



**Universidad Nacional Autónoma de México**

---

**Instituto de Investigaciones Biomédicas**

**Posgrado en Ciencias Biomédicas**

**ANÁLISIS GENÉTICO DE LA  
RESPUESTA AL NO Y SUPERÓXIDO  
DE *Escherichia coli*.**

**Tesis que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias**

**Presenta**

**Biol. Elizabeth Hernández Urzúa**

**Asesor Dr. Jorge Membrillo Hernández**

**México, D.F.**

**2006.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO**

Presidente	Dra. María del Carmen Gómez Eichelmann
Secretario	Dr. Jorge Membrillo Hernández
Vocal	Dr. David Romero Camarena
Vocal	Dr. Juan Enrique Morett Sánchez
Vocal	Dr. Jaime Mariano Martínez Salazar
Suplente	Dr. Salvador Uribe Carvajal
Suplente	Dr. Edgardo Escamilla Marván

## AGRADECIMIENTOS

A mi Corazón (Daniel Caballero Muñoz) por estar conmigo en las buenas y en las malas, porque siempre me has apoyado en todo, porque siempre has confiado en mi y sobre todo porque fuiste una persona muy importante en esta etapa de mi vida. Te amo.

A mi Padres, Francisca y Guillermo porque me enseñaron a ser una persona honesta y agradecida, pero sobre todo porque siempre han estado conmigo. A mis hermanas Guillermina, Adriana y Verónica con las que he contado incondicionalmente.

A la familia Caballero Muñoz porque siempre me han apoyado.

Al Dr. Jorge Membrillo Hernández por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por todo lo que me enseñó.

Al Dr. Mario Soberón Chávez y la Dra. Laura Camarena Mejía por ser parte de mi Comité Tutoral y por todos sus comentarios a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A los miembros del Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular por su apoyo y por todos los comentarios durante el desarrollo de este trabajo. A mis amigos Alondra, Gerry, Luis, Tecilli, Nora, Adriana.

A todos mis profesores durante el Doctorado.

A los doctores María del Carmen Gómez Eichelmann, David Romero Camarena, Juan Enrique Morett Sánchez, Jaime Mariano Martínez Salazar, Salvador Uribe Carvajal, Edgardo Escamilla Marván, por los comentarios al trabajo.

Al Sr. Miguel Páez Silva por ser parte importante en el desarrollo de mi trabajo. Al Técnico Académico Dr. Luis Delgado Olivares por su ayuda.

Al CONACYT por la beca durante el Doctorado. A los proyectos J-33369-N y 42580-Q de CONACYT, IN207703 y IN205200 de PAPIIT-UNAM.

# ÍNDICE

	Paginas
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABLAS	XIII
ABREVIATURAS	XIV
LISTA DE PUBLICACIONES	XV
ARTICULOS QUE CITAN ESTAS PUBLICACIONES	XVI
PRESENTACIONES EN CONGRESOS	XVII
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. LA BACTERIA <i>Escherichia coli</i> .	1
1.1.1. <i>Escherichia coli</i> , una enterobacteria facultativa.	1
1.1.2. Características estructurales y fisiológicas de <i>Escherichia coli</i> .	1
1.1.2.1. Estructura celular.	1
1.1.2.2. Composición química.	2
1.1.3. Fisiología del crecimiento bacteriano.	2
1.1.3.1. Fases de crecimiento.	2
1.1.3.2. Nutrientes necesarios para el crecimiento de <i>E. coli</i> .	3
1.1.3.3. Efecto de temperatura y pH.	4
1.1.4. Metabolismo aeróbico.	5
1.1.5. Metabolismo anaeróbico.	5
1.1.5.1. El sistema Arc.	6
1.1.5.2. El Sistema Fnr.	6
1.1.6. Fermentación.	7
1.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN BACTERIAS.	7
1.2.1. El estrés oxidativo generado por ROS.	7
1.2.1.1. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).	7
1.2.1.2. Daño producido por ROS.	9
1.2.1.3. Sistemas de defensa contra el estrés oxidativo por ROS.	10
1.2.1.4.1 El sistema SoxRS en <i>Escherichia coli</i> .	11
1.2.1.4.2 El regulón OxyR.	13
1.2.2. El estrés oxidativo generado por RNS.	15

1.2.2.1. Producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS).	16
1.2.2.2. Daño producido por RNS.	16
1.2.2.3. Sistemas de defensa contra el estrés oxidativo por RNS.	16
1.2.2.3.1. Las flavohemoglobinas.	16
1.2.2.3.2. La flavorubredoxina <i>norV norW</i> .	17
1.3. LAS HEMOGLOBINAS BACTERIANAS Y SU PAPEL EN EL ESTRÉS NITROSATIVO (ARTICULO DE REVISIÓN).	19
1.3.1. Publicaciones reciente sobre la regulación del gen <i>hmp</i> de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	20
1.4. OBJETIVO.	21
1.5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	21
CAPITULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS.	
2.1. LISTA DE CEPAS UTILIZADAS.	22
2.1.1. Mantenimiento de cepas.	23
2.2. LISTA DE PLÁSMIDOS UTILIZADOS.	23
2.3. LISTA DE OLIGONUCLÉTIDOS UTILIZADOS	24
2.4. MEDIOS DE CULTIVO, ANTIBIÓTICOS Y SUPLEMENTOS UTILIZADOS.	25
2.5. TÉCNICAS GENÉTICAS.	25
2.5.1. Propagación de bacteriófagos.	25
2.5.2. Transformación.	26
2.5.3. Transducción mediada por el bacteriofago P1 <sub>vir</sub> .	28
2.5.4. Mutagénesis al azar por transposición.	29
2.5.5. Construcción de fusiones transcripcionales.	30
2.5.6. Construcción de mutantes.	31
2.6. TÉCNICAS MOLECULARES.	32
2.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa.	32
2.6.2. Purificación de plásmidos.	32
2.6.3. Purificación de DNA cromosomal.	32
2.6.4. Purificación de RNA.	33
2.6.5. Southern blot.	34

2.6.6. Northern blot.	36
2.6.7. 5' RACE.	37
2.6.8. Purificación de la proteína Fur.	38
2.6.9. Ensayos electroforéticos de movilidad de bandas.	39
2.7. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.	40
2.7.1. Actividad de $\beta$ -galactosidasa.	40
2.7.2. Ensayos de respiración.	42
2.8. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS.	42
2.8.1. Análisis tipo BLAST.	42
2.8.2. Análisis en GeConT (Gene Context Tool).	42
CAPITULO 3. RESULTADOS.	
ARTICULO	
3.1. RESULTADOS ADICIONALES AL ARTÍCULO.	43
3.1.1. Análisis de la unión de la proteína Fur de <i>E. coli</i> a la región intergénica <i>glyA-hmp</i> de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> .	43
3.1.2. Análisis de la secuencia de las proteínas Fur de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>	45
3.1.3. Conclusiones y Perspectivas.	46
3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>hmp</i> DE <i>Escherichia coli</i> POR PQ Y SNP.	48
3.2.1. Razonamiento.	48
3.2.2. Expresión de la $\Phi(hmp-lacZ)$ en presencia de PQ o SNP.	49
3.2.3. Búsqueda de mutantes afectadas en la expresión de la fusión $\Phi(hmp-lacZ)$ por transposición.	49
3.2.4. Análisis de la región <i>cis</i> del gen.	51
3.2.5. Análisis del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>hmp</i> por el método de 5'RACE,	55
3.2.6. Análisis de la expresión del gen <i>hmp</i> por Northern blot en presencia de PQ o SNP.	57
3.2.7. Cinética de inducción del gen <i>hmp</i> por Northern blot en presencia de PQ o SNP.	59



3.2.8. Cinética de inducción de la $\Phi(hmp-lacZ)$ en presencia de PQ o SNP.	61
3.2.9. Expresión de la $\Phi(hmp-lacZ)$ en mutantes <i>ytfE</i> , <i>yidZ</i> , <i>yphF</i> , <i>yfhA</i> , <i>yfhK</i> .	63
3.2.10. El papel de <i>yjeB</i> en la inducción de <i>hmp</i> por PQ.	69
3.2.11. Discusión.	72
3.2.12. Conclusiones y perspectivas.	76
CAPITULO 4. DISCUSIÓN GENERAL.	77
CAPITULO 5. REFERENCIAS.	85
APÉNDICE. PUBLICACIÓN ADICIONAL.	

Flavohemoglobin Hmp, but not its individual domains, confers protection from respiratory inhibition by nitric oxide in *Escherichia coli*.  
Hernández-Urzúa *et al.* 2003.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mecanismo de activación del sistema SoxRS en *Escherichia coli*.
- Figura 2. Mecanismo de activación de OxyR en *Escherichia coli*.
- Figura 3 Sobreexpresión de la proteína Fur de *Escherichia coli*.
- Figura 4. Ensayo electroforético de retardo de bandas.
- Figura 5. Alineamiento de la secuencia *glyA-hmp* de Fur de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.
- Figura 6. Actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en presencia de PQ y SNP.
- Figura 7. Región intergénica *glyA-hmp* de *E. coli*.
- Figura 8. Southern blot de las fusiones  $\Phi(hmp-lacZ)$  en pRS551.
- Figura 9. PCR de las fusiones  $\Phi(hmp-lacZ)$  en la cepa TE2680.
- Figura 10. Actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las fusiones  $\Phi(hmpF0-F5-lacZ)$ .
- Figura 11. PCR del cDNA del mRNA del gen *hmp*.
- Figura 12. Identificación del sitio de inicio de transcripción del gen *hmp*.
- Figura 13. Ensayos de Northern blot del gen *hmp* y *sodA*.
- Figura 14. Cinética de inducción del gen *hmp* de *E. coli* por PQ o SNP.
- Figura 15. Cinética de inducción de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  por PQ o SNP.
- Figura 16. Cinética de inducción de las fusiones  $\Phi(soxS-lacZ)$  y  $\Phi(sodA-lacZ)$  por PQ o SNP.
- Figura 17. Contexto genómico de los genes *ytfE* y *yidZ* de *E. coli*.
- Figura 18. Construcción de las mutantes *ytfE::kan*, *yidZ::kan* y *yidY-yidZ::kan*.
- Figura 19. Actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en las mutantes *ytfE::kan*, *yidZ::kan*.
- Figura 20. Contexto genómico del gen *hmp* de *E. coli*.
- Figura 21. Construcción de las mutantes *yphF::kan*, *yfhA::kan* y *yfhK::kan*.
- Figura 22. Actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en las mutantes *ytfE::kan*, *yidZ::kan* y *yidY-yidZ::kan*.
- Figura 23. Contexto genómico de *yjeB* de *E. coli*.
- Figura 24. Ensayos de Northern blot del gen *hmp* en una mutante *yjeB*.

Figura 25. Expresión del gen *hmp* en ausencia del gen *yjeB* (NsrR).

Figura 26. Modelos de regulación de la proteína RamA en la expresión del gen *hmp* en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Figura 27. Posibles modelos de regulación del gen *hmp* de *E. coli* en presencia de PQ o SNP.

Figura 28. Modelo de regulación del gen *hmp* de *E. coli* en presencia de PQ o SNP involucrando a las proteínas NsrR y Fur. A y B en una cepa silvestre. C y D en la mutante *yjeB*.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición Química de la célula de *Escherichia coli*.

Tabla 2. Genes regulados por la proteína SoxS en presencia de superóxido en *Escherichia coli*.

Tabla 3. Genes regulados por la proteína OxyR en presencia de peróxido de hidrógeno en *Escherichia coli*.

Tabla 4. Lista de cepas utilizadas en este trabajo.

Tabla 5. Lista de plásmidos utilizados en este trabajo.

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Tabla 7. Antibióticos y suplementos utilizados en los medios de cultivo.

## ABREVIATURAS

DMSO	Dimetilsulfóxido
FlavoRb	Flavorubredoxina
Fnr box	Secuencia de unión de Fnr
Fur box	Secuencia de unión de Fur
GSNO	S-nitrosoglutatión
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
LB	Luria-Bertani medio
NO <sup>·</sup>	Óxido nítrico
N <sub>2</sub> O	Óxido nitroso
O	Oxígeno atómico
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
O <sub>3</sub>	Ozono
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno en singulete
O <sub>2</sub> <sup>-·</sup>	Superóxido
<sup>·</sup> OH	Radical hidroxilo
<sup>-</sup> OH	Ión hidroxilo
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PQ	Metil viologeno o paraquat
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
SNP	Nitroprusiato de sodio

## PUBLICACIONES

Los artículos que se publicaron con algunos resultados de este trabajo son:

**Hernández-Urzúa E.**, Mills C. E., White G. P., Contreras-Zentella M. L., Escamilla E., Vasudevan S. G., Membrillo-Hernández J. y Poole R. K. 2003. Flavohemoglobin Hmp, but not its individual domains, confers protection from respiratory inhibition by nitric oxide in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37):34975-34982.

**Hernández-Urzúa E.**, Zamorano-Sánchez D., Ponce-Coria J., Morett E., Grogan S., Poole R. K. y Membrillo-Hernández J. 2006. Multiple regulators of the flavohaemoglobin (*hmp*) gene of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium include RamA, a transcriptional regulator conferring the multidrug resistance phenotype. *Archives of Microbiology*. En línea.

**Hernández-Urzúa E.** y Membrillo-Hernández J. 2004. Genética molecular de las hemoglobinas bacterianas: estructura, regulación y función. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 7(2):61-69.

## ARTICULOS QUE CITAN ESTAS PUBLICACIONES

Bang, I.S., Liu L.M., Vazquez-Torres A., Crouch M-L., Stamler J.S. and Fang F.C. 2006. Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the *Salmonella* flavohemoglobin Hmp. *J. Biol. Chem.*, 281(38):28039-28047.

Lama, A., Pawaria S., Dikshit K.L. 2006. Oxygen binding and NO scavenging properties of truncated hemoglobin, HbN, of *Mycobacterium smegmatis*. *FEBS Letters*, 580(17):4031-4041.

Igamberdiev, A.U., Bykova N.V., Hill R.D. 2006. Nitric oxide scavenging by barley hemoglobin is facilitated by a monodehydroascorbate reductase-mediated ascorbate reduction of methemoglobin. *Planta*, 223(5):1033-1040.

Gow, A.J., Payson A.P., Bonaventura J. 2005. Invertebrate hemoglobins and nitric oxide: How heme pocket structure controls reactivity. *J. Inorganic Biochemistry*, 99(4):903-911.

Gardner, P.R. 2005. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. *J. Inorganic Biochemistry*, 99(1):247-266.

## PRESENTACIONES EN CONGRESOS

**Hernández-Urzúa E.**, Ponce-Coría J. y Membrillo-Hernández J. Studies on the regulation of the expression of the *hmp* gene encoding for a flavohemoglobin in *Escherichia coli* . Responses to NO and superoxide. Molecular Genetics of Bacterial and Phages. Universidad de Wisconsin, Madisón, USA. Agosto 5 al 10 de 2003.

**Hernández-Urzúa E.**, Zamorano-Sánchez D. y Membrillo-Hernández J. Transcriptional regulation of the *hmp* (flavo-haemoglobin) gene in *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. EMBO Conference on Molecular Microbiology: Exploring Prokaryotic Diversity. EMBL Heidelberg, Alemania. Abril 22 al 26 de 2004.

**Hernández-Urzúa E.** y Membrillo-Hernández J. Bacterial Genetics: Global regulation on gene expression in bacteria. International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology. Trieste, Italia. Noviembre 15 al 18 de 2004.

**Hernández-Urzúa E.** y Membrillo-Hernández J. Análisis de la regulación del gen *hmp* en *Escherichia coli*. Respuesta al estrés por superóxido y óxido nítrico. XXXV Congreso Nacional de Microbiología. Oaxtepec, Mor., México. Del 3 al 6 Abril 2006.



## RESUMEN

En *Escherichia coli* como en otras bacterias se han encontrado flavohemoglobinas, proteínas involucradas en la defensa celular ante el estrés oxidativo. Las flavohemoglobinas tienen un papel esencial en la detoxificación del óxido nítrico (NO<sup>·</sup>), una molécula de gran reactividad química. La flavohemoglobina (Hmp) de *E. coli*, es codificada por el gen *hmp*. La transcripción del gen es inducida por la presencia de paraquat (PQ, generador cíclico de superóxido) o nitroprusiato de sodio (SNP, donador de NO<sup>·</sup>). Esta inducción es independiente al sistema SoxRS. El objetivo de este trabajo fue profundizar en el estudio de la regulación del gen *hmp* de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en respuesta al estrés oxidativo por PQ o SNP.

Analizando fusiones transcripcionales de los genes *hmp* de *E. coli* y *S. enterica*,  $\Phi(hmp_{Ec}-lacZ)$  y  $\Phi(hmp_{Sr}-lacZ)$  mostramos que mutaciones en *fur* y *ramA* causan alteraciones a la expresión de ambas fusiones. Fur es un regulador negativo de la expresión de *hmp*, ensayos electroforéticos de movilidad de bandas demostraron que Fur se une a la región intergénica *glyA-hmp* de *E. coli* y de *Salmonella*. El papel de RamA en la regulación de este gen por la presencia de PQ aún no es claro, pero en ausencia de *ramA* la expresión de *hmp* disminuye.

Un análisis de la región *cis* del gen *hmp* determinó que la secuencia entre las bases -56 a la -68 con respecto al sitio +1 (inicio de transcripción) es importante en la expresión del gen, pero no en la inducción por la presencia de PQ o SNP. Con experimentos de 5'-RACE se demostró que únicamente existe un sólo sitio de inicio de la transcripción en *hmp*. Ensayos tipo Northern blot indicaron que la inducción de la transcripción de *hmp* por SNP es inmediata, mientras que en presencia de PQ, la inducción se observó hasta 45 minutos después del tratamiento. Adicionalmente se estudió la expresión de *hmp* en ausencia de NsrR, un regulador recientemente identificado como sensor de NO<sup>·</sup>. Mutaciones en el gen *nsrR* resultaron en una desrepresión de la expresión de *hmp*.

El análisis del papel del dominio hemo y el dominio flavin de la proteína Hmp, determinó que ambos dominios juegan un papel importante para la protección en el estrés oxidativo producido por NO<sup>·</sup>.

## ABSTRACT

Flavo-haemoglobins have been found in *Escherichia coli* as in many other bacteria. Flavo-haemoglobins are proteins involved in the cellular defence to oxidative stress. Flavo-haemoglobins have an essential role in the detoxification of nitric oxide (NO $\cdot$ ), a molecule with high chemical reactivity. The *E. coli* flavo-haemoglobin, Hmp, is coded by the *hmp* gene which is located at the 55 minute of the chromosome. Transcription of *hmp* is induced by the presence of paraquat (PQ, a superoxide producer cyclic agent) or sodium nitroprussiate (SNP, an NO $\cdot$ -donor). These inductions are independent of the general responsive system to superoxide, SoxRS. The goal of this project was to deepen the study of the regulation of the *hmp* genes of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to the oxidative stress produced by PQ or SNP.

Transcriptional fusions to *lacZ* of the *hmp* genes,  $\Phi(hmp_{EC}-lacZ)$  and  $\Phi(hmp_{SR}-lacZ)$ , showed that mutations in *fur* and *ramA* cause alterations to the expression of both fusions in the presence of PQ. Fur is a negative regulator of the expression of *hmp*, tests of gel mobility shift assays demonstrated that Fur is united to the intergenic region *glyA-hmp* of *E. coli* and of *Salmonella*. The paper of RamA in the regulation of this gene by the PQ presence not yet is sure but, in *ramA* absence the expression of *hmp* diminishes.

*Cis*-analysis of the *hmp* promoter determined that the sequence between the -56 to -68 bases upstream of the transcriptional start site is important for the expression of gene, but not for the induction by the presence of PQ or SNP. On the other hand we observed the presence of only one transcriptional start site. We determined the expression kinetics of *hmp* by Northern blot and observed that the induction by SNP was immediately. By contrast, PQ induction of *hmp* was only detected after 45 minutes. We analyse the expression of *hmp* in absence of *yjeB* (*nsrR*) gene, we observed up expression in presence of PQ.

The analysis on the role of the haem and flavin domains in the Hmp protein determined that, both domains play a role important in the protection of the oxidative stress by NO $\cdot$ .

### 1.1. LA BACTERIA *Escherichia coli*.

#### 1.1.1. *Escherichia coli*, una enterobacteria facultativa.

*Escherichia coli* es una *Enterobacteriaceae* Gram-negativa anaeróbica facultativa, que en presencia de oxígeno puede llevar a cabo el metabolismo aeróbico, pero en ausencia de éste puede utilizar aceptores alternos de electrones como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), dimetilsulfóxido (DMSO), trimetilamina *N*-óxido (TMAO) o fumarato, para llevar a cabo el metabolismo anaeróbico, o en ausencia de cualquier aceptor de electrones llevar a cabo la fermentación (Lin y Lynch, 1996).

*E. coli* es el principal constituyente de la flora intestinal de los humanos y algunos vertebrados. Algunas cepas de *E. coli* adquieren factores de virulencia y son responsables de infecciones digestivas y urinarias. Dependiendo del síntoma al que son asociadas se clasifican en cuatro categorías: *E. coli* enteropatógenicas (EPEC), *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) y *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC) (Souza *et al.*, 2001).

*Escherichia coli* K-12 es una cepa no patógena frecuentemente usada como modelo en estudios fisiológicos y genéticos (Souza *et al.*, 2001).

#### 1.1.2. Características estructurales y fisiológicas de *Escherichia coli*.

##### 1.1.2.1. Estructura celular.

La arquitectura celular de *E. coli* es común a la de algunos procariotes. Para mantener aislado el interior de la célula del ambiente exterior, la célula presenta dos membranas, ambas compuestas de fosfolípidos, glicoproteínas y proteínas que pueden servir como soporte o como transportadores. La membrana interna se encuentra entre el citoplasma y el periplasma y la membrana externa se encuentra entre el periplasma y el ambiente exterior (White, 2000; Moat *et al.*, 2002).

*E. coli* presenta varios apéndices que tienen diferentes funciones, como el flagelo usado para la motilidad de la célula, las fimbrias (algunas llamadas pili) usadas para la adherencia a las superficies y el pili sólo existe en algunas células y se utiliza para poder intercambiar material genético (White, 2000).

### 1.1.2.2. Composición química.

La composición de una célula de *E. coli* se observa en la Tabla 1 (tomada de Neidhardt y Umbarger, 1996). El peso total de una célula es de  $9.5 \times 10^{-13}$ g (en peso seco es de  $2.8 \times 10^{-13}$  g).

Tabla 1. Composición química de una célula de *Escherichia coli*.

Componentes	Pesos seco total (%)	Peso (g)	Número aproximado de moléculas por célula
Proteína	55.0	$4.0 \times 10^4$	2,350,000
RNA			
rRNA 23S		$1.0 \times 10^6$	18,700
rRNA 16S	20.5	$5.0 \times 10^5$	18,700
rRNA 5S		$3.9 \times 10^4$	18,700
tRNA		$2.5 \times 10^4$	198,000
mRNA		$1.0 \times 10^6$	1,380
DNA	3.1	$2.5 \times 10^9$	2.1
Lípidos	9.1	705	22,000,000
Lipopolisacáridos	3.4	4,070	1,430,000
Peptidoglicanos	2.5	(904) <sub>n</sub>	1
Glicógeno	2.5	$1.0 \times 10^6$	4300
Poliaminas	0.4	233	6,700,000
Metabolitos, cofactores, iones	3.5		

### 1.1.3. Fisiología del crecimiento bacteriano.

El crecimiento se define como un incremento en la masa.

#### 1.1.3.1. Fases de crecimiento.

En la cinética de crecimiento de una bacteria se observan cuatro fases de crecimiento, la fase lag, la fase logarítmica, la fase estacionaria y la fase de muerte.

En la fase lag el cultivo se adapta al medio nuevo ya que las células pueden ser viejas o poseer cantidades reducidas de ATP, cofactores esenciales o de ribosomas. Otra de las razones de esta fase, es el tiempo que requieren la células para recobrase de los productos tóxicos después de estar en la fase estacionaria (White, 2000)

En la fase logarítmica (también es llamada fase exponencial), los microorganismos crecen y se dividen exponencialmente. Durante esta fase la población es más uniforme química y fisiológicamente, por ello los cultivos en fase exponencial se utilizan en estudios bioquímicos y fisiológicos (White, 2000).

En la fase estacionaria el crecimiento se detiene y la curva de crecimiento se hace horizontal. Un factor principal es el agotamiento de nutrientes, o la limitación de oxígeno para los organismos aerobios, o por la acumulación de productos tóxicos (White, 2000).

En la fase de muerte los cambios ambientales que se generaron en la fase estacionaria provocan la reducción de células viables, hecho que caracteriza esta fase. La muerte en un cultivo puede deberse a varios factores, la causa común se debe a la falta de energía celular y a la actividad de enzimas líticas (White, 2000).

### **1.1.3.2. Nutrientes necesarios para el crecimiento de *E. coli***

En un ambiente natural las bacterias están frecuentemente bajo condiciones limitadas de nutrientes, por lo tanto su crecimiento es lento o pueden existir periodos largos en donde no hay crecimiento. En el laboratorio, las bacterias son crecidas en medios de cultivo diseñados para proveer todos los nutrientes esenciales (Todar, 2004).

Los nutrientes que requiere una célula de *E. coli* son: C, H, O,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y trazas de Zn, Co, Cu y Mo. Estos elementos se

encuentran en forma de agua, de iones inorgánicos, pequeñas moléculas y macromoléculas (Todar, 2004).

Para poder crecer las bacterias necesitan de una fuente de nitrógeno, una fuente de carbono y energía, así como ciertas condiciones fisiológicas en el medio de cultivo, concentración de oxígeno, de temperatura, de pH. (Todar, 2004). Aeróbicamente puede crecer hasta una densidad de aproximadamente  $10^8$  células/ml. El medio rico consiste de triptona y extracto de levadura (medio Luria-Bertani, LB). El medio mínimo contiene un amortiguador, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y requiere de vitaminas, aminoácidos y otros suplementos (Miller, 1992).

### **1.1.3.3. Efecto de la temperatura y pH en el crecimiento.**

Cuando los microorganismos se encuentran a temperaturas por encima de la óptima, se afectan la estructura y la función celular; a bajas temperaturas se afecta la función celular, pero no necesariamente la estructura o la composición química. Las altas temperaturas ocasionan la desnaturalización de las enzimas, al igual que se deterioran las membranas. A muy bajas temperaturas las enzimas bajan su velocidad de reacción. Para *E. coli* la temperatura óptima es de 37°C, la temperatura máxima en la cual esta bacteria puede crecer es de 45°C y la mínima es de 10°C, por eso se clasifica como un organismo mesófilo (Ingraham y Marr, 1996).

Aunque a menudo los microorganismos crecen en un amplio rango de pH, su tolerancia tiene un límite. Variaciones en el pH puede dañar la membrana plasmática o inhibir la actividad de las enzimas y las proteínas transportadoras. *E. coli* se clasifica como un organismo neutrófilo por el rango de pH para su crecimiento, que es entre 5.5 y 8 (Ingraham y Marr, 1996).

### 1.1.4. Metabolismo aeróbico.

En la cadena respiratoria los electrones se transfieren a quinonas, las cuales conectan las diferentes deshidrogenasas con las diferentes reductasas y oxidasas terminales que están presentes bajo diferentes condiciones de crecimiento.

*E. coli* presenta tres quinonas, la ubiquinona (UQ), la menaquinona (MQ) y la dimetilmenaquinona (DMQ), la presencia de estas depende de la naturaleza del aceptor de electrones. Cuando *E. coli* crece aeróbicamente, la UQ es la quinona más frecuente (60%), seguida de la DMQ (37%) y la MQ (3%). Cuando crece anaeróbicamente en presencia de nitrato las principales quinonas son DMQ (70%) y MQ (30%), mientras que en presencia de fumarato o DMSO son MQ (74%) seguida de DMQ (16%) y UQ está en menor cantidad (10%) (White, 2000).

Cuando *E. coli* crece aeróbicamente, transfiere los electrones a dos diferentes complejos de oxidasas terminales, el complejo citocromo *bo* (tiene un hemo tipo *b* y un hemo tipo *o* llamado *bo*<sub>3</sub> o citocromo *o*) y el complejo citocromo *bd* (tiene un hemo tipo *b* y un hemo tipo *d* y es llamado citocromo *d*). El citocromo *bo* es la oxidasa predominante cuando los niveles de oxígeno son altos; cuando la tensión de oxígeno es menor, *E. coli* utiliza el citocromo *bd* (White, 2000).

### 1.1.5. Metabolismo anaeróbico.

En anaerobiosis *E. coli* puede producir al menos cinco diferentes reductasas terminales, donde el aceptor de electrones puede ser nitrato, nitrito, TMAO, DMSO o fumarato. Sin embargo es necesaria la acción cooperativa de varios reguladores globales para que se lleve a cabo este tipo de respiración.

El cambio de una atmósfera aeróbica a una anaeróbica provoca cambios en el metabolismo, se lleva a cabo la represión de genes requeridos en la aerobiosis y la inducción de genes requeridos en anaerobiosis. Las bacterias han desarrollado mecanismos de transducción de señales en respuesta a la

disponibilidad de aceptores de electrones presente en el medio. (White, 2000; Sawers, 1999; Partridge *et al.*, 2006). Algunos de los genes que responden a la anaerobiosis son regulados globalmente por dos sistemas, el sistema ArcAB y el sistema FNR.

### 1.1.5.1. El sistema Arc.

El sistema ArcA/ArcB es un sistema de dos componentes que regula más de 30 genes. Principalmente reprime la transcripción de genes que codifican enzimas que participan en la respiración aeróbica.

La transmisión de señales entre ArcB y ArcA ocurre por una cascada de fosforilación entre la His→Asp→His→Asp de la proteína sensora ArcB al regulador de respuesta ArcA. La fosforilación de ArcA conduce a la represión de genes involucrados en el transporte de electrones, el ciclo de los ácidos tricarbónicos y en el ciclo del glioxilato. Además activa genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo fermentativo (Sawers, 1999). ArcB no percibe el oxígeno directamente, sino que los transportadores de electrones tipo quinona actúan como una señal negativa que inhibe la autofosforilación aeróbica de ArcB (Georgellis *et al.*, 2001).

### 1.1.5.2. El sistema Fnr.

La proteína Fnr tiene la función de regular el cambio del metabolismo aeróbico al anaeróbico. Induce la expresión de genes necesarios en el metabolismo anaeróbico y reprime genes indispensables del metabolismo aeróbico. En *E. coli* regula cerca de 120 genes (Sawers, 1999).

Se ha sugerido que Fnr percibe el oxígeno directamente a través de dos centros hierro-azufre ([4Fe-4S]<sup>2+</sup>) sensibles al balance redox. En presencia de oxígeno estos centros se convierten en ([2Fe-2S]<sup>2+</sup>), lo que inactiva la función de Fnr para la unión al DNA (Sawers, 1999).



### 1.1.6. Fermentación.

La fermentación fue originalmente descrita por Pasteur como “la vie sans air”. Esta es una condición bajo la cual ocurre el crecimiento sin ningún aceptor de electrones (Bock y Sawers, 1996). Los productos de la fermentación en *E. coli* comprenden una mezcla de ácidos como el D-lactato, etanol, acetato, formato y succinato; estos productos tienen diferentes estados de oxidación (Bock y Sawers, 1996).

## 1.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN BACTERIAS.

### 1.2.1. El estrés oxidativo generado por ROS.

El estrés oxidativo se define como la pérdida en el balance entre agentes prooxidantes y antioxidantes, a favor de los prooxidantes (Storz y Zheng, 2000).

#### 1.2.1.1. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Los organismos aeróbicos que usan el oxígeno molecular ( $O_2$ ) generan especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son tóxicas, además son más reactivas que el  $O_2$ . Las principales ROS que se generan son: 1) las que son producto de la ruptura o de la excitación del  $O_2$ , como el oxígeno atómico (O), el ozono ( $O_3$ ) y el oxígeno en singulete ( $^1O_2$ ) y 2) las que están parcialmente reducidas como el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Las especies parcialmente reducidas se generan cuando la célula crece bajo condiciones aeróbicas (Hansberg, 2002).

El  $O_2$  se considera un radical libre por tener dos electrones desapareados, estos dos electrones tienen spins paralelos, es decir giran en el mismo sentido. Los electrones con spins paralelos solo pueden reaccionar con electrones que giren en sentido opuesto a éstos. Por esta razón el  $O_2$  no es tan reactivo y se encuentra en un estado estable (Halliwell, 2006).

El O se produce a través de la ruptura de los dos enlaces covalentes del O<sub>2</sub>, por la luz ultravioleta. El oxígeno atómico puede combinarse con el O<sub>2</sub> para generarse el ozono, que es un gas irritante de olor penetrante y además es más oxidante que el O<sub>2</sub>. El O<sub>3</sub> reacciona con las proteínas, los lípidos, el NAD(P)H, el ascorbato, el ácido úrico y además puede generar otras especies reactivas (Hansberg, 2002).

El <sup>1</sup>O<sub>2</sub> se forma cuando uno de los dos electrones libres del O<sub>2</sub> capta energía y cambia de giro. Esta especie es muy reactiva y es capaz de reaccionar con la mayoría de las moléculas de la célula, principalmente DNA, proteínas y lípidos (Halliwell y Gutteridge, 1984; Hansberg, 2002).

Durante la respiración aeróbica una pequeña parte de los electrones que pasan por la cadena respiratoria salen de ésta y son captados por el O<sub>2</sub>. Cada una de estas reducciones es catalizada por una enzima de la cadena respiratoria que se encuentra asociada a la membrana de la célula. En la primera reducción el oxígeno capta un electrón y se forma el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, que es una especie poco reactiva ya que solo reacciona con quinonas (a una tasa importante), fenoles, el hierro libre o unido a proteínas (con los cúmulos de [Fe-S]) y con otros radicales como el óxido nítrico. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> reduce al Fe(III) en Fe<sup>2+</sup>, y puede reaccionar con el ascorbato pero no con el NAD(P)H, ni con el DNA, lípidos o los aminoácidos de las proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1984; Hansberg, 2002).

Al captar un segundo electrón O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se forma el ión peróxido (O<sub>2</sub><sup>2-</sup>) el cual no tiene electrones desapareados y no es un radical. A pH fisiológico el O<sub>2</sub><sup>2-</sup> es protonado para formarse el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Halliwell y Gutteridge, 1984). Esta reacción es llevada a cabo por la enzima superóxido dismutasa; aunque también algunas otras oxidasas pueden formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como la oxidasa de xantina, las oxidasas de aminoácidos, las oxidasas de hexosas y las de fenoles. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una especie poco reactiva y se difunde a través de la célula. Reacciona con el ascorbato pero

no con el NAD(P)H, ni con el DNA, lípidos y la mayoría de las proteínas (Hansberg, 2002).

El  $\cdot\text{OH}$  y el ión hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ) se forman cuando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el  $\text{Fe}^{2+}$  o el  $\text{Cu}^+$ . Esta reacción es conocida con el nombre de reacción de Fenton. El  $\text{HO}\cdot$  es inocuo ya que se protona y forma agua, sin embargo el  $\cdot\text{OH}$  es una de las moléculas más reactivas, dado que es oxidante y se difunde rápidamente, reacciona con cualquier compuesto de la célula (Halliwell y Gutteridge, 1984; Hansberg, 2002).

### 1.2.1.2. Daño producido por ROS.

Los blancos biológicos de las ROS son el DNA, RNA, las proteínas y los lípidos. Muchos de estos daños son causados por el radical hidroxilo formado en la reacción de Fenton.

Durante el estrés oxidativo los lípidos son el principal blanco de las ROS. Los radicales libres pueden atacar directamente a los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas e iniciar la peroxidación de lípidos. El efecto primario de la peroxidación es la disminución de la fluidez de la membrana, en la cual se alteran sus propiedades y además puede dañar a las proteínas que se encuentran unidas. Pero esto puede llevar a que se formen más radicales y los ácidos grasos poliinsaturados son degradados a una gran variedad de productos, como los aldehídos. Los aldehídos son muy reactivos y pueden dañar a las proteínas (Cabiscol *et al.*, 2000).

El daño que se provoca en el DNA depende de la presencia de hierro. Las ROS atacan las bases y la desoxirribosa de las cadenas nucleotídicas, produciendo 8-hidroxiguanina, la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5-metilcitosina en timina, además puede provocar el rompimiento de una o las dos hebras del DNA. El  $\text{HO}\cdot$  puede atacar tanto a las purinas como a las pirimidinas así como a la desoxirribosa, provocando la ruptura del DNA. Estas lesiones evitan que

algunas proteínas o algunas otras moléculas se unan al DNA, además la replicación del DNA puede dañarse (Fang, 2004; Cabiscol *et al.*, 2000).

El daño en las proteínas es generado principalmente por el  $\cdot\text{HO}$ . Puede provocar la oxidación de los grupos sulfhidrilo, reducción de los puentes disulfuro, oxidación de los aminoácidos (en particular los residuos de arginina, prolina o lisina, los cuales forman carbonilos) cercanos al sitio de unión del metal a través de la oxidación catalizada por un metal (MCO), reaccionar con aldehídos, modificar los grupos prostéticos o grupos metales, interacción proteína-proteína y fragmentación de péptidos (Cabiscol *et al.*, 2000; Fang, 2004).

Todas estas modificaciones son perjudiciales para la célula, ya que provocan la pérdida de la función de las membranas y las proteínas, bloquean la replicación del DNA o causan mutaciones.

### **1.2.1.3. Sistemas de defensa contra el estrés oxidativo por ROS.**

El daño provocado por las ROS es reparado a través de varios sistemas de defensa de la célula. Estos sistemas se dividen en mecanismos de detoxificación enzimática, moléculas antioxidantes encargadas de atrapar ROS, regulación de la obtención del hierro, mecanismos de respuesta genética a los ROS y los procesos de reparación del daño producido. Además hay otros mecanismos que ayudan a mantener el estado redox de la célula (Fang, 2004).

Mediante la detoxificación enzimática, las ROS son convertidas a especies menos tóxicas. Algunas de las principales enzimas que intervienen en estos procesos son las catalasas, la superóxido dismutasa y las peroxidasas. Se ha determinado que en algunas bacterias (como *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium bovis* y *Haemophilus influenzae*) estas proteínas son indispensables para la virulencia (Fang, 2004).

Algunas moléculas no enzimáticas ayudan a mantener un ambiente reductor intracelular, ya que atrapan o consumen el  $O_2$  libre. Estos antioxidantes son el NADPH y el NADH, el  $\beta$ -caroteno, el ácido ascórbico, el  $\alpha$ -tocoferol y el glutatión (Halliwell, 2006; Fang, 2004).

El hierro al reaccionar con el  $H_2O_2$  produce el  $\cdot HO$  el cual es muy tóxico. En los microorganismos existen sistemas que regulan la obtención de hierro para llevar a cabo su almacenamiento. La regulación se lleva a cabo a dos niveles: 1) la obtención es a través de receptores específicos en membrana. En bacterias y hongos el hierro se incorpora directamente como  $Fe^{2+}$  o como  $Fe(III)$  unido a sideróforos y se almacena en la ferritina. En *E. coli* y otras bacterias la proteína Fur une hierro y reprime la síntesis de las proteínas relacionadas con el metabolismo de éste. 2) Dentro de la célula dos proteínas, la bacterioferritina y ferritina, muy similar a la ferritina de los eucariotes, funcionan como ferroxidasa (Cabiscol *et al.*, 2000; Fang, 2004; Hansberg, 2002).

Además de los compuestos antioxidantes, en *E. coli* y otros microorganismos existe una respuesta genética por la presencia de ROS. El sistema SoxRS está involucrado en la respuesta contra el estrés oxidativo provocado por el  $O_2^{\cdot -}$  y por el monóxido de nitrógeno ( $NO^{\cdot}$ ), por otro lado la proteína OxyR responde a la presencia de  $H_2O_2$  (González-Flecha y Demple, 2005).

### **1.2.1.3.1. El sistema SoxRS en *Escherichia coli*.**

El sistema SoxRS se activa por la presencia del  $O_2^{\cdot -}$ , generado por agentes cíclicos redox como el paraquat (metil viológico, PQ) o la menadiona. La activación de este sistema lleva a cabo la expresión de un conjunto de genes que codifican para proteínas cuya función se encuentra involucrada en la protección y/o detoxificación del  $O_2^{\cdot -}$  (Tabla 2) (Walkup y Kogoma, 1989).

Tabla 2. Genes regulados por la proteína SoxS en presencia de superóxido en *E. coli*.

Gene	Producto
<i>sodA</i>	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
<i>nfo</i>	Endonucleasa IV
<i>zwf</i>	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
<i>fumC</i>	Fumarasa C
<i>acnA</i>	Aconitasa A
<i>tolC</i>	Proteína de membrana externa
<i>fur</i>	Represor global de genes para la adquisición de Fe
<i>micF</i>	Regulador del RNA de <i>ompF</i>
<i>agn43</i>	Proteína de membrana externa
<i>acrAB</i>	Bomba de salida de diversas drogas
<i>nfsA</i>	Nitroreductasa A
<i>fpr</i>	Ferredoxin/flavodoxin reductasa
<i>fldbA</i>	Flavodoxina
<i>fldB</i>	Flavodoxina
<i>ribA</i>	GTP ciclohidrolasa

La proteína SoxR (17 kDa) constitutiva en la célula pertenece a la familia de MetR de reguladores bacterianos, presenta un motivo de unión a DNA (hélice vuelta hélice) en el extremo amino. SoxR se encuentra como un homodímero y es el factor de transcripción del gen *soxS*. SoxR presenta un centro activo redox de [2Fe-2S] en cada subunidad. Cuando los centros metálicos están en forma reducida [2Fe-2S]<sup>+1</sup>, SoxR se encuentra en su forma inactiva, pero cuando estos centros se oxidan [2Fe-2S]<sup>+2</sup>, SoxR se encuentra en su forma activa (Figura 1) (Gaudu *et al.*, 1997).

Los genes *soxR* y *soxS* se encuentran arreglados divergentemente en *E. coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. SoxR en su forma inactiva se encuentra unida en la región intergénica entre estos dos genes, pero aunque se encuentre unida no activa la expresión de *soxS*, cuando SoxR se activa por la presencia de O<sub>2</sub><sup>-</sup> estimula la expresión del gen *soxS* y a su vez la expresión del regulón (Wu y Weiss, 1991; Storz y Zheng, 2000).

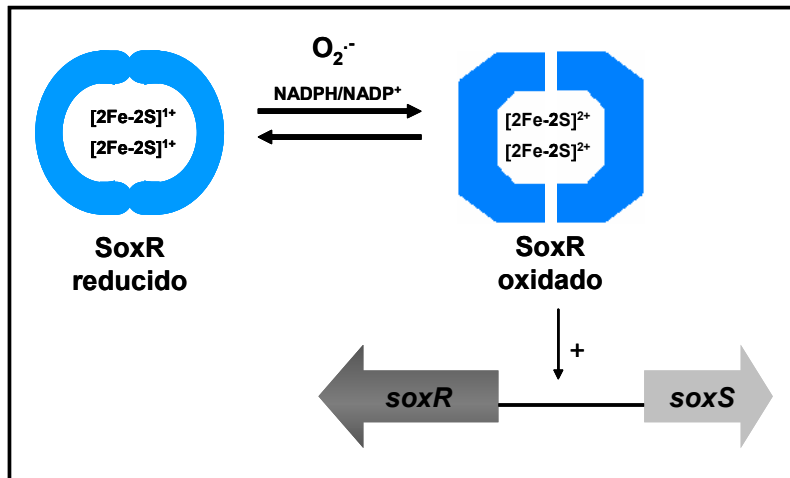


Figura 1. Mecanismo de activación del sistema SoxRS en *E. coli*.

La proteína SoxS (13 KDa) pertenece a la familia de reguladores transcripcionales tipo AraC/XylS y a la nueva familia de Rob y de otras pequeñas proteínas similares a SoxS. La activación del regulón depende de que la proteína SoxS se una a la región promotora de los genes blanco (Tabla 2) (Li y Demple, 1994), aumentando la unión de la RNA polimerasa para estimular la transcripción. La secuencia a la cual se une SoxS es una secuencia degenerada (AYNGCACNNWNNRYAAAYN, Martin y Rosmer, 2002), similar a la que se unen MarA y Rob, proteínas que pertenecen a la misma familia de activadores transcripcionales (González-Flecha y Demple, 2005; Storz y Zheng, 2000). El regulón SoxRS induce varias clases de genes relacionados con la defensa antioxidante, como *sodA*, *nfo*, *zwf*, *fpr*, *ribA* y *nfsA* y el metabolismo central como *fumC* y *acnA* (Tabla 2).

#### 1.2.1.3.2. El regulón OxyR.

Este regulón se encuentra involucrado en la respuesta al estrés oxidativo por el  $H_2O_2$ . OxyR es una proteína homotetramérica (34 kDa) que activa la transcripción del regulón. Esta proteína pertenece a la familia de reguladores bacterianos tipo LysR, el dominio de unión a DNA se localiza en su extremo amino (Storz y Zheng, 2000).

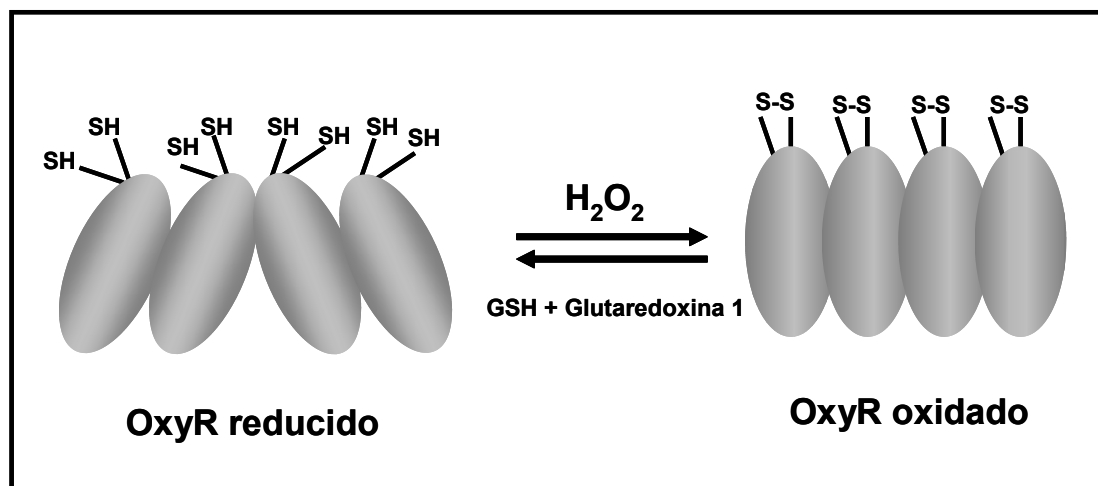


Figura 2. Mecanismo de activación de OxyR en *E. coli*.

OxyR puede encontrarse en estado oxidado o reducido, pero sólo la forma oxidada activa la transcripción de los genes blanco, involucrados en la defensa antioxidantes contra  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Tabla 3). La oxidación de OxyR ocasiona la formación de un puente disulfuro entre la cisteína 199 y la cisteína 208 (Figura 2). Mutaciones en cualquiera de estas dos cisteínas inhibe la capacidad de OxyR para percibir el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tanto las formas oxidadas como las reducidas se pueden unir al DNA. En su forma oxidada, OxyR reconoce la secuencia ATAGnt, en los cuatro surcos mayores continuos, mientras que en su forma reducida reconoce dos pares de surcos mayores separados por una vuelta (Storz y Zheng, 2000).

Tabla 3. Genes regulados por la proteína OxyR en presencia de peróxido de hidrógeno en *E. coli*.

Gene	Producto
<i>katG</i>	Hidroperoxidasa I
<i>ahpCF</i>	Alquil hidroperóxido reductasa
<i>fur</i>	Represor global de genes para la adquisición de Fe
<i>dps</i>	Proteína de unión no específica a ADN
<i>gorA</i>	Reductasa de glutatión
<i>grxA</i>	Glutaredoxina I
<i>fhuF</i>	Reductasa férrica
<i>oxyS</i>	RNA regulador pequeño



### 1.2.2. El estrés oxidativo generado por RNS.

#### 1.2.2.1. Producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS).

El monóxido de nitrógeno ( $\text{NO}^\cdot$ ), también conocido como óxido nítrico, es un gas incoloro relativamente soluble en agua, intermediario obligado del ciclo del nitrógeno. En las bacterias el  $\text{NO}^\cdot$  se forma en la respiración a través de la acción de varias nitrito reductasas y tal vez por la actividad de la  $\text{NO}^\cdot$  sintasa, homóloga a la enzima de los mamíferos que cataliza la oxidación de la L-arginina a  $\text{NO}^\cdot$  y citrulina en presencia de oxígeno. Es reducido a óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) por varias  $\text{NO}^\cdot$  reductasas (Poole, 2005).

