



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**“Caracterización de la proteína membranal Sphbp-37 de
Streptococcus pneumoniae con capacidad de unir hemo y
hemoglobina”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. MARÍA ELENA ROMERO ESPEJEL

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directores de tesis: Dr. José de Jesús Olivares Trejo
 Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Ciudad de México

MARZO 2017

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORES

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

CINVESTAV-IPN

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

CINVESTAV-IPN

Dra. Rosa María del Angel Núñez de Cáceres

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

CINVESTAV-IPN

Dr. Juan Ernesto Ludert León

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

CINVESTAV-IPN

Dr. José Tapia Ramírez

Departamento de Genética y Biología Molecular

CINVESTAV-IPN

Dra. Norma Velázquez Guadarrama

Laboratorio de Infectología

Hospital Infantil de México Federico Gómez

AGRADECIMIENTOS

El proyecto de investigación descrito en esta tesis contó con el apoyo y respaldo académico del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional CINVESTAV-IPN, al cual agradezco profundamente por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo y desarrollarme dentro de esta institución.

Agradezco el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) para la realización del presente trabajo. (Proyecto número CB-222180).

Agradezco también al CONACyT la beca de estudios de Doctorado otorgada durante el periodo Febrero 2013 a Enero 2017.

A los Dres. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez y José de Jesús Olivares Trejo agradezco que me hayan aceptado en su grupo de trabajo, el apoyo, el tiempo y la paciencia que incondicionalmente me brindaron, así como la formación académica que me otorgaron.

A los Dres. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, Rosa María del Angel Núñez de Cáceres, Juan Ernesto Ludert León, José Tapia Ramírez y Norma Velázquez Guadarrama por sus consejos y recomendaciones para concluir mi proyecto de tesis.

A Carlos Calzada Vázquez, a Mario Rodríguez Nieves por su apoyo, amabilidad y amistad sincera.

A los compañeros de laboratorio del CINVESTAV y UACM por sus consejos y amistad.

DEDICATORIA

A mi hija *Isabella Mariel Esquivel Romero* y a mi esposo *Luis Genaro Esquivel Arvizú* por llegar a mi vida y quedarse para siempre en ella.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA	1
1.1 Características generales de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
1.2 Características morfológicas de <i>S. pneumoniae</i>	3
1.3 Características genómicas de <i>S. pneumoniae</i>	3
1.4 Epidemiología de <i>S. pneumoniae</i>	4
1.5 Factores de virulencia de <i>S. pneumoniae</i>	7
1.6 Importancia clínica de <i>S. pneumoniae</i>	8
1.7 Diagnóstico.....	9
1.8 HIERRO	10
1.8.1 Importancia del hierro en los seres vivos	10
1.8.2 Disponibilidad de hierro en el organismo humano.....	11
1.8.3 Clasificación de fuentes de hierro en el organismo humano	13
1.8.4 Importancia del hierro para los microorganismos	16
1.8.5 Mecanismos de adquisición de hierro en microorganismos patógenos.....	16
1.8.6 Mecanismo indirecto. Sideróforos y hemóforos	17
1.8.7 Mecanismo directo	18
1.8.7.1 Receptores para sideróforos y hemóforos	18
1.8.7.2 Receptores para transferrina y Lactoferrina	19
1.8.7.3 Receptores de hemo y hemoglobina.....	19
1.9 Transporte del hierro a través de la membrana citoplasmática	20
1.10 Importancia de los transportadores ABC.....	21
1.11 Mecanismo de adquisición en <i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.12 Mecanismo de adquisición en <i>Streptococcus pyogenes</i>	23

2. ANTECEDENTES PARTICULARES	25
2.1 Mecanismo de adquisición de hierro de <i>S. pneumoniae</i>	25
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	30
II. OBJETIVOS	31
1. OBJETIVO GENERAL	31
2. OBJETIVOS PARTICULARES	31
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1 Recuperación de la cepa R-6 de <i>S. pneumoniae</i>	33
4.2 Cultivo de <i>S. pneumoniae</i>	33
4.3 Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	34
4.4 Extracción de RNA	34
4.5 RT-PCR semicuantitativa	34
4.6 Obtención de DNA genómico de <i>S. pneumoniae</i>	35
4.7 Aislamiento del plásmido <i>pGEX-6P-1</i>	36
4.8 Amplificación del gen codificante de la proteína Sphbp-37 de <i>S. pneumoniae</i>	36
4.9 Purificación del DNA a partir de geles de agarosa	37
4.10 Digestión de los fragmentos de PCR y del plásmido <i>pGEX-6P-1</i>	38
4.11 Ligación	38
4.12 Preparación de bacterias competentes de <i>E. coli</i>	38
4.13 Transformación de células competentes	39
4.14 Selección y caracterización de las clonas	39
4.15 Expresión de las proteínas recombinantes	40
4.16 Análisis y solubilización de los cuerpos de inclusión	41
4.17 Purificación de la proteína recombinante	42
4.18 Corte enzimático de la etiqueta de GST	42
4.19 Producción de anticuerpos específicos	42

4.20	Inmunodetección por Western Blot.....	43
4.21	Microscopía electrónica.....	44
4.22	Crecimiento de <i>S. pneumoniae</i> en presencia de Hb y anticuerpos	
	Anti Spbhp-37-GST.....	44
4.23	Obtención de extractos totales de proteínas de <i>S. pneumoniae</i>	45
4.24	Determinación de la concentración de proteína	45
4.25	Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes	46
4.26	Ensayos de Overlay	46
4.27	Resonancia de plasmón en superficie (SPR).....	47
4.28	Metodología <i>in silico</i>	48
	4.28.1 Generación del modelo 3D.....	48
	4.28.2 Simulaciones de dinámica molecular	48
	4.28.3 Análisis de trayectoria y acoplamiento (docking)	49
V.	RESULTADOS	50
5.1	Análisis e identificación del péptido señal y la secuencia	
	lipobox de la lipoproteína Sphbp-37	50
5.2	Niveles de expresión del gen <i>spbhp-37</i> en presencia de Hb.....	50
5.3	Clonación, expresión y solubilidad de la proteína recombinante Sphbp-37	53
5.4	Obtención de los anticuerpos anti-Spbhp-37.....	59
5.5	La proteína Spbhp-37 se incrementa en la superficie de <i>S. pneumoniae</i>	
	cuando se cultivó con Hb como única fuente de hierro.....	61
5.6	Anticuerpos anti Spbhp-37-GST limitan el crecimiento celular	
	cuando Hb se suministra como la única fuente de hierro	63
5.7	La proteína Sphbp-37 tiene la capacidad de unir Hb	65
5.8	Spbhp-37 tiene una alta afinidad por Hb	67
5.9	Modelo tridimensional de la proteína Sphbp-37	70
5.10	El análisis de acoplamiento predice la unión entre la proteína	
	Sphbp-37 y el grupo hemo	72
5.11	Modelo tridimensional de la proteína Sphbp-37 mutada	73

VI. DISCUSIÓN 74
VII. CONCLUSIONES 79
VIII. PERSPECTIVAS 80
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Microscopia electrónica de *S. pneumoniae* en cadenas.
- Figura 2 Enfermedades causadas por *S. pneumoniae*.
- Figura 3 Morfología colonial y morfología microscópica de *S. pneumoniae*.
- Figura 4 Reacciones óxido-reducción en presencia de hierro y generación de especies reactivas de oxígeno
- Figura 5 Distribución del contenido de hierro total en el organismo humano
- Figura 6 Distribución de hierro a los órganos y tejidos en el organismo humano
- Figura 7 Estructura de la Hemoglobina y del grupo hemo
- Figura 8 Mecanismo de captación de hierro para hemóforos y Hemoproteínas en bacterias Gram negativas
- Figura 9 Mecanismo de adquisición de hemo en *Staphylococcus aureus*
- Figura 10 Mecanismo de adquisición de hemo en *Streptococcus pyogenes*
- Figura 11 Transferencia del grupo hemo mediante complejo ternario
- Figura 12 Purificación de proteínas de membrana de *S. pneumoniae* que unen hemo
- Figura 13 Ensayo de Overlay y tinción con azul de Coomassie para demostrar la competencia de la vitamina B12 con el hemo de la Hb

- Figura 14 Estrategia experimental desarrollada
- Figura 15 Caracterización estructural de la proteína Spbhp-37
- Figura 16 La Hb aumenta la expresión del RNAm del gen *spbhp-37*
- Figura 17 Amplificación por PCR del gen *spbhp-37* de *S. pneumoniae*
- Figura 18 Clonación del gen Spbhp-37 en el plásmido *pGEX-6P-1*
- Figura 19 Inducción de la proteína recombinante Spbhp-37 en el vector *pGEX-6P-1*
- Figura 20 Análisis de la solubilidad de la proteína recombinante Spbhp-37
- Figura 21 Solubilización de la proteína recombinante Spbhp-37 y producción de anticuerpos contra ella
- Figura 22 Inmunolocalización de la proteína Spbhp-37
- Figura 23 Los anticuerpos anti-Spbhp-37-GST bloquean el crecimiento celular de *S. pneumoniae*
- Figura 24 La Hb se une a la proteína Spbhp-37
- Figura 25 Purificación de la proteína recombinante Spbhp-37 sin la etiqueta de GST
- Figura 26 Análisis cuantitativo de la interacción de Hb y la proteína Spbhp-37 mediante la técnica SPR (Surface Plasmon Resonance)
- Figura 27 Modelo tridimensional de la proteína Spbhp-37 antes y después de 500 ns de simulación en la dinámica molecular obtenida con el servidor I-TASSER

- Figura 28 Análisis estructural de la proteína Sphbp-37
- Figura 29 Análisis de acoplamiento molecular entre la proteína Sphbp-37 y el grupo hemo
- Figura 30 Modelo tridimensional de la proteína Sphbp-37 mutada antes y después de 500 ns de simulación en la dinámica molecular obtenida con el servidor I-TASSER.
- Figura 31 Mecanismo propuesto de adquisición de hemo en *Streptococcus pneumoniae*.

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1 Número de aislamientos invasores por grupos de edad y por fuente (Hemocultivo, Líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, otros).
- Tabla 2 Número de aislamientos invasores por grupos de edad y por diagnóstico.
- Tabla 3 Clasificación y características principales de proteínas que unen hierro y el grupo hemo.
- Tabla 4 Sistema de adquisición de hierro por patógenos.
- Tabla 5 Proteínas membranales que unen el grupo hemo en *S. pneumoniae* identificadas por espectrometría de masas.
- Tabla 6 Composición de Caldo Todd Hewitt
- Tabla 7 Secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes
- Tabla 8 Valores de las constantes de afinidad de los receptores de hemoglobina en bacterias

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Proteína de unión a ATP
ATP	Trifosfato de adenosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Dithitritol
EDTA	Ácido Etilén Diamino Tetra-acético
ENI	Enfermedad Neumocócica Invasiva
g	Gramos
h	Horas
Hb	Hemoglobina
kDa	Kilodaltones
Lbp	Lactoferrin binding protein
m	Minutos
mL	Mililitros
mM	Mili molar
mm	milímetros
min	minutos
NaCl	Cloruro de Sodio
OMS	Organización Mundial de Salud
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer salino de fosfato
PBT	Periplasmic binding dependent transport
PCV7	Vacuna antineumocócica conjugada 7 valente
Pit	Pneumococcal iron transporter
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SIREVA	Sistema Regional de Vacunas
Sphbp-37	<i>Streptococcus pneumoniae</i> hemoglobin and heme binding protein
Tbp	Transferrin binding protein

TEMED	N, N, N', N'', Tetra Metilen Diamina
TH	Todd Hewitt
xg	Gravedades
μg	Microgramos

RESUMEN

Streptococcus pneumoniae es el principal agente causante de la neumonía bacteriana, sinusitis y otitis media. También puede causar enfermedades invasivas como meningitis, bacteriemias y septicemias. Este patógeno causa una considerable morbilidad y mortalidad en todo el mundo, especialmente niños, adultos mayores y personas inmunocomprometidas. La hemoglobina (Hb) y el hemo pueden restablecer el crecimiento y viabilidad celular del *S. pneumoniae* utilizadas como únicas fuentes de hierro. Desafortunadamente, el mecanismo de adquisición de hemo y hemoglobina esta bacteria ha sido poco estudiado. En nuestro laboratorio hemos purificado siete proteínas de membrana por cromatografía de afinidad al grupo hemo y al menos dos de ellas: Spbhp-22 y Spbhp-37 fueron identificadas como proteínas de unión a Hemo y Hb. Además, Spbhp-37 se identificó como lipoproteína por espectrometría de masas. Curiosamente, varias proteínas requeridas para la virulencia en bacterias gram-positivas son lipoproteínas, por ejemplo, FhuD, que actúa como transportador de hierro. La lipoproteína Spbhp-37 fue inmunolocalizada por microscopía electrónica de transmisión utilizando anticuerpos específicos contra la proteína recombinante. La expresión del gen spbhp-37 se incrementó cuando las bacterias se hicieron crecer en medio de cultivo suministrado con Hb como única fuente de hierro. La proteína recombinante Spbhp-37 de *S. pneumoniae* une Hb humana con un alta constante de afinidad. Además, se realizó el acoplamiento molecular de la lipoproteína Spbhp-37 con el grupo hemo utilizando el software Moe para identificar los residuos de aminoácidos involucrados en la unión. En resumen, en este trabajo presentamos los primeros hallazgos que intentan explicar el mecanismo involucrado en la adquisición de hierro de este patógeno.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is the main causative agent of bacterial pneumoniae, sinusitis and otitis media. It also can cause invasive diseases such as meningitis, bacteremia and septicemia. This pathogen causes considerable morbidity and mortality throughout the world, especially among young infants, elderly and immunocompromised individuals. Haemoglobin (Hb) and haem can support the *S. pneumoniae* growth and viability as sole iron sources. Unfortunately, the mechanism of Hb and haem-uptaking in this bacterium has been poorly studied. We have purified seven membrane proteins by haem-affinity chromatography and two of them: Spbhp-22 and Spbhp-37 (*S. pneumoniae* binding haem-protein) were identified as potential *S. pneumoniae* haem- and Hb-binding proteins. Additionally, Spbhp37 was identified as lipoprotein by Mass spectrometry. Interestingly, several proteins required for virulence in gram-positive bacteria are lipoproteins, for instance FhuD, which acts as iron-siderophore transporter. Spbhp-37 was immunolocalized by transmission electron microscopy using specific antibodies raised against the recombinant protein. The expression of *spbhp-37* gene was increased when bacteria were grown in media culture supplied with Hb as only iron source. In addition, the affinity of Spbhp-37 for Hb was determined. Besides, we performed the molecular docking of Spbhp-37 with haem using the software Moe to identify the amino acid residues involved in the binding of these iron sources. In summary, in this work we are presenting the first findings that attempt to explain the mechanism involved in iron acquisition of this pathogen.

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

1.1 Características generales de *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae es una bacteria patógena oportunista, habitualmente forma parte de la flora comensal de la nasofaringe humana (Bogaert *et al*, 2004). Fue descubierta simultáneamente por Sternberg en Estados Unidos y Pasteur en Francia en 1881. La bacteria crece en forma de cadenas (Tomasz, 1970) (Figura 1).



Figura 1. Microscopía electrónica de *S. pneumoniae* en cadenas (Philips, 1993).

Los medios de cultivo en los que crece *S. pneumoniae* son ricos en vitaminas y aminoácidos, un requerimiento indispensable es la colina, necesario para que sintetice en su pared celular los ácidos teicoicos y lipoteicoicos (Benton *et al*, 1997).

Este microorganismo es un estreptococo que se clasifica, según el manual de Bergey (2010), dentro de la familia *Streptococcaceae* y género *Streptococcus*. Estas bacterias son microaerobias, catalasa negativa que crecen en medios enriquecidos con 10% de sangre y en medio líquido Todd Hewitt suplementado con extracto de levadura 0.05% (Toumanen *et al*, 2004).

S. pneumoniae es uno de los patógenos más frecuentes adquiridos en la comunidad (Butler, 2004; Gray *et al*, 1979). En niños menores de cinco años, en adultos mayores de setenta años y en personas inmunocomprometidas causa infecciones como otitis media, sinusitis o neumonía (Figura 2) que pueden ir acompañadas de otras enfermedades como meningitis y bacteriemias (Thornton *et al*, 2010; Yaro *et al*, 2006). La colonización de la nasofaringe es un paso previo al desarrollo de enfermedad ocasionada por *S. pneumoniae* y las tasas más elevadas de colonización se encuentran en los niños, especialmente en los de edad preescolar (Bogaert *et al*, 2004).

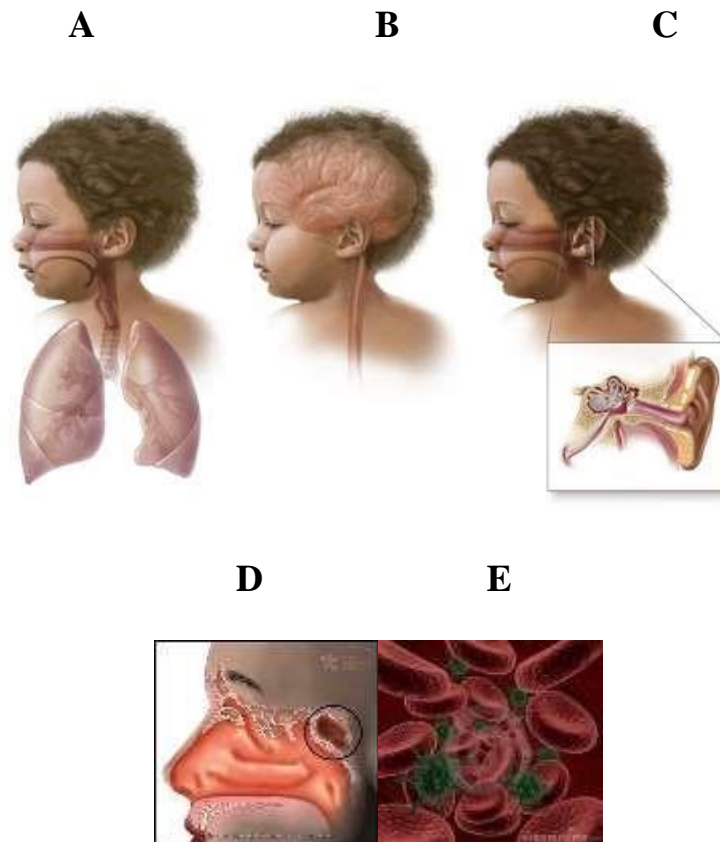


Figura 2. Enfermedades causadas por *S. pneumoniae*. Microorganismo patógeno capaz de causar diversas infecciones y procesos invasivos severos. Las enfermedades frecuentemente causadas por esta bacteria son: Neumonía (A), Meningitis (B), Otitis media (C), Sinusitis (D) y Bacteriemias (E).

1.2 Características morfológicas de *S. pneumoniae*

Las bacterias *S. pneumoniae* se arreglan en pares formando diplococos o cadenas cortas y disponen de una cápsula gruesa de polisacáridos, presentan α -hemólisis cuando crecen en medios de agar-sangre debido a la producción de neumolisina que hidroliza la hemoglobina y eritrocitos dando lugar a un pigmento verdoso (Roca *et al*, 2006). Este microorganismo crece formando colonias redondas, mucosas y no pigmentadas de 1-3 mm de diámetro, después de 48 horas presentan un aspecto con una depresión central producida por una autólisis celular progresiva (Figura 3A) (Tomasz y Mosser, 1966; Winn, 2008). En la tinción de Gram aparecen como diplococos Gram positivos (Figura 3B); presentan óvalos y poseen un tamaño de 0.8 μm de diámetro y una longitud de 1.2-1.8 μm (Madigan *et al*, 2004).

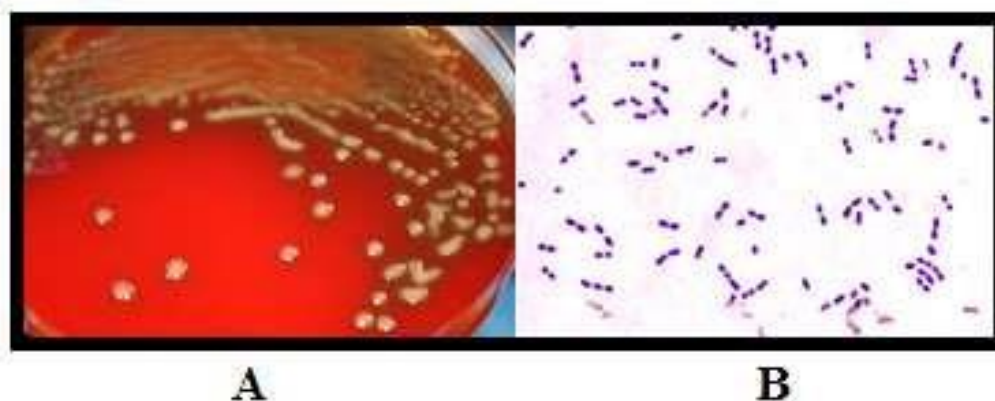


Figura 3. Morfología colonial y morfología microscópica de *S. pneumoniae*. A) Colonias de *Streptococcus pneumoniae* con α -hemólisis (Romero, M.E. UACM, 2014). (B) Tinción de Gram de *S. pneumoniae* aparece en diplococos o cadenas cortas (modificada de Winn, 2008).

1.3 Características genómicas de *S. pneumoniae*

Aunque muchas de las características del genoma de *S. pneumoniae* ya se habían analizado en un estudio de un conjunto de secuencias cortas que cubría el 95% del genoma (Baltz *et al*, 1998), se han realizado análisis más precisos como consecuencia de la reciente publicación de las secuencias genómicas completas de dos cepas de *S. pneumoniae*: TIGR4 de serotipo 4 (Tettelin *et al*, 2001) y la cepa de laboratorio R6 derivada de un serotipo 2 (Hoskins *et al*, 2001). También se ha secuenciado más del 90% del genoma de una cepa de serotipo 19F

(Dopazo *et al*, 2001). De estos trabajos se deduce que el cromosoma único y circular de *S. pneumoniae* tiene un tamaño ligeramente superior a 2 Mpb con un número estimado de genes que podría superar los 2,000 aunque no se conoce el número exacto por existir más de 400 marcos abiertos de lectura (ORFs) con un tamaño inferior a 100 codones, esto aún no ha sido demostrado. De 55-64% de los genes se les han asignado funciones y aproximadamente 20% no presenta homólogos en las bases de datos (Butler, 1999). Es notable la presencia de muchas secuencias de inserción y transposasas que ocupan más del 3.5% del genoma (Tettelin *et al*, 2001), más que en ningún otro organismo con genoma secuenciado.

1.4 Epidemiología de *S. pneumoniae*

Existen diferentes clasificaciones serológicas para *S. pneumoniae*, la americana asigna números cronológicamente considerando su aislamiento, mientras que la clasificación danesa está basada en características antigénicas (Henrichsen, 1995).

En todo el mundo existen 90 serotipos de *S. pneumoniae*, 23 representan más del 88% de las bacteriemias y meningitis (Musher, 2000) y alrededor de la mitad han sido implicados en distintas enfermedades. Lo anterior ha complicado el desarrollo de una vacuna con cobertura total para todos los serotipos existentes. La distribución de los serotipos patógenos varía a lo largo del tiempo y está en función de la edad, la enfermedad, su gravedad y la región geográfica (Johnson *et al*, 2010). Antes de la introducción de las vacunas antineumocócicas conjugadas (PCV), 70% o más de todas las Enfermedades Neumocócicas Invasivas (ENI) en niños eran causadas por los serotipos 6 y 11 a nivel mundial (Johnson *et al*, 2010).

De los 8.8 millones de muertes de menores de cinco años que se reportaron en el mundo durante el 2008, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que alrededor de 476,000 fueron causadas por infecciones causadas por *S. pneumoniae* (O'Brien *et al*, 2009). Las tasas de morbilidad y mortalidad son mayores en los países en desarrollo que en los industrializados y la mayoría de las muertes se producen en África y Asia. Antes de la inmunización generalizada con la vacuna antineumocócica conjugada heptavalente (PCV7), la incidencia anual media de ENI en menores de dos años era de 44.4/100 000 en Europa y de 167/100 000 en los Estados Unidos de Norteamérica (Isaacman *et al*, 2010; Black *et al*,

2008). En comparación, en África la incidencia anual de ENI en menores de dos años oscilaba entre 60/100 000 en Sudáfrica y 797/100 000 en Mozambique (Roca *et al*, 2006; Klugman y Feldman, 2001; Cutts *et al*, 2005).

En México las infecciones de vías respiratorias continúan siendo una de las 10 primeras causas de morbilidad y mortalidad en los menores de cinco años de edad (Echániz, 1997). En las infecciones de origen comunitario los principales agentes etiológicos son virus y bacterias. Entre las bacterias, *Haemophilus influenzae*, *S. pneumoniae* y *Moraxella catharralis* son las que se aíslan con mayor frecuencia (Echániz, 1997; Mulholland, 1999).

S. pneumoniae tiene una gran relevancia en la salud pública en México, 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.

Las infecciones invasivas por *S. pneumoniae* constituyen un serio problema de salud pública en países en desarrollo por las elevadas tasas de mortalidad que producen (Musher, 2000). Tan solo en el año 2011 se reportaron 241 casos de personas infectadas en México con *S. pneumoniae*, según el informe regional SIREVA II de ese año. En su mayoría esas infecciones causaron neumonía 56%, meningitis 16.2%, bacteriemia 14.1%, septicemia 5.0% y otras infecciones 8.7% (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Número de aislamientos invasores por grupos de edad y por fuente (Hemocultivo, Líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, otros). SIREVA II, 2011.

Grupos de edad	Fuente								Total	
	Hemocultivo		LCR		Líquido pleural		Otros*			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<12 meses	12	31,6	7	18,4	1	2,6	18	47,4	38	15,8
12-23 meses	6	19,4	1	3,2	4	12,9	20	64,5	31	12,9
24-59 meses	5	9,4	6	11,3	18	34,0	24	45,3	53	22,0
Total <5 años	23	18,9	14	11,5	23	18,9	62	50,8	122	50,6
5-14 años	15	30,0	7	14,0	3	6,0	25	50,0	50	20,7
15-29 años	7	46,7	4	26,7	0	0,0	4	26,7	15	6,2
30-49 años	4	22,2	5	27,8	1	5,6	8	44,4	18	7,5
50-59 años	3	33,3	2	22,2	0	0,0	4	44,4	9	3,7
≥60 años	7	26,9	5	19,2	2	7,7	12	46,2	26	10,8
Total ≥50 años	10	28,6	7	20,0	2	5,7	16	45,7	35	14,5
Sin dato**	0	0,0	1	100,0	0	0,0	0	0,0	1	0,4
Total	59	24,5	38	15,8	29	12,0	115	47,7	241	100,0

*otros líquidos corporales estériles. **sin dato de edad

Tabla 2. Número de aislamientos invasores por grupos de edad y por diagnóstico. SIREVA II, 2011.

Grupos de edad	Diagnóstico										Total	
	Neumonía		Meningitis		Sepsis		Bacteriemia		Otras*			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<12 meses	16	42,1	7	18,4	4	10,5	7	18,4	4	10,5	38	15,8
12-23 meses	22	71,0	1	3,2	0	0,0	4	12,9	4	12,9	31	12,9
24-59 meses	39	73,6	7	13,2	1	1,9	3	5,7	3	5,7	53	22,0
Total <5 años	77	63,1	15	12,3	5	4,1	14	11,5	11	9,0	122	50,6
5-14 años	25	50,0	7	14,0	5	10,0	7	14,0	6	12,0	50	20,7
15-29 años	4	26,7	4	26,7	1	6,7	5	33,3	1	6,7	15	6,2
30-49 años	10	55,6	5	27,8	1	5,6	2	11,1	0	0,0	18	7,5
50-59 años	5	55,6	2	22,2	0	0,0	2	22,2	0	0,0	9	3,7
≥60 años	14	53,8	5	19,2	0	0,0	4	15,4	3	11,5	26	10,8
Total ≥50 años	19	54,3	7	20,0	0	0,0	6	17,1	3	8,6	35	14,5
Sin dato**	0	0,0	1	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,4
Total	135	56,0	39	16,2	12	5,0	34	14,1	21	8,7	241	100,0

* otras enfermedades invasoras. **sin dato de edad

1.5 Factores de virulencia *S. pneumoniae*

Se han descrito diferentes moléculas que participan en la virulencia de *S. pneumoniae*, entre ellas se encuentran:

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 adhiriéndose a la capa mucosa e interactuando con componentes como la mucina. Como resultado de esta interacción se produce el daño (Davies *et al*, 1995).

Pneumolisina. Son proteínas tóxicas, conocidas como toxinas formadoras de poro (PLY), pueden lisar cualquier célula eucariota con colesterol en su membrana (Benton *et al*, 1997).

Neuraminidasa. 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).

Cápsula polisacárida. Es una estructura externa a la pared celular de naturaleza polisacárida, indispensable para la patogénesis de las infecciones causadas por *S. pneumoniae*. 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).

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. 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* (Davies *et al*, 1995).

Mecanismos de adquisición de hierro. La capacidad de adquirir hierro en condiciones de baja disponibilidad se encuentra relacionada con la virulencia en una gran cantidad de bacterias patógenas. Tal es el caso particular de las proteínas Pit1A y Pit2A (Brown, 2001).

1.6 Importancia clínica de *S. pneumoniae*

S. pneumoniae puede colonizar al individuo en su primer día de vida para pasar a formar parte de la flora comensal de su nasofaringe (Gundel y Schwarz, 1932). El porcentaje de portadores para uno o más serotipos es del 40%, siendo superior en niños y disminuyendo en personas de edad avanzada (Austrian, 1986).

Aunque el número de portadores disminuye con la vacunación, éstos son especialmente importantes para el mantenimiento de cepas virulentas o resistentes a antibióticos, ya que pueden ser transmitidas a individuos pertenecientes a grupos de riesgo o adquirir nuevas resistencias de microorganismos cercanos filogenéticamente. La transmisión ocurre preferentemente a través de pequeñas gotas de saliva que se dispersan por el aire a distancias cercanas, pero suficiente para pasar de cama en cama dentro de un hospital y a través de contacto con manos contaminadas con secreciones (Schaechter *et al*, 1993). Después de una exposición exógena, y si hay predisposición a la enfermedad, los primeros síntomas pueden aparecer entre 24 horas y tres días (Evans y Brachman, 1991).

Los grupos de riesgo son principalmente niños, ancianos, personas con alteraciones congénitas o adquiridas del sistema inmunológico, alcohólicos, enfermos pulmonares,

cardiacos, diabéticos e individuos mal nutridos (Mandell *et al*, 1995). Bajo determinadas circunstancias *S. pneumoniae* puede moverse desde la nasofaringe a otros nichos ecológicos (Klugman y Feldman, 2001). Puede alcanzar los senos nasales y las trompas de Eustaquio causando sinusitis y otitis media, respectivamente, lo que es muchas veces propiciado por la acumulación de moco por una enfermedad vírica previa (generalmente gripe) o alérgica, ya que de otro modo suele producirse una eliminación inmediata del microorganismo (Konttinen y Sivonen, 1987). Si llega al pulmón, puede causar neumonía (Hoskins *et al*, 2001). Una complicación grave de la neumonía se produce cuando el microorganismo alcanza la pleura y comienza a dividirse, causando un síndrome denominado empiema que precisa de una terapia intensa (Schaechter *et al*, 1993). A través de roturas en la discontinuidad del epitelio de la nasofaringe o pulmonar puede llegar a los vasos linfáticos locales, posteriormente al conducto linfático torácico y alcanzar desde ahí el torrente sanguíneo a la altura de la vena subclavia del cuello (Gundel y Schwarz, 1932).

Una vez en la sangre existe riesgo de septicemia que puede ser fatal especialmente en individuos con pérdida de la función del bazo (Hosea *et al*, 1981). Por el sistema circulatorio puede alcanzar diversos nichos ecológicos entre los que destacan las meninges y causar meningitis, un síndrome altamente dependiente de la reacción inflamatoria mediada por citoquinas inflamatorias como TNF α , que también daña la barrera hematoencefálica (Sharief *et al*, 1992). Sin embargo, también puede producirse meningitis mediante el paso directo de *S. pneumoniae* desde la nasofaringe a través de fracturas craneales (Hand y Sanford, 1970).

Es importante resaltar que el *S. pneumoniae* es el principal agente causante de meningitis en adultos, excepto en las epidemias causadas por *Neisseria meningitidis* (Luby, 1992). Otros lugares potencialmente alcanzables a través del torrente sanguíneo son el endocardio y el pericardio, las articulaciones, el peritoneo y otros tejidos blandos (Hosea *et al*, 1981).

1.7 Diagnóstico

En el laboratorio clínico se usan clásicamente cuatro pruebas para el diagnóstico diferencial de *S. pneumoniae* frente a los estreptococos del grupo viridans: la morfología de la colonia, la sensibilidad a optoquina (Opt) (Lund, 1959), la solubilidad en bilis (Neufeld, 1900) y la aglutinación con anticuerpos dirigidos a polisacáridos de la cápsula (reacción de Quellung)

(Neufeld, 1902). Algunos aislados clínicos de *S. pneumoniae* muestran reacciones anómalas a una o varias de estas pruebas (Kontiainen y Sivonen, 1987; Lund, 1959; Finland y Barnes, 1977) y son clasificados como neumococos atípicos (Kellogg *et al.*, 2001). Se ha utilizado una sonda comercial específica (AccuProbe) que detecta el 16S rRNA de *S. pneumoniae* con una efectividad del 100%, pero su uso es económicamente inviable en el diagnóstico rutinario. La efectividad del uso de la PCR para la detección de genes que codifican factores de virulencia de *S. pneumoniae*, como el de la neumolisina (Salo *et al.*, 1995) y el de la autolisina (Pozzi *et al.*, 1989; Fenoll *et al.*, 1990), está comprometida por la existencia de estos genes en algunos estreptococos viridans (Whatmore *et al.*, 2000).

1.8 HIERRO

1.8.1 Importancia del hierro en los seres vivos

El hierro es un mineral que se encuentra en la naturaleza en dos estados de oxidación, Fe^{3+} o Fe^{2+} . Este catión es esencial para los seres vivos debido a sus propiedades como elemento prostético altamente versátil que se incorpora a proteínas como un cofactor de proteínas hierro-azufre (Horton *et al.*, 2002), siendo un agente reductor en diversos procesos celulares. En la respiración celular juega un papel importante en la transferencia de electrones, formando parte de moléculas clave como los citocromos (Crosa y Walsh, 2002). Además, también forma parte de la ribonucleótido reductasa y de otros componentes relacionados con el metabolismo y la biosíntesis de macromoléculas como ácidos grasos y el DNA, donde participa en la síntesis de bases pirimidínicas (Crosa y Walsh, 2002; Ratledge y Dover, 2000; Köster, 2001).

El hierro libre es extremadamente tóxico en condiciones aeróbicas y además es una fuente de radicales peligrosos para la célula, debido a que si hay hierro libre en el citoplasma celular, se forman especies reactivas de oxígeno reducido como se muestra en la Figura 5. Existen especies como los radicales hidroxilos (OH^\cdot), aniones superóxidos (O_2^-) y peróxidos (RO_2) que se originan a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Figura 4) (Touati, 2000). Estos radicales libres pueden afectar los sistemas vivos dañando membranas lipídicas, proteínas y ácidos nucleicos (Zheng *et al.*, 1999; Wandersman y Delepelaire, 2004), por lo que la célula debe eliminarlos antes de que causen daños significativos (Hansberg, 2002).

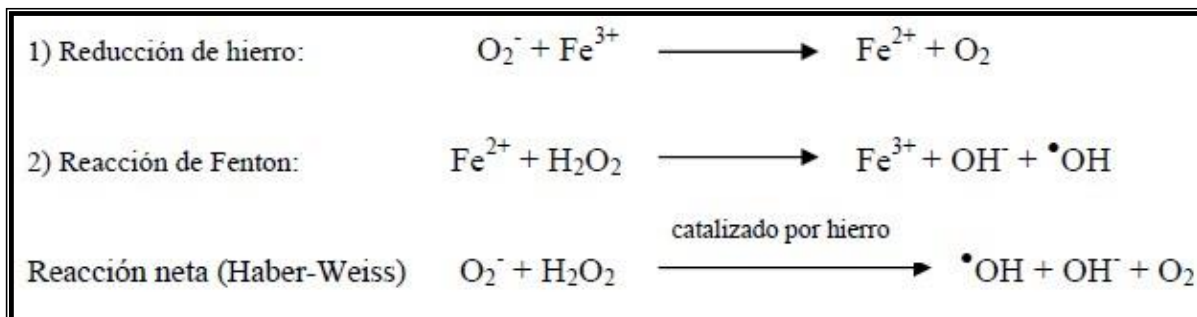


Figura 4. Reacciones óxido-reducción en presencia de hierro y generación de especies reactivas de oxígeno (modificada de Andrews *et al*, 2003).

1.8.2 Disponibilidad de hierro en el organismo humano

Para evitar la toxicidad del hierro libre la mayor parte de este elemento es captada por proteínas especializadas llamadas metaloproteínas que unen hierro libre (ferriproteínas) o acoplado al grupo *hemo* (hemoproteínas) (Tabla 3) (Baker *et al*, 2003).