El  $\text{NO}^\cdot$  es un radical porque tiene un electrón desapareado. Sin embargo al igual que el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  no es muy reactivo y se puede difundir. Reacciona lentamente con los grupos tioles o con los sulfhidrilos de algunas proteínas. Puede formar otros radicales mucho más oxidantes que el propio  $\text{NO}^\cdot$ , como el nitrato al reaccionar con el  $\text{O}_2$  y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) al reaccionar con el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Hansberg, 2002).

El  $\text{NO}^\cdot$  es una molécula de gran importancia en los sistemas biológicos, participa en sistemas de señalización. A concentraciones de  $10^{-7}$  M controla la presión sanguínea en los mamíferos y funciona como un mensajero en el sistema nervioso central y periférico. El  $\text{NO}^\cdot$  formado por el sistema inmune inhibe enzimas indispensables como las oxidasas terminales y otras hemoproteínas que unen oxígeno y enzimas con centros Fe-S como las aconitasas (Poole, 2005).

El  $\text{NO}^\cdot$  es un radical lipofílico que se difunde a través de la membrana y el citoplasma. Un gran rango de compuestos son usados para inducir el estrés nitrosativo, estos compuestos pueden variar en los efectos biológicos que provocan de acuerdo a su concentración, a la disponibilidad de oxígeno, de iones metal, pH, la reactividad a los nucleófilos y otras variables. El uso de S-nitrosotioles, nitroprusiato de sodio (SNP) y liberadores de  $\text{NO}^\cdot$  como los

NONOatos (diazeniumdiolato) y NOCs varía debido a la reacción promedio que presenta cada uno de estos compuestos, desde unos pocos minutos a algunas horas. El anión SNP  $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{2-}$ , con un grupo nitrosil  $\text{NO}^+$  a pH neutro, es el agente nitrosativo más frecuentemente usado como un liberador de  $\text{NO}^\cdot$ , pero esto puede ocurrir solo indirectamente a través de la nitración y un grupo tiolato (Poole, 2005).

### 1.2.2.2. Daño producido por RNS.

El peroxinitrito oxida los grupos sulfhidrilo de las proteínas y péptidos de bajo peso molecular, induce la peroxidación de lípidos en las membranas y causa la nitración de los residuos de tirosina de las proteínas para formar 3-nitrotirosina, la cual se considera un marcador de estrés nitrosativo (Beckman y Koppenol, 1996; Akura *et al.*, 2006). Se ha determinado que bajo condiciones fisiológicas el peroxinitrito reacciona rápidamente con las bases de guanina de los ácidos nucleicos para formar 8-nitrosoguanina (Akura *et al.*, 2006).

### 1.2.2.3. Sistemas de defensa contra el estrés oxidativo por RNS.

En defensa a la presencia de  $\text{NO}^\cdot$  los microorganismos han desarrollado mecanismos de defensas. Uno de los mecanismos de defensa son las proteínas que perciben el  $\text{NO}^\cdot$ . El sistema SoxRS también es inducido por la presencia de  $\text{NO}^\cdot$ . Recientemente se ha descrito que el  $\text{NO}^\cdot$  nitrosila los centros  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  de SoxR activando la transcripción del regulón (Ding y Demple, 2000).

#### 1.2.2.3.1. Las flavohemoglobinas.

Las flavohemoglobinas son proteínas presentes en los microorganismos involucradas en la defensa ante el estrés oxidativo por RNS. Existe evidencia de que la actividad de estas proteínas consume  $\text{NO}^\cdot$ , protegiendo procesos sensibles como la respiración. Por otra parte evidencia genética determinó que mutantes nulas de los genes que codifican para estas proteínas son esenciales para resistir contra el  $\text{NO}^\cdot$ . La expresión de estos genes son inducidos por el  $\text{NO}^\cdot$  y especies relacionadas. (Poole, 2005).

En *E. coli* la flavohemoglobina Hmp (codificada por el gen *hmp*) es un monómero de 44 kDa. El extremo N-terminal presenta un dominio hemo con 46% de identidad a la secuencia de la hemoglobina Vgb de *Vitreoscilla*. El extremo C-terminal es similar a la ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductasa, presentando sitios altamente conservados de unión a FAD y NAD(P)H (Wu *et al.*, 2004).

La inducción de la transcripción del gen *hmp* por NO<sup>•</sup>, SNP, GSNO (S-nitrosoglutatión) fue la primera evidencia genética de que las flavohemoglobinas están involucradas en la protección al NO<sup>•</sup> (Poole, 1996). Otras observaciones fueron que: 1) mutantes nulas en el gen *hmp* de *Salmonella* y *E. coli* son hipersensibles a GSNO y a macrófagos; 2) el grupo hemo de Hmp es reducido por sustratos fisiológicos (NAD(P)H) a través de la transferencia de electrones de FAD; 3) en ausencia de oxígeno Hmp reduce el NO<sup>•</sup> a NO<sup>-</sup> y posteriormente se forma óxido nitroso (Poole, 2005); 4) por medio de perfiles transcripcionales del genoma de varias bacterias se ha observado la inducción consistente del gen *hmp* en cultivos de *E. coli* expuestos a NO<sup>•</sup> y agentes nitrosativos en condiciones aeróbicas (Mukhopadhyay *et al.*, 2004) y anaeróbicas (Justino *et al.*, 2005), además se ha observado lo mismo en *Bacillus subtilis* (Moore *et al.*, 2004) y *Pseudomonas aeruginosa* (Firoved *et al.*, 2004).

### 1.2.2.3.2. La flavorubredoxina NorVW

En *E. coli* existe otro mecanismo para reducir y detoxificar a la célula del NO<sup>•</sup> bajo condiciones anaeróbicas, en este sistema se encuentra involucrada la proteína llamada flavorubredoxina (FlavoRb). Esta proteína tiene una actividad de NO<sup>•</sup> reductasa (Gardner *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2002). FlavoRb es un miembro de la familia de flavoproteínas tipo A presente en una gran variedad de procariotes, arqueas filogenéticamente y metabólicamente diversas, bacterias anaeróbicas facultativas y estrictas, cianobacterias fotosintéticas, organismos fijadores de nitrógeno y bacterias. Esta familia de enzimas tienen en común dos dominios que se encuentran conservados, un dominio similar a la β-lactamasa en el N-terminal, que presenta un sitio catalítico difierro y un dominio flavodoxin con

un sitio FMN. La enzima FlavoRb de *E. coli* presenta un dominio extra en el C-terminal que presenta un centro similar a la rubredoxina (da Costa *et al.*, 2003).

La FlavoRb es codificada por el gen *norV* (*ygaK*, b2710), hacia la región 3' de este gen se encuentra el gen *norW* (*ygbD*, b2711) que codifica para una NADH oxidoreductasa que tiene un dominio FAD, esta proteína se encarga de reducir a la FlavoRb a expensas de NADH. Por ensayos de RT-PCR se encontró que *norV* y *norW* forman un operón (daCosta *et al.*, 2003). Adyacente a este operón y divergentemente transcrito se encuentra en gen *norR* (*ygaA*, b2709), que codifica para un regulador transcripcional dependiente del factor sigma 54 en *E. coli*. Esta proteína es muy similar a la proteína NorR de *Ralstonia eutropha*, la cual funciona como un regulador transcripcional de la NO<sup>-</sup> reductasa *b3* en presencia de NO<sup>-</sup> (da Costa *et al.*, 2003). La proteína NorR esta organizada en tres dominios: un dominio GAF en el N-terminal al cual pueden unirse pequeñas moléculas, un dominio central que puede interactuar con la RNA polimerasa y puede llevar a cabo hidrólisis de ATP y un dominio de unión a DNA en el C-terminal (Hutchings *et al.*, 2002).

Existe evidencia de que NorR es el regulador transcripcional del operón *norVW*, realizando una fusión de la región promotora del gen *norV* con el gen *lacZ* como monitor de expresión, Hutchings y colaboradores (2002) determinaron que bajo condiciones anaeróbicas el promotor *norV* es activado por la presencia SNP, de modo completamente dependiente de NorR (Hutchings *et al.*, 2002). Ya que en la secuencia promotora de los genes *norVW* se encuentra la secuencia para la unión a sigma 54 se ha propuesto que esta inducción también es dependiente de este factor (Gardner *et al.*, 2003).

En el 2005 D'Autréaux y colaboradores reportaron el mecanismo de percepción del NO<sup>-</sup> que utiliza NorR para activar la transcripción de la FlavoRb, y su reductasa para poder reducir el NO<sup>-</sup> a óxido nítrico (D'Autréaux *et al.*, 2005).

Debido a que el operón *norVW* es un sistema eficiente para reducir NO<sup>·</sup> en ausencia de oxígeno se ha reportado que mutantes en el operón o en su regulador son más sensibles a la presencia del SNP que una cepa silvestre bajo condiciones anaeróbicas, sin embargo en presencia de oxígeno no se ha observado la misma sensibilidad (Gardner *et al.*, 2002).

### **1.3. LAS HEMOGLOBINAS BACTERIANAS Y SU PAPEL EN EL ESTRÉS NITROSATIVO (ARTICULO DE REVISIÓN).**

## GENÉTICA MOLECULAR DE LAS HEMOGLOBINAS BACTERIANAS: ESTRUCTURA, REGULACIÓN Y FUNCIÓN

Elizabeth Hernández-Urzúa\* y Jorge Membrillo-Hernández\*\*

Lab. de Microbiología y Genética Molecular, Depto. de Biología Molecular y Biotecnología,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. C.P. 04510, México, D.F.

E-mail: \*elyzabet@correo.unam.mx; \*\*jmh@biomedicas.unam.mx

### RESUMEN

Las hemoglobinas se definen como aquellas hemoproteínas que unen reversiblemente el oxígeno. Estas proteínas se encuentran distribuidas en plantas, protozoarios, hongos y bacterias. Las hemoglobinas presentes en los microorganismos se han dividido en tres grupos. En el primer grupo se encuentran aquellas hemoproteínas que presentan un solo dominio con el grupo hemo, por ejemplo la hemoglobina de *Vitreoscilla*. En el segundo se encuentran aquellas hemoglobinas que presentan dos diferentes dominios, el primer dominio con el grupo hemo el cual es homólogo a la hemoglobina de *Vitreoscilla* y un segundo dominio con actividad de reductasa el cual es homólogo a la familia de las proteínas ferredoxina NADP reductasas (FNR), a éstas hemoglobinas se les conoce como flavohemoglobinas, un ejemplo es Hmp, la flavohemoglobina de *Escherichia coli*, ésta fue la primera flavohemoglobina estudiada a nivel molecular. En el tercer grupo se encuentran las hemoglobinas truncadas, éstas son proteínas pequeñas de 20 a 30 aminoácidos en donde se encuentra el dominio hemo. Poco se sabe acerca de la función de estas hemoglobinas, pero se ha reportado su participación en la protección y detoxificación del óxido nítrico.

**Palabras Clave:** Flavohemoglobina, hemoglobina, hmp, óxido nítrico, vgb.

### ABSTRACT

Haemoglobins are defined as haemoproteins that reversibly bind oxygen. They are present in all organisms, plants, protozoa, fungi and bacteria. Haemoglobins can be classified into three groups. The first group comprises haemoproteins with only one domain, for example, the haemoglobin of *Vitreoscilla*. The second group includes haemoglobins with two different domains, a haemo domain homologous to the *Vitreoscilla* haemoglobin and a domain homologous to the family of ferredoxin NADP reductases (FNR). The third group consists of truncated haemoglobins. These proteins are 20 to 30 amino acids long with a haemo group. Their function is not well known, but they have been reported to participate in the protection and detoxification of nitric oxide.

**Key Words:** Flavohaemoglobin, haemoglobin, hmp, nitric oxide, vgb.

### INTRODUCCIÓN

Las hemoglobinas se definen como aquellas hemoproteínas que pueden unir reversiblemente el oxígeno, estas globinas son una familia de proteínas ancestrales que se encuentran distribuidas en diferentes organismos incluyendo plantas, protozoarios, hongos y bacterias (Figura 1). En la secuencia de estas hemoproteínas se encuentran dos aminoácidos conservados, una histidina la cual forma un enlace covalente en el dominio hemo con el hierro y una fenilalanina que se encuentra formando una asa entre la hélice C y D de la proteína

formando una especie de bolsillo para el dominio hemo<sup>1</sup>.

Por mucho tiempo se pensó que las hemoglobinas sólo se encontraban presentes en organismos superiores, en 1953 Keilin fue el primero en sugerir la presencia de estas proteínas en microorganismos<sup>2</sup>, sin embargo, hasta 1986 se demostró por evidencia molecular la presencia de una hemoglobina en la bacteria *Vitreoscilla*<sup>3</sup>.

A la fecha, las hemoglobinas presentes en los microorganismos se han dividido en tres grupos. En el primer grupo se encuentran aquellas hemoproteínas que presentan un solo dominio, el cual comprende al grupo hemo, ejemplos de microorganismos que

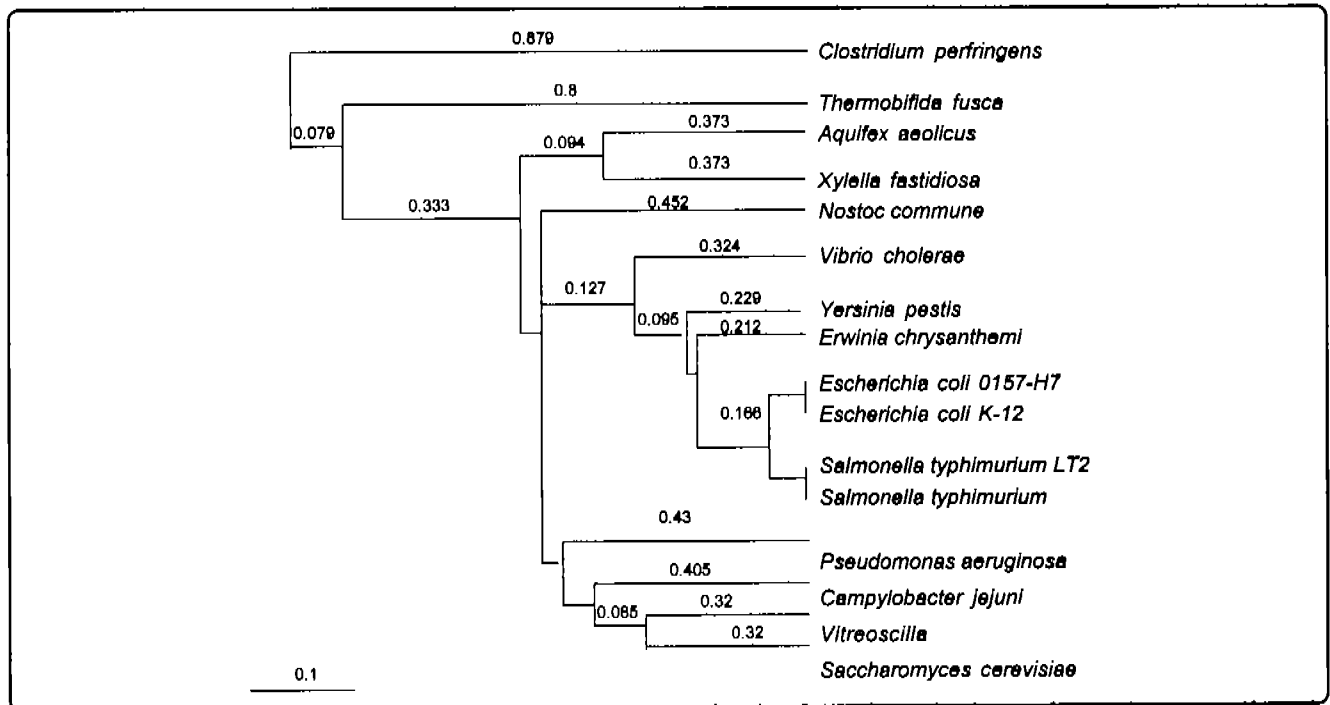


Figura 1. Árbol filogenético de algunas hemoglobinas bacterianas usando Parsimonia (PAUP).

presentan estas proteínas son, *Vitreoscilla*<sup>3</sup>, *Campylobacter jejuni*, *Nostoc commune*, *Paramecium caudatum*, *Tetrahymena pyriformis*, y *Tetrahymena thermophila*<sup>4</sup>. En el segundo grupo se encuentran las hemoproteínas que tienen dos diferentes dominios, el primer dominio el cual comprende al grupo hemo homólogo a la hemoglobina de *Vitreoscilla* y un segundo dominio con actividad de reductasa homólogo a la familia de las proteínas ferredoxina NADP reductasas (FNR), en el cual se reconocen sitios de unión para FAD y NAD(P)H, estas proteínas son llamadas flavohemoglobinas<sup>1</sup>, estas proteínas se encuentran muy distribuidas en bacterias como *Ralstonia eutropha* (antes *Alcaligenes eutrophus*)<sup>5</sup>, *Bacillus subtilis*<sup>6</sup>, *Erwinia chrysanthemi*<sup>7</sup>, *Escherichia coli*<sup>8</sup>, *Mycobacterium tuberculosis*<sup>9</sup>, *Salmonella typhimurium*<sup>10</sup> y en levaduras como *Candida norvegensis*<sup>11</sup> y *Saccharomyces cerevisiae*<sup>12</sup> (Tabla I).

Recientemente se describió otra clase de hemoproteínas llamadas hemoglobinas truncadas (TrHbs). El análisis filogenético de estas proteínas indica que las TrHbs se encuentran formando un grupo distinto a las hemoglobinas, constituyendo una nueva familia de pequeñas proteínas con un tamaño de 20 a 30 aminoácidos y que se encuentran ampliamente distribuidas en eubacterias, cianobacterias, protozoarios y plantas<sup>13</sup>. La primera TrHb fue descrita en 1989 en *Paramecium caudatum*<sup>14</sup>. A la fecha se han identificado más de 40 genes de TrHbs. Un dato importante es que estas hemoproteínas comúnmente se encuentran coexistiendo con las flavohemoglobinas en el mismo organismo, lo cual sugiere funciones distintas de cada una. De acuerdo a su relación filogenética estas proteínas se han

dividido en tres grupos (grupo I, II y III), dentro del grupo I se encuentran las TrHbs de *Mycobacterium tuberculosis*, las de las cianobacterias *Synechocystis* y *Nostoc commune*, la del alga unicelular *Chlamydomonas eugametos* y el protozoario *Paramecium*, en el grupo II se encuentran dos TrHb en *M. tuberculosis* y las globinas de *S. aureus* y *B. pertussis*; poco se conoce sobre el grupo III<sup>13</sup>. La regulación de la expresión de las TrHbs no es conocida pero se sabe que en *C. eugametos* es inducida en respuesta a la activación de la fotosíntesis y se localiza a lo largo de la membrana del cloroplasto; por otra parte en *Nostoc commune* la TrHb se encuentra en el citoplasma y se induce sólo en condiciones anaeróbicas<sup>15,16</sup>. También se ha sugerido que las TrHbs protegen a la bacteria *M. tuberculosis* del óxido nítrico (NO) generado por la óxido nítrico sintasa II de los macrófagos en los procesos de infección<sup>17</sup>.

Poco se sabe acerca de la función fisiológica y bioquímica de las hemoglobinas en microorganismos, se han propuesto varias funciones, inicialmente se pensó que podrían estar participando en el transporte y almacenamiento de oxígeno, así también, se sugirió que podrían tener funciones de sensor o tal vez como una proteína que participara en diferentes estreses ambientales. Una de las funciones propuestas para la hemoglobina Vhb de *Vitreoscilla* fue su participación para el mejoramiento de la transferencia de oxígeno a bajas tensiones de éste<sup>18,19</sup>. Recientemente se reportó su papel en la protección y detoxificación del NO. En *Escherichia coli*, el gen *hmp*, [el primer gen clonado y secuenciado de hemoglobinas bacterianas<sup>8</sup>], es inducido por la presencia de NO<sup>20</sup> y liberadores

Grupo I Hemoglobinas (un solo dominio)	Grupo II Flavohemoglobinas (dos dominios)	Grupo III Hemoglobinas Truncadas
<p><b>Bacterias</b> <i>Vitreoscilla</i> <i>Campylobacter jejuni</i></p> <p><b>Cianobacterias</b> <i>Nostoc commune</i></p> <p><b>Protozoarios</b> <i>Paramecium caudatum</i> <i>Tetrahymena pyriformis</i> <i>Tetrahymena thermophila</i></p>	<p><b>Bacterias</b> <i>Ralstonia eutrophus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Erwinia chrysanthemi</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Rhizobium meliloti</i></p> <p><b>Levaduras</b> <i>Candida norvegensis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	<p><b>Bacterias</b> <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p> <p><b>Cianobacterias</b> <i>Synechocystis</i> <i>Nostoc commune</i></p> <p><b>Protozoarios</b> <i>Paramecium caudatum</i></p>

Tabla 1. Hemoglobinas y flavohemoglobinas de microorganismos. Ejemplos de los tres grupos de hemoglobinas presentes en microorganismos.

de éste como S-nitrosoglutatión (GSNO) y nitroprusiato de sodio (SNP)<sup>21</sup>.

### HEMOGLOBINAS Y FLAVOHEMOGLOBINAS

#### La hemoglobina VHb de *Vitreoscilla*

VHb es una proteína homodimérica de 15.7 kDa que une oxígeno, ésta es la proteína mejor caracterizada del grupo I de hemoglobinas bacterianas. El gen *vgb* que codifica para esta proteína ha sido clonado y expresado en *Escherichia coli* bajo el control de su propio promotor<sup>3,22</sup>.

Estudios para saber la distribución de esta proteína para lo cual fue expresada en *Escherichia coli*, presentaron que la mayor localización es en el espacio citoplásmico y un 40% es en el espacio periplásmico, además la exportación de la proteína al periplasma se debe a la presencia de una secuencia de 16 aminoácidos en la secuencia amino-terminal<sup>23</sup>. Recientemente se realizó la localización de VHb por microscopía electrónica marcando a la proteína con partículas de oro en células de *Vitreoscilla* y en células recombinantes de *E. coli*, los resultados mostraron a VHb principalmente localizada en el espacio citoplásmico cerca de la membrana<sup>24</sup>.

La estructura tridimensional de esta proteína se ha resuelto por cristalografía de rayos X, y se ha observado que adopta la forma clásica de las globinas, el grupo hemo se encuentra dentro de una caverna hidrofóbica formada por las hélices B, C, E, F, G y H de la proteína. Una gran diferencia de las hemoglobinas de bacterias con respecto a los hemoglobinas de mamíferos es la ausencia de la hélice D<sup>25</sup>.

Por otra parte, se describió la presencia de una proteína flavín reductasa que copurifica con VHb en *Vitreoscilla*, esto sugiere el ensamble *in vivo* de estas dos proteínas mediante un enlace no covalente produciendo una proteína híbrida muy similar a las

flavohemoglobinas<sup>26,27</sup>.

La máxima expresión del gen *vgb* se observa en condiciones bajas de oxígeno, el promotor de gen (*Pvgb*) de esta hemoglobina es inducido cuando los niveles de oxígeno son menores al 2% de saturación<sup>28,29</sup>. *vgb* es regulado positivamente por cAMP-CRP y FNR, ya que mutantes en los genes *cya* y *fnr* en células recombinantes de *E. coli* reducen los niveles de expresión de este gen. El sitio de unión de CRP en la secuencia promotora del gen *vgb* se encuentra alrededor de la base -97, mientras que, para FNR se han reportado dos secuencias, la primera reportada por Tsai *et al.*, la cual, se encuentra centrada alrededor de la base -41.5 y la segunda reportada por Joshi y Dikshit localizada alrededor de -25.5, esto nos indica que en *E. coli* FNR y CRP se unen a dos sitios diferentes en el promotor del gen *vgb*<sup>29,30,31</sup>. Un tercer mecanismo de regulación se ha observado en presencia de fuentes de nitrógeno complejas en el medio, como extracto de levadura, sin embargo, este mecanismo aún no ha sido estudiado con detalle<sup>32</sup>.

Basados en las propiedades de unión al oxígeno y a la síntesis dependiente de oxígeno, VHb es inducido bajo condiciones hipóxicas, esto sugiere que la función primaria de esta proteína es atrapar el oxígeno y facilitar su transferencia a las vías respiratorias y así permitir a *Vitreoscilla* sobrevivir bajo estas condiciones, ya que es un microorganismo aerobio estricto<sup>33, 34</sup>.

Se ha demostrado que la expresión de VHb en varias especies de microorganismos de importancia biotecnológica como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii*, *Rhizobium etli*, *Streptomyces* sp., *Serratia marcescens* y *Burkholderia* sp. y en plantas como el tabaco, da lugar a un incremento en la densidad celular, en el metabolismo oxidativo, la formación de productos secundarios y en procesos



de biorremediación especialmente bajo condiciones de microaerofilia. Por ejemplo, en células recombinantes de *E. coli* y *Pseudomonas* se incrementa la densidad celular<sup>34,35,36,37</sup>, la producción de  $\alpha$ -amilasa en *E. coli*<sup>38</sup> y cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum*<sup>39</sup>. En otros estudios se ha observado que VHb incrementa la degradación de desechos tóxicos como el ácido benzoico y de 2,4-dinitrotolueno en *Pseudomonas* y *Burkholdelia* respectivamente<sup>40,41</sup>, y mejora las propiedades de fijación de nitrógeno en *Rhizobium etli*<sup>42</sup>.

Recientemente se reveló que VHb protege a las células del estrés nitrosativo, ya que en células recombinantes de *E. coli*, la respiración fue protegida por la presencia de VHb en células tratadas con 10 mM de NO, mientras que a 20 mM de NO hubo una reducción de más del 50 % de la respiración<sup>43,24</sup>. En 2003 en nuestro laboratorio se reportó que VHb expresada en una mutante *hmp* de *E. coli*, puede proteger la respiración sensible por la presencia de SNP (donador de óxido nítrico)<sup>44</sup>. Sin embargo, Frey *et al.* analizando el efecto de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y RNS respectivamente) en la inducción de *vgb*, observaron que no hay un aumento en la expresión de *vgb* por la presencia de ROS o RNS<sup>45</sup>.

**La flavohemoglobina Hmp de *Escherichia coli***

Hmp de *Escherichia coli* es la hemoglobina mejor estudiada del grupo de las flavohemoglobinas, sin embargo, no fue la primera hemoglobina descrita, en los años treinta Oshino *et al.* purificaron una proteína de levadura semejante a las hemoglobinas y describieron características importantes de sus propiedades<sup>46</sup>. En bacterias el primer ejemplo fue la proteína de *R. eutropha*, esta proteína fue inicialmente identificada como un citocromo tipo b en el espacio citoplasmático y subsecuentemente descrita como una flavohemoglobina con base en los análisis de la proteína purificada<sup>47</sup>.

El primer gen identificado de flavohemoglobinas bacterianas fue el gen *hmp* de *E. coli*, Vasudevan *et al.* clonaron el gen del minuto 57.7 del cromosoma de *E. coli*, este gen codifica para una proteína de 44 kDa con características espectrales similares a las de la hemoglobina de *Vitreoscilla*<sup>8</sup> (Figura 2). El gen *hmp* se encuentra flanqueado por los genes *glyA*, que codifica para la serina hidroximetil transferasa y *glnB*, que codifica para la proteína PII involucrada en la regulación de la actividad de la glutamino sintetasa<sup>48,49</sup>. Hmp pertenece al grupo de hemoglobinas bacterianas que presentan dos dominios con 396 aminoácidos. En el extremo amino terminal compuesto por 144 aminoácidos se encuentra el dominio hemo el cual tiene 45% de identidad y 67% de similitud con la secuencia de la proteína VHb de *Vitreoscilla* y en el carboxilo terminal se encuentra el dominio flavín reductasa, el cual es similar a la familia de ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductasas, presenta 81% de similitud al dominio reductasa de FNR<sup>8,50</sup>.

Por medio de análisis espectrales de fracciones subcelulares de una cepa de *E. coli* que sobreexpresa al gen *hmp*, se observó que el 86% de esta proteína se localiza en el citoplasma y 14 % en el periplasma<sup>51</sup>.

La estructura de esta proteína se determinó por cristalografía de rayos X y al igual que la hemoglobina VHb, el dominio hemo adopta la forma clásica de globinas<sup>25,52</sup> (Figura 2).

Stevanin *et al.* en el 2000 propusieron que tal vez Hmp se encuentre en forma dimérica *in vivo*, ellos analizaron la unión del cianuro a la proteína pura observando un efecto de cooperatividad a diferencia de la hemoglobina de *Vitreoscilla* la cual es un homodímero y la proteína férrica presenta anti-cooperatividad<sup>53</sup>.

El dominio flavín reductasa de Hmp y de otras flavohemoglobinas presenta sitios de unión para NAD(P)H y para FAD. Este

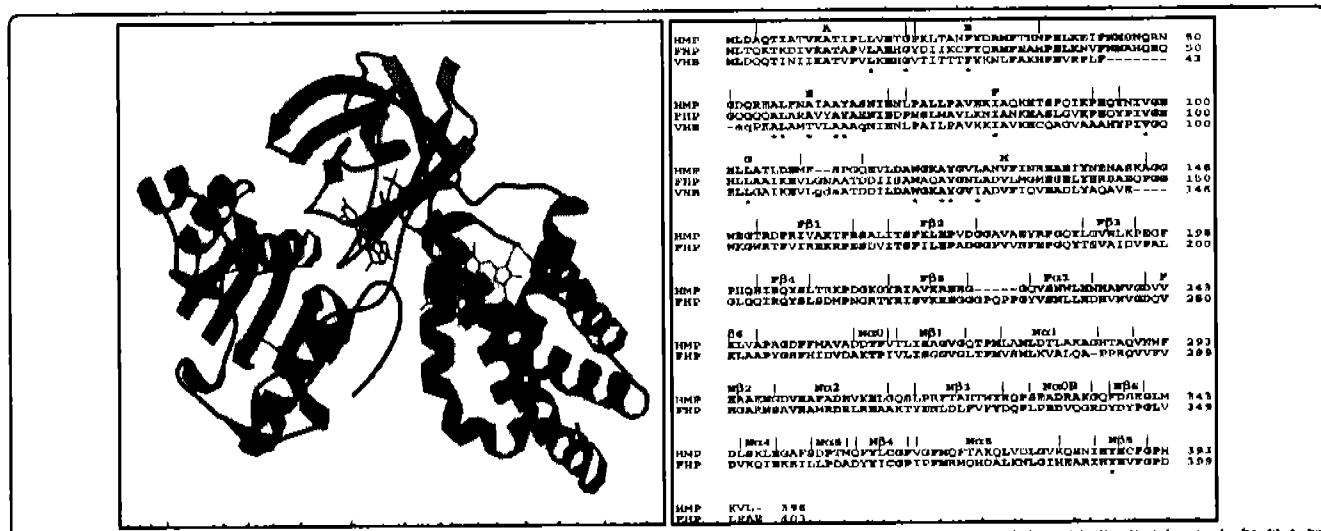


Figura 2. Estructura de la flavohemoglobina Hmp de *Escherichia coli* y la homología de su grupo hemo con la hemoglobina de *Vitreoscilla*<sup>52</sup>.

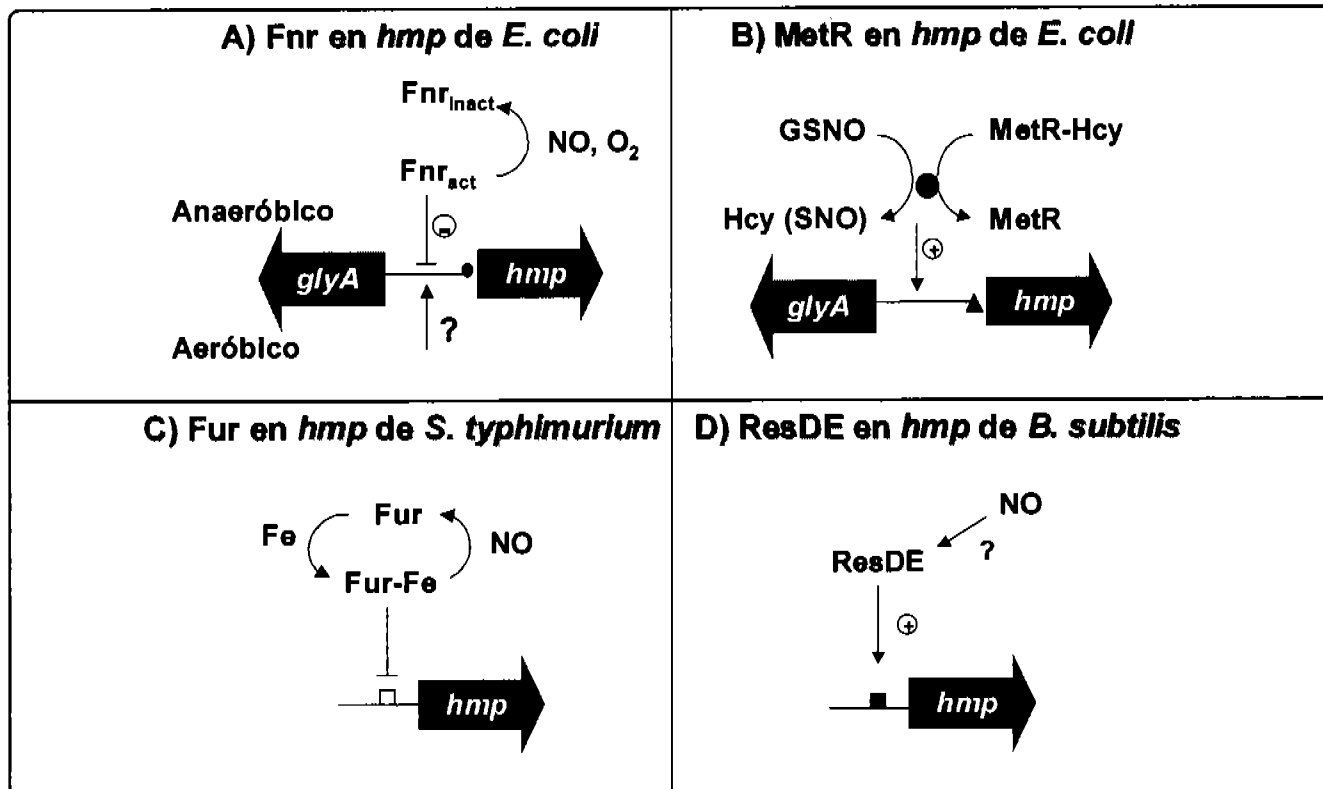


Figura 3. Regulación del gen *hmp* de *Escherichia coli*. A) Regulación del gen *hmp* de *Escherichia coli* por Fnr<sup>27</sup>. B) Regulación del gen *hmp* de *Escherichia coli* por MetR<sup>21</sup>. C) Regulación del gen *hmp* de *Salmonella enterica* por Fur<sup>65</sup>. D) Regulación del gen *hmp* de *Bacillus subtilis* por el sistema ResDE<sup>69</sup>.

dominio pertenece a la familia de ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductasas, y se puede subdividir en dos subdominios independientes estructural y funcionalmente, un subdominio de unión a FAD, el cual, se encuentra del residuo 151 al 251 y un subdominio de unión a NAD(P)H que se encuentra del residuo 259 al 396. El hemo y el dominio FAD se aproximan a una distancia mínima de 5.9 Å promoviendo la transferencia de electrones del FAD al hemo en un ambiente predominantemente polar dado por varias cadenas de aminoácidos. En el subdominio de unión a FAD se han identificado varios aminoácidos conservados: tirosina (Tyr) 206, glutamato (Glu) 388, glutamina (Gln) 205, arginina (Arg) 204, Tyr 206 y serina (Ser) 207 y en el subdominio de unión a NAD el Glu 388 está muy conservado<sup>52</sup>.

Para determinar la posible función de Hmp se realizaron análisis de la expresión genética del gen midiendo la actividad transcripcional de la fusión cromosomal de la región promotora del gen *hmp* con un gen monitor como *lacZ*. Poole *et al.* analizaron la expresión de *hmp* bajo diferentes condiciones de crecimiento, observaron que en una mutante *fnr*, (gen que codifica para la proteína FNR que regula la expresión de genes necesarios de anaerobiosis), en condiciones de anaerobiosis y en presencia de agentes donadores de NO, la expresión del gen *hmp* se induce, sugiriendo que FNR es un regulador negativo de la expresión del gen durante condiciones anaeróbicas, sin

embargo, ellos argumentan que debe de existir otro factor diferente que regula la expresión del gen bajo condiciones aeróbicas<sup>20</sup>. Por ensayos de protección de la DNasa I y geles de retardo se demostró que el promotor del gen *hmp* presenta un sitio de unión para la proteína FNR ubicado entre la base -2 y +11<sup>20,54</sup>. Además, se ha demostrado que la represión ejercida por FNR sobre *hmp* es por la inhibición que sufre FNR al nitrosilarse por la presencia del NO<sup>54</sup> (Figura 3). Por otra parte, también se observó que *hmp* es inducido por la presencia de nitrato, nitrito y NO independiente de los factores de regulación NarLP, reguladores de genes que participan en la respiración anaeróbica en presencia de nitrato y nitrito como aceptores de electrones, y SoxRS, sistema global de regulación de la respuesta al estrés oxidativo en *E. coli*<sup>20</sup>.

La expresión de *hmp* también se observa disminuida en la fase de crecimiento exponencial en comparación con la fase de crecimiento estacionaria en donde se observa un aumento de dos veces, esta inducción está mediada por el factor sigma S de la RNA polimerasa<sup>55</sup>.

Además de FNR existen otros factores involucrados en la regulación de la expresión del gen *hmp* en respuesta al estrés oxidativo. Se ha reportado que la sobreexpresión de Hmp es capaz de generar superóxido<sup>56</sup>. Por otra parte, nuestro laboratorio

reportó en 1999 que una mutante en el gen *hmp* (*hmp::Tn5*) es hipersensible a los donadores de NO como SNP (nitroprusiato de sodio) y GSNO (S-nitrosoglutatión)<sup>57</sup>. También se reportó que la fusión  $\Phi$ (*hmp-lacZ*) es inducible por la presencia de 200  $\mu$ M del radical Paraquat (metil viológeno), en este mismo estudio, se usaron otros generadores de superóxido como la menadiona, plumbagina y el metazulfato de fenazina, pero éstos no indujeron la expresión del gen *hmp*, quizás debido a las diferencias en el potencial redox<sup>58</sup>.

Por otra parte, se ha reportado que *hmp* es inducible por NO dependiente de la proteína MetR, la cual, es un regulador global de la vía de la biosíntesis de metionina en *E. coli*, MetR también es el factor transcripcional responsable de la expresión del gen *glyA*, que se encuentra en la región 5' del gen *hmp* y en dirección opuesta compartiendo la región reguladora. En la región intergénica entre *hmp-glyA* se localizan dos sitios de unión para MetR, el sitio dos se centra a -121 bases y el sitio uno a -143 bases con respecto al sitio de inicio de la transcripción de *glyA* y a -104 y -75 con respecto al sitio de inicio de la transcripción de *hmp*. La homocisteína (Hcy) tiene un efecto positivo en la regulación mediada por MetR, es decir, si no hay Hcy en el medio MetR se une preferentemente al sitio uno, que se encuentra más próximo al gen *hmp*, por el contrario, en presencia de Hcy, MetR se une a los dos sitios, pero la afinidad por el sitio dos es mayor que por el sitio uno. Cuando MetR sólo se une al sitio uno, actúa como un represor de la expresión del gen *glyA*. En este artículo se demuestra que sólo la presencia del sitio uno de unión a MetR (sitio dos deletado), es indispensable para la inducción del gen *hmp* en presencia de SNP y GSNO. La inactivación de la homocisteína puede ocurrir por la reacción de nitrosilación<sup>21</sup> (Figura 3).

Un mecanismo similar al de FNR se describió en el 2002 por D'Autreaux y colaboradores para Fur, el regulador global para la obtención de hierro, ellos reportan que la actividad de Fur se ve afectada por la presencia de concentraciones micromolares de NO, formándose el complejo FeFur-NO, el cual, no puede unirse al DNA<sup>39</sup>. Además, Fur regula la transcripción de *hmp* en *Salmonella*<sup>10</sup> (Figura 3). En *E. coli* el quelante de hierro 2'2'-dipiridilo induce la transcripción de *hmp* en condiciones aeróbicas y anaeróbicas<sup>20</sup>.

La inducción de la expresión del gen *hmp* bajo condiciones de estrés oxidativo por superóxido y por la presencia de agentes donadores de NO involucran a las flavohemoglobinas en la protección al estrés, sin embargo, hasta el día de hoy el mecanismo por el cual las bacterias perciben el NO y especies reactivas relacionadas no se conoce. En *Erwinia chrysanthemi* se reportó que la expresión de la flavohemoglobina HmpX es importante para la patogénesis de esta bacteria en plantas<sup>7</sup>.

La proteína Hmp presenta dos actividades en la detoxificación del NO dependiendo de la disponibilidad de oxígeno,

aeróbicamente Hmp detoxifica a las células del NO actuando como una NO dioxigenasa<sup>60,61,62</sup> o desnitrosilasa catalizando la reacción de NO a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrito)<sup>63</sup>, anaeróbicamente Hmp tiene actividad de NO reductasa catalizando la reacción de NO a N<sub>2</sub>O (óxido nitroso)<sup>64</sup> (Tabla II).

Recientemente nuestro laboratorio reportó la importancia de ambos dominios de la flavohemoglobina Hmp (hemo y flavín) en la protección de la respiración inhibida por NO en *E. coli*<sup>44</sup>.

### Otras flavohemoglobinas

Se ha reportado la presencia de flavohemoglobinas en otras bacterias, con funciones similares en la protección al NO como Hmp.

### HMP DE *Salmonella enterica* SEROVAR TYPHIMURIUM

La flavohemoglobina de *Salmonella* es 94% idéntica a la secuencia de Hmp de *E. coli*. Analizando la expresión de una fusión  $\Phi$ (*hmp-lacZ*) en *Salmonella* se determinó que la expresión de *hmp* en respuesta al NO es independiente de SoxS, OxyR y FNR bajo condiciones aeróbicas, sin embargo, en una mutante *fur*, gen que codifica para la proteína Fur responsable de la regulación de genes involucrados en la obtención de hierro, la expresión de la fusión  $\Phi$ (*hmp-lacZ*) fue inducida, además de que una secuencia de unión a Fur fue identificada en el promotor del gen *hmp* de *Salmonella*<sup>10,65</sup>. Por otra parte, se sabe que los genes reprimidos por Fur son inducidos por la presencia de NO, ya que el NO inactiva a este factor transcripcional<sup>59</sup>.

En células de *Salmonella*, Hmp provee protección a la presencia del NO producido por macrófagos humanos, por lo que células mutadas en el gen *hmp* son más sensibles a la muerte mediada por los macrófagos<sup>66</sup>.

### FHP DE *Ralstonia eutropha*

En esta bacteria desnitrificante, la expresión de la flavohemoglobina *fhp* se induce 20 veces bajo condiciones limitadas de oxígeno<sup>67</sup>. Dos sitios de unión a NarL (centrada alrededor de la base -108) y uno a FNR (centrada alrededor de la base -86), se encuentran en la región reguladora de este gen, sugiriendo el papel de este gen en el metabolismo anaeróbico. Mutantes en el gen *fhp* no presentaron diferencias en el crecimiento aeróbico, pero esta mutante no acumuló N<sub>2</sub>O durante la desnitrificación con nitrato como único aceptor de electrones<sup>5</sup>. La expresión de FHP en *E. coli* incrementa la resistencia al estrés nitrosativo, demostrando que esta proteína puede proteger a *R. eutropha* del NO, sin embargo, la concentración intracelular de NO en el proceso de desnitrificación en esta bacterias es controlada por las NO reductasas, por lo tanto, no es claro si la actividad detoxificante de FHP está afectada bajo condiciones desnitrificantes<sup>43</sup>.

### HMP DE *Bacillus subtilis*

Bajo condiciones de anaerobiosis con nitrato como único aceptor

de electrones, se observó inducción de la expresión de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  de *B. subtilis*. FNR actúa como un inductor de la expresión de *hmp* dependiente de los reguladores ResD-ResE, reguladores del metabolismo anaeróbico en *B. subtilis*. En mutantes *resDE* la expresión de *hmp* disminuye 10 veces con respecto a la cepa silvestre bajo condiciones limitadas de oxígeno, pero se inhibe en mutantes *fnr* y *narG*, además la presencia de nitrito pero no de nitrato restaura la inducción de esta fusión<sup>6</sup>. Se describió el sitio de unión a ResD en la región promotora de *hmp* localizado entre las bases -67 y -49<sup>68</sup>. En presencia de SNP (donador de NO) *hmp* se induce 20 veces en condiciones aeróbicas y por lo menos 100 veces en condiciones anaeróbicas, además, se ha observado una disminución en la expresión inducida por NO de este gen en mutantes ResD o ResE, aunque se observaron niveles basales de expresión en ambas mutantes<sup>69</sup>. Esto indica que la función de Hmp en *B. subtilis* es la protección al estrés por NO<sup>43</sup>.

**EVOLUCIÓN DE LAS GLOBINAS**

En 1996 Moens *et al.*, sugirieron que en la evolución todas las globinas provienen de una proteína ancestral común que pesaba cerca de 17 kDa y que probablemente presentaba la forma de las globinas y funcionaba como una proteína redox. La identificación de la hemoglobinas en *Deinococcus* y *Aquifex*, consideradas dos especies primitivas, sugiere que las hemoglobinas existen desde hace aproximadamente 2 x10<sup>9</sup> años, es decir, antes de que existiera oxígeno en la atmósfera. En el árbol evolutivo que proponen hay tres aparentes grupos, el primero conteniendo las globinas de los metazoarios y plantas, el segundo grupo las de los ciliados y el tercero las de levaduras y proteobacterias<sup>70</sup>.

Evolutivamente no se tiene claro por qué se separaron los dominios hemo y flavín en la bacteria *Vitreoscilla*. Se ha asumido que las hemoglobinas ancestrales, aparecieron en las bacterias cuando en la atmósfera de la tierra era anóxica y abundaba el NO<sup>71</sup>. Así la función primaria de las hemoglobinas ancestrales tuvo que ser la detoxificación del NO de la atmósfera. La aparición de las cianobacterias fotosintéticas y el oxígeno libre en la atmósfera (1.8 billones de años) dieron resultado a una atmósfera aeróbica y a un metabolismo aeróbico. La presencia de una cantidad limitada de oxígeno atmosférico probablemente causó que las hemoglobinas ancestrales se involucraran en el almacenamiento del oxígeno y su transporte. Es interesante que especies relacionadas a *Vitreoscilla* se conozcan como cianobacterias sin color<sup>33</sup>. La separación y la interacción de los dominios hemo y flavín, la cercana similitud con las flavohemoglobinas y las características de unión de oxígeno en VHb sugieren que la hemoglobina de *Vitreoscilla*, puede ser la conexión evolutiva entre las flavohemoglobinas que metabolizan NO y la hemoglobinas que transportan oxígeno<sup>71</sup>.

**REFERENCIAS**

1. Poole, R.K. Oxygen reactions with bacterial oxidases and globins:

Aeróbico NO oxigenasa/desnitrósilasa	Anaeróbico NO reductasa
Hmp-Fe <sup>3+</sup> • NO	Hmp-Fe <sup>2+</sup> • NO
Hmp-Fe <sup>3+</sup> NO • NADH	Hmp-Fe <sup>2+</sup> NO • •
Hmp-Fe <sup>2+</sup> NO • •	Hmp-Fe <sup>3+</sup> NO <sup>-</sup> • •
Hmp-Fe <sup>3+</sup> NO <sup>-</sup> • O <sub>2</sub>	NO + H <sup>+</sup> + HNO 2HNO + N <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O
Hmp-Fe <sup>3+</sup> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Nitrato	Oxido nitroso
Hausladen <i>et al.</i> PNAS 2001.	Kim <i>et al.</i> FEBS Lett 1999.