Aproximadamente 65% del hierro presente en individuos sanos forma parte de la **hemoglobina**, la cual viaja en los glóbulos rojos y realiza el transporte de oxígeno (Forrelat *et al*, 2000; Baker *et al*, 2003). También este elemento se puede almacenar intracelularmente en forma de **ferritina**, principalmente en los hepatocitos; otra fracción es almacenada en macrófagos de hígado, bazo, médula ósea y en el músculo como **mioglobina** (Forrelat *et al*, 2000; Baker *et al*, 2003). Una pequeña fracción del hierro corporal total se halla en proteínas extracelulares como **transferrina o lactoferrina**. Cantidades más pequeñas de hierro se encuentran en diversas *hemoproteínas* (citocromos, catalasas, peroxidasas) y enzimas no relacionadas al grupo *hemo* como ribonucleótido reductasas, metaloflavoproteínas y proteínas con núcleos hierro-azufre (Forrelat *et al*, 2000).

El contenido total de hierro presente en el humano, 80% se encuentra como hierro funcional. La Hb representa 65%, la mioglobina 10% y otras enzimas 5%; 20% restante de hierro total forma el depósito de hierro (ferritina y hemosiderina) y sólo un pequeño porcentaje es requerido para el transporte de hierro (transferrina) (Figura 5).

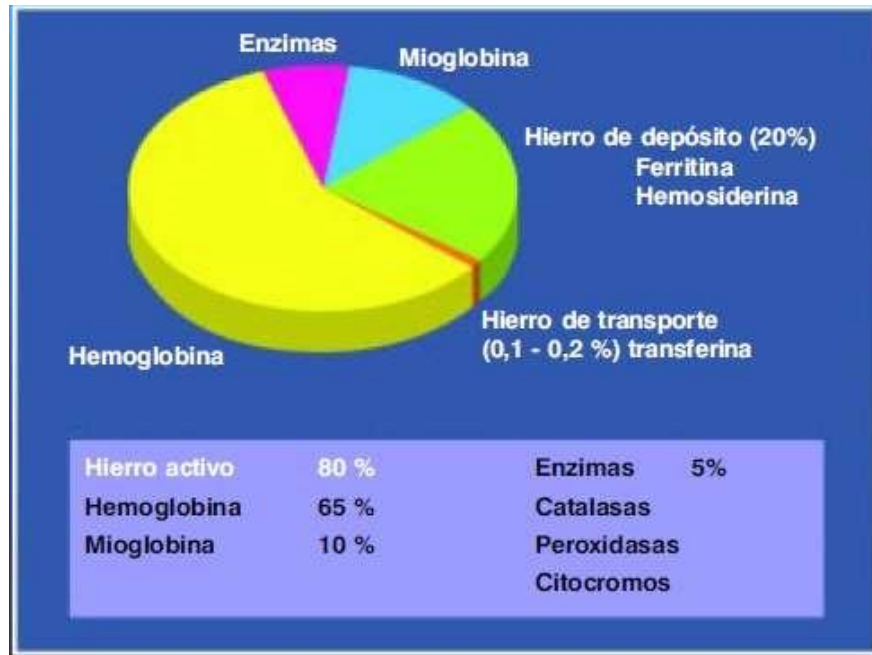


Figura 5. Distribución del contenido de hierro total en el organismo humano (Forrelat *et al*, 2000).

El hierro se distribuye hacia diferentes órganos y tejidos en el organismo humano; su transporte es llevado a cabo por diferentes proteínas y enzimas, por ejemplo, el hierro de la dieta es transportado por la transferrina al tejido muscular (mioglobina) y/o puede almacenarse hierro en el hígado (ferritina) (Figura 6).

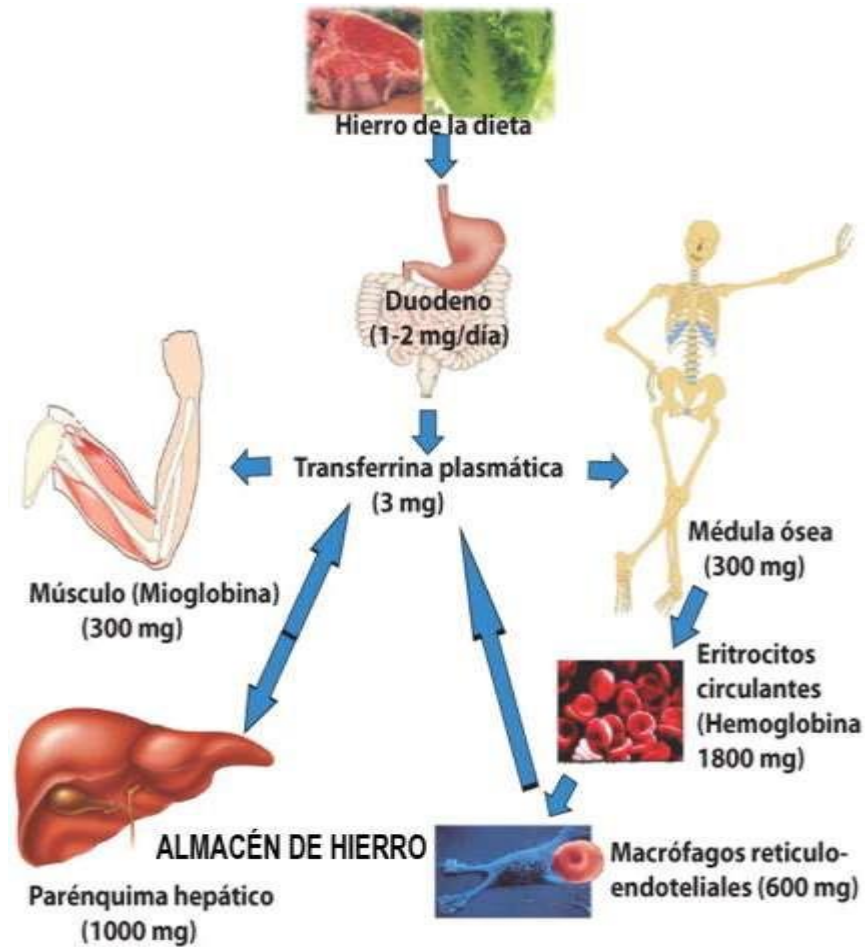


Figura 6. Distribución de hierro a los órganos y tejidos en el organismo humano (De la Garza *et al.* 2010).

1.8.3 Clasificación de fuentes de hierro en el organismo humano

Las proteínas especializadas que se encuentran como fuentes de almacén del hierro en el organismo humano se clasifican en dos grupos: proteínas que unen hierro (ferriproteínas) y proteínas que unen el grupo hemo (hemoproteínas) (Baker *et al.*, 2003). En la tabla 1 se presenta la clasificación y las características principales de las metaloproteínas que unen hierro y el grupo hemo; se indica el peso molecular aproximado de las proteínas en kDa, así como la función y localización en el cuerpo humano (Forrelat *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2003).

Tabla 3. Clasificación y características principales de proteínas que unen hierro y el grupo hemo.

PROTEÍNAS QUE UNEN HIERRO LIBRE			
Proteína	Peso Molecular (kDa)	Función	Localización
Lactoferrina	80	Protege al organismo al quelar el hierro libre y tiene actividad bacteriolítica	Suero y mucosas
Transferrina	80	Transporta y almacena hierro	Suero
Ferritina	900	Almacena hierro y lo pone a disposición del organismo	Hígado
PROTEÍNAS QUE UNEN EL GRUPO HEMO			
Proteína	Peso Molecular (kDa)	Función	Localización
Mioglobina	17.8	Transporte de Oxígeno	Músculo
Hemopexina	60	Une hierro y lo entrega a los hepatocitos	Suero
Albúmina	68	Une átomos de hierro y acarrea grupos hemo	Suero
Hemoglobina	64.5	Transporta O ₂ y CO ₂	Eritrocitos
Haptoglobina	80-160	Une hemoglobina libre	Suero
Catalasa	244	Cataliza la descomposición del H ₂ O ₂ en H ₂ O y O ₂	Peroxisomas
Citocromos	Variable	Transporte de energía	Membrana citoplasmática/ mitocondrial

Una de las principales hemoproteínas es la **hemoglobina**, es una proteína globular presente en los hematíes en altas concentraciones (Tabla 3), está encargada de fijar oxígeno en los pulmones y transportarlo por la sangre hacia los tejidos y células que rodean los capilares del sistema vascular. Al volver a los pulmones desde la red de capilares, la hemoglobina actúa como transportador de CO₂ y de protones (Telen, 1994).

Esta proteína es un tetrámero formado por cuatro cadenas polipeptídicas, dos de tipo alfa y dos de tipo beta unidas entre sí de forma no covalente, cada una con un grupo prostético hemo (Figura 7A). Un grupo prostético es la porción no polipeptídica de una proteína. **Hemina** es el nombre farmacológico para el grupo **hemo**, el cual es una molécula de porfirina que contiene un átomo de hierro en su centro. El tipo de porfirina de la Hb es la protoporfirina IX; contiene dos ácidos propiónicos, dos vinilos y cuatro metilos como cadenas laterales unidas a los anillos pirrólicos en estructura (Perutz, 1976; Schultz, 1993) (Figura 7).

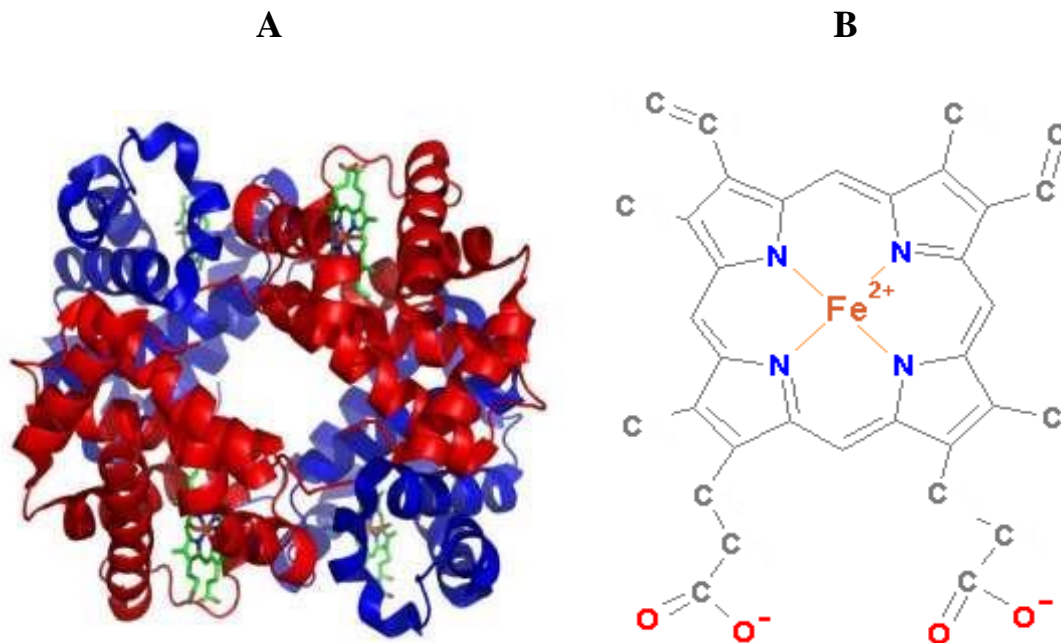


Figura 7. Estructura de la Hemoglobina y del grupo hemo. (A) Representación de la estructura cuaternaria de la Hb, las subunidades proteicas alfa y beta se muestran en rojo y azul, los grupos hemo, que contienen hierro, en verde. (B) Estructura del grupo hemo, en rojo se señala el átomo de hierro y en azul los cuatro nitrógenos de los anillos pirrólicos con los que el Fe forma 4 enlaces de coordinación (Protein Data Bank www.pdb.org).

1.8.4 Importancia del hierro para los microorganismos

Se sabe que cuando se lleva a cabo algún proceso de infección por diversos patógenos bacterianos, éstos pueden adquirir directamente todos los nutrientes que necesitan del huésped que infectan, con excepción del hierro libre (Ratledge y Dover, 2000). La limitación de la disponibilidad de hierro inhibe el crecimiento de cualquier especie bacteriana; se sabe que las bacterias necesitan una concentración de hierro entre 10^{-6} y 10^{-8} M (Pradel *et al*, 2000). Sin embargo, la concentración en solución de hierro libre en el organismo humano suele ser de 10^{-18} M, valor muy inferior al requerimiento bacteriano (Ratledge y Dover, 2000).

El Fe^{2+} es soluble y accesible para las bacterias que tan sólo requieren su transporte a través de la membrana celular, sin embargo, en presencia de O_2 y a $\text{pH} \geq 7$ se oxida a Fe^{3+} , volviéndose insoluble y no biodisponible para los patógenos (Andrews *et al*, 2003). Se sabe que las bacterias emplean agentes quelantes ya sea unidos a su superficie celular o secretándolos al exterior, como estrategias preferentemente empleadas para obtener esta catión del medio (Guerinot, 1994).

1.8.5 Mecanismos de adquisición de hierro en microorganismos patógenos

La mayoría de los estudios de los últimos 40 años han permitido dilucidar qué bacterias, hongos y protozoarios dependen del hierro para sobrevivir y replicarse (Weinberg, 2008) e inclusive para llevar a cabo el proceso infeccioso (Simpson, 2000; Liu *et al*, 2006); sin embargo, si este elemento se encuentra unido a proteínas como la transferrina, lactoferrina o hemoglobina ¿cómo los patógenos obtienen hierro dentro del humano?. Actualmente, se sabe que los microorganismos que infectan al hombre han desarrollado mecanismos para obtener este elemento de fuentes disponibles en el hospedero como hemoproteínas y ferriproteínas (Simpson, 2000; Wandersman *et al*, 2004).

En las bacterias Gram negativas el hierro biodisponible debe atravesar la membrana externa hasta el periplasma y posteriormente introducirlo al citoplasma a través de la membrana interna. Para ello, la célula posee receptores de membrana externa y un sistema (complejo Ton B) que le suministra la energía necesaria para el transporte del hierro al periplasma (Wandersman *et al*, 2004).

Los mecanismos de captación de hierro de que disponen las bacterias patógenas, tanto Gram negativas como Gram positivas, pueden o no depender directamente de moléculas proteicas. Los que implican la síntesis de proteínas, a su vez se clasifican en dos tipos: moléculas secretadas, como los sideróforos y hemóforos pertenecientes a un mecanismo indirecto de captación de hierro o hemo, o bien proteínas que son expresadas a nivel de membrana externa para unir específicamente la fuente de hierro pertenecientes al mecanismo directo (Wandersman *et al*, 2004; Weinberg, 2008) (Tabla 4).

Tabla 4. Sistema de adquisición de hierro por patógenos.

Sistema de adquisición de hierro	
* Sideróforos	*Receptores -Sideróforos -Hemóforos -Transferrina -Lactoferrina -Hemo y hemoglobina
* Hemóforos	

1.8.6 Mecanismo indirecto. Sideróforos y hemóforos

Los sideróforos son moléculas quelantes de hierro de bajo peso molecular <1 kDa que se caracterizan porque poseen una alta especificidad y afinidad hacia el hierro férrico (Andrews *et al*, 2003) y actúan como agentes solubilizantes extracelulares de hierro a partir de minerales o compuestos orgánicos, tales como la transferrina (Crosa y Walsh, 2002). Los sideróforos son sintetizados y secretados por los microorganismos patógenos para captar hierro del medio extracelular y son reconocidos por receptores específicos de membrana que le permiten penetrar al interior de la célula y liberar a la molécula de hierro en el citosol (Ratledge y Dover, 2000). Los hemóforos son proteínas de peso molecular aproximado a 10 kDa, su función es unir al grupo *hemo* de las hemoproteínas y conducirlo a un receptor de

membrana externa que lo transportará al interior de la célula (Genco y Dixon, 2001). El hemóforo mejor caracterizado es HasA de *Serratia marcescens*, el cual es secretado en condiciones de restricción de hierro para capturar el grupo *hemo* de la hemoglobina (Létóffé *et al*, 2001).

1.8.7 Mecanismo directo

Los receptores de moléculas que transportan hierro se encuentran en la membrana de las bacterias Gram negativas o, en el caso de las bacterias Gram positivas, en la pared celular o en la membrana. Se inducen por la inanición de hierro y pueden unir sideróforos/hemóforos, transferrinas/lactoferrinas y/o hemo/hemoproteínas (Andrews *et al*, 2003).

1.8.7.1 Receptores para sideróforos y hemóforos

En las bacterias Gram negativas el mecanismo básico de captura de hierro mediado por sideróforos consiste en la unión del complejo ferrisideróforo a receptores de membrana externa esenciales para la expresión de factores de virulencia en algunas bacterias; seguido de su transporte activo hacia el espacio periplásmico mediante la energía provista por el complejo de la membrana citoplásmica TonB (Lefranc, 2004). Los sideróforos presentes en el espacio periplásmico son transportados contra gradiente de concentración por el complejo ABC hacia el citosol. El complejo ferrisideróforo es finalmente reducido o degradado en el citosol para liberar los iones Fe^{2+} (Wandersman *et al*, 2004). Los complejos TonB y ABC están vinculados a la virulencia en algunas bacterias que producen sideróforos para captar hierro (Takase *et al*, 2000; Reeves *et al*, 2000; Torres *et al*, 2001).

El mecanismo de captura de hierro en el que participan los hemóforos consiste en que estas moléculas captan el grupo hemo de las hemoproteínas y lo dirigen a receptores de superficie para ser posteriormente internalizado al espacio periplásmico mediante el complejo TonB (Genco y Dixon, 2001). El transporte del complejo hemo del espacio periplásmico al citosol se lleva a cabo por la permeasa ABC. Al parecer, las proteínas periplásmicas no están implicadas en la captura del grupo hemo y su fijación con la permeasa ABC (Andrews *et*

al, 2003). Una vez en el citoplasma el hemo es degradado por hemooxigenasas para liberar el Fe^{2+} (Genco y Dixon, 2001).

1.8.7.2 Receptores para transferrina y lactoferrina

Los mecanismos de captura de Fe^{3+} fijado a la transferrina y/o lactoferrina que se conocen con mayor detalle son los de *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus* spp (Schryvers, 1999). En las neisserias patógenas la fijación de Fe^{3+} unido a transferrina está mediada por el receptor de membrana denominado Tbp (del inglés transferrin binding protein) y por el receptor Lbp (del inglés lactoferrin binding protein). El Tbp está integrado por un complejo de proteínas TbpA y TbpB, el cual se ha relacionado con la virulencia del neumococo (Takase *et al*, 2000). Este complejo receptor Tbp remueve los iones Fe^{3+} de la ferriproteína y permite su transporte contra gradiente de concentración a través de la membrana externa hacia el espacio periplásmico. La energía requerida para este transporte activo de Fe^{3+} mediado por Tbp deriva de la fuerza motriz de protones generada por el complejo TonB (Ferguson, 2002). Este último se encuentra formado por las proteínas integrales de membrana citoplásmica TonB, ExbB y ExbD y es crucial en la virulencia de algunas bacterias que captan transferrina como fuente de hierro (Takase *et al*, 2000).

1.8.7.3 Receptores de hemo y hemoglobina

La captación de hemina/hemoproteínas, se han descrito hasta el momento dos mecanismos básicos en bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* (ChuA), *Neisseria meningitidis* (HmbR), *Porphyromonas gingivalis* (HmuR) y *Yersenia pestis* (HmuR) (Wandersman *et al*, 2004) y son los siguientes:

1. El mecanismo más descrito se basa en la unión directa y el procesamiento del grupo hemo o de la hemoproteína por un receptor de membrana externa dependiente de TonB. La hemina pasa al periplasma para ser transportada al citoplasma vía un sistema PBT (del inglés periplasmic binding dependent transport).
2. El otro sistema consta de una proteína soluble llamada hemóforo, que interacciona con las hemoproteínas y transporta la fuente de hierro a la superficie celular, donde

interacciona con los receptores los cuales internalizan al hemo ayudados por un sistema dependiente de TonB (Ratledge y Dover, 2000).

Además de los mecanismos básicos se sabe que algunos patógenos producen enzimas que aumentan la eficacia de estos sistemas, sintetizando proteasas que secretan al medio y degradan a las proteínas transportadoras de hierro del huésped (Genco y Dixon, 2001). Por ejemplo, *Porphyromonas gingivalis* sintetiza la proteinasa Kgp que se une a hemoglobina, hemopexina y transferrina y degrada estas fuentes de hierro (Liu *et al*, 2006).

1.9 Transporte del hierro a través de la membrana citoplasmática

En las bacterias Gram positivas micobacterias y miembros del grupo micoplasma, ni el Complejo Ton ni los receptores de membrana externa son necesarios. En este caso, las proteínas de unión al hierro son lipoproteínas ancladas en la membrana citoplasmática, por lo tanto, deberán atravesar la capa de peptidoglicano y esta membrana (Köster, 2001).

Una vez que el hierro se encuentra en el periplasma debe entrar al citoplasma, lo cual se realiza a través de un mecanismo dependiente de ATP del tipo ABC (del inglés ATP-binding cassette), describiéndose distintas vías que implican la entrada de Fe^{2+} , Fe^{3+} y del ión férrico unido a sideróforos o al grupo hemo (Köster, 2001). El sistema encargado del transporte de hierro a través de la membrana citoplasmática consiste en un mecanismo del tipo ABC, está integrado por lo siguiente:

- Una o varias proteínas periplasmáticas de unión al sustrato que pueden ser solubles o bien encontrarse ancladas a la membrana citoplasmática en forma de lipoproteínas como sucede en el caso de las bacterias Gram positivas y en algunas Gram negativas. Actualmente no se sabe si la proteína de unión reconoce al sustrato (sideróforo, hemo o vitamina B12) cuando está unido al receptor o si de alguna forma lo recoge del periplasma (Köster, 2001).
- Una o dos proteínas de membrana interna que forman la permeasa transmembranal.
- Una o dos ATP hidrolasas o ATPasas encaradas hacia el citoplasma que aportan la energía al sistema (Köster, 2001).

1.10 Importancia de los transportadores ABC

La incorporación del grupo hacia el espacio periplásmico es transportado al interior de la bacteria a través de una permeasa tipo ABC, que consta de una proteína de unión periplásmica y de un complejo de membrana interna, la cual obtiene energía a partir de ATP por medio de una ATPasa ABC (Wandersman *et al*, 2004) (Figura 8).

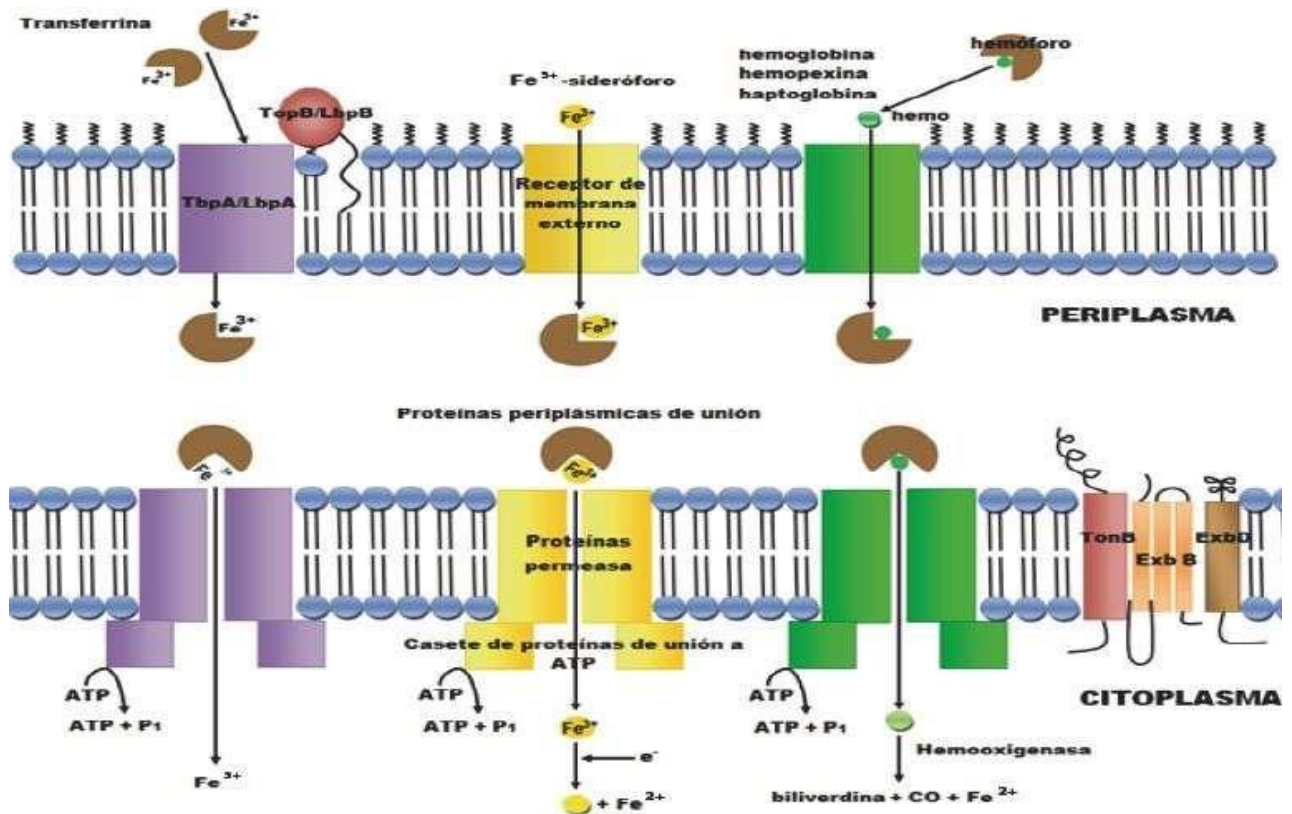


Figura 8. Mecanismo de captación de hierro para hemóforos y hemoproteínas en bacterias Gram negativas (Krewulak y Vogel, 2008).

Los sistemas ABC de bacterias Gram positivas están menos estudiados, pero en general se parecen a los de las Gram negativas aunque carecen del transportador libre periplásmico. Sin

embargo, presentan una proteína con funciones equivalentes (captar el nutriente del exterior), pero que está anclada al lado externo de la membrana citoplásmica cerca del heterodímero integral de membrana.

1.11 Mecanismo de adquisición en *Staphylococcus aureus*

El mecanismo más descrito para los Gram positivos es el de *Staphylococcus aureus*, conocido como sistema Isd, está compuesto por un grupo de siete proteínas denominadas Isd de la A a la G, se encargan de unir hemoglobina y transportar el hierro ligado al hemo a través de la pared bacteriana (Zhu *et al*, 2008). Así, IsdB es la proteína responsable de unir la hemoglobina a la superficie bacteriana, IsdA e IsdB separan al hemo de la hemoglobina y la transfieren a IsdC. A su vez, esta proteína que se encuentra localizada en la pared celular, transfiere el hemo a los factores de translocación de membrana, IsdD, IsdE e IsdF, los cuales introducen el hemo al citoplasma. Finalmente, la proteína IsdG localizada en el citoplasma presumiblemente se encarga de liberar el hierro del hemo (Figura 9) (Zhu *et al*, 2008). Otras bacterias como *Bacillus anthracis* expresan proteínas Isd, así que es probable que también exista un sistema similar de adquisición de hierro en otras bacterias Gram positivas (Mazmanian *et al*, 2002).

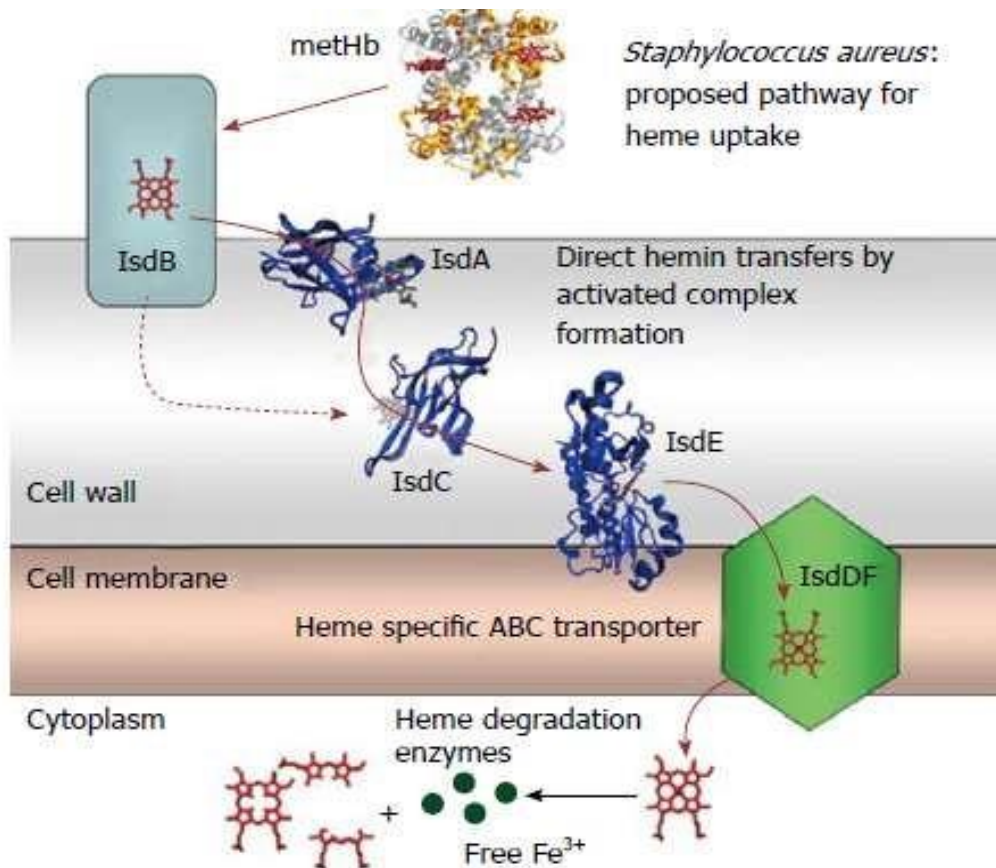


Figura 9. Mecanismo de adquisición de hemo en *Staphylococcus aureus* (Zhu *et al*, 2008).

1.12 Mecanismo de adquisición en *Streptococcus pyogenes*

En el caso del mecanismo de adquisición de hierro para *Streptococcus pyogenes* se encontró que la proteína Shp transfiere eficientemente el grupo hemo a la proteína HtsA (Liu y Lei, 2005). Posteriormente, se reportó que la proteína Shr transfiere eficientemente el grupo hemo a la proteína Shp, pero no a HtsA (Zhu *et al*, 2008). Estos hallazgos llevaron a proponer un modelo en el que la proteína Shr adquiere el grupo hemo de met-hemoglobina y la proteína Shp libera al grupo hemo de la proteína Shr a HtsA del complejo proteico HtsABC, que lleva el grupo hemo a través de la membrana citoplasmática (Figura 10).

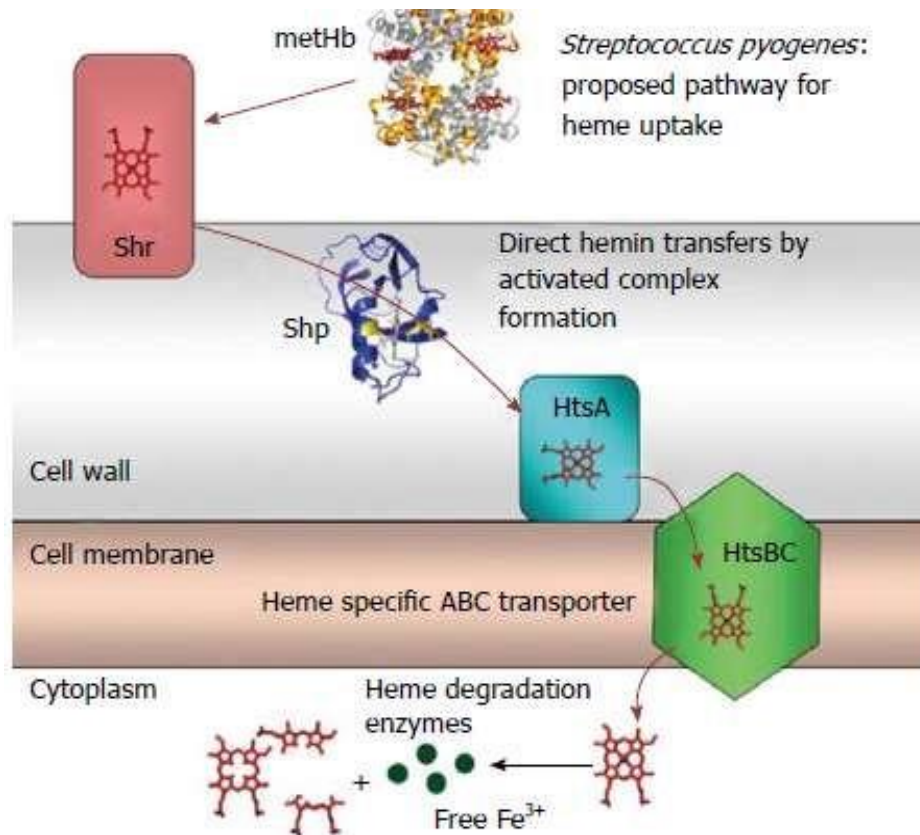


Figura 10. Mecanismo de adquisición de hemo en *Streptococcus pyogenes* (Zhu *et al*, 2008).

Se realizó un estudio más a fondo de la reacción Shp / HtsA como un modelo para entender cómo el grupo hemo se transfiere de una proteína a otra durante la adquisición de hemo. Se demostró la transferencia directa y rápida del grupo hemo de la proteína Shp a la proteína HtsA (Nygaard *et al*, 2006). Este es el primer ejemplo de transferencia directa del grupo hemo de una proteína de superficie a un transportador del tipo ABC y el primer mecanismo cinético detallado de la transferencia de hemo de una proteína a otra en procesos de adquisición de hemo en bacterias. Este estudio demostró un mecanismo de transferencia de hemo activado, es decir, el donador de hemo Shp y el aceptante HtsA forman un complejo activado para facilitar la transferencia de hemo. Además, se desarrolló un enfoque cinético para distinguir las reacciones de transferencia de hemo directa e indirecta (Ran *et al*, 2007). Se demostró la importancia de los ligandos axiales de Shp hemo en la reacción de transferencia y se detectó un complejo ternario donante-hemo-aceptor en las reacciones de los ligandos Shp ligando axial con HtsA (Figura 11).

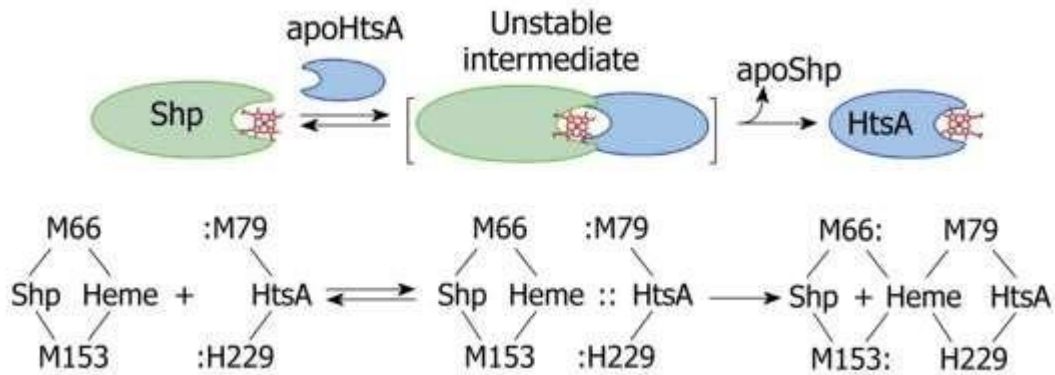


Figura 11. Transferencia del grupo hemo mediante complejo ternario (Lei, 2010).

2. ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 Mecanismo de adquisición de hierro de *S. pneumoniae*

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos moleculares implicados en la adquisición de hierro están mejor estudiados y han sido descritos para muchos microorganismos Gram negativos, sin embargo, para la mayoría de los Gram positivos aún no se han dilucidado. En la bacteria Gram positiva *S. pneumoniae* éstos han sido poco estudiados.

En estudios anteriores se demostró que *S. pneumoniae* utiliza eficientemente la hemoglobina como fuente de hierro, como se había reportado previamente (Tai *et al*, 1993), aunque también emplea otras fuentes de hierro como el grupo hemo. Sin embargo, el crecimiento del microorganismo se ve afectado cuando se utiliza a la transferrina como fuente de hierro con un comportamiento similar al observado en presencia del agente quelante de hierro dipirilo, lo cual demuestra que *S. pneumoniae* no adquiere el hierro de la transferrina (Romero-Espejel *et al*, 2013). En el ensayo de viabilidad celular en esas condiciones se evidenció que la limitación de hierro además de disminuir el crecimiento también reduce la viabilidad del microorganismo (Romero-Espejel *et al*, 2013).

Con el fin de identificar a las proteínas de superficie de *S. pneumoniae* que tienen la capacidad de unir al grupo hemo se realizó una cromatografía de afinidad a hemo con proteínas de

membrana. Estos ensayos mostraron nueve proteínas purificadas con pesos moleculares aproximados de 22, 37, 43, 45, 50, 67, 71, 80 y 115 kDa (Romero-Espejel *et al*, 2013) (Figura 12). De éstas se seleccionaron las bandas más abundantes y representativas y mediante espectrometría de masas se identificaron siete de ellas (Tabla 5) (Romero-Espejel *et al*, 2013).