Tabla II. Reacciones catalizadas por la flavohemoglobina Hmp de *Escherichia coli* en presencia<sup>63</sup> y ausencia de oxígeno<sup>64</sup>.

binding, reduction and regulation. *Antonie van Leeuwenhoek* **65**, 289-310 (1994).

2. Keilin, D. Occurrence of haemoglobin in yeast and the supposed stabilization of the oxygenated cytochrome oxidase. *Nature* **172**, 390-393 (1953).

3. Wakabayashi, S., Matsubara, H. & Webster, D.A. Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature* **322**, 481-483 (1986).

4. Poole, R.K. & Hughes, M.N. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Mol. Microbiol.* **36**, 775-783 (2000).

5. Cramm, R., Siddiqui, R.A. & Friedrich, B. Primary sequence and evidence for a physiological function of the flavohemo-protein of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* **269**, 7349-7354 (1994).

6. LaCelle, M. *et al.* Oxygen-controlled regulation of the flavohemoglobin gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**, 3803-3808 (1996).

7. Favay, S., Labesse, G., Vouille, V. & Boccara, M. Flavohaemoglobin HmpX: a new pathogenicity determinant in *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Microbiology* **141**, 863-871 (1995).

8. Vasudevan, S.G. *et al.* Isolation and nucleotide sequence of the *hmp* gene that encodes a haemoglobin-like protein in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **226**, 49-58 (1991).

9. Cole, S.T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544 (1998).

10. Crawford, M.J. & Goldberg, D.E. Role of the *Salmonella* flavohemoglobin in protection from nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **273**, 12543-12547 (1998).

11. Iwaasa, H., Takagi, T. & Shikama, K.J. Amino acid sequence of yeast hemoglobin. A two-domain structure. *Mol. Biol.* **227**, 948-954 (1992).

12. Zhu, H. & Riggs, A.F. Yeast flavohemoglobin is an ancient protein related to globins and a reductase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 5015-5019 (1992).

13. Wittenberg, J.B., Bolognesi, M., Wittenberg, B.A. & Guertin, M. Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes and plants. *J. Biol. Chem.* **277**, 871-874 (2002).

14. Iwaasa, H., Takagi, T. & Shikama, K. Protozoan myoglobin from

- Paramecium caudatum*. Its unusual amino sequence. *J. Mol. Biol.* **208**, 355-358 (1989).
15. Thorsteinsson, M.V., Bevan, D.R. & Potts, M.A. cyanobacterial hemoglobin with unusual ligand kinetics and stability properties. *Biochemistry* **38**, 2117-2126 (1999).
  16. Hill, D.R. *et al.* GlnN (cyanoglobin) is a peripheral membrane protein that is restricted to certain *Nostoc* spp. *J. Bacteriol.* **178**, 6587-6598 (1996).
  17. Ouellet, H., *et al.* Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 902-907 (2002).
  18. Webster, D.A. Structure and function of bacterial hemoglobin and related protein. "en" *Adv. Inorg. Biochem.* (ed. Eichhorn, G.C. & Marzilli, L.G.) 245-265 (Elsevier, New York, 1987).
  19. Wittenberg, J.B. & Wittenberg B.A. Mechanisms of cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **19**, 217-241 (1990).
  20. Poole, R.K. *et al.* Nitric oxide, nitrite, and Fnr regulation of *hmp* (Flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **178**, 5487-5492 (1996).
  21. Membrillo-Hernández, J., Coopamah, M.D., Channa, A., Hughes, M.N. & Poole, R.K. A novel mechanism for upregulation of the *Escherichia coli* K-12 *hmp* (flavo-hemoglobin) gene by the 'NO releaser', *S*-nitrosoglutathione: nitrosation of homocysteine and modulation of MetR binding to the *glyA-hmp* intergenic region. *Mol. Microbiol.* **29**, 1101-1112 (1998).
  22. Dikshit, K.L. & Webster, D.A. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. *Gene* **70**, 377-386 (1988).
  23. Khosla, C. & Bailey J.E. Evidence for partial export of *Vitreoscilla* hemoglobin into the periplasmic space in *Escherichia coli*. Implications for protein function. *J. Mol. Biol.* **210**, 10970-10975 (1989).
  24. Ramandeep, K. *et al.* *Vitreoscilla* hemoglobin. Intracellular localization and binding to membranes. *J. Biol. Chem.* **276**, 24781-24789 (2001).
  25. Ermler, U., Siddiqui R.A., Cramm R., Schröder D. & Friedrich B. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a bacterial flavo-hemoglobin protein. *Proteins* **21**, 351-353 (1995).
  26. Gonzalez-Prevatt, V. & Webster, D.A. Purification and properties of NADH-cytochrome *o* reductase from *Vitreoscilla*. *J. Biol. Chem.* **255**, 1478-1482 (1980).
  27. Jacob, W., Webster, D.A. & Kroneck, P.M. NADH-dependent methemoglobin reductase from the obligate aerobic *Vitreoscilla*: improved method of purification and reexamination of prosthetic groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**, 29-33 (1992).
  28. Webster, D.A. & Hackett, D.P. The purification and properties of cytochrome *o* from *Vitreoscilla*. *J. Biol. Chem.* **241**, 3308-3315 (1966).
  29. Khosla, C. & Bailey, J.E. Characterization of the oxygen-dependent promoter of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 5990-6004 (1989).
  30. Tsai, P.S., Kallio, P.T. & Bailey, J.E. FNR, a global transcriptional regulator of *Escherichia coli*, activates the *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) promoter and intracellular VHb expression increases cytochrome *d* promoter activity. *Biotechnol. Prog.* **11**, 288-293 (1995).
  31. Joshi, M. & Dikshit, K.L. Oxygen-dependent regulation of *Vitreoscilla* globin gene: evidence for positive regulation by FNR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 535-542 (1994).
  32. Khosla, C., Curtis, J.E., Bydalek, P., Swartz, J.R. & Bailey, J.E. Expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* using an oxygen-responsive promoter. *Bio-Technol.* **8**, 554-558 (1990).
  33. Kaur, R., Pathania, R., Sharma, V., Mande, S.C. & Dikshit, K.L. Chimeric *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) carrying a flavoreductase domain relieves nitrosative stress in *Escherichia coli*: new insight into the functional role of VHb. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 152-160 (2002).
  34. Khosla, C., Curtis, J.E., DeModena, J., Rinas, U. & Bailey, J.E. Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*. *Bio-Technol.* **8**, 849-853 (1990).
  35. Dikshit, K.L., Dikshit, R.P. & Webster, D.A. Study of *Vitreoscilla* globin (*vgb*) gene expression and promoter activity in *E. coli* through transcriptional fusion. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4149-4155 (1990).
  36. Khosla, C. & Bailey, J.E. Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature* **331**, 633-635 (1988).
  37. Liu, S.C., Liu, Y.X., Webster, D.A. & Stark, B.C. Sequence of the region downstream of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene: *vgb* is not part of a multigen operon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 419-424 (1995).
  38. Khosravi, M., Webster, D.A. & Stark, B.C. Presence of the bacterial hemoglobin gene improves alpha-amylase production of a recombinant *Escherichia coli* strain. *Plasmid* **24**, 190-194 (1990).
  39. DeModena, J.A. *et al.* The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Biol. Technol.* **11**, 926-929 (1993).
  40. Liu, S.C., Webster, D.A., Wei, M.L. & Stark, B.C. Genetic engineering to contain the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhances degradation of benzoic acid by *Xanthomonas maltophilia*. *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 101-105 (1996).
  41. Patel, S., Stark, B.C., Hwang, K.W., Dikshit, K.L. & Webster, D.A. Cloning and expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Burkholderia* sp. strain DNT for enhancement of 2,4-dinitrotoluene degradation. *Biotechnol. Prog.* **16**, 26-30 (2000).
  42. Ramirez, M. *et al.* *Rhizobium etli* genetically engineered for the heterologous expression of *Vitreoscilla* sp. Hemoglobin: effects free-living and symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interact.* **12**, 1008-1015 (1999).
  43. Frey, A.D., Farrés, J., Bollinger, C.J.T. & Kallio, P.T. Bacterial hemoglobins and flavo-hemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4835-4840 (2002).
  44. Hernández-Urzúa, E. *et al.* Flavo-hemoglobin Hmp, but not its individual domains confers protection from respiratory inhibition by nitric oxide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**, 34975-34982 (2003).
  45. Frey, A., Koskenkorva, D.T. & Kallio, P.T. *Vitreoscilla* hemoglobin promoter is not responsive to nitrosative and oxidative stress in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Letters* **224**, 127-132 (2003).
  46. Oshino, R., Asakura, T., Oshino, N., Chance, B. & Hagihara, B. Purification and molecular properties of yeast hemoglobin. *Eur. J. Biochem.* **39**, 581-590 (1973).
  47. Probst, I. & Schlegel, H.G. Respiratory components and oxidase activities in *Alcaligenes eutrophus*. *Biochim. Biophys. Acta*

- 440, 412-428 (1976).
48. Bueno, R., Pahel, G. & Magasanik, B. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **164**, 816-822 (1985).
  49. Plamann, M.D. & Stauffer, G.V. Regulation of the *Escherichia coli glyA* by the *metR* gene product and homocysteine. *J. Bacteriol.* **171**, 4958-4962 (1989).
  50. Andrews, S.C. *et al.* The hemoglobin-like protein (Hmp) of *Escherichia coli* has ferrisiderophore-reductase-activity and its C-terminal domain shares homology with ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductases. *FEBS Lett.* **302**, 247-252 (1992).
  51. Vasudevan, S.G., Tang, P., Dixon, N.E. & Poole, R.K. Distribution of the flavohaemoglobin, HMP, between periplasm and cytoplasm in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 219-224 (1995).
  52. Ilari, A., Bonamore, A., Farina, A., Jonson, K.A. & Bofia, A. The X-ray structure of Ferric *Escherichia coli* flavohemoglobin reveals an unexpected geometry of the distal heme pocket. *J. Biol. Chem.* **277**, 23725-23732 (2002).
  53. Stevanin, T.M. *et al.* Flavohemoglobin Hmp affords inducible protection for *Escherichia coli* respiration, catalyzed by cytochromes *bo'* or *bd*, from nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **275**, 35868-35875 (2000).
  54. Cruz-Ramos, H. *et al.* NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *EMBO J.* **21**, 3235-3244 (2002).
  55. Membritto-Hernández, J., Cook, G.M. & Poole, R.K. Roles of RpoS (sigmaS), IHF and ppGpp in the expression of the *hmp* gene encoding the flavohemoglobin (Hmp) of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 599-603 (1997).
  56. Membritto-Hernández, J., Ioannidis, N. & Poole, R.K. The flavohaemoglobin (HMP) of *Escherichia coli* generates superoxide *in vitro* and causes oxidative stress *in vivo*. *FEBS Lett.* **382**, 141-144 (1996).
  57. Membritto-Hernández, J. *et al.* The flavohemoglobin of *Escherichia coli* confers resistance to a nitrosating agent, a "nitric oxide releaser," and paraquat and is essential for transcriptional responses to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **274**, 748-754 (1999).
  58. Membritto-Hernández, J., Kim, S.O., Cook, G.M. & Poole, R.K. Paraquat regulation of *hmp* (flavohemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12 is SoxRS independent but modulated by *s*<sup>5</sup>. *J. Bacteriol.* **179**, 3164-3170 (1997).
  59. D'Autréaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J. M. & Michaud-Soret, I. Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric-uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 16619-16624 (2002).
  60. Gardner, P.R., Gardner, A.M., Martin, L.A. & Salzman, A.L. Nitric oxide dioxigenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 10378-10383 (1998).
  61. Gardner, P.R., Gardner, A.M. & Martin, L.A. Nitric-oxide dioxigenase activity and function of flavohemoglobins. Sensitivity to nitric oxide and carbon monoxide inhibition. *J. Biol. Chem.* **275**, 31581-31587 (2000).
  62. Hausladen, A., Gow, A.J. & Stamler, J.S. Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 14100-14105 (1998).
  63. Hausladen, A., Gow, A.J. & Stamler, J.S. Flavohemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10108-10112 (2001).
  64. Kim, S.O., Orii, Y., Lloyd, D., Hughes, M.N. & Poole, R.K. Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. *FEBS Lett.* **445**, 389-394 (1999).
  65. Crawford, M.J. & Goldberg, D.E. Regulation of the *Salmonella typhimurium* flavohemoglobin gene. A new pathway for bacterial gene expression in response to nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **273**, 34028-34032 (1998).
  66. Stevanin, T.M., Poole, R.K., Demoncheaux, E.A. & Read, R.C. Flavohemoglobin Hmp protects *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* from nitric oxide-related killing by human macrophages. *Infect. Immun.* **70**, 4399-4405. (2002).
  67. Probst, I., Wolf, G. & Schlegel, H.G. An oxygen-binding flavohemoprotein from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochim. Biophys. Acta* **576**, 471-478 (1979).
  68. Nakano, M.M., Zhu, Y., Lacelle, M., Zhang, X. & Hulett, F.M. Interaction of ResD with regulatory regions of anaerobically induced genes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **37**, 1198-1207 (2000).
  69. Nakano, M.M. Induction of ResDE-dependent gene expression in *Bacillus subtilis* in response to nitric oxide and nitrosative stress. *J. Bacteriol.* **184**, 1783-1787 (2002).
  70. Moens, L. *et al.* Globins in nonvertebrate species: dispersal by horizontal gene transfer and evolution of the structure-function relationships. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 324-333 (1996).
  71. Hardison, R. The evolution of hemoglobins. *Am. Scientist.* **87**, 26-137 (1999).

### 1.3.1. Publicaciones recientes sobre la regulación del gen *hmp* de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar typhimurium.

Aunque Crawford y Goldberg (1998) hallan determinado que Fur era el único factor transcripcional involucrado en la regulación del gen *hmp* de *Salmonella*, recientemente los autores se retractaron de este resultado debido a que los resultados publicados se realizaron sobre una fusión  $\Phi(\textit{iroC-lacZ})$  y no en una  $\Phi(\textit{hmp}_{sr-lacZ})$  (Crawford y Goldberg, 2006)

Recientemente se reportó a la proteína NsrR (codificada por el gen *yjeB*) como la responsable de la regulación del gen *hmp* por la presencia de NO<sup>·</sup>. En este artículo se identificó a NsrR como un regulador negativo de la expresión del gen, que en presencia de NO<sup>·</sup> se inactiva debido a la presencia de un posible centro Fe-S (Bodenmiller y Spiro, 2006). Esta misma regulación se ha determinado en *Salmonella* por la misma proteína NsrR (Bang *et al.*, 2006).

Por otra parte se ha publicado que *fhp* (codifica para la flavohemoglobina) de *Pseudomonas aeruginosa*, es regulado por el gen *fhpR*, que se encuentra adyacente a este gen. Este gen codifica para una proteína homóloga a NorR, el regulador de la flavorubredoxina en *E. coli*. Se ha demostrado que FHP esta involucrada en la protección ante el NO<sup>·</sup> en condiciones aeróbicas (Arai *et al.*, 2005).

### 1.4. OBJETIVO.

Caracterizar el modo de regulación del gene *hmp* en la respuesta al estrés oxidativo generado por ROS o RNS.

### 1.5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En estudios anteriores se ha involucrado a la producción de ROS y RNS como un mecanismo de defensa de las células ante la invasión por microorganismos. Sin embargo en los últimos años también se ha estudiado los mecanismos que presentan los microorganismos ante estas especies reactivas. A la fecha se conocen varios sistemas de defensa, así como de reparación por el daño producido por el estrés oxidativo, pero aún existen mecanismos que desconocemos.

Para conocer sobre los mecanismos moleculares que los microorganismos presentan para responder contra el estrés oxidativo, por superóxido o por óxido nítrico, en este trabajo se ha realizado un análisis de la expresión transcripcional del gen *hmp* de *E. coli* y *Salmonella* en respuesta a la presencia de PQ o SNP. Se ha reportado que *hmp* es uno de los genes que mayoritariamente se expresa en repuesta a la presencia de NO<sup>·</sup>, además de que es el único gen reportado que es inducido independiente del sistema SoxRS por la presencia de PQ y SNP.



2.1. LISTA DE CEPAS UTILIZADAS.

Las cepas utilizadas en este trabajo se enlistan en la Tabla 4 y en la Tablas 1 de los artículos anexos.

Tabla 4. Lista de Cepas.

NOMBRE	GENOTIPO	REFERENCIA
RKP2178	VJS676 $\Delta(\text{argF-lacZ})$ U169 $\Phi(\text{hmp}'\text{-lacZ})$	Poole <i>et al.</i> , 1996.
MC4100	F <sup>-</sup> <i>araD139</i> $\Delta\text{lacU169}$ <i>rpsL150</i> <i>relA1</i> <i>flb-5301</i> <i>deoC1</i> <i>pts</i> F25	Casadaban M. 1976
XLI Blue-MRF	<i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>lac</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , F <sup>'</sup> [ <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M15, Tn10]	Bullock <i>et al.</i> 1987.
JMH0252	MC4100, pRS415 $\Phi(\text{hmp}_{\text{Ec}}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0408	MC4100 + pUC4K	Vieira y Messing. 1982
TE2680	F <sup>'</sup> $\lambda$ IN( <i>rrnD-rrnE</i> ) $\Delta\text{lacX74}$ <i>rplS</i> <i>galK42</i> <i>reD::Tn10d-tet</i> <i>trpDC700::putA</i> 13033 ::(kan <sup>S</sup> , Cm <sup>R</sup> <i>lac</i> )	Elliot, 1992.
JMH0722	XL1-Blue, pRS551 $\Phi(\text{hmp}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0723	XL1-Blue, pRS551 $\Phi(\text{hmpF1}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0724	XL1-Blue, pRS551 $\Phi(\text{hmpF2}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0725	XL1-Blue, pRS551 $\Phi(\text{hmpF3}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0726	TE2680 $\Phi(\text{hmp}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0727	TE2680 $\Phi(\text{hmpF2}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0728	TE2680 $\Phi(\text{hmpF3}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0729	TE2680 $\Phi(\text{hmpF1}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0730	P1 <sub>vir</sub> JMH0726 x MC4100, $\Phi(\text{hmp}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0731	P1 <sub>vir</sub> JMH0728 x MC4100, $\Phi(\text{hmpF3}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0874	P1 <sub>vir</sub> JMH0729 x MC4100, $\Phi(\text{hmpF1}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0877	P1 <sub>vir</sub> JMH431 x MC4100, $\Phi(\text{soxS}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0884	XL1-blue, pRS551 $\Phi(\text{hmpF4}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0885	XL1-blue, pRS551 $\Phi(\text{hmpF5}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0888	TE2680 $\Phi(\text{hmpF4}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH0889	TE2680 $\Phi(\text{hmpF5}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH1086	P1 <sub>vir</sub> JMH0889 x MC4100, $\Phi(\text{hmpF5}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
JMH1085	<i>soxR::cat</i>	Cepario JMH
TN520	GC4468 $\lambda(\text{soxR}^+$ , <i>soxS::lacZ</i> )	Nunoshiba <i>et al.</i> 1993
QC1709	F <sup>-</sup> , $\Delta(\text{lac-argF})$ U169, <i>rpsL179</i> , inversion ( <i>rrnD-rrnE</i> )1, sup amb uncharacterized, ( <i>sodA-lacZ</i> )1, SmR	Lab. Danielle Touati J. Bact. (1993),175
JMH1216	MC4100, pRS415 $\Phi(\text{hmp}_{\text{Sr}}'\text{-lacZ})$	Este trabajo
DH5 $\alpha$ + BL21	DH5 $\alpha$ , pET3a- <i>fur</i>	Lee <i>et al.</i> , 2003
JC7623	RNA polimerasa T7, pLysS	Invitrogen
JMH1255	<i>recBCD</i>	Cepario JMH
JMH1269	BL21, pET3a- <i>fur</i>	Este trabajo
JMH1271	M1655, pKOBEGA	Beloin <i>et al.</i> , 2004
JMH1495	MC4100 <i>ybew::GB</i> , kan <sup>R</sup>	Beloin <i>et al.</i> , 2004
JMH1496	XL1-blue, pUC18 L-Kan-R <i>ytfE</i>	Este trabajo
JMH1497	XL1-blue, pUC18 L-Kan-R <i>yidZ</i>	Este trabajo
JMH1499	XL1-blue, pUC18 L-Kan-R <i>yidZopr</i>	Este trabajo
JMH1500	JMH1269 $\Delta\text{yidZ}::\text{kan}$	Este trabajo
	JMH1269 $\Delta\text{yidZoperón}::\text{kan}$	Este trabajo

JMH1503	JC7623 $\Delta ytfE::kan$	Este trabajo
JMH1504	P1 <sub>vir</sub> JMH1499 x MC4100, $\Delta yidZ::kan$	Este trabajo
JMH1506	P1 <sub>vir</sub> JMH1500 x MC4100, $\Delta yidZoperón::kan$	Este trabajo
JMH1728	P1 <sub>vir</sub> JMH1503 x MC4100, $\Delta ytfE::kan$	Este trabajo
JMH1730	P1 <sub>vir</sub> JMH1503 x RKP2178, $\Delta ytfE::kan$	Este trabajo
JMH1824	JMH1269 $\Delta yphF::kan$	Este trabajo
JMH1826	JMH1269 $\Delta yfhA::kan$	Este trabajo
JMH1828	JMH1269 $\Delta yfhK::kan$	Este trabajo
JMH1831	MC4100 $\Delta yphF::kan$	Este trabajo
JMH1832	MC4100 $\Delta yfhA::kan$	Este trabajo
JMH1833	MC4100 $\Delta yfhK::kan$	Este trabajo
JMH1834	P1 <sub>vir</sub> JMH1499 x RKP2178, $\Delta yidZ::kan$	Este trabajo
JMH1856	P1 <sub>vir</sub> JMH1824 x RKP2178, $\Delta yphF::kan$	Este trabajo
JMH1857	P1 <sub>vir</sub> JMH1826 x RKP2178, $\Delta yfhA::kan$	Este trabajo
JMH1858	P1 <sub>vir</sub> JMH1828 x RKP2178, $\Delta yfhK::kan$	Este trabajo
MC1000		Bodenmiller y Spiro 2006
JOEY60	MC1000 $yjeB::kan$	Bodenmiller y Spiro 2006.
JOEY62	MC1000 $\Delta yjeB$	Bodenmiller y Spiro 2006
JOEY72	MC1000 $\Phi(hmpA-lacZ)$	Bodenmiller y Spiro 2006
JOEY76	MC1000 $\Delta yjeB, \Phi(hmpA-lacZ)$	Bodenmiller y Spiro 2006
JMH1955	P1 <sub>vir</sub> JOEY60 x MC4100, $yjeB::kan$	Este trabajo
JMH1957	P1 <sub>vir</sub> JOEY60 x RKP2178, $yjeB::kan$	Este trabajo

### 2.1.1. Mantenimiento de cepas.

En el laboratorio existe una colección de cepas las cuales se mantienen almacenadas en glicerol al 10% a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para mantener las células viables. Se realizó un cultivo fresco de cada cepa en medio LB más el antibióticos requeridos, posteriormente en viales de 1.8 ml que contienen 500  $\mu\text{l}$  glicerol al 40% en LB se agregan 600  $\mu\text{l}$  del cultivo.

### 2.2. LISTA DE PLÁSMIDOS UTILIZADOS.

Los plásmidos utilizados en este trabajo se enlistan en la Tabla 5 y en las Tablas 1 de los artículos anexos.

Tabla 5. Lista de Plásmidos.

VECTOR	GENOTIPO	REFERENCIA
pUC18	<i>ptac-lacZ</i> alpha	
pRS415	<i>lacZ</i> vector fusion	Simons <i>et al.</i> 1987
EHU1	pRS415 $\Phi(hmp_{Ec}-lacZ)$	Este trabajo
pUC4K	cassette kanamicina	Vieira y Messing 1982.
pRS551	<i>lacZ</i> vector fusion	Simons <i>et al.</i> 1987
EHU18	pRS551 $\Phi(hmp-lacZ)$	Este trabajo

EHU19	pRS551 $\Phi$ ( <i>hmpF1-lacZ</i> )	Este trabajo
EHU20	pRS551 $\Phi$ ( <i>hmpF2-lacZ</i> )	Este trabajo
EHU21	pRS551 $\Phi$ ( <i>hmpF3-lacZ</i> )	Este trabajo
EHU26	pRS551 $\Phi$ ( <i>hmpF4-lacZ</i> )	Este trabajo
EHU27	pRS551 $\Phi$ ( <i>hmpF5-lacZ</i> )	Este trabajo
pRS415/ <i>sodA</i>	pRS415 $\Phi$ ( <i>sodA-lacZ</i> )	Danielle Touati
EHU31	pRS415 $\Phi$ ( <i>hmp<sub>Sr</sub>-lacZ</i> )	Este trabajo
pET3a- <i>fur</i>	<i>fur</i> RNA polimerasa T7	Lee <i>et al.</i> , 2003
EHU33	pUC18 L-Kan-R <i>ytfE</i>	Este trabajo
EHU34	pUC18 L-Kan-R <i>yidZ</i>	Este trabajo
EHU35	pUC18L-Kan-R <i>yidZ</i> oper	Este trabajo

### 2.3. LISTA DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se enlistan en la Tabla 6.

Tabla 6. Lista de Oligonucléotidos.

OLIGO	GEN	SECUENCIA
HMP1	<i>hmpF0</i>	5' GCTTGAATTC <del>CCGCATCTCCT</del> GA <del>CTCAGC</del> 3'
HMP2	<i>hmp</i>	5' CCCCGATCCAC <del>CAGTAAAGGGATGGTGG</del> 3'
HMPP1	<i>hmpF1</i>	5' AATCGAATTC <del>CGATAACAGG</del> 3'
HMPP2	<i>hmpF2</i>	5' TTGGGAATTC <del>AAGAGCTTGC</del> 3'
HMPP3	<i>hmpF3</i>	5' TCACGAATTC <del>TCTGAAAAAC</del> 3'
HMPP4	<i>hmpF4</i>	5' CTGAGAATTC <del>CCAAAGAACC</del> 3'
HMPP5	<i>hmpF5</i>	5' CCAAGAATTC <del>ATTTACATTGC</del> 3'
HMP1 <i>St</i>	<i>hmpSt</i>	5' CGCTGAATTC <del>TCCGCATCTCCTGA</del> 3'
HMP2 <i>St</i>	<i>hmpSt</i>	5' CGGTGGATCCT <del>CAACCAGCAGGGG</del> 3'
PE-2	PE <i>hmp</i>	5' CCAGTAAAGGGATGGTGGCTTTTACTGTAGCGATGGTTTG 3'
SODA-1	<i>sodA</i>	5' GGAGATGAATATGAGCTATACCCTGCC 3'
SODA-2	<i>sodA</i>	5' GGCAAATGATTATTTTTTCGCCGAAA 3'
Kanamicina 5'	kan	5' GGGGGAAAGCCACGTTGTCTCAA 3'
Kanamicina 3'	kan	5' GGGGGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGA 3'
YTFEL-1	L- <i>ytfE</i>	5' GTTCGGTAAAGCTT <del>GAGGTCTGGTTTG</del> 3'
YTFEL-2	L- <i>ytfE</i>	5' CGCGCTGGCGGT <del>CGACTGATCTAAAAGC</del> 3'
YTFER-1	R- <i>ytfE</i>	5' CACTGCCAGGT <del>CGACA</del> ACTTTCTGAGAC 3'
YTFER-2	R- <i>ytfE</i>	5' GGGTTGATGTGGAGCT <del>CTATTTTTGTCCGGG</del> 3'
YIDZL-1	L- <i>yidZ</i>	5' CAATGCCAGGT <del>CGAC</del> GCAGTTGCATATTGC 3'
YIDZL-2	L- <i>yidZ</i>	5' GAGCGGGGAT <del>CCGGCGTCCAGGCGCGA</del> 3'
YIDZR-1	R- <i>yidZ</i>	5' CGATGGCAGGAT <del>CCAATCGTATGAAACGC</del> 3'
YIDZR-2	R- <i>yidZ</i>	5' GGTAACGCAGAGCT <del>CTCCATGCTCGCCGGA</del> 3'
YIDZL-1 OPR	L- <i>yidZ</i> opr	5' TCACGCTAAGT <del>CGACTATTGTCCGGATCTGCAC</del> 3'
YIDZL-2 OPR	L- <i>yidZ</i> opr	5' CATGGGCTAGGAT <del>CCCTGATAGTAAGGTGACG</del> 3'
YIDZR-1 OPR	R- <i>yidZ</i> opr	5' AACCGCTGGAT <del>CTTTAGTGAGCGTCGATAAAG</del> 3'
YIDZR-2 OPR	R- <i>yidZ</i> opr	5' CTGGGGCGGAGCT <del>CTGCTGTTACTGACGA</del> 3'
YPHFL-1	L- <i>yphF</i>	5' GCCACCTGACCATCGCGCATAACGGTGGCA 3'
YPHFL-2	L- <i>yphF</i>	5' GCAATGTAACATCAGAGATTTT <del>GAGACACAACGTGGCTTTTCGCCCTAA</del> TCGCTGATT <del>CGCAGAGGTCC</del> 3'
YPHFR-1	R- <i>yphF</i>	5' GCAACACCTTCTT <del>CACGAGGCAGACCTCAGCGCCGCTCCTGT</del> AGGGTTTTTATTAACAAC 3'
YPHFR-2	R- <i>yphF</i>	5' GCCGCGCTGCATTATCCGGAGAATTTAAGC 3'
YPHHL-1	L- <i>yphH</i>	5' GGGCGAGGGTGAACCTGT <del>CATCACCTGT</del> 3'

## CAPITULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS

YPHHL-2	L- <i>yphH</i>	5' GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCGGCTC TCATCTTCACTAAACCTTG 3'
YPHHR-1	R- <i>yphH</i>	5' GCAACACCTTCTTACGAGGCAGACCTCAGCGCCGGCGGATAA CGTAGAAAGGCTTCCCG 3'
YPHHR-2	R- <i>yphH</i>	5' GCGGTTGCTCTGAAAGAAGCGATGGAGCCT 3'
YFHAL-1	L- <i>yfhA</i>	5' GCGATCCGACAATGCAGTTCTATCTCTGCG 3'
YFHAL-2	L- <i>yfhA</i>	5' GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCGGCG TTATGTGTTACGTTTAGCAGATC 3'
YFHAR-1	R- <i>yfhA</i>	5' GCAACACCTTCTTACGAGGCAGACCTCAGCGCCGCGCAGGTTT ATGGCTCATCAGGAGTG 3'
YFHAR-2	R- <i>yfhA</i>	5' GCCAGCCATTGATACGCCAGCAGAAGAAAA 3'
YFHKL-1	L- <i>yfhK</i>	5' GGGCGAACCTGTGCCGGGATCTCGGTACTT 3'
YFHKL-2	L- <i>yfhK</i>	5' GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCGCCTAT CCTATCAGGCTATTTTATTTG 3'
YFHKR-1	R- <i>yfhK</i>	5' GCAACACCTTCTTACGAGGCAGACCTCAGCGCCGCGGGA ATTACCCGGCTTTGTTATGG 3'
YFHKR-2	R- <i>yfhK</i>	5' CGGTATTACGGCAGTCACGACTGAAAGTGG 3'

### 2.4. MEDIOS DE CULTIVO, ANTIBIÓTICOS Y SUPLEMENTOS UTILIZADOS.

El medio de cultivo usado fue LB (Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1.0% y triptona 1.0%), para los medios de cultivo sólidos al LB se le agregó 1.5% de agar (w/v). Los antibióticos y otros suplementos utilizados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Antibióticos y suplementos utilizados en los medios de cultivo.

Antibiótico o Suplemento	Concentración
Ampicilina	200 µg/ml
Kanamicina	25 µg/ml ó 100 µg/ml
Tetraciclina	25 µg/ml
Cloramfenicol	25 µg/ml
Paraquat	200 y 400 µM
SNP	200 y 400 µM

### 2.5. TÉCNICAS GENÉTICAS.

#### 2.5.1. Propagación del bacteriófago P1<sub>vir</sub>.

El estudio con bacteriófagos ha sido una parte integral de la genética bacteriana. A finales de los 40's y principios de los 50's André Lwoff determinó la naturaleza del lisógeno en *Bacillus megaterium*. Joshua Lederberg y Norton Zinder descubrieron la transducción en *Salmonella typhimurium* por el fago P22 en 1952. A principios de los 50's Hershey y colaboradores demostraron el entrecruzamiento genético con los fagos T-even en *E. coli* (Miller, 1992).

### Procedimiento

1. Cultivo de la cepa MC4100 en LB + CaCl<sub>2</sub> 5 mM a 37°C a 200 rpm toda la noche (ON).
2. Centrifugar 1.5 ml del cultivo a 14,000 rpm por 5 minutos.
3. Resuspender el pellet en 750 µl de LB + CaCl<sub>2</sub> 5 mM.
4. Mezclar en tubos de ensayo:
  - 100 µl células
  - 100 µl células + 100 µl Fagos P1<sub>vir</sub>
5. Incubar a temperatura ambiente 15 minutos.
6. Agregar 3 ml de LB + CaCl<sub>2</sub> 5 mM.
7. Incubar a 37°C por 4 horas a hasta que se observe lisis.
8. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
9. Recuperar el sobrenadante.
10. Agregar 2 gotas de cloroformo con una pipeta Pasteur y mezclar en vortex.
11. Almacenar a 4°C.

### **2.5.2. Transformación.**

La transformación es el proceso por el cual la célula bacteriana puede tomar DNA libre del medio. Esta técnica fue el primer sistema bacteriano de transferencia genética descrito, aunque este proceso ocurre naturalmente en algunas bacterias. Las células recombinantes son llamadas transformantes (Miller, 1992). La transformación puede llevarse a cabo mediante dos métodos, el método químico, llevado a cabo con una solución de CaCl<sub>2</sub> fría y calentada brevemente de 37°C a 42°C y el método físico (electroporación), en la cual se exponen las células a un cambio eléctrico que desestabiliza la membrana de las células provocando la formación de poros por donde pasa el DNA, este es un método fácil, rápido, eficiente y muy reproducible (Sambrook y Russell, 2001).

### Método de electroporación. Procedimiento

1. Cultivo de la cepa en LB a 37°C a 200 rpm ON.
- Células electrocompetentes
2. Inocular 250 µl del cultivo en 50 ml de LB.
  3. Incubar a 37°C hasta una OD<sub>600nm</sub> de 0.7-0.9.
  4. Centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos en tubos Falcon a 4°C.
  5. Resuspender el pellet en 25 ml de glicerol 10% frío, agitando suavemente por 1 hora.
  6. Centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos.
  7. Resuspender el pellet en 10 ml de glicerol 10% frío agitando suavemente por media hora.

8. Centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos.
9. Resuspender el pellet en 0.5 ml de glicerol 10% frío y guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Transformación

10. Mezclar en tubos eppendorf:
  - 50  $\mu\text{l}$  de células (control negativo)
  - 50  $\mu\text{l}$  de células + 2  $\mu\text{l}$  plásmido conocido (control positivo)
  - 50  $\mu\text{l}$  de células + 1, 2 ó 5  $\mu\text{l}$  plásmido
11. Usar las celdas de electroporación de tapa café y el programa Ec1.
12. Después de dar el pulso agregar 1 ml de LB y pasar a tubos eppendorf.
13. Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación por 2 a 3 horas.
14. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
15. Resuspender el pellet en 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgSO}_4$  10 mM.
16. Platear con el antibiótico de selección e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  ON.

### Reactivos

Glicerol 10% frío

$\text{MgSO}_4$  10 mM

### Método de $\text{CaCl}_2$ . Procedimiento

1. Cultivo de la cepa en LB a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación a 200 rpm ON.

### Células competentes

2. Inocular 150  $\mu\text{l}$  del cultivo en 15 ml de LB.
3. Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  0.4-0.6.
4. Centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en tubos Falcon.
5. Resuspender el pellet en 5 ml de  $\text{CaCl}_2$  100 mM frío.
6. Incubar en hielo 40 minutos.
7. Centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
8. resuspender el pellet el 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  100 mM frío.

### Transformación

9. Mezcal en tubos eppendorf:
  - 50  $\mu\text{l}$  de células (control negativo)
  - 50  $\mu\text{l}$  de células + 2  $\mu\text{l}$  plásmido conocido (control positivo)
  - 50  $\mu\text{l}$  de células + 1, 2 ó 5  $\mu\text{l}$  plásmido problema
10. Incubar en hielo 30 minutos.
11. Incubar a  $43^{\circ}\text{C}$  por 90 segundos.
12. Agregar 1 ml de LB.
13. Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 a 3 horas en agitación.
14. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
15. Resuspender el pellet en 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgSO}_4$  10 mM.
16. Platear con el antibiótico de selección e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  ON.

### Reactivos

$\text{CaCl}_2$  100 mM frío

$\text{MgSO}_4$  10 mM

### 2.5.3. Transducción mediada por el bacteriófago P1<sub>vir</sub>.

Transducción es el proceso para la transferencia de un fragmento de DNA de una célula a otra, usando un bacteriófago como transportador del DNA. Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan y crecen en las células bacterianas. Este proceso permite a la bacteria adquirir un fragmento de DNA de aproximadamente 50 a 100 kpb de longitud. Hay dos tipos de transducción, la generalizada y la especializada. En la transducción generalizada se permite la transferencia de cualquier fragmento del cromosoma. Después de la infección el DNA es cortado y los fragmentos de DNA son empaquetados por el fago, posteriormente el fago vuelve a infectar transfiriendo en DNA de la primer célula en la segunda en donde por recombinación los fragmentos de DNA se insertan en el cromosoma de la nueva célula. En la transducción especializada solo un grupo de genes puede ser transferido, las bases de este proceso están en la especificidad de integración del fago por temperatura (Miller, 1992).

#### Procedimiento

Lisado de la cepa donadora con el bacteriófago P1<sub>vir</sub>

1. Cultivo de la cepa a transducir en LB + CaCl<sub>2</sub> 5 mM a 37°C a 200rpm ON.
2. Centrifugar 1.5 ml del cultivo a 14,000 rpm por 5 minutos.
3. Resuspender el pellet en 750 µl de LB + CaCl<sub>2</sub> 5 mM.
4. Mezclar en tubos de ensaye:
  - 100 µl de células (Control Negativo)
  - 100 µl de células + 10 µl de fago P1<sub>vir</sub>
  - 100 µl de células + 100 µl de fago P1<sub>vir</sub>
5. Incubar a temperatura ambiente 15 minutos.
6. Agregar 3 ml de LB + CaCl<sub>2</sub> 5 mM.
7. Incubar a 37°C hasta observar lisis.
8. Recuperar el lisado en un tubo eppendorf.
9. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
10. Recuperar el lisado en un tubo eppendorf y agregar 2 gotas de cloroformo con una pipeta Pasteur y mezclar en vortex.
11. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
12. Almacenar a 4°C.

Transducción a la cepa receptora.

13. Cultivo de la cepa receptora en LB + MgSO<sub>4</sub> 10 mM a 37°C a 200rpm ON.
14. Centrifugar el cultivo a 14,000 rpm por 5 minutos
15. Resuspender el pellet en 750 µl de LB + MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
16. Mezclar en tubos eppendorf:

- 100  $\mu$ l de células (Control Negativo)
- 100  $\mu$ l de células + 0.5, 2, 5, 10 ó 100  $\mu$ l del lisado
- 17. Incubar 10 minutos a 37°C, es muy importante que solo sean 20 minutos no más ya que se pueden lisar las células.
- 18. Agregar 1 ml de LB + 20 mM citrato de sodio y centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
- 19. Repetir el paso 18 tres veces más.
- 20. Resuspender el pellet en 2 ml de LB + 20mM citrato de sodio + antibiótico de selección.
- 21. Incubar a 37°C a 200 rpm ON.
- 22. Centrifugar los cultivos en donde se observa crecimiento y resuspender el pellet en 1000  $\mu$ l LB + 20 mM citrato de sodio + antibiótico de selección.
- 23. Platear con el antibiótico de selección e incubar a 37°C ON.

### Reactivos

- LB + CaCl<sub>2</sub> 5 mM
- LB + MgSO<sub>4</sub> 10 mM
- LB + 20 mM citrato de sodio

#### **2.5.4. Mutagénesis al azar por transposición.**

En la genética bacteriana los elementos transponibles son una importante herramienta. Los clásicos estudios en el maíz, realizados por Barbara McClintock, y otros estudios en bacterias, levaduras, *Drosophila*, y otros organismos determinaron una familia de elementos genéticos que pueden moverse de una posición a otra en el mismo cromosoma o diferentes. Estos elementos llamados transposones son de un tamaño de más de 1500 pb, con secuencias invertidas repetidas que flanquean la secuencia de un gen de resistencia a un antibiótico o la secuencia de un gen; estos transposones se llaman Tn1, Tn2, Tn3, etc. El movimiento de los transposones de un cromosoma a otro se puede seguir por la resistencia al antibiótico que presenta (Miller, 1992).

En la búsqueda de algún factor transcripcional involucrado en la regulación del gen *hmp* en *E. coli* en este trabajo se usaron los transposones miniTn10, miniTn5 y  $\lambda$ NK1098 para realizar una mutagénesis al azar de una cepa merodiploide que lleva en su cromosoma la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  para monitorear la expresión del gen.



### Procedimiento

1. Cultivo de la cepa merodiploide en LB + CaCl<sub>2</sub> 5 mM, a 37°C ON.
2. Centrifugar 1.5 ml del cultivo a 14,000 rpm por 5 minutos.
3. Resuspender el pellet en 750 µl de MgSO<sub>4</sub> 10 mM + CaCl<sub>2</sub> 5 mM.
4. Mezclar en tubos de eppendorf:
  - 100 µl de células (Control Negativo)
  - 100 µl de células + 100 µl de miniTn10, miniTn5 o λNK1098
5. Incubar a temperatura ambiente 15 minutos.
6. Agregar 1 ml de LB + MgSO<sub>4</sub> 10mM.
7. Incubar a 37°C por 2 a 3 horas sin agitación.
8. Hacer diluciones 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-4</sup> con MgSO<sub>4</sub> 10mM.
9. Platear en cajas con kanamicina o tetraciclina

### Reactivos

LB + CaCl<sub>2</sub> 5 mM

#### **2.5.5. Construcción de fusiones transcripcionales.**

En la genética para poder observar la expresión de algunos genes en determinadas condiciones fisiológicas se realizan fusiones usando genes monitores. En este trabajo para monitorear la expresión del gen *hmp* se realizaron fusiones de la secuencia promotora del gen *hmp* con la secuencia del gen monitor *lacZ*. El gen *lacZ* que codifica para la proteína β-galactosidasa, cuya actividad es fácilmente cuantificable a través de un ensayo colorimétrico (ver actividad de β-galactosidasa). Así la actividad de β-galactosidasa es directamente proporcional a la expresión del gen *hmp*.

En este trabajo el primer paso en la construcción de las fusiones fue la clonación del promotor del gen *hmp* en el plásmido pRS415 o pRS551, posteriormente se realizó la transferencia de la fusión al cromosoma de una cepa  $\Delta lac$ . Para transducción de la fusión al cromosoma se realizó mediante el fago λRS45 (Simons *et al.*, 1987), o usando la cepa TE2680 (Elliot, 1992), la cual es una cepa *recD* que permite la recombinación del DNA lineal con secuencias homólogas en el cromosoma con mayor eficiencia. En este caso la recombinación se lleva a cabo en el operón de triptofano que está modificado en la cepa TE2680.

### Procedimiento

1. Clonar el promotor *hmp* en los plásmidos pRS415 o pRS551 usando las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI.
2. Transducir la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  de pRS415 al cromosoma de la cepa MC4100 mediante  $\lambda$ RS45 o recombinación en la cepa TE2680

### **2.5.6. Construcción de mutantes.**

Una herramienta genética usada para poder determinar la función de una proteína en la fisiología del microorganismo, es realizar la sustitución del gen por la secuencia de un gen de resistencia a algún antibiótico. En este trabajo se realizó la delección sustitución de varios genes mediante dos métodos, el primer método es mediante la sustitución por recombinación homóloga en la cepa JC7623 (*recBCD*) (Winans *et al.*, 1985) en el segundo se usa el plásmido pKOBEGA (plásmido  $\lambda$ red) para llevar a cabo la recombinación (Beloin *et al.*, 2004).

### Método 1 (Winans *et al.*, 1985) Procedimiento

1. Amplificar por PCR las secuencias adyacentes 5' (L) y 3' (R) del gen a sustituir.
2. Digerir el plásmido pUC4K para obtener el gen de resistencia a kanamicina.
3. Clonar los tres fragmentos (L-Kan-R) en el plásmido pUC18 usando la enzima ligasa T4.
4. Transformar la cepa XLI-blue con el plásmido pUC18 L-Kan-R. Seleccionar colonias tetraciclina, ampicilina y kanamicina resistentes.
5. Purificar el plásmido pUC18 L-Kan-R y linearizarlo.
6. Transformar la cepa JC7623 con este plásmido lineal. Seleccionar colonias kanamicina resistentes y ampicilina sensibles.
7. Transducir la mutación a una cepa silvestre mediante el fago P1<sub>vir</sub>.

### Reactivos

Reactivos para PCR

Enzimas de restricción

Reactivos para transformación

### Método 2 (Beloin *et al.*, 2004) Procedimiento

1. Amplificar por PCR las secuencias adyacentes 5' (L) y 3' (R) del gen a sustituir.
2. Amplificar por PCR la secuencia del gen de resistencia a kanamicina.
3. Amplificar por PCR el fragmento L-Kan-R.

4. Transformar la cepa con el plásmido pKOBEGA con el fragmento L-Kan-R. Seleccionar colonias kanamicina resistentes.
5. Transducir la mutación a una cepa silvestre mediante el fago P1<sub>vir</sub>.

### Reactivos

Reactivos para PCR

Reactivos para transformación

## 2.6. TÉCNICAS MOLECULARES.

### 2.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa.

Para poder amplificar los fragmentos de DNA se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En esta técnica mediante el uso de dos oligonucleótidos homólogos a una secuencia de DNA específica a amplificar y una serie de ciclos de temperatura de desnaturalización y polimerización se incrementa exponencialmente la secuencia definida por los oligonucleótidos.

### 2.6.2. Purificación de plásmidos.

La purificación de los plásmidos utilizados en este trabajo se realizó mediante el Kit de QIAGEN llamado QUIAprep Spin Miniprep.

### 2.6.3. Purificación de DNA cromosomal.

La obtención de DNA cromosomal de las cepas durante este trabajo se realizó mediante dos técnicas, una fue usando la técnica de fenol- cloroformo y la otra fue mediante el kit de Wizard Genomics Promega DNA Purification.

### Técnica de Fenol-Cloroformo Procedimiento

1. Cultivo de la cepa en 50 ml de LB a 37°C a 200 rpm de agitación hasta una OD<sub>600nm</sub> de 0.8-1.0.
2. Centrifugar el cultivo en tubos Falcon a 3,000 rpm por 10 minutos.
3. Resuspender el pellet 10 ml de buffer TE y agregar 10 mg de lisozima
4. Incubar a 30°C por 15 minutos en agitación.
5. Agregar 1 ml de SDS 20% y agitar con una micropipeta por 15 segundos.
6. Agregar 10 ml de fenol (saturado con buffer TE) y 1.5 ml de NaCl 5 M.
7. Agitar invirtiendo el tubo por 20 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos y recuperar la fase superior.

9. Agregar un volumen de fenol y un volumen de cloroformo.
10. Agitar invirtiendo el tubo por 20 minutos a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos y recuperar la fase superior.
12. Agregar un volumen de cloroformo.
13. Agitar invirtiendo el tubo por 20 minutos a temperatura ambiente.
14. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos recuperar la fase superior.
15. Agregar un volumen de isopropanol suavemente por las paredes del tubo.
16. Mezclar suavemente con una varilla de vidrio en la zona de interfase para recuperar el DNA que esta en forma de fibras.
17. Lavar el DNA con etanol al 70% frío y secar a temperatura ambiente.
18. Resuspender en 1 ml de buffer TE.
19. Agregar 20 µg/ml de RNAsa e incubar 1 hora a 50°C.
20. Agregar 100 µg/ml de proteinasa K e incubar 1 hora a 37°C.
21. Ajustar el volumen a 5 ml con buffer TE.
22. Agregar un volumen de fenol y un volumen de cloroformo.
23. Agitar invirtiendo el tubo por 10 minutos a temperatura ambiente.
24. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos y recuperar la fase superior.
25. Agregar un volumen de cloroformo.
26. Agitar invirtiendo el tubo por 10 minutos a temperatura ambiente.
27. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos y recuperar la fase superior.
28. Agregar un volumen de isopropanol suavemente por las paredes del tubo.
29. Mezclar suavemente con una varilla de vidrio en la zona de interfase para recuperar el DNA que esta en forma de fibras.
30. Lavar el DNA con etanol al 70% frío y secar a temperatura ambiente
31. Resuspender en 1 ml de buffer TE

### Reactivos

Buffer TE (Tris-HCL 25 mM pH 8.0 + EDTA 1 mM)

Lizozima 100 mg de en 1 ml de H<sub>2</sub>O.  $V_1 = 10 \text{ mg} \times 10 \text{ ml} / 1000 \text{ mg} = 0.1 \text{ ml} = 100 \text{ } \mu\text{l}$

SDS 20%

Fenol (saturado con Buffer TE)

NaCl 5 M

Cloroformo

Isopropanol

Etanol al 70%

RNAsa (20 µg/ml)

Proteinasa K (100 µg/ml)

### **2.6.4. Purificación de RNA.**

La obtención de RNA durante este trabajo se realizó mediante la técnica de fenol caliente (Aiba *et al.*, 1981). Los cultivos para la extracción de RNA se realizaron en medio LB bajo condiciones aeróbicas hasta una OD<sub>600nm</sub> de 0.4, posteriormente se les agrego 400 µM de PQ o SNP y se incubaron por 10 y 45 minutos o de 0 a 60 minutos.

### Procedimiento

1. Cultivo de la cepa en LB a 37°C a 200 rpm de agitación ON.
2. Inocular 150 µl de cada cultivo en 15 ml LB, tres matraces.
3. Incubar a 37°C hasta una OD<sub>600nm</sub> de 0.4.
4. Agregar 400 µM Paraquat o SNP.
5. Incubar a 37°C por 10 minutos y 45 minutos.
6. Centrifugando en tubos Falcón a 3,500 rpm por 15 minutos a 4°C.
7. Resuspender el pellet en 1.5 ml de solución de lisis con una pipeta Pasteur.
8. Agregar un volumen de fenol saturado incubado a 65°C.
9. Agitar a 200 –300 rpm por 10 minutos a 65°C.
10. Centrifugar a 3,500 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
11. Recuperar la fase acuosa superior en un tubo Falcon.
12. Repetir los pasos 8 al 11 dos veces más.
13. Agregar un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
14. Agitar 10 minutos a temperatura ambiente.
15. Centrifugar a 3,500 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
16. Recuperar la fase acuosa superior en un tubo Corex limpio.
17. Agregar un volumen de acetato de sodio 3M pH 5.5 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto y precipitar toda la noche a –70°C
18. Centrifugar a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C.
19. Decantar el sobrenadante y secar a temperatura ambiente.
20. Resuspender en 150 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNAsa y guardar a –70°C en H<sub>2</sub>O.

### Reactivos

PQ (20 mM)

SNP (20 mM)

Solución de Lisis Acetato de sodio 20 mM pH 5.5

EDTA 1 mM

SDS 0.5%

Esterilizar en autoclave

Fenol bidestilado Saturar el Fenol con acetato de sodio 20 mM pH 5.5 y EDTA 1 mM esterilizado previamente en autoclave

Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)

Acetato de sodio 3 M pH 5.5

Etanol absoluto

Etanol al 75%

Agua libre de RNAsas

### **2.6.5. Southern blot.**

A mediados de los 60's, después de que Nygaard y Hall (1963) demostraran que el DNA de cadena sencilla puede ser inmovilizado en un filtro de nitrocelulosa, Denhardt (1966) y Gillespie y Spiegelman (1965) demostraron que los ácidos nucleicos fijados pueden ser detectados por la hibridación con sondas marcadas radiactivamente con una alta sensibilidad. A mediados de los 70's, Ed.

Southern (Southern, 1975) demostró que la hibridación del DNA fijado en los filtros de nitrocelulosa con las sondas radiactivas puede ser usada para detectar secuencias específicas de fragmentos de DNA. En este método el DNA primero es digerido con una o más enzimas de restricción los fragmentos de DNA generados son separados por tamaño en una electroforesis en geles de agarosa. El DNA es transferido a membrana de nitrocelulosa para hibridar con sondas específicas de DNA complementarias y posteriormente detectar las bandas por medio de un sistema de detección apropiado (Sambrook y Russell, 2001).

### Procedimiento

#### Digestión.

1. Digestión del DNA cromosomal con una o dos enzimas de restricción.

#### Electroforesis.

2. Hacer una electroforesis con el DNA digerido, en un gel de agarosa al 1% y teñirlo con bromuro de etidio (1.5 µg/ml). Tomar una fotografía al gel es muy importante poner una regla.

#### Transferencia a la membrana de nitrocelulosa Hybond™ N<sup>+</sup>.

4. En una charola cubrir el gel con solución depurinizadora (HCl 0.25M) e incubar en agitación lenta por 12 minutos, hasta observar que el azul de bromofenol cambio a amarillo debido a la acidez del medio que tiene HCl. Lavar el gel con H<sub>2</sub>O.
5. Cubrir el gel con solución desnaturalizadora e incubar en agitación lenta por 25 minutos, observar que el azul de bromofenol regrese a su color azul. Lavar el gel con H<sub>2</sub>O.
6. Cubrir el gel con solución neutralizadora e incubar en agitación lenta por 30 minutos. Lavar el gel con H<sub>2</sub>O.
7. Transferir el DNA a la membrana:

Poner en una base una tira de papel Wattman<sup>3MM</sup> 3 veces el tamaño de gel a lo largo para hacer un puente. Colocarlo sobre el soporte de la cámara y mojar este papel con buffer SSC 20X.

Poner el gel sobre el papel wattman y después la membrana de nitrocelulosa, procurar que no formen burbujas entre esta y el gel.

Colocar sobre la membrana tres rectángulos del tamaño del gel de papel Wattman<sup>3MM</sup> y sanitas, aproximadamente 5cm de altura de sanitas.

Presionar todo con un peso de aproximadamente 1 k.

Dejar transfiriendo por 4 horas o toda la noche.

#### Marcaje de la sonda (Kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System de Amersham)

8. Para inmovilizar el DNA hay que fijar covalentemente el DNA a la membrana colocar la membrana en luz UV antes de hibridar con la sonda.

9. Preparar el buffer de hibridación (Gold Hybridation Buffer ECL). Se requieren 0.25 ml de buffer por cada cm<sup>2</sup> del recipiente usado o si hicimos un gel de 8 x 11 cm preparar 30 ml de buffer.
  10. Agregar a los 30 ml de buffer en agitación 0.5 M de NaCl (0.850 g), esperar a que se disuelva.
  11. Agregar en agitación 5 % peso/volumen de agente bloqueador (1.5 g) y mantener en agitación por 1 hora a temperatura ambiente.
  12. Prehibridizar la membrana a 42°C por 20 minutos en el buffer de hibridación.
  13. Marcar la sonda: poner 10 µl de sonda en un tubo eppendorf.
  14. Desnaturalizar calentando a 100°C por 5 minutos.
  15. Incubar en hielo por 5 minutos y centrifugar 10 segundos.
  16. Agregar un volumen de agente de marcaje, mezclar con la micropipeta.
  17. Agregar un volumen de la solución de glutaraldehído.
  18. Incubar a 37°C por 10 minutos.
  19. Agregar al buffer de hibridación sin tocar la membrana e incubar a 42°C toda la noche.
- Detección de la señal
20. Lavar la membrana con 100 ml de buffer primario caliente a 55°C agitando suavemente por 10 minutos a 55°C.
  21. Repetir el lavado.
  22. Lavar la membrana con 100 ml de buffer secundario, agitando suavemente por 5 minutos a temperatura ambiente.
  23. Repetir el lavado.
  24. Pasar la membrana a un recipiente limpio eliminando el exceso de buffer secundario.
  25. Agregar sobre la membrana del lado del DNA una mezcla de volúmenes iguales del reactivo de detección 1 con el reactivo de detección 2.
  26. Colocar una película autoradiográfica sobre la membrana.
  27. Dejar exponiendo por 5 minutos y revelar.

### Reactivos

Membrana de nitrocelulosa Hybond™ N<sup>+</sup>  
Solución Depurinizadora (HCl 0.25M)  
Solución Desnaturalizadora  
Solución Neutralizadora  
Buffer SSC 20X  
Kit ECL Detection System de Amersham Biosciences  
Buffer Primario  
Buffer Secundario  
Película autoradiográfica

### **2.6.6. Northern blot.**

A diferencia del Southern blot, en el Northern blot lo que se inmoviliza en la membrana de nitrocelulosa es el RNA. En este trabajo el RNA se purificó de cultivos tratados con PQ o SNP.

### Procedimiento

#### Electroforesis.

1. Hacer una electroforesis con el RNA en un gel de agarosa al 1% + 20 mM tiocianato de guanidina (Goda y Minton, 1995). Realizar la electroforesis a 60 volts por aproximadamente 1.30 horas.
  2. Transferir a la membrana de nitrocelulosa.
- Los pasos siguientes son iguales a los de Southern blot.

#### **2.6.7. 5' RACE.**

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) es un proceso para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos de templado de RNA mensajero (mRNA) entre un sitio interno definido y una secuencia desconocida hacia el extremo 5' del mRNA. El 5' RACE es una técnica que facilita el aislamiento y caracterización del extremo 5' de mensajeros de bajo número de copias. Los pasos a seguir en esta técnica son (Invitrogen):

- 1) Síntesis de la cadena de cDNA, usando un oligonucleótido antisentido específico a la secuencia del gen (oligonucleótido 1).
- 2) El cDNA se purifica de los dNTP's no incorporados y los restos de oligonucleótido.
- 3) Usando la enzima deoxinucleótido terminal transferasa (TdT) se agrega una cola homopolimérica de citocinas en el extremo 3' del cDNA.
- 4) El cDNA con el homopolímero en el 3' es usado para realizar un PCR, usando un segundo oligonucleótido específico dentro de la secuencia del gen (oligonucleótido 2) y otro que además de la secuencia complementaria a la cola de homopolimeros tenga una secuencia conocida (oligonucleótido kit 1).
- 5) Este otro producto es usado como molde para realizar un segundo PCR usando el oligonucleótidos 2 y un cuarto oligonucleótido (oligonucleótido 2 kit) complementario al oligonucleótido kit 1.
- 6) Este producto de PCR es secuenciado y una vez identificado el homopolimero en al secuencia la siguiente base sera el sitio de inicio de la transcripción del gen.



### 2.6.8. Purificación de la proteína Fur.

Para poder realizar los ensayos electroforéticos de retardo de bandas se purificó la proteína Fur. Usando el plásmido pET3a-fur, donado por la Dra. Jung-Hye Roe de la Universidad de Seul, Corea del Sur, se realizaron cultivos en presencia de IPTG y posteriormente se uso el Kit Ni-NTA Spin Handbook de QIAGEN.

#### Procedimiento

##### Expresión

1. Cultivo de la cepa ELI96 (BL21 + pET3a-fur) en LB + 200 µg/ml ampicilina + 25 µg/ml cloramfenicol a 37°C ON.
2. Inocular 500 µl del cultivo en 50 ml LB + 200 µg/ml ampicilina + 25 µg/ml cloramfenicol, dos matraces.
3. Incubar a 37°C en agitación hasta una OD<sub>600</sub> nm de 0.4.
4. Agregar a uno de los cultivos 1 mM IPTG e incubar a 37°C en agitación por 4 horas.
5. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos a 4°C y decantar el sobrenadante.

##### Lisado

6. Resuspender el pellet en 1 ml de buffer de lisis.
7. Agregar 1 mg/ml lisozima e incubar en hielo por 30 minutos.
8. Sonicar 10 segundos con pausas de 30 segundos a 12 microoms, 4 veces. Homogeinizar en hielo para la lisis total.
9. Centrifugar a 14,000 rpm 30 minutos a 4 °C.

##### Purificación (solo de los cultivos con IPTG) Usar el Kit Ni-NTA Spin Handbook

10. Equilibrar las columnas con 600 µl de buffer de lisis.
11. Centrifugar a 2,000 rpm (700 xg) por 2 minutos.
12. Guardar 20 µl del lisado (para el gel de proteínas).
13. Poner 600 µl del lisado en una columna ya pre-equilibrada.
14. Centrifugar a 2,000 rpm (700 xg) por 2 minutos.
15. Decantar el sobrenadante y agregar 600 µl de buffer de lavado.
16. Centrifugar a 2,000 rpm (700 xg) por 2 minutos.
17. Guardar un poco del sobrenadante para realizar el gel de proteínas.
18. Pasar la columna a otro tubo y agregar 600 µl de buffer de lavado.
19. Centrifugar a 2,000 rpm (700 xg) por 2 minutos.
20. Guardar un poco del sobrenadante para realizar el gel.
21. Pasar la columna a un tubo eppendorf y agregar 600 µl de buffer de elución.
22. Centrifugar a 2,000 rpm (700 xg) por 2 minutos.
23. Agregar 150 µl de buffer de elusión.
24. Guardar a -70°C.
25. Realizar un gel de proteínas para verificar la pureza de la proteína.

##### Reactivos

Lisozima 1 mg/ml (Stock 100 mg/ml)

Buffer de Lisis ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM+ NaCl 300 mM + 10 mM Imidazol pH 8.0)

Buffer de Lavado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM+ NaCl 300 mM + 20 mM Imidazol pH 8.0)

Buffer de Elución ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM+ NaCl 300 mM + 250 mM Imidazol pH 8.0)

### 2.6.9. Ensayos electroforéticos de retardo de bandas.

Para determinar si Fur se une a la región intergénica *glyA-hmp* se realizaron ensayos electroforéticos de retardo de bandas con la secuencia de DNA de *glyA-hmp* de *E. coli* y *Salmonella* y la proteína Fur de *E. coli* purificada.

#### Procedimiento

##### Obtención de Sondas

1. Amplificar por PCR las regiones intergénicas *glyA-hmp* de *E. coli* y *Salmonella*, usando una mezcla de dNTP's conteniendo  $\alpha\text{CTP}$  [ $^{32}\text{P}$ ].

##### Reacciones de Unión

1. Mezclar en tubos eppendorf:
  - 5  $\mu\text{l}$  sonda radioactiva
  - 1, 2, 5  $\mu\text{l}$  proteína Fur
  - 10  $\mu\text{l}$  Buffer Binding 1MM
2. Incubar a 30°C 15 minutos.
3. Realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% + glicerol 2%.
4. Correr a 120 volts por 40 minutos a 1 hora.
5. Secar el gel y exponer placas radiográficas. Revelar.

#### Reactivos

##### Buffer TGED (20 ml)

Tris-HCl pH 8.0	20 mM
Glicerol	5 %
EDTA	1 mM
DTT	1 mM

##### Buffer Binding 1MM (5ml)

Tris-HCl pH 8.0	20 mM
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
EDTA	1 mM
BSA	0.05 mg/ml
DTT	5 mM
Glicerol	10 %
Polyd1-dc	100 ng/ml (Stock 250 $\mu\text{g/ml}$ )
NP-40	0.1%

Filtrar

Poliacrilamida 8% + Glicerol 2% (50 ml)

### 2.7. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.

#### 2.7.1. Actividad de $\beta$ -galactosidasa.

Una de los genes reporteros utilizados en estudios sobre regulación genética, es el gene *lacZ* que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa. El substrato de esta enzima es la lactosa, pero también puede actuar sobre análogos de ésta molécula, uno de ellos es el cromóforo *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), cuya hidrólisis puede detectarse mediante una reacción colorimétrica, midiendo absorbancia a 420 nm. Para monitorear la actividad de un gen, se pueden construir fusiones uniendo la región promotora del gene de interés con la región codificante del operón *lacZ* y midiendo la expresión del gene de interés mediante la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa (Millar, 1992).

Para calcular la actividad de  $\beta$ -galactosidasa se usa la fórmula de Miller:

$$UM = 1000 (DO_{420nm} - (1.75 \times DO_{550nm})) / (t \times V \times DO_{600nm})$$

donde: t= tiempo de reacción

V= volumen de células en suspensión (ml)

La  $DO_{420nm}$  mide la absorbancia debida a la hidrólisis de ONPG; mientras que la  $DO_{550nm}$  mide la dispersión de la luz debida a los restos celulares y la turbidez. Para estos experimentos se usó un espectrofotómetro de UV/Visible Ultrospec 3100 pro (Amersham Pharmacia Biotech).

#### Procedimiento

1. Cultivo de la cepa en LB a 37°C en agitación a 200 rpm ON.
2. Inocular 100  $\mu$ l del cultivo en 5 ml de LB, 3 matraces por cepa.
3. Incubar a 37°C a 200 rpm de agitación  $OD_{600nm}$  de 0.4.
4. Agregar: 1 matraz sin nada  
1 matraz 200  $\mu$ M PQ  
1 matraz 200  $\mu$ M SNP
5. Incubar 60 minutos a 37°C a 200 rpm.
6. Agregar 40  $\mu$ g / ml de Cloramfenicol, para inhibir la síntesis de proteínas.
7. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Tomar 1 ml de cada cultivo y centrifugar 5 minutos a 14 000 rpm.

9. Resuspender el pellet de células en 1 ml de NaCl al 0.8% frío.
10. Centrifugar 5 minutos a 14 000 rpm.
11. Resuspender el pellet de células en 1 ml de Buffer Z con Beta-mercaptoetanol.
12. Medir D.O. a 600nm usando como blanco 1 ml de Buffer Z con  $\beta$ -mercaptoetanol.
13. Hacer triplicado de cada cepa con lo siguiente:
  - 30  $\mu$ l de células + 970 microlitros de Buffer Z con Beta-Mercaptoetanol
  - 50  $\mu$ l de células + 950 microlitros de Buffer Z con Beta-Mercaptoetanol
  - 100  $\mu$ l de células + 900 microlitros de Buffer Z con Beta-MercaptoetanolUsar 1 ml de Buffer Z con Beta-mercaptoetanol como control.
14. Agregar 2 gotas de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y 2 gotas de SDS al 0.1% con una pipeta Pasteur.
15. Mezclar en vortex el mismo tiempo y velocidad para cada tubo. El tubo control se trata de la misma forma.
16. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
17. Agregar 200  $\mu$ l de ONPG a 0.4 % en intervalos de 15 segundos entre tubo y tubo (para controlar el tiempo en cada tubo) y mezclar en vortex el mismo tiempo y velocidad para cada tubo. El ONPG es el sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa que al hidrolizarse por esta enzima, presenta un máximo de absorbancia a 420nm.
18. Incubar a temperatura ambiente de 15 a 20 minutos o hasta observar el color amarillo.
19. Agregar 500  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M (también a intervalos de 15 segundos entre cada tubo) para detener la reacción del ONPG.
20. Medir la absorbancia a 420 nm y 550 nm (a 550nm se mide la densidad celular) de los tubos y usar el control como blanco. Se uso un espectrofotómetro de UV/Visible Ultrospec 3100 pro (Amersham Pharmacia Biotech).
21. Calcular las Unidades Miller (cantidad de ONPG hidrolizado por minuto por función de densidad óptica).

### Reactivos

PQ

SNP

Cloramfenicol

NaCl al 0.8% frío

Buffer Z con Beta-Mercaptoetanol

Cloroformo

SDS al 0.1%

ONPG a 0.4 %

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M

### 2.7.2. Ensayos de inhibición de la respiración por NO.

Para determinar la inhibición de la respiración por NO en una cepa silvestre, una mutante *hmp* y ambas cepas complementadas con el gen *vgb* (hemoglobina de *Vitreoscilla*) se usó un oxímetro para medir el porcentaje de oxígeno.

#### Procedimiento

1. Cultivos de las cepas en LB a 37°C a 200 rpm ON.
2. Inocular 50 ml de cada cultivo en 2 litros de LB + antibiótico requerido.
3. Incubar a 37°C a 200 rpm hasta una OD<sub>600</sub> nm de 0.4-0.6.
4. Tomar 1.8 ml de los cultivos para medir en el oxímetro.
5. Agregar diferentes concentraciones de SNP.
6. Realizar la gráfica.

## 2.8. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS.

### 2.8.1. Análisis tipo BLAST.

Para poder realizar comparaciones de secuencias se hicieron análisis tipo BLAST usando la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

### 2.8.2. Análisis en GeConT (Gene Context Tool).

El programa GeConT (Ciria *et al.*, 2004), fue diseñado para visualizar el contexto del genoma de un gen o un grupo de genes y sus ortólogos en todos los genomas completamente secuenciados. La información gráfica de GeConT puede usarse para analizar la anotación del genoma, la identificación de genes ortólogos funcionales o para verificar el contexto genómico de algún grupo de genes con propiedades comunes.

## Multiple regulators of the Flavohaemoglobin (*hmp*) gene of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium include RamA, a transcriptional regulator conferring the multidrug resistance phenotype

Elizabeth Hernández-Urzúa · David S. Zamorano-Sánchez ·  
José Ponce-Coria · Enrique Morett · Susan Grogan ·  
Robert K. Poole · Jorge Membrillo-Hernández

Received: 4 May 2006 / Revised: 20 July 2006 / Accepted: 30 August 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** Microbial flavohaemoglobins are proteins with homology to haemoglobins from higher organisms, but clearly linked to nitric oxide (NO) metabolism by bacteria and yeast. *hmp* mutant strains of several bacteria are hypersensitive to NO and related compounds and *hmp* genes are up-regulated by the presence of NO. The regulatory mechanisms involved in *hmp* induction by NO and the superoxide-generating agent, methyl viologen (paraquat; PQ), are complex, but progressively being resolved. Here we show for the first time that, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *hmp* transcription is increased on exposure to PQ and demonstrate that RamA, a homologue

of MarA is responsible for most of the *hmp* paraquat regulation. In addition we demonstrate NO-dependent elevation of *Salmonella hmp* transcription and Hmp accumulation. In both *Escherichia coli* and *Salmonella* modest transcriptional repression of *hmp* is exerted by the iron responsive transcriptional repressor Fur. Finally, in contrast to previous reports, we show that in *E. coli* and *Salmonella*, *hmp* induction by both paraquat and sodium nitroprusside is further elevated in a *fur* mutant background, indicating that additional regulators are implicated in this control process.

**Keywords** Flavohaemoglobin · Nitric oxide · Paraquat · Fur · Iron regulation · RamA

E. Hernández-Urzúa · D. S. Zamorano-Sánchez ·  
J. Ponce-Coria · J. Membrillo-Hernández (✉)  
Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular,  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
P.O. Box 70-228, Coyoacán, Mexico City 04510, Mexico  
e-mail: jmh@biomedicas.unam.mx

S. Grogan · R. K. Poole  
Krebs Institute for Biomolecular Research,  
Department of Molecular Biology and Biotechnology,  
University of Sheffield, Sheffield, UK

E. Morett  
Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología,  
Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Mexico City, Mexico

**Present Address:**  
S. Grogan  
Department of Medicine, Section of Infectious Disease,  
Boston University School of Medicine, 650 Albany Street,  
EBRC, Room 630, Boston, MA 02118, USA

### Introduction

Haemoglobins are defined as haem proteins that bind oxygen reversibly. Microbial haemoglobins can be classified into two broad groups. The first comprises globins resembling classical myoglobin or haemoglobin as in the case of *Vitreoscilla* Vgb (Wakabayashi et al. 1986), or *Campylobacter jejuni* Cgb (Elvers et al. 2004). The second broad group comprises the chimeric flavohaemoproteins, composed of a single polypeptide having both a single haem and FAD (Wu et al. 2003a, b; Poole and Hughes 2000). These proteins are composed of an N-terminal domain homologous to vertebrate, plant and *Vitreoscilla* globins, and a C-terminal domain with FAD- and NAD(P)H-binding sites as in proteins of the ferredoxin-NADP reductase family (Ermler et al. 1995; Ilari et al. 2002). Closely related flavohaemoglobins occur in yeast (Zhu and Riggs 1992; Iwaasa et al. 1992) and different bacteria (Vasudevan et al. 1991; Cramm et al.

1994; Favey et al. 1995; Lacelle et al. 1996; Crawford and Goldberg 1998a, b). On the basis of polymerase chain reactions experiments (Membrillo-Hernández and Poole 1997) and of genome sequence projects (<http://www.tigr.org/microbial>), related haemoglobins are predicted to be present in many other bacteria.

A role for microbial globins in protection from NO stress was first suggested by the observation of a significant increase in the transcription of the *hmp* gene (encoding the flavohaemoglobin of *Escherichia coli*) in response to NO (Poole et al. 1996). This was further supported by the increased sensitivity to NO-releasing agents of defined *hmp* mutant strains of *E. coli* (Membrillo-Hernández et al. 1999) and *S. typhimurium* (Crawford and Goldberg 1998b). Moreover, purified Hmp protein has NO dioxygenase or denitrosylase activity, forming nitrate under aerobic conditions (Gardner et al. 1998; Hausladen et al. 1998; Hausladen et al. 2001) and also, with much reduced activity, reducing NO to N<sub>2</sub>O under anaerobic conditions (Kim et al. 1999). These findings strongly suggest that the main function of flavohaemoglobins is to provide protection from the toxicity of NO. In fact, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *hmp*-deficient mutants are impaired in pathogenicity due to their increased sensitivity to the NO-related killing process exerted by macrophages (Stevanin et al. 2002). Although the role of several flavohaemoglobins in NO detoxification is now well established (Frey et al. 2002; Wu et al. 2003a, 2003b; Gardner 2005; Poole 2005), the transcriptional regulatory mechanisms responsible for NO induction of *hmp* genes are still being uncovered.

Two of the most studied flavohaemoglobin genes are those from *E. coli* (hereafter *hmp<sub>Ec</sub>*) and *S. enterica* serovar Typhimurium (hereafter *hmp<sub>St</sub>*). *hmp<sub>Ec</sub>* expression is induced 19-fold by NO under aerobic or anaerobic conditions independently of the SoxRS system (Poole et al. 1996). In addition, a 10- to 15-fold induction was observed when aerobically or anaerobically grown cells were treated with the iron-chelating agent 2,2'-dipyridyl suggesting the involvement of an iron regulatory protein (Poole et al. 1996; Anjum et al. 1998). Fnr is a regulator of *hmp<sub>Ec</sub>* gene expression but only under anaerobic conditions (Cruz-Ramos et al. 2002; Poole et al. 1996). Inactivation by nitrosylation of the Fe-S cluster of Fnr with formation of a dinitrosyl-iron-cysteine complex lowers the affinity of binding of Fnr to the "Fnr box" near the translational start codon ATG (Cruz-Ramos et al. 2002; Poole et al. 1996). Thus repression of *hmp* transcription by active Fnr is lifted in the presence of NO and its congeners. Under aerobic conditions, and presumably anoxic conditions also, MetR (a methionine biosynthesis transcriptional

regulator) activates *hmp* gene expression in response to nitrosothiols but not to NO per se (Membrillo-Hernández et al. 1998). Other regulators such as RpoS and IHF, known to affect *hmp* expression, apparently are not involved in the *hmp<sub>Ec</sub>* induction by NO (Membrillo-Hernández et al. 1996, 1997a). Very recently, the *yjeB* (*nsrR*) gene of *E. coli* has been shown to encode a NO-sensitive transcriptional regulator of *hmp* and other genes known to be involved in nitrosative stress tolerance (Bodenmiller and Spiro 2006). Interestingly, *hmp<sub>Ec</sub>* is also strongly induced by methyl viologen (Paraquat; PQ) independently of the SoxRS system (Membrillo-Hernández et al. 1997b) but neither its physiological significance nor the mechanism for transcriptional control have been so far clarified.

In *Salmonella*, it was reported that *hmp<sub>St</sub>* is regulated by the iron responsive protein Fur (Crawford and Goldberg 1998a) but the  $\Phi$ (*hmp-lacZ*) operon fusion used is in fact an  $\Phi$ (*iroC-lacZ*) fusion (Crawford and Goldberg 2006), rendering earlier conclusions invalid. Nevertheless, it has been independently demonstrated (D'Autreaux et al. 2002) that the Fur protein is directly inhibited by nitrosylation of the iron and so, in principle, Fur might act as a transcriptional regulator of *hmp* genes.

In this work, we constructed and analysed  $\Phi$ (*hmp-lacZ*) fusions for both the *E. coli* and *Salmonella* promoter regions. Since (a) Fur has not been implicated in regulation of *hmp<sub>Ec</sub>* and (b) doubt has been cast on the Fur regulation of *hmp<sub>St</sub>*, we used these fusions to examine regulation of each promoter in each species, since both genes respond to NO and the DNA promoter regions of *hmp<sub>St</sub>* and *hmp<sub>Ec</sub>* share extensive sequence identity. Our results demonstrate for the first time that Fur is a weak repressor of both *hmp* genes. In addition, we report on the PQ regulation of the *hmp<sub>St</sub>* and report that RamA, a homologue of MarA in *Salmonella* is responsible for most of the *hmp<sub>St</sub>* induction by this redox-cycling agent.

## Methods

### Bacterial strains, plasmids, media and growth conditions

*Escherichia coli* and *S. enterica* serovar Typhimurium strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Cells were grown in rich medium (LB; Miller 1972) supplemented as appropriate with ampicillin (200 µg/ml), chloramphenicol (25 µg/ml), tetracycline (25 µg/ml) or kanamycin (25 µg/ml). Culture optical density at 600 nm (apparent A<sub>600</sub>) was measured with a

**Table 1** Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant genotype	Source or reference
<i>Escherichia coli</i>		
MC4100	F <sup>-</sup> <i>araD139 ΔlacU169 rpsL150 relA1 ffb-5301 deoC1 pts F25</i>	Michael Casadaban
JMH0252	MC4100, pRS415 Φ( <i>hmp<sub>Ec</sub>-lacZ</i> )	This study
JMH1216	MC4100, pRS415 Φ( <i>hmp<sub>St</sub>-lacZ</i> )	This study
JMH1179	MC4100 <i>Δfur::kan</i>	This study
JMH1211	JMH1179, pRS415 Φ( <i>hmp<sub>Ec</sub>-lacZ</i> )	This study
JMH1251	JMH1179, pRS415 Φ( <i>hmp<sub>St</sub>-lacZ</i> )	This study
JMH1085	MC4100 <i>soxR::cat</i>	This study
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium		
JMH1177	UA1784, <i>fur::ΩCm</i>	S. Campoy
JMH1212	JMH1177, pRS415 Φ( <i>hmp<sub>Ec</sub>-lacZ</i> )	This study
JMH1213	JMH1177, pRS415 Φ( <i>hmp<sub>St</sub>-lacZ</i> )	This study
JMH1262	ATCC 14028	ATCC
JMH1366	ATCC 14028, pRS415 Φ( <i>hmp<sub>St</sub>-lacZ</i> )	This study
JMH1367	ATCC 14028, pRS415 Φ( <i>hmp<sub>Ec</sub>-lacZ</i> )	This study
JS219	14028 <i>fur41::kan</i>	Kehres et al. (2002)
MCS2A	14028 <i>hmp::kan</i>	Crawford and Goldberg (1998a, b)
TS1	ATCC 14028 <i>ΔramA::kan</i>	van der Straaten et al. (2004a)
TS2	ATCC 14028 <i>ΔsoxRS::tet</i>	van der Straaten et al. (2004b)
Plasmids		
pRS415	<i>lacZYA</i> operon fusion vector, Amp <sup>R</sup>	Simons et al. (1987)
EHU01	pRS415 Φ( <i>hmp<sub>Ec</sub>-lacZ</i> )	This study
EHU30	pRS415 Φ( <i>hmp<sub>St</sub>-lacZ</i> )	This study

Jenway 6100 spectrophotometer in cells of 10-mm path length after appropriate dilution. Cultures were grown at 37°C with shaking (200 rpm) in conical flasks containing about 1/5 of their own volume of medium and inoculated with 1% of the culture volume using an overnight culture. Sodium nitroprusside (SNP; Sigma, St. Louis, MO, USA) (400 μM) or Methyl Viologen (Paraquat; PQ; Sigma) (400 μM) were used as indicated in the figure legends.

#### Construction of plasmids EHU1 Φ(*hmp<sub>Ec</sub>-lacZ*) and EHU30 Φ(*hmp<sub>St</sub>-lacZ*)

A 400 bp fragment containing the promoter region of the *hmp<sub>Ec</sub>* was PCR amplified using oligonucleotides JMH5 *hmp<sub>Ec</sub>* 5'-GCTTGAATTC<sup>CCCGCATCTCCTG</sup> ACTCAGC-3' and JMH3*hmp<sub>Ec</sub>* 5'-CCCCGGATCC ACCAGTAAAGGGATGGTGG-3', and a 401 bp fragment containing the promoter region of the *hmp<sub>St</sub>* was PCR amplified using oligonucleotides JMH5*hmp<sub>St</sub>* 5'-CGCTGAATTC<sup>TCCCGCATCTCCTGA</sup>-3' and JMH3*hmp<sub>St</sub>* 5'-CGGTGGATCC<sup>TCAACCAGCAGGG</sup> G-3'. Both PCR fragments were digested with *EcoRI* and *BamHI* and cloned into plasmid pRS415 (Simons et al. 1987) digested with the same enzymes. Plasmids bearing transcriptional *lacZ* fusions were used to transform by electroporation strain MC4100 (Table 1), purified, and subjected to DNA sequencing; correct constructs were introduced by electroporation into

wild-type and mutant strains of *E. coli* and *S. enterica* serovar Typhimurium as indicated in the results section.

#### Genetic techniques

Genetic crosses were performed with bacteriophage P1<sub>vir</sub>-mediated transduction (Miller 1972). Plasmid DNA was isolated with the QIAGEN QIAprep kit (Valencia CA). DNA fragments were isolated from 1% agarose gels with the QIAGEN QIAquick kit. Transformation of bacteria with plasmid DNA was done by electroporation. Restriction enzymes and T4 DNA ligase were from New England BioLabs, Inc. (Beverly, MA, USA) or Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). DNA polymerase (Pfu) was from Stratagene (La Jolla, CA, USA).

#### β-Galactosidase assays

β-Galactosidase activity was measured as described by Miller (1972) and Giacomini et al. (1992). Assays were carried out at room temperature (around 25°C). Cell pellets were suspended in 2.5 to 4 ml of Z buffer (Miller 1972) and stored on ice. β-Galactosidase activity in CHCl<sub>3</sub>- and sodium dodecyl sulfate-permeabilised cells was measured by monitoring the hydrolysis of *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside. Activities are expressed in terms of the OD<sub>600</sub> of cell suspensions by the formula



of Miller (1972). Each culture was assayed in triplicate; results were confirmed in at least two or three independent experiments.

#### Northern blot analyses

Total RNA was extracted from exponentially growing cultures (0.5 OD<sub>600 nm</sub>) of *Salmonella* or *E. coli* using a modified version of the hot-phenol protocol (Aiba et al. 1981). SNP or PQ was added prior to RNA extraction as indicated in Fig. 4. Quantification of RNA was performed in an Amersham UV spectrophotometer at 260 nm. Samples (30 µg) with a 260/280 nm ratio of 1.8 or higher were loaded into a 1% agarose gel containing 20 mM guanidinium thiocyanate as previously reported (Goda et al. 1995; Membrillo-Hernández et al. 1999). Electrophoresis was run at 8 V/cm for 2.5 h. The ECL Hybridization system (Amersham, Uppsala, Sweden) was used for Northern blot analyses using PCR-generated *hmp* DNA fragments from *E. coli* or *Salmonella* as probes.

#### Western blot analysis

For the immunoblotting experiments, *S. enterica* cultures were grown under the same conditions used for the RNA assays; cells were harvested, disrupted by sonication and cell debris was removed by centrifugation. The crude extract was centrifuged at 160,000 × g for 1 h and the supernatant (soluble extract) was decanted. Total soluble protein was determined according to the method of Bradford (Bradford 1976) using BSA for standardization. Each protein sample was separated by SDS-PAGE and transferred to

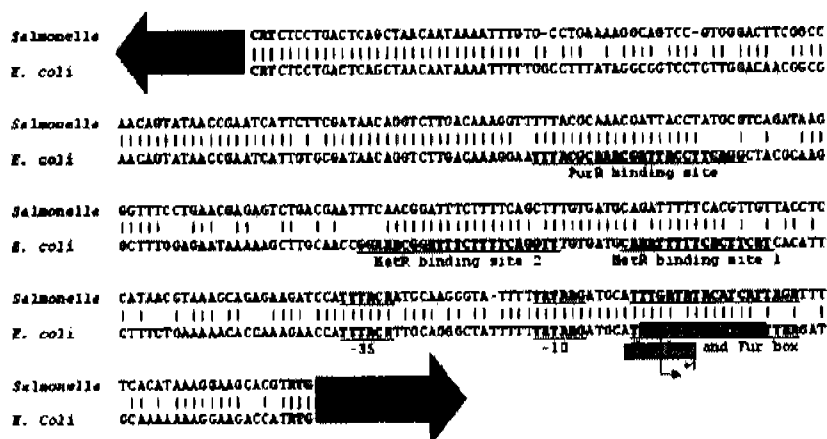
nitrocellulose membranes overnight at 11 mA. The membrane was incubated with rabbit polyclonal antiserum raised against *E. coli* Hmp protein (Stevanin et al. 2002), then with rabbit monoclonal secondary antibody. Detection was done with the ECL chemiluminescence system (Amersham).

#### Results and discussion

##### DNA sequence similarity between *E. coli* and *S. enterica* serovar Typhimurium *glyA-hmp* intergenic regions

Alignment of the *E. coli* and *S. glyA-hmp* intergenic DNA sequences reveals 77% identity between the two regulatory sequences (Fig. 1) and clear conservation in the regulatory regions (Schwartz et al. 2000). Regulation within the intergenic *glyA-hmp* region in *E. coli* and *Salmonella* is complex and several transcriptional regulators such as MetR, PurR and recently CsgD are known to be involved in *glyA* and *hmp* expression (Chirwa and Herrington 2004; Koskenkorva et al. 2006). Importantly, both the *E. coli* and *Salmonella hmp* genes are strongly up-regulated by NO (Poole et al. 1996; Poole 2005).

In *Salmonella*, the iron-uptake regulator protein Fur was previously implicated in the NO-regulation of *hmp*<sub>Sr</sub> (Crawford and Goldberg 1998a, b) but the fusion described in that work is now known not to report *hmp* transcription (Crawford and Goldberg 2006). Nevertheless, independently D'Autreaux et al. (2002) have described a slight effect of Fur on *hmp* transcription in *E. coli* (unpublished, cited in D'Autreaux



**Fig. 1** DNA sequence alignment of the *glyA-hmp* intergenic regions in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (top) and *Escherichia coli* (bottom). Identical nucleotides are shown by a vertical line. Regulatory binding sites for MetR, PurR, and Fur boxes are in

bold and underlined letters; nucleotides belonging to the *E. coli* Fnr box are in italics and boxed in grey. The experimentally determined *hmp*<sub>Ec</sub> transcriptional start site is shown by an arrow. The *hmp*<sub>Ec</sub> Pribnow -10 and the -35 boxes are indicated

et al. 2002), evident as a twofold induction in a *fur* mutant. The transcriptional start site for *hmp<sub>St</sub>* has yet to be determined but, due to 100% identity with the experimentally determined -35 (TTTACA) and -10 (TATAAG) boxes of *hmp<sub>Ec</sub>*, it is likely that both *hmp* transcripts start at the G located at position -38 bp upstream from the translational start codon ATG (Fig. 1). Interestingly, a very recent and independent in silico study using the Bacterial PROMoter prediction program BPROM (<http://www.softberry.com>) arrived at the same conclusion (Koskenkorva et al. 2006). Examination of the putative Fur box in *Salmonella* showed a 10 out of 19 match with the bacterial Fur box, whereas the *E. coli* Fur box displayed a 7 out of 19 match (Baichoo and Helmann 2002; Lavrrar and McIntosh 2003). In the *hmp<sub>Ec</sub>* gene, the Fur box overlaps with the experimentally determined transcriptional start site (Fig. 1; Membrillo-Hernández et al. 1997a).

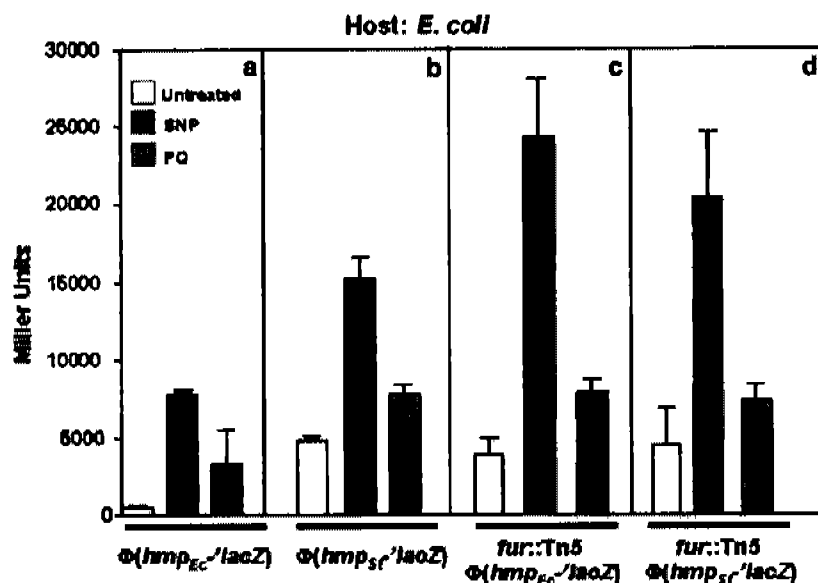
#### $\beta$ -Galactosidase activity of $\Phi(hmp_{Ec}-lacZ)$ and $\Phi(hmp_{St}-lacZ)$ transcriptional fusions in *E. coli*

The DNA sequence analysis of the regulatory regions of both *hmp* genes led us to think that, notwithstanding the lack of evidence from the transcriptional fusion of *hmp<sub>St</sub>*, (Crawford and Goldberg 1998a, 2006), both this and the *E. coli* gene might be regulated by the NO-sensitivity of Fur (D'Autreaux et al. 2002). To test this idea, we constructed two plasmid-borne  $\Phi(hmp-lacZ)$  transcriptional fusions in order to monitor *hmp<sub>Ec</sub>* or *hmp<sub>St</sub>* transcriptional activity (see Methods). Both fusions carry the entire intergenic *glyA-hmp* DNA region (Fig. 1). We used pRS415 as plasmid vector, since it is able to replicate in both *Salmonella* and

*E. coli* (Simons et al. 1987). Each fusion-bearing plasmid was transformed first into *E. coli* strain MC4100 (Table 1) and the  $\beta$ -galactosidase activity levels were determined in exponentially growing cultures. Basal levels of *hmp<sub>St</sub>* expression (Fig. 2b) were five-fold higher than those of *hmp<sub>Ec</sub>* (Fig. 2a). Addition of the nitrosating agent (NO<sup>+</sup> donor), sodium nitroprusside (SNP; 200  $\mu$ M), resulted in a seven- and threefold induction in the expression levels of *hmp<sub>Ec</sub>* and *hmp<sub>St</sub>*, respectively (Fig. 2a, b). These data are in good agreement with previous results using a monolysogen in *E. coli* (Poole et al. 1996; Membrillo-Hernández et al. 1997a, b).

The superoxide-generating agent methyl viologen (paraquat, PQ) was found to be a potent inducer of *hmp<sub>Ec</sub>* expression (Membrillo-Hernández et al. 1997b; Pomposiello et al. 2001). Interestingly *hmp<sub>Ec</sub>* was the first gene reported to be induced by PQ in the absence of the two-component global regulatory system SoxRS (Membrillo-Hernández et al. 1997b; see later). However, no data on the effect of PQ on *hmp<sub>St</sub>* gene expression have been reported. We therefore determined the  $\beta$ -galactosidase activity levels of the same *E. coli* strains carrying the *E. coli* or *Salmonella*  $\Phi(hmp-lacZ)$  fusion in the presence of PQ. As shown in Fig 2a, addition of PQ caused a three- to fourfold induction of *hmp<sub>Ec</sub>* expression, confirming our earlier results (Membrillo-Hernández et al. 1997b). Interestingly, the *hmp<sub>St</sub>* gene expression was also induced 1.5-fold by PQ (Fig. 2b). Taken together, these results indicate that, in an *E. coli* genetic background, *hmp<sub>St</sub>* is induced by SNP and PQ and that its promoter is stronger than that of *hmp<sub>Ec</sub>*, whether in untreated cells or cells challenged with SNP or PQ.

**Fig. 2**  $\beta$ -Galactosidase activity of  $\Phi(hmp_{Ec}-lacZ)$  and  $\Phi(hmp_{St}-lacZ)$  constructs in wild type and *fur* derivative *E. coli* strains. Plasmids EHU1 and EHU30 were transformed into wild type (a, b) or into an isogenic *fur* mutant strain (c, d). Cultures were grown to the mid-exponential phase and then treated for 45 min with SNP (sodium nitroprusside, 200  $\mu$ M; black bars), PQ (Methyl Viologen, 200  $\mu$ M; grey bars) or left untreated (empty bars).  $\beta$ -Galactosidase activity levels are expressed as Miller Units (Miller 1972). Standard deviations of four different experiments are shown



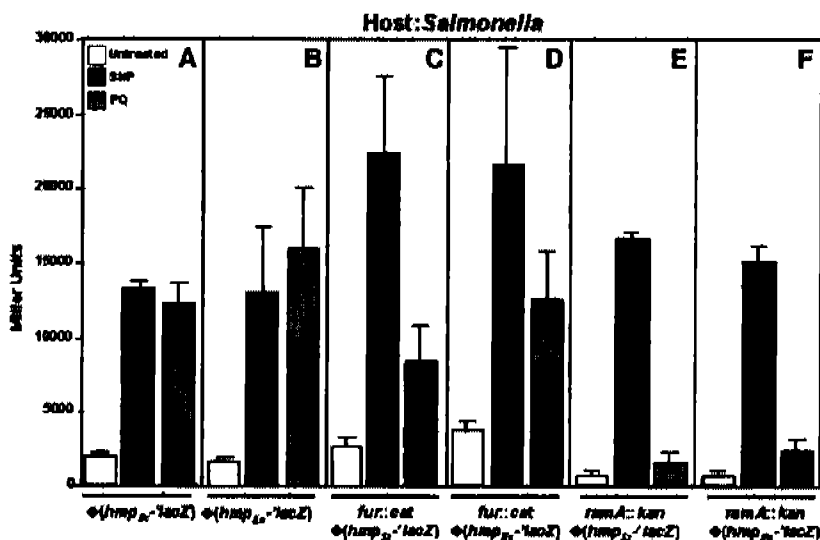
To test whether or not the *E. coli* Fur protein could regulate *hmp<sub>Ec</sub>* and/or *hmp<sub>St</sub>* in response to NO or PQ, we transformed a *fur::kan* mutant *E. coli* strain (Table 1) with the fusion-carrying plasmids and determined  $\beta$ -galactosidase activities. As shown in Fig. 2c, the lack of *fur* caused a three- to fourfold increase in the  $\Phi(hmp_{Ec}-lacZ)$  activity levels suggesting a role for Fur in *hmp<sub>Ec</sub>* repression. When the  $\Phi(hmp_{St}-lacZ)$  fusion was tested (Fig. 2d), no significant changes relative to the wild-type background (Fig. 2b) were observed in untreated cells. Addition of SNP in the *fur::kan* background resulted in a 6-fold induction in the *hmp<sub>Ec</sub>* transcriptional activity levels (but a 25-fold induction when compared to the wild-type levels of expression) (Fig. 2d). In the case of *hmp<sub>St</sub>*, a fivefold induction was observed with SNP (slightly higher than the magnitude observed for the wild type strain). Treatment with PQ in the *fur::kan* background resulted in a twofold induction for *hmp<sub>Ec</sub>* (Fig. 2c, displaying higher levels of expression than those exhibited in a wild type strain) and a lower (1.2-fold) induction for *hmp<sub>St</sub>* (Fig. 2d) These results indicate that, in an *E. coli* genetic background, Fur is a weak repressor of both *hmp* genes.