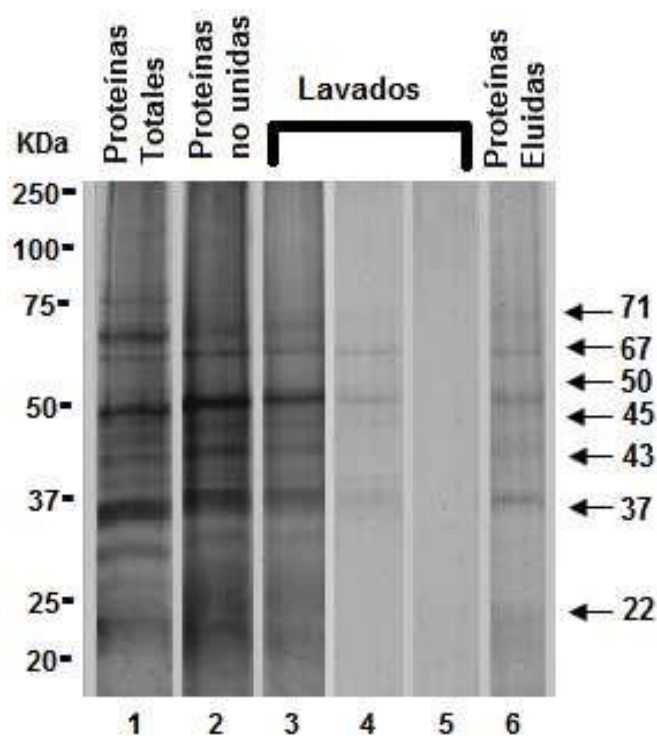


Figura 12. Purificación de proteínas de membrana de *S. pneumoniae* que unen hemo. Cromatografía de afinidad empleando una resina de perlas de agarosa-hemina. Las proteínas unidas fueron resueltas en un gel al 12% SDS-PAGE en tinción con Sypro. Proteínas contenidas en el extracto total de proteínas membranales (línea 1), proteínas que no se unen a las perlas de agarosa-hemina (línea 2); lavados realizados para eliminar las proteínas inespecíficas (líneas 3, 4 y 5) (proteínas que no unen el grupo hemo); proteínas eluidas con clorohidrato de guanidina 6M (línea 6) (Romero-Espejel *et al*, 2013).

Tabla 5. Proteínas de membrana que unen el grupo hemo en *S. pneumoniae* identificadas por espectrometría de masas (Romero-Espejel *et al*, 2013).

Peso molecular (kDa)	No. de acceso en NCBI	Proteína identificada	Longitud de aminoácidos	Función
22	gij15901633	Proteína general de estrés 24	202	Une hemo y Hb.
37	gij15900732	Lipoproteína	350	Une hemo y Hb.
43	gij15901337	Factor de elongación Tu	398	Pertenece a la familia de factor de elongación de unión a GTP.
45	gij353807173	Proteína de unión maltosa/maltodextrina	418	Transportador transmembranal de maltosa.
50	gij116516325	Glutamina sintetasa, tipo I	448	Cataliza la unión de serina a RNAt.
67	gij116516239	Producto de gen glpO	608	Une hemo y Hb.
71	gij15902056	Proteína de división celular FtsH	652	Metalopeptidasa dependiente de ATP.

De las proteínas obtenidas mediante la cromatografía de afinidad acoplada a hemo las de 22 y 37 kDa se eluyeron con el ligando (hemo), pero no con hierro libre, y mediante ensayos de overlay se mostró que ambas proteínas tienen la capacidad de unir al grupo hemo presente en la Hb (Romero-Espejel *et al*, 2013). Además, la vitamina B12 con estructura similar a la del grupo hemo, compitió la unión del hemo a las proteínas de 22 y 37 kDa (Figura 13) (Romero-Espejel *et al*, 2013).

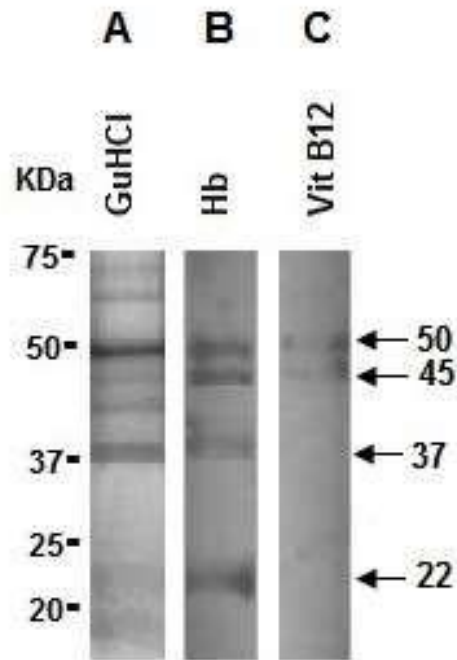


Figura 13. Ensayo de Overlay y tinción con azul de Coomassie para demostrar la competencia de la vitamina B12 con el hemo de la Hb. Muestra la elución de proteínas membranales que unen el grupo hemo mediante clorhidrato de guanidina y analizado mediante SDS-PAGE al 12% teñido con Sypro Ruby (panel A), se observa la elución de las proteínas que unen el grupo hemo utilizando Hb como eluyente (panel B), se muestra la elución de las proteínas que se inhiben o bloquean al emplear un exceso de vitamina B12 para competir con el hemo de Hb (panel C) (Romero-Espejel *et al.*, 2013).

Todos estos resultados sugieren fuertemente que las proteínas de membrana de 22 y 37 kDa funcionan como receptores de hemo y Hb. Sin embargo, se requerían más experimentos para confirmar esta hipótesis.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el índice de enfermedades ocasionadas por *S. pneumoniae* es una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, afectando principalmente a niños, adultos mayores y personas inmunocomprometidas. *S. pneumoniae* es el principal causante de enfermedades como neumonía, otitis media, sinusitis y puede llegar a ocasionar enfermedades invasivas como meningitis, septicemias y bacteriemias.

Se sabe que cualquier microorganismo requiere de hierro para sobrevivir, replicarse y llevar a cabo su proceso infeccioso dentro de su hospedero, para lo cual requiere de un mecanismo de adquisición de hierro, mismo que aún no está bien descrito.

Actualmente estos mecanismos de adquisición de hierro son muy estudiados y descritos para microorganismos Gram negativos, sin embargo, en los Gram positivos aún no se ha esclarecido. Previamente sugerimos que proteínas membranales de 22 y 37 kDa están involucradas en la unión del grupo hemo; es por ello que en el presente trabajo de investigación con el propósito de contribuir al estudio actual sobre el proceso infeccioso, se propuso confirmar la participación de la proteína de 37 kDa en el mecanismo de adquisición de hierro de *S. pneumoniae*.

El grupo hemo y la hemoglobina son fuentes disponibles de hierro para la mayoría de las bacterias patógenas, por tal motivo las proteínas involucradas en la adquisición de hierro serían un blanco potencial para la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas, en función de ofrecer alternativas para el tratamiento y la prevención de este agente oportunista.

4. HIPÓTESIS

La proteína membranal Sphbp-37 de *S. pneumoniae* funciona como receptor de hemoglobina en el mecanismo directo de adquisición de hierro de este microorganismo patógeno.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ‡ Analizar la participación de la proteína membranal Sphbp-37 en el mecanismo de adquisición de hierro de *Streptococcus pneumoniae*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ‡ Confirmar la localización de la proteína Sphbp-37 de *S. pneumoniae*.
- ‡ Analizar los niveles de expresión del gen sphbp-37 en presencia de diferentes fuentes de hierro.
- ‡ Confirmar la capacidad de la proteína Sphbp-37 de unir Hb.
- ‡ Determinar la afinidad de la proteína purificada Sphbp-37 de *S. pneumoniae* por Hb.
- ‡ Sugerir el motivo o los dominios de la proteína Sphbp-37 que interacciona con el grupo hemo.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Figura 14. Estrategia experimental desarrollada.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Recuperación de la cepa R-6 de *S. pneumoniae*

La cepa R-6 de *S. pneumoniae* es una cepa no encapsulada derivada de la cepa de tipo capsular D39 y fue seleccionada para realizar el presente proyecto de investigación, es una cepa no virulenta y su genoma ha sido secuenciado (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

La cepa se recuperó de un congelado en glicerol estéril al 50%, se mantuvo almacenado a 70°C. Para ello, del cultivo congelado se tomó una muestra y se sembró en cajas de Petri conteniendo base agar suplementado con sangre de carnero al 5%. Posteriormente, las cajas se incubaron durante 24 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Una vez que las bacterias crecieron, se realizaron observaciones directas de su morfología colonial y de sus características microscópicas en células teñidas por la técnica de Gram para evaluar la viabilidad celular y descartar la posible contaminación de la cepa.

4.2 Cultivo de *S. pneumoniae*

Una vez que se verificó la viabilidad y la pureza de la cepa, se tomaron muestras del cultivo para realizar nuevas resiembras en medio líquido Todd-Hewitt (Tabla 6), suplementado con extracto de levadura al 5% que se incubaron bajo las mismas condiciones.

Tabla 6. Composición de Caldo Todd Hewitt.

Contenido de caldo Todd Hewitt:	
Carbonato de Sodio	2.5 g
Cloruro de Sodio	2.0 g
Dextrosa	2.0 g
Fosfato dipotásico	0.4 g
Infusión de corazón	3.1 g
Peptona especial	20.0 g

4.3 Cultivo de *Escherichia coli*

Las cepas DH5a y BL21 de *Escherichia coli* se recuperaron a partir de congelados en glicerol, las cajas se sembraron por estría abierta en cajas de Petri conteniendo agar 1.5% en medio Luria-Bertani (LB, peptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 0.5%) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. A partir de estas cajas se tomó una colonia de cada cepa y se inoculó en medio LB líquido creciéndose a 37°C en agitación durante toda la noche.

4.4 Extracción de RNA

La extracción total del RNA de bacterias cultivadas en presencia de diferentes fuentes de hierro se realizó con el método de Trizol (Chu *et al*, 2012). En resumen, se cultivaron bacterias, se centrifugaron y se lisaron con 1 ml de TRI Reagent® (TRI-Reagent, Cat. T9424, Sigma®); se añadieron 200 µl de cloroformo y la muestra se agitó vigorosamente durante 15 s. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, después los ácidos nucleicos se recuperaron por centrifugación a 12000 x g durante 15 min a 4°C. La fase acuosa (que contenía RNA) se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 500 µl de 2-propanol. El RNA se concentró por centrifugación a 12000 x g durante 10 min a 4°C y finalmente se lavó dos veces con etanol al 75%. El DNA genómico se eliminó utilizando DNasa I libre de RNasa (Cat. M6101, Promega®), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Ma *et al*, 2012; Black *et al*, 2008). El RNA purificado se resuspendió en agua libre de nucleasas y se almacenó a -80°C hasta su uso. La presencia de DNA contaminante se evaluó mediante PCR usando las muestras de RNA como molde y oligonucleótidos específicos para la amplificación de RNAr 16s, los productos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

4.5 RT-PCR semicuantitativa

Para la transcripción inversa se usaron 10 ng de RNA total como molde empleando el kit 1Step-RT-PCR (Cat. AB-1454 / A, Thermo Scientific®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los experimentos se realizaron con el cebador antisentido específico para el gen *spbhp-37* (5'-CCCCAAGCCTGCAAACCTTCC-3'). Posteriormente, el DNA complementario (cDNA) se utilizó como molde para la amplificación por PCR del gen *Sphbp-37*, empleando el mismo cebador antisentido y como cebador sentido el

oligonucleótido 5'-GGTCTTGGCCTAGTTGCAGTGG-3'. La amplificación se llevó a cabo mediante una incubación inicial a 50°C durante 15 min y desnaturalización a 95°C durante 2 min, seguido por 25 ciclos con una desnaturalización rápida a 95°C durante 20 s, la hibridación a 60°C durante 30 s y la etapa de extensión a 72°C durante 1 min, con una incubación final a 72°C durante 5 min. Como control interno se realizó la amplificación del gen RNAr 16S utilizando cebadores específicos (sentido: 5'-GGCTACACACGTGCTACAATGG-3' y antisentido: 5'-CGACTTCGGGTGTTACAACTCTC-3'). En los ensayos de PCR se utilizó RNA como molde (omitiendo el paso de retro-transcripción) como control negativo. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con Gelred (Cat. B05-41003) y se sometieron a un análisis densitométrico en el equipo GelDoc (Bio-Rad®) usando el Software One-4.6.3 1-D. La expresión génica del gen *spbhp-37* se normalizó con la del RNAr 16S.

4.6 Obtención de DNA genómico de *S. pneumoniae*

La obtención del DNA genómico de *S. pneumoniae* se llevó a cabo a partir de un cultivo de toda la noche en medio líquido Todd-Hewitt. Posteriormente, el cultivo se centrifugó y el paquete celular se resuspendió en 500 µl de PBS. Entonces la purificación de DNA genómico se llevó a cabo empleando el kit #K0512 (Thermo Scientific). Brevemente se mezclaron 200 µl de células con 400 µl de solución de lisis y se incubaron a 65°C durante 5 min, inmediatamente se adicionaron 600 µl de cloroformo, se emulsificó la solución suavemente por inversión y la muestra se centrifugó a 8000 x g durante 2 min. La fase acuosa que contenía el DNA se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y se adicionaron 800 µl de solución de precipitación recién preparada (720 µl de agua deionizada estéril más 80 µl de la solución de precipitación concentrada a 10 X), se mezcló cuidadosamente por inversión a temperatura ambiente durante 2 min y se centrifugó a 8000 x g durante 2 min. Posteriormente, el sobrenadante se eliminó completamente y la pastilla de DNA se disolvió en 100 µl de NaCl 1M. Finalmente, se adicionaron 300 µl de etanol frío, se incubó 10 min a temperatura de 20°C para la formación del precipitado de DNA y se centrifugó a 8000 x g durante 4 min. Se eliminó el etanol y el DNA se disolvió en 100 µl de agua estéril.

4.7 Aislamiento del plásmido *pGEX-6P-1*

El vector de clonación *pGEX-6P-1* (Amersham) se aisló mediante el método de lisis alcalina empleando el kit midipreparación de plásmidos (Qiagen). Una colonia de la cepa *DH5 α* de *Escherichia coli* se transformó con el plásmido y se sembró en 5 ml de medio LB más la adición de ampicilina (50 mg/ml) y se incubó a 37°C toda la noche en agitación. Después se realizó una dilución 1:500 en 100 ml de medio LB y se incubó a 37°C por 12-16 h en agitación constante, hasta obtener una densidad óptica (DO) de aproximadamente 0.4-0.6 a 600 nm. Posteriormente, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 6000 x g por 20 min a 4°C, el paquete celular se resuspendió en 4 ml del amortiguador PI (Tris-HCl 50mM pH 6.8, EDTA 10mM y 100 μ g/ml de RNasa) y se añadieron 4 ml de amortiguador de lisis P2 (NaOH 200 mM y SDS 1%). La mezcla se agitó suavemente por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Después se añadieron 4 ml de amortiguador de neutralización P3 (acetato de potasio 3M pH 5.5), se incubó por 15 minutos a 4°C y se centrifugó a 3800 x g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de gasas estériles y se colocó en la columna de afinidad previamente equilibrada con 4 ml de amortiguador QBT (NaCl 1.25 M, MOPS 50 mM pH 7.0, isopropanol 15% y Triton X-100 0.15%). Posteriormente, se realizaron dos lavados con 10 ml de amortiguador QC (NaCl 1M, MOPS 50 mM e isopropanol 15%) para eliminar carbohidratos, proteínas y DNA no asociado a la columna. El DNA plasmídico se eluyó con 5 ml de amortiguador QF (NaCl 1.25 M, Tris 50 mM pH 8.5 e isopropanol 15%) y se precipitó con 3.5 ml de isopropanol. La muestra se centrifugó a 15000 x g por 30 min a 4°C. El sobrenadante se decantó, la pastilla se lavó en 10 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 15000 x g por 20 min a 4°C. La pastilla se secó y se resuspendió en 300 μ l de agua estéril. El plásmido obtenido se distribuyó en alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.8 Amplificación del gen codificante de la proteína Sphbp-37 de *S. pneumoniae*

El gen Sphbp-37, cuyo producto proteico se identificó como posible receptor del grupo hemo, se amplificó por PCR usando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen, pero omitiendo la secuencia que codifica para el péptido señal putativo. Como cebador sentido se diseñó un oligonucleótido que contiene el sitio de reconocimiento para la enzima *BamHI*, y

como cebador antisentido un oligonucleótido que incluye el sitio de reconocimiento para *SalI* (Tabla 7).

Tabla 7. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes.

Gen	Gen ID	Primers DNA
<i>sphbp-37</i>	NP_345336.1	<p>Sentido 5' GGGGGGGATCCATGAACAAGAAACAATGGCT AGGTC3'</p> <p>Antisentido 5' GGGGGGTCGACTTATTTTTCAGGAACTTTTAC GCTTCCATC3'</p>

La amplificación por PCR se realizó utilizando como molde el DNA genómico de *S. pneumoniae*. Se mezclaron 10 mM de oligonucleótidos sentido y anti-sentido, 300 ng de dNTP's 10 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 300 ng de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 5µl de solución amortiguadora 10X (Invitrogen), 1.25 U de una enzima DNA polimerasa de alta fidelidad y agua suficiente para alcanzar un volumen final de 50 µl. Como control negativo se utilizó la misma mezcla de reacción, pero sin DNA molde.

4.9 Purificación del DNA a partir de geles de agarosa

Las bandas de DNA de interés se purificaron a partir de la electroforesis en geles de agarosa por el método de *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Los fragmentos de DNA se cortaron del gel de agarosa, se añadieron 3 volúmenes de amortiguador QG por cada volumen de gel y las muestras se incubaron a 50°C por 10 min para disolver la agarosa. Después se añadió un volumen de isopropanol igual al volumen del gel, se mezcló y se vertió dentro de una columna *Qiaquick spin column* (Qiagen) mediante el método de cromatografía de exclusión, para inmediatamente centrifugar durante 60 s a 18,000 x g. La columna se lavó con 0.5 ml de amortiguador QG, se centrifugó y se añadió 0.75 ml de amortiguador PE para lavar la columna y se repitió la centrifugación dos veces para remover los residuos de etanol y amortiguador PE. Entonces el DNA se eluyó con 50 µl de agua estéril y se centrifugó a 18000 x g. El DNA se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.10 Digestión de los fragmentos de PCR y del plásmido *pGEX-6P-1*

El gen *Sphbp-37* se clonó en marco de lectura con la glutation-S-transferasa (GST), etiqueta del vector *pGEX-6P-1* (GE Healthcare) que permite la solubilidad e identificación de la proteína. La etiqueta de GST de la proteína recombinante se eliminó con ayuda de la enzima PreScission Protease (PPS, GE Healthcare Life Sciences). La proteasa corta específicamente entre los residuos Gln y Gly de la secuencia de reconocimiento de LeuGluValLeuPheGln / GlyPro, debido a ello se utilizaron los sitios de restricción *BamHI* y *SalI* para la clonación dirigida. El vector tiene un promotor *tac*. Las clonas positivas se seleccionaron por ampicilina. Para ello, el gen *sphbp-37* obtenido por PCR y purificado, así como el plásmido *pGEX-6P-1* se sometieron a una doble digestión con las enzimas *BamHI* y *SalI*. La restricción se llevó a cabo en una mezcla de reacción con el amortiguador 1X (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM y dithiothreitol pH 7.9 1), 100 mg/ml de albúmina y 4 µg de DNA. Las reacciones se incubaron durante 2 h a 37°C (BarnsteadLab-Line modelo Aquabath). Los productos digeridos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y las bandas de interés se purificaron del gel como se describió previamente.

4.11 Ligación

Los fragmentos de DNA digeridos y purificados, tanto del inserto de interés como del plásmido *pGEX-6P-1*, se ligaron en una proporción de 1:3 (vector: inserto). Las mezclas de ligación se realizaron en un volumen final de 10-15 µl, conteniendo 50 ng del plásmido *pGEX6P-1* digerido con *BamHI/SalI*, la cantidad necesaria del inserto para tener la relación molar deseada, 1 µl (100 unidades) de T4 DNA ligasa (Invitrogen), 2 µl de amortiguador T4 DNA Ligasa 5X (Invitrogen) y H₂O para completar el volumen de reacción. La reacción se incubó de 16-18 h a 16°C. En este ensayo se utilizó como control negativo la misma reacción, pero sin el inserto.

4.12 Preparación de bacterias competentes de *E. coli*

Las células competentes se obtuvieron utilizando RbCl₂. Para ello, un cultivo bacteriano de 5 ml en LB, suplementado con 50 mg/ml de ampicilina se incubó a 37°C por 18 h. Posteriormente, 1 ml del cultivo anterior se inoculó en 100 ml de medio SOB-MgSO₄ 1M

(bactotripton a al 2%, extracto de levadura al 0.5%, NaCl 10mM y KCl 2,5mM) y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} 0.5. Inmediatamente, el cultivo bacteriano se incubó en hielo por 10 min y se centrifugó a 5000 x g por 12 min a 4°C. El botón se resuspendió en 16 ml de la solución RF1 pH 5.8 (RbCl, MnCl₂·4H₂O, KCH₃COO, CaCl₂·H₂O, C₃H₈O₃) y se incubó en hielo por 15 min. Entonces, las muestras se centrifugaron a 5000 x g por 12 min a 4°C, la pastilla se resuspendió en 4 ml de una solución fría RF2 pH 6.8 (MOPS, RbCl₂, CaCl₂·H₂O, C₃H₈O₃). Finalmente, se prepararon alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf para su conservación a -80°C.

4.13 Transformación de células competentes

Las células competentes DH5α y BL21 (pLys) se transformaron por medio de la siguiente técnica. Una muestra de 100 µl de células competentes se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se mezcló con 25 ng del plásmido de interés y se incubó en hielo durante 15 min. Posteriormente, se dio un choque térmico a 42°C por 2 min, rápidamente se regresó al hielo y se incubó durante un minuto. Entonces, se agregó 1 ml de medio Luria y se incubó por 2 h a 37°C en agitación. Al final de este tiempo, los tubos se centrifugaron a 8000 x g durante un minuto, el sobrenadante se desechó, a excepción de 50 µl que se emplearon para resuspender el botón obtenido. Una vez resuspendidas, las células se sembraron en cajas de Petri conteniendo agar-Luria con ampicilina (100µg/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

4.14 Selección y caracterización de las clonas

Las clonas que crecieron en las placas de agar-LB con ampicilina se seleccionaron al azar y se les extrajo el DNA plasmídico para verificar la inserción de los genes de interés. La extracción de DNA plasmídico se realizó mediante el proceso de PEG (Sambrook 1987). Para ello, se inoculó una colonia de bacterias en 5 ml de LB líquido con ampicilina y se incubó durante toda la noche a 37°C en agitación. El cultivo se transfirió a tubos de 1.5 ml y se centrifugó a 8000 x g por 3 min a 4°C, la pastilla se resuspendió con 200 µl de TS (TrisHCl

50 mM pH 7.5 y Sacarosa al 25%). Posteriormente, se adicionaron 200 μ l de ELT (EDTA 100mM, Lisozima 2 mg/ml y Triton X 100 al 0.1%) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó durante 10 min a 70°C y se centrifugó a 12000 x g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó, se le adicionó 1 volumen de PEG (Polietilenglicol 8000 al 20% y NaCl 1M), se mezcló por inversión, se incubó 20 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g por 3 min. Se eliminó el sobrenadante y el botón se dejó secar por 15 min y finalmente se resuspendió en 30 μ l de H₂O milliQ. Para identificar los plásmidos que contenían los genes de interés se realizaron ensayos de PCR utilizando el DNA plasmídico como molde y los oligonucleótidos iniciadores específicos para cada gen. Además, algunos de los plásmidos positivos fueron analizados mediante la digestión con las enzimas *BamH I*/*Sal I* y secuenciados para verificar la identidad del gen deseado, así como para detectar posibles mutaciones que pudieran afectar la expresión o la función de la proteína recombinante.

4.15 Expresión de las proteínas recombinantes

Para la expresión de las proteínas recombinantes, los plásmidos *pGEX-6P-1* utilizados como control negativo y *pGEX-6P-1/sphbp-37* se transformaron en células competentes de *E. coli* cepa BL21(pLysS-33). Posteriormente, una colonia transformante se incubó en 5 ml de medio LB/ampicilina a 37°C por 12 h. Al término de este tiempo, a partir del cultivo se realizó una dilución 1:50 en medio LB con 100 mg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C hasta alcanzar una D.O a 600 nm entre 0.4 y 0.6. Entonces, se tomó una muestra de 100 μ l del cultivo que se incubó durante 3 h a 37°C en agitación, para su posterior caracterización como células control (bacterias no inducidas). Al resto del cultivo se le agregó Isopropil- β -Dtiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final 1 mM y se incubó por 3 h a 37°C en agitación para inducir la expresión de las proteínas recombinantes. Al término del tiempo, para verificar la expresión de los péptidos recombinantes las bacterias se lisaron y los extractos se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 12% teñidos con azul de Coomassie.

4.16 Análisis y solubilización de los cuerpos de inclusión

Para el análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes, se utilizaron 100 ml de bacterias que expresaron las proteínas recombinantes. Para ello, las bacterias crecidas se centrifugaron a 10000 x g por 5 min, la pastilla se resuspendió en 2.5 ml de amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 2mM, NaCl 100mM y 1 mM PMSF), se le adicionó lisozima a una concentración final de 1 mg/ml y se incubó por 1 h a 4°C. Posteriormente, la mezcla se sometió a sonicación en frío (sonicador ultrasónico de punta Vibra-Cell Sonics^R) por 5 veces con intervalos de 10 s a una amplitud de 60 watts. El lisado celular se centrifugó a 12000 x g por 20 min a 4°C para separar la fracción soluble (sobrenadante) y la insoluble (pastilla). Se tomó una alícuota de 100 µl de cada una de las fracciones, se les adicionaron 20 µl de amortiguador de muestra 5X (tris pH 6.8, SDS 10%, glicerol 87% y azul de bromofenol 2%) y 5% de β-mercaptoetanol y se analizaron por SDS-PAGE 12% teñidos con azul de Coomassie.

La proteína recombinante se detectó en cuerpos de inclusión, por lo que se procedió a solubilización de los mismos utilizando la metodología descrita por Vallejo *et al*, 2002. Brevemente después de la inducción de proteína los cultivos se centrifugaron a 1500 x g durante 40 min y la pastilla se resuspendió en 50 ml de amortiguador A (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 mM de NaCl) en presencia de 1 mM del inhibidor de proteasas PMSF. Las células se sonicaron durante 30 s (100 W) 4 ciclos. Después se añadió un volumen igual de amortiguador A suplementado con urea 8 M y 1 mM PMSF, se agitó durante 1 h a 4°C y se centrifugó a 10000 x g durante 30 min. El sedimento se resuspendió en 500 ml de amortiguador B (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) y se centrifugó a 10000 x g durante 30 min. El sedimento se resuspendió en 500 ml de agua, se centrifugó nuevamente y se congeló a -70°C. Posteriormente, se resuspendió el sedimento en amortiguador C (2 M urea, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl y 2% de Triton X-100), se centrifugó durante 15 min a 10000 x g, se lavó con el mismo volumen de amortiguador B y se centrifugó nuevamente. Inmediatamente el paquete celular obtenido se disolvió en 20 ml de amortiguador D (urea 8 M, Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl y 1 mM de 2-mercaptoetanol) y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Después la muestra se centrifugó a 12000 x g

durante 30 min a 4°C. Finalmente las muestras fueron dializadas a través de una membrana de 0.45 μ y se almacenaron en alícuotas a -70°C. La presencia de la proteína recombinante en el material solubilizado se examinó nuevamente por SDS-PAGE 12% y por ensayos de Western blot usando anticuerpos contra la etiqueta de GST.

4.17 Purificación de la proteína recombinante

La purificación de la proteína recombinante se realizó a partir de la solubilización de los cuerpos de inclusión obtenidos de las bacterias inducidas con IPTG. Esta fracción se incubó durante 12 h a 4°C en agitación suave con 1.33 ml de una matriz de Glutation-Sefarosa (Amersham Biosciences), previamente equilibradas en el amortiguador PBS 1X. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 800 x *g* por 2 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y las perlas se lavaron 10 veces con el amortiguador PBS 1X. En cada lavado se centrifugó a 800 x *g* por 2 min a 4°C. Para eluir la proteína recombinante las perlas se transfirieron a un tubo nuevo, se les adicionó un volumen de amortiguador de muestra 2X, se incubaron a 100°C por 5 min, en seguida se colocaron en hielo por 2 min y se centrifugaron a 10000 x *g* por 2 min. Los sobrenadantes conteniendo las proteínas purificadas se analizaron en SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Coomassie y por ensayos de western blot utilizando anticuerpos contra la etiqueta de GST.

4.18 Corte enzimático de la etiqueta de GST

La etiqueta de GST de la proteína recombinante se eliminó con ayuda de la enzima PreScission Protease (PPS, GE Healthcare Life Sciences). Para ello, a la matriz de glutatión acoplada al péptido recombinante se le adicionaron 500 μ l de la solución de corte (Tris-HCl 50mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM y PPS 10 μ l/ml) y se incubó por 12 h a 4°C en agitación suave. Finalmente, se centrifugó a 8000 x *g* por 3 min y el sobrenadante conteniendo la proteína de interés sin etiqueta de GST se recuperó.

4.19 Producción de anticuerpos específicos

La proteína recombinante se utilizó como antígeno para producir anticuerpos específicos contra Sphbp-37. Para esto, la proteína recombinante purificada se mezcló con un volumen

del adyuvante TiterMax gold (Sigma 14538033-2). Se utilizó un conejo blanco de la cepa Nueva Zelanda, al cual se le inyectó 150 g de proteína en 1 ml de suspensión. Para la inmunización la suspensión de la proteína se dividió en cuatro dosis de 250 μ l cada una, de las cuales dos dosis se inyectaron por vía subcutánea y dos en sitios intramusculares. La inmunización se realizó tres veces con intervalos de 15 días. El protocolo de inmunización se realizó aplicando las Buenas Prácticas de Laboratorio y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), el cual fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional del Cinvestav.

4.20 Inmunodetección por western blot

Para que las proteínas fueran accesibles a la detección por anticuerpos, éstas fueron transferidas desde los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa por acción de un campo eléctrico (electrotransferencia). Este método utiliza corriente eléctrica y amortiguador de fosfatos con 0.1% de PBS-Tween 20 para llevar las proteínas desde los geles hacia la membrana. Para ello, se apiló en el orden descrito los siguientes elementos (del polo negativo o cátodo al positivo o ánodo): esponja, varios papeles de filtro empapados en amortiguador de transferencia, gel, membrana, más papeles de filtro empapados y finalmente otra esponja. Este montaje llamado coloquialmente “sándwich” se dispuso en el sistema de transferencia y se aplicó una corriente eléctrica de 100V durante 1 h. De esta manera las proteínas del gel se desplazaron hacia el polo positivo y quedaron atrapadas por la membrana. Después de la transferencia se procedió a la tinción del gel con azul de Coomassie para comprobar que en efecto una parte importante del material proteico fuera transferido a la membrana.

Para bloquear los lugares de unión que han quedado libres tras la transferencia la membrana se incubó con leche en polvo libre de grasa al 5% disuelta en amortiguador de fosfatos con 0.1% de PBS-Tween 20 durante 2 h a 4°C. Posteriormente se incubó con un anticuerpo primario anti-GST Sigma-G7781 (1:10000) o anti-Spbhp-37 (1:10000) durante 1 h a 4°C y después con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano (Invitrogen 65–6120; 1:10000) durante 1 h a 4°C, se realizaron 3 lavados de 15 min con PBS-Tween en cada uno de los pasos de esta técnica. La presencia de las proteínas fue revelada mediante quimioluminiscencia. El ensayo de quimioluminiscencia se realizó con el kit ECL

(Amersham); las membranas se bañaron con esta solución durante 3 min en un cuarto oscuro y con luz roja, se eliminó el exceso de solución y las membranas se cubrieron con un acetato, finalmente se colocaron encima las placas autorradiográficas a diferentes tiempos de exposición y las placas se revelaron para observar los resultados.

4.21 Microscopía electrónica

Las bacterias cultivadas en medio Todd-Hewitt en ausencia o en presencia de hemoglobina como única fuente de hierro se fijaron en 4% de paraformaldehído y 0.5% de glutaraldehído en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron embebidas en la resina acrílica (LR White) y se polimerizaron bajo UV a 4°C durante la noche. Se obtuvieron secciones delgadas (es decir, 60 nm) y se montaron en rejillas de níquel cubiertas por Formvar. Más tarde las secciones se incubaron en PBS con suero bovino fetal al 10% antes de la incubación con los anticuerpos anti-Spbhp-37 diluido (1:100) en suero bovino fetal al 5%. A continuación, las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios (anti-IgGs de conejo) conjugados con esferas de oro coloidal de 20 nm (Ted Pella Inc; 1:100). Por último, las secciones se contrastaron con solución acuosa de acetato de uranilo y citrato de plomo antes de ser examinadas en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011.

4.22 Crecimiento de *S. pneumoniae* en presencia de Hb y anticuerpos Anti Spbhp-37GST

Las células de *S. pneumoniae* se incubaron durante 16 h a 37°C con una atmósfera regulada a 5% de CO₂ en THB (suplementado con 0,5% de extracto de levadura). Con el fin de sincronizar el crecimiento celular, la densidad óptica del cultivo se ajustó a una densidad óptica de 0.1 a 600 nm y se incubó durante 3 h en presencia de 700 mM de 2,2'-dipiridilo con el fin de eliminar el hierro del medio de cultivo. Posteriormente, el medio se suplemento con: (a) 2.5 M de Hb (Cat H7379, Sigma R.); (b) suero pre-inmune (500 mg / ml) más 2.5 M de Hb; o (c) anticuerpos contra Spbhp-37 (500 mg / ml) más 2.5 M de Hb. Después de eso, el crecimiento celular en cada condición se monitoreó midiendo la densidad óptica a 600 nm cada 60 min durante 4 h.

4.23 Obtención de extractos totales de proteínas de *S. pneumoniae*

La bacteria se cultivó en 20 ml de medio líquido Todd-Hewitt y su crecimiento se monitoreó hasta llegar a una densidad óptica (D.O.) de 0.9 a una longitud de onda (λ) de 600 nm y se aisló por centrifugación a 6000 x g durante 10 min. El sobrenadante fue almacenado a -70°C. Las pastillas celulares fueron suspendidas en (250 μ l) de solución TEP (25 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 1mM PMSF). La suspensión se sonicó durante tres minutos con intervalos de 15 segundos con una amplitud de 60%. Las células rotas se eliminaron por centrifugación a 9000 x g durante 10 min, finalmente se obtuvieron los extractos totales de proteínas.

4.24 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de las proteínas fue determinada utilizando el método de Bradford. El método se basa en la formación de un complejo entre las proteínas y el colorante Azul Brillante G, lo que provoca un cambio en la absorbancia del colorante, de 465 a 595 nm. Se utilizó el protocolo para placas de 96 de pozos, ya que requiere poca cantidad de muestra (3-5 μ l). El reactivo de Bradford fue llevado a temperatura ambiente antes de ser utilizado con previa agitación suave. Se prepararon estándares de proteína utilizando la albúmina sérica bovina (500 μ g/ml). Se agregaron 5 μ l de cada uno de los estándares de proteína en cada pozo por separado. La muestra problema fue preparada con una concentración aproximada entre 0.1 y 1.4 mg/ml. Una vez preparadas las muestras se agregaron 40 μ l del reactivo de Bradford a cada pozo con los estándares de proteína, muestra problema y blanco. Las mediciones se hicieron por duplicado. Una vez agregado el reactivo de Bradford, se colocó la placa en un agitador durante 30 s para mezclar el contenido de los pozos. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 10 min (el complejo colorante-proteína es estable hasta por 60 min). Transcurrido el tiempo de incubación se leyó la absorbancia de los pozos en un lector de microplaca a 592 nm. Se realizaron los cálculos correspondientes y se determinó la concentración proteica de la muestra.

4.25 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes

Se realizó la electroforesis para determinar el patrón electroforético de las proteínas, adicionalmente, mediante este análisis de electroforesis se logró estimar el peso molecular (PM) de las proteínas. El tamaño del poro de la matriz de poliacrilamida que se utilizó dependió de las diferencias en tamaño de los componentes proteicos que se deseaban separar. La muestra que se analizó fue tratada previamente con un agente reductor, como el 2mercaptoetanol y con Dodecil Sulfato de sodio (SDS) en presencia de calor.

Una vez que las muestras se solubilizaron y cuantificaron se calentaron hasta ebullición por 5 min, se depositaron en los pozos correspondientes, se cerró el sistema eléctrico mediante la adición de amortiguador de corrida (Tris base 0.025M, SDS 0.1%, Glicina 0.2M) y se aplicó voltaje. El azul de bromofenol presente en las muestras indicó el frente de migración y por lo tanto el momento de detener la corrida.

Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (10% de ácido acético, 40% de etanol y 0.05% de Coomassie azul brillante) durante 30 min, posteriormente para decolorar los geles se destiñeron con una solución decolorante (30% de metanol, 10% de ácido acético en agua desionizada) con agitación constante durante 1 h. Los resultados fueron interpretados fotografiando y analizando el gel.

4.26 Ensayos de Overlay

Las proteínas totales de *S. pneumoniae* fueron analizadas por SDS-PAGE y transferidas como se mencionó anteriormente a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 5% de leche descremada-PBS-Tween 20 pH 7.4 (PBST) por 2 h a temperatura ambiente, después se incubaron con hemoglobina humana (2.5 μ M) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas se incubaron por 1 h a 37°C con un anticuerpo primario anti-hemoglobina (Santa Cruz Biotechnology SC21005) (1:10000) y después 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (Invitrogen 656120; 1:10000). El ensayo se reveló mediante quimioluminiscencia como se describió anteriormente. Como control negativo se realizaron ensayos donde se omitió la incubación con la hemoglobina humana.