$\beta$ -Galactosidase activity of  $\Phi(hmp_{Ec}-lacZ)$  and  $\Phi(hmp_{St}-lacZ)$  transcriptional fusions in *S. enterica* serovar Typhimurium

To explore the transcriptional activity of both *hmp* genes in *Salmonella*, fusion-carrying plasmids were

transformed into *Salmonella* wild type strain 14028 (see Methods; Table 1) and the  $\beta$ -galactosidase activity levels were determined. As shown in Fig. 3, similar low levels of basal expression were observed for both *hmp* genes. Likewise, a similar magnitude of induction was detected when SNP was added to exponentially growing cultures (about sevenfold; Fig. 3a, b). When PQ was added to the plasmid-carrying strains, a greater induction of both *hmp* genes was observed (seven- to eightfold increase; Fig. 3b) than that seen in *E. coli*.

To test whether the *Salmonella* Fur protein was the primary transcriptional regulator responsible for the *hmp<sub>St</sub>* and *hmp<sub>Ec</sub>* gene expression in the presence of SNP or PQ, both  $\Phi(hmp-lacZ)$  constructs were transformed into a *Salmonella fur::cat* mutant strain. Unexpectedly, the basal level of expression of *hmp<sub>St</sub>* was only twofold higher (Fig. 3c) than that observed in the wild type strain (Fig. 3a). In a similar way, the levels of expression of *hmp<sub>Ec</sub>* in a *Salmonella fur* genetic background were about twofold higher when compared to those of the wild type strain (Fig. 3d). Both  $\Phi(hmp-lacZ)$  fusions were still induced by SNP (about sixfold) and PQ (two- to threefold, Figs. 3c, d). Taken together, these findings strongly suggest that *Salmonella* bears all the genetic elements needed for eliciting *hmp<sub>St</sub>* or *hmp<sub>Ec</sub>* induction in the presence of PQ or SNP. In addition, the *hmp-lacZ* expression seems not to be influenced by Fur in the absence and presence of PQ and is only slightly repressed by Fur in the presence of SNP in *E. coli* and *Salmonella* (Figs. 2b, d; 3a, c).



**Fig. 3**  $\beta$ -Galactosidase activity of  $\Phi(hmp_{Ec}-lacZ)$  and  $\Phi(hmp_{St}-lacZ)$  constructs in wild type and different mutant *Salmonella* strains. Plasmids EHU1 and EHU30 were transformed into wild type (a, b) or into an isogenic *fur* (c, d) or *ramA* (e, f) mutant strains. Cultures were grown up to the mid exponential phase and

then treated for 45 min with SNP (sodium nitroprusside, 200  $\mu$ M; black bars), PQ (Methyl viologen, 200  $\mu$ M; grey bars) or left untreated (empty bars).  $\beta$ -Galactosidase activity levels are expressed as Miller Units (Miller 1972). Standard deviations of four different experiments are shown

Northern blot analyses of *hmp<sub>Ec</sub>* and *hmp<sub>St</sub>* gene expression

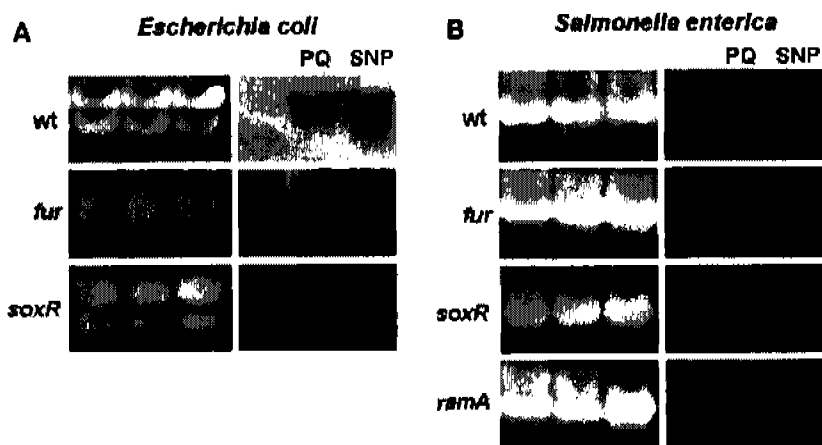
It is widely accepted that the use of gene fusions may not reflect the transcriptional activity of a studied gene (Giacomini et al. 1992; Pessi et al. 2001). To validate our results described above, we carried out Northern blot analyses using RNA extracted from *E. coli* or *Salmonella* wild type and different mutant strains under the same experimental culture conditions. The loading of RNA samples was quantified and standardized in all comparisons (see left-hand set of images in each of Fig. 4a, b). In a wild type *E. coli* strain, the *hmp<sub>Ec</sub>* mRNA transcript could not be detected by Northern blot analysis unless the culture was treated with PQ or SNP where strong hybridization signals were observed (Fig. 4a). Densitometry analysis revealed that there was a 6- or 15-fold increase in *hmp* transcription in the presence of PQ or SNP, respectively. These results are similar to previous Northern blot analyses of the *hmp<sub>Ec</sub>* gene in cultures treated with SNP (Membrillo-Hernández et al. 1999). A *fur* mutation did not result in a detectable increase in *hmp<sub>Ec</sub>* expression in the absence of stressors, but the magnitudes of induction by PQ (16-fold) and SNP (28-fold) were considerably higher than those observed in a wild type strain. These results confirmed our data obtained with a plasmid-borne  $\Phi(hmp-lacZ)$  gene fusion (Fig. 2). When RNA from a wild type *Salmonella* strain was used, again, no detectable signal for the *hmp<sub>St</sub>* transcript was observed in untreated cultures. The failure to observe clear up-regulation in a *fur* mutant in the absence of external stressors, is consistent with the following: 1) *hmp<sub>St</sub>* was not identified as a

Fur-regulated gene in *S. enterica* serovar Typhimurium in two different genome wide studies (Tsolis et al. 1995; Bjarnason et al. 2003), and 2) *hmp<sub>Ec</sub>* was not found among the relevant Fur-regulated genes in parallel genomic studies (McHugh et al. 2003). Addition of PQ or SNP elicited a 9- or 20-fold increment in the signal, respectively (Fig. 4b). In a *fur* mutant, the *hmp<sub>St</sub>* transcript was still undetectable in untreated cultures and a strong induction was observed when PQ (12-fold) or SNP (20-fold) was added (Fig. 4b). These results provide additional molecular evidence suggesting that Fur is not the only regulator of *hmp<sub>St</sub>* in the presence of NO or PQ.

Using an  $\Phi(hmp_{Ec}-lacZ)$  monolysogen fusion, the global regulatory system SoxRS was previously shown not to be involved in the induction of *hmp<sub>Ec</sub>*, by PQ (Membrillo-Hernández et al. 1997b). To determine whether or not regulation  $\Phi(hmp_{St}-lacZ)$  fusion (Fig. 2) was dependent on the SoxRS system, we carried out Northern blot experiments in *E. coli* or *Salmonella soxR* mutant strains. In both cases, we observed an increase in *hmp* mRNA amounts in the presence of PQ or SNP (Fig. 4). Taken together these results confirmed that both *hmp<sub>Ec</sub>* and *hmp<sub>St</sub>* are induced by PQ in a SoxRS-independent manner. To date the transcriptional regulatory factors involved in *hmp<sub>Ec</sub>* regulation by PQ are not known but *Salmonella* has all the transcriptional elements required for the induction of both *hmp* genes suggesting the presence of parallel regulatory circuits.

Western blot analyses of *Hmp<sub>St</sub>*

To determine if a *fur* mutation affects the synthesis of Hmp protein in *S. enterica* serovar Typhimurium we



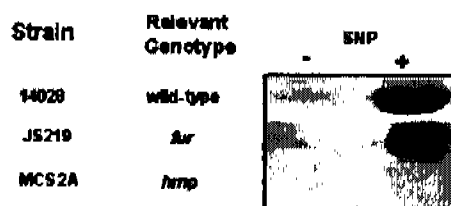
**Fig. 4** Northern blot expression analyses of *hmp<sub>Ec</sub>* and *hmp<sub>St</sub>* in different genetic backgrounds under different culture conditions. Exponentially growing *E. coli* (a) or *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (b) wild type (*wt*), *fur*, *soxR*, or *ramA* strains cultures were treated with 200  $\mu$ M methyl viologen (PQ), 200  $\mu$ M sodium

nitroprusside (SNP) or left untreated for 45 min. RNA was then extracted and subjected to Northern hybridization analysis using the *hmp* sequences of *Salmonella* (a) or *E. coli* (b) as probes. The RNA loading control (ethidium bromide stained agarose gel) is shown on the left hand side of every autoradiograph

carried out Western immunoblot analysis of different strains. As shown in Fig. 5, a clear induction in the amount of Hmp was observed when wild type cells (strain 14028) were treated with SNP (200  $\mu$ M). Interestingly, a *fur* mutant (JS129) exhibited a similar pattern of expression to that of the wild type strain. The apparent discrepancy between the gene fusion experiments (Fig. 5) and the immunoblotting assay is probably the result of protein turnover: we have demonstrated recently (Wu et al. 2004) that purified Hmp when incubated with oxygen and NADH but in the absence of NO, rapidly generates superoxide and peroxide leading to Hmp decay and iron release.

#### Role of RamA in the regulation of *hmp<sub>Sr</sub>* by PQ

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium possesses, in addition to the SoxR/S system, a second transcriptional activator, RamA which is located at about 13.1 min on the *Salmonella* chromosome, which also responds to oxidative stress, specifically to superoxide (van der Straaten et al. 2004a, b; Yassien et al. 2002). The *ramA* gene appears to be specific for *Salmonella* serovars and is absent in many other gram-negative microorganisms; a notable exception is *Klebsiella pneumoniae* (van der Straaten et al. 2004a). Indeed, when overexpressed, *ramA* confers menadione and PQ resistance and also a multi-drug resistance phenotype (MDR; van der Straaten et al. 2004b; Yassien et al. 2002). To determine whether or not RamA was involved in the PQ regulation of *hmp<sub>Sr</sub>*, we carried out Northern Blot analyses using RNA extracted from *Salmonella* wild type and *ramA* mutant strains from untreated and treated cultures with PQ and SNP. As shown in Fig. 4, a *ramA* mutant strain displayed a weak signal when treated with PQ (1.5 to 2-fold induction) but a strong induction when treated with SNP (21-fold induced). These results strongly suggest that RamA is involved in the induction of *hmp<sub>Sr</sub>* by PQ but not in the SNP regulation.



**Fig. 5** Western blot analysis of the Hmp protein in cell extracts from cultures grown aerobically in the absence or presence of SNP. *S. enterica* strains 14028, MCS38, JS129 and MCS2A were grown aerobically to early exponential phase. For treated (+) cultures, 200  $\mu$ M SNP was added and cultures were incubated for a further 45 min. Cell-free extracts were prepared and Hmp was detected using Western blotting

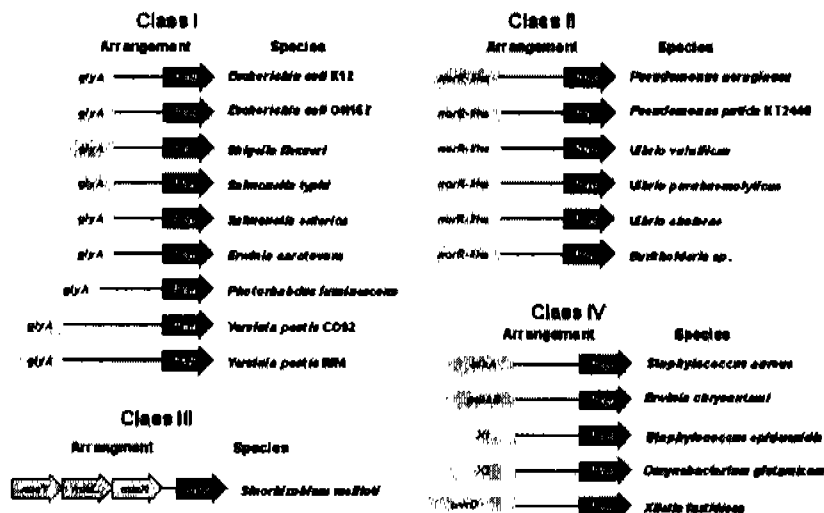
To further explore this phenomenon, both  $\Phi$ (*hmp-lacZ*) constructs were transformed into a *Salmonella ramA::kan* mutant strain. The basal levels of expression of *hmp<sub>Sr</sub>*, as well as of *hmp<sub>Ec</sub>* were lower than their corresponding wild type strains (Fig. 3e, f). Remarkably, both  $\Phi$ (*hmp-lacZ*) fusions were not as heavily induced by SNP as in the wild type strain (approximately 20% less Fig. 3e, f). The most affected regulation was clearly the induction by PQ where more than 80% of the induction was lost. Taken together, these findings strongly suggest that RamA contributes to the regulation of *hmp<sub>Sr</sub>* by PQ.

Interestingly, it has been demonstrated that due to its high similarity with MarA and SoxS, RamA can recognise "Sox boxes" (Li and Demple 1996; Martin and Rosner 2002; Yassien et al. 2002); however it is still unclear if the three transcriptional regulators (MarA, SoxS and RamA) have common promoter targets. It is important to note that the Sox box is very relaxed (AYNGCACNNWNNRYAAAYN where R=A or G, W=A or T, Y=C or T and N=any base; Martin and Rosner 2002) and the DNA sequence that is recognised by RamA is still unknown.

#### Gene context analysis of different *hmp* genes

We reasoned that the neighbours of different *hmp* genes could provide us with a clue to their regulation. We therefore used the novel web interface GeConT (GeneContextTool; Ciria et al. 2004) to analyse the regulatory sequences and the neighbour ORFs of all flavohaemoglobin genes ("*hmp* genes"). Four different classes of genetic arrangements could be easily distinguished (Fig. 6). At least one class (Class II in Fig. 6) of *hmp* genes seems to have preserved a transcriptional regulator in their vicinity in a typical gene-regulator arrangement. All these regulatory genes encode for a member of the  $\sigma^{54}$ -dependent family of regulators (Xu and Hoover 2001). It was recently reported that a member of this family (NorR, formerly known as YgaA) in *E. coli* is responsible for the induction of the *norVW* operon (encoding a flavorubredoxin, divergently transcribed from *norR*) in response to NO (Hutchings et al. 2002; Gardner et al. 2003; daCosta et al. 2003). Thus, NorR is a transcriptional activator protein that responds to NO and it is tempting to suggest that the NorR-orthologues located upstream and divergently transcribed from their corresponding *hmp* genes in *Vibrio cholerae*, *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus*, *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii*, *Burkholderia fungorum* and *Burkholderia*, sp. are indeed their NO-responding regulators (Fig. 6). A different class of *hmp* genes (I) comprises those having

**Fig. 6** GeneConT analysis of different *hmp* genes. DNA sequences from different *hmp* genes were analysed and their neighbouring genes identified using the GenConT Web interface (<http://www.ibt.un-am.mx/biocomputo/gc-cont.html>). Four classes of neighbouring genes were identified. Genes *x1* and *x2* (class IV) encode for a hypothetical protein involved in bacterial cell division and for a hypothetical transport protein respectively, both of unknown function



*glyA* as a divergently transcribed neighbouring gene. It is noteworthy that, in addition to *E. coli* and *S. enterica*, a similar arrangement is found in *Shigella flexneri*, *E. coli* OH157, *Erwinia carotovora* and *S. typhi* (Fig. 6). Within Class I are *hmp* genes from two different *Yersinia pestis* strains having *glyA* as a neighbouring gene but, in these two cases, an insertion event apparently took place in the *glyA-hmp* intergenic regions suggesting that the regulatory region of *hmp* in *Yersinia* is evolving away from *glyA* control. An intermediate case is the *hmp* gene of *Photobacterium luminescens* in Class I where the *glyA-hmp* intergenic region is shorter than that of *Yersinia* but larger than that of *E. coli*. A unique example is the case of *Sinorhizobium meliloti* (Class III) where the *hmp* gene is located in an operon-like arrangement with the nitric oxide-related *nosYVX* operon (Fig. 6) suggesting a potential role in nitrogen metabolism. The significance of other neighbouring genes such as *ldhA* in the case of *Staphylococcus aureus*, *pelAB* in *E. chrysanthemi* or *uvrD* in *Xylella fastidiosa* (all categorized here as Class IV) is yet to be determined. It seems likely that some flavohaemoglobin genes are regulated by NorR-like transcriptional activator factors and that the complex and fine regulation of *hmp* transcription is still incompletely understood. No RamA homologues (from the family of AraC/XylS transcriptional regulators) were found in the vicinity of any *hmp* gene analysed.

## Conclusions

Our results demonstrate for the first time that Fur is a weak repressor of both *hmp<sub>Ec</sub>* and *hmp<sub>St</sub>* genes and that PQ regulation of the *hmp<sub>St</sub>* is mainly mediated by RamA. It is important to note that the transcriptional

regulation of *hmp* by PQ in *E. coli* is still obscure as RamA is not present in the *E. coli* chromosome. Work is in progress to elucidate the regulatory mechanisms concerning PQ regulation of the flavohaemoglobin gene *hmp<sub>Ec</sub>* and to determine whether or not RamA interacts directly with the *hmp* promoter region.

**Acknowledgments** This work was supported by grants J-3369 and 42580-Q from CONACYT (Mexico), 207703 from PAPIIT-UNAM (Mexico), and P18939 from BBSRC (UK). JMH acknowledges The Royal Society and The Wellcome Trust for travelling support. We thank Dr. D. Goldberg and Dr. van Dissel for strains used in this work. Technical assistance from Luis Delgado-Olivares and Miguel Pérez is greatly appreciated. We thank Dr. Mario Soberón, Dr. Laura Camarena and members of the Membrillo-Hernández lab for helpful advises. SG held a BBSRC Research studentship and E. H.-U. holds a Ph.D. Scholarship from CONACYT (Mexico).

## References

- Alba H, Adhya S, Crombrughe B (1981) Evidence for two functional gal promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* 256:11905–11910
- Anjum MF, Ioannidis N, Poole RK (1998) Response of the NAD(P)H-oxidising flavohaemoglobin (Hmp) to prolonged oxidative stress and implications for its physiological role in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 166:219–223
- Baichoo N, Helmann JD (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur Box consensus sequence. *J Bacteriol* 184:5826–5832
- Bjarnason J, Southward CM, Surette MG (2003) Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. *J Bacteriol* 185:4973–4982
- Bodenmiller DM, Spiro S (2006) The *yjeB* (*nsrR*) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. *J Bacteriol* 188:874–881
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254

- Chirwa NT, Herrington MB (2004) Role of MetR and PurR in the activation of *glyA* by CsgD in *Escherichia coli* K-12. *Can J Microbiol* 250:683–690
- Ciria R, Abreu-Goodger C, Morett E, Merino E (2004) GeConT: gene context analysis. *Bioinformatics* 20:2307–2308
- da Costa PN, Teixeira M, Saraiva LM (2003) Regulation of the flavorubredoxin nitric oxide reductase gene in *Escherichia coli*: nitrate repression, nitrite induction, and possible post transcription control. *FEMS Microbiol Lett* 218:385–393
- Cramm R, Siddiqui RA, Friedrich B (1994) Primary sequence and evidence for a physiological function of the flavohemoprotein of *Alcaligenes eutrophus*. *J Biol Chem* 10:7349–7354
- Crawford MJ, Goldberg DE (1998a) Regulation of the *Salmonella typhimurium* flavohaemoglobin gene. A new pathway for bacterial gene expression in response to nitric oxide. *J Biol Chem* 273:34028–34032
- Crawford MJ, Goldberg DE (1998b) Role for the *Salmonella* flavohaemoglobin in protection from nitric oxide. *J Biol Chem* 273:12543–12547
- Crawford MJ, Goldberg DE (2006) Correction. Regulation of the *Salmonella typhimurium* flavohaemoglobin gene. A new pathway for bacterial gene expression in response to nitric oxide. *J Biol Chem* 281:3752
- Cruz-Ramos H, Crack J, Wu G, Hughes MN, Scott C, Thomson AJ, Green J, Poole RK (2002) NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin Hmp. *EMBO J* 21:3235–3244
- D'Autreaux B, Touati D, Bersch B, Latour JM, Michaud-Soret I (2002) Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16619–16624
- Elvers KT, Wu G, Gilberthorpe NJ, Poole RK, Park SF (2004) Role of an inducible single-domain haemoglobin in mediating resistance to nitric oxide and nitrosative stress in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Bacteriol* 186:5332–5341
- Ermiler U, Siddiqui RA, Cramm R, Friedrich B (1995) Crystal structure of the flavohaemoglobin from *Alcaligenes eutrophus* at 1.75 Å resolution. *EMBO J* 24:6067–6077
- Favey S, Labesse G, Vouille V, Boccara M (1995) Flavohaemoglobin HmpX: a new pathogenicity determinant in *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Microbiology* 141:863–871
- Frey AD, Farrés J, Bollinger CJT, Kallio P (2002) Bacterial Haemoglobins and Flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 68:4835–4840
- Gardner PR (2005) Nitric oxide dioxygenase function and mechanisms of flavohaemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. *J Inorg Biochem* 99:247–266
- Gardner PR, Gardner AM, Martin LA, Salzman AL (1998) Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohaemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10378–10383
- Gardner AM, Gessner CR, Gardner PR (2003) Regulation of the nitric oxide reduction operon (*norRVW*) in *Escherichia coli*. Role of NorR and sigma54 in the nitric oxide stress response. *J Biol Chem* 278:10081–10086
- Giacomini A, Corich B, Ollero FJ, Squartini A, Nuti MP (1992) Experimental conditions may affect reproducibility of the  $\beta$ -galactosidase assay. *FEMS Microbiol Lett* 100:87–90
- Goda SK, Minton NP (1995) A simple procedure for gel electrophoresis and Northern blotting of RNA. *Nucleic Acids Res* 23:3357–3358
- Hausladen A, Gow AJ, Stamler JS (1998) Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohaemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14100–14105
- Hausladen A, Gow AJ, Stamler JS (2001) Flavohaemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10108–10112
- Hutchings MI, Mandhana N, Spiro S (2002) The NorR Protein of *Escherichia coli* activates expression of the flavorubredoxin gene *norV* in response to reactive nitrogen species. *J Bacteriol* 184:4640–4643
- Ilari A, Bonamore A, Farina A, Johnson KA, Boffi A (2002) The X-ray structure of ferric *Escherichia coli* flavohaemoglobin reveals an unexpected geometry of the distal heme pocket. *J Biol Chem* 277:23725–23732
- Iwaasa H, Takagi T, Shikama K (1992) Amino acid sequence of yeast hemoglobin. A two-domain structure. *J Mol Biol* 227:948–954
- Kehres DG, Janakiraman A, Maguire ME (2002) Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *mntH* transcription by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>3+</sup> and Mn<sup>2+</sup>. *J Bacteriol* 184:3151–3158
- Kim SO, Orii Y, Lloyd D, Hughes MN, Poole RK (1999) Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. *FEBS Lett* 445:389–394
- Koskenkorva T, Frey AD, Kallio PT (2006) Characterization of heterologous hemoglobin and flavohaemoglobin promoter regulation in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 122:161–175
- LaCelle M, Kumano M, Kurita K, Yamane K, Zuber P, Nakano MM (1996) Oxygen-controlled regulation of the flavohaemoglobin gene in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 178:3803–3808
- Lavrrar JL, McIntosh MA (2003) Architecture of a Fur binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol* 185:2194–2202
- Li Z, Demple B (1996) Sequence specificity for DNA binding by *Escherichia coli* SoxS and Rob proteins. *Mol Microbiol* 20:937–945
- Martin RG, Rosner JL (2002) Genomics of the *marA/soxS/rob* regulon of *Escherichia coli*: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data. *Mol Microbiol* 44:1611–1624
- McHugh JP, Rodriguez-Quifones F, Abdul-Tehrani H, Svis-tunenko DA, Poole RK, Cooper CE, Andrews SC (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278:29478–29486
- Membrillo-Hernández J, Poole RK (1997) Bacterial flavohaemoglobins: a consensus sequence and identification of a discrete enterobacterial group and of further bacterial globins. *FEMS Microbiol Lett* 155:179–184
- Membrillo-Hernández J, Ioannidis N, Poole RK (1996) The flavohaemoglobin (HMP) of *Escherichia coli* generates superoxide in vitro and causes oxidative stress in vivo. *FEBS Lett* 382:141–144
- Membrillo-Hernández J, Cook GM, Poole RK (1997a) Roles of RpoS ( $\sigma^S$ ), IHF and ppGpp in the expression of the *hmp* gene encoding the flavohaemoglobin (Hmp) of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 254:599–603
- Membrillo-Hernández J, Kim SO, Cook GM, Poole RK (1997b) Paraquat regulation of *hmp* (flavohaemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12 is SoxRS independent but modulated by  $\sigma^S$ . *J Bacteriol* 179:3164–3170
- Membrillo-Hernández J, Coopamah MD, Channa A, Hughes MN, Poole RK (1998) A novel mechanism for upregulation of the *Escherichia coli* K-12 *hmp* (flavohaemoglobin) gene by the “NO releaser” S-nitrosoglutathione: nitrosation of homocysteine and modulation of MetR binding to the *glyA-hmp* intergenic region. *Mol Microbiol* 24:1101–1112
- Membrillo-Hernández J, Coopamah MD, Anjum MF, Stevanin TM, Kelly A, Hughes MN, Poole RK (1999) The flavohaemoglobin of *Escherichia coli* confers resistance to a nitrosat-

- ing agent a "nitric oxide releaser" and paraquat and is essential for transcriptional responses to oxidative stress. *J Biol Chem* 274:748–754
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- Pessi G, Blumer C, Haas D (2001) *lacZ* fusions report gene expression, don't they? *Microbiology* 147:1993–1995
- Pomposiello PJ, Bennik MHJ, Demple B (2001) Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J Bacteriol* 183:3890–3902
- Poole RK (2005) Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. *Biochem Soc Trans* 33:176–180
- Poole RK, Hughes MN (2000) New Functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Mol Microbiol* 36:775–783
- Poole RK, Anjum MF, Membrillo-Hernández J, Kim SO, Hughes MN, Stewart V (1996) Nitric oxide, nitrite and Fnr regulation of *hmp* (flavo-haemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 178:5487–5492
- Schwartz S, Zhang Z, Frazer K A, Smit A, Riemer C, Bouck J, Gibbs R, Hardison R, Miller W (2000) PipMaker: a Web server for aligning two genomic DNA sequences. *Genome Res* 10:577–586
- Simons RW, Houman R, Kleckner N (1987) Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* 53:85–96
- Stevanin TM, Poole RK, Demoncheaux EA, Read RC (2002) Flavo-haemoglobin Hmp protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from nitric oxide-related killing by human macrophages. *Infect Immun* 70:4399–4405
- van der Straaten T, Zulianello L, Van Diepen A, Granger DL, Janssen R, van Dissel JT (2004b) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium RamA, intracellular oxidative stress response, and bacterial virulence. *Infect Immun* 72:996–1003
- van der Straaten T, Janssen R, Mevius DJ, van Dissel JT (2004a) *Salmonella* gene *rma* (*ramA*) and multiple-drug-resistant *Salmonella enterica* Serivar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2292–2294
- Tsolis RM, Bäumlér AJ, Stojiljkovic I, Heffron F (1995) Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: Identification of new iron-regulated genes. *J Bacteriol* 177:4628–4637
- Vasudevan SG, Armarego WLF, Shaw DC, Lilley PE, Dixon RE, Poole RK (1991) Isolation and nucleotide sequence of the *hmp* gene that encodes a haemoglobin-like protein in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 226:49–58
- Wakabayashi S, Matsubara H, Webster DA (1986) Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature* 322:481–483
- Wu G, Wainwright LM, Poole RK (2003a) Microbial Globins. *Adv Microb Physiol* 47:255–310
- Wu G, Wainwright LM, Membrillo-Hernández J, Poole RK (2003b) Bacterial Hemoglobins: Old proteins with "new" functions? Roles in respiratory and nitric oxide metabolism. In: Zanoni D (ed) *Respiration in Archaea and Bacteria*. Kluwer, Dordrecht
- Wu G, Corker H, Orii Y, Poole RK (2004) *Escherichia coli* Hmp an "oxygen-binding flavohaemoprotein" produces superoxide anion and self-destructs. *Arch Microbiol* 182:193–203
- Xu H, Hoover TR (2001) Transcriptional regulation at a distance in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4:138–144
- Yassien MA, Ewis HE, Lu Ch-D, Abdelal AT (2002) Molecular cloning and characterisation of the *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi B *rma* gene, which confers multiple drug resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:360–366
- Zhu H, Riggs AF (1992) Yeast flavohaemoglobin is an ancient protein related to globins and a reductase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5015–5059



### 3.1. RESULTADOS ADICIONALES AL ARTÍCULO.

#### 3.1.1. Análisis de la unión de la proteína Fur de *E. coli* a la región intergénica *glyA-hmp* de *E. coli* y *Salmonella*.

En el artículo Hernández-Urzúa *et al.* 2006, una de las conclusiones fue que, la proteína Fur participa como un regulador negativo en la expresión del gen *hmp*. Además anteriormente D'Autréaux y colaboradores (2002) habían demostraron que Fur se inactiva por la presencia de NO.

Para poder determinar si Fur se une a las secuencias intergénicas *glyA-hmp* de *E. coli* y *Salmonella* se realizaron ensayos electroforéticos de retardo de bandas (ver Material y Métodos). Las secuencias intergénicas *glyA-hmp* de *E. coli* o *Salmonella* se usaron como sondas para ser incubadas con la proteína Fur de *E. coli*, purificada a partir de cultivos de una cepa que sobreexpresa el gen *fur* bajo un promotor de la polimerasa del fago T7.

Para la purificación de la proteína Fur se utilizó el plásmido pET3a-*fur*, donado por la Dra. Jung-Hye Roe (Lee *et al.*, 2003) de la Universidad de Seul, Corea del Sur. Este plásmido tiene clonado el gen *fur* bajo un promotor T7, para que este gen se exprese se debe de inducir la RNA polimerasa T7, que en la cepa BL21 esta bajo el promotor *trc* y es inducida por la presencia de IPTG. Realizando cultivos de la cepa JMH1255 en presencia de 1 mM de IPTG se logró sobreexpresar a la proteína Fur de aproximadamente 14 kDa (Figura 3). La purificación de esta proteína se realizó mediante el Kit Ni-NTA Spin de QIAGEN (ver Material y Métodos, Figura 4A).

Las sondas de DNA de la región intergénica *glyA-hmp* (Figura 4B) de *E. coli* y *Salmonella* se obtuvieron mediante PCR usando los oligonucleótidos HMP1 y HMP2 para *E. coli* y HMP1St y HMP2St para *Salmonella* (ver secuencia en Tabla 6). Se usó una mezcla de dNTP's conteniendo  $\alpha$ CTP [ $^{32}$ P] para marcar las secuencias de DNA. En la región intergénica *glyA-hmp* la secuencia de unión de la

proteína Fur (Fur box) se encuentra entre las bases -23 a -41 hacia el extremo 5' al sitio de inicio de la traducción, esta secuencia empalma con la secuencia de unión de Fnr (Fnr box), otro factor transcripcional involucrado en la expresión del gen *hmp* bajo condiciones anaeróbicas, además obstruye el sitio de unión a la transcripción (Ver Figura 1 del artículo Hernández-Urzúa *et al.*, 2006).

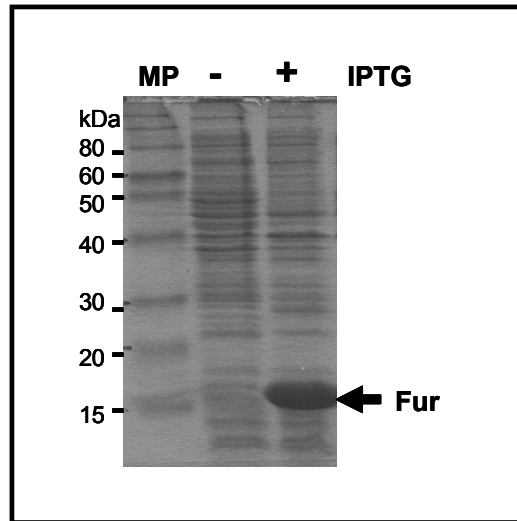


Figura 3. Sobreexpresión de la proteína Fur de *Escherichia coli*. Se realizaron cultivos de la cepa JMH1255 en ausencia y presencia de 1 mM de IPTG. En geles de poliacrilamida-SDS al 15% teñido con una solución de Azul de Coomassie se observó la sobreexpresión de Fur.

Los ensayos electroforéticos de retardo de bandas (ver Material y Métodos) se realizaron incubando diferentes concentraciones de la proteína Fur purificada, la cual fue reconstituida agregando ditionita, con las sondas de DNA. Para poder observar los complejos DNA-Proteína se realizaron geles de poliacrilamida al 8% suplementados con 2% de glicerol (Figura 4C).

Los resultados de estos ensayos (Figura 4C) indicaron que en presencia de cantidades crecientes de la proteína Fur se forma un complejo DNA-Proteína, con la sonda *hmp E. coli* y la sonda *hmp Salmonella*. Esto demostró que la proteína Fur de *E. coli* es capaz de unirse a la secuencia intergénica *glyA-hmp* de *E. coli* y además a la de *Salmonella*. Además Fur se une al DNA, para regular la transcripción del gen *hmp* de *E. coli*, aún con 7 pares de bases de las 19 del

consenso de unión de Fur, por lo tanto las diferencias que presenta la secuencia Fur box de *E. coli* y *Salmonella* no son importantes para este reconocimiento.

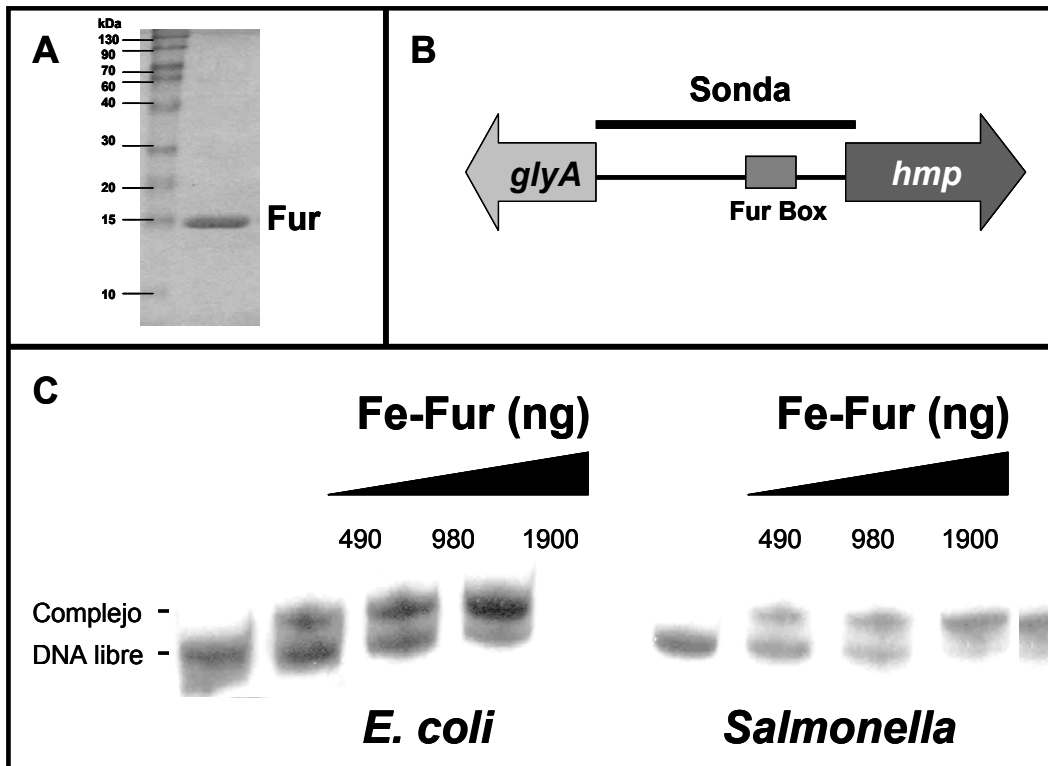


Figura 4. Ensayo electroforético de retardo de bandas.

A. Purificación de la proteína Fur. Gel de poliacrilamida-SDS al 15%. B. Esquema de la sonda de DNA utilizada en estos ensayos. C. Imágenes de las placas autoradiográficas de los geles de poliacrilamida al 8% suplementados con 2% de glicerol donde se muestran los complejos DNA-Proteína.

### 3.1.2. Análisis de la secuencia de las proteínas Fur de *E. coli* y *Salmonella*.

Los resultados anteriores de ensayos electroforéticos de retardo de bandas demostraron que la proteína Fur de *E. coli* también reconoce la secuencia del promotor de *hmp* de *Salmonella*. Adicionalmente se realizó un análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas Fur de *E. coli* y *Salmonella* (Figura 5).

Se ha demostrado que el dominio N-terminal de la proteína Fur es el que reconoce al DNA, mientras que el dominio C-terminal es el encargado de la dimerización de la proteína. Los resultados de este análisis nos indican que estas dos proteínas presentan un 97% de identidad, solo hay diferencias en los últimos 5

aminoácidos que se encuentran en el dominio C-terminal encargado de la dimerización de Fur.

Secuencia de Fur			
<i>E. coli</i>	1	MTDNNTALKKAGLKVTLPRLKILEVLQEPDNHHVSAEDLYKRLIDMGEEI	50
<i>Salmonella</i>	1	MTDNNTALKKAGLKVTLPRLKILEVLQEPDNHHVSAEDLYKRLIDMGEEI	50
<i>E. coli</i>	51	GLATVYRVLNQFDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQHHHDHLICLDCGKV	100
<i>Salmonella</i>	51	GLATVYRVLNQFDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQHHHDHLICLDCGKV	100
<i>E. coli</i>	101	IEFSDDSIEARQREIAAKHGIRLTNHSLYLYGHCAEGDCREDEHAH <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">EGK</span>	148
<i>Salmonella</i>	101	IEFSDDSIEARQREIAAKHGIRLTNHSLYLYGHCAEGDCREDEHAH <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">DDATK</span>	150

Figura 5. Alineamiento de la secuencia peptídica de Fur de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

### 3.1.3. Conclusiones y Perspectivas.

Los resultados publicados en el artículo Hernández-Urzúa *et al.* (2006) junto con estos resultados adicionales, demuestran que la proteína Fur funciona como un represor de la expresión del gen *hmp* de *E. coli* y de *Salmonella*. Además por los resultados obtenidos de los ensayos electroforéticos de retardo de bandas, este activador se une a la secuencia promotora del gen, muy probablemente en la secuencia identificada como la Fur box. Estos resultados demuestran que en ambas bacterias la regulación del gen *hmp* es muy similar, inclusive los factores transcripcionales involucrados en la regulación de este gen funcionan de manera similar, como el mecanismo que involucra al regulador NsrR recientemente reportado en *E. coli* (Bodenmiller y Spiro, 2006) y en *Salmonella* (Bang *et al.*, 2006).

En este trabajo también se demostró que en *Salmonella* la regulación de *hmp* por la presencia de PQ se encuentra principalmente mediada por la proteína RamA, codificada por gen *ramA* que ha sido identificado como un gen de resistencia a multidroga en *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serovar

Paratyphi y *Enterobacter aerogenes* (George *et al.*, 1995; Yassien *et al.*, 2002; van der Straaten *et al.*, 2004a y 2004b; Chollet *et al.*, 2004). Esta proteína pertenece a la familia de reguladores transcripcionales tipo AraC junto con MarA y SoxS, pero RamA solo se ha encontrado en el género *Salmonella* (van der Straaten *et al.*, 2004b) y en *Klebsiella pneumoniae* (George *et al.*, 1995). Se ha demostrado que RamA se une a la región promotora de algunos genes que pertenecen al regulón SoxRS reconociendo la secuencia de unión de SoxS (Yassien *et al.*, 2002), sin embargo experimentos realizados por Membrillo-Hernández y colaboradores han demostrado que *hmp* no es parte del regulón, ya que en ausencia de *soxR* o *soxS* el gen se induce por la presencia de PQ o SNP (Membrillo-Hernández *et al.*, 1997; Pomposiello *et al.*, 2001).

Aún se desconoce si en *E. coli* existe un factor transcripcional involucrado en la regulación de la expresión del gen *hmp* solo por la presencia de superóxido, pero hay que tomar en cuenta que en este trabajo se obtuvo evidencia que en ausencia del gen *ramA* en el fondo genético de *Salmonella* la expresión de la fusión  $\Phi(hmp_{Ec}-lacZ)$  disminuye en presencia de PQ, similar a la fusión  $\Phi(hmp_{St}-lacZ)$ , lo que sugiere que posiblemente exista un mecanismo similar al de RamA en *Salmonella*, aunque aún no sabemos el papel de RamA en la regulación de este gen.

Una vez determinado que RamA está involucrada en la expresión de *hmp* en *Salmonella* en respuesta al PQ, hay que determinar si su efecto es directo, es decir si reconoce una secuencia específica en la región reguladora del gen *hmp*, o si es indirecto, tal vez regulando la transcripción de otro gen que codifique para una proteína involucrada en la regulación de *hmp*. Para determinar el papel de RamA en la regulación de *hmp* una perspectiva es llevar a cabo la clonación *ramA* y sobreexpresión de la proteína, para poder hacer su purificación y realizar ensayos electroforéticos de retardo de bandas usando la proteína RamA y la secuencia de la región reguladora de *hmp*.

### 3.2. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *hmp* DE *Escherichia coli* POR PQ Y SNP.

#### 3.2.1. Razonamiento.

Se ha demostrado que la expresión del gen *hmp* (flavohemoglobina) de *E. coli* y de otros microorganismos, es inducido por la presencia de NO<sup>•</sup> gas, agentes liberadores de NO<sup>•</sup> como SNP y por PQ en ausencia del sistema SoxRS, involucrado en la respuesta al estrés oxidativo por la presencia de superóxido y óxido nítrico (Poole *et al.*, 1996, Membrillo-Hernández *et al.*, 1997, 1998, 1999; Pomposiello *et al.*, 2001). Además se ha observado por ensayos de expresión global, que *hmp* es uno de los genes que se expresa mayoritariamente por la presencia de SNP, GSNO y NO<sup>•</sup> en *E. coli* (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Justino *et al.*, 2005), en *Bacillus subtilis* (Moore *et al.*, 2004) y *Pseudomonas aeruginosa* (Firoved *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo fue la caracterización de la regulación del gen *hmp* por la presencia de PQ o SNP. Recientemente se publicó que la proteína NsrR es un represor de la expresión de *hmp* en *E. coli*, sin embargo aún se desconoce el mecanismo por el cual esta proteína percibe la presencia de NO<sup>•</sup> (Bodenmiller y Spiro, 2006). En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Bang *et al.*, 2006) y en *Bacillus subtilis* (Nakano *et al.*, 2006) existe un mecanismo similar involucrando al mismo regulador.

A pesar de que se han descrito algunos factores transcripcionales involucrados en la regulación de *hmp* por la presencia de SNP, aún se desconoce si estos factores, como NsrR, están involucrados en la inducción de la expresión del gen por la presencia de PQ. Resultados obtenidos en el laboratorio nos indican que la inducción de la expresión del gen *hmp* responde diferente a la presencia de PQ o SNP. Por lo tanto es posible que exista algún otro factor involucrado en la regulación por la presencia de PQ.

### 3.2.2. Expresión de la $\Phi(hmp-lacZ)$ en presencia de PQ o SNP.

Usando una cepa merodiploide (RKP2178) con la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  se cuantificó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Se realizaron cultivos en LB en fase exponencial bajo condiciones aeróbicas, en presencia de 200  $\mu$ M de PQ o SNP por 45 minutos.

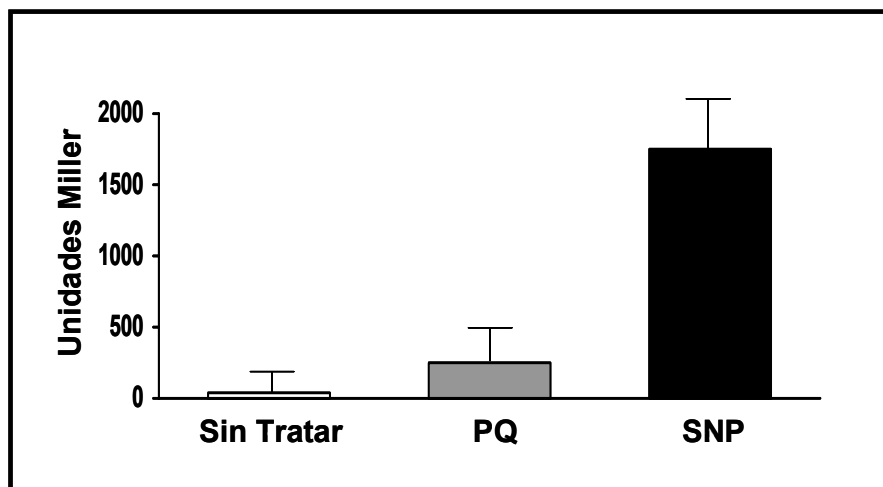


Figura 6. Actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$ . Se cuantificó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en la presencia de 200  $\mu$ M de PQ o SNP por 45 minutos.

Como se ha reportado en artículos anteriores la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  es inducida bajo condiciones aeróbicas alrededor de 5 veces por la presencia de PQ y alrededor de 10 veces por la presencia de SNP (Figura 6) (Poole *et al.*, 1996; Membrillo-Hernández *et al.*, 1997, 1998, 1999).

### 3.2.3. Búsqueda de mutantes afectadas en la expresión de la fusión $\Phi(hmp-lacZ)$ por transposición.

Para buscar algún factor transcripcional involucrado en la regulación del gen *hmp*, la estrategia experimental utilizada fue la obtención colonias mutantes afectadas en la expresión de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$ . Se realizó mutagénesis al azar mediada por la inserción de transposones, utilizando una cepa merodiploide. Se seleccionaron colonias mutantes con la expresión de la fusión modificada.

Inicialmente la mutagénesis al azar se realizó usando bacteriófagos como vehículo de entrega de los minitransposones miniTn10 y miniTn5 (ver Material y Métodos), con resistencia a tetraciclina y kanamicina respectivamente. Las colonias mutantes fueron seleccionadas en medios sólidos de LB suplementados con Xgal, para poder seleccionar colonias más o menos azules o blancas, determinando que la expresión de la fusión se modificó. Después del evento de transposición se seleccionaron una gran cantidad de colonias blancas. Estos resultados no fueron confiables ya que indicaban que la gran mayoría de los genes estaban relacionados con la regulación del gen *hmp* o que en el evento de transposición lo que se interrumpió fue la fusión, además de que las colonias azules no eran estables ya que perdían la coloración azul. Estos resultados nos indicaban que probablemente la fusión se salía del cromosoma al realizar la mutagénesis.

Otro tipo de mutagénesis al azar que se realizó fue utilizando plásmidos suicidas como vehículo de entrega del transposón Tn10dcam, con resistencia a cloramfenicol. Las colonias mutantes fueron seleccionadas en medios sólidos de LB suplementados con X-gal y diferentes concentraciones de PQ o SNP. No se pudo seleccionar una colonia con diferencias en la coloración azul con respecto a la cepa parental. De las colonias mutantes seleccionadas, a 2500 mutantes se les cuantificó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, ninguna presentó modificación en la actividad. Otros medios de selección de la expresión de la fusión que se usaron fueron medio de Tetrazolium + lactosa y medio MacConkey seleccionando colonias rojas o blancas, sin embargo después de aproximadamente 8500 colonias no pudo detectarse una con cambios en la coloración.

Debido a que no se pudo seleccionar una mutante utilizando diferentes estrategias de selección, se realizó la construcción de una nueva fusión transcripcional  $\Phi(hmp-lacZ)$ . Utilizando esta nueva cepa merodiploide, se realizó la mutagénesis al azar utilizando el bacteriófago  $\lambda$ NK1098 con resistencia a tetraciclina. Las colonias mutantes fueron seleccionadas en medios MacConkey +



lactosa suplementados con Xgal más 50  $\mu$ M de PQ o 200  $\mu$ M de SNP. En estos medios se pudo observar diferencia en la coloración de las colonias mutantes en presencia de PQ (rosas) o SNP (moradas). En una selección de aproximadamente 13,000 colonias mutantes ninguna presentó cambios en la coloración con respecto a la cepa parental.