4.27 Resonancia de plasmón en superficie (SPR)

Todos los experimentos de SPR se realizaron con el biosensor óptico Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). Las mediciones se realizaron en un amortiguador HBS-EP 10X (10 mM de HEPES, 3 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,05% v/v de Tween 20 y pH 7,4) a 25°C en un chip CM5 (recubierto con dextrano carboxilado). Para la inmovilización la Hb se disolvió (30 mg/ml) en amortiguador de acetato (pH 3.5, 4.4, 5.5, y 5.5) y se inyectó en el sistema Biacore a una velocidad de flujo 10 ml/min, con un tiempo de contacto de 120 s, se utilizó NaOH 50 mM como solución de lavado para regenerar la superficie del chip. Una vez que el pH se seleccionó (pH 4), la Hb se disolvió en un amortiguador de acetato correspondiente y se inmovilizó en el chip usando un acoplamiento de amina en un nivel de inmovilización de RL = 435 RU para llegar a un teórico RU max = 249,53. Durante el acoplamiento la superficie del chip se activó usando una mezcla 1:1 de 100 mM Nethyl-N- (dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y 100 mM de Nhidroxisuccinimida (NHS), ambos disueltos en agua. Después de la inyección de Hb, los grupos carboximetil activados en la superficie del chip se bloquearon con etanolamina 1 M, pH 8.5. Para analizar la interacción de la proteína Spbhp-37 con la Hb inmovilizada la proteína bacteriana se disolvió en amortiguador HBS-EP y se inyectó. La misma solución se utilizó como amortiguador de corrida. La velocidad de flujo se mantuvo constante durante todo el experimento (30 ml/min), el tiempo de contacto se mantuvo por 120 s y el tiempo de disociación se mantuvo a 300 s. La regeneración se llevó a cabo con NaCl 1 M durante 30 s. Los experimentos se realizaron con concentraciones de Sphbp-37 de 100 a 1000 nM y se monitorearon los cambios en el índice de refracción en función del tiempo bajo condiciones de flujo constante. La cantidad de la proteína Spbhp-37 unida a la Hb se determinó midiendo el aumento neto de índice de refracción con respecto al tiempo en comparación con el amortiguador solo. Este cambio fue reportado en unidades de respuesta (RU). El análisis de los datos se realizó con la versión de software de evaluación Biacore T200 1.0.

4.28 Metodología *in silico*

4.28.1 Generación del modelo 3D

La estructura tridimensional de la proteína Spbhp-37 se realizó empleando el servidor ITASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), los modelos con la mayor puntuación C fueron seleccionados (Roy, Kucukural, & Zhang, 2010). Para este análisis se utilizó la secuencia NP_345336.1, recuperada de la base de datos NCBI, eliminando el péptido señal (20 residuos del extremo amino terminal). Las estructuras del cristal en 3D empleadas como molde se obtuvieron de la base de datos Protein Data Bank (PDB). Los moldes utilizados fueron las proteínas 2FQY, 2FQW, 2FQX, que son lipoproteínas de *Treponema pallidum* llamadas PnrA. En estos análisis se seleccionaron los modelos 3D energicamente más estables para la proteína Spbhp-37.

4.28.2 Simulaciones de dinámica molecular

La simulación de dinámica molecular se realizó con el software NAMD 2.8 (Phillips *et al*, 2005) mediante el uso GPU-CUDA y videos con modelos gráficos NVIDIA Tesla C2070 / Tesla C2075. Los campos de fuerza CHARMM22 (MacKerell *et al*, 1998) se utilizaron para crear las topologías de proteínas; mientras que las moléculas de agua y los átomos de hidrógeno se añadieron usando el psfgen en el software VMD (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996), después se añadieron aleatoriamente iones de cloruro para neutralizar el sistema. Los sistemas se minimizaron durante 1000 etapas seguidas de equilibrio, bajo condiciones de temperatura y presión constantes. Luego se realizó la simulación de la dinámica molecular a 500 ns, considerando esta proteína como soluble. Las interacciones electrostáticas se calcularon mediante el método PME (Batcho, Case, & Schlick, 2001) y se utilizó un corte de 9 Å para las interacciones de van der Waals. La temperatura se mantuvo constante empleando la dinámica de Langevin, mientras que la presión se mantuvo constante en una barra usando un pistón Nosé-Hoover-langevin (Feller, Zhang & Pastor, 1995).

4.28.3 Análisis de trayectoria y acoplamiento (docking)

El software Carma (Steffen *et al*, 2010) fue empleado para obtener la desviación cuadrática media (RMSD), la fluctuación cuadrática media (RMSF) y el radio de giro (Rg). El RMSD se normalizó utilizando el software SigmaPlot 12.0 para determinar si una muestra aleatoria de valores sigue una distribución normal. Los gráficos moleculares se realizaron en SigmaPlot 12.0 y la visualización de la proteína fue realizada por VMD. Los estudios de acoplamiento proteína-ligando se desarrollaron en un ambiente operativo molecular (MOE) (Chemical Computing Group Inc) (Humphrey *et al*, 1996).

V. RESULTADOS

5.1 Análisis e identificación del péptido señal y la secuencia lipobox de la lipoproteína Sphbp-37

Mediante espectrometría de masas, previamente se identificó a la proteína de 37 kDa que une hemoglobina y al grupo hemo como una lipoproteína con una longitud de 350 aminoácidos (Romero-Espejel *et al*, 2013). En el presente trabajo primeramente analizamos *in silico* la estructura de esta proteína, donde se identificó un péptido señal de 21 aminoácidos, en el aminoácido 22 el motivo N-palmitol cisteína y la secuencia lipobox **LAACG** específica de las lipoproteínas bacterianas (Figura 15).

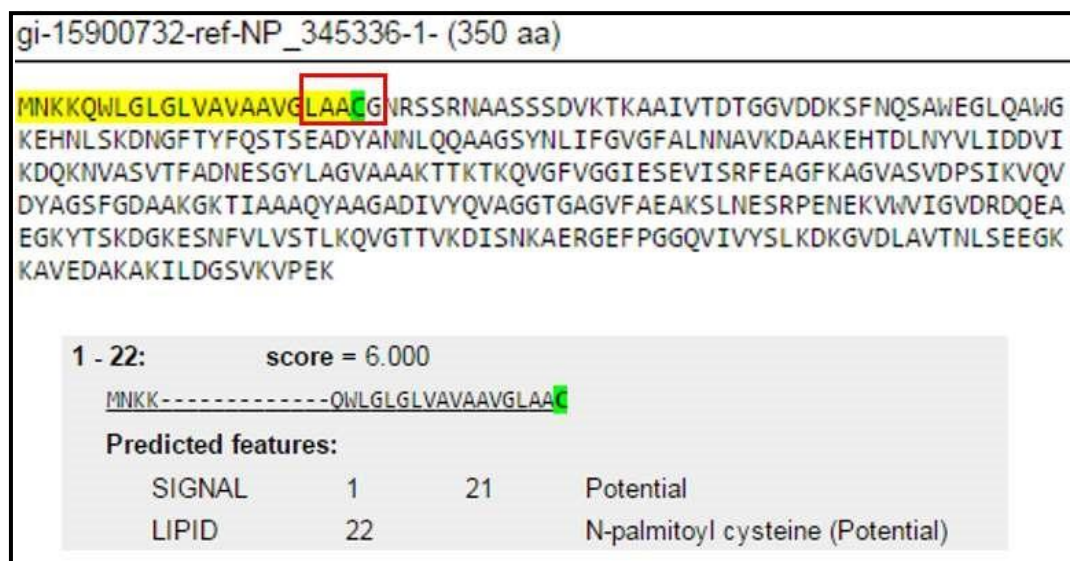


Figura 15. Caracterización estructural de la proteína Sphbp-37. Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína Sphbp-37. Se identificó una secuencia señal (amarillo), el motivo de N-palmitol cisteína (verde) y la caja lipobox (rectángulo), características de las lipoproteínas bacterianas.

5.2 Niveles de expresión del gen *spbhp-37* en presencia de Hb

S. pneumoniae utiliza Hb y hemo como únicas fuentes de hierro para su crecimiento y nuestros resultados previos sugerían que la proteína Sphbp-37 está involucrada en la unión a Hb y hemo (Romero-Espejel *et al*, 2013). Para corroborar la participación de Sphbp-37 en la unión a HB y hemo, analizamos los niveles de expresión de su transcrito en presencia de sus ligandos con la idea de que, si realmente tiene el papel sugerido, la presencia de Hb y hemo

regularían positivamente su expresión. Para ello, se realizaron ensayos semicuantitativos por RT-PCR utilizando la expresión del gen ribosomal 16s como control interno. En estos experimentos las bacterias se crecieron durante 4 h en medio THB-Y o en THB-Y sin hierro suplementado con Hb. Los niveles del RNA 16S permanecieron constantes en todas las condiciones (Figura 16A). El análisis por densitometría reveló que los niveles de RNAm de *spbhp-37* en presencia de Hb aumentaron 40%, en comparación con el medio de control TH (Figura 16B), todos los resultados se normalizaron con los niveles de rRNA 16S, lo que apoya la hipótesis de que *Sphbp-37* participa en la adquisición de hierro por *S. pneumoniae*.

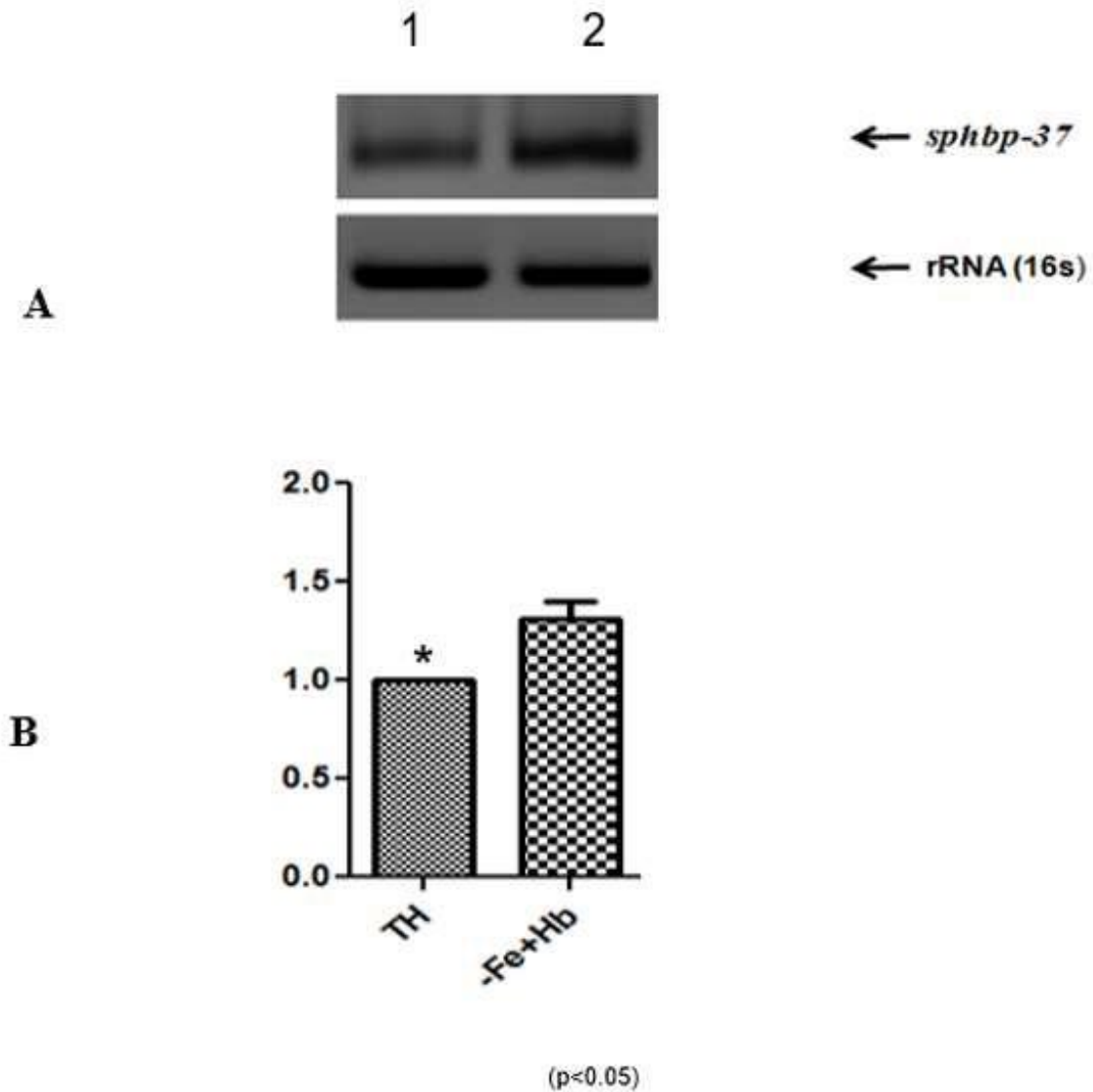


Figura 16. La Hb aumenta la expresión del RNAm del gen *spbhp-37*. (A) Los niveles de RNAm del gen *spbhp-37* se analizaron en diferentes condiciones de hierro mediante RT-PCR y análisis por densitometría. Se cultivaron células R6 de *S. pneumoniae* con diferentes condiciones de hierro en medio THB-Y, en medio depletado de hierro y suplementado con Hb. (B) Representación gráfica del análisis por densitometría. Se utilizó RNAr 16S como un control de expresión constitutivo. Los datos representan el promedio y la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes por triplicado.

5.3 Clonación, expresión y solubilidad de la proteína recombinante Sphbp-37

Para corroborar que Sphbp-37 tiene la capacidad de unir Hb y hemo se decidió probar esta capacidad de la proteína purificada. Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen completo, excepto la secuencia codificante del péptido señal, añadiendo a los mismos los sitios de reconocimiento de las enzimas *Bam*HI y *Sal* I, para su posterior clonación dirigida en el vector de expresión pGEX-6P-1.

Con estos cebadores y utilizando como templado el DNA genómico de *S. pneumoniae* se obtuvo el amplicón del gen *sphbp-37* con el tamaño esperado de 1050 pb (Figura 17, carril 2), mientras que en ausencia de DNA no se observó ninguna señal (Figura 18, carril 1), indicando que los oligos son específicos.

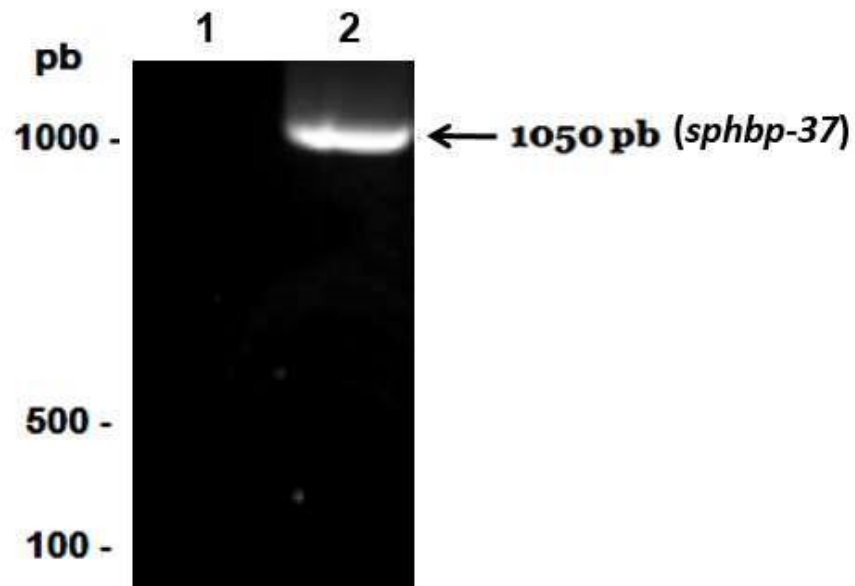
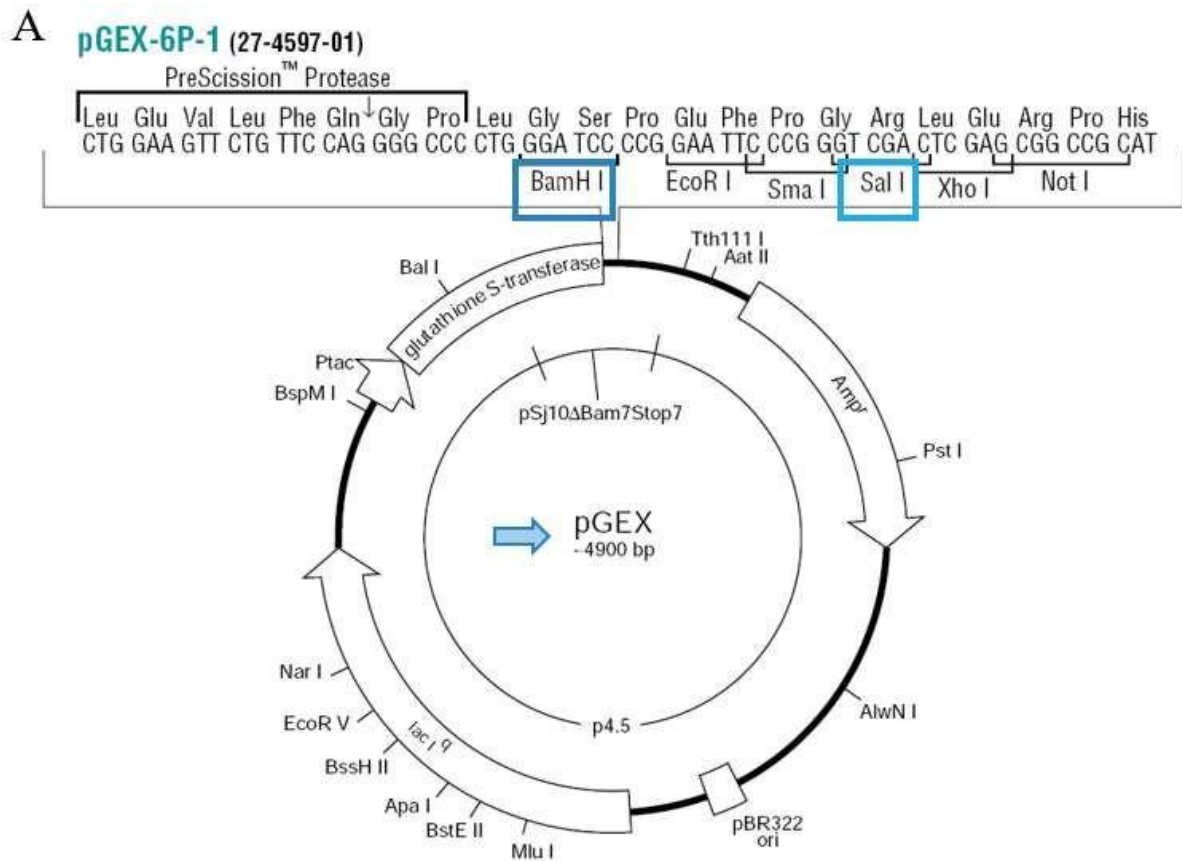


Figura 17. Amplificación por PCR del gen *sphbp-37* de *S. pneumoniae*. A partir de DNA genómico de *S. pneumoniae* y oligos específicos se realizaron ensayos de PCR. Los productos de la reacción se analizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Amplificado del gen *sphbp-37* de 1050 pb (carril 2) y control negativo: reacción en ausencia de DNA (carril 1).

Posteriormente, el producto de PCR se clonó en el plásmido pGEX-6P-1 (Figura 18A) para obtener a la proteína Sphbp-37 fusionada a la etiqueta de GST codificada por el vector. De algunas de las colonias que crecieron en el medio selectivo se extrajeron los plásmidos que fueron analizados mediante restricción con las enzimas *Bam*HI/*Sal*I y electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. El resultado del análisis de uno de los plásmidos candidato, donde con la digestión con solo una de las enzimas (*Bam*HI o *Sal*I) se aprecia una banda de 5950 pb, mientras que en la doble digestión se aprecian dos bandas; la del plásmido de 4900 pb y una de 1050 pb que corresponde al gen *sphbp-37* de *S. pneumoniae* (Figura 18B).



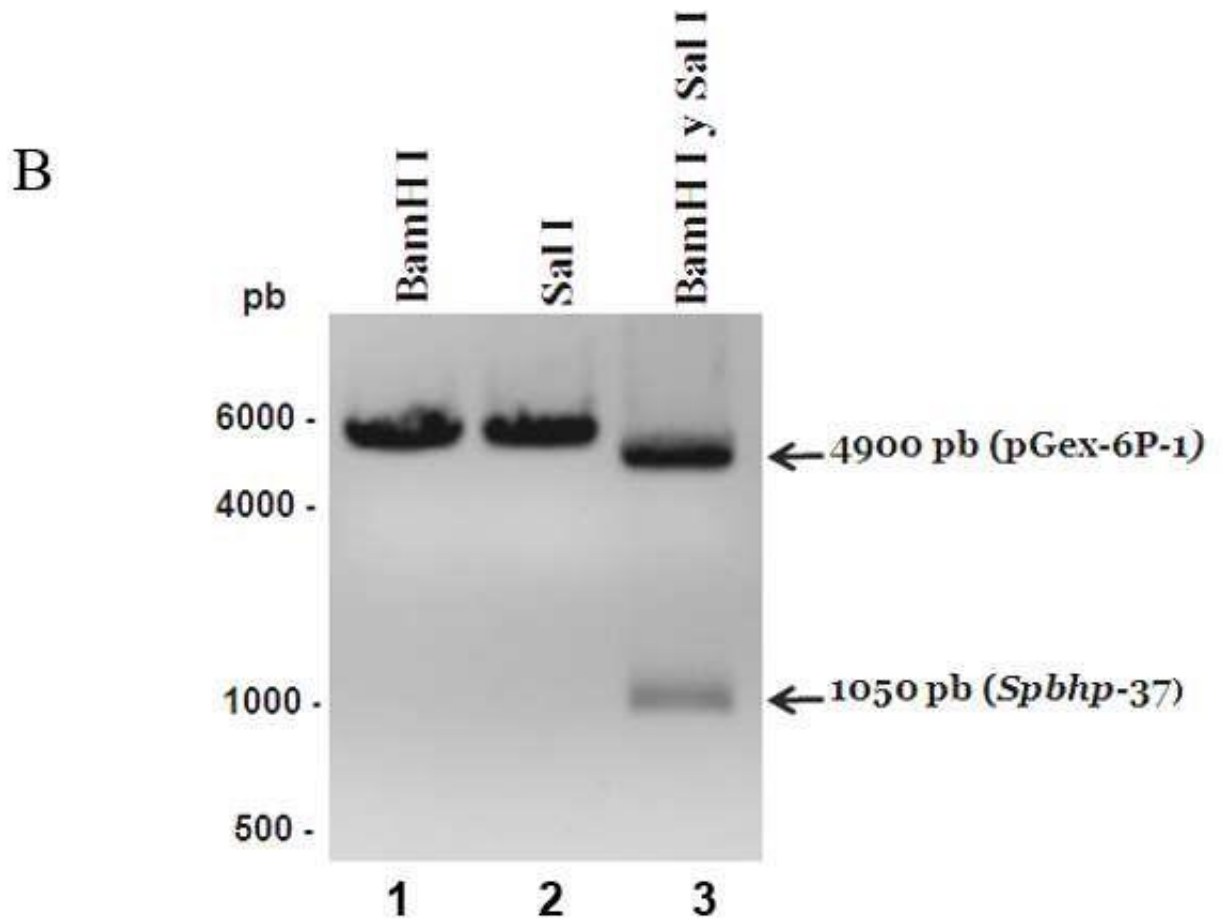


Figura 18. Clonación del gen *sphbp-37* en el plásmido *pGEX-6P-1*. (A) Representación esquemática del plásmido *pGEX-6P-1* y sitios de corte de las enzimas *BamHI* y *SalI* (rectángulos). (B) Un plásmido candidato a contener el gen de interés se digirió con las enzimas *BamHI* o *SalI* o con las dos enzimas y los productos se analizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Digestión con la enzima *BamHI* (carril 1), digestión con la enzima *SalI* (carril 2) y doble digestión con las enzimas *BamHI* y *SalI* (carril 3).

Posteriormente, el vector vacío y la construcción de interés pGEX-6P-1/*sphbp-37* se transformaron en células *E. coli*, cepa BL21 y la expresión de las proteínas recombinantes (GST y GST/*sphbp-37*) se indujo con IPTG durante 3 h. Finalmente, la sobreexpresión de la proteína se analizó por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. En estos ensayos se observó la sobreexpresión de una proteína de 26 kDa (GST) cuando las bacterias se transformaron con el vector vacío y se indujeron con IPTG (Figura 19, carril 2), mientras que en las bacterias transformadas con el plásmido que contenía el gen de interés se detectó la sobreexpresión de una proteína de 63 kDa (Figura 19, carril 4), que corresponde al peso molecular esperado para la proteína *Sphbp-37* recombinante (26 kDa de GST y 37kDa de *Sphbp-37*). La sobreexpresión de la proteína GST/*Sphbp-37* fue máxima a la 3 h de inducción, por lo que este tiempo fue el empleado en experimentos posteriores.

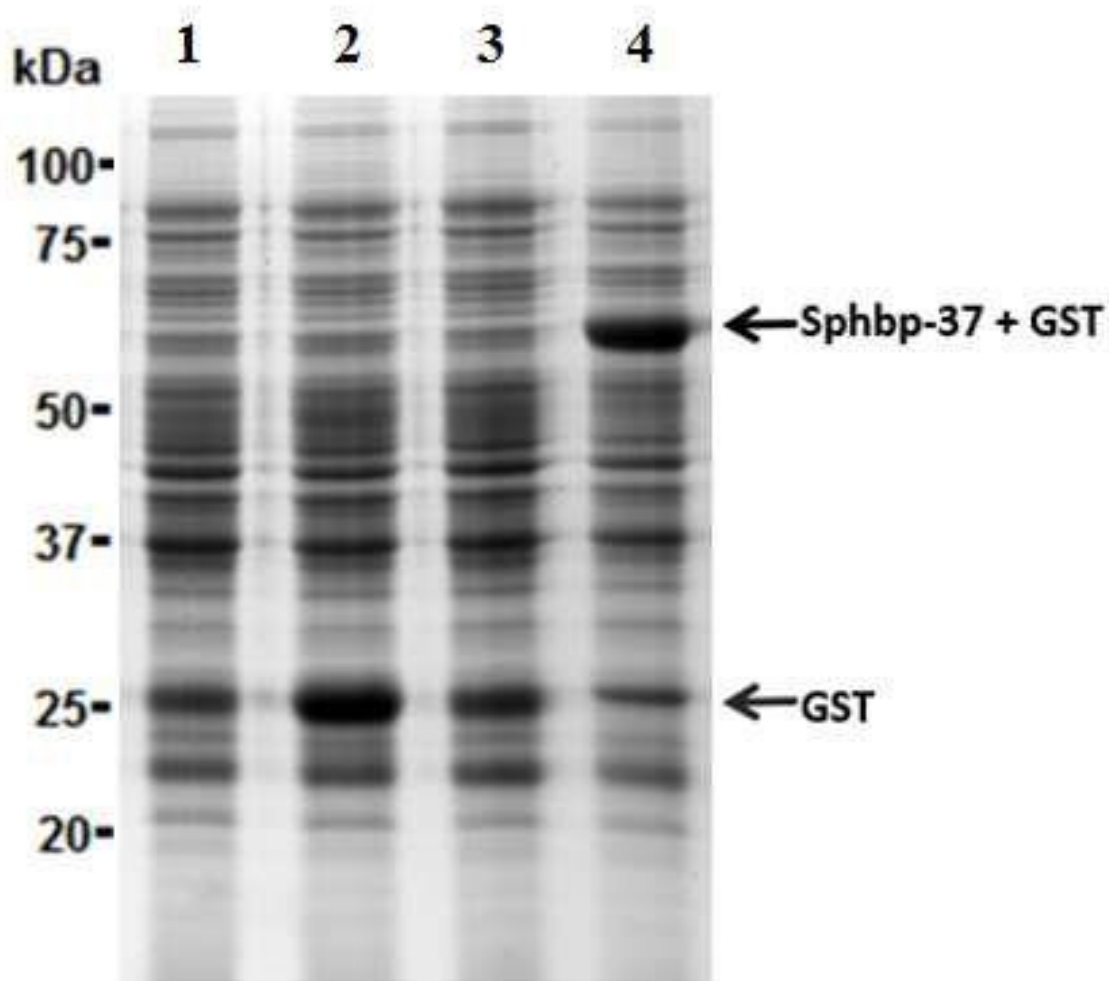


Figura 19. Inducción de la proteína recombinante Spbhp-37 en el vector *pGEX-6P-1*. Las proteínas totales de bacterias *E. coli* transformadas con el vector *pGEX-6P-1* o con la construcción de interés *pGEX-6P-1/spbhp37* e incubadas o no con IPTG durante 3 h se analizaron mediante SDS-PAGE al 12% teñidas con azul de Coomassie. Proteínas de bacterias conteniendo el vector vacío no inducidas (carril 1), proteínas de bacterias conteniendo el vector vacío e inducidas con IPTG (carril 2), proteínas de bacterias conteniendo la construcción de interés no inducidas (carril 3), proteínas de bacterias conteniendo la construcción de interés e inducidas con IPTG (carril 4). Las flechas indican la sobreexpresión de las proteínas Spbhp-37+GST y GST (control).

Una vez obtenida la sobreexpresión de la proteína recombinante Spbhp-37 se analizó la presencia de la misma en las fracciones solubles e insolubles de las bacterias inducidas y se analizó mediante SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. En estos experimentos se observó que la proteína Spbhp-37 se concentraba en la fracción insoluble (Figura 20).

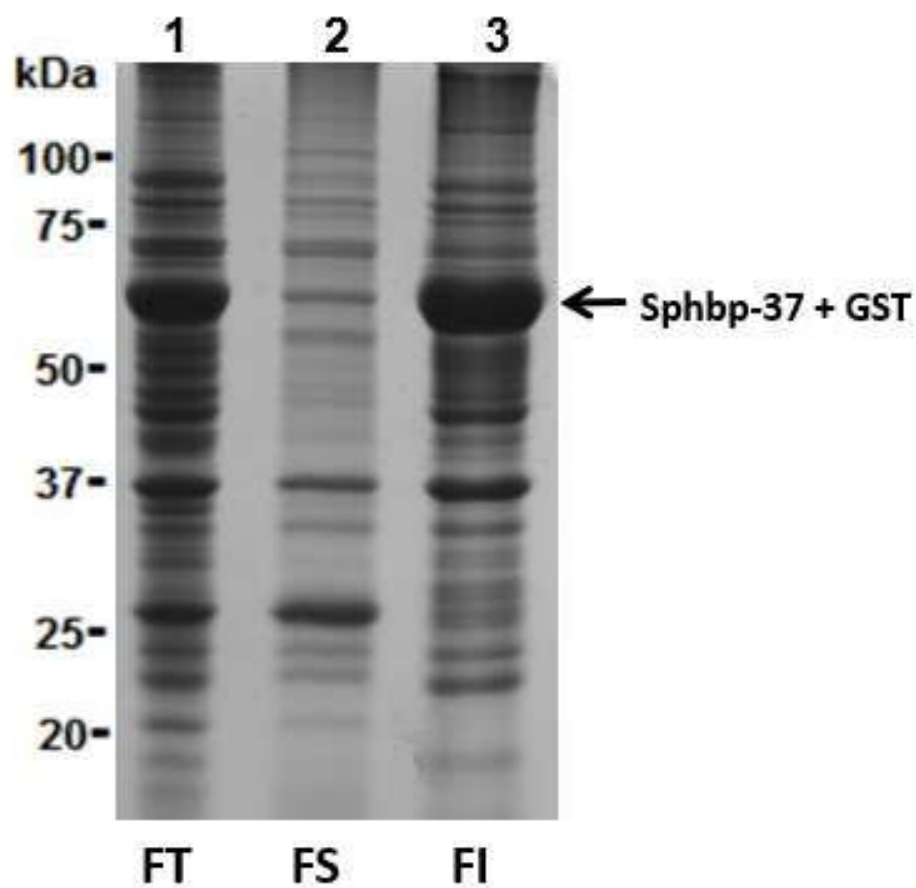


Figura 20. Análisis de la solubilidad de la proteína recombinante Spbhp-37. Las proteínas solubles e insolubles de bacterias inducidas con IPTG se analizaron mediante SDS-PAGE al 12% teñidas con azul de Coomassie. Proteínas totales (carril 1), proteínas de la fracción soluble (carril 2), proteínas de la fracción insoluble (carril 3). La flecha señala a la proteína recombinante Spbhp-37+GST.

Por lo tanto, se llevó a cabo un protocolo para solubilizar los cuerpos de inclusión como se describió en Materiales y Métodos. Después de este procedimiento se logró obtener a la

proteína de 63 kDa (Figura 21A, carril 5), la cual fue posteriormente purificada mediante cromatografía de afinidad acoplada a glutatión (Figura 21A, carril 6). Para confirmar que la proteína purificada corresponde a la proteína GST/Sphbp-37 llevamos a cabo ensayos de Western blot utilizando anticuerpos anti-GST. Los resultados mostraron que los anticuerpos reconocieron la proteína purificada (Figura 21B, carril 1).

5.4 Obtención de los anticuerpos anti-Sphbp-37

Con el fin de localizar a la proteína Sphbp-37 en la superficie de *S. pneumoniae*, se decidió producir anticuerpos contra ella. La proteína recombinante purificada se utilizó como antígeno para inocular un conejo. Los anticuerpos obtenidos reconocieron a la proteína recombinante (Figura 21B, carril 2) y a la proteína nativa mediante ensayos de western blot utilizando las proteínas totales de *S. pneumoniae*. En estos ensayos, los anticuerpos reconocieron una sola banda de 37 kDa, el peso molecular de Sphbp-37 (Figura 21C, carril 3). Esta banda no se detectó cuando los ensayos de western blot se realizaron con suero preinmune o con anticuerpos anti-GST (Figura 21C, carriles 2 y 4). Estos resultados demostraron la especificidad de los anticuerpos generados contra Sphbp-37.

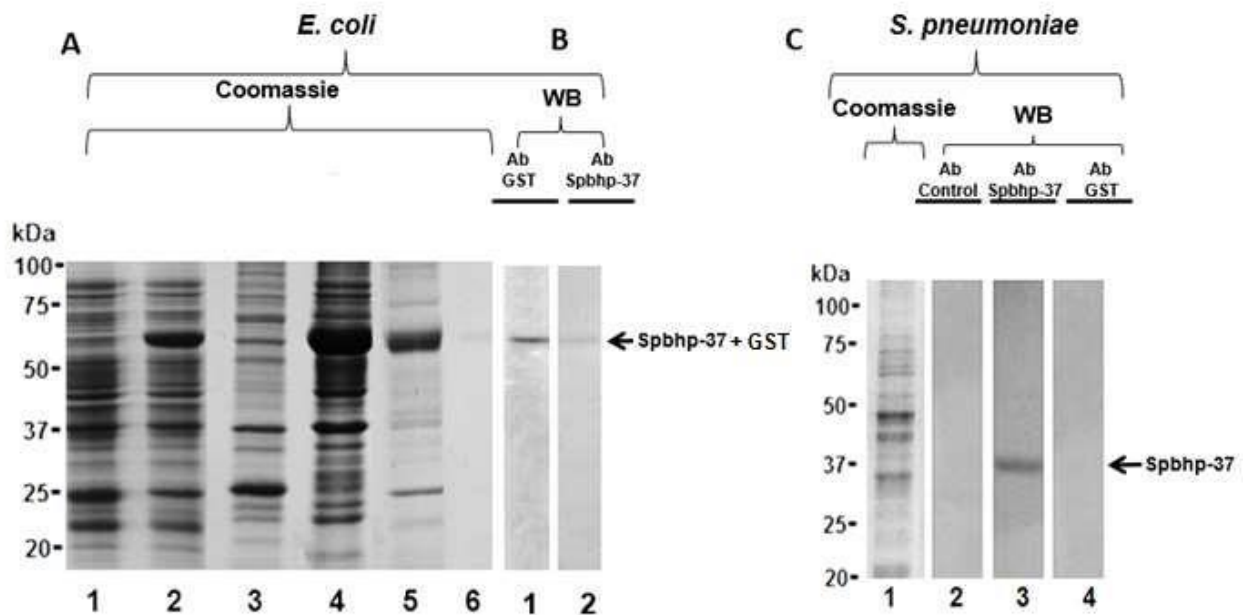


Figura 21. Solubilización de la proteína recombinante Spbhp-37 y producción de anticuerpos. La proteína recombinante Spbhp-37 se expresó en bacterias *E. coli* (cepa BL21), se solubilizaron los cuerpos de inclusión y la proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad. Entonces esta proteína se utilizó como antígeno para obtener anticuerpos específicos contra ella, los cuales se utilizaron en ensayos de western blot sobre la proteína recombinante y sobre extractos totales de *S. pneumoniae*. (A) Producción y purificación de la proteína recombinante Spbhp-37. Las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE al 12% teñidas con azul de Coomassie. Proteínas totales de bacterias no inducidas (carril 1), proteínas totales de bacterias inducidas con IPTG (carril 2), fracción soluble de bacterias inducidas con IPTG (carril 3), fracción insoluble de bacterias inducidas por IPTG (carril 4), solubilización de cuerpos de inclusión (carril 5), proteína purificada (carril 6). (B) Western blot sobre la proteína recombinante purificada. Western blot usando un anticuerpo dirigido contra la etiqueta de GST (carril 1), western blot usando el anticuerpo dirigido contra la proteína recombinante (antiSpbhp-37) (carril 2). (C) Las proteínas totales de *S. pneumoniae* se analizaron en SDS-PAGE al 12% teñidas con azul de Coomassie y por ensayos de western blot. Extractos totales de *S. pneumoniae* analizados por SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie (carril 1), western blot utilizando el suero preinmune (carril 2), western blot usando anticuerpos anti-Spbhp-37 (carril 3), western blot usando anticuerpos anti-GST (carril 4).