Estos resultados llevaron a la conclusión de que, la mutagénesis a azar no fue la estrategia experimental adecuada para poder seleccionar algún gen que codificara una proteína que participara en la regulación del gen *hmp*.

### 3.2.4. Análisis de la región *cis* del gen.

Se realizó un análisis de la región *cis* a fin de determinar la secuencia mínima necesaria para la transcripción del gen *hmp* en presencia de PQ o SNP.

Para este fin se cuantificó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de fusiones transcripcionales con diferentes longitudes de la región intergénica *glyA-hmp*.

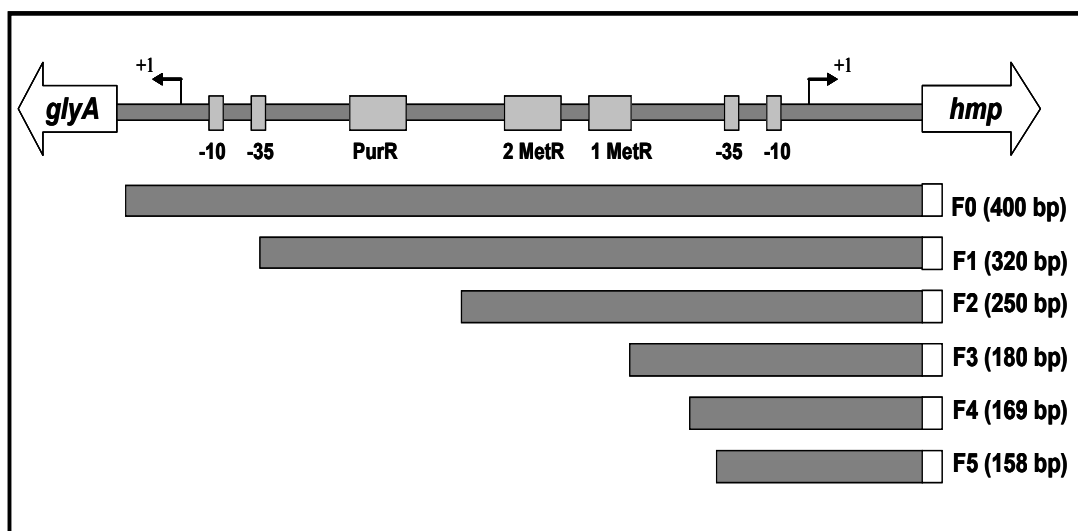


Figura 7. Región intergénica *glyA-hmp* de *Escherichia coli*.

Se muestran las diferentes longitudes (F0 a F5) de la región *glyA-hmp* usadas para la construcción de las fusiones transcripcionales con el gen *lacZ*.

Para la construcción de las fusiones transcripcionales se amplificaron diferentes longitudes de la región intergénica *glyA-hmp*, llamadas en este trabajo

como F0, F1, F2, F3, F4 y F5 (Figura 7), usando los oligonucleótidos HMP1, HMPP1, HMPP2, HMPP3, HMPP4, HMPP5 y HMP2 (ver secuencia en la Tabla 6). Estas secuencias fueron clonadas en el plásmido pRS551 usando las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. Para verificar la clonación de cada fragmento en el plásmido se realizaron ensayos de Southern blot usando el DNA de los plásmidos (EHU18, EHU19, EHU20, EHU21, EHU26, EHU27) y como sonda el fragmento de DNA de la región intergénica *glyA-hmp*. Los resultados (Figura 8) demostraron la clonación de cada fragmento en pRS551.

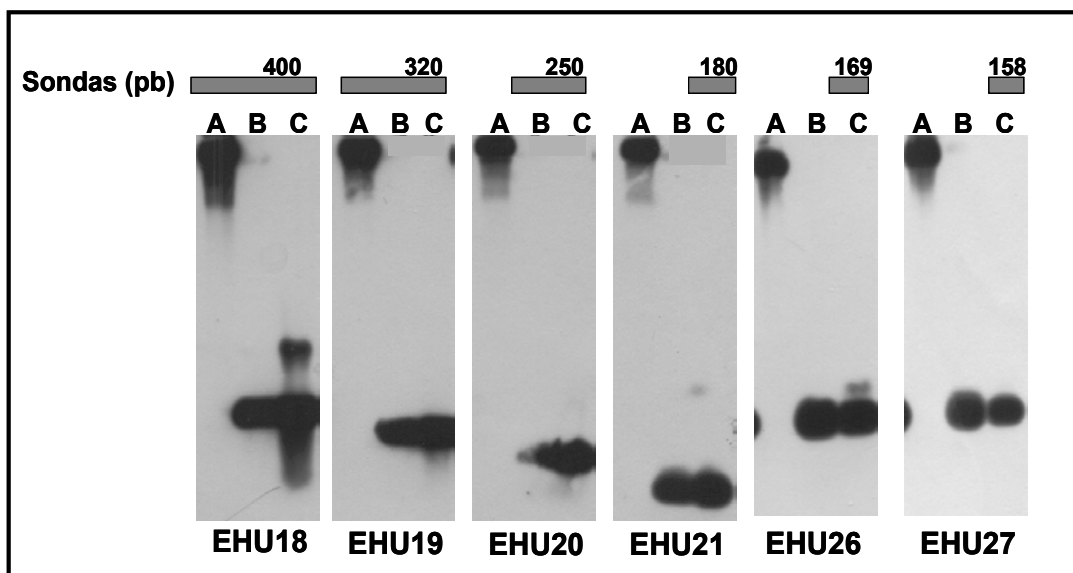


Figura 8. Southern blot de las fusiones  $\Phi(hmp-\psi lacZ)$  en pRS551. Usando los plásmidos EHU18, EHU19, EHU20, EHU21, EHU26 y EHU27 se determinó la clonación de los fragmentos F0, F1, F2, F3, F4 y F5 de la región intergénica *glyA-hmp* en pRS551. A. Plásmido pRS551 con los fragmentos clonados. B. Plásmidos digeridos con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. C. Sondas utilizadas.

Posteriormente con el propósito de obtener las fusiones en una sola copia se realizó la inserción de cada fusión al cromosoma de la cepa TE2680, por recombinación en el operón de triptofano (ver Material y Métodos). La inserción de cada fusión al cromosoma se verificó por PCR del DNA cromosomal de cada cepa, usando los oligonucleótidos HMP1, HMPP1, HMPP2, HMPP3, HMPP4, HMPP5 que alinean en la región 5' de cada fragmento y el oligonucleótido LacZrev

que alinea en la secuencia 5' del gen *lacZ*. Los resultados (Figura 9) demuestran la inserción de cada fusión en el cromosoma de la cepa TE2680.

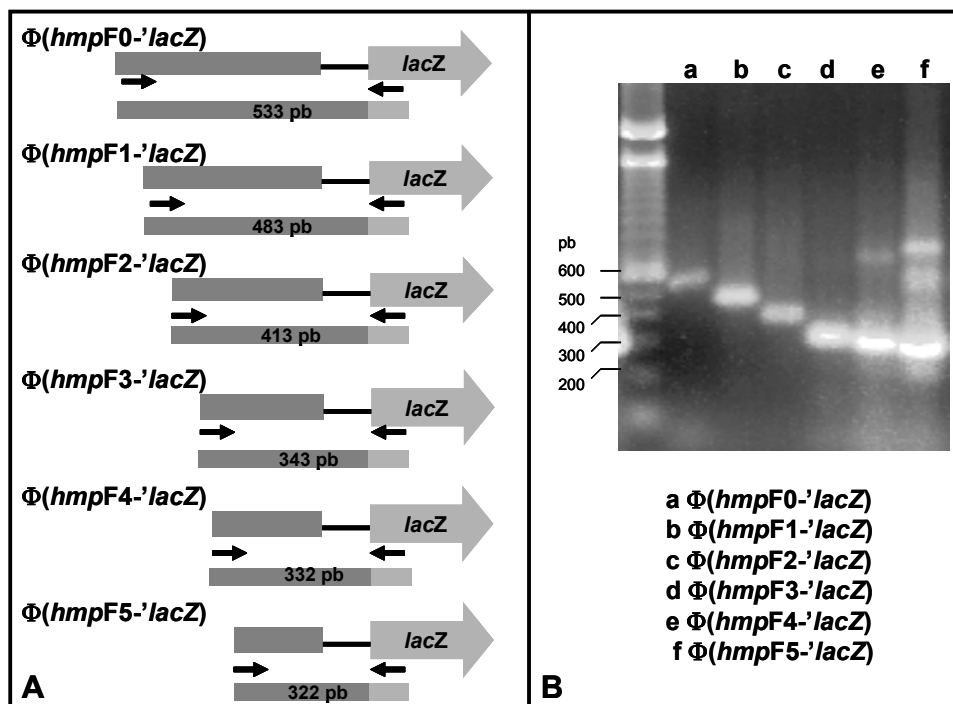


Figura 9. PCR de las fusiones  $\Phi(hmp-lacZ)$  en la cepa TE2680.

A. Esquema de los fragmentos esperados por PCR de las diferentes fusiones en TE2680. B. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos de las diferentes fusiones en un gel de agarosa al 1%.

Las cepas JMH0726, JMH0729, JMH0727, JMH0728, JMH0888, JMH0889 con las fusiones  $\Phi(hmpF0-lacZ)$ ,  $\Phi(hmpF2-lacZ)$ ,  $\Phi(hmpF3-lacZ)$ ,  $\Phi(hmpF1-lacZ)$ ,  $\Phi(hmpF4-lacZ)$  y  $\Phi(hmpF5-lacZ)$  respectivamente, fueron usadas para la cuantificación de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa realizando cultivos en LB en fase exponencial, bajo condiciones aeróbicas tratados con 200  $\mu$ M de PQ o SNP por 45 minutos.

Como se esperaba la fusión  $\Phi(hmpF0-lacZ)$ , que presenta 289 pb hacia el 5' del sitio de inicio de la transcripción del gen *hmp*, fue inducida por la presencia de PQ o SNP (Figura 10); una inducción similar se observó con la fusión  $\Phi(hmpF1-lacZ)$ , con sólo 209 pb. La cuantificación de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(hmpF2-lacZ)$ , con 139 pb, presentó un aumento en la

inducción por la presencia de SNP de aproximadamente 500 unidades Miller (UM) con respecto a la fusión  $\Phi(hmpF0-lacZ)$ , sin embargo la fusión  $\Phi(hmpF3-lacZ)$ , con 69 pb, presentó un aumento de aproximadamente 1000 UM en presencia de SNP y de 500 UM en presencia de PQ con respecto a la fusión  $\Phi(hmpF0-lacZ)$ . En las fusiones  $\Phi(hmpF4-lacZ)$  y  $\Phi(hmpF5-lacZ)$  con 58 y 47 pb respectivamente, la expresión disminuyó aproximadamente a la mitad con respecto a la fusión  $\Phi(hmpF0-lacZ)$ , pero a pesar de esto se observó inducción por la presencia de PQ o SNP.

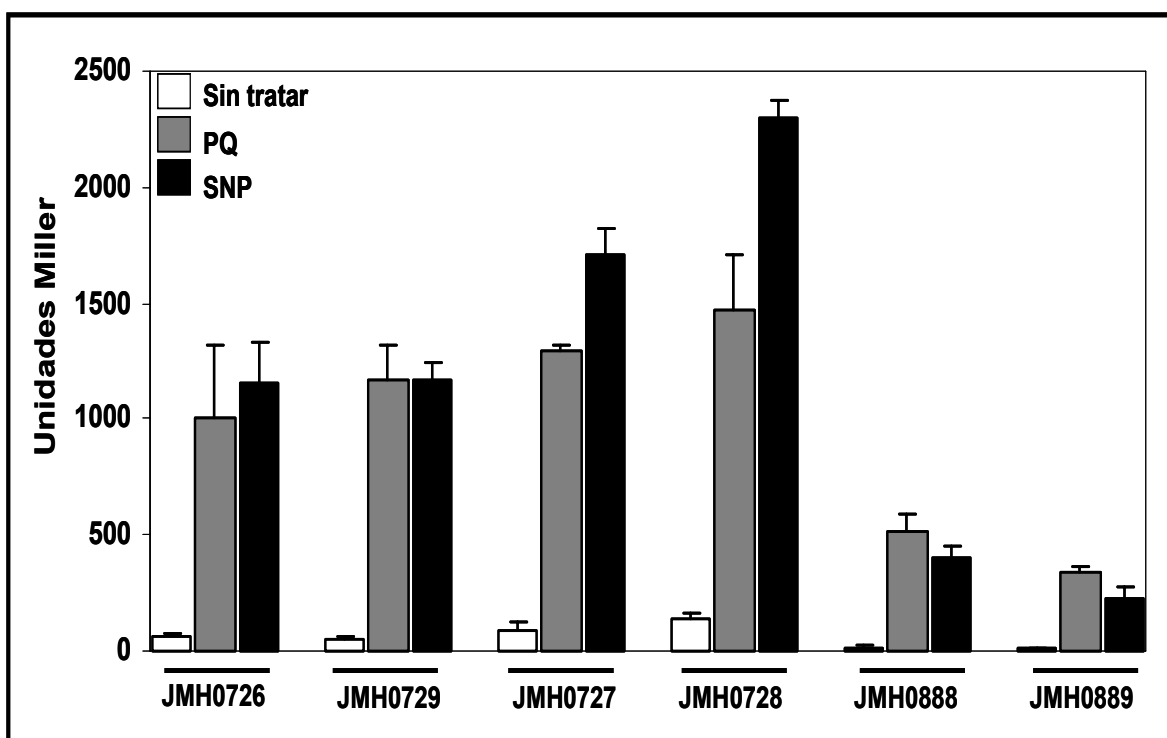


Figura 10. Actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las  $\Phi(hmp F0-F5-lacZ)$ . Se cuantificó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las fusiones  $\Phi(hmpF0-lacZ)$ ,  $\Phi(hmpF1-lacZ)$ ,  $\Phi(hmpF2-lacZ)$ ,  $\Phi(hmpF3-lacZ)$ ,  $\Phi(hmpF4-lacZ)$  y  $\Phi(hmpF5-lacZ)$  en TE2680 en presencia de 200  $\mu$ M de PQ o SNP por 45 minutos.

Estos resultados indican que la secuencia entre las bases -58 y -69 del gen *hmp* es importante para la expresión, sin embargo en ausencia de esta secuencia, de 12 pb, hubo inducción del gen por la presencia de PQ o SNP. Por lo tanto muy probablemente esta secuencia no se encuentra involucrada con la inducción del

gen en respuesta al estrés oxidativo si no más bien esta relacionada con la expresión basal de *hmp*.

### **3.2.5. Análisis del sitio de inicio de la transcripción del gen *hmp* por el método de 5'RACE.**

Membrillo-Hernández y colaboradores (1997b) determinaron el sitio de inicio de la transcripción (+1) del gen *hmp* mediante experimentos de “primer extensión”. Usando RNA de una cepa silvestre de *E. coli* purificado de cultivos en fase de crecimiento exponencial y estacionaria, determinaron que para ambas condiciones de cultivo la cantidad del transcrito no difiere y el sitio de inicio de la transcripción se encontró a 38 pb hacia el extremo 5' del codón de inicio del gen para ambas condiciones de crecimiento.

Debido a que en este artículo solo se realizó la diferencia entre fases de crecimiento (Membrillo-Hernández *et al.*, 1997b), y además tomando en cuenta que la expresión de este gen es inducida por la presencia de PQ o SNP, aquí se determinó si en presencia de PQ o SNP podría existir un sitio de inicio de la transcripción alterno al ya reportado.

Mediante la técnica de 5'RACE (ver Material y Métodos) se determinó el sitio de inicio de la transcripción del gen *hmp*, usando RNA purificado de cultivos de la cepa JMH0252 en medio LB en fase de crecimiento exponencial, bajo condiciones aeróbicas tratados con 400  $\mu$ M de PQ o SNP por 10 y 45 minutos.

Para poder aumentar la cantidad de mRNA de *hmp* se uso una cepa con la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en multicopia. En la técnica de 5'RACE el cDNA sintetizado a partir del RNA purificado es usado para realizar un primer PCR. Empleando un oligonucleótido específico a la secuencia del gen, en este caso el oligonucleotido usado fue el LacZrev que alinea en la secuencia del gen *lacZ* de la fusión, y el oligonucleótido AAP, que es complementario a la secuencia de homopolímeros que se agregó a los mRNA, se realizó el PCR. En la figura 11A se muestran los

productos de PCR obtenidos de este primer amplificado. Con el propósito de hacer mucho más específico este amplificado en la técnica de 5'RACE se realiza un segundo PCR, a partir del producto del primer PCR y usando los oligonucleótidos PE-2 que es específico a la secuencia de *hmp* y el AUAP que es específico a la secuencia de oligonucleótido AAP se realizó el segundo PCR, el producto de PCR obtenido fue de aproximadamente 150 pb (Figura 11B).

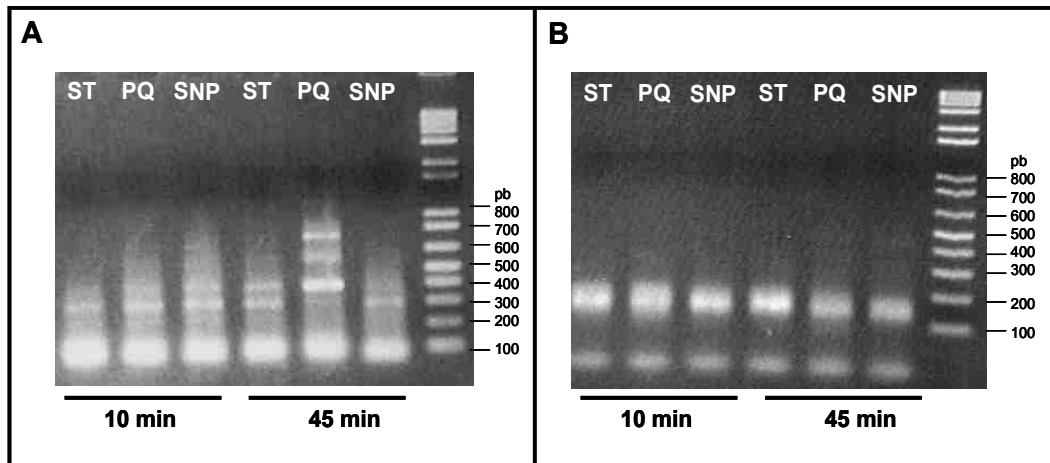


Figura 11. PCR del cDNA del mRNA del gen *hmp*. Siguiendo la técnica de 5'RACE. A Primer PCR con los oligonucleótidos LacZrev y AAP. B. Segundo PCR con los oligonucleótidos PE-2 y AUAP. ST sin tratar.

El producto de PCR de aproximadamente 150 pb, fue secuenciado (Figura 12A) y posteriormente se determinó la base correspondiente al sitio de inicio de la transcripción.

Los resultados (Figura 12B) mostraron que no importan las condiciones de cultivo, es decir en presencia de PQ o SNP o en ausencia de estos, el sitio de inicio de la transcripción del gen es el mismo, a 34 pb hacia el extremo 5' del codón de inicio del gen. Sin embargo comparando con el +1 ya reportado difiere en 4 bases. Una posible explicación de este resultado es por las técnicas que se emplearon, Membrillo-Hernández y colaboradores identificaron este sitio por un análisis de primer extensión, mientras que en este trabajo se realizó mediante la técnica de 5'RACE. Pero a pesar de los resultados se puede concluir que el gen *hmp* presenta un solo sitio de inicio de la transcripción aún en el estrés oxidativo.

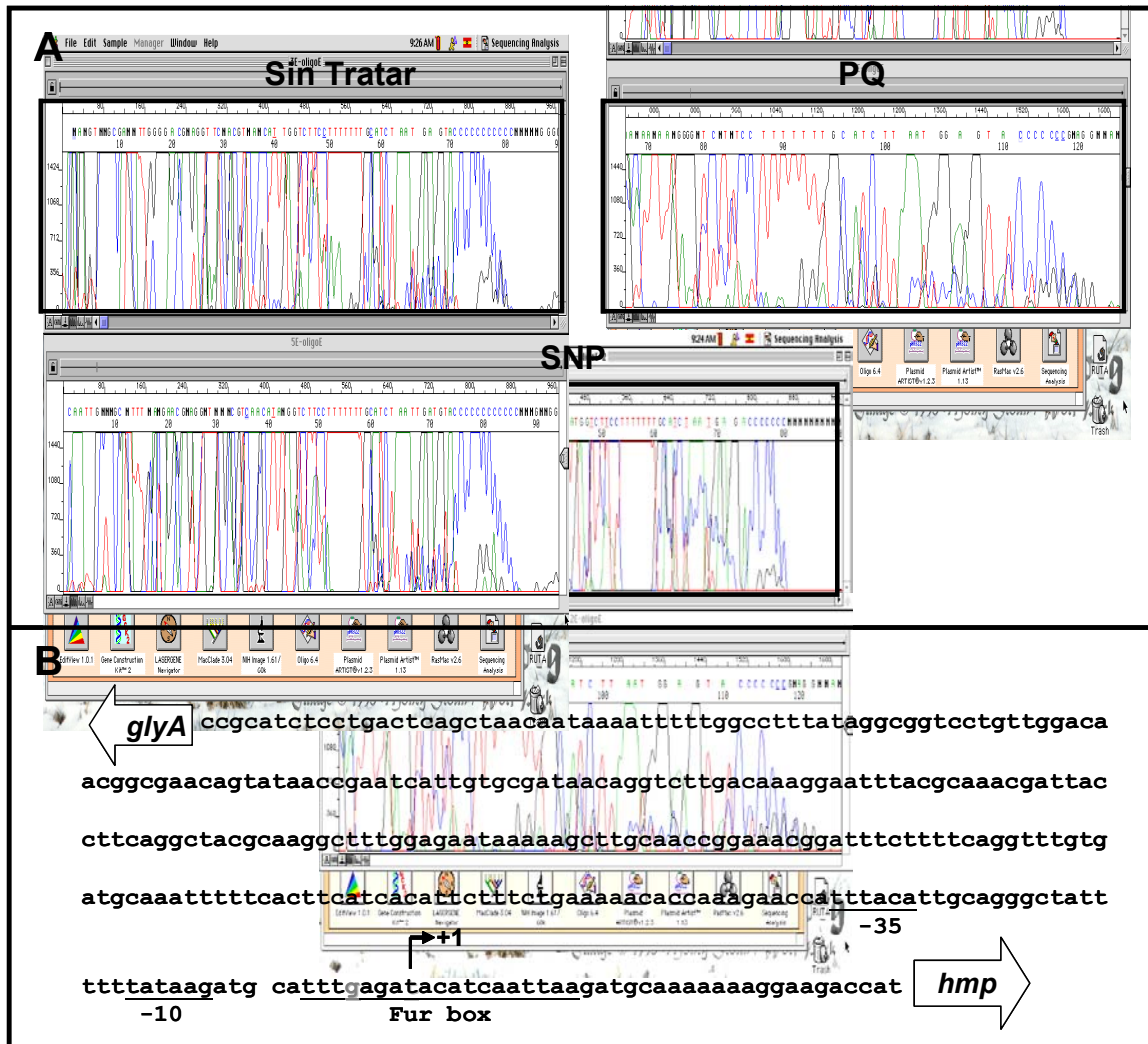


Figura 12. Identificación del sitio de inicio de transcripción del gen *hmp*. Usando RNA purificado de la cepa JMH0252 en presencia de 400  $\mu$ M PQ o SNP por 10 y 45 minutos. A. Diagramas de la secuenciación. B. Secuencia intergénica *glyA-hmp* de *E. coli* en donde se muestra el sitio de inicio de la transcripción de *hmp*.

### 3.2.6. Análisis de la expresión del gen *hmp* por Northern blot en presencia de PQ o SNP.

Se determinó la expresión del gen *hmp* de *E. coli* en presencia de PQ o SNP por ensayos de Northern blot (ver Material y Métodos).

Para realizar los ensayos de Northern blot se usaron muestras de RNA, purificado de cultivos de la cepa MC4100 o la cepa JMH1085 (*soxR::cat*) en LB en fase exponencial, tratados bajo condiciones aeróbicas en presencia de 400  $\mu$ M de

PQ o SNP por 10 o 45 minutos. Además se determinó la expresión del gen *sodA* bajo las mismas condiciones en la cepa MC4100. Las sondas usadas para estos ensayos fueron los marcos abiertos de lectura (ORFs) de los genes *hmp* y de *sodA* obtenidos por PCR.

En cada experimento se usó como control de carga la electroforesis de las muestras de RNA, en geles de agarosa al 1% más 20 mM de tiocianato de guanidina teñidos con bromuro de etidio.

Los resultados (Figura 13A) mostraron que bajo las condiciones experimentales probadas no se detectó señal de la expresión basal del gen *hmp*, lo que indica que posiblemente la expresión es baja y mediante esta técnica no puede detectarse. En la inducción de la expresión por PQ o SNP se observó que, la inducción por la presencia de SNP se detectó a los 10 minutos y 45 minutos después del tratamiento, mientras que por PQ sólo se detectó a los 45 minutos.

Por otro lado se determinó la expresión de *hmp* en ausencia del sistema SoxRS (Figura 13A). Como ya se había reportado en ausencia de *soxR* la expresión del gen *hmp* no se afecta, además se observó que el patrón de expresión fue similar al de la cepa silvestre. Además de corroborar que la regulación de *hmp* es independiente del sistema SoxRS contra el estrés oxidativo por superóxido y NO<sup>·</sup>, estos resultados sugieren otro mecanismo de regulación responsable de la inducción de la flavohemoglobina Hmp.

También se analizó la expresión del gen *sodA* (Figura 13B), que codifica para la enzima superóxido dismutasa y pertenece al regulón SoxRS. A diferencia de la expresión de *hmp* se observó que aún sin PQ o SNP los niveles de expresión basal de *sodA* fueron detectados, además a los 10 minutos se observó la inducción por la presencia de PQ, que aumentó ligeramente a los 45 minutos. Sin embargo no se observó inducción por la presencia de SNP, a pesar de que se ha reportado que este regulón también es inducido por la presencia de NO<sup>·</sup>, pero



tal vez se deba al tipo de donador de NO $\cdot$  que se usó ya que en los reportes anteriores se usó NO $\cdot$  gaseoso.

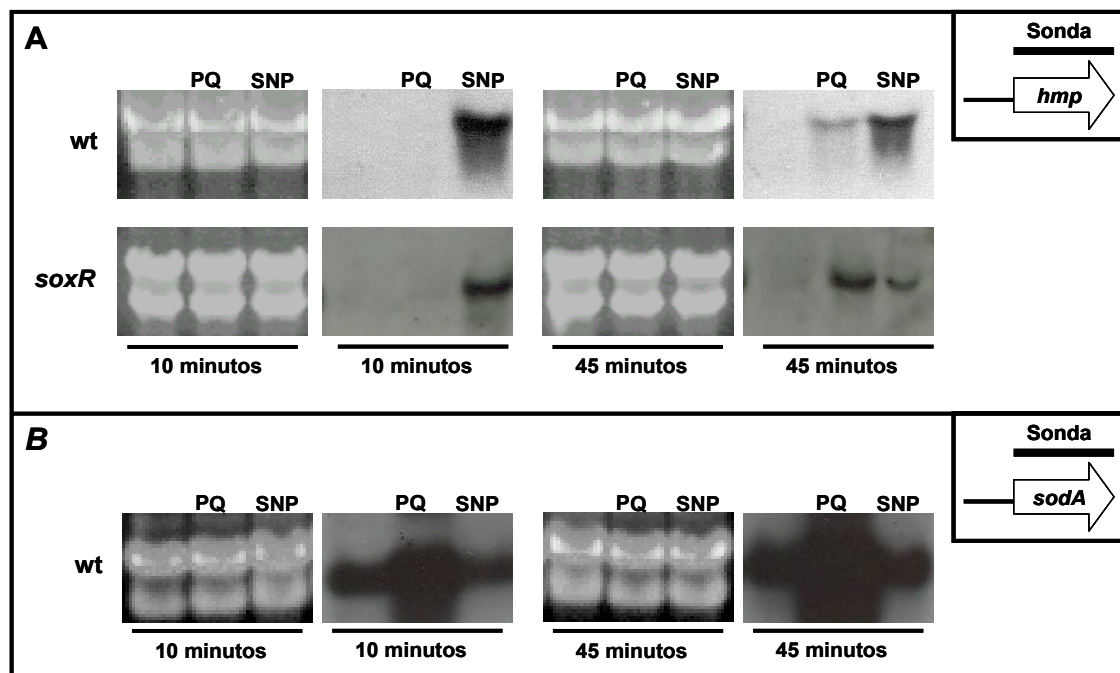


Figura 13. Ensayos de Northern blot del gen *hmp* y *sodA*.

A. Usando 20  $\mu$ g del RNA de la cepa MC4100 y JMH1085 (*soxR::cat*) en presencia de 400  $\mu$ M de PQ o SNP por 10 o 45 minutos se determinó la expresión de *hmp*. B. Usando 20  $\mu$ g del RNA de la cepa MC4100 presencia de 400  $\mu$ M de PQ o SNP por 10 o 45 minutos se determinó la expresión de *sodA*.

Estos resultados demuestran que, 1) *hmp* no es parte del regulón SoxRS y 2) que la inducción de la expresión de *hmp* responde diferente ante la presencia de superóxido u óxido nítrico. Con respecto a la inducción del gen *hmp* estos resultados podrían estar indicando que probablemente en la regulación del gen *hmp* estén participando dos factores transcripcionales, uno responde a la presencia de superóxido y otro a la presencia de NO $\cdot$ .

### 3.2.7. Cinética de inducción del gen *hmp* por Northern blot en presencia de PQ o SNP.

Para determinar la cinética de la expresión de *hmp* en presencia de PQ o SNP, se decidió realizar una curva de inducción del gen *hmp* de los 0 a los 60 minutos por la presencia de PQ o SNP, por ensayos de Northern blot.

La purificación de RNA se realizó de cultivos de la cepa MC4100 en LB, en fase exponencial bajo condiciones aeróbicas en presencia de 400  $\mu$ M de PQ o SNP. Después de un minuto de inducción y hasta los 60 minutos se tomaron muestras de los cultivos para la purificación del RNA. (ver Material y Métodos). La sonda usada para estos ensayos fue el ORF de *hmp* obtenido por PCR.

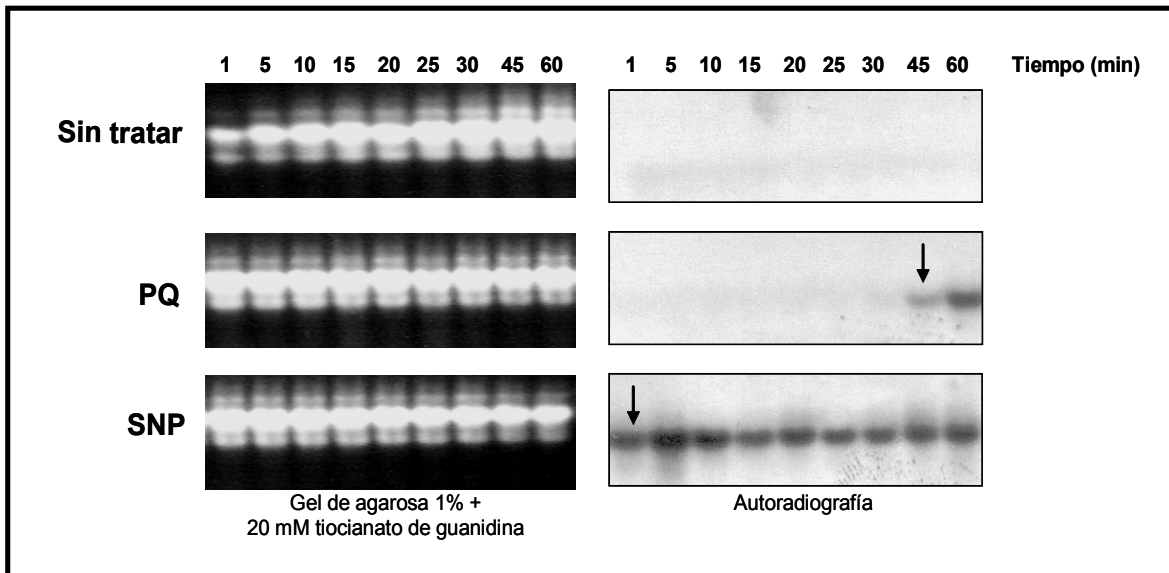


Figura 14. Cinética de inducción del gen *hmp* de *E. coli* por PQ o SNP. Izquierda. Usando 15  $\mu$ g del RNA de la cepa MC4100 por la presencia de 400  $\mu$ M de PQ o SNP se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% con 20 mM de tiocianato de guanidina. Derecha. Placas autorradiográficas del ensayo de Northern blot usando como sonda el ORF de *hmp*. Las flechas indican el inicio de la inducción de la expresión.

En los resultados (Figura 14) se pudo observar nuevamente que la expresión basal de este gen no es detectable, como se observó en los experimentos anteriores. En presencia de PQ la inducción de la expresión se observó hasta los 45 minutos, que aumento a los 60 minutos. En presencia de SNP se observó inducción casi inmediatamente, ya que después de un minuto de tratamiento se pudo detectar señal, en el seguimiento de esta cinética se observó un aumento de la expresión a los 5 minutos que disminuyó a los 10 minutos, esto indica que la inducción máxima de este gen por la presencia de SNP es a los 5 minutos.

Estos resultados indican que el gen *hmp* responde de manera diferente a la presencia de superóxido o NO<sup>·</sup>, probablemente en la regulación del gen *hmp* estén participando dos factores transcripcionales diferentes o que la regulación del gen se lleva a cabo por dos mecanismos diferentes, uno responde a la presencia de superóxido y otro esta respondiendo a la presencia de NO<sup>·</sup>.

### 3.2.8. Cinética de inducción de la $\Phi(hmp-lacZ)$ en presencia de PQ o SNP.

Se realizaron cinéticas de expresión de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$ . Para la cuantificación de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión se usaron cultivos de la cepa RKP2178 en medio LB en fase exponencial en aerobiosis tratados con 200  $\mu$ M de PQ o SNP.

En los resultados (Figura 15) se observó que 1) El nivel basal de expresión del gen no cambia, se mantiene a lo largo de la cinética, 2) la inducción de la expresión de esta fusión por la presencia de PQ se observó hasta los 30 minutos después del tratamiento y 3) la inducción de la expresión de la fusión por la presencia de SNP se observó después de 6 minutos de tratamiento. Estos resultados presentaron un patrón similar a los observados en los ensayos de Northern blot, determinando que la inducción de la expresión del gen *hmp* por la presencia de PQ es tardía con respecto a la presencia de SNP.

Como experimento adicional se realizó la cinética de inducción de la expresión de la fusión  $\Phi(soxS-lacZ)$  y de la fusión  $\Phi(sodA-lacZ)$ . Usando cultivos de las cepas TN520  $\Phi(soxS-lacZ)$  y QC1709  $\Phi(sodA-lacZ)$  en medio LB en fase exponencial bajo condiciones aeróbicas en la presencia de 200  $\mu$ M de PQ o SNP, se cuantificó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las fusiones.

A diferencia de la expresión de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$ , se observó que la expresión de la fusión  $\Phi(soxS-lacZ)$  (Figura 16A) fue inducida por la presencia de PQ a los 6 minutos después del tratamiento, sin embargo en presencia de SNP no se pudo observar inducción de la expresión de la fusión.

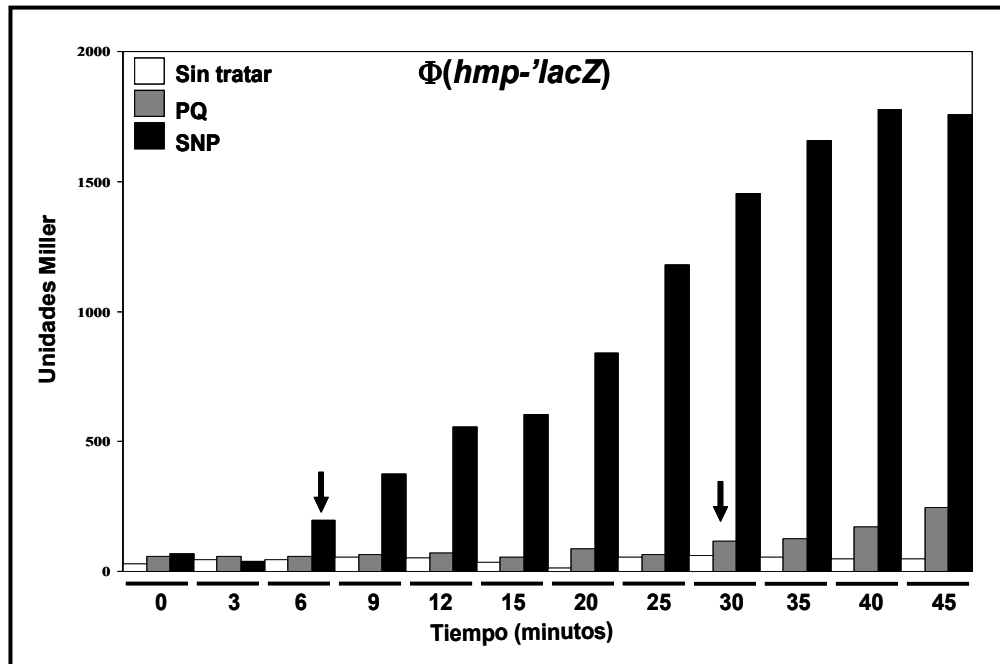


Figura 15. Cinética de inducción de la  $\Phi(hmp-lacZ)$  por PQ o SNP.

Se cuantificó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de los cultivos de la cepa RKP2178 tratados con 200  $\mu$ M de PQ o SNP en fase exponencial bajo condiciones aeróbicas de 0 a 60 minutos. Las flechas indican el inicio de la inducción por PQ o SNP.

En la fusión  $\Phi(sodA-lacZ)$  (Figura 16B) la inducción de la expresión por la presencia de PQ se observó a los 15 minutos después del tratamiento y al igual que la fusión  $\Phi(soxS-lacZ)$  no hubo inducción por la presencia de SNP. La inducción de la expresión por la presencia de PQ en la fusión  $\Phi(soxS-lacZ)$  fue antes que en la fusión  $\Phi(sodA-lacZ)$ , estos resultados concuerdan con la jerarquía de expresión en el regulón SoxRS, ya que primero se tiene que expresar *soxS* para poderse expresar *sodA*.

Los resultados de la expresión de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  indican que el gen *hmp* presenta una respuesta diferente ante la presencia de superóxido o NO $\cdot$ , lo cual indicaría que probablemente en la regulación estén participando diferentes factores transcripcionales que formen parte de un mecanismo que responda a la presencia de PQ o SNP. Sin embargo podría ser que la respuesta a la presencia de superóxido esta dada principalmente por el sistema SoxRS ya que como se

pudo observar en las cinéticas de expresión de las fusiones  $\Phi(\text{soxS}'\text{-lacZ})$  y  $\Phi(\text{sodA}'\text{-lacZ})$  responden más rápido a la presencia de PQ que la fusión  $\Phi(\text{hmp}'\text{-lacZ})$ .

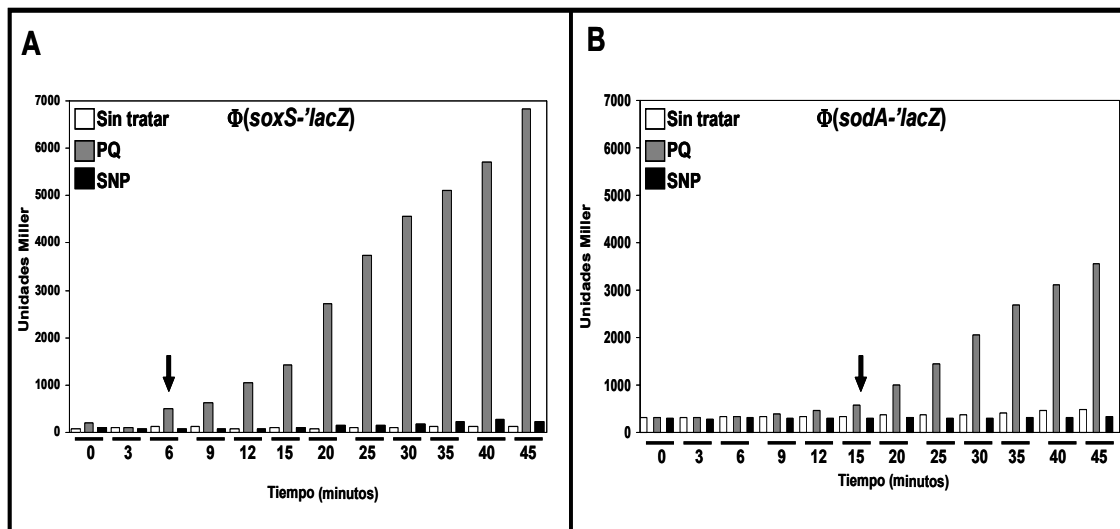


Figura 16. Cinética de inducción de las fusiones  $\Phi(\text{soxS}'\text{-lacZ})$  y  $\Phi(\text{sodA}'\text{-lacZ})$  por PQ o SNP.

A. Se cuantificó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(\text{soxS}'\text{-lacZ})$  de cultivos tratados con 200  $\mu\text{M}$  de PQ o SNP en fase exponencial bajo condiciones aeróbicas. B. Se cuantificó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(\text{sodA}'\text{-lacZ})$  de cultivos tratados con 200  $\mu\text{M}$  de PQ o SNP en fase exponencial bajo condiciones aeróbicas. Las flechas indican el inicio de la inducción por PQ.

### 3.2.9. Expresión de la $\Phi(\text{hmp}'\text{-lacZ})$ en mutantes *ytfE*, *yidZ*, *yphF*, *yfhA*, *yfhK*.

En la búsqueda de un factor transcripcional involucrado en la regulación del gen *hmp* de *E. coli*, en respuesta a la presencia de PQ o SNP, se realizó la mutación de algunos genes para determinar su papel en la regulación de *hmp*.

Un primer grupo de genes fueron aquellos que se reportaron por la inducción de  $\text{NO}^-$  y que además codifican proteínas con una posible función de reguladores. En trabajos en *E. coli* analizando el perfil transcripcional en respuesta a la presencia de  $\text{NO}^-$  se observó la inducción de los genes *ytfE* y *yidZ*, que codifican proteínas con una posible función en la regulación (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Justino *et al.*, 2005).

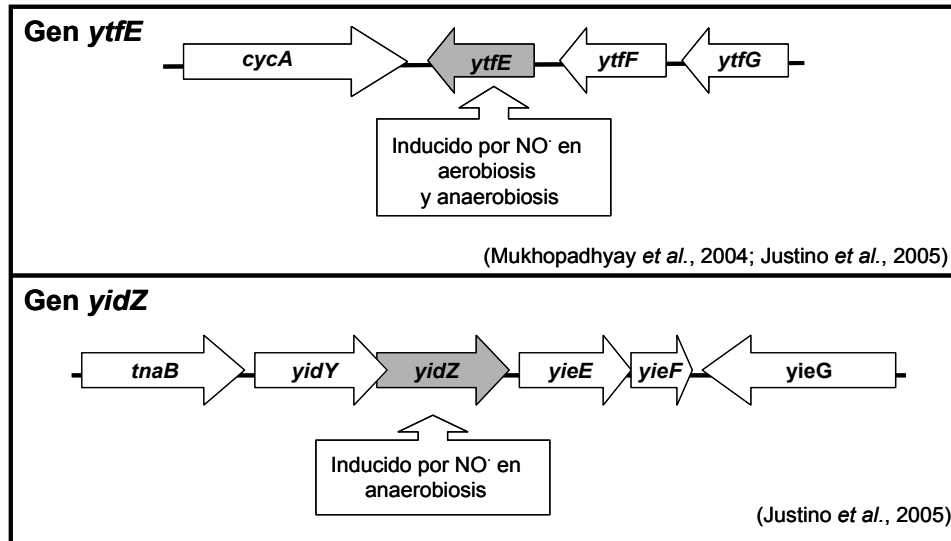


Figura 17. Contexto genómico de los genes *ytfE* y *yidZ* de *E. coli*. Usando el programa GeConT (Ciria *et al.*, 2004).

El gen *ytfE* (b4209) con 663 pb de longitud se localiza en el minuto 95.47 del genoma de *E. coli* y codifica para una proteína de 220 aa. Se desconoce la función de esta proteína, pero presenta similitud con la proteína DnrN de *Bacillus cereus* (55.6%), la cual se ha descrito como un probable regulador dependiente de NO<sup>•</sup>. El gen *yidZ* (b3711) con 960 pb de longitud se localiza en el minuto 83.86 del cromosoma de *E. coli*, codifica para una proteína de 319 aa. La función de esta proteína se desconoce aunque se describe como un regulador hipotético. El contexto genómico de *yidZ* podría estar indicando que este gen sea parte de un operón junto con *yidY* (Figura 17).

Para determinar la posible participación de YtfE y YidZ en la regulación del gen *hmp* se realizó una deleción sustitución de los genes *ytfE*, *yidZ* y *yidY-yidZ* por un cassette de kanamicina (ver Material y Métodos, Winans *et al.*, 1985).

Para la realización de las mutaciones primero se llevo a cabo la amplificación por PCR de los fragmentos adyacentes hacia el extremo 5' y 3' del gen, llamados L y R respectivamente (Figura 18A). Los fragmentos L y R fueron clonados en el plásmido pUC18 junto con la secuencia del gen de kanamicina, obteniendo los fragmentos L-Kan-R. Para comprobar la clonación de los

fragmentos L-Kan-R se realizó una digestión de los plásmidos (Figura 18B). Una vez que se comprobó la clonación de los fragmentos L-Kan-R, los plásmidos fueron linearizados usando la enzima *SacI* y se transformó a la cepa JC7623 (*recBCD*). Para comprobar que se llevó a cabo la recombinación, se realizó un análisis por PCR del DNA cromosomal de las colonias transformantes, amplificando los fragmentos L-Kan-R por PCR (Figura 18C). Los resultados demostraron que en los tres casos se llevó a cabo la recombinación logrando la sustitución de los genes *ytfE*, *yidZ*, *yidY-Z* por el gen de kanamicina. Estas mutaciones fueron transducidas al fondo genético de la cepa MC4100 (cepas JMH1728, JMH1504, JMH1506).

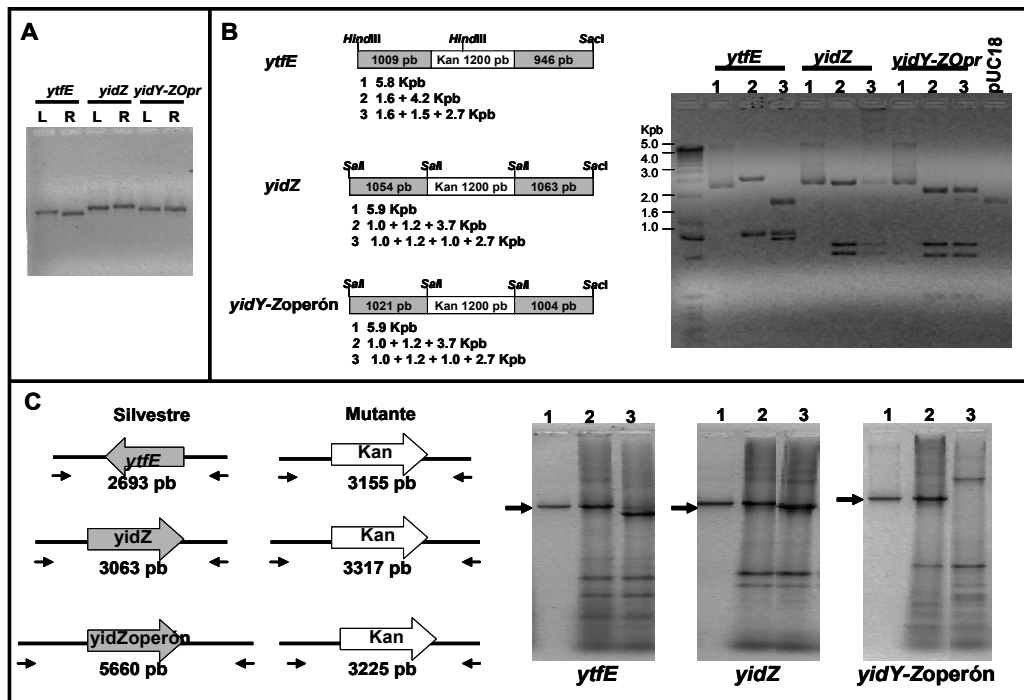


Figura 18. Construcción de las mutantes *ytfE::kan*, *yidZ::kan* y *yidY-Z::kan*. A. Fragmentos L y R obtenidos por PCR de *ytfE*, *yidZ* y *yidY-yidZ*. B. Análisis del plásmido pUC18 con los fragmentos L-Kan-R de *ytfE*, *yidZ* y *yidY-yidZ*. 1) plásmido sin digerir, 2) plásmido digerido con una sola enzima, *HindIII* para *ytfE* o *Sal* para *yidZ* o *yidY-Zoperón*, 3) plásmido digerido con las dos enzimas usadas en la clonación *HindIII* y *SacI* para *ytfE* y *Sal* y *SacI* para *yidZ* o *yidY-Zoperón*. C. Productos de PCR de las secuencias L-Kan-R de *ytfE*, *yidZ* y *yidY-Zoperón* del DNA cromosomal de la cepa silvestre y mutantes. 1) producto de PCR del fragmento L-Kan-R del plásmido pUC18 con cada fragmento, 2) producto de PCR del DNA cromosomal de cada mutante, 3) producto de PCR del DNA cromosomal de la cepa silvestre.

Para determinar si la ausencia de estos genes modificó la expresión del gen *hmp*, se realizó la transducción de las mutaciones al fondo genético de la cepa RKP2178 (JMH1730 y JMH1834). Se cuantificó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en cultivos en medio LB en fase exponencial, bajo condiciones aeróbicas en presencia de 200  $\mu$ M de PQ o SNP. La mutación *yidY-Z* no se pudo transducir al fondo genético de RKP2178.

En los resultados (Figura 19) se observó que en ausencia de *ytfE* o *yidZ* la expresión de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  no se modifica aún en presencia de PQ o SNP. Estos resultados indican que las proteínas YtfE y YidZ no están involucradas en el mecanismo de regulación del gen *hmp*.

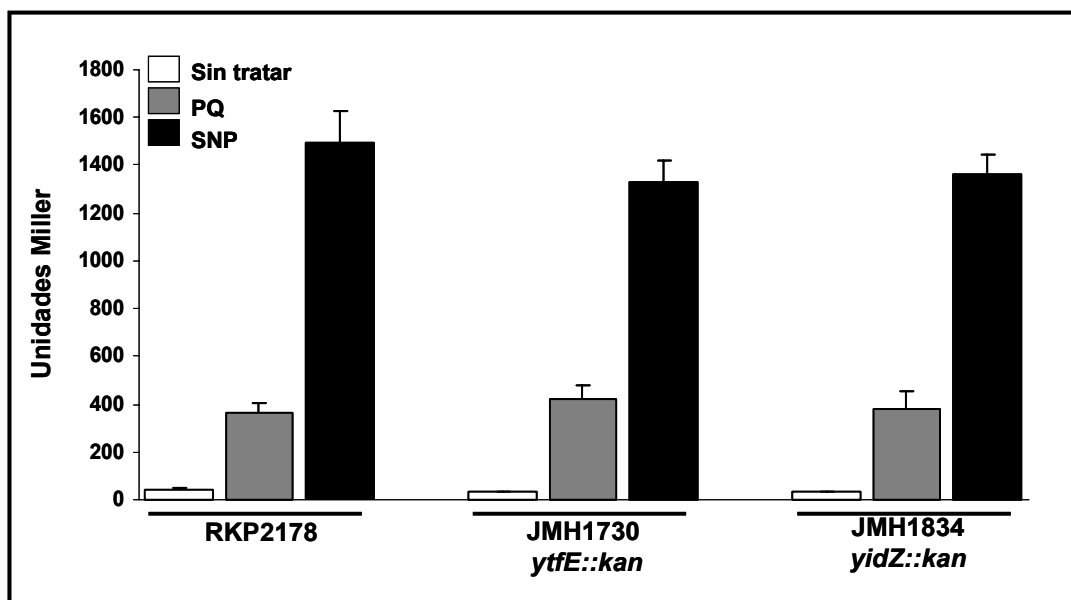


Figura 19. Actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$ . Se cuantificó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en los fondos genéticos *ytfE::kan* y *yidZ::kan* en presencia de 200  $\mu$ M de PQ o SNP por 45 minutos.

Otro grupo de genes que posiblemente pudieran estar involucrados en la regulación de *hmp* fueron aquellos genes cercanos a la secuencia del gen, además que codifiquen para una proteína con posible función de regulador. En *Pseudomonas aeruginosa*, recientemente se reportó al gen *fhpR* como el



regulador responsable de la expresión de la flavohemoglobina Fhp, este gen se localiza hacia el extremo 5' de *fhp* (Arai *et al.*, 2005).

En el contexto genómico de *hmp* de *E. coli* se identificaron cuatro genes cercanos, dos hacia el extremo 5' y dos hacia el extremo 3' de *hmp*, que codifican proteínas con una posible función de regulador. El gene *yphF* (b2548) con 984 pb, codifica para un proteína de 327 aa, con posible función de regulador tipo Lacl, el gen *yphH* (b2550) con 1194 pb, codifica para una proteína de 397 aa, el gen *yfhA* (b2554) y *yfhK* (b2556) con 1335 pb y 1428 pb respectivamente, codifican para proteínas de 444 aa y 475 aa respectivamente con función de regulador y sensor respectivamente para un sistemas de dos componentes del que aún se desconoce la señal que las activa (Figura 20).

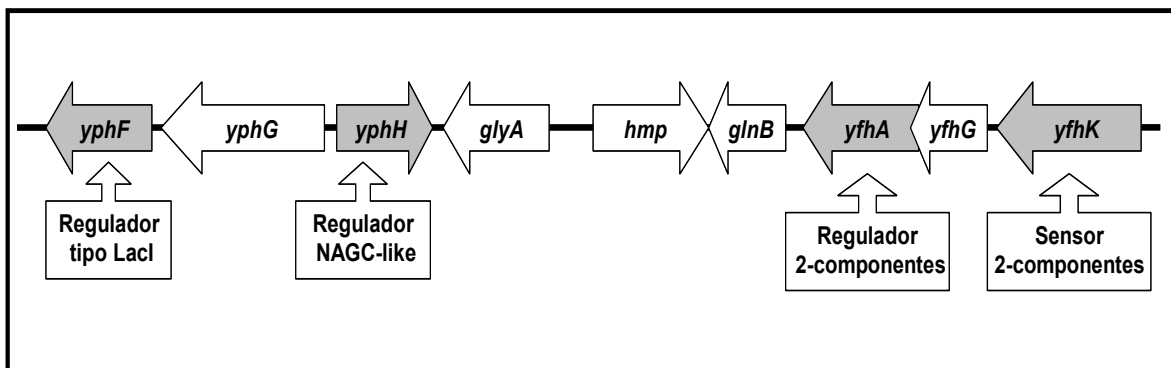


Figura 20. Contexto genómico del gen *hmp* de *E. coli*. Usando el programa GeConT (Ciria *et al.*, 2004) se observan cuatro genes cercanos a *hmp* con posible función de reguladores.

Para la mutación de estos genes se siguió el método reportado por Beloin y colaboradores (2004, ver Material y Métodos), estos genes fueron sustituidos por la secuencia del gen de resistencia a kanamicina. En este método la obtención de los fragmentos L-Kan-R se llevó a cabo mediante dos ensayos de PCR. Se amplificaron los fragmentos L y R (Figura 21A) y posteriormente en un segundo paso por PCR se obtuvieron los fragmentos L-Kan-R (Figura 21B). Posteriormente se transformó la cepa MG1655 + pKOBEGA ( $\lambda$ red). Para corroborar que se llevó a cabo la recombinación se realizó un análisis por PCR usando el DNA cromosomal de las colonias transformantes amplificando los fragmentos L-Kan-R (Figura 21C).

Solo se pudo llevar a cabo la recombinación de *yphF*, *yfhA* y *yfhK*, para *yphH* no se pudo sustituir el gen. Estas mutaciones fueron transducidas al fondo genético de la cepa MC4100 (JMH1831, JMH1832, JMH1833).

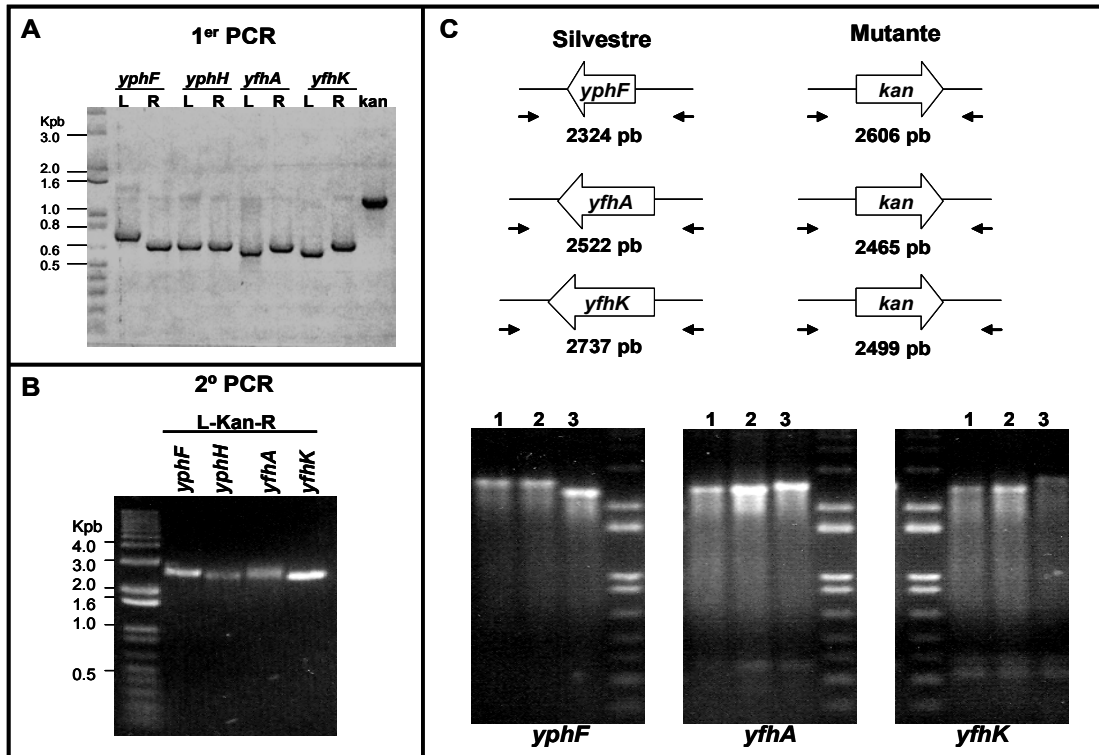


Figura 21. Construcción de las mutantes *yphF::kan*, *yfhA::kan* y *yfhK::kan*.  
 A. Fragmentos L y R obtenidos por PCR de *yphF*, *yphH*, *yfhA* y *yfhK*.  
 B. Fragmentos L-Kan-R de *yphF*, *yphH*, *yfhA* y *yfhK* obtenidos por PCR.  
 C. Productos de PCR de las secuencias L-Kan-R de *yphF*, *yfhA* y *yfhK* del DNA cromosomal de la cepa silvestre y mutantes, 1) fragmento L-Kan-R, 2) producto de PCR del DNA cromosomal de cada mutante, 3) producto de PCR del DNA cromosomal de la cepa silvestre.

Para determinar el posible papel de estas proteínas en la regulación del gen *hmp*, las mutaciones fueron transducidas al fondo genético de la cepa RKP2178 (JMH1856, JMH1857, JMH1858). La cuantificación de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  se realizó en cultivos en LB en fase exponencial, bajo condiciones aeróbicas en presencia de 200  $\mu$ M de PQ o SNP. En los resultados (Figura 22) se observó que en ausencia de *yphF*, *yfhA* o *yfhK* la expresión de la fusión no se modificó aún en presencia de PQ o SNP. Por lo tanto

ninguno de estos genes se involucra en la regulación del gen *hmp* en la respuesta al estrés oxidativo por superóxido o NO $\cdot$ .

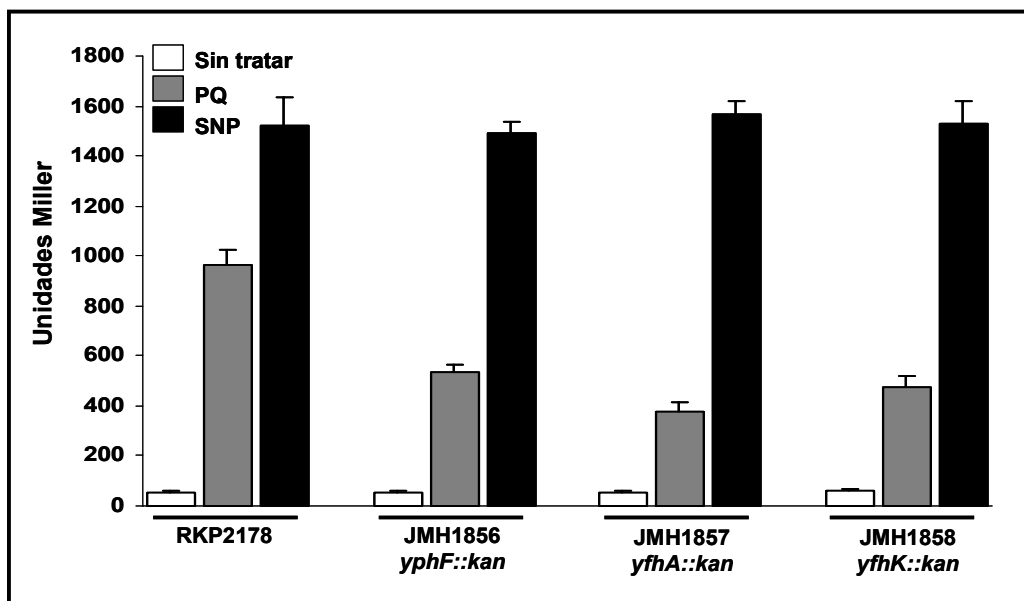


Figura 22. Actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$ .

Se cuantificó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en los fondos genéticos *yphF::kan*, *yfhA::kan* o *yfhK::kan* en presencia de 200  $\mu$ M de PQ o SNP por 45 minutos.

### 3.2.10. El papel de *yjeB* en la inducción de *hmp* por PQ.

Recientemente se publicó un artículo donde se involucra a la proteína NsrR, codificada por el gen *yjeB*, como la responsable de la regulación del gen *hmp*, en presencia de NO $\cdot$  (Bodenmiller y Spiro, 2006), esta misma regulación se ha observado en *Salmonella* y en *B. subtilis* con un regulador homólogo a NsrR (Bang *et al.*, 2006; Nakano *et al.*, 2006).

Se ha reportado que *yjeB* forma un operón junto con los genes *mnr* (codifica para la RNasaR) y *yifH* (codifica para una proteína con función de metiltransferasa de rRNA) que se expresa en condiciones de estrés por bajas temperaturas (Cairrão *et al.*, 2003). En la figura 23 se muestra el contexto genómico del gen *yjeB* de *E. coli*.

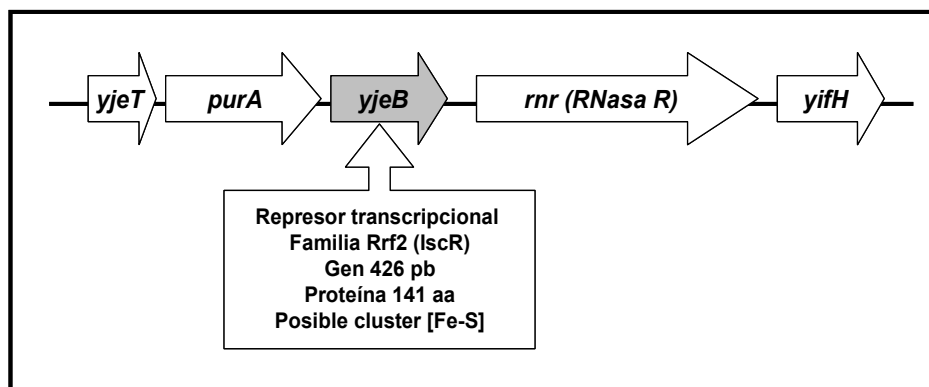


Figura 23. Contexto genómico de *yjeB* de *E. coli*. Usando el programa GeConT (Ciria *et al.*, 2004).

Para determinar el papel de la proteína NsrR en la regulación del gen *hmp* de por la presencia de PQ o SNP, se realizó un análisis de la expresión de *hmp* en un fondo genético *yjeB* por ensayos de Northern blot en presencia de PQ o SNP.

Para el Northern blot se purificó RNA de cultivos de las cepas MC1000 y JOEY62, donadas por el Dr. S. Spiro, en fase de crecimiento exponencial bajo condiciones aeróbicas agregando 400  $\mu\text{M}$  de PQ o SNP por 45 minutos.

En los resultados (Figura 24) se observó que la cepa MC1000 (cepa silvestre que se usó en el artículo de Bodenmiller y Spiro, 2006) presenta un patrón de expresión similar al de la cepa MC4100, usada en los experimentos anteriores, por lo tanto la inducción de la expresión por SNP se observó a los 10 minutos y 45 minutos y la inducción por la presencia de PQ sólo se observó a los 45 minutos. En ausencia de *yjeB* la expresión de *hmp* es desreprimida, en todas las condiciones probadas, es decir en presencia o ausencia de PQ o SNP, a los 10 o 45 minutos de inducción se observó que la expresión es similar.

Para determinar la expresión la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en ausencia de *yjeB* se realizó la transducción de la mutación *yjeB::kan* a la cepa RKP2178 (JMH1957). La cuantificación de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa se realizó cultivos en LB en fase exponencial, bajo condiciones aeróbicas en presencia de 200  $\mu\text{M}$  de PQ o SNP.

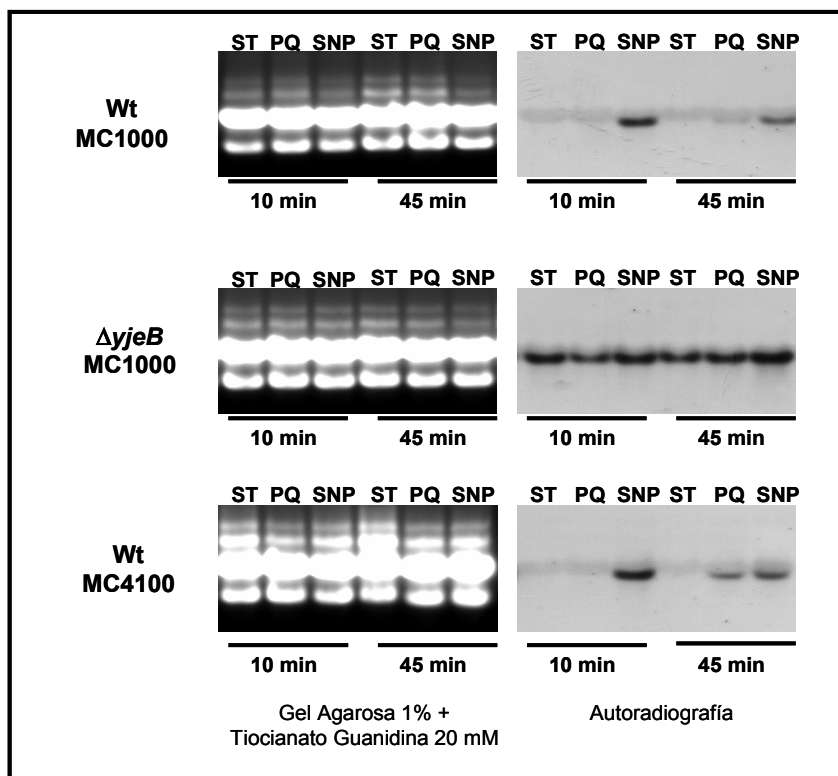


Figura 24. Ensayos de Northern blot del gen *hmp* en una mutante *yjeB*. Usando 20  $\mu$ g del RNA de la cepa MC4100, MC1000 y JOEY62 (*yjeB*) en presencia de 400  $\mu$ M de PQ o SNP por 10 o 45 minutos se determinó la expresión de *hmp*. ST, sin tratar.

En los resultados (Figura 25A) se observó que en ausencia de *yjeB* la expresión de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  fue aproximadamente 60 veces más que en la cepa silvestre RKP2178; en presencia de PQ o SNP la expresión fue similar, estos resultados indican una “desrepresión” de la expresión. Sin embargo aunque se observó desrepresión se pudo detectar una pequeña inducción de la fusión por la presencia de PQ o SNP, lo que indicaría que posiblemente este participando otro factor transcripcional. También se determinó la expresión de esta fusión en el fondo genético de MC1000 (cepas JOEY72 y JOEY76, Bodenmiller y Spiro, 2006), se observó un patrón de expresión similar al de la cepa RKP2178, sin embargo las UM detectadas son mucho menores.

La mutación *yjeB::kan* también fue transducida a la cepa MC4100 (JMH1955). Se realizó una cinética de inducción de la expresión de *hmp* en ausencia del gen *yjeB*. Para la purificación de RNA se realizaron cultivos en medio

LB en fase exponencial, bajo condiciones aeróbicas en presencia de 400  $\mu$ M de PQ o SNP. En los resultados (Figura 25B) se observó que en ausencia de *yjeB* la expresión de *hmp* es similar en ausencia o presencia de PQ o SNP, lo cual indicaría que existe un mecanismo similar en la regulación del gen *hmp* por la presencia de PQ.

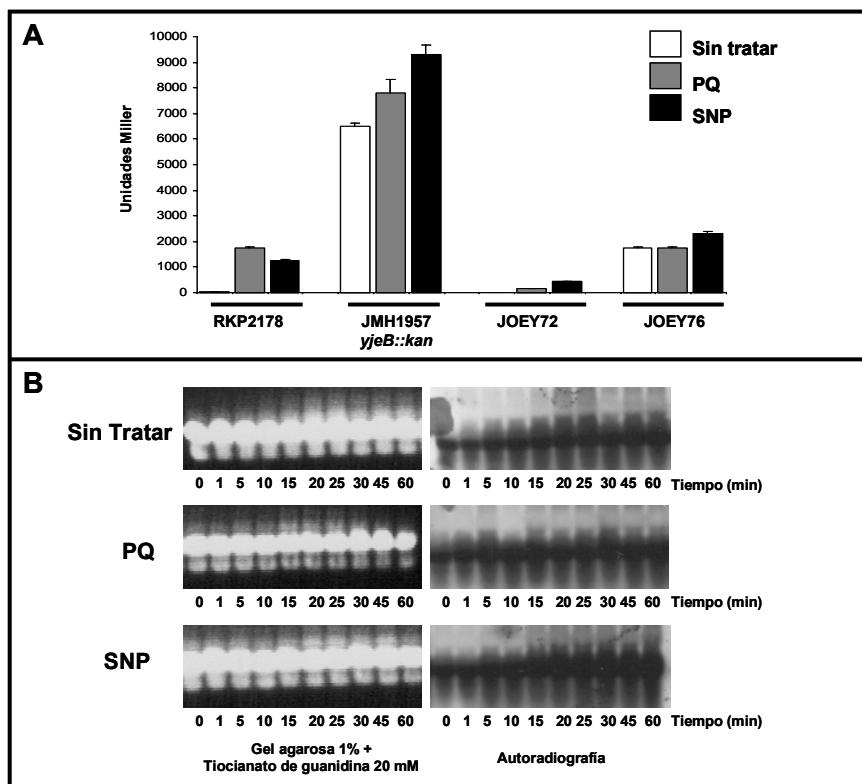


Figura 25. Expresión del gen *hmp* en ausencia del gen *yjeB* (NsrR).

A. Actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en las cepas RKP2178, JMH1957 (*yjeB::kan*), JOEY72, JOEY76(*yjeB*), en 200  $\mu$ M de PQ o SNP.

B. Cinética de inducción del gen *hmp* de *E. coli* por Northern blot. Izquierda. Usando 15  $\mu$ g del RNA de la cepa JMH1955 en presencia de 400  $\mu$ M de PQ o SNP se realizaron electroforésis en gels de agarosa al 1% con 20 mM de tiocianato de guanidina. Derecha. Placas autoradiográficas del ensayo de Northern blot usando como sonda el ORF de *hmp*.

### 3.2.11. Discusión.

Como ya se ha reportado en trabajos anteriores la expresión de gen *hmp* de *E. coli* es inducida por la presencia de PQ, SNP, GSNO, NO<sup>-</sup> y donadores de este en ausencia del sistema SoxRS (Poole *et al.*, 1996; Membrillo-Hernández *et al.*, 1997a, 1997b, 1998, 1999; Pomposiello *et al.*, 2001), por lo tanto en la bacteria

existen mecanismos alternos en la respuesta al estrés oxidativo. Para conocer los mecanismos que participan en la regulación transcripcional de *hmp* en el estrés oxidativo por la presencia de PQ o SNP, se realizaron análisis de la inducción de la expresión mediante ensayos de Northern blot o usando una fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$ .

Realizando un análisis de la región *cis* del gen *hmp* se determinó la secuencia mínima requerida para la expresión del gen *hmp*. La cuantificación de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las fusiones transcripcionales de diferentes longitudes de la región intergénica *glyA-hmp* determinaron que, la secuencia entre las bases -58 a -69, con respecto al +1, es importante para la expresión del gen, pero no para la inducción por la presencia de PQ o SNP.

Se determinó que *hmp* sólo presenta un sitio de inicio de la transcripción, ubicado a 34 pb hacia el extremo 5' del codón de inicio, aún en presencia de PQ o SNP. Este sitio difiere en 4 bases con el que fue reportado por Membrillo-Hernández *et al.* (1997b), ubicado a 38 pb hacia el extremo 5' del codón de inicio. Una explicación a estas diferencias puede ser las técnicas que se emplearon en estos dos trabajos.

Por otra parte al realizar el análisis de la expresión del gen *hmp*, mediante la técnica de Northern blot, en presencia de 400  $\mu$ M de PQ o SNP durante 10 y 45 minutos se observó que, la inducción de la expresión por la presencia de SNP ocurre a los 10 y 45 minutos, pero en presencia de PQ sólo se detectó a los 45 minutos. Para poder realizar una curva de inducción de la expresión se realizaron cinéticas de inducción mediante Northern blot. Se observó que la inducción por la presencia de SNP inició después de un minuto de tratamiento, mientras que la inducción por PQ inició hasta los 45 minutos. Realizando la cinética de inducción de la fusión (*hmp-lacZ*), el patrón de inducción de la expresión fue similar a los resultados anteriores que se obtuvieron con ensayos de Northern blot. La

inducción por la presencia de SNP inicio a los 6 minutos después del tratamiento, en presencia de PQ inicio a los 30 minutos.

Los resultados anteriores podrían indicar que probablemente estén participando dos factores transcripcionales en la regulación del gen *hmp*, uno pertenece a un mecanismo que es inducido por la presencia de superóxido y otro a la presencia de NO<sup>·</sup>.

Tomando en cuenta los resultados del análisis de la expresión del gen *sodA* y *soxS*, se puede determinar que posiblemente en la bacteria exista una jerarquía en los mecanismos de respuesta ante la presencia de ROS y RNS. Posiblemente el sistema SoxRS sea un mecanismo de respuesta ante la presencia principalmente de superóxido, por eso la expresión de genes de este regulón es durante los primeros minutos después del tratamiento con PQ, sin embargo el sistema de defensa de las hemoglobinas participa principalmente es la protección contra la presencia de NO<sup>·</sup>, por esa razón la inducción de este gen es casi inmediata a la presencia de SNP.

Por otra parte se concluyó que ninguno de los genes *ytfE*, *yidZ*, *yphF*, *yfhA* y *yfhK* participa en la regulación del gen *hmp*. El gen *ytfE* fue reportado por ser uno de los mayoritariamente inducidos por la presencia de NO<sup>·</sup> bajo condiciones anaeróbicas, en *E. coli* (Justino *et al.*, 2005) y bajo condiciones aeróbicas en presencia de GSNO (Mukhopadhyay *et al.*, 2004). Además se ha observado que en ausencia de este gen hay una disminución en la resistencia al NO<sup>·</sup>, posiblemente este participando en la protección ante el NO<sup>·</sup>. Recientemente fue publicado que la regulación de *ytfE* esta mediada por la proteína NsrR, de manera similar a la regulación de *hmp* (Bodenmiller y Spiro, 2006). Por otro lado se ha reportado que Fnr y Fur participan en la regulación de *ytfE* actuando como represores de la expresión. Se ha observado que YtfE no esta involucrada en la regulación de genes inducidos por la presencia de NO<sup>·</sup> (Justino *et al.*, 2006), esto también se ha determinó en este proyecto, midiendo la expresión de la fusión



$\Phi(hmp-lacZ)$  en la mutante *ytfE::kan*. Recientemente se sugirió que YtfE participa en la biogénesis de los centros Fe-S (Justino *et al.*, 2006).

La expresión de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en una mutante *yjeB (nsrR)* aumentó aproximadamente 60 veces con respecto a la cepa silvestre, sin embargo la presencia de PQ o SNP causó un ligero aumento en la expresión de la fusión lo cual estaría indicando que posiblemente este participando otro factor transcripcional. En la regulación del gen *hmp* se ha reportado a Fur como un regulador negativo en la expresión (D'Áutréaux *et al.*, 2002). En la primera parte de este trabajo de tesis se reportó la participación de Fur en la regulación de *hmp*. Fur se inactiva por la nitrosilación del hierro en presencia de NO<sup>·</sup>, posiblemente la inducción observada en la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en una mutante *yjeB* en presencia de SNP se deba a la inactivación de Fur. Además se ha observado que la secuencia de unión de Fur en el promotor de *hmp* y la secuencia propuesta para la unión de NsrR se empalman, lo que posiblemente indicaría una competencia por este sitio. En presencia de PQ posiblemente este sucediendo lo mismo que en presencia de SNP, tal vez Fur se inactive por la presencia de PQ o algún otro factor que interviene en la inducción, aunque debido a que la diferencia entre la expresión basal y la inducida con PQ es muy pequeña se podría sugerir que tal vez no participe ningún otro factor en la regulación de *hmp* por la presencia de PQ.

Por otra parte en la cinética de inducción de la expresión de *hmp* en el fondo genético *yjeB::kan* y no se pudieron determinar diferencias de expresión por la presencia de PQ o SNP, esto puede ser debido a una saturación de la señal y que además la cuantificación de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa es una técnica más sensible para medir la expresión de este gen; ya que en los ensayos de Northern blot nunca se pudo detectar una señal de la expresión basal del gen mientras que por  $\beta$ -galactosidasa el promedio de la expresión basal de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  fue de aproximadamente 50 UM.

### 3.2.12. Conclusiones y perspectivas

Una de las conclusiones en el análisis de la expresión del gen *hmp* es que, la secuencia entre la base -56 a la -68 es importante en la expresión del gen, pero no en la inducción de la expresión por la presencia de PQ o SNP. Además *hmp* solo tiene un sitio de inicio de la transcripción.

Se observó que la inducción de la expresión por SNP es casi inmediatamente después al tratamiento a diferencia de la inducción por la presencia de PQ, la cual se observa hasta los 45 minutos después del tratamiento, Estos resultados indican que posiblemente estuvieran involucrados dos factores transcripcionales. Sin embargo en ausencia de NsrR la expresión del gen se desreprime, indicando que posiblemente esta proteína se el único factor involucrado en regulación del gen *hmp* por la presencia de PQ o SNP, aunque se observó un ligero aumento en la expresión por la inducción con PQ o SNP, que puede ser por la inactivación de Fur.

Una perspectiva interesante sería evaluar la expresión de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en un fondo genético *fur yjeB*.

### DISCUSIÓN

En las bacterias como *Escherichia coli* se han estudiado los sistemas de defensa que participan en la protección ante el estrés oxidativo por la presencia de ROS y RNS.

Los sistemas más estudiados en la protección contra el estrés oxidativo son, el sistema OxyR que responde a la presencia de peróxido de hidrógeno y el sistema SoxRS, que responde a la presencia de superóxido y NO<sup>•</sup>. En el sistema SoxRS, la proteína sensora es SoxR y es el regulador transcripcional de *soxS*, que codifica para la proteína SoxS, esta proteína funciona como regulador transcripcional de una serie de genes involucrados en la detoxificación y reparación del daño provocado por el estrés oxidativo (Walkup y Kogoma, 1989; Wu y Weiss, 1991).

Otros mecanismos involucrados en la respuesta al estrés oxidativo involucran proteínas encargadas de detoxificar principalmente el NO<sup>•</sup>, como la flavorubredoxinas y flavohemoglobinas. La flavorubredoxina es codificada por los genes *norV* (*ygaK*, b2710) y *norW* (*ygbD*, b2711), los cuales son un operón (da Costa *et al.*, 2003). Estos genes codifican para una proteína con función de NO reductasa, en condiciones anaeróbicas, catalizando la reacción de NO<sup>•</sup> a óxido nitroso (Gardner *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2002). La proteína NorR (*ygaA*, b2709) funciona como el regulador del operón *norVW* (Hutchings *et al.*, 2002; da Costa *et al.*, 2003), recientemente se publicó el mecanismo por el cual NorR percibe la presencia de NO<sup>•</sup> (D'Áutréaux *et al.*, 2005).

La flavohemoglobina funciona como una NO<sup>•</sup> dioxigenasa o desnitrosilasa catalizando la reacción de NO<sup>•</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, en condiciones aeróbicas (Gardner *et al.*, 1998; 2000; Hausladen *et al.*, 1998, 2001) y anaeróticamente Hmp tiene actividad de NO<sup>•</sup> reductasa, catalizando la reacción de NO<sup>•</sup> a N<sub>2</sub>O (Kim *et al.*, 1999). Existe evidencia de que la expresión del gen *hmp* es inducido por el NO<sup>•</sup> y superóxido (Poole *et al.*, 1996; Membrillo-Hernández *et al.*, 1997a y b, 1998, 1999), sin

embargo los factores involucrados en la inducción por la presencia de PQ o SNP aún no está bien estudiado. Recientemente se reportó la participación de la proteína NsrR codificada por el gen *yjeB* en la regulación del gen en presencia de NO<sup>-</sup> (Bodenmiller y Spiro, 2006).

El objetivo en este trabajo fue caracterizar la regulación del gen *hmp* en respuesta al estrés oxidativo por la presencia de PQ o SNP en *Escherichia coli*.

La estrategia experimental inicial que se usó en la búsqueda de un factor transcripcional, involucrado en la regulación del gen *hmp* en presencia de PQ o SNP fue, realizar una mutagénesis al azar mediada por la inserción de un transposón usando una cepa merodiploide con la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$ . Después de aproximadamente 20,000 colonias mutantes seleccionadas en diferentes medios indicadores de la expresión de la fusión (LB Xgal, MacConkey o Tetrazolium) no se detectó alguna mutante con cambios en la expresión de la fusión. Posiblemente la estrategia experimental no fue la adecuada para seleccionar una mutante afectada en la expresión de la fusión, indicando que la que codificada por el gen mutado participa en la regulación del gen *hmp*.

En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium fue reportado a Fur como el único factor transcripcional involucrado en la regulación del gen *hmp* (Crawford y Goldberg, 1998a y b). Para poder determinar si Fur también participa en la regulación de *hmp* de *E. coli*, se realizó la cuantificación de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las fusiones  $\Phi(hmp_{Ec}-lacZ)$  y  $\Phi(hmp_{St}-lacZ)$ . Se determinó que la proteína Fur funciona como un regulador negativo de la expresión de *hmp* en ambas bacterias, sin embargo no es el único factor involucrado, ya que la expresión de las fusiones fue inducida por la presencia de PQ o SNP en ausencia de Fur, lo cual indica la presencia de otro factor transcripcional. Los datos publicados en 1998 de la regulación de *hmp* en *Salmonella* fueron retractados al darse cuenta que los datos publicados habían sido realizados usando una fusión  $\Phi(iroC-lacZ)$  (Crawford y Goldberg, 2006). Un dato que refuerza los resultados de

la participación de Fur en la regulación de *hmp* fue la unión de esta proteína a la secuencia intergénica *glyA-hmp*. Por otra parte D'Autréaux y colaboradores (2002) han reportado la inactivación de la actividad de Fur por la nitrosilación de hierro en presencia de NO<sup>-</sup> (D'Autréaux *et al.*, 2002).

La proteína RamA fue involucrada en el estrés oxidativo ya que, la sobreexpresión del gen *ramA* generó resistencia a la menadiona (generador de superóxido) en *Salmonella typhimurium* (van der Straaten *et al.*, 2004b). El gen *ramA* sólo se ha encontrado en el género *Salmonella* y en la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. Se ha identificado a *ramA* como un gen de resistencia a multidroga en *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serovar Paratyphi y *Enterobacter aerogenes* (George *et al.*, 1995; Yassien *et al.*, 2002; van der Straaten *et al.*, 2004a y 2004b; Chollet *et al.*, 2004). En este trabajo se muestra evidencia para determinar que RamA esta involucrado en la inducción del gen *hmp* por la presencia de PQ, en ausencia de este gen la expresión de *hmp* disminuye en presencia de PQ, lo que indicaría una regulación positiva. Sin embargo se desconoce si el papel de RamA puede ser directo, reconociendo una secuencia específica en la región intergénica *glyA-hmp*, o indirecto, participando en la regulación de la transcripción de otro gen que codifique para una proteína involucrada en la regulación de *hmp* (Figura 26).

RamA pertenece a la familia de reguladores transcripcionales tipo AraC junto con MarA y SoxS. Se ha reportado que esta proteína se puede unir a la región promotora de algunos genes que pertenecen al regulón SoxRS, reconociendo la secuencia de unión de SoxS para llevar a cabo la transcripción de estos (Yassien *et al.*, 2002), sin embargo se tiene evidencia de que *hmp* no pertenece a este regulón (Membrillo-Hernández *et al.*, 1997; Pomposiello *et al.*, 2001). Por otra parte la secuencia reportada como la unión de RamA o SoxS (llamada Sox box o Mar box, Chollet *et al.*, 2004) no se encuentra en la región intergénica *glyA-hmp*. Tal vez RamA participa en la expresión de *hmp* de

*Salmonella* a través de un mecanismo indirecto, determinar cómo ésta proteína esta involucrada en esta regulación es una perspectiva que se tiene.

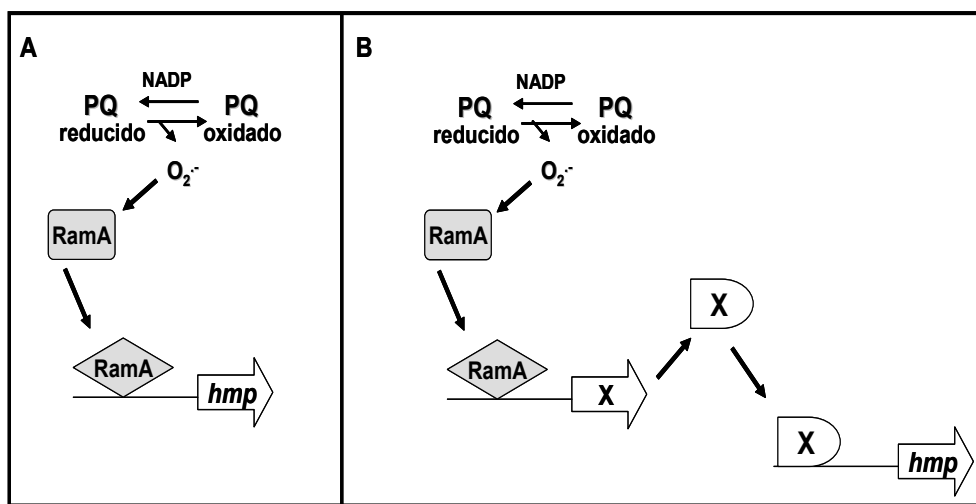


Figura 26. Modelos de regulación de la proteína RamA en la expresión del gen *hmp* en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.  
A. Modelo directo. B. Modelo indirecto.

La ausencia de *ramA* en *E. coli* da evidencia de que esta regulación podría ser exclusiva del género *Salmonella*, además este mecanismo de regulación es independiente del sistema SoxRS, ya que al parecer RamA sólo responde a la presencia de PQ. A pesar de esto se pudo observar que en ausencia de *ramA* la fusión  $\Phi(hmp_{Ec}-lacZ)$  en el fondo genético de *Salmonella* presenta una expresión similar que la fusión  $\Phi(hmp_{St}-lacZ)$  en ausencia de este mismo gen. Estos resultados indican que tal vez la proteína RamA se perdió en el género *E. coli* y que la presión selectiva hizo que se conservara en *Salmonella*.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo fueron publicados en el artículo Multiple regulators of the flavohaemoglobin (*hmp*) gene of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium include RamA, a transcriptional regulator conferring the multidrug resistance phenotype (Hernández-Urzúa *et al.*, 2006 en línea).

Analizando la expresión del gen *hmp* por Northern blot en presencia de PQ o SNP se observó que, la inducción por la presencia de SNP fue a los 10 y 45 minutos después del tratamiento, mientras que por la presencia de PQ fue a los 45

minutos. Realizando una cinética de inducción de la expresión del gen se determinó que, el gen responde a la presencia de SNP casi inmediatamente (1 minuto después del tratamiento) sin embargo la inducción por la presencia de PQ es tardía (45 minutos después del tratamiento). Estos resultados podrían estar indicando un modelo de regulación involucrando dos factores transcripcionales; uno responde a la presencia de PQ y el otro a la presencia de SNP. En este modelo de regulación (Figura 27A) el superóxido, que se genera por la oxidación del PQ, es percibido por una proteína (X) que funciona como el factor transcripcional de un gen (Y) que codifica para una proteína (Y) la cual es el factor transcripcional de *hmp*. En el caso de la inducción por la presencia de SNP (Figura 27B) posiblemente la regulación sea directa, es decir la proteína sensora del NO $\cdot$  funciona como el factor transcripcional de *hmp*.

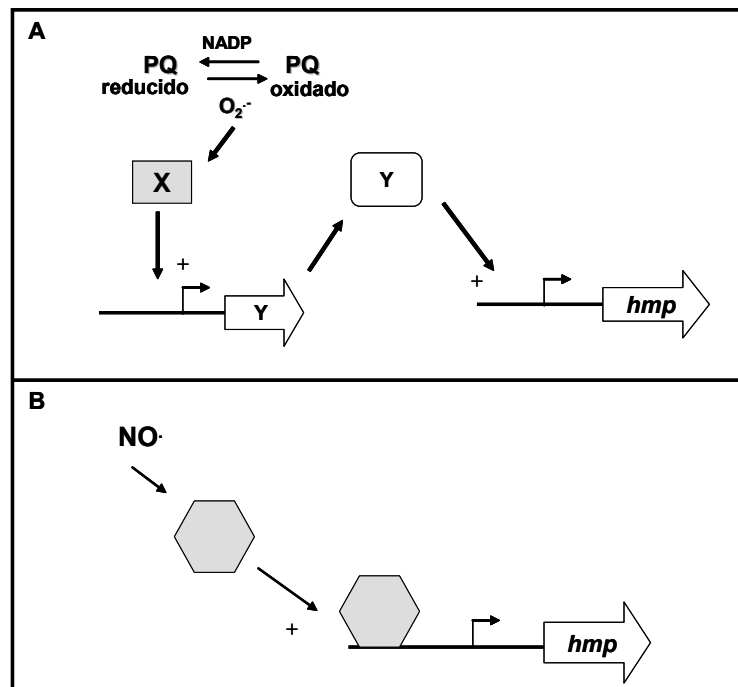


Figura 27. Posibles modelos de regulación del gen *hmp* de *E. coli* en presencia de PQ (A) o SNP (B).

Aunque cabe la posibilidad de que sólo participe un factor transcripcional que responda a la presencia de PQ o SNP. Tal vez las diferencias en la inducción del gen *hmp* pudieran ser por la sensibilidad del factor transcripcional al superóxido o NO $\cdot$ . Por otra parte tomando en cuenta que la inducción de *soxS* y

*sodA* es mucho más sensible a la presencia de PQ, podría ser que la respuesta primaria a la presencia de superóxido sea del regulón SoxRS, mientras que la respuesta a la presencia de NO<sup>·</sup> sea la flavohemoglobina y otras proteínas inducidas por NO como la flavorubredoxina.

Recientemente se reportó que la proteína NsrR funciona como un represor de la expresión del gen *hmp*. En presencia de NO<sup>·</sup> NsrR se inactiva, esto favorece la expresión del gen *hmp* (Bodenmiller y Spiro, 2006). Esta misma proteína se ha involucrado en la expresión de los genes *hmp* de *Salmonella* y *Bacillus subtilis* (Bang *et al.*, 2006; Nakano *et al.*, 2006).

Aunque se describió a NsrR como regulador del gen *hmp* que responde a la presencia de NO<sup>·</sup>, aún se desconocía el mecanismo de regulación por la presencia de superóxido. Para determinar el papel de NsrR en la regulación de *hmp* en presencia de PQ, se cuantificó la expresión de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en una mutante *yjeB* (*nsrR*). Se observó desrepresión de la expresión de la fusión, sin embargo en presencia de PQ o SNP se detectó una ligera inducción, lo cual indicaría la participando de otro factor transcripcional.

En la regulación del gen *hmp* se han descrito algunas otras proteínas; en la primera parte de este trabajo se describió a Fur como un regulador negativo de la expresión de este gen. El mecanismo propuesto es, la inactivación de Fur al nitrosilarse el hierro en presencia de NO<sup>·</sup> (D'Autréaux *et al.*, 2002).

Tomando en cuenta el papel de Fur en la regulación de *hmp* posiblemente, la inducción de la fusión  $\Phi(hmp-lacZ)$  en una mutante *yjeB* en presencia de SNP se debe a la inactivación de Fur.

El modelo de regulación que se propone es: en una cepa silvestre, NsrR y Fur se unen a la región promotora de *hmp* obstruyendo el sitio de inicio de la transcripción y por lo tanto no hay transcripción del gen (Figura 28A). En presencia



de NO $\cdot$  (Figura 28B), NsrR y Fur se inactivan, llevando a la activación de la transcripción de *hmp*, aún no se desconoce si en presencia de PQ podría estar pasando algo similar, pero tal vez la inactivación de estas dos proteínas no ocurra tan rápido por la presencia de superóxido (Figura 28B).

En ausencia del gen *yjeB* (Figura 28C), la transcripción de *hmp* se desreprime, no totalmente, sin embargo aún Fur se encuentra unida al promotor de *hmp* obstruyendo el sitio de inicio de la transcripción. En presencia de SNP (Figura 28D), Fur se inactiva por la presencia de NO $\cdot$  por lo tanto la transcripción de *hmp* se desreprime totalmente, en presencia de PQ tal vez pase lo mismo.

Aunque NsrR y Fur participan como represores de la expresión de *hmp*, no se observa la misma activación de la transcripción por la ausencia de NsrR que por la de Fur. Una posible explicación sería que la unión de Fur al promotor de *hmp* es débil, ya que sólo presenta 7 de la 19 pares reportadas como consenso de la Fur box.

Los datos obtenidos sugieren que NsrR y Fur participan en la regulación del gen *hmp* por la presencia de NO $\cdot$  y sugiere que en presencia de PQ sucede el mismo mecanismo sólo que tal vez la susceptibilidad al superóxido por NsrR sea menor que por NO $\cdot$ .