5.5 La proteína Spbhp-37 se incrementa en la superficie de *S. pneumoniae* cuando se cultivó con Hb como única fuente de hierro

Para investigar la localización de la proteína Spbhp-37 en *S. pneumoniae* se realizaron ensayos de inmunoelectromicroscopía, utilizando los anticuerpos contra la proteína recombinante. Nuestros resultados mostraron la presencia de proteína Spbhp-37 exclusivamente sobre la superficie de las bacterias (Figura 22B). La señal fue específica para la proteína Spbhp-37, ya que en el control negativo, donde las bacterias se incubaron sólo con los anticuerpos secundarios marcados con oro, no se detectó ninguna señal (Figura 22A). Para analizar el efecto de la Hb en la expresión de Spbhp-37, cultivamos *S. pneumoniae* en THB en presencia de Hb como la única fuente de hierro. En esta condición se observó que la aparición de la proteína Spbhp-37 en la superficie de las bacterias era más abundante que cuando se cultivaron células en medio normal (Figura 22C). Para obtener un valor

cuantitativo se contaron las señales positivas en cada condición en 25 bacterias seleccionadas al azar. Los resultados revelaron un aumento en el promedio de partículas de aproximadamente dos veces (5 vs 8 partículas de oro por célula) en las bacterias cultivadas con Hb (Figura 22D). Estos resultados indican que la presencia de Hb induce, además del transcrito, la expresión de la proteína Spbhp-37.

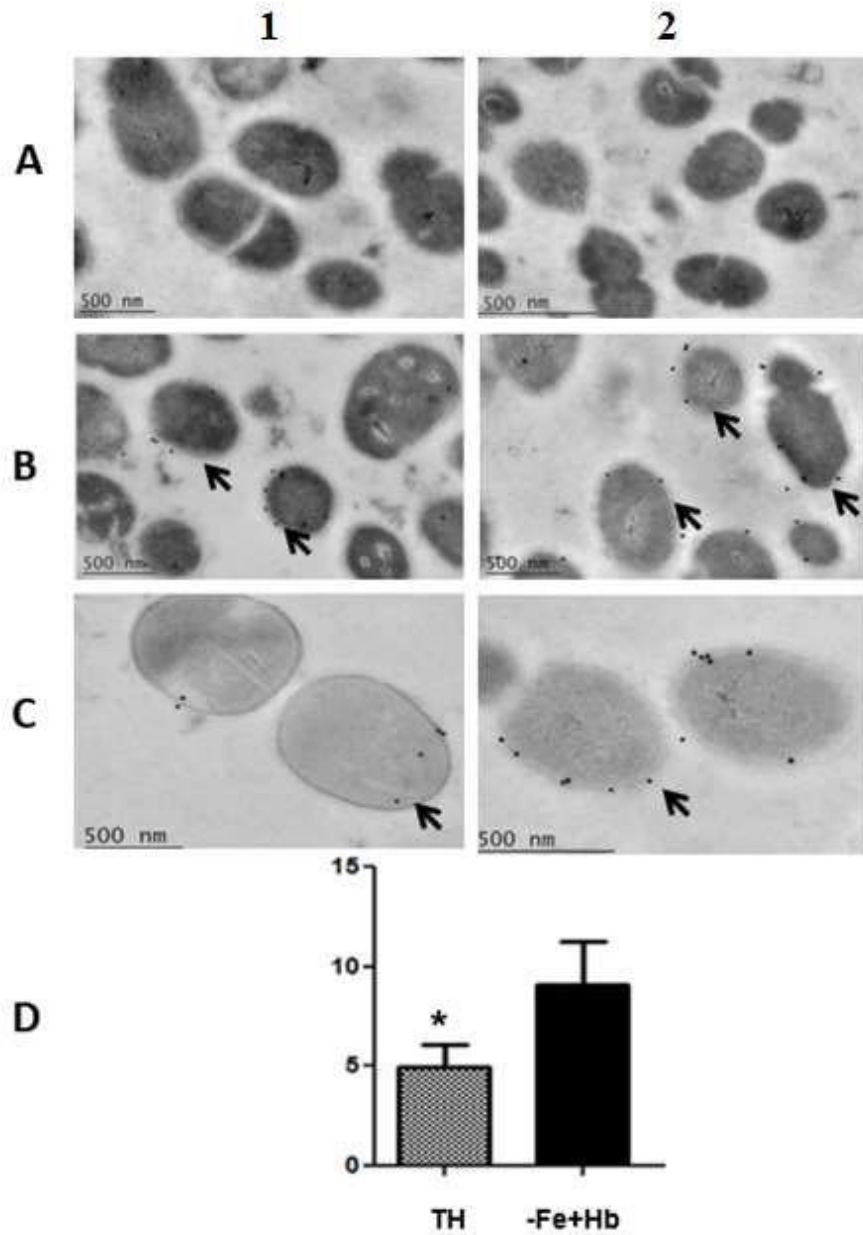


Figura 22. Inmunolocalización de la proteína Spbhp-37. La localización de Spbhp-37 se analizó por microscopía electrónica. (A) Las bacterias se incubaron sólo con los anticuerpos secundarios marcados con oro. Control negativo. (B) Localización de Spbhp-37 en medio normal (1) y en medio con Hb como única fuente de hierro (2). (C) Ampliación de las bacterias para comparar la expresión en medio normal (1) y en medio con Hb como única fuente de hierro (2). Las flechas indican la localización de la proteína Spbhp-37 en *S. pneumoniae*. (D) Análisis cuantitativo de la expresión de Spbhp-37. Se contaron las partículas de oro en la superficie de 25 bacterias elegidas al azar tanto en condiciones normales (TH) como en medio con Hb como fuente de hierro (Fe + Hb). Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. El asterisco indica una diferencia significativa ($p < 0,05$).

5.6 Anticuerpos anti Spbhp-37-GST limitan el crecimiento celular cuando Hb se suministra como la única fuente de hierro

Para confirmar que la proteína Spbhp-37 está involucrada en el mecanismo de adquisición de hierro de *S. pneumoniae*, y aprovechando la característica de que la cepa en estudio es una cepa no encapsulada, se diseñó un experimento en el que se utilizaron los anticuerpos antiSpbhp-37 para bloquear la unión de la Hb y por lo tanto la adquisición de hierro, afectando el crecimiento de las bacterias cuando Hb es la única fuente de hierro. Cuando *S. pneumoniae* se cultivó en THB bajo la inanición de hierro, el crecimiento celular fue limitado, pero cuando este medio se suplementó con Hb como la única fuente de hierro, se restauró el crecimiento celular (Figura 23). Interesantemente el crecimiento celular se detuvo a partir de las 4 horas de cultivo, cuando se añadieron anticuerpos anti-Spbhp-37 a los cultivos con Hb como la única fuente de hierro (Figura 23). Por el contrario, el suero pre-inmune mostró un efecto mínimo en el crecimiento celular en medios suplementados con Hb como la única fuente de hierro (Figura 23). Los resultados mostraron claramente que el crecimiento de *S. pneumoniae* es afectado por la presencia de anticuerpos específicos anti-Spbhp-37 bajo condiciones limitantes de hierro y adición de Hb como única fuente de hierro, soportando la hipótesis de que la proteína Spbhp-37 participa en la adquisición de hierro mediante la unión de Hb.

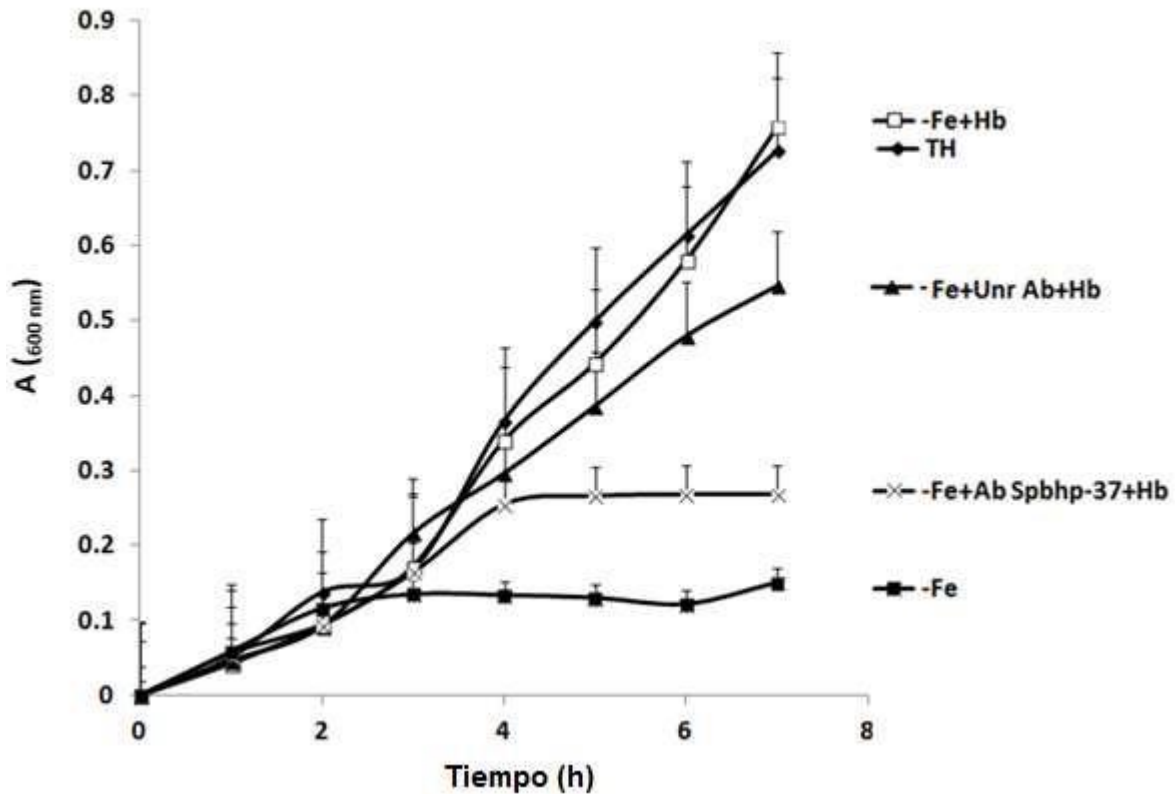


Figura 23. Los anticuerpos anti-Spbhp-37-GST bloquean el crecimiento de *S. pneumoniae*. La cepa R6 de

S. pneumoniae se cultivó en caldo Todd-Hewitt en condiciones de: suficiencia de hierro (◆); sin hierro (■); sin hierro y suplementado con Hb (□); sin hierro y suplementado con Hb en presencia de anticuerpos antiSpbhp-37 (×); y sin hierro y suplementado con Hb en presencia de suero preinmune (utilizado como anticuerpos no relacionados) (▲). El crecimiento celular se determinó cada hora durante un periodo de 7 h mediante espectrofotometría (600 nm). Los datos representan la media ± DE de tres experimentos independientes por triplicado. El crecimiento celular a partir de bacterias cultivadas en el medio sin hierro y suplementado con Hb en presencia de anticuerpos anti-Spbhp-37 fue significativamente más alto en comparación con el crecimiento celular de bacterias cultivadas en el medio sin hierro y suplementado con Hb en presencia de suero preinmune ($p < 0.05$, ANalysis Of VAriance (ANOVA) unidireccional).

5.7 La proteína Spbhp-37 tiene la capacidad de unir Hb

La inhibición del crecimiento celular con anti-Spbhp-37 en presencia de Hb apoya la hipótesis de que la proteína Spbhp-37 funciona como un receptor de Hb. Para corroborar esta hipótesis la interacción entre la proteína Spbhp-37 y Hb se investigó mediante ensayos de overlay. Para ello, las proteínas totales de *S. pneumoniae* se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Figura 24D). Posteriormente, las membranas se incubaron con Hb y la unión de ésta a las proteínas presentes en las membranas se reveló con anticuerpos anti-Hb. En estos ensayos al menos cinco proteínas de los extractos de proteínas totales de *S. pneumoniae*, incluyendo una banda de 37 kDa que puede corresponder a la proteína Spbhp-37, fueron reconocidos por la Hb (Figura 24A). Interesantemente la detección de la banda no fue observada cuando se adicionaron los anticuerpos anti-Spbhp-37 en el ensayo de overlay (Figura 24B). Además, no se detectaron bandas cuando se omitió la incubación con Hb (control negativo) (Figura 24C). Estos resultados confirman que Spbhp37 une Hb y que los anticuerpos anti-Spbhp-37 bloquean la interacción entre ambas proteínas.

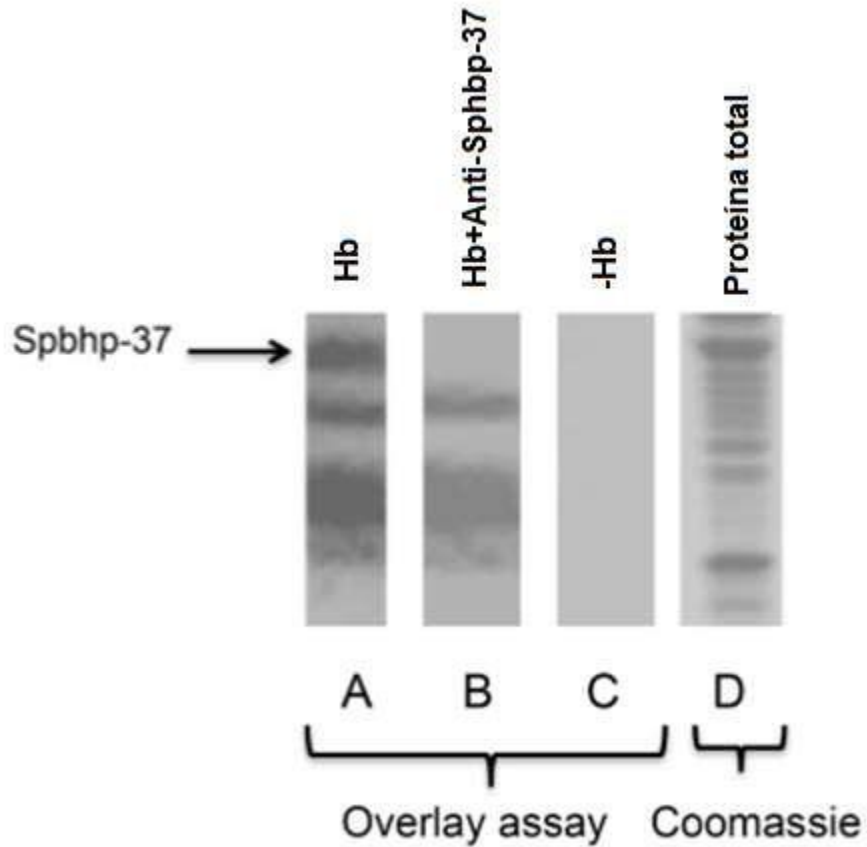


Figura 24. La Hb se une a la proteína Spbhp-37. Las proteínas totales de *S. pneumoniae* se separaron por SDS-PAGE al 12%, se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se realizaron ensayos de overlay. (A) Overlay. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con Hb, con anticuerpos anti-hemoglobina y anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. (B) Al igual que en A, pero el ensayo de overlay se incubó primero con anticuerpos anti-Spbhp-37. (C) Las membranas de nitrocelulosa se incubaron sólo con anticuerpos primarios y secundarios (omitiendo la incubación con Hb) Control negativo. (D) Las proteínas totales de *S. pneumoniae* se revelaron por SDS-PAGE al 12%, teñido con azul de Coomassie. La flecha indica la proteína Spbhp-37.

5.8 Spbhp-37 tiene una alta afinidad por Hb

Para corroborar la unión de Spbhp-37 a Hb y determinar su afinidad se realizaron ensayos de resonancia de plasmones de superficie (SPR) utilizando la proteína recombinante. Para la realización de estos ensayos se eliminó la etiqueta de GST de la proteína recombinante Spbhp-37 mediante la digestión con la proteasa PreScission. Para confirmar el corte de la etiqueta de GST las muestras de la proteína recombinante unida a GST y las proteínas obtenidas después de la digestión se analizaron por SDS-PAGE. En esos ensayos se observaron las bandas esperadas: la de 63 kDa obtenida antes del tratamiento (GST-Spbhp37), la de 37 kDa (Spbhp-37) obtenida de la fracción que no se unió a la columna de glutation después de la digestión y la de 26 kDa (etiqueta de GST) obtenida en la fracción unida a la columna de afinidad después de la digestión (Figura 25A). La identidad de la proteína Spbhp37 fue corroborada por ensayos de Western blot usando los anticuerpos anti Spbhp-37. Estos anticuerpos reconocieron a las proteínas de 63 kDa y 37 kDa, pero no a la banda de 26 kDa (Figura 25B). Como control se realizaron ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo anti-GST, donde únicamente se revelaron las proteínas de 63 kDa y 26 kDa (Figura 25C).

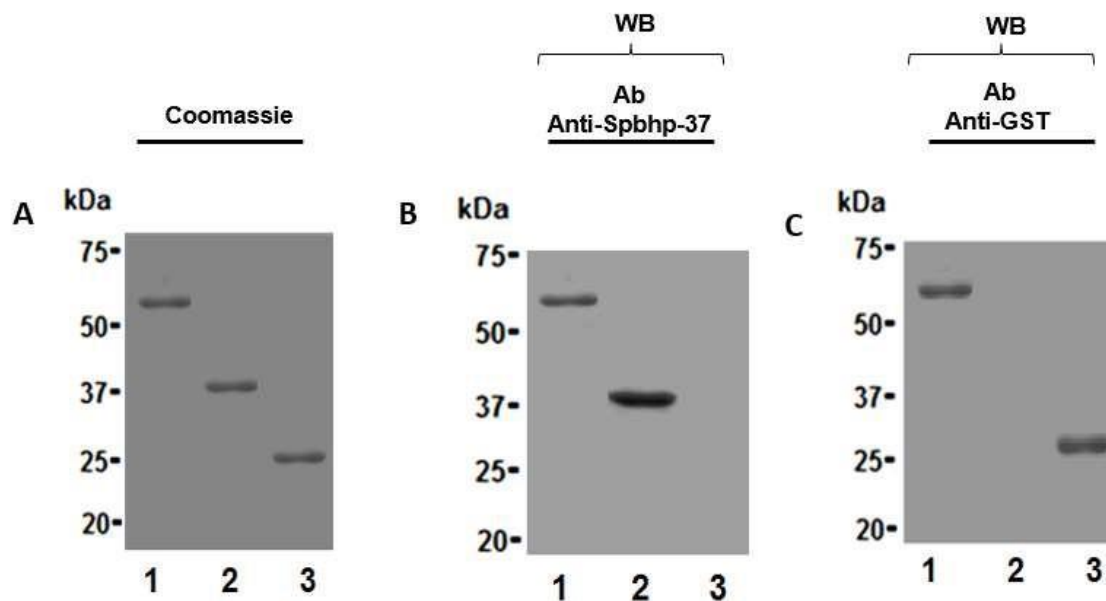


Figura 25. Purificación de la proteína recombinante Spbhp-37 sin la etiqueta de GST. La proteína recombinante Spbhp-37-GST se purificó mediante cromatografía de afinidad y la escisión de la etiqueta de GST se realizó mediante la digestión con la proteasa PreScission. Se analizaron las muestras de proteínas mediante SDS-PAGE al 12% y western blot usando anticuerpos anti-Spbhp-37 y anti-GST. (A) Tinción con azul de Coomassie. (B) Western blot con anti-Spbhp-37. (C) Western blot con anti-GST. Spbhp-37-GST (Carril 1), Spbhp-37 sin GST (Carril 2), GST (carril 3).

Posteriormente se realizaron los experimentos por SPR, en el cual la Hb se inmovilizó sobre un chip sensor y la proteína Spbhp-37 (sin la etiqueta de GST) se adicionó a diferentes concentraciones de 100 a 1000 nm. En estos experimentos se observó una unión de la proteína Spbhp-37 a Hb dependiente de la dosis (Figura 26). Con los datos obtenidos se realizó el ajuste de la curva de los sensogramas y se determinó un valor para la constante de disociación (Kd) de 3.57×10^{-7} M, lo cual indica una alta afinidad de la proteína Spbhp-37 por la Hb.

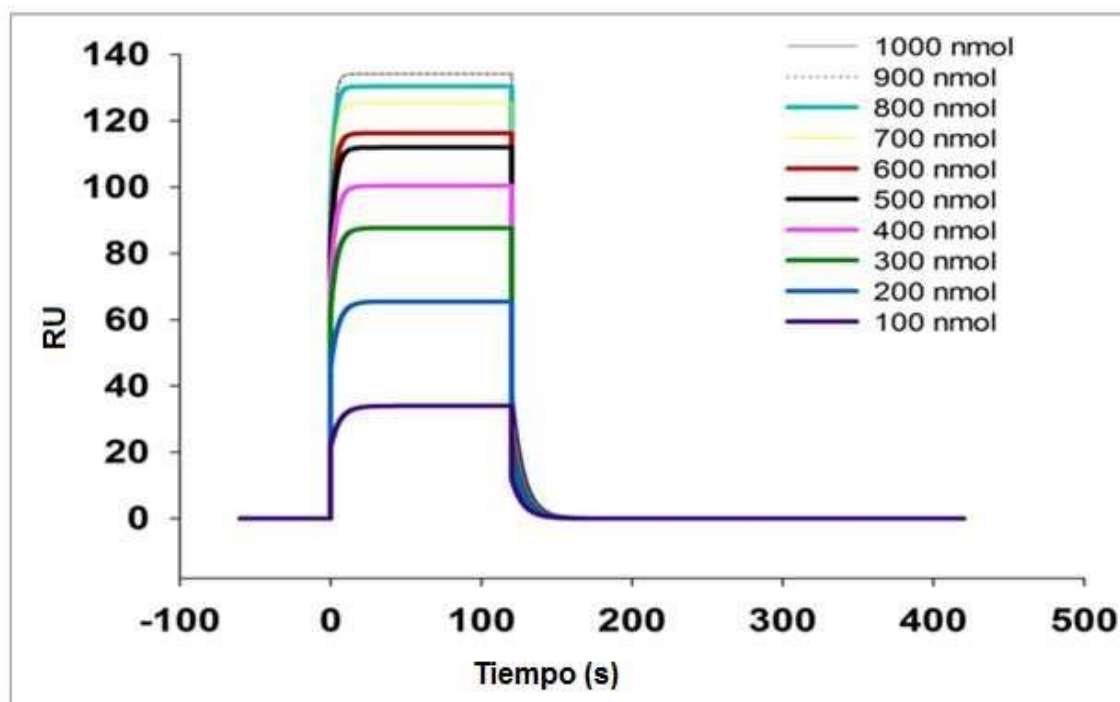


Figura 26. Análisis cuantitativo de la interacción de Hb y la proteína Spbhp-37 mediante la técnica SPR (Surface Plasmon Resonance). La hemoglobina humana se inmovilizó en chips sensores CM5 (Biacore) y las curvas de unión para Spbhp-37 se expresaron en unidades de resonancia (RU) en función del tiempo. Se indican los parámetros cinéticos y las concentraciones del análisis.

5.9 Modelo tridimensional de la proteína Sphbp-37

El modelaje 3D de la proteína Sphbp-37 mostró que ésta es una proteína globular (Figura 27A), la cual presenta nueve α -hélices y once β -plegadas. Después de la simulación de la dinámica molecular a 500 ns por el software NAMD, realizada para la estabilidad dinámica de la proteína Sphbp-37 aún conservó su forma globular, mostrando el mismo número de hélices α , pero trece hebras β (Figura 27B).

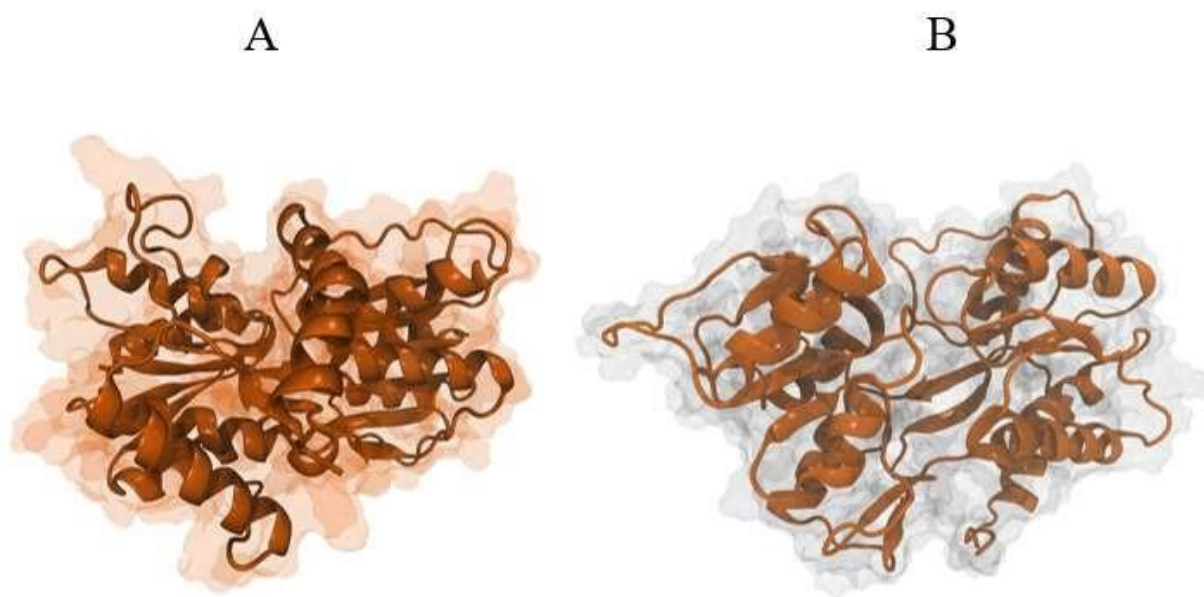


Figura 27. Modelo tridimensional de la proteína Sphbp-37 antes y después de 500 ns de simulación en la dinámica molecular obtenida con el servidor I-TASSER.

El análisis RMSD de la proteína Sphbp-37 durante la trayectoria a 500 ns evidenció que la proteína alcanzó el equilibrio después de 50 ns (Figura 28A). Los valores del Rg mostraron la expansión de la proteína después de 100 y 200 ns, con compacidad en los últimos 20 ns de la trayectoria (Figura 28B). Los valores de RMSF de la proteína mostraron mayor fluctuación en algunos de los aminoácidos (Figura 28C).

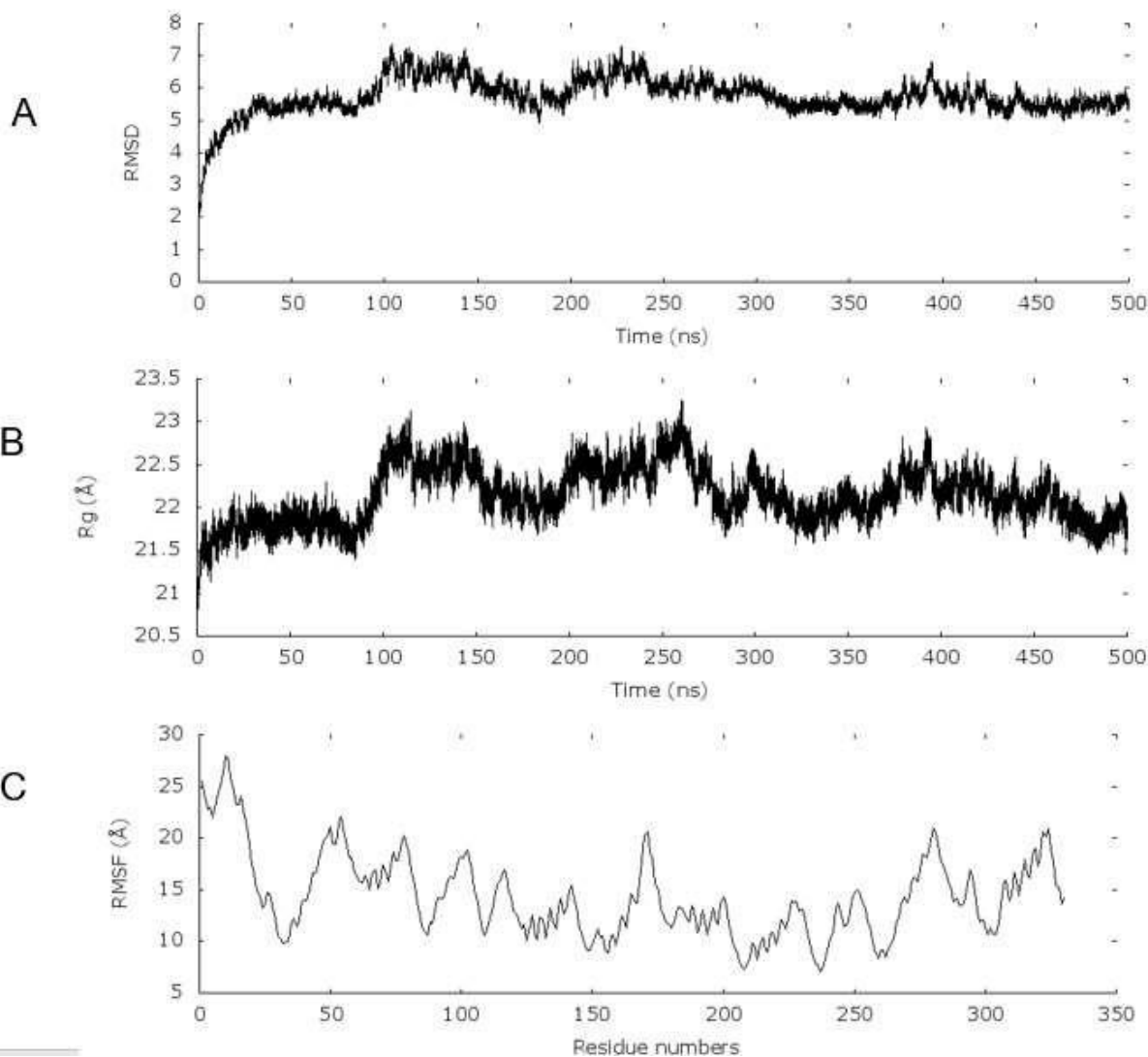


Figure 28. Análisis estructural de la proteína Sphbp-37. La trayectoria molecular se realizó con el programa Carma. A) RMSD, B) Rg y C) RMSF.

5.10 El análisis de acoplamiento predice la unión entre la proteína Sphbp-37 y el grupo hemo

Para llevar a cabo el análisis *in silico* de interacción entre la proteína Sphbp-37 y el grupo hemo, se realizó la simulación del acoplamiento molecular después de 500 ns de la dinámica molecular. Los resultados sugieren que existe interacción mediante los siguientes aminoácidos de Sphbp-37: ácido glutámico en posición 152 (Glu152), glutamina en posición 177 (Gln177), valina en posición 178 (Val178), ácido aspártico en posición 179 (Asp179), tirosina en posición 180 (Tyr180), isoleucina en posición 193 (Ile193), alanina en posición 196 (Ala196), glutamina en posición 197 (Gln197) y alanina en posición 200 (Ala200) (Figura 29).

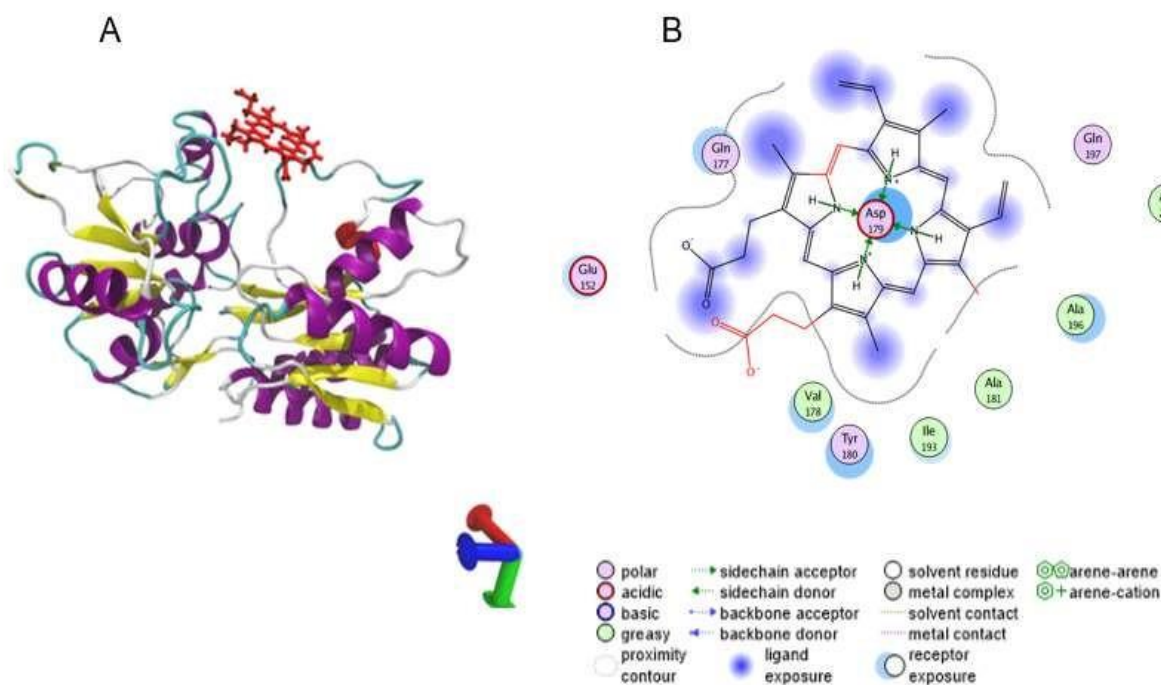


Figure 29. Análisis de acoplamiento molecular entre la proteína Sphbp-37 y el grupo hemo. (A) Modelo tridimensional del análisis. (B) La interacción entre la proteína Sphbp-37 y el grupo hemo se mantiene a través de 10 aminoácidos.

Después de realizar el análisis de acoplamiento molecular entre la proteína Sphbp-37 y el grupo hemo, se decidió llevar a cabo el acoplamiento de la proteína con los cambios de los

aminoácidos glu152 por alanina (glu152ala) y asp179 por alanina ala (asp179ala), debido a que esas mutaciones teóricamente podrían inhibir la unión de sphbp-37 y el grupo hemo, ya que son los aminoácidos que mantienen la interacción directamente.

5.11 Modelo tridimensional de la proteína Sphbp-37 mutada

El modelaje 3D de la proteína Sphbp-37 mutada mostró que ésta es una proteína globular (Figura 30A), la cual presenta diez α -hélices y doce β -plegadas. Después de la simulación de la dinámica molecular a 500 ns por el software NAMD, la proteína Sphbp-37 mutada aún conservó su forma globular, mostrando nueve hélices α , pero trece hebras β (Figura 30B).

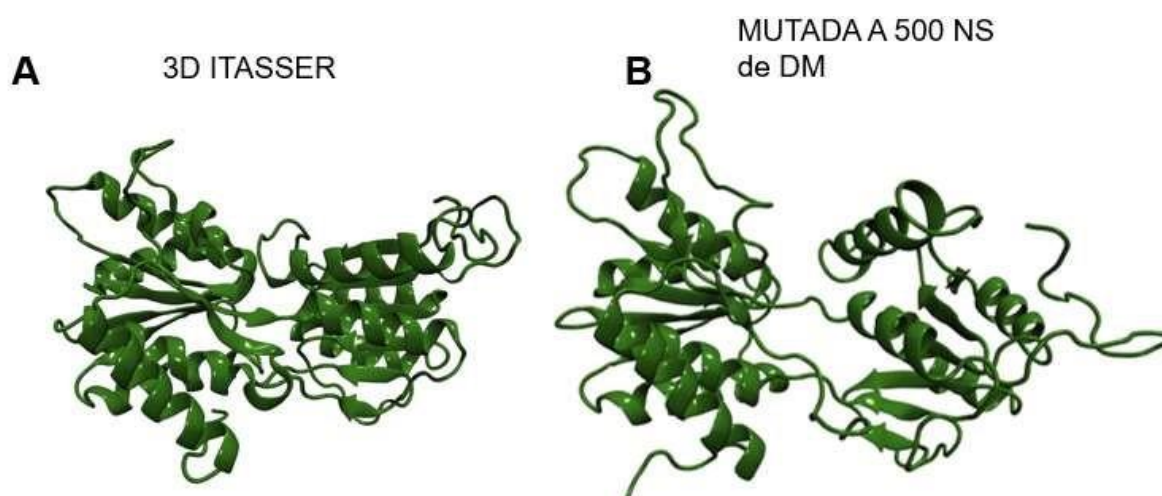


Figura 30. Modelo tridimensional de la proteína Sphbp-37 mutada antes y después de 500 ns de simulación en la dinámica molecular obtenida con el servidor I-TASSER.

Posteriormente, una vez que se efectuó la simulación de la proteína Sphbp-37 mutada (Figura 30A y B), se procedió con el acoplamiento del grupo hemo con la proteína Sphbp-37 mutada. Con estos cambios de aminoácidos se predijo una segunda estructura tridimensional que no mostró unión entre la proteína Sphbp-37 y el grupo hemo.

VI. DISCUSIÓN

Los mecanismos moleculares implicados en la adquisición de hierro están mejor estudiados y han sido descritos para muchos microorganismos Gram negativos, sin embargo, para la mayoría de los Gram positivos aún no se han dilucidado. Particularmente en la bacteria Gram positiva *S. pneumoniae* estos mecanismos han sido poco estudiados, por lo que en la presente tesis nos dimos a la tarea de estudiar a una proteína que participa en el mecanismo de adquisición de hierro como un probable receptor.

S. pneumoniae utiliza eficientemente a la hemoglobina como fuente de hierro, como se había reportado en estudios anteriores (Tai *et al*, 1993), también emplea otras fuentes de hierro como el hemo. Anteriormente identificamos dos proteínas: *proteína general de estrés 24* y una *lipoproteína* con pesos moleculares de 22 y 37 kDa, relacionadas con la unión al grupo hemo y Hb (Romero-Espejel *et al*, 2013). Estas proteínas obtenidas mediante la cromatografía de afinidad acoplada a hemo, se eluyeron con el ligando (hemo), pero no con el hierro y mediante el empleo de los ensayos de overlay se mostró que ambas proteínas tienen la capacidad de unir al grupo hemo presente en la Hb. Se evidenció que la vitamina B12, con estructura similar a la del grupo hemo, tiene la capacidad de competir con el hemo de la Hb por los sitios receptores que unen Hb en *S. pneumoniae* (Romero-Espejel *et al*, 2013). Las proteínas *general de estrés 24* de 22kDa y *lipoproteína* de 37 kDa son las que se pudieron inhibir por la probable capacidad de competencia de la vitamina B12, por lo que se propone que estas proteínas de membrana funcionen como receptores de hemo y Hb (Romero-Espejel *et al*, 2013).

En nuestra investigación decidimos confirmar el papel de la lipoproteína de 37 kDa (Sphbp37) en la adquisición de hierro a partir de Hb y del grupo hemo, para lo cual produjimos y purificamos la proteína recombinante generada en *E. coli*, la cual se usó para obtener un anticuerpo generado contra ella. Mediante ensayos de RT-PCR y Western blot utilizando esos anticuerpos se demostró que el transcrito de Sphbp-37 y la proteína se sobreexpresan en *S. pneumoniae* cuando la Hb se adiciona al medio de cultivo como única fuente de hierro. Estos resultados apoyaron la hipótesis de la participación de la proteína como un probable receptor, ya que se detectó en la superficie de la bacteria mediante estudios de inmunomicroscopía electrónica.

Además, para confirmar que la proteína Sphbp-37 está involucrada en el mecanismo de adquisición de hierro de *S. pneumoniae*, se diseñó un experimento en el que se utilizaron los anticuerpos anti-Sphbp-37 para bloquear la unión de la Hb y por lo tanto la adquisición de hierro afectando el crecimiento de las bacterias cuando Hb es la única fuente de hierro.

Cuando *S. pneumoniae* se cultivó en medio THB bajo la inanición de hierro, el crecimiento celular fue limitado, pero cuando este medio se suplementó con Hb como la única fuente de hierro, se restauró el crecimiento celular. Sin embargo, cuando se utilizaron los anticuerpos generados contra la proteína de 37 kDa para analizar el crecimiento de las bacterias en presencia de Hb, detectamos que se disminuyó alrededor del 50% el crecimiento celular con respecto a los medios de cultivo con Hb en ausencia de este anticuerpo o en presencia de suero pre-inmune, lo que indica la importancia de la proteína Sphbp-37 en la adquisición de hierro cuando Hb está disponible como fuente de hierro. Esta hipótesis se confirmó por ensayos de overlay, donde se encontró que la Hb se une a la proteína recombinante Spbhp37 y que los anticuerpos anti-Sphbp-37 eran capaces de inhibir la interacción entre Hb y la proteína.

Por otro lado, la Kd determinada por SPR para la unión de la Hb y Sphbp-37 (3.57×10^{-7} M) es similar a la reportada para el receptor de hemo TonB-dependiente (HasR) de *Serratia Marcenscens*, receptor de hemo de la membrana externa (HmuR) de *Porphyromonas gingivalis* y el receptor de hemo (HasA) de *Serratia marcenscens* (Ghigo *et al.*, 1997; Olczak *et al.*, 2001; Deniau *et al.*, 2003) (Tabla 9), lo que indica que la proteína Spbhp-37 se une a Hb con alta afinidad y sugiere que esta proteína es importante en los mecanismos de adquisición de hierro a partir de Hb.

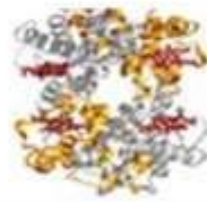
Posiblemente otras proteínas están implicadas en este mecanismo, por ejemplo, las proteínas reportadas previamente por nuestro grupo, que incluyen una proteína de estrés general de 22 kDa, una proteína de unión a maltosa de 45 kDa y un tipo de glutamina sintetasa I de 50 kDa (Romero-Espejel *et al.*, 2013). Estas proteínas podrían ayudar a introducir y almacenar la fuente de hierro en el citoplasma (Figura 31), como se han descrito en los mecanismos de adquisición de hierro para otras bacterias Gram-positivas (Mazmanian *et al.*, 2002; Mazmanian *et al.*, 2003; Skaar *et al.*, 2004; Skaar y Schneewind, 2004; Wu *et al.*, 2005).

Además, mediante la utilización de herramientas bioinformáticas se realizó la predicción de los probables sitios de unión al grupo hemo, el análisis de acoplamiento molecular sugiere que los aminoácidos Glu-152, Gln-177, Val-178, Asp-179, Tyr-180, Ala-181, Ile-193, Ala-196, Gln-197, Ala-200 de Sphbp-37 interaccionan con el grupo hemo. Con el fin de confirmar este resultado, se realizó el cambio de los aminoácidos de los dos aminoácidos Glu-152 y Asp-179, que son los aminoácidos que directamente mantienen la interacción con el grupo hemo. La presencia de los dos aminoácidos mutados eliminó teóricamente la interacción con Hb.

En conclusión, nuestros resultados nos permiten explicar uno de los mecanismos de adquisición de hierro por *S. pneumoniae* cuando la Hb está disponible. Nos permitieron demostrar que Sphbp-37 es una proteína de superficie que participa en la captación de Hb, un mecanismo esencial de este patógeno para establecer un proceso de infección en humanos. Sin embargo, aún queda mucho por dilucidar y esclarecer respecto a otras proteínas que unen hemoglobina y hemo, ya que resultaría interesante conocer la participación de éstas en el mecanismo de adquisición de hierro.

Tabla 8. Valores de las constantes de afinidad de los receptores de hemoglobina en bacterias.

Microorganismo	Receptor	Constante de afinidad (M)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sphbp-37	3.57e-07
<i>Serratia marcescens</i>	HasR	5.3 e-10
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	HmuR	2.4 e-05
<i>Serratia marcescens</i>	HasA	< e-08



Streptococcus pneumoniae:
mecanismo propuesto para
captación de hemo

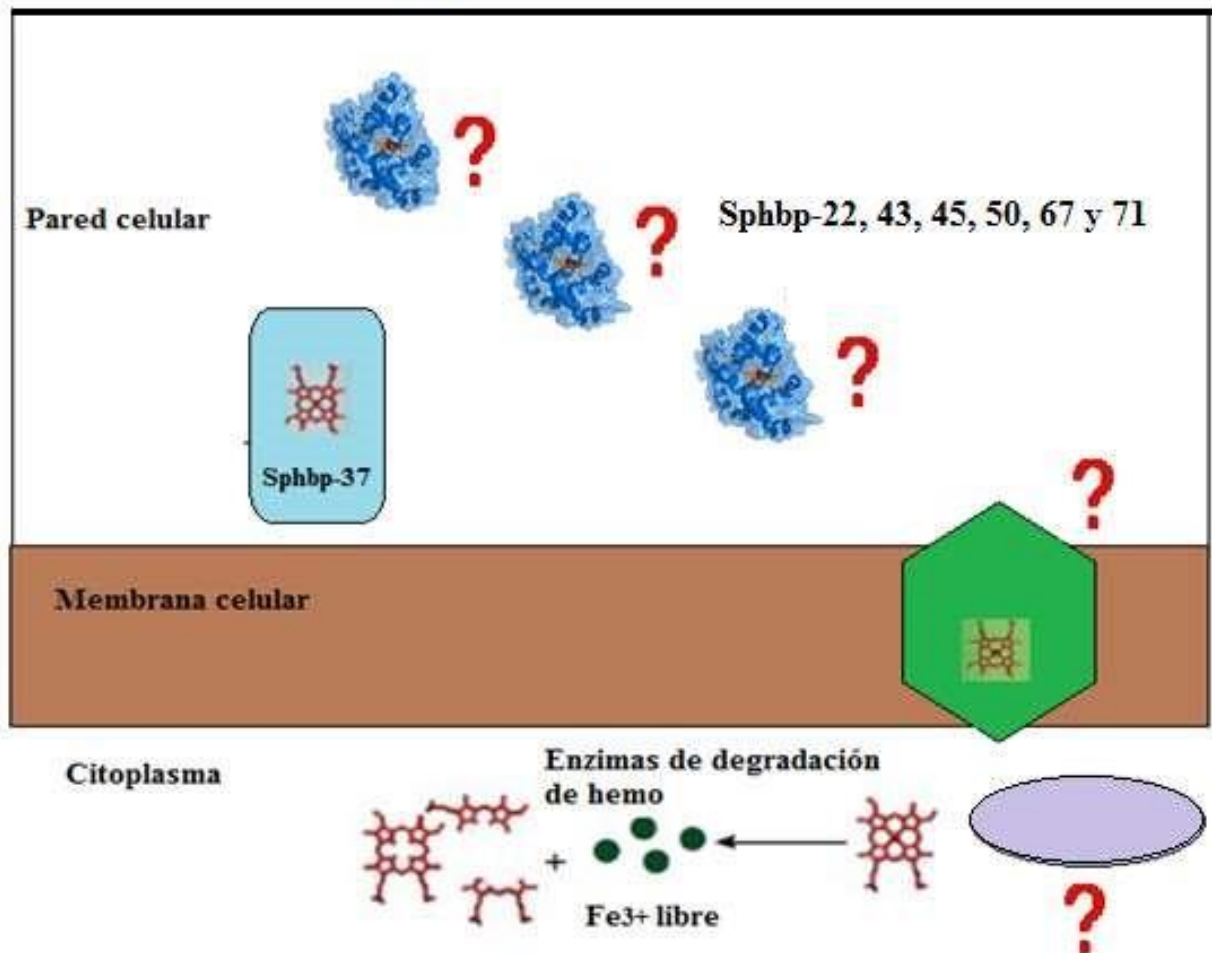


Figura 31. Mecanismo propuesto de adquisición de hemo en *Streptococcus pneumoniae*.

VII. CONCLUSIONES

- † La proteína Spbhp-37 se localiza en la superficie celular de *S. pneumoniae*.
- † El transcrito y la proteína Spbhp-37 de *S. pneumoniae* aumentan su expresión en condiciones de -Fe+Hb.
- † La proteína Spbhp-37 de *S. pneumoniae* une Hb humana con una constante de afinidad ($K_d=3.57 \times 10^{-7}$ M), valor similar al compararlo con otras ya reportadas.
- † El análisis de acoplamiento molecular *in silico* sugiere que los aminoácidos Glu-152, Gln-177, Val-178, Asp-179, Tyr-180, Ala-181, Ile-193, Ala-196, Gln-197, Ala-200 de Spbhp-37 interaccionan con el grupo hemo y que la mutación de los aminoácidos Glu-152 y Asp-179 teóricamente eliminan la unión.

VIII. PERSPECTIVAS

Determinar el sitio de unión al grupo hemo de las proteínas que funcionan como receptores.

Determinar la expresión de las proteínas que unen hemo y Hb empleando distintas fuentes de hierro.

Estudiar la participación de las proteínas con peso molecular de 22, 43, 45, 50, 67 y 71 kDa identificadas en el mecanismo de adquisición de hierro en *S. pneumoniae*.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrews S. C, Robinsón A. K; Rodríguez-Quiñonez F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:215-237.

- Andrews S, Norton I, Salunkhe A.S, Goodluck H, Aly W.S, Mourad-Agha H; Cornelis P. (2013). Control of iron metabolism in bacteria. *Met. Ions Life Sci.* 12:203–239.
- Austrian R. (1989). Pneumococcal polysaccharide vaccines. *Rev. Infect. Dis.* 11:598–602.
- Baker H, Anderson B; Baker N. (2003). Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc Natl Acad Sci.* 100:3579-3583.
- Baltz, R.H, Norris, F.H, Matsushima, P, DeHoff, B.S, Rockey, P, Porter, G, Burgett, S, Peery, R, Hoskins, J, Braverman, L, Jenkins, I, Solenberg, P, Young, M, McHenney, M.A, Skatrud, P.L; Rosteck, P.R.J. (1998). DNA sequence sampling of the *Streptococcus pneumoniae* genome to identify novel targets for antibiotic development. *Microb. Drug Resist.* 4:1-9.
- Benton, K, J. Paton; 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.
- Black S, Eskola J, Whitney C, Shinefield H. (2008). Pneumococcal conjugate vaccine and pneumococcal common protein vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit P, eds. *Vaccines*, 5th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders Company, 531–567.
- Bogaert D, Groot R, Hermans PM. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* 4:144-54.
- Brown J, Gilliland S; Holden D. (2001). A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol. Microbiol.* 40:572–585.
- Butler J; Schuchat A. (1999). Epidemiology of pneumococcal infections in the elderly. *Drugs Aging.* 15:11-19.
- Butler JC. Epidemiology of pneumococcal disease. En:Tuomanen E, Mitchell T, Morrison D, Spratt B.G. (2004). *The Pneumococcus*. Washington: ASM press. 148-68.
- Crosa J; Walsh C. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 66:223-249.
- Cutts FT, Zaman S, Enwere G, Jaffar S, Levine O, Okoko J, Oluwalana C, Vaughan A, Obaro S, Leach A, McAdam K, Biney E, Saaka M, Onwuchekwa U, Yallop F, Pierce N, Greenwood B, Adegbola R. (2005). Efficacy of nine-valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and invasive pneumococcal disease in The Gambia: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 365:1139–1146.

- Davies J, Carlstedt I, Nilsson AK, Håkansson A, Sabharwal H, van Alphen L, van Ham M, Svanborg C. (1995). Binding of *Haemophilus influenzae* to purified mucins from the human respiratory tract. *Infect. Immun.* 63(7):2485–2492.
- Deniau C, Gilli R, Izadi-Pruneyre N, Letoffe S, Delepierre M, Wandersman C, Briand C; Lecroisey A. (2003). Thermodynamics of heme binding to the HasA(SM) hemophore: effect of mutations at three key residues for heme uptake. *Biochem.* 42:10627–10633.
- Denys, G.A; Carey, R.B. (1992). Identification of *Streptococcus pneumoniae* with a DNA probe. *J. Clin. Microbiol*, 30:2725-2727.
- Dopazo, J, Mendoza, A, Herrero, J, Caldara, F, Humbert Y, F, Guerrier M, GrandSchenk E, Gandin C, de Francesco M, Polissi A, Buell G, Feger G, Garcia E, Peitsch M, Garcia-Bustos JF. (2001). Annotated draft genomic sequence from a *Streptococcus pneumoniae* type 19F clinical isolate. *Microb. Drug. Resist.*7:99-125.
- Echániz A, Velázquez M, Carnalla B, Soto N, Solórzano S, Pérez A. (1997). Antimicrobial susceptibilities and capsular types of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolated in children in Mexico City. *Microb Drug Resist.* 3:153-157.
- Evans, A; Brachman, P. (1991) Bacterial infections of humans, 2nd ed. Plenum Medical Book Co, N. Y.
- Fenoll, A, Martínez-Suarez, J, Muñoz, R, Casal, J; García, J.L. (1990). Identification of atypical strains of *Streptococcus pneumoniae* by a specific DNA probe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9:396-401.
- Ferguson A. D, Deisenhofer J. (2002). Ton B-dependent receptors structural perspectives. *Biochim Biophys Acta.* 1565:318-32.
- Finland, M; Barnes, M.W. (1977). Changes in occurrence of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* at Boston City Hospital during selected years between 1935 and 1974. *J. Clin. Microbiol.* 5:154-166.
- Forrelat M, Gauttier du Défaix; Fernández D. (2000). Metabolismo del hierro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 16:149-60.
- Forrellat M, Fernández N; Hernández P. (2005). Nuevos conocimientos sobre el metabolismo del hierro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 21:3.
- Genco, C; Dixon, D. (2001). Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol. Microbiol.* 39:1-11.

- Ghigo J. M., Letoffe S. and Wandersman C. (1997). A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179:3572–3579.
- Gray B. M., Converse J., and Dillon H. (1979). Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing disease. *J. Infect. Dis.* 140:979–983.
- Guerinot M. L. (1994). Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:743-772.
- Gundel, M; Schwarz, F.K.T. (1932). Studien über die Bakterienflora der oberen Atemwege Neugeborner (im Vergleich mit der Mundhöhlenflora der Mutter und des Pflegepersonals) unter besonderer Berücksichtigung ihrer Bedeutung für das Pneumonie problem. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheit.* 113:411-436.
- Hand, W.L; Sanford, J.P. (1970). Posttraumatic bacterial meningitis. *Ann. Intern. Med.* 72:869-874.
- Hansberg, W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México.
<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquímico>.
- Henrichsen, J. (1995). Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 33:2759-2762.
- Horton R, Moran L, Ochs R; Rawn J; Scrimgeour K. (2002). Principles of biochemistry. Prentice Hall. 827 p.
- Hosea, S.W, Brown, E, Hamburger, M.I; Frank, M.M. (1981). Opsonic requirements for intravascular clearance after splenectomy. *N. Engl. J. Med.* 304:245-250.
- Hoskins, J., Alborn, W.E., Arnold, J., Blaszcak, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., Estrem, S.T., Fritz, L., Fu, D.J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J.S., Khoja, H., Kraft, A.R., Lagace, R.E., LeBlanc, D.J., Lee, L.N., Lefkowitz, E.J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S.M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C.W., Nicas, T.I., Norris, F.H., O_Gara, M., Peery, R.B., Robertson, G.T., Rockey, P., Sun, P.M., Winkler, M.E., Yang, Y., Young_Bellido, M., Zhao, G., Zook, C.A., Baltz, R.H., Jaskunas, S.R., Rosteck, P.R., Skatrud, P.L. and Glass, J.I. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bact.*, 183: 5709-17.
- Isaacman D, McIntosh E, Reinert R. (2010). Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe:

- impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *J. Infect. Dis.* 14:e197–209.
- Johnson H, Knoll M, Levine O, Stoszek S, Hance L, Reithinger R, Muenz L, O'Brien K. (2010). Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: the pneumococcal global serotype project. *PLoS Medicine*. 7:1000348.
- Kellogg, J.A., Bankert, D.A., Elder, C.J., Gibbs, J.L. and Smith, M.C. (2001) Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. *J. Clin. Microbiol.* 39:3373-3375.
- Klugman, K.P; Feldman, C. (2001). *Streptococcus pneumoniae* respiratory tract infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 14:173-179.
- Konttinen, S; Sivonen, A. (1987). Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from blood and middle ear fluid. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6:422-4.
- Köster, W. (1997). Transport of iron (III) hydroxamates across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Trautwein A. X. Ed. Bioinorganic Chemistry. Transition metals in biology and their coordination chemistry, Wiley-VCH, p.56-68.
- Köster, W. (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res. Microbiol.* 152:291-301.
- Lefranc Nègre V, Bonacorsi S, Schubert S, Bidet P, Nassif X, Bingen E. (2004). The siderophore receptor IronN but not the high pathogenicity island or the heme receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis. *Infect Immun.* 72:1216-1220.
- Lei B., Liu M., Voyich J. M., Prater C. I., Kala S. V., DeLeo F. R., and Musser J. M. (2003). Identification and characterization of HtsA, a second heme-binding protein made by *Streptococcus pyogenes*. 71:5962-5969.
- Lencastre H, Tomasz A. (2002). From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centers and drug resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemoter.* 50(S2):75-81.
- Létoffé, S; Deniau, C; Wolff, N; Dassa, E; Delepelaire, P; Lecroisey, A. y Wandersman, C. (2001). Haemophore- mediated bacterial haem transport: evidence for a common or overlapping site for haem-free and haem-loaded haemophore on its specific outer membrane receptor. *Mol Microbiol.* 41:439-450.

- Liu X, Olczak T, Guo H. C., Dixon D. W; Genco C. A. (2006). Identification of amino acid residues involved in heme binding and hemoprotein utilization in the *Porphyromonas gingivalis* heme receptor HmuR. *Infect Immun.* 74:1222-32.
- Luby, J.P. (1992). Infections of the central nervous system. *Am. J. Med. Sci.* 304:379-391.
- Lund E, Henrichsen, J. (1978). Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. En: Norris, E, Ribbon, F. *Methods in Microbiol.* 12:242-261.
- Lund, E. (1959). Diagnosis of pneumococci by the optochin and bile test. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 47:308-315.
- Madigan M. T, Martinko J. M; Parker J. (2004). Brock. Biología de los microorganismos. Décima edición. Pearson Educación, S. A; Madrid. 1096 p.
- Mandell, G. L, Douglas, R. G; Bennett, J. E. (1995). Principles and practice of infectious diseases 4th edition. Churchill Livingstone, New York.
- Mazmanian S. K., Ton-That H., Su K., and Schneewind O. (2002). An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 2293–2298.
- Mazmanian S. K., Skaar E. P., Gaspar A. H., Humayun M., Gornicki P., Jelenska J., et al. (2003). Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science.* 299:906–909
- Mulholland K. (1999). Magnitude of the problem of childhood pneumonia. *Lancet Infect Dis* 354:590-592.
- Musher D. M. (1992). Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin. Infect. Dis.* 14:801–807.
- Musher D. M. (2000). *Streptococcus pneumoniae*. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th Ed. New York: Churchill Livingstone. 2128-2147.
- Neufeld, F. (1900). Über eine spezifische bacterolytische Wirkung der Galle. *Z. Hyg. Infekt. (Leipzig)*, 34:454-464.
- Neufeld, F. (1902). Über die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorien der Agglutination. *Z. Hyg. Infekt.* 40:54-72.
- Nygaard T, Blouin G, Liu M, Fukumura M, Olson J, Fabian M, Dooley DM, Lei B. (2006). The mechanism of direct heme transfer from the streptococcal cell surface protein Shp to Has A of the HstABC transporter. *J. Clin. Microbiol.* 282: 31380-31388.

- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS. (2009). Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet Infect Dis.* 374:893–902.
- Olczak T., Dixon D. W. and Genco C. A. (2001). Binding specificity of the *Porphyromonas gingivalis* heme and hemoglobin receptor HmuR, gingipain K, and gingipain R1 for heme, porphyrins, and metalloporphyrins. *J. Bacteriol.* 183, 5599-5608.
- Perutz MF. (1976). Structure and mechanism of haemoglobin. *Br Med Bull*; 32:195-208.
- Pozzi, G., Oggioni, M.R. and Tomasz, A. (1989). DNA probe for the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*27:370-372.
- Pradel, E; Guiso, N; Menozzi, F. D; Loch, C. (2000). *Bordetella pertussis* Ton B.a Bvgindependent virulence determinant. *Infect Immun.* 68:1919-1927.
- Prado J. (2001). *Streptococcus pneumoniae*: Basic microbiological aspects. *Rev. chil. infectol.* 18:1
- Ratledge C; Dover L. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:881-941.
- Ran Y, Zhu H, Liu M, Fabian M, Olson J, Aranda R, Phillips G, Dooley DM, Lei B. (2007). Bis-methionine ligation to heme iron in the streptococcal cell surface protein Shp facilitates rapid hemin transfer to HtsA of the HtsABC transporter. *J. Biol. Chem.*282: 31380-31388.
- Reeves SA, Torres AG, Payne SM. (2000). TonB is required for intracellular growth and virulence of *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun.* 68:6329-6336.
- Roca A, Sigaúque B, Quintó L, Mandomando I, Vallés X, Espasa M, Abacassamo F, Sacarlal J, Macete E, Nhamo A, Levine M, Alonso P. (2006). Invasive pneumococcal disease in children <5 years of age in rural Mozambique. *Trop. Med. and Internal. H.* 11:1422–1431.
- Romero-Espejel M. E., González-López M. A., and Olivares-Trejo J. J. (2013). *Streptococcus pneumoniae* requires iron for its viability and expresses two membrane proteins that bind haemoglobin and haem. *Metallomics.* 5:384–389.
- Salo, P., Ortqvist, A. and Leinonen, M. (1995). Diagnosis of bacteremic pneumococcal pneumonia by amplification of pneumolysin gene fragment in serum. *J. Infect. Dis.* 171:479-482.

- Schaechter, M., Medoff G. and Eisenstein, B. I. (1993). Mechanism of microbial disease 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Schryvers AB, Stojiljkovic I. (1999). Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol.* 32:1117-1123.
- Schultz R. (1993). Proteínas fisiológicas. En: Devlin T. Ed. Bioquímica. Barcelona: Reverté. p. 95-133.
- Sharief, M.K., Ciardi, M. and Thompson, E.J. (1992). Blood-brain barrier damage in patients with bacterial meningitis: association with tumor necrosis factor-alpha but not interleukin1 beta. *J. Infect. Dis.* 166:350-358.
- Simpson W., Olczak T., and Genco C. A. (2000). Characterization and expression of HmuR, a TonB-dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 182: 5737–5748.
- Skaar E. P; Schneewind O. (2004). Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes Infect.* 6:390–397
- Skaar E. P., Gaspar A. H., and Schneewind O. (2004). IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 279:436–443
- Tai S. S., Lee C. J., and Winter R. E. (1993). Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 61:5401–5405.
- Tai, S; Wang, T y Lee, C. (1997). Characterization of Hemin binding activity of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1083-1087.
- Takase H, Nitanai H, Hoshino K, Otani T. (2000). Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa* tonB gene for high affinity iron acquisition and infection. *Infect Immun.* 68:4498-4504.
- Telen M. Eritrocitos maduros. En: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens J, Lukens J. (1994). Wintrobe Hematología clínica. Buenos Aires: Intermédica. p. 80-105.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S. and Heidelberg J, D.R., Haft DH, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Kolonay JF, Nelson WC, Peterson JD, Umayam LA, White O, Salzberg SL, Lewis MR, Radune D, Holtzapple E, Khouri H, Wolf AM, Utterback TR, Hansen CL, McDonald LA, Feldblyum TV, Angiuoli S, Dickinson T, Hickey EK, Holt. (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*, 293.498-506.

- Thornton J, Durick-Eder K y Tuomanen E. (2010). Pneumococcal pathogenesis: “innate invasion” yet organ-specific damage. *J Mol Med.* 88: (2):103-107.
- Tomasz, A. (1964). Studies on the competence (for genetic transformation) of *Diplococcus pneumoniae* in a synthetic medium. *Bacteriological Proceedings*, 29.
- Tomasz, A. and Hotchkiss, R.D. (1964). Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 51:480-486.
- Tomasz, A. and Mosser, J.L. (1966). On the nature of the pneumococcal activator substance. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 55:58-66.
- Tomasz, A. (1970). Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence. *J. Bacteriol.* 101: 860871.
- Torres AG, Redford P, Welch RA, Payne SM. (2001). TonB dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect Immun.* 69:6179-6185.
- Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 373:1-6.
- Tuomanen E, Mitchell T, Morrison D y Spratt B. (2004). The Pneumococcus. Washington (DC): ASM Press. 426 p.
- Vallejo L., Brokelman M., Marten S., Trappe S., Cabrera J., Hoffmann A., Gross G. and Rinas, U. (2002). Renaturation and Purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 94:185-194.
- Van Damm, J. E. G., A. Fleer, and H. Snippe. (1990). Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Antonie Leeuwenhoek* 58:1–17.
- Wandersman C., and Delepelaire P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to haemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:611-647.
- Wandersman C., and Stojiljkovic I. (2000). Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and haemophores. *Curr Opin Microbiol.* 3:215–220.
- Weinberg E. D. (2008). Iron availability and infection. *Biochimica et Biophysica A.* p. 6.
- Winn, W. (2008). Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en color. Sexta edición. Panamericana. Madrid, España. 1900 p.

- Wu R., Skaar E. P., Zhang R., Joachimiak G., Gornicki P., Schneewind O., and Joachimiak A. (2005). *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes with structural similarity to monooxygenases. *J. Biol. Chem.* 280:2840–2846
- Yaro S, Lourd M, Traoré Y, Njanpop-Lafourcade BM, Sawadogo A, Sangar L, Hien A, Ouedraogo MS, Sanou O, Parent du Châtelet, Koeck JL, Gessner BD. (2006). Epidemiological and molecular characteristics of a highly lethal pneumococcal meningitis epidemic in Burkina Faso. *Clin. Infec. Dis.* 43:693–700.
- Zheng, M; Doan, T, Scheneider, D. y Storz, G. (1999). OxyR and SoxRS regulation of Fur. *J. Bacteriol* 181:4639-4643.
- Zhu H, Xie G, Liu M, Olson JS, Fabian M, Dooley DM, Lei B. (2008). Pathway for heme uptake from human methemoglobin by the iron-regulated surface determinants system of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 283:18450-18460.

El jurado designado por el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, aprobó esta tesis el día 30 de marzo de 2017, en la Ciudad de México para optar al Grado de Doctora en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular, a la M. en C. María Elena Romero Espejel.

DIRECTORES

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Investigador Titular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular
CINVESTAV-IPN

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Profesor Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas Universidad
Autónoma de la Ciudad de México

SINODALES

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Investigadora Titular del Departamento de
Infectómica y Patogénesis Molecular
CINVESTAV-IPN

Dr. José Tapia Ramírez

Profesor Investigador del Departamento de
Genética y Biología Molecular
CINVESTAV-IPN

Dra. Rosa María del Angel Núñez de Cáceres

Investigadora Titular del Departamento de
Infectómica y Patogénesis Molecular
CINVESTAV-IPN

Dra. Norma Velázquez Guadarrama

Investigador en Ciencias Médicas D del
Laboratorio de Infectología
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Juan Ernesto Ludert León

Profesor Investigador del Departamento de
Infectómica y Patogénesis Molecular
CINVESTAV-IPN

requires iron for its viability and expresses two membrane proteins that bind haemoglobin and haem

Mari'a Elena Romero-Espejel, Marco A. Gonzalez-Lo'pez and Jose' de Jesu's Olivares-Trejo*

Streptococcus pneumoniae, a human pathogen bacterium, can support its growth using haemoglobin (Hb) and haem as sole iron sources, but not when holo-transferrin or holo-lactoferrin is supplied. For this reason, it is easy to think that the principal iron sources for this pathogen inside humans are Hb and haem. Unfortunately, the mechanism has been poorly studied. The findings presented in this study are the first efforts that attempted to explain the mechanism involved in iron acquisition of this pathogen. This pathogen was capable of supporting its viability when iron sources such as Hb or haem were supplied. Membranes of *S. pneumoniae* were separated and their respective proteins were solubilized in order to be purified by haem-affinity chromatography. This strategy allowed us to purify seven membrane proteins. An experiment of competence with haem and iron showed two potential haem and Hb-binding proteins. Their Hb-binding function was confirmed by overlay assay using Hb and their respective identities were obtained by mass spectrometry. Then by amino acid alignment analysis, the motif involved in binding of Hb or haem was revealed. These results are the first findings that attempt to explain the mechanisms developed by *S. pneumoniae*

Received 11th September 2012,
Accepted 6th February 2013 DOI:

10.1039/c3mt20244e

Metallomics

RSC Publishing

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

www.rsc.org/metallomics

to acquire iron from Hb or haem in the host, which could allow a better understanding of the biology of this bacterium.

Introduction

Streptococcus pneumoniae

Iron is essential for nearly all the organisms. In humans, around 95% of iron is found in intracellular proteins such as haemoglobin (Hb), the rest is stored in extracellular proteins such as holo-transferrin (holo-Tf) or holo-lactoferrin (holo-Lf) and only 10^{18} M is detected as free form.^{1–2} Therefore hemoproteins like Hb seem to be an attractive iron source for the pathogens, this protein can store four atoms of iron because it contains four haem molecules, for this reason, pathogens such as *Corynebacterium diphtheria*,³ *Porphyromonas gingivalis*,⁴ *Pseudomonas aeruginosa*,⁵ *Escherichia coli*⁶ and *Serratia marcescens*⁷ have developed mechanisms to cover their iron necessities using Hb. These pathogens generally express outer membrane proteins to bind the iron supply and they are termed receptors. If the iron source is located farther away from the pathogen, an alternative mechanism is started and the bacterium secretes proteins named haemophores,^{8–9} which bind Hb

or haem and then deliver the iron source towards a specific membrane receptor protein.^{10–11} It has been found that those

Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, San Lorenzo 290, Del Valle, C.P. 03100, México, D.F., Mexico.
E-mail: jouacm@gmail.com; Tel: +52 5554886661 ext 15309

receptors could bind the iron sources using Phe-Arg-Ala-Pro (FRAP) and Asn-Pro-Asn-Leu (NPNL) motifs,¹² except protein e(P4) of *Haemophilus influenzae*, which binds haem using the motif Lys-Val-Ala-Phe-Asp-His (KVAFDH).¹³ These mechanisms have been described for gram negative bacteria. For gram positive bacteria, the mechanism has been explored in at least two pathogens: one of them is *Staphylococcus aureus*, for which it has been indicated that iron acquisition using Hb in this pathogen is via the system Isd, which encodes cell wallanchored surface proteins (IsdA, IsdB, IsdC and IsdH), membrane transporters (IsdD, IsdE and IsdF), a transpeptidase (SrtB) and cytoplasmic haem-degrading monooxygenases (IsdG and IsdI).¹⁴ Another pathogen studied is *Bacillus anthracis*; its genome has a locus in which the genes *isdC*, *isdX1*, *isdX2*, *isdE1*, *isdE2* and *isdF-srtB-isdG* have been identified, presumably these genes contain the information necessary for binding and utilization of Hb and haem as

iron supplies.¹⁵ Unfortunately, for *Streptococcus pneumoniae* the mechanism is practically unknown. This bacterium can use Hb and haem as iron sources, but, curiously, it cannot use holo-Lf or holo-Tf.¹⁶ Therefore, *S. pneumoniae* must be well equipped with a battery of genes, which guarantee the utilization of Hb and haem as iron supplies because the concentration of free iron in humans is insignificant and not all the sources of iron available in the host are susceptible to be used by this pathogen. In relation to haem utilization, it has been reported that *S. pneumoniae* expresses a protein and it is located in different compartments of the bacterium: insoluble extract, cytoplasmic membrane, and cell wall extract, but not in the cytoplasm, this protein has an estimated size of 43 kDa and probably binds haem. Unfortunately, its identity remains undetermined and its function as haem or Hb-binding protein has not been corroborated yet.¹⁷ For these reasons, we attempt to explore more about this mechanism developed by *S. pneumoniae*. Now, we are presenting results that indicate the existence of two proteins which could be involved in haem and Hb-binding, and they are different from that of the 43 kDa protein.¹⁷ Our results are the first efforts that attempt to explain how *S. pneumoniae* obtains iron from Hb and haem and maybe these proteins are necessary for the infective process, all these points are discussed here.

Experimental

Bacterial growth conditions

S. pneumoniae of strain R6 was stored at 70 °C in 10% glycerol and was routinely cultivated on Todd Hewitt agar supplemented with 5% sheep blood. The incubation was performed under microaerophilic growth conditions (5% CO₂) for 24 h at 37 °C.

Analysis of alternative iron supplies in the cultures

Cells of *S. pneumoniae* previously cultivated on Todd Hewitt agar were collected and inoculated in Todd Hewitt broth (supplemented with 0.5% of yeast extract). When it was necessary to test an iron supply alternative (haem, Hb or holo-Tf, all of them from humans) a chelating agent 700 μM 2,2'-dipyridyl (Sigma D216305-25G) was used, in order to eliminate iron from the medium of culture. Thereafter, the bacteria were incubated for 16 h at 37 °C with an atmosphere regulated at 5% CO₂. In order to synchronize the cellular growth the optical density (600 nm) was adjusted to 0.1. Thus, the cellular growth was monitored each hour. After 3 h under iron starvation the medium of culture was supplemented with 8 mM haem (Sigma 51280-SG), 2 mM human Hb (Sigma H7379-10G) or 4 mM holo-Tf (Sigma T-4132).

Viability experiments

Samples of *S. pneumoniae* cultivated for 5 h under iron starvation or with different iron sources (Hb, haem or holo-Tf) were taken. 10 ml of each sample were mixed with 10 ml of trypan blue. This mixture was placed on a counting slide with a dual chamber and it was read using the TC10 automated cell counter apparatus (Bio-Rad). The results were analyzed and plotted.

Purification of membrane proteins by affinity chromatography

Bacteria cultivated in 20 ml Todd-Hewitt broth were harvested by centrifugation (17000 g for 10 min, at 4 °C). The cell pellet was suspended in 250 ml buffer TEP pH 8 (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF phenyl methyl sulphonyl fluoride). The bacterium biomass was broken by sonication (60% amplitude for 3 min with pulses of 15 s at 4 °C). Intact cells, debris and cell walls were eliminated by centrifugation (17000 g for 10 min at 4 °C). Cytoplasmic and membrane fractions were obtained by ultracentrifugation (100000 g for 4 h at 4 °C) using a previously described method,¹⁸ and the volume was adjusted up to 10 ml. The precipitate was considered as the membrane fraction and the supernatant as the cytoplasmic fraction. Proteins from the membrane fraction were solubilized using a pH 8.0 solubilization solution (sarcosyl 1% in order to prevent unspecific interactions), then they were loaded onto affinity chromatography columns coupled to haem (Sigma H6390). The interaction was maintained overnight at 4 °C. The flow through chromatography was performed to eliminate unspecific interactions, the resin was washed on three occasions with pH 8.0 wash buffer (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl and 5 mM EDTA). Proteins that were attached to the haem-chromatography column were released by increasing the astringency with 6 M guanidine hydrochloride. Salts and other contaminants were removed from each fraction using a cleaning kit (Clean up, Bio-Rad) following protocol instructions, and finally the samples were suspended in 20 ml (6 M urea, 2% (w/v) CHAPS and 50 mM DTT). The concentration of proteins was calculated by Bradford methodology and 50 mg of proteins were loaded onto Coomassie blue-staining SDS-PAGE, in order to see the integrity of the membrane proteins.

Western blotting

Samples of proteins from different fractions were loaded onto a SDS-PAGE, then they were transferred to a nitrocellulose membrane using a semi-dry Trans-blot cell for 1 h at 100 V in pH 7.5 buffer (25 mM Tris-HCl and 20% methanol). The nitrocellulose membranes (Bio-Rad) were soaked for 1 h in pH 6.8 PBS buffer (phosphate buffered saline) containing 5% non-fat milk, in order to saturate all remaining active binding sites. Nitrocellulose membranes were washed five times for 10 min with PBST (pH 6.8 PBS buffer, containing 0.05% Tween-20) and they were incubated with anti-pneumolysin antibodies (Enzo BPD-HYB-041-01-S) (1:10000) to identify cytoplasmic proteins or anti-PspA antibodies (Genetex GTX39080) (1:5000) to identify membrane proteins. Both nitrocellulose membranes were incubated for 1 h and they were washed on three occasions with PBST. The secondary antibody was added, which was the same for both membranes. We used an anti-mouse conjugated with horseradish peroxidase (Invitrogen 04-6020) (1:1000), it was incubated for 1 h and washed three times with PBST, finally, the interaction was revealed by chemiluminescence (Millipore).

Overlay assay

The proteins eluted by affinity chromatography were separated by 12% SDS-PAGE and were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Nitrocellulose membranes were blocked for 1 h with 0.5% non-fat milk in PBST pH 7.4 buffer (PBS and 0.05% Tween 20) to saturate all remaining active binding sites. One membrane was incubated overnight with vitamin B12

Metallomics

(Sigma V2876-1G) (1000 mg) at 4 1C. After that, Hb (50 mg) was added and incubated for 1 h at 4 1C. Immediately five washes (10 min) with PBST were performed, and then the membrane was incubated with anti-globin antibodies (Santa Cruz Biotechnology SC-21005) (1:10000) for 1 h. Lastly, the secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase was added (Invitrogen 65-6120) (1:10000) and was incubated for 1 h. Each cellulose membrane was washed on several occasions with PBST and the signal was developed by chemiluminescence (Millipore).¹⁹ As a control, a membrane was incubated only with PBST and tested under the same conditions.

Competing experiments

The competing experiments were performed in the haemaffinity chromatography, but the proteins bound to the resin were released with 0.15 mM haem, 0.15 mM FeCl₃, instead of 6 M guanidine hydrochloride (all concentrations were calculated according to the iron contained in the haem of affinity chromatography). The eluents had a concentration of two fold the concentration of iron in the haem-chromatography. Finally, 30 mg of protein of each fraction were loaded onto Sypro Ruby staining SDS-PAGE to reveal the proteins released.

Mass spectrometry analysis

After destaining the Coomassie-blue SDS-PAGE, bands corresponding to 22, 37, 43, 45, 50, 67 and 71 kDa were excised and washed with deionized water. Enzymatic digestion was performed with trypsin. LC-MS/MS was performed on a Micromass QToF I equipped with a LC Packings nanoflow LC. 5 ml of digest solution was injected onto a LC Packings C18 PepMap column (0.75 mm 15 cm) and eluted with a linear acetonitrile gradient at a flow rate of 200 nL min⁻¹. The peptides eluted from the column were introduced into the mass spectrometer through a New Objective PicoTip held by a New Objective adapter. The experimental conditions were: capillary voltage set at 1.8 kV and cone voltage 32 V; collision energy set according to mass and charge of the ion, from 14 eV to 50 eV. Raw data files were processed using the MassLynx ProteinLynx software and pkl files were submitted for searching at www.matrixscience.com using the Mascot algorithm (Protein Core Facility, Columbia University Medical Center).

Results

An iron source is necessary to support and to maintain the viability of *S. pneumoniae*

The iron availability is necessary for the cellular growth of *S. pneumoniae*; it is just enough to limit the iron concentration in the cell culture to arrest the growth, however, bacteria could remain viable

waiting for an iron source. To analyze this assumption, viability experiments were performed. *S. pneumoniae* strain R-6 was cultivated in Todd Hewitt liquid medium until an optical density of 0.1 (Fig. 1, filled diamonds), then the iron was eliminated from the medium (by adding 2,2'-dipyridyl). The results showed that the cellular growth remained without apparent change, because, the optical density was sustained close to 0.2 (Fig. 1, filled squares). To corroborate that the arrest

Paper

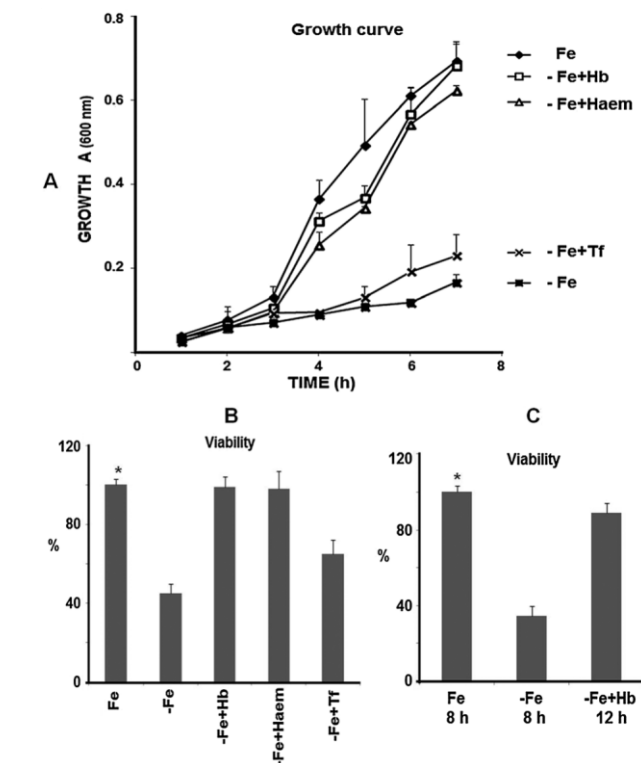


Fig. 1 Cellular viability of *S. pneumoniae* is maintained under iron starvation and the cellular growth is restored supplying with Hb or haem. *S. pneumoniae* strain R6 was cultivated in the liquid medium, the cellular growth was followed for 7 h by spectrophotometry (600 nm) (A), the viability determined by trypan blue exclusion at 5 h (B), and the viability determined at 8 h and 12 h by trypan blue exclusion (C). Data represent mean \pm SD of 3 independent experiments. Bacteria were cultivated under conditions of iron sufficiency (E), 2,2'-dipyridyl was added to the medium to eliminate iron ('), medium without iron was supplemented with Hb (&), haem (n) or transferrin (.). * = Cellular viability from bacteria cultivated in the medium with iron (Fe) was significantly higher compared to cellular viability from bacteria cultivated in the medium without iron (Fe) and (Fe + Tf) ($p < 0.05$, one-way ANOVA).

in the growth was due to the starvation of iron, the cell cultures were supplemented with Hb (Fig. 1, open squares) or haem (Fig. 1, open triangles). Another alternative source such as holo-Tf was unable to support the cellular growth (Fig. 1, crosses). These results corroborated that this pathogen can support its cellular growth using Hb and haem but not holo-Tf as iron supply. Under iron starvation the cellular growth was arrested, but perhaps not the viability. In order to test this assumption, the viability was explored. Like the cellular growth, the viability was also affected, after 5 h only around 50% of the cells remained viable (Fig. 1B). To corroborate this

last result, the cell cultures of *S. pneumoniae* were supplemented with Hb. The result showed a recovery of the viability close to 90% (Fig. 1C) at 4 h. All these results clearly showed that an iron source was necessary to support the cellular growth and to maintain the viability.

S. pneumoniae expresses haem-binding membrane proteins

The ability of *S. pneumoniae* to obtain iron from sources such as Hb or haem is essential to survive in the human host.

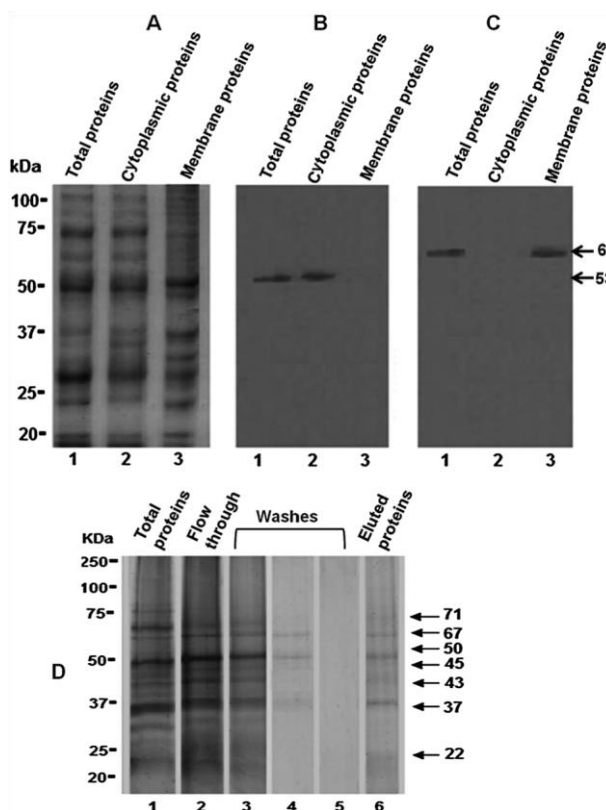


Fig. 2 Cellular fractionation and expression of membrane haem-binding proteins in *S. pneumoniae*. Samples of membrane or cytoplasmic fractions were loaded onto 12% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. SDS-PAGE Coomassie blue staining was performed in order to corroborate the presence of proteins in all the fractions tested (A). Total proteins (lane 1), cytoplasmic fraction (lane 2) and membrane fraction (lane 3). The western blotting was performed using anti-cytoplasmic antibodies (pneumolysin) 53 kDa (B). The western blotting was performed using anti-membrane antibodies (PspA) 65 kDa (C). *S. pneumoniae* membrane proteins were purified by haemaffinity chromatography and proteins with different fractions were loaded onto 12% SDS-PAGE and Sypro Ruby stained (D). Total membrane proteins (lane 1), flow through (lane 2), washes (lanes 3–5), elution (lane 6). Molecular weight markers are indicated on the left. The estimated size for purified membrane haem-binding proteins is indicated on the right side with arrows.

Therefore, this pathogen must be equipped with membrane proteins specialized in uptake of Hb or haem. To corroborate this hypothesis, we decided to investigate if *S. pneumoniae* expressed membrane proteins with affinity for haem. First, the fractions of membrane and cytoplasm of *S. pneumoniae* cultivated under iron starvation and supplemented with Hb were obtained (Fig. 2A). The purity of the

fractions was tested with antibodies (anti-pneumolysin) specific for proteins of cytoplasm (Fig. 2B) or (anti-PspA) specific for membrane proteins (Fig. 2C). The result clearly showed that the strategy to separate both fractions was adequate, because no contamination was detected for each fraction.

The proteins corresponding to the membrane fraction were solubilized using an alkaline solution in order to prevent the unspecific interactions. These soluble proteins were loaded onto the haem-affinity chromatography column (Fig. 2D, lane 1), in addition, the flow through chromatography (Fig. 2D, lane 2) and three washes (Fig. 2D, lanes 3–5) were performed. Finally, the proteins that were bound to resin were eluted by increasing the astringency (Fig. 2D, lane 6). This result showed at least seven bands with sizes of 22, 37, 43, 45, 50, 67 and 71 kDa. Under these conditions we also purified the 43 kDa protein previously reported.¹⁷

Characterization of membrane haem-binding proteins

As *S. pneumoniae* expresses at least seven proteins apparently in haem-affinity chromatography, we decided to corroborate if these proteins bind specifically haem. We performed experiments in which the proteins were eluted from the affinity chromatography column using different molecules as eluents. As we expected, when the elution was performed with haem, only the bands with sizes 22, 37, 43, 45, 50 and 67 kDa were eluted (Fig. 3A, lane 2), these results showed the proteins with affinity for haem. An elution performed with FeCl₃, released the bands corresponding to 50 and 67 kDa (Fig. 3A, lane 3), this control indicated that these proteins bound directly the free iron without the tetrapyrrole ring. Compounds used as eluents were loaded onto 12% SDS-PAGE to discard artifacts (Fig. 3B). This experiment indicated that *S. pneumoniae* expresses at least four proteins with affinity for haem and maybe these proteins could be used by this pathogen in different stages of the infective process. As the Hb contains four molecules of haem, it was easy to think that these proteins bind Hb. To analyze this assumption an overlay experiment was performed in order to investigate if these proteins also bind Hb. The findings showed four Hb-binding proteins whose sizes correspond to 22, 37, 45 and 50 kDa. This result showed that these proteins bound Hb in addition to haem (Fig. 4B). In order to corroborate the specificity, the overlay assay was performed with a tetrapyrrole

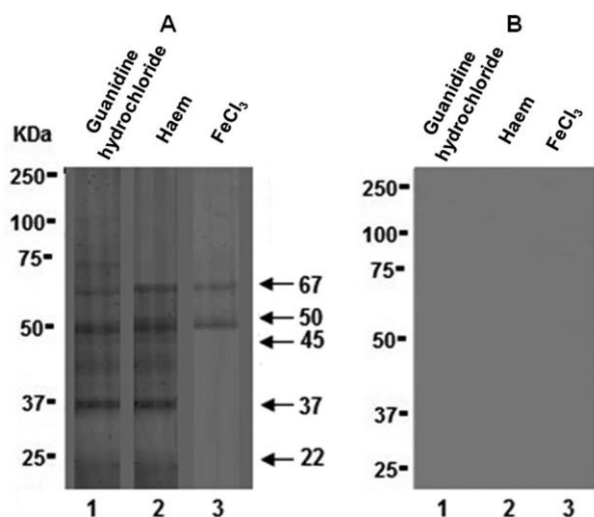
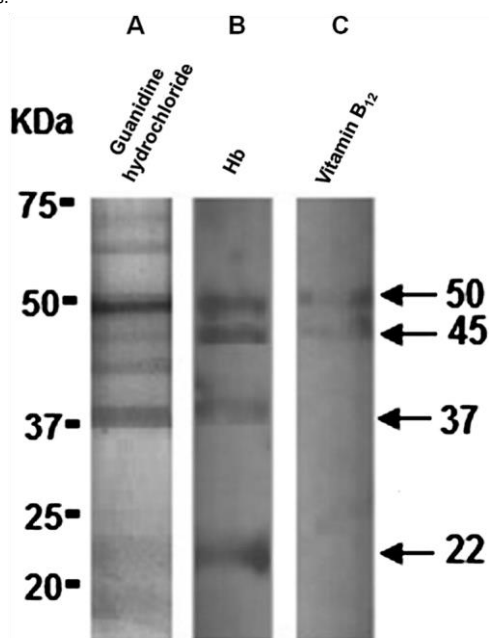


Fig. 3 Characterization of membrane haem-binding proteins. Membrane haem-binding proteins bound to affinity chromatography were eluted using different compounds and were loaded onto 12% SDS-PAGE Sypro Ruby staining (A). Using 6 M guanidine chloride (lane 1), 0.15 mM haem (lane 2), 0.15 mM FeCl_3 (lane 3), compounds used as eluents were loaded onto 12% SDS-PAGE and Sypro Ruby staining (B) to corroborate that bands are not provided for them. Molecular weight markers are shown on the left side for both panels.



Metallomics

Fig. 4 Proteins of 22 and 37 kDa bind Hb in overlay experiments. Proteins eluted from haem-binding chromatography were loaded onto 12% SDS-PAGE and Sypro Ruby staining (A), transferred to nitrocellulose membrane and an overlay assay was performed. Proteins bind Hb in addition to haem (B). Proteins that compete for a tetrapyrrole ring Vit B12 (C). The nitrocellulose membranes were incubated with anti-globin antibodies (1 : 10 000) for 1 h and then the secondary antibody was added; anti-rabbit antibodies conjugated to horseradish peroxidase HR (1 : 10 000) for 1 h.

ring (Vit B12); this compound contains Co instead of iron. The experiment revealed that only proteins corresponding to 22 and 37 kDa compete (Fig. 4C), indicating that they bind preferentially the

tetrapyrrole ring. The proteins of 45 and 50 kDa did not compete for Vit B12, suggesting that they bind only iron of the Hb and perhaps they were incapable of recognizing the tetrapyrrole ring structure. These experiments clearly showed that proteins corresponding to sizes 22 and 37 kDa bind haem and Hb.

Identification of haem and Hb-binding proteins

All the bands purified were excised from the gel and they were digested with trypsin. The resulting peptides were purified using cartridges and subjected to mass spectrometry. The mass spectrometry analysis allowed us to identify the seven proteins purified by haem affinity chromatography. These results showed a stress general lipoprotein of 22 kDa whose function is unknown and a lipoprotein of 37 kDa whose function is also completely unknown (Table 1). Both proteins were considered by us as Hb and haem-binding proteins, because they were capable of binding Hb and haem, and they compete for a tetrapyrrole ring (vit B12) but not for free iron. Under our conditions the protein of 43 kDa previously purified¹⁷ was also purified by us, unfortunately this protein did not bind Hb and the identification by mass spectrometry revealed its function as an elongation factor. For these reasons, we thought that this protein was not involved in iron acquisition. Proteins corresponding to 45 and 50 kDa were identified as maltose binding protein and glutamine synthetase, type I respectively (Table 1). Both proteins bound Hb, but they did not compete for the tetrapyrrole ring (Vit B-12), perhaps these proteins are not involved in Hb-binding, however we do not discard their potential participation as haem-binding proteins. Proteins corresponding to 67 and 71 kDa were identified as gene glpO and division cellular protein FtsH respectively (Table 1). These proteins were incapable of binding Hb and haem, maybe they have affinity for the iron. We proposed that these new proteins (22 and 37 kDa) are haem and Hb-binding proteins because they had the capacity to bind both Hb and haem, additionally, they did not compete for free iron, but interestingly they compete for Vit B12 in an overlay assay. Maybe these proteins were expressed by this pathogen in order to obtain iron from sources such as Hb or haem.

The 22 and 37 kDa proteins have the motifs that interact with the iron source

The 22 and 37 kDa proteins have the capacity to bind haem and Hb. In order to explore whether their respective amino acid

Paper

```

S. pneumoniae -37 - V D P S I K V Q V D Y A G S F G
S. pneumoniae -22 E V G - K T Q V A V D L N V I V E
S. pyogenes -Shr - A E K L K Q L V R D H Q T S I E
H. influenzae -e_P4 - - - - - K V A F D H - - - - -

```

Paper

Fig. 5 Proteins 22 and 37 kDa have the motif necessary for haem and Hb-binding. Amino acid alignment was performed comparing the amino terminal region of the proteins 22 and 37 kDa of *S. pneumoniae* with the protein Shr of *S. pyogenes*. The motif KVAFDH essential for haem binding is shown as dark boxes. In the consensus sequence the Asp (D) is the best conserved residue followed by Val (V) and His (H). The conservation of the motif suggests that the proteins 22 and 37 kDa have the capability of binding the haem group. The alignment was performed using the program Jalview.

sequences have the motifs necessary for haem or Hb-binding, an amino acid alignment was performed using sequences previously

Metalloomics

necessary for haem-binding¹³ and also for Hb-binding. As no siderophores²¹ or haemophores have been reported, the principal mechanisms developed by this pathogen are focused on expressing membrane proteins for the uptake of the iron source. Therefore, this could explain why the proteins purified (22 and 37 kDa) can bind both iron sources, and they recognized preferentially the tetrapyrrole ring. Interestingly, the viability diminished under iron starvation showing that this pathogen needs iron for both cellular growth and viability.

Table 1 Identification of membrane haem binding-proteins by mass spectrometry. Proteins eluted from haem-affinity chromatography were excised from the gel, digested with trypsin, the peptides purified were analyzed and identified by mass spectrometry

Molecular weight (kDa)	NCBI	Mass spectrometry identification	Function	Reference
22	gi 15901633	Stress general protein	Unknown	This work
37	gi 15900732	Lipoprotein	Unknown	This work
43	gi 15901337	Elongation factor Tu	Synthesizes proteins	Tai, 1997
45	gi 353807173	Maltose binding protein	Transports maltose through membrane	This work
50	gi 116516325	Glutamine synthetase, type I	Charges tRNA with serin	This work
67	gi 116516239	Gene glpO	Unknown	This work
71	gi 15902056	Division cellular protein FtsH	Metallopeptidase ATP dependent	This work

reported for *Haemophilus influenzae*¹³ and *S. pyogenes*.²⁰ This result clearly showed that both proteins (22 and 37 kDa) contain the motifs necessary for haem and Hb-binding (Fig. 5).

Conclusions

The molecular mechanism involved in iron acquisition using Hb as an iron supply has been greatly investigated in gram negative bacteria. In gram positive pathogens, such as *S. pneumoniae*, the mechanism has been poorly studied. Here, two haem and Hb-binding proteins were purified and they were identified. Although seven bands with sizes from 22 to 71 kDa of the membrane proteins were eluted from the resin, only two proteins were related to Hb and haem-binding. Data obtained with total proteins presented previously¹⁷ showed a major 43 kDa band. Under our conditions we were able to purify this band (43 kDa), but its intensity was minor than that obtained previously, as we only used membrane proteins in which a small fraction of this protein was present. We discouraged the suggestion of the protein (43 kDa) as haem and Hb-binding proteins, because this protein did not bind Hb in our overlay experiments. Additionally, this protein was identified by mass spectrometry as an elongation factor (Tu). The elongation factor is a protein that is generally found bound to ribosomes and it participates in the protein synthesis process; this protein is expressed abundantly and perhaps under the conditions reported previously¹⁷ the 43 kDa protein is bound to the affinity chromatography column. However, our strategy let us to identify two proteins related to haem or Hb-binding (22 and 37 kDa). These proteins were loaded onto a haem-affinity chromatography column, then both proteins were eluted with the ligand (haem), but not with iron, and overlay assays showed the Hb-binding function of both proteins. Amino acid sequence alignment of these proteins revealed that they have the motif

Therefore, these results clearly show that *S. pneumoniae* cannot survive without iron because its viability could be abated, for this reason this pathogen must obtain iron almost permanently. In summary, these new proteins (22 and 37 kDa) identified here are essential for the survival of this pathogen in humans, because the unique supplies of iron available to be used by this pathogen are Hb and haem. Our results presented here are the first findings that attempt to explain the mechanism developed by *S. pneumoniae*, in order to acquire iron in the host and they open a new horizon to understand how this pathogen survives in humans.

Author contribution

María Elena Romero-Espejel performed the experiments. Marco Antonio González-Lopez performed the amino acid alignment and José de Jesús Olivares-Trejo designed the experiments and analysed the data. All the authors wrote the manuscript.

Funding

This work was supported by CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) (grant number SALUD-2010-01-139945, SALUD-2012-01-181641).

Acknowledgements

Thanks to Ms. D. Alma Lidia Olivares from Hospital Infantil de México, Federico Gómez for the R6 strain provided for this work. Marco A. González-Lopez was supported by fellowship BI-080530175442 agreement ICyT/179/2011 from ICyT-DF.

Notes and references

- 1 C. Ratledge and L. G. Dover, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, 54, 881.
- 2 C. Genco and D. Dixon, *Mol. Microbiol.*, 2001, 39, 1.
- 3 M. P. Schmitt, *J. Bacteriol.*, 1997, 179, 838. 4 X. Liu, T. Olczak, H. C. Guo, D. W. Dixon and C. A. Genco, *Infect. Immun.*, 2006, 74, 1222.
- 5 A. Ochsner, Z. Johnson and L. Vasil, *Microbiology*, 2000, 146, 185.
- 6 H. Hoffmann, M. Hornef, S. Schubert and A. Roggenkamp, *Int. J. Med. Microbiol.*, 2001, 291, 227.
- 7 S. Le´toffe´, O. Delepelaire and C. Wandersman, *J. Bacteriol.*, 2008, 190, 1866.
- 8 S. Le´toffe´, C. Deniau, N. Wolff, E. Dassa, P. Delepelaire, A. Lecroisey and C. Wandersman, *Mol. Microbiol.*, 2001, 41, 439.
- 9 C. Wandersman and P. Delepelaire, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2004, 58, 611.
- 10 C. Wandersman and I. Stojiljkovic, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, 53, 1209.
- 11 S. C. Andrews, A. K. Robinso´n and F. Rodri´guez-Quin´onez, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, 27, 215.
- 12 W. Simpson, T. Olczak and C. A. Genco, *J. Bacteriol.*, 2000, 182, 5737.
- 13 J. Reidl and J. J. Mekalanos, *J. Exp. Med.*, 1996, 183, 621. 14 V. J. Torres, G. Pishchany, M. Humayun, O. Schneewind and E. Skaar, *J. Bacteriol.*, 2006, 188, 8421. 15 A. W. Maresso, G. Garufi and O. Schneewind, *PLoS Pathog.*, 2008, 4, 1000132.
- 16 S. Tai, C. Lee and R. Winter, *Infect. Immun.*, 1993, 61, 5401. 17 S. Tai, T. Wang and C. Lee, *Infect. Immun.*, 1997, 65, 1083. 18 R. Hakenbeck, H. Ellerbrok, T. Briese, S. Handwerger and A. Tomasz, *Antimicrobial*, 1986, 30, 553.
- 19 A. Cruz-Castanˆeda, J. Herna´ndez-Sa´nchez and J. J. OlivaresTrejo, *Biochimie*, 2009, 91, 383.
- 20 C. S. Bates, G. E. Montanˆez, C. R. Woods, R. M. Vincent and Z. Eichenbaum, *Infect. Immun.*, 2003, 71, 1042.
- 21 G. S. Moeck and J. W. Coulton, *Mol. Microbiol.*, 1998, 28, 675.

pneumoniae

María E. Romero-Espejel¹, Mario A. Rodríguez¹, Bibiana Chávez-Munguía¹, Emmanuel Ríos-Castro² and José de Jesús Olivares-Trejo^{3*}

Edited by:
Jorge Eugenio Vidal,
Emory University, USA

Reviewed by:
Gregory T. Robertson,
Colorado State University, USA
Zehava Eichenbaum,
Georgia State University, USA

*Correspondence: José de
Jesús Olivares-Trejo
olivarestrejo@yahoo.com

Received: 26 January 2016

Accepted: 12 April 2016

¹ Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, México, ² Unidad de Genómica, Proteómica y Metabólica. LaNSE-CINVESTAV, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, México, ³ Laboratorio de Bacteriología y Nanomedicina, Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México, México

Streptococcus pneumoniae is a Gram-positive microorganism that is the cause of bacterial pneumonia, sinusitis and otitis media. This human pathogen also can cause invasive diseases such as meningitis, bacteremia and septicemia. Hemoglobin (Hb) and haem can support the growth and viability of *S. pneumoniae* as sole iron sources.

Published: 04 May 2016

Citation:

Romero-Espejel ME, Rodríguez MA, Chávez-Munguía B, Ríos-Castro E and Olivares-Trejo JJ (2016) Characterization of Spbhp-37, a Hemoglobin-Binding Protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:47. doi: 10.3389/fcimb.2016.00047



CrossMark

Characterization of Spbhp-37, a Hemoglobin-Binding Protein of *Streptococcus*

Unfortunately, the acquisition mechanism of Hb and haem in this bacterium has been poorly studied. Previously we identified two proteins of 37 and 22 kDa as putative Hb- and haem-binding proteins (Spbhp-37 and Spbhp-22, respectively). The sequence of Spbhp-37 protein was database annotated as lipoprotein without any function or localization. Here it was immunolocalized in the surface cell by transmission electron microscopy using specific antibodies produced against the recombinant protein. The expression of Spbhp-37 was increased when bacteria were grown in media culture supplied with Hb. In addition, the affinity of Spbhp-37 for Hb was determined. Thus, in this work we are presenting new findings that attempt to explain the mechanism involved in iron acquisition of this pathogen. In the future these results could help to develop new therapy targets in order to avoid the secondary effects caused by the traditional therapies.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, haem, iron, iron starvation, haem-binding protein

INTRODUCTION

Streptococcus pneumoniae is the most important cause of bacterial pneumonia and moreover this pathogen can cause infections as septicemia, bacteremia, and meningitis (Yaro et al., 2006; Thornton et al., 2010). This bacterium causes considerable human morbidity and mortality throughout the world, especially among children, the elderly and immunocompromised individuals (Gray et al., 1979; Austrian, 1989; Musher, 1992; Butler and Schuchat, 1999). However, the mechanisms for pneumococcal disease are not fully understood. There is a necessity for the discovering of novel therapeutic strategies focused on bacterial iron acquisition systems, because many bacteria pathogens require iron as an essential nutrient to infect the human (Klebba et al., 1982; Ratledge and Dover, 2000; Simpson et al., 2000; Crosa and Walsh, 2002; Andrews et al., 2003). Due to that the iron is required in several cellular processes, most bacteria have developed strategies for iron scavenging from host proteins (Wooldridge and Williams, 1993; Raymond et

al., 2003; Ge and Sun, 2012; Andrews et al., 2013). **One of the best studied bacterial iron acquisition systems is**

based on siderophores, which are secreted from the bacterial cell to scavenge free iron (Wooldridge and Williams, 1993; Guerinot, 1994; Wandersman and Delepelaire, 2004). Even though many pathogens secrete siderophores for iron acquisition during infection (Wandersman and Stojiljkovic, 2000; Genco and Dixon, 2001; Wandersman and Delepelaire, 2004), there are not biochemical or genetic evidences that *S. pneumoniae* produces siderophores (Tai et al., 1993; Brown et al., 2001; Romero-Espejel et al., 2013). As a result of the powerful reactivity of haem, it is generally sequestered within human cells by hemoproteins such as hemoglobin (Hb; Wandersman and Stojiljkovic, 2000; Wandersman and Delepelaire, 2004). In accordance, many bacteria have developed systems involved in iron acquisition from host hemoproteins (Tai et al., 1993; Brown et al., 2001; Genco and Dixon, 2001; Romero-Espejel et al., 2013). There are several studies on bacterial haem acquisition systems based mostly on Gram-negative bacteria (Stojiljkovic et al., 1996; Lewis et al., 1998; Wandersman and Stojiljkovic, 2000; Genco and Dixon, 2001; Olczak et al., 2001). Comparatively, less is known about how Gram-positive pathogens utilize host hemoproteins as an iron source. Recently, some surface proteins of *Streptococcus pyogenes* have been shown that bind haem (Shr and Shp, and haem-specific ATP-binding cassette transporter HtsABC). Shp has been shown to rapidly transfer its haem to the HtsA lipoprotein of HtsABC (Lei et al., 2002, 2003; Bates et al., 2003). In addition, it has been proposed that Shr is a source of haem for Shp and that the Shr-to-Shp haem transfer is a step of the haem acquisition process in *S. pyogenes* (Zhu et al., 2008).

Staphylococcus aureus acquires iron from haem by the Isd (iron-regulated surface determinant) system, which is formed by cell wall-anchored surface proteins (IsdA, IsdB, IsdC, and IsdH), a membrane transporter (composed by IsdD, IsdE, and IsdF), a transpeptidase (SrtB), and cytoplasmic haem-degrading monooxygenases (IsdG and IsdI) (Mazmanian et al., 2000, 2002, 2003; Skaar and Schneewind, 2004; Wu et al., 2005). Unfortunately, the mechanism of Hb and haem uptake in *S. pneumoniae* has been poorly studied. This pathogenic bacterium can grow using Hb or haem as a sole iron source. Hb acquisition is vital to microbial survival (Tai et al., 1993; Brown et al., 2001; Romero-Espejel et al., 2013). Previously, we detected two potential *S. pneumoniae* Hb- and haem-binding proteins (Spbhp) of 22 and 37 kDa, termed by us as Spbhp-22 and Spbhp-37. The Spbhp-37 protein had homology with a lipoprotein (Bierne et al., 2002; Romero-Espejel et al., 2013). Interestingly, several proteins required for virulence in Gram-positive bacteria are lipoproteins; for instance, FhuD which is an iron-siderophore transporter (Schneider and Hantke, 1993). Therefore, the aim of this work was to confirm the role of Spbhp-37 as Hb-binding protein and to determinate the affinity of Spbhp-37 for Hb.

MATERIALS AND METHODS

S. pneumoniae Growth Conditions

S. pneumoniae strain R6 was grown under microaerophilic conditions in 5% CO₂ for 24 h at 37°C on agar plates supplemented with 5% sheep blood. The cellular cultures were then inoculated in plates containing Todd-Hewitt Broth (THB), supplemented with 0.5% yeast extract (THB-Y) and incubated for 16 h at 37°C with 5% CO₂. For testing alternative iron sources the bacteria were cultivated in well culture plates containing medium THB, supplemented with 0.5% yeast extract (THB-Y) and 700 μM of 2,2-dipyridyl (a chelating agent) was added to eliminate free iron from the culture medium. Then, incubation was followed for 16 h at 37°C with 5% CO₂. The cellular growth was adjusted to 0.1 (OD₆₀₀) by spectrophotometry. After 3 h under iron starvation, the culture medium was supplemented with 2 μM human Hb.

Cloning and Expression of Spbhp-37 Recombinant Protein

The coding region of the *Spbhp-37* gene, excluding the signal peptide, was amplified by PCR from *S. pneumoniae* genomic DNA. For its directional cloning we used as sense primer an oligonucleotide containing the BamHI recognition site (5'-GGGGGGATCCATGAACAAGAAACAATGGCTAGGTC-3'), and as anti-sense primer an oligonucleotide that included the Sall recognition site (5'-GGGGGGTCTGACTTATTTTCAGGAACCTTTACGCTTCCATC-3'). Then, amplicon was cloned in frame with the glutathione-S-transferase (GST), tag of the pGEX-6P-1 construction vector (GE Healthcare) using the BamHI and Sall restriction sites. The nucleotide sequence was corroborated by automated DNA sequencer.

For expression, *Escherichia coli* (strain BL21) competent cells were transformed with the pGEX-6P-1 empty vector, used as a negative control, or with the construction containing the *Spbhp37* gene (pGEX-spbhp-37). Induction of recombinant proteins (GST and Spbhp-37-GST) was induced with 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 h at 37°C.

Purification of the Spbhp-37 Recombinant Protein

Inclusion bodies (IB), where the recombinant protein was accumulated, were purified as described (Vallejo et al., 2002). Briefly, after protein induction, cultures were centrifuged at 1500 g for 40 min and bottom was suspended in 50 ml of buffer A (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl) in the presence of 1 mM PMSF. Cells were sonicated for 30 s (100 W) and 50 s off time for a total sonication time (including the off time) of 10 min. Then, an equal volume of buffer A having 8 M urea and 1 mM PMSF was added, stirred for 1 h at 4°C and centrifuged at 10000 g for 30 min. Pellet was resuspended in 500 ml of buffer B (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 M NaCl)

and centrifuged at 10000 g for 30 min. Pellet was resuspended in 500 ml of water, centrifuged again, and frozen at -70°C . After that, pellet was resuspended in buffer C (2 M urea, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl, and 2% Triton X-100), centrifuged for 15 min at 10000 g, washed with the same volume of buffer B and centrifuged again. Then, the wet pellet of IB (2.1 g) was dissolved in 20 ml of solubilization buffer (8 M urea, Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl and 1 mM 2-mercaptoethanol) and stirred for 2 h at room temperature. Sample was centrifuged at 12000 g for 30 min at 4°C and supernatant was extensively dialyzed against a freshly prepared solution containing 20 mM Tris-HCl pH 8.0 and 4 mM urea. Finally, dialyzed samples were filter through a $0.45\ \mu\text{m}$ membrane and stored in aliquots at -70°C . Recombinant protein was then purified by affinity chromatography using Glutathione-agarose beads (GE Healthcare) following the manufacturer's recommendations. Induction of the recombinant protein and its purification were examined by SDS-PAGE and western blotting assays using antibodies against GST. Cleavage of the GST tag was achieved using Pre-Scission protease following the manufacturer's recommendations.

Production of Specific Antibodies

Recombinant protein was used as antigen to produce specific antibodies against Spbhp-37. Thus, recombinant protein was mixed with a volume of TiterMax Gold Adjuvant (Sigma 14538033-2). Then, a New Zealand white rabbit was injected with $150\ \mu\text{g}$ of protein in 1 ml of suspension. For immunization, protein suspension was divided in four doses of $250\ \mu\text{l}$ each, which were injected into two subcutaneous and two intramuscular sites. Immunization was performed three times for periods of 15 days. The study was conducted in accordance with Good Laboratory Practices (GLP) and Use of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999). The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)Cinvestav. Thereafter, antiserum was obtained and tested using total *S. pneumoniae* extracts or Spbhp-37 purified protein.

Western Immunoblotting

Protein samples from different fractions during purification of the Spbhp-37 recombinant protein or total extracts of *S. pneumoniae*, isolated as described (Romero-Espejel et al., 2013), were loaded onto 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were soaked for 1 h with 5% non-fat milk in PBS in order to saturate all remaining active binding sites, and then they were incubated with anti-GST (glutathione transferase; 1:10000) or anti-Spbhp-37 (1:10000) antibodies. After that, membranes were incubated with anti-rabbit IgGs secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Invitrogen 65-6120; 1:10000) and the antibodies recognition was revealed by chemiluminescence (Millipore).

Immunolectron Microscopy

Bacteria grown in THB-Y or in the presence of Hb as only iron source were fixed in 4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in PBS for 1 h at room temperature. Samples were embedded in the acrylic resin (LR White) and polymerized under UV at 4°C overnight. Thin sections (i.e., 60 nm) were obtained and mounted on Formvar-covered nickel grids. Later, sections were incubated in PBS with 10% fetal bovine serum before incubation with the anti-Spbhp-37 antibodies diluted (1:100) in 5% fetal bovine serum. Then, samples were incubated with anti-rabbit IgGs secondary antibodies conjugated to 20 nm colloidal gold spheres (Ted Pella Inc; 1:100). Finally, sections were contrasted with aqueous solutions of uranyl acetate and lead citrate before being examined in a Jeol JEM-1011 transmission electron microscope.

S. pneumoniae Growth in the Presence of Hb and Anti Spbhp-37-GST Antibodies

Cells of *S. pneumoniae* previously cultivated and inoculated in THB (supplemented with 0.5% of yeast extract). When it was necessary to test an iron supply alternative, a chelating agent $700\ \mu\text{M}$ 2,2'-dipyridyl (Sigma D216305-25G) was used in order to eliminate iron from the medium of culture. Thereafter, the bacteria were incubated for 16 h at 37°C with an atmosphere regulated at 5% CO_2 . In order to synchronize the cellular growth (OD_{600}) was adjusted to 0.1. Thus, the cellular growth was monitored each hour. After 3 h under iron starvation the medium of culture was supplemented with: (a) only $2.5\ \mu\text{M}$ of Hb (Cat. H7379, Sigma[®]), (b) pre-immune serum (500 mg/ml) plus Hb or (c) anti-Spbhp-37 antibodies (500 mg/ml) plus Hb. After that, cellular growth was monitored each hour for 4 h, comparing under iron limiting condition vs. the condition when Hb was supplied as the sole iron source or when the anti-Spbhp-37 antibodies were added.

Overlay Assays

Total extracts of *S. pneumoniae* were separated by 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were incubated for 1 h at 37°C with 0.5% nonfat milk in PBS and 0.05% Tween 20, pH 7.4 (PBST) to block unspecific sites and then overnight at 4°C with human Hb ($2.5\ \mu\text{M}$). After that, membranes were incubated for 1 h at 37°C with anti-hemoglobin antibodies (Santa Cruz Biotechnology SC21005) (1:10000), and lastly 1 h at 37°C with the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Invitrogen 656120; 1:10000). Antibodies recognition was developed by chemiluminescence (Millipore). As a control, a membrane was incubated only with PBST before the incubation with anti-globin antibodies.

Surface Plasmon Resonance (SPR)

All SPR experiments were performed using Biacore T200 optical biosensor (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). SPR measurements were carried out in HBS-EP running buffer 10X (10 mM HEPES, 3 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.05% v/v of Tween 20 and pH 7.4) at 25°C in a CM5 chip (coated with carboxylated dextran). For the immobilization scouting Hb was dissolved (30 µg/ml) in acetate buffer (pH 3.5, 4, 4.5, 5, and 5.5) and injected at the Biacore system at flow rate of 10 µl/min, with a contact time of 120 s and using NaOH 50 mM as a wash solution to regenerate the chip surface. Once pH was selected (pH 4), Hb was dissolved in a corresponding acetate buffer (30 µg/ml) and immobilized to the chip using amine coupling at an immobilization level of $RL = 435 RU$ to reach a theoretical $RU_{max} = 249.53$. During the coupling, the chip surface was activated using 1:1 mixture of 100 mM Nethyl-N-(dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) and 100 mM N-hydroxysuccinimide (NHS; both dissolved in water), and after Hb injection, the residual activated carboxy methyl groups on the chip surface were blocked by 1 M ethanolamine, pH 8.5. For this study, flow cell 1 was blank immobilized (without protein) for

experiment (30 µl/min), contact time was settled for 120 s and dissociation time was kept at 300 s. Regeneration was carried out with NaCl 1 M for 30 s. Experiments were performed with various concentrations of Spbhp-37 from 100 to 1000 nM, monitoring the refractive index changes as a function of time under constant flow conditions. The relative amount of Spbhp-37 bound to the Hb was determined by measuring the net increase of refractive index over time compared with that of running buffer alone. This change was reported in response units (RU). The data analysis was done with Biacore T200 evaluation software version 1.0 and data was fit to 1:1 binding.

RESULTS

Cloning and Expression of Spbhp-37

To investigate the participation of Spbhp-37 protein on iron acquisition, its encoding gene was cloned in the plasmid pGEX6-P-1. The construction was termed pGEX-spbhp-37 and was used to transform BL21 strain; the expression of Spbhp-37 was induced with IPTG. The overexpression of Spbhp-37 protein was confirmed by SDS-PAGE stained with Coomassie blue, we observed a band of 63 kDa when bacteria were incubated with

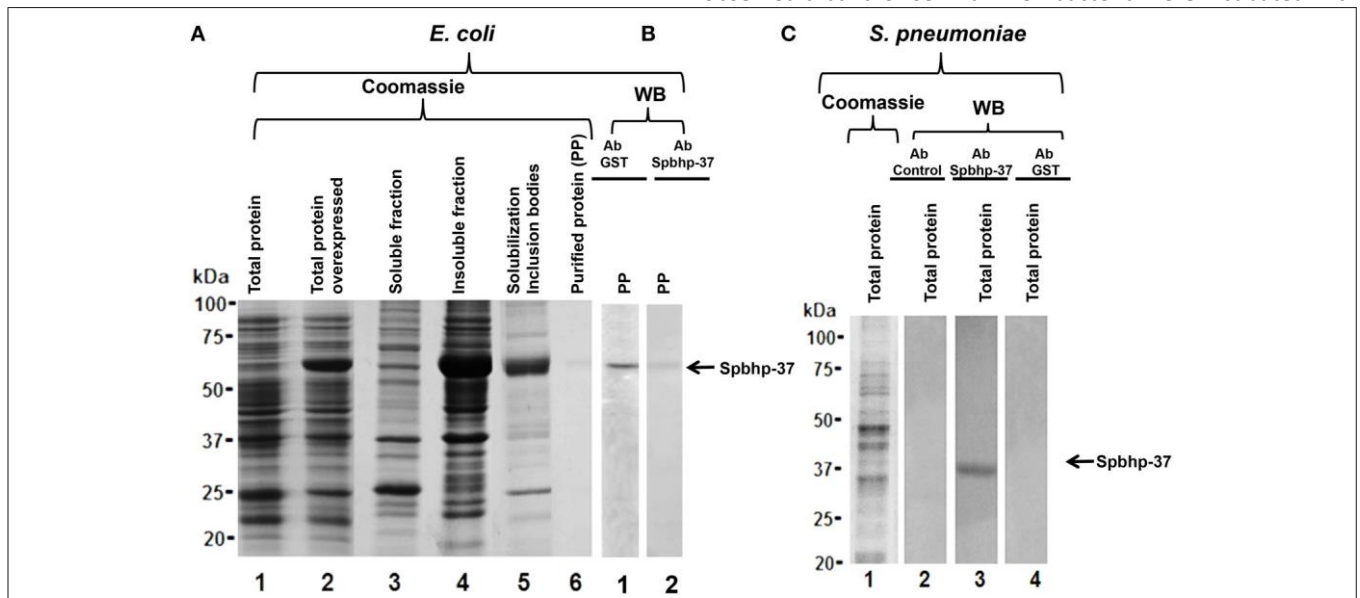


FIGURE 1 | Production of a Spbhp-37 recombinant protein and antibodies against it. The Spbhp-37 encoding gene was cloned in the pGEX-6P-1 vector, the recombinant protein was expressed in *E. coli* bacteria (BL21 strain) and purified. Then, this protein was used as antigen to obtain specific antibodies against it. Finally, antibodies were utilized in western blotting assays on the recombinant protein and total extracts of *S. pneumoniae*. (A) Production and purification of the Spbhp-37 recombinant protein. Proteins were analyzed by 12% SDS-PAGE stained with coomassie blue. Lane 1, total proteins of non-induced bacteria; lane 2, total proteins of IPTG-induced bacteria; lane 3, soluble fraction of IPTG-induced bacteria; lane 4, insoluble fraction of IPTG-induced bacteria; lane 5, solubilization of inclusion bodies; lane 6, purified protein. (B) Western blotting on purified recombinant protein. Lane 1, western blotting using an antibody directed against the GST tag; lane 2, western blotting using an antibody directed against the recombinant protein (anti-Spbhp-37). (C) Proteins were analyzed by 12% SDS-PAGE stained with coomassie blue and western blotting on total proteins of *S. pneumoniae*. Lane 1, total extracts of *S. pneumoniae* were analyzed by 12% SDS-PAGE stained with coomassie blue; lane 2, western blotting using the pre-immune serum; lane 3, western blotting using anti-Spbhp-37 antibodies; lane 4, western blotting using anti-GST. Molecular weight markers are indicated on the left. Arrows indicate the antibodies recognition of recombinant protein Spbhp-37.

using as a reference. To analyze interactions of Spbhp-37 with immobilized Hb, Spbhp-37 was dissolved in buffer HBS-EP and injected. The same buffer was used as the running buffer. The flow rate was maintained constant throughout the kinetics

IPTG with respect to non-induced bacteria (Figure 1, lane 2). This molecular weight corresponds to the expected for the recombinant protein (26 kDa from GST and 37 kDa from Spbhp37). Unfortunately, when soluble and insoluble fractions

were separated, the Spbhp-37 recombinant protein was detected in the insoluble fraction (**Figure 1**, lane 4). Therefore, a protocol to solubilize the inclusion bodies (IB) was performed (see Materials and Methods Section) (**Figure 1**, lane 5) previous to purification of the protein by affinity chromatography (**Figure 1**, lane 6). To confirm the identity of the purified protein, we carried out western blot assays using anti-GST antibodies. Results showed that antibodies recognized the purified recombinant protein (**Figure 1B**, lane 1).

Obtaining of Anti Spbhp-37 Antibodies

In order to produce anti Spbhp-37 antibodies, the recombinant protein was used as antigen to inoculate a New Zealand rabbit. As expected, the obtained antibodies recognized the recombinant protein in western blot assays (**Figure 1B**, lane 2). After that, antibodies were characterized by western blotting on total proteins of *S. pneumoniae*. In these assays, antibodies recognized a single band of 37 kDa, which corresponds to the molecular weight of Spbhp-37 (**Figure 1C**, lane 3). This band was not revealed when western blotting was performed with preimmune serum or with anti-GST antibodies (**Figure 1C**, lanes 2, 4, respectively). These results allowed us to demonstrate the specificity of the antibodies raised against Spbhp-37.

Spbhp-37 Protein is Increased Two Fold on the Surface of *S. pneumoniae* When it is Grown in the Presence of Hb As Only Iron Source

To investigate the location of Spbhp-37 in *S. pneumoniae* bacteria we performed immunoelectronic microscopy assays using antibodies against the recombinant protein. Our results showed the presence of Spbhp-37 protein on bacteria surface (**Figure 2B**). Signal was specific for Spbhp-37 because not signal was detected in a control incubated only with the gold-labeled secondary antibodies (**Figure 2A**). Then, to analyze the effect of Hb on the expression of Spbhp-37, we cultivated *S. pneumoniae* in THB in the presence of Hb as the sole iron source. In this condition we observed that the occurrence of Spbhp-37

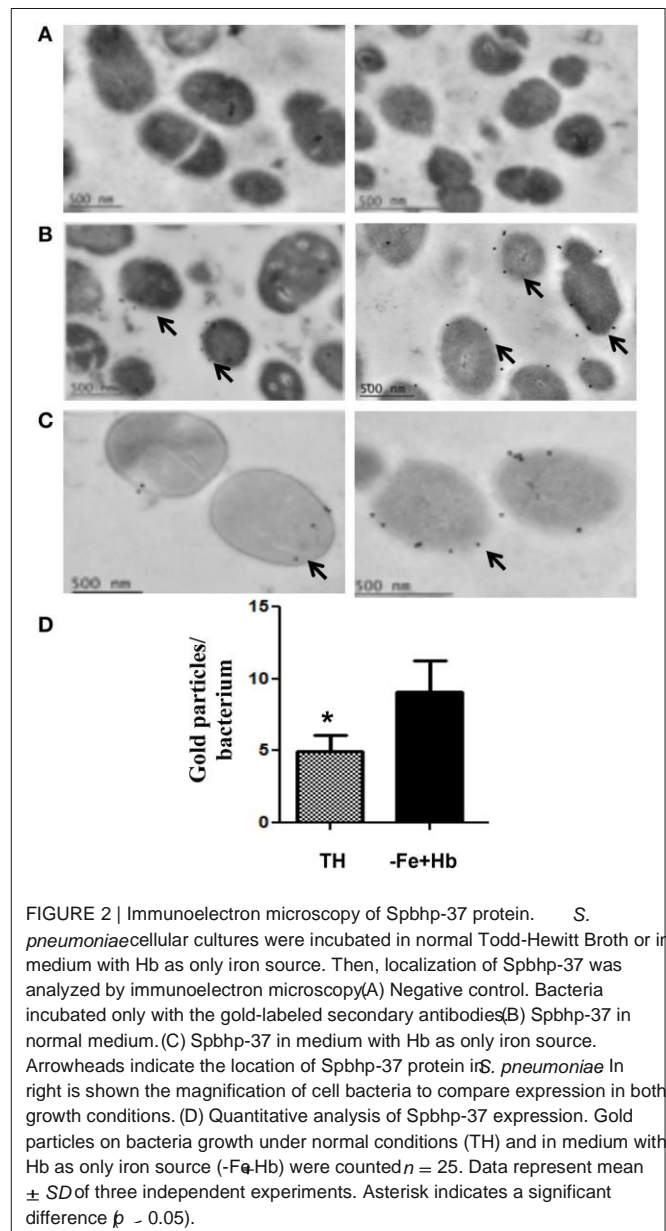


FIGURE 2 | Immunoelectron microscopy of Spbhp-37 protein. *S. pneumoniae* cellular cultures were incubated in normal Todd-Hewitt Broth or in medium with Hb as only iron source. Then, localization of Spbhp-37 was analyzed by immunoelectron microscopy (A) Negative control. Bacteria incubated only with the gold-labeled secondary antibodies (B) Spbhp-37 in normal medium. (C) Spbhp-37 in medium with Hb as only iron source. Arrowheads indicate the location of Spbhp-37 protein in *S. pneumoniae*. In right is shown the magnification of cell bacteria to compare expression in both growth conditions. (D) Quantitative analysis of Spbhp-37 expression. Gold particles on bacteria growth under normal conditions (TH) and in medium with Hb as only iron source (-Fe+Hb) were counted ($n = 25$). Data represent mean \pm SD of three independent experiments. Asterisk indicates a significant difference ($p < 0.05$).

on bacteria surface was more abundant than when cells were grown in normal medium (**Figure 2C**). To obtain a quantitative value, the positive signals were counted in each condition. Results revealed an increase of about two fold of Spbhp-37 in bacteria grown with Hb (**Figure 2D**). This result was corroborated by western blotting (data not shown). These results suggest that the presence of Hb increases two fold the abundance of Spbhp-37.

Anti Spbhp-37-GST Antibodies Limited the Cellular Growth When Hb Was Supplied As the Sole Iron Source

To explore whether Spbhp-37 protein is related to utilization of Hb in the cellular growth of *S. pneumoniae*, we designed an experiment in which the anti-Spbhp-37 antibodies were supplied to block the bacteria growth under free iron limiting conditions, but using Hb as sole iron source. When *S. pneumoniae* was cultivated in THB under iron starvation, the cellular growth was limited, but when this media was supplemented with Hb as the sole iron source, the cellular growth was restored (Figure 3). Interestingly, the cellular growth was blocked when anti-Spbhp-37 antibodies were added to cellular cultures with Hb as the sole iron source (Figure 3). In addition, preimmune serum had a minimal effect on the cellular growth in media supplemented with Hb (Figure 3). Results clearly showed the cellular growth under iron limiting conditions was impaired.

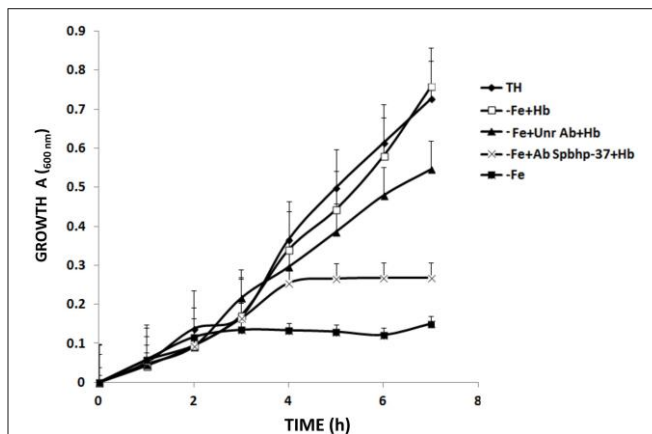
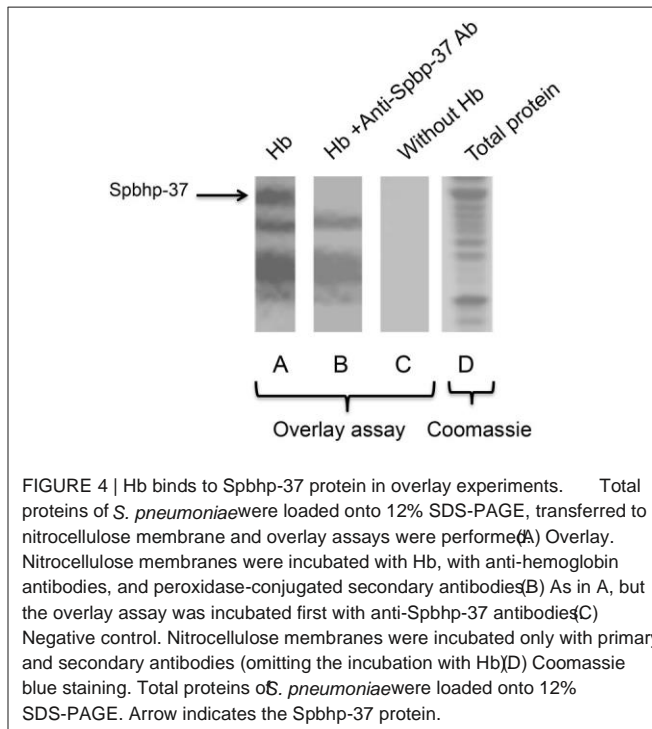


FIGURE 3 | Anti Spbhp-37-GST antibodies block the cellular growth of *S. pneumoniae*. *S. pneumoniae* strain R6 was cultivated in Todd-Hewitt Broth under conditions of: iron sufficiency (◆); without iron (■); without iron and supplemented with Hb (□); without iron and supplemented with Hb in the presence of anti-Spbhp-37 antibodies (×); and without iron and supplemented with Hb in the presence of pre-immune serum (used as unrelated antibodies) (▲). The cellular growth was monitored each hour for a period of 7 h by spectrophotometry (600 nm). Data represent mean \pm SD of three independent experiments by triplicate. The cellular growth from bacteria cultivated in the medium without iron and supplemented with Hb in the presence of anti-Spbhp-37 antibodies was significantly higher compared to the cellular growth from bacteria cultivated in the medium without iron and supplemented with Hb in the presence of pre-immune serum (used as unrelated antibodies); $p < 0.05$, one-way ANOVA.

Anti-Spbhp-37 Antibodies Block the Interaction between Spbhp-37 Protein and Hb

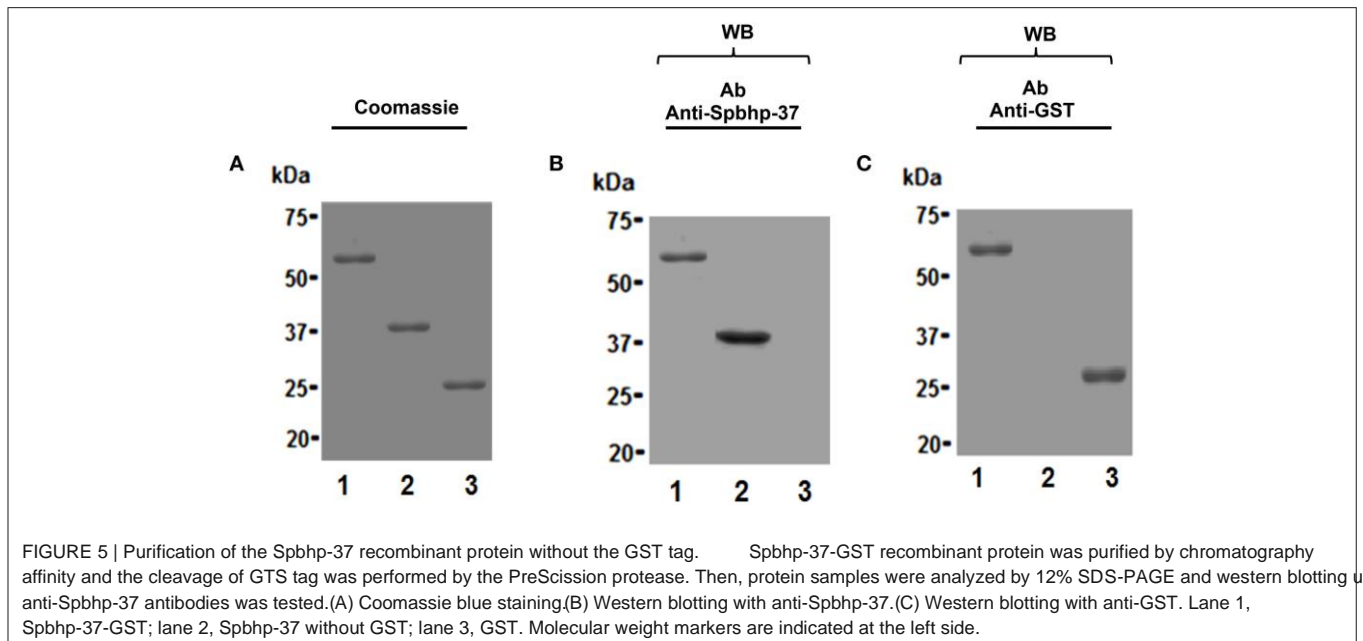
Inhibition of cellular growth with anti-Spbhp-37 notwithstanding the presence of Hb supports the hypothesis that Spbhp-37 is a receptor for Hb and that antibodies block the interaction between both proteins. To corroborate these

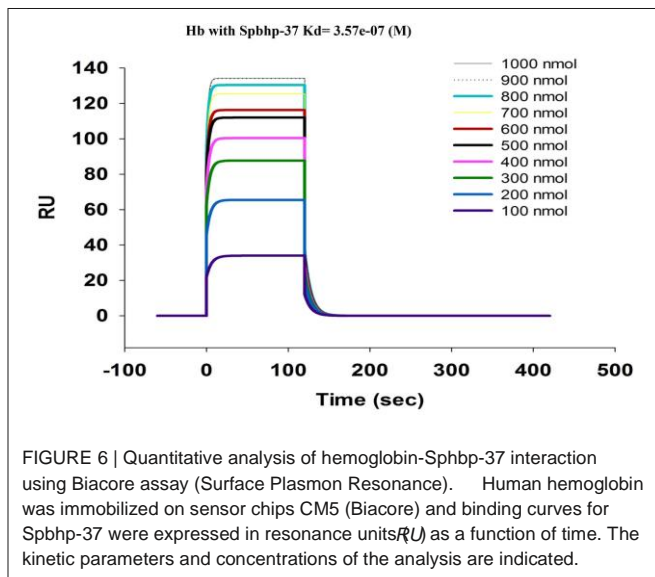


assumptions, the interaction between Spbhp-37 protein and Hb as well the blockage of this interaction by anti Spbhp-37 antibodies were investigated by overlay assays. Thus, total proteins of *S. pneumoniae* (Figure 4D) were separated in SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Then, membranes were incubated with Hb and interaction was revealed with anti-Hb antibodies. At least five proteins, including a 37 kDa band Spbhp-37 protein (located in the top of gel), were recognized by Hb and anti-Hb antibodies when total proteins were used (Figure 4A). Interestingly, the detection of the protein was not observed when anti-Spbhp-37 antibodies were added in the overlay assays (Figure 4B). In addition, not bands were detected when incubation of Hb was omitted in the overlay experiments (used as a negative control) (Figure 4C). Results confirmed that Spbhp-37 binds to Hb and that antibodies block the interaction between both proteins.

Spbhp-37 Showed High Affinity by Hb

To determine the affinity of Spbhp-37 for Hb, the GST tag of the Spbhp-37 recombinant protein was eliminated by digestion with the Pre-Scission protease and its affinity to Hb was analyzed by surface plasmon resonance (SPR). First, to confirm the cleavage of the GST tag, protein samples were analyzed by SDS-PAGE and western blotting. After SDS-PAGE and coomassie blue staining we observed the purified Spbhp37-GST protein (**Figure 5A**, lane 1), the Spbhp-37 protein without GST (**Figure 5A**, lane 2), and the releasing of the GST tag (**Figure 5A**, lane 3). Identity of Spbhp-37 protein was corroborated by western blotting assays using the anti Spbhp-37 antibodies. These antibodies recognized the Spbhp37-GST protein (**Figure 5B**, lane 1) and the Spbhp-37 protein without the GST tag (**Figure 5B**, lane 2), but GST was not revealed (**Figure 5B**, lane 3). As a control, western blotting was





performed using an anti-GST antibody, where only Spbhp-37GST protein (Figure 5C, lane 1), and GST (Figure 5C, lane 3) were revealed.

To obtain kinetic binding data by SPR, Hb was immobilized on the sensor chip and the binding of Spbhp-37 (without GST tag) at concentrations ranged from 100 to 1000 nmol was tested. In these experiments we observed a dose-dependent binding of Spbhp-37 to Hb (Figure 6). Curve fitting of the sensograms enabled us to determine that K_d was of 3.57×10^{-7} M, showing a high affinity of Spbhp-37 protein for Hb.

DISCUSSION

S. pneumoniae is a human pathogen that uses Hb to cover its iron necessities. However, the iron acquisition mechanism has been poorly studied. Previously, we identified a lipoprotein of 37 kDa (Spbhp-37) as a *S. pneumoniae* membrane protein, which was purified by haem affinity chromatography and that could be involved in the Hb and haem acquisition. In the present work, by use of an antibody raised against Spbhp-37 recombinant protein we showed that the expression of native protein was increased on the surface of *S. pneumoniae* when Hb was supplemented as the sole iron source. These results clearly showed the character of receptor protein, because it was detected on the surface of the bacterium (Lei et al., 2002, 2003; Bates et al., 2003; Mazmanian et al., 2003). In addition, when these antibodies were used to analyze the bacterial growth in the presence of Hb, we noticed that they diminished about 50% the cell growth with respect to that obtained in media with Hb in the absence of this antibody or in the presence of pre-immune serum, indicating the importance of Spbhp-37 on uptake of Hb when was supplied as only iron source. This hypothesis was confirmed by overlay assays, because we found that Hb bound to Spbhp-37 protein and anti Spbhp37 antibodies were capable to inhibit the

interaction between Hb and Spbhp-37 protein. In fact, antibodies only blocked the Hb binding to one (Spbhp-37) of the all bands previously identified in *S. pneumoniae* total proteins (Romero-Espejel et al., 2013), which correspond to 37 kDa size, this observation clearly showed the specificity of the antibodies produced. On the other hand, the low K_d determined by SPR for the binding of Hb and

Spbhp-37 protein (3.57×10^{-7} M) is similar to that reported for the TonB-dependent haem receptor (HasR) of *Serratia marcescens*, the outer membrane haem receptor (HmuR) of *Porphyromonas gingivalis*, and haem receptor (HasA) of *S. marcescens* (Ghigo et al., 1997; Olczak et al., 2001; Deniau et al., 2003), indicating that Spbhp-37 protein binds Hb with high affinity and suggesting that this protein is necessary in the mechanisms of iron acquisition to scavenge iron. Possibly other proteins are involved in this mechanism, for example those reported previously by our group, which include a stress general protein of 22 kDa, a maltosebinding protein of 45 kDa, and a glutamine synthetase type I 50 kDa (Romero-Espejel et al., 2013). These proteins could help to introduce and store the iron source to cytoplasm as it has been described for other Gram-positive bacteria (Mazmanian et al., 2002, 2003; Skaar et al., 2004; Skaar and Schneewind, 2004; Wu et al., 2005).

Our overall results attempt to explain the iron acquisition mechanism by *S. pneumoniae* when Hb is available. We showed that Spbhp-37 is a surface protein involved in Hb uptake, an essential mechanism of this pathogen to establish an infection process in human, because this bacterium uses Hb and haem as iron sources.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ME conceived and carried out most of the experiments, analyzed data, and drafted the manuscript; BC was responsible for transmission electronic microscopy experiments; ER performed the surface plasmon resonance assays; MR and JO designed the study, analyzed data, and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [grant numbers: SALUD-2012-01181641 and 222180].

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Carlos Vázquez-Calzada and Mario Rodríguez-Nieves (Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México City, México) for their help in the generation of specific antibodies and reagents preparation used in this work. We also thank Lorena Ramírez-Reyes (Unidad de Genómica,

Proteómica y Metabolómica. LaNSE-CINVESTAV, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México City, México) for her help in experiments of surface plasmon resonance.

REFERENCES

- Andrews, S., Norton, I., Salunkhe, A. S., Goodluck, H., Aly, W. S., Mourad-Agha, H., et al. (2013). Control of iron metabolism in bacteria. *Met. Ions Life Sci.* 12, 203–239. doi: 10.1007/978-94-007-5561-1_7
- Andrews, S., Robinsón, A. K., and Rodríguez-Quiñonez, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215–237. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00055-X
- Austrian, R. (1989). Pneumococcal polysaccharide vaccines. *Rev. Infect. Dis.* 11, 598–602. doi: 10.1093/clinids/11.Supplement_3.S598
- Bates, C. S., Montanez, G. E., Woods, C. R., Vincent, R. M., and Eichenbaum, Z. (2003). Identification and characterization of a *Streptococcus pyogenes* operon involved in binding of hemoproteins and acquisition of iron. *Infect. Immun.* 71, 1042–1055. doi: 10.1128/IAI.71.3.1042-1.055.2003
- Bierne, H., Mazmanian, S. K., Trost, M., Pucciarelli, M. G., Liu, G., Dehoux, P., et al. (2002). Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol. Microbiol.* 43, 869–881. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.0.2798.x
- Brown, J. S., Gilliland, S. M., and Holden, D. W. (2001). A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol. Microbiol.* 40, 572–585. doi: 10.1046/j.13652958.2001.02414.x
- Butler, J. C., and Schuchat, A. (1999). Epidemiology of pneumococcal infections in the elderly. *Drugs Aging* 15, 11–19. doi: 10.2165/00002512-19991500100002
- Crosa, J., and Walsh, C. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 66, 223–249. doi: 10.1128/MMBR.66.2.223-249.2002
- Deniau, C., Gilli, R., Izadi-Pruneyre, N., Letoffe, S., Delepierre, M., Wandersman, C., et al. (2003). Thermodynamics of heme binding to the HasA(SM) hemophore: effect of mutations at three key residues for heme uptake. *Biochemistry* 42, 10627–10633. doi: 10.1021/bi030015k
- Ge, R., and Sun, X. (2012). Iron trafficking system in *Helicobacter pylori*. *BioMetals* 25, 247–258. doi: 10.1007/s10534-011-9512-8
- Genco, C. A., and Dixon, D. W. (2001). Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol. Microbiol.* 39, 1–11. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.0.2231.x
- Ghigo, J. M., Letoffe, S., and Wandersman, C. (1997). A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 3572–3579.
- Gray, B. M., Converse, J., and Dillon, H. (1979). Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing disease. *J. Infect. Dis.* 140, 979–983. doi: 10.1093/infdis/140.6.979
- Guerinot, M. L. (1994). Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 743–772. doi: 10.1146/annurev.mi.48.100194.003523
- Klebba, P. E., McIntosh, M. A., and Neilands, J. B. (1982). Kinetics of biosynthesis of iron-regulated membrane proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 149, 880–888.
- Lei, B., Liu, M., Voyich, J. M., Prater, C. I., Kala, S. V., DeLeo, F. R., et al. (2003). Identification and characterization of HtsA, a second heme-binding protein made by *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* 71, 5962–5969. doi: 10.1128/iai.71.10.5962-5969.2003
- Lei, B., Smoot, L. M., Menning, H. M., Voyich, J. M., Kala, S. V., DeLeo, F. R., et al. (2002). Identification and characterization of a novel heme-associated cell surface protein made by *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* 70, 4494–4500. doi: 10.1128/IAI.70.8.4494-4500.2002
- Lewis, L. A., Sung, M. H., Gipson, M., Hartman, K., and Dyer, D. W. (1998). Transport of intact porphyrin by HpuAB, the hemoglobin-haptoglobin utilization system of *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* 180, 6043–6047.
- Mazmanian, S. K., Liu, G., Jensen, E. R., Lenoy, E., and Schneewind, O. (2000). *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5510–5515. doi: 10.1073/pnas.080.520697
- Mazmanian, S. K., Skaar, E. P., Gaspar, A. H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., et al. (2003). Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* 299, 906–909. doi: 10.1126/science.10.81147
- Mazmanian, S. K., Ton-That, H., Su, K., and Schneewind, O. (2002). An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2293–2298. doi: 10.1073/pnas.032523999
- Musher, D. M. (1992). Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin. Infect. Dis.* 14, 801–807. doi: 10.1093/clinids/14.4.801
- Olczak, T., Dixon, D. W., and Genco, C. A. (2001). Binding specificity of the *Porphyromonas gingivalis* heme and hemoglobin receptor HmuR, gingipain K, and gingipain R1 for heme, porphyrins, and metalloporphyrins. *J. Bacteriol.* 183, 5599–5608. doi: 10.1128/JB.183.19.5599-5608.2001
- Ratledge, C., and Dover, L. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 881–941. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.881
- Raymond, K. N., Dertz, E. A., and Kim, S. S. (2003). Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3584–3588. doi: 10.1073/pnas.0630018100
- Romero-Espejel, M. E., González-López, M. A., and Olivares-Trejo, J. J. (2013). *Streptococcus pneumoniae* requires iron for its viability and expresses two membrane proteins that bind haemoglobin and haem. *Metallomics* 5, 384–389. doi: 10.1039/c3mt20244e
- Schneider, R., and Hantke, K. (1993). Iron-hydroxamate uptake systems in *Bacillus subtilis*: identification of a lipoprotein as part of a binding protein dependent transport system. *Mol. Microbiol.* 8, 111–121. doi: 10.1111/j.13652958.1993.tb01208.x
- Simpson, W., Olczak, T., and Genco, C. A. (2000). Characterization and expression of HmuR, a TonB-dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 182, 5737–5748. doi: 10.1128/JB.182.20.5737-5748.2000
- Skaar, E. P., Gaspar, A. H., and Schneewind, O. (2004). IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 279, 436–443. doi: 10.1074/jbc.m307952200
- Skaar, E. P., and Schneewind, O. (2004). Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes Infect.* 6, 390–397. doi: 10.1016/j.micinf.2003.12.008
- Stojiljkovic, I., Larson, J., Hwa, V., Anic, S., and So, M. (1996). HmbR outer membrane receptors of pathogenic *Neisseria* spp.: iron-regulated, hemoglobin-binding proteins with a high level of primary structure conservation. *J. Bacteriol.* 178, 4670–4678.
- Tai, S., Winter, R., Lee, C. J., and E. (1993). Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 61, 5401–5405.
- Thornton, J., Durick-Eder, K., and Tuomanen, E. (2010). Pneumococcal pathogenesis: “innate invasion” yet organ-specific damage. *J. Mol. Med.* 88, 103–107. doi: 10.1007/s00109-009-0578-5
- Vallejo, L., Brokelman, M., Marten, S., Trappe, S., Cabrera, J., Hoffmann, A., et al. (2002). Renaturation and purification of bone morphogenetic protein2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 94, 185–194. doi: 10.1016/s0168-1656(01)00425-4

- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to haemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 611–647. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123811
- Wandersman, C., and Stojiljkovic, I. (2000). Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and haemophores. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 215–220. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00078-3
- Wooldridge, K. G., and Williams, P. H. (1993). Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 325–348. doi: 10.1111/j.15746976.1993.tb00026.x
- Wu, R., Skaar, E. P., Zhang, R., Joachimiak, G., Gornicki, P., Schneewind, O., et al. (2005). Staphylococcus aureus IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes with structural similarity to monooxygenases. *J. Biol. Chem.* 280, 2840–2846. doi: 10.1074/jbc.M409526200
- Yaro, S., Lourd, M., Traoré, Y., Njanpop-Lafourcade, B. M., Sawadogo, A., Sangare, L., et al. (2006). Epidemiological and molecular characteristics of a highly lethal pneumococcal meningitis epidemic in Burkina Faso. *Clin. Infect. Dis.* 43, 693–700. doi: 10.1086/506940
- Zhu, H., Liu, M., and Lei, B. (2008). The surface protein Shr of *Streptococcus pyogenes* binds heme and transfers it to the streptococcal heme-binding protein Shp. *BMC Microbiol.* 8:15. doi: 10.1186/1471-2180-8-15

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Romero-Espejel, Rodríguez, Chávez-Munguía, Ríos-Castro and Olivares-Trejo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.