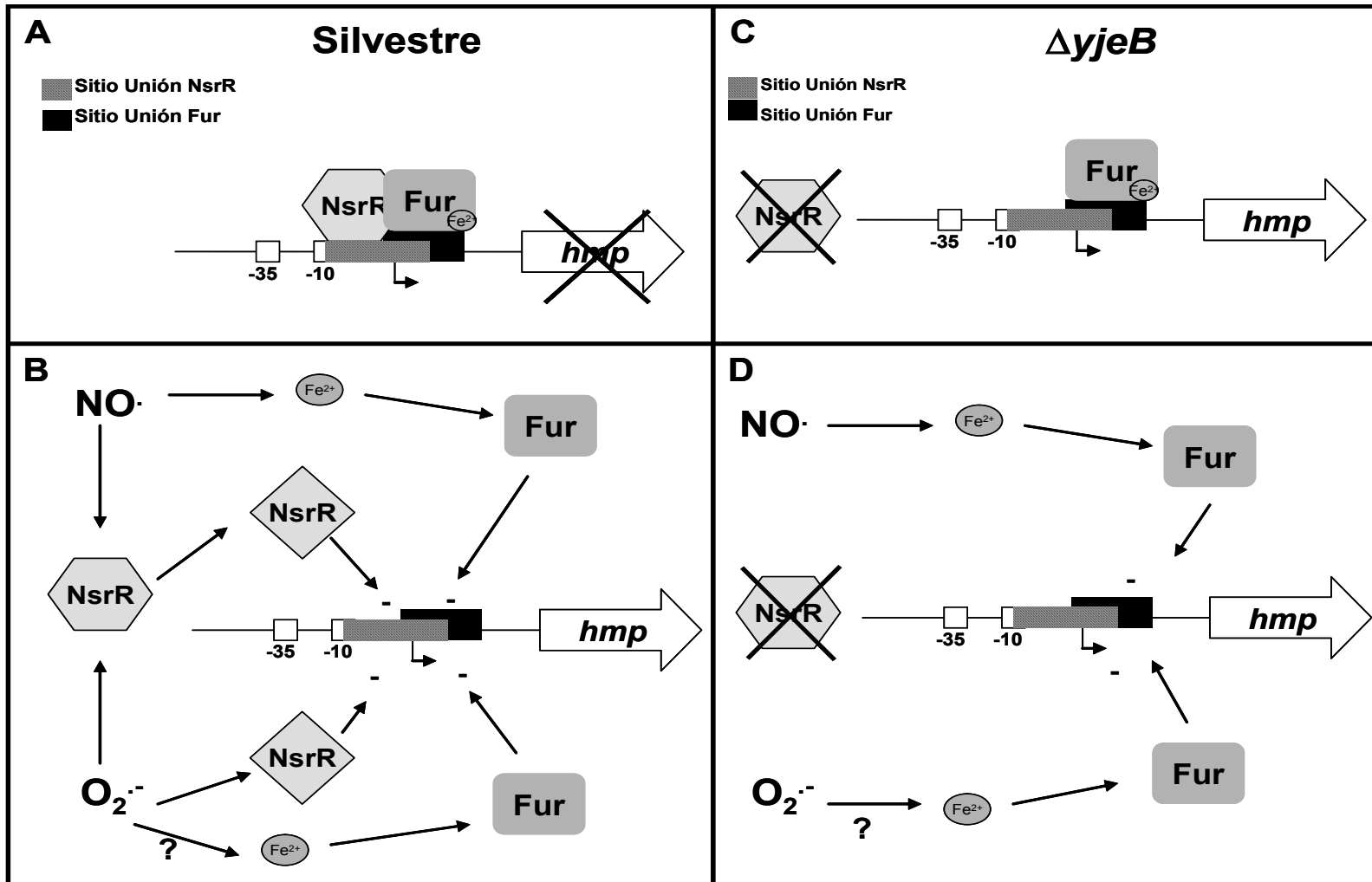


Figura 28. Modelo de regulación del gen *hmp* de *E. coli* en presencia de PQ o SNP involucrando a las proteínas NsrR y Fur. A y B en una cepa silvestre. C y D en la mutante *yjeB*.

1. **Aiba, H., Adhya S. and Crombrugghe B.** 1981. Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.*, 256(22):11905-11910.
2. **Akura, T., Zaki M.H., Yoshitake J., Okamoto T. and Akaike T.** 2006. Nitrosative stress through formation of 8-nitroguanoside: insights into microbial pathogenesis. *Nitric Oxide*, 14:101-108.
3. **Andrews, S.C., Shipley D., Keen J.N., Findlay J.B., Harrison P.M. and Guest J.R.** 1992. The hemoglobin-like protein (Hmp) of *Escherichia coli* has ferrosiderophore-reductase-activity and its C-terminal domain shares homology with ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductases. *FEBS Lett.*, 302:247-252.
4. **Arai, H., Hayashi M., Kuroi A., Ishii M. and Igarashi Y.** 2005. Transcriptional regulation of the flavohemoglobin gene for aerobic nitric oxide detoxification by the second nitric oxide-responsive regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 187(12):3960-3968.
5. **Bang, I-S, Liu L., Vazquez-Torres A., Crouch M-L., Stamler J.S. and Fang F.C.** 2006. Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the *Salmonella* flavohemoglobin Hmp. *J. Biol. Chem.*, 281(38):28039-28047.
6. **Beckman, J.S. and Koppenol W.H.** 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.*, 271:1424-1437.
7. **Beloin, C., Valle J., Latour-Lambert P., Faure P., Kzreminski M., Balestrino D., Haagensen J.A.J., Molin S., Prensier G., Arbeille B., and Ghigo J-M.** 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.*, 51(3):659-674.
8. **Bock, A. and Sawers G.** 1996. Fermentation. *In: Escherichia coli and Salmonella cellular and molecular biology.* (Eds. Neidhardt F.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K. B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umberger H. E.). ASM Press Washington, D.C.
9. **Bodenmiller, D.M. and Spiro S.** 2006. The *yjeB* (*nsrR*) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. *J. Bacteriol.*, 188(3):874-881.

10. **Bueno, R., Pahel G. and Magasanik B.** 1985. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 164:816-822.
11. **Cabiscol, E., Tamarit J. and Ros J.** 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.*, 3:3-8.
12. **Cairrão, F., Cruz A., Mori H. and Arraiano C.M.** 2003. Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA. *Mol. Microbiol.*, 50(4):1349-1360.
13. **Chollet, R., Chevalier J., Bollet C., Pages J-M. and Davin-Regli A.** 2004. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(7):2518-2523.
14. **Ciria, R., Abreu-Goodger A., Morett E. and Merino E.** 2004. GeConT: gene context analysis. *Bioinformatics*, 20(14):2307-2308.
15. **Clollet, R., Chevalier J., Bollet C., Pages J-M and Davin-Regli A.** 2004. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(7):2518-2523.
16. **Cole, S.T., et al.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393:537-544.
17. **Cramm, R., Siddiqui R.A. and Friedrich B.** 1994. Primary sequence and evidence for a physiological function of the flavohemo-protein of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.*, 269:7349-7354.
18. **Crawford, M.J. and Goldberg D.E.** 1998a. Role of the *Salmonella* flavohemoglobin in protection from nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 273:12543-12547.
19. **Crawford, M.J. and Goldberg D.E.** 1998b. Regulation of the *Salmonella typhimurium* flavohemoglobin gene. A new pathway for bacterial gene expression in response to nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 273:34028-34032.
20. **Crawford, M.J. and Goldberg D.E.** 2006. Regulation of the *Salmonella typhimurium* flavohemoglobin gene. A new pathway for bacterial gene expression in response to nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 281:3752.

21. **Cruz-Ramos, H., Crack J., Wu G., Hughes M.N., Scott C., Thomson A.J., Green J. and Poole R.K.** 2002. NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *EMBO J.*, 21:3235-3244.
22. **D'Autréaux, B., Touati D., Bersch B., Latour J.M. and Michaud-Soret I.** 2002. Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric-uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:16619-16624.
23. **D'Autréaux, B., Tucker N.P., Dixon R. and Spiro S.** 2005. A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. *Nature*, 437:769-772.
24. **da Costa, P., Teixeira M. and Saraiva L.M.** 2003. Regulation of the flavorubredoxin nitric oxide reductase gene in *Escherichia coli*: nitrate repression, nitrite induction, and possible post-transcription control. *FEMS Microbiol. Lett.*, 218:385-393.
25. **Dikshit, K.L. and Webster D.A.** 1988. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. *Gene*, 70:377-386.
26. **Ding, H. and Demple B.** 2000. Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:5146-5150.
27. **Elliot, T.** 1992. A method for constructing single copy *lac* fusions in *Salmonella typhimurium* and its application to the *hemA-prfA* operon. *J. Bacteriol.*, 174:245-253.
28. **Ermler, U., Siddiqui R. A., Cramm R., Schröder D. and Friedrich B.** 1995. Crystallization and preliminar X-ray diffraction studies of a bacterial flavohemoglobin protein. *Proteins*, 21:351-353.
29. **Fang, F.C.** 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2:820-832.
30. **Favey, S., Labesse G., Vouille V. and Boccara M.** 1995. Flavohaemoglobin HmpX: a new pathogenicity determinant in *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Microbiology*, 141:863-871.

31. **Firoved, A.M., Wood S.R., Ornatowski W., Deretic V. and Timmins G.S.** 2004. Microarray analysis and functional characterization of the nitrosative stress response in nonmucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 186(12):4046-4050.
32. **Frey, A.D., Farrés J., Bollinger C.J.T. and Kallio P.T.** 2002. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:4835-4840.
33. **Frey, A., Koskenkorva D.T. and Kallio P.T.** 2003. *Vitreoscilla* hemoglobin promoter is not responsive to nitrosative and oxidative stress in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 224:127-132.
34. **Gardner, P.R., Gardner A.M., Martin L.A. and Salzman A.L.** 1998. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:10378-10383.
35. **Gardner, P.R., Gardner A.M. and Martin L.A.** 2000. Nitric-oxide dioxygenase activity and function of flavohemoglobins. Sensitivity to nitric oxide and carbon monoxide inhibition. *J. Biol. Chem.*, 275:31581-31587.
36. **Gardner, A.M., Helmick R.A. and Gardner P.R.** 2002. Flavorubredoxin, an inducible catalyst for nitric oxide reduction en detoxification in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 277 (10):8172-8177.
37. **Gardner, A.M., Gessner C.R. and Gardner P.R.** 2003. Regulation of the nitric oxide reduction operon (*norVW*) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 278 (12):10081-10086.
38. **Gaudu, P., Moon N. and Weiss B.** 1997. Regulation of the *soxRS* oxidative stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 272:5082-5086.
39. **George, A.M., Hall R. M. and Stokes H.W.** 1995. Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: a novel gene, *ramA* confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 141:1909-1920
40. **Georgellis, D., Kwon O. and Lin E.C.** 2001. Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science*, 292:2314-2316.

41. **Goda, S.K. and Minton N.P.** 1995. A simple procedure for gel electrophoresis and Northern blotting of RNA. *Nucleic Acids Research*, 23(16):3357-3358.
42. **Gomes, C. M., Giuffrè A., Forte E., Vicente J.B., Saraiva L.M., Brunori M. and Teixeira M.** 2002. A novel type of nitric-oxide reductase. *Escherichia coli* flavorubredoxin. *J. Biol. Chem.*, 277(28):25273-25276.
43. **González-Flecha, B. and Demple B.** 2005. Genetic responses to free radicals. Homeostasis and genetic control. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 899:69-87.
44. **Halliwell, B. and Gutteridge J.M.C.** 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 219:1-14.
45. **Halliwell, B.** 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141:312-322.
46. **Hansberg-Torres, W.** 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *In: Mensaje Bioquímico* (Eds. Cea Bonilla A., del Arenal Mena I.P., Riveros Rosas H., Vázquez-Contreras E.) Vol. XXVI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM, México D. F.
47. **Hausladen, A., Gow A.J. and Stamler J.S.** 1998. Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:14100-14105.
48. **Hausladen, A., Gow A.J. and Stamler J.S.** 2001. Flavohemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:10108-10112.
49. **Hutchings, M.I., Mandhana N. and Spiro S.** 2002. The NorR protein of *Escherichia coli* activates expression of the flavorubredoxin gene *norV* in response to reactive nitrogen species. *J. Bacteriol.*, 184(16):4640-4643.
50. **Ilari, A., Bonamore A., Farina A., Jonson K.A. and Bofia A.** 2002. The X-ray structure of Ferric *Escherichia coli* flavohemoglobin reveals an unexpected geometry of the distal heme pocket. *J. Biol. Chem.*, 277:23725-23732.
51. **Ingraham, J.L. and Marr A.G.** 1996. Effect of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth. *In: Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology.* (Eds. Neidhardt F.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin

- E.C.C., Low K. B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umbarger H. E.). ASM Press Washington, D.C.
52. **Iwaasa, H., Takagi T. and Shikama K.J.** 1992. Amino acid sequense of yeast hemoglobin. A two-domain structure. *Mol. Biol.*, 227:948-954.
  53. **Joshi, M. and Dikshit K. L.** 1994. Oxygen-dependent regulation of *Vitreoscilla* globin gene: evidence for positive regulation by FNR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202:535-542.
  54. **Justino, M.C., Vicente J.B., Teixeira M. and Saraiva L.M.** 2005. New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 280(4):2636-2643.
  55. **Kaur, R., Pathania R., Sharma V., Mande S.C. and Dikshit K.L.** 2002. Chimeric *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) carrying a flavoreductase domain relieves nitrosative stress in *Escherichia coli*: new insight into the functional role of VHb. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:152-160.
  56. **Keilin, D.** 1953. Occurence of haemoglobin in yeast and the supposed stabilization of the oxygenated cytochrome oxidase. *Nature*, 172:390-393.
  57. **Khosla, C. and Bailey J.E.** 1989. Characterization of the oxygen-dependent promoter of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 171:5990-6004.
  58. **Khosla, C., Curtis J.E., DeModena J., Rinas U. and Bailey J.E.** 1990. Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*. *Bio-Technol.*, 8:849-853.
  59. **Khosravi, M., Webster D.A. and Stark B. C.** 1990. Presence of the bacterial hemoglobin gene improves alpha-amylase production of a recombinant *Escherichia coli* strain. *Plasmid*, 24:190-194.
  60. **Kim, S.O., Orii Y., Lloyd D., Hughes M.N. and Poole R.K.** 1999. Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. *FEBS Lett.*, 445:389-394.
  61. **LaCelle, M., Kunamo M., Kurita K., Yamane K., Zuber P. and Nakano M.M.** 1996. Oxygen-controlled regulation of the flavohemoglobin gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 178:3803-3808.



62. **Lee, J-H, Yeo W-S and Roe J-H.** 2003. Regulation of the *sufABCDSE* operon by Fur. *J. Microbiol.*, 41(2):109-114.
63. **Li, Z. and Demple B.** 1994. SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*. Purification and interaction with DNA. *J. Biol. Chem.*, 269(28):18371-18377.
64. **Lin, E.C.C. and Lynch S.A.** 1996. Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Chapman & Hall. New York.
65. **Martin and Rosner.** 2002. Genomics of the *marA/soxS/rob* regulon of *E. coli*. *Mol. Microbiol.*, 46(6):1611-1624.
66. **Membrillo-Hernández, J., Ioannidis N. and Poole R.K.** 1996. The flavohaemoglobin (HMP) of *Escherichia coli* generates superoxide *in vitro* and causes oxidative stress *in vivo*. *FEBS Lett.*, 382:141-144.
67. **Membrillo-Hernández, J. and Poole R.K.** 1997. Bacterial flavohaemoglobins: a consensus sequence and identification of a discrete enterobacterial group and of further bacterial globins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 155:179-184.
68. **Membrillo-Hernández, J., Kim S.O., Cook G.M. and Poole R.K.** 1997a. Paraquat regulation of *hmp* (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12 is SoxRS independent but modulated by  $\sigma^S$ . *J. Bacteriol.*, 179:3164-3170.
69. **Membrillo-Hernández, J., Cook G.M. and Poole R.K.** 1997b. Roles of RpoS ( $\sigma^S$ ), IHF and ppGpp in the expression of the *hmp* gene encoding the flavohemoglobin (Hmp) of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.*, 254:599-603.
70. **Membrillo-Hernández, J., Coopamah M.D., Channa A., Hughes M.N. and Poole R.K.** 1998. A novel mechanism for upregulation of the *Escherichia coli* K-12 *hmp* (flavo-haemoglobin) gene by the 'NO releaser', S-nitrosoglutathione: nitrosation of homocysteine and modulation of MetR binding to the *glyA-hmp* intergenic region. *Mol. Microbiol.*, 29:1101-1112.
71. **Membrillo-Hernández, J., Coopamah M.D., Anjum M.F., Stevanin T.M., Kelly A., Hughes M.N. and Poole R.K.** 1999. The flavohemoglobin of *Escherichia coli* confers resistance to a nitrosating agent, a "nitric oxide

- releaser,” and paraquat and is essential for transcriptional responses to oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 274:748-754.
72. **Miller, J.H.** 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
73. **Moat, A.G., Foster J.W. and Spector M.P.** 2002. Introduction to microbial physiology. *In: Microbial physiology*. 4<sup>a</sup> ed.
74. **Moore, C.M., Nakano M.M., Wang T., Ye R.W. and Helmann J.D.** 2004. Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. *J. Bacteriol.*, 186(14):4655-4664.
75. **Mukhopadhyay, P., Zheng M., Bedzyk L., LaRosa R.A. and Storz G.** 2004. Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(3):745-750.
76. **Nakano, M.M., Zhu Y., LaCelle M., Zhang X. and Hulett F.M.** 2000. Interaction of ResD with regulatory regions of anaerobically induced genes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 37:1198-1207.
77. **Nakano, M.M.** 2002. Induction of ResDE-dependent gene expression in *Bacillus subtilis* in response to nitric oxide and nitrosative stress. *J. Bacteriol.*, 184:1783-1787.
78. **Nakano, M.M., Geng H., Nakano S. and Kobayashi K.** 2006. The nitric oxide-responsive regulator NsrR controls ResDE-dependent gene expression. *J. Bacteriol.*, 188(16):5878-5887.
79. **Neidhardt F.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M. and Umbarger H. E.** 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology. ASM Press Washington, D.C.
80. **Neidhardt, F.C. and Umbarger H.E.** 1996. Chemical Composition of *Escherichia coli*. *In: Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology. (Eds. Neidhardt F.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K. B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umbarger H. E.). ASM Press Washington, D.C.

81. **Ouellet, H., Ouellet Y., Richard C., Labarre M., Wittenberg B., Wittenberg J. and Guertin M.** 2002. Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99:902-5907.
82. **Partridge, J.D., Scott C., Tang Y., Poole R.K. and Green J.** 2006. *Escherichia coli* transcriptome dynamics during the transition from anaerobic to aerobic conditions. J. Biol. Chem., 281(38):27806-27815.
83. **Plamann, M.D. and Stauffer G.V.** 1989. Regulation of the *Escherichia coli glyA* by the *metR* gene product and homocysteine. J. Bacteriol., 171:4958-4962.
84. **Pomposiello, P.J., Bennik M.H. and Demple B.** 2001. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. J. Bacteriol., 183(13):3890-3902.
85. **Poole, R. K.** 1994. Oxygen reactions with bacterial oxidases and globins: binding, reduction and regulation. Antonie van Leeuwenhoek, 65:289-310.
86. **Poole, R.K., Anjum M.F., Membrillo-Hernández J., Kim S.O., Hughes M.N. and Stewart V.** 1996. Nitric oxide, nitrite, and Fnr regulation of *hmp* (Flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol., 178:5487-5492.
87. **Poole, R.K. and Hughes M.N.** 2000. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. Mol. Microbiol., 36:775-783.
88. **Poole R.K.** 2005. Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. Biochem. Soc. Trans., 33:176-180.
89. **Probst, I., Wolf G. and Schlegel H.G.** 1979. An oxygen-binding flavo-hemoprotein from *Alcaligenes eutrophus*. Biochim. Biophys. Acta, 576:471-478.
90. **Ramírez, M., Valderrama B., Arredondo-Peter R., Soberón M., Mora J., and Hernández G.** 1999. *Rhizobium etli* genetically engineered for the heterologous expression of *Vitreoscilla* sp. Hemoglobin: effects free-living and symbiosis. Mol. Plant-Microbe. Interact., 12:1008-1015.

91. **Rinaldi, A.C., Bonamore A., Macone a., Boffi A., Bozzi A. and Di Giulio A.** 2006. Interaction of *Vitreoscilla* hemoglobin with membrane lipids. *Biochemistry*, 45:4069-4076.
92. **Sambrook, J. and Russell D.W.** 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
93. **Sawers, G.** 1999. The aerobic/anaerobic interface. *Curr. Op. Microbiol.*, 2:181-187.
94. **Simons, R.W., Houman F. and Kleckner N.** 1987. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*, 53:85-96.
95. **Southern, E.M.** 1975. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98:503-517.
96. **Souza, V., Rocha M., Sander L. and Eguiarte L.E.** 2001. Historia natural, ecología y evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli*. *In: Microbios en Línea*. (Eds. Martínez R.E. y Martínez R. J.) Coordinación de la Investigación Científica, UNAM.
97. **Stevanin, T.M., Poole R.K., Demoncheaux E.A. and Read R.C.** 2002. Flavohemoglobin Hmp protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from nitric oxide-related killing by human macrophages. *Infect. Immun.*, 70:4399-4405.
98. **Storz, G. and Zheng M.** 2000. Oxidative Stress. *In: Bacterial Stress Responses*. (Eds. Storz G. and Hengge-Aronis R.) ASM Press, Washington, D.C.
99. **Todar, K.** 2004. Nutrition and growth of bacteria. *In: Todar's online textbook of bacteriology*. University of Wisconsin-Madison. [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net)
100. **Tsai, P.S., Kallio P.T. and Bailey J.E.** 1995. FNR, a global transcriptional regulator of *Escherichia coli*, activates the *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) promoter and intracellular VHb expression increases cytochrome *d* promoter activity. *Biotechnol. Prog.*, 11:288-293.

101. **van der Straaten, T., Janseen R., Mevius D.J. and van Dissel T.** 2004a. *Salmonella* gene *rma* (*ramA*) and multiple-drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(6):2292-2294.
102. **van der Straaten, T., Zulianello L., van Diepen A., Granger D.L., Janseen R. and van Dissel T.** 2004b. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium RamA, intracellular oxidative stress response, and bacterial virulence. *Infec. Immun.*, 72(2):996-1003.
103. **Vasudevan, S.G., Armarego W.L.F., Shaw D.C., Lilley P.E., Dixon N.E. and Poole R.K.** 1991. Isolation and nucleotide sequence of the *hmp* gene that encodes a haemoglobin-like protein in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.*, 226:49-58.
104. **Vasudevan, S.G., Tang P., Dixon N.E. and Poole R.K.** 1995. Distribution of the flavohaemoglobin, HMP, between periplasm and cytoplasm in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 125:219-224.
105. **Wakabayashi, S., Matsubara H. and Webster D.A.** 1986. Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature*, 322:481-483.
106. **Walkup, L.K.B. and Kogoma T.** 1989. *Escherichia coli* proteins inducible by oxidative stress mediated by the superoxide radical. *J. Bacteriol.*, 171(3):1476-1484.
107. **Webster, D.A. and Hackett D.P.** 1966. The purification and properties of cytochrome *o* from *Vitreoscilla*. *J. Biol. Chem.*, 241:3308-3315.
108. **White, D.** 2000. *The physiology and biochemistry of prokaryotes*. 2<sup>a</sup> ed. Oxford University Press. New York.
109. **Winans, S., Elledge S., Krueger J.H. and Walker G.C.** 1985. Site-directed insertion and deletion mutagenesis with cloned fragments in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 161(3):1219-1221.
110. **Wittenberg, J.B., Bolognesi M., Wittenberg B.A. and Guertin M.** 2002. Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes and plants. *J. Biol. Chem.*, 277:871-874.

111. **Wu, G., Wainwright L.M., Membrillo-Hernández J. and Poole R.K.** 2004. Bacterial hemoglobins: old proteins with 'new' functions? Roles in respiratory and nitric oxide metabolism. *In: Respiration in Archaea and Bacteria*. (Zannoni, D., ed.) Vol. 1. Klumer Academic Publishers, Dodrecht, Holanda.
112. **Wu, J. and Weiss B.** 1991. Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 173(9):2864-2871.
113. **Yassien, M.A., Ewis H. E., Lu C-D. and Abdelal A.T.** 2002. Molecular cloning and characterization of the *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B *rma* gene, which confers multiple drug resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(2):360-366.
114. **Zhu, H. and Riggs A.F.** 1992. Yeast flavohemoglobin is an ancient protein related to globins and a reductase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:5015-5019.

## Flavohemoglobin Hmp, but Not Its Individual Domains, Confers Protection from Respiratory Inhibition by Nitric Oxide in *Escherichia coli*\*

Received for publication, April 8, 2003, and in revised form, June 13, 2003  
Published, JBC Papers in Press, June 24, 2003, DOI 10.1074/jbc.M303629200

Elizabeth Hernández-Urzúa†§, Catherine E. Mills§¶, Gregory P. White||,  
Martha L. Contreras-Zentella‡\*\*, Edgardo Escamilla\*\*, Subhash G. Vasudevan||‡‡,  
Jorge Membrillo-Hernández‡, and Robert K. Poole¶§§

From the †Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, P. O. Box 70-228, Mexico City, 04510, Mexico, ¶Department of Molecular Biology and Biotechnology, The University of Sheffield, Firth Court, Western Bank, Sheffield S10 2TN, United Kingdom, ||Department of Biochemistry and Molecular Biology, James Cook University, Townsville, Queensland 4811, Australia, and \*\*Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, P. O. Box 70-242, Mexico City 04510, Mexico

*Escherichia coli* possesses a two-domain flavohemoglobin, Hmp, implicated in nitric oxide (NO) detoxification. To determine the contribution of each domain of Hmp toward NO detoxification, we genetically engineered the Hmp protein and separately expressed the heme (HD) and the flavin (FD) domains in a defined *hmp* mutant. Expression of each domain was confirmed by Western blot analysis. CO-difference spectra showed that the HD of Hmp can bind CO, but the CO adduct showed a slightly blue-shifted peak. Overexpression of the HD resulted in an improvement of growth to a similar extent to that observed with the *Vitreoscilla* heme-only globin Vgb, whereas the FD alone did not improve growth. Viability of the *hmp* mutant in the presence of lethal concentrations of sodium nitroprusside was increased (to 30% survival after 2 h in 5 mM sodium nitroprusside) by overexpressing Vgb or the HD. However, maximal protection was provided only by holo-Hmp (75% survival under the same conditions). Cellular respiration of the *hmp* mutant was instantaneously inhibited in the presence of 13.5  $\mu$ M NO but remained insensitive to NO inhibition when these cells overexpressed Hmp. When HD or FD was expressed separately, no significant protection was observed. By contrast, overexpression of Vgb provided partial protection from NO respiratory inhibition. Our results suggest that, despite the homology between the HD from Hmp and Vgb (45% identity), their roles seem to be quite distinct.

Flavohemoglobins have been identified in a number of bacteria and yeast (1–4). These proteins consist of an N-terminal

heme binding domain integrated with a flavin binding reductase domain. Despite the high degree of conservation among these proteins in a variety of organisms and the biochemical characterization of yeast (5) and bacterial (6) examples, their function remained elusive for many years. A proposal for the involvement of flavohemoglobins in protection from NO stress was first prompted by the observation of a significant increase in *hmp* transcription in response to exogenous NO in *Escherichia coli* (7). This was later supported by (a) the increased sensitivity to NO-releasing agents of defined *hmp* mutant strains of *E. coli* (8) and *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (9–10), (b) biochemical evidence showing that the purified Hmp protein has NO dioxygenase or denitrosylase activity, forming nitrates under aerobic conditions (11–13), and (c) the additional ability of Hmp to sequester NO and reduce it to N<sub>2</sub>O anaerobically (12, 14). Together these observations strongly suggested that one of the main functions of flavohemoglobins is to provide protection from the toxicity of NO. Indeed, *S. enterica* serovar *typhimurium* flavohemoglobin-deficient mutants are impaired in pathogenicity due to their increased sensitivity to the NO-related killing process exerted by macrophages (10). Recently, it was reported that heterologous expression in *E. coli* of flavohemoglobins from *Pseudomonas aeruginosa*, *S. enterica* serovar *typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Deinococcus radiodurans*, or *Ralstonia eutropha* also confers resistance to nitrosative and oxidative stresses (15).

The electron transport chain of aerobically grown *E. coli* contains two different quinol oxidases, cytochromes *bo'* and *bd*, which reduce oxygen to water (16). Cytochrome *bo'* is the predominant terminal oxidase during fully aerobic conditions, and its oxygen affinity is relatively low ( $K_m < 1 \mu$ M (17)). Conversely, cytochrome *bd* is synthesized under low oxygen conditions and has an extremely high oxygen affinity ( $K_m$  3 to 8 nM (18)). Respiration catalyzed by either cytochrome *bo'* or *bd* is sensitive to NO (19) so that, at oxygen tensions above the  $K_m$  for O<sub>2</sub> of these oxidases, neither oxidase provides NO-insensitive respiration, and the degree of NO inhibition increases at low oxygen tensions (19). Significantly, we demonstrated that the flavohemoglobin Hmp from *E. coli* provides effective protection *in vivo* from NO respiratory inhibition (19).

Some bacteria, such as *Vitreoscilla sp.* and *Campylobacter jejuni*, do not synthesize flavohemoglobins but possess single-domain hemoglobins lacking the FAD-containing domain (3, 4, 20–21). *Vitreoscilla* hemoglobin Vgb accumulates to high levels

\* This work was supported by Biotechnology and Biological Sciences Research Council Grants PRS12199 and P18939 (to R. K. P.), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México Grant J-33369 and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)-Universidad Nacional Autónoma de México Grant IN5200 (to J. M.-H.), and a Ph.D. CONACyT studentship (to E.H.-U.). The Royal Society, the Wellcome Trust, and Academia Mexicana de Ciencias generously provided traveling support to J. M.-H. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ These authors contributed equally to this work.

‡‡ Present address: Novartis Institute for Tropical Diseases, 1 Science Park Rd., Singapore 117528.

§§ To whom all correspondence should be addressed. Tel.: 44-114-222-4447; Fax: 44-114-272-8697; E-mail: r.poole@sheffield.ac.uk.

TABLE I  
Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains	Relevant genotype	Source/Reference
RKP2206	$\Delta(\text{argF-lacZ})$	7
RKP4545	RKP2206, but <i>hmp::Tn5</i>	8
RKP4701	RKP4545, but harboring pPL341 <i>hmp</i> <sup>+</sup>	This study
RKP4702	RKP4545, but harboring pPL341 $\Delta$ FD	This study
RKP4703	RKP4545, but harboring pPL341 $\Delta$ HD	This study
RKP5101	RKP2206, but harboring pPL341 $\Delta$ FD	This study
RKP5102	RKP2206, but harboring pPL341 $\Delta$ HD	This study
RKP5103	RKP2206, but harboring pPL341 <i>hmp</i> <sup>+</sup>	This study
RKP5104	RKP2206, but harboring pUC8:16 <i>vgb</i> <sup>+</sup>	This study
RKP5105	RKP2206, but harboring pUC18	This study
RKP5106	RKP2206, but harboring pBR322	This study
RKP5107	RKP4545, but harboring pUC18	This study
RKP5108	RKP4545, but harboring pBR322	This study
RKP5109	RKP4545, but harboring pUC8:16 <i>vgb</i> <sup>+</sup>	This study
Plasmids		
pBR322	<i>bla</i> <sup>+</sup> <i>tet</i> <sup>R</sup>	29
pUC18	Cloning vector <i>bla</i> <sup>+</sup> <i>lacZYA</i> <sup>+</sup>	Stratagene
pPL341	pBR322 with <i>hmp</i> <sup>+</sup> under its own promoter	30
pPL341 $\Delta$ HD	pBR322 with a 806 bp <i>NdeI</i> - <i>EcoRI</i> fragment of pPL452 encoding the Hmp flavin domain under its own promoter	This study
pPL341 $\Delta$ FD	pBR322 with a 533-bp <i>NdeI</i> - <i>EcoRI</i> fragment of pPL452 encoding the Hmp heme domain under its own promoter	This study
pUC8:16	pUC18 derived plasmid with <i>vgb</i> <sup>+</sup> (1.4-kb fragment) under its own promoter	31
pPL341 $\Delta$ <i>NdeI</i>	pPL341 but with the <i>NdeI</i> site removed	This study

under microaerophilic conditions (22). Significant enhancement of growth and production of recombinant proteins and antibiotics is observed when *vgb* is expressed in *E. coli*, *Streptomyces coelicolor*, and *Streptomyces lividans* (23–25), and numerous other beneficial effects on culture growth and metabolism have been described (for review, see Ref. 4). The proposal that the function of Vgb is facilitation of O<sub>2</sub> delivery for respiration (25) has received considerable recent support from the finding that Vgb interacts specifically with the O<sub>2</sub>-reducing subunit of the cytochrome *bo*' terminal oxidase (26). However, roles in nitrosative and oxidative stress responses have also been suggested for one-domain hemoglobins (27). Whatever the role of Vgb, it has been assumed that the globin interacts with a cognate, separately encoded, reductase that is functionally analogous to the C-terminal domain of flavohemoglobins. Indeed, such a reductase has been purified from *Vitreoscilla* and characterized (28). Presumably, another reductase(s) assumes a similar role when Vgb is expressed in heterologous hosts.

In this communication we describe genetic engineering of the Hmp flavohemoprotein from *E. coli* to synthesize separately each domain and the effect of expressing them on growth, oxygen metabolism, and protection from inhibition of respiration by NO. Our results with the heme domain of the *E. coli* Hmp (flavohemoglobin) differed from those obtained using the *Vitreoscilla sp.* Vgb single-domain hemoglobin.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Strains, Media, and Growth Conditions**—The strains and plasmids used are listed in Table I. Transformations were done after CaCl<sub>2</sub> treatment (32). Cells were grown in rich medium (LB) (33) supplemented as appropriate with kanamycin (50  $\mu$ g/ml) or ampicillin (200  $\mu$ g/ml). Culture optical density at 600 nm (apparent A<sub>600</sub>) was measured with a Jenway 6100 spectrophotometer in cells of 10-mm path length after appropriate dilution. Cultures were grown at 37 °C with shaking (200 rpm) in conical flasks containing about 1/3 of their own volume of medium and inoculated with 1% of the culture volume using an overnight culture.

**Construction of Plasmids pPL341 $\Delta$ FD and pPL341 $\Delta$ HD**—Plasmid pMA2000U (34) was used for cloning a 1309-bp *EcoRI*-*Bam*HI fragment containing the entire *hmp* structural gene plus its own promoter region from plasmid pPL304 (30), to yield plasmid pMAHmp. Single strand phagemid pMAHmp was obtained by infection with helper phage M13 RP408. Insertion of a stop codon (TAA) and an *NdeI* restriction site (see

Fig. 1) was carried out by using a site-directed mutagenesis kit (Amersham Biosciences) using the 5'-end phosphorylated primer RKPhmp1 (5'-GCCAGCAAAGCCTAACATATGGCTGGTTGGAA-3', where italics indicate the introduced stop codon (TAA) and the underlined bold text indicates the *NdeI* site (Fig. 1B)); the annealing step was performed following the manufacturer's instructions. Extension and religation of the complementary strand was carried out by using the Klenow fragment of DNA polymerase and T4 DNA ligase (Amersham Biosciences). The resulting mutated plasmid was called pMAHmp (see Fig. 2). *NdeI* digestion of this plasmid precisely excised the heme domain (HD)<sup>1</sup> of the *hmp* gene. This plasmid was religated, and then the *Bam*HI-*EcoRI* fragment was cloned in the cloning vector pBR322 digested with the same enzymes to yield plasmid pPL341 $\Delta$ HD (see Fig. 2). This plasmid contains only the flavin (FD) domain of Hmp starting at codon 148 (see Fig. 1). On the other hand, partial *NdeI*-*XmnI* digestions of the pMAHmp plasmid allowed the excision of the flavin domain (Fig. 2), yielding the plasmid pPL341 $\Delta$ FD. It is important to note that both constructs are under the control of the native *hmp* promoter and that both conserve an 11-bp repeat at the 3'-end that has been suggested to be the terminator sequence of *hmp* (30). Both constructs were verified by sequencing using Sequenase version 2.0 (U. S. Biochemical Corp.; data not shown).

**Treatment with NO, Sodium Nitroprusside (SNP), and Methyl Viologen (PQ)**—NO was prepared as in Poole *et al.* (7). SNP was from Sigma. Solutions were added to a culture 1.5 h after inoculation (A<sub>600</sub> = 0.5), samples were taken at the stated times, and serial dilutions were performed to determine viability. Results were expressed as the percentage of viable cells present in the control culture without any treatment.

**Preparation and Use of Anti-Hmp Polyclonal Antibodies**—Anti-Hmp polyclonal antibodies were obtained as described in Stevanin *et al.* (19). Western blot detection was done using the ECL chemiluminescence system (Amersham Biosciences).

**Determination of Cell Respiration Rates and the Effects of NO**—Cells were grown for 6 h as described above until A<sub>600</sub> reached ~1.4. Cells were harvested by centrifugation, washed in sterile 0.9% saline, and resuspended in about 5 ml of buffer containing MOPS (50 mM, pH 7.4) and 50 mM NaCl. A Clark-type polarographic oxygen electrode system (Rank Bros. Bottisham, Cambridge, UK) was used comprising a water-jacketed (37 °C) Perspex chamber, stirred magnetically; the membrane-covered electrode was situated at the bottom of the chamber below the stirrer. About 25–50  $\mu$ l of cell suspension was diluted in the chamber

<sup>1</sup> The abbreviations used are: HD, heme domain; FD, flavin domain; SNP, sodium nitroprusside; PQ, paraquat or methyl viologen; MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid.



A)

<i>Escherichia coli</i>	1	MLDAQTLATVKATIPLLVETGPKLTAHFYDMFTHNPELKEIFNMSNQFN	50
<i>Vitreoscilla</i>	1	NLDQQTINIIKATVFLVLRHGVTITTFYKNLFAKHFEVRLDFMGRQES	50
		*** **	
<i>Escherichia coli</i>	51	GDQREALFMALAAAYASHNIENLPALIPAVEKIAQKHTSEQIKPEQYNI VGE	100
<i>Vitreoscilla</i>	51	LEQPKALAMTVLAAAQNIENLPALIPAVKLIARHCQAGVAAAHYFIVGO	100
		** **	
<i>Escherichia coli</i>	101	HLLATLDENFSFGQ--EVLDAHGKAYGVLAVFINREAEIYNENASKAGG	148
<i>Vitreoscilla</i>	101	ELLGATKEVLGDAATDDTLDANGKAYGVIADVFIOVEADLYAQAVE	146
		** **	
<i>Escherichia coli</i>	149	WEGTRDFRIVAKTFRBALITSPFELEPVDGGAVAEYREGQYLGVWLKPEGF	198
<i>Escherichia coli</i>	199	PHQEIROYSLTRKPDGKGYRIAVKREGGQVSNLWLNHNANVGDVVKLVAD	248
<i>Escherichia coli</i>	249	AGDYFHAVADDTFVTLISAGVGTQMLAMLDTLAKAGHTAQNWFHAAEN	298
<i>Escherichia coli</i>	299	GOVRAFADEVKELGQSLPRFTAHTWYRQPSRADRAKQFDEGLMDLSKL	348
<i>Escherichia coli</i>	349	EGAFSDPTMDFYLCGFVGMQFAARQLVDLGVKQENIHYECFQPHKVL	396

Heme  
domain

B)

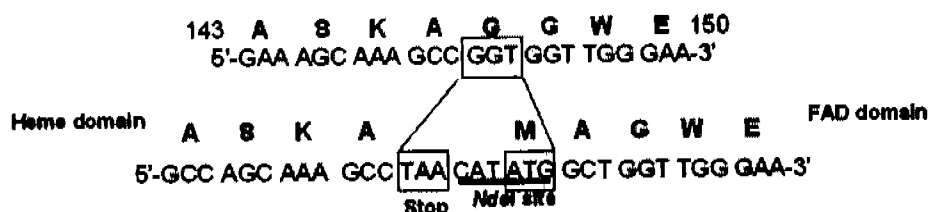


FIG. 1. Sequence alignments of Hmp (*E. coli*) and Vgb (*Vitreoscilla*) and the junction of the heme and flavin domain-encoding regions of the *hmp* gene. A, identical residues are marked (\*), and functionally similar amino acid residues are indicated by a period. The heme domains of Hmp and Vgb are boxed. The heme domain amino acid residues believed to interact with the reductase domain in Fhp (40) are shown in bold letters. B, the top sequence is the *hmp* gene-coding region extending from residues 143 to 150; the site of insertion (GGT) that was mutagenized is boxed. The resulting sequence after mutagenesis is shown underneath; a TAA stop codon, an *Nde*I site, and an ATG start codon were added to separate the heme and the FAD domains.

with MOPS-NaCl buffer to give a working volume of 2 ml, and a close-fitting lid with a fine hole for injections using a Hamilton syringe was inserted. The suspension was further supplemented with glucose (10  $\mu$ M final concentration), and respiration rates measured in the closed system.

**Preparation of Cell-free Extracts and Assay of NO Denitrosylase Activity**—Cells were harvested by centrifugation at  $6000 \times g$  for 20 min. The cell pellet was washed and resuspended in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. The cell suspension was sonicated three times in an ice bath using an MSE Soniprep 150-watt sonicator. Each sonication was for 1 min, with a 30-s interval between successive sonications. Cell debris and unbroken cells were removed by centrifugation at  $77,000 \times g$  in a Ti70 rotor using a Beckman ultracentrifuge for 1.5 h at 4 °C. Activity was measured in the oxygen electrode vessel described above. Oxygen consumption was initiated by addition of NADH (500  $\mu$ M final concentration).

**Visible Electronic Spectroscopic Analysis**—Spectra for characterization and quantification of hemoproteins in cells and cell-free extracts were obtained using an SDB-4 dual-wavelength scanning spectrophotometer (University of Pennsylvania Biomedical Instrumentation Group and Current Designs Inc., Philadelphia, PA) (35). Cells were centrifuged from stationary phase cultures, suspended in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4, and used to record the dithionite-reduced - persulfate-oxidized difference spectra or CO + dithionite - dithionite difference spectra (36). Spectral data were analyzed and plotted using SoftSDB (Current Designs Inc.) and CA-Cricket Graph III software.

## RESULTS

**Construction of Plasmids Carrying the Heme or the Flavin Domain of Hmp Separately**—The *E. coli* flavohemoglobin consists of two domains, an NH<sub>2</sub> heme domain (HD) that is homologous (46% identity; 67% similarity; Fig. 1A) to the single domain Vgb *Vitreoscilla* hemoglobin, and a COOH flavin do-

main (FD) that belongs to the ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase (FNR) family of reductases (30, 37). Several reports implicate Vgb in the improvement of growth when the globin is heterologously expressed in other organisms (4, 24–25), and more importantly, many of its functions overlap with those of flavohemoglobins (23). To examine whether the heme domain from the Hmp protein of *E. coli* could play a similar role to that of the Vgb protein, we genetically engineered the *hmp* gene so that each domain of the protein could be expressed separately. First, we determined the length of the heme domain by comparing the structural features of the Vgb and the Hmp proteins, taking advantage of the available structures of Vgb (38) and of the flavohemoglobins from *E. coli* (39) and *R. eutropha* (40). We determined that the heme domain extends up to residue 146 (Fig. 1). Plasmid pMAHmp carrying the whole *hmp* gene but with the addition of 1) an *Nde*I restriction site, 2) a TAA codon that stops translation at residue 146, and 3) an ATG starting codon at residue 147 was constructed according to the procedures described under "Experimental Procedures" (Figs. 1B and 2). The new *Nde*I site allowed the excision of the HD or the FD domain to yield plasmids pPL341 $\Delta$ HHD and pPL341 $\Delta$ FD, respectively (Fig. 2).

**Expression of the Separate Domains of Hmp Encoded by Plasmids pPL341 $\Delta$ HHD and pPL341 $\Delta$ FD**—Polyclonal Hmp antibodies were used to detect Hmp expression in high speed cell-free extracts prepared from cells of strain RKP4545 (*hmp*: Tn5, hereafter referred to as *hmp*<sup>-</sup>) carrying different plasmids. Western blot analysis of extracts from RKP4701 cells, which harbored plasmid pPL341 (*hmp*<sup>-</sup>), showed a band of 44 kDa, corresponding to the Hmp polypeptide, and a smaller

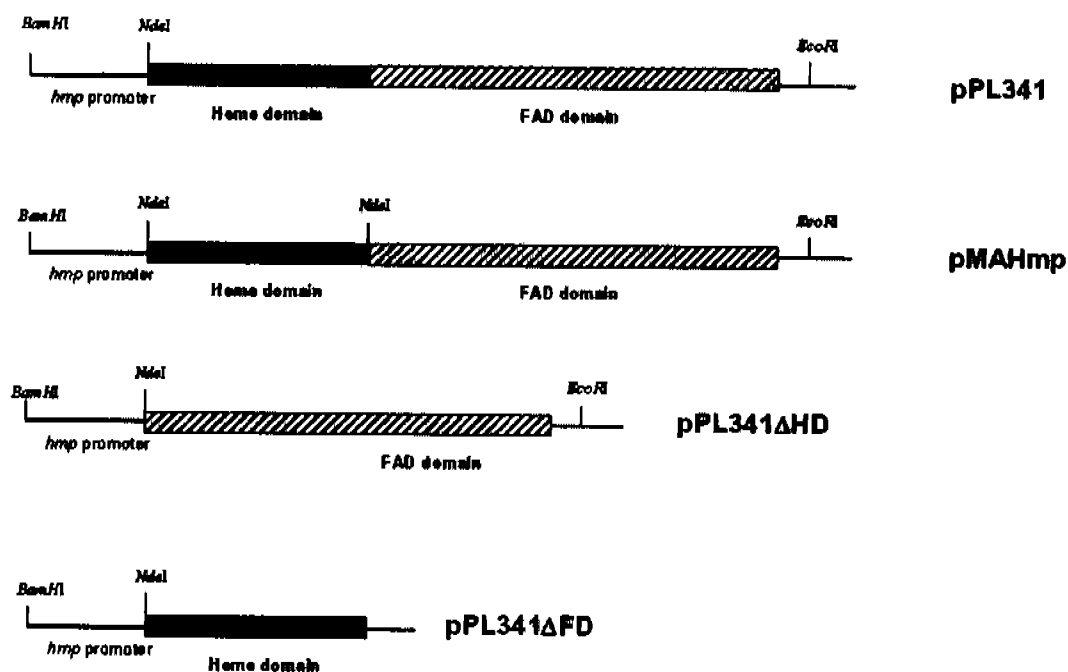
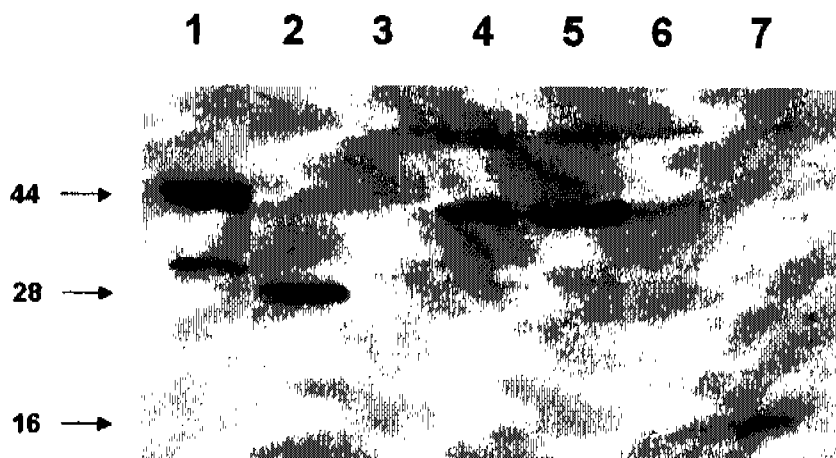


FIG. 2. Genetic strategy to separate the heme and FAD domains of Hmp. Plasmid pPL341 (top) carrying the entire *hmp* gene was used to construct phagemid pMAHmp after insertional mutagenesis (see Fig. 1 for details). An *NdeI* site was added that allowed the construction of plasmids pPL341ΔHD or pPL341ΔFD, shown below.

FIG. 3. Immunologically detectable Hmp in cell-free extracts from non-induced and SNP-treated cells expressing the holo-Hmp and each Hmp domain separately. Hmp antibody was used to detect Hmp present in high speed cell-free extracts of strains carrying different plasmids. Lane 1, RKP4701 (*hmp*<sup>+</sup>); lane 2, RKP4703 (ΔHD); lane 3, RKP4545 (*hmp*<sup>-</sup> mutant); lane 4, RKP2206 (wild-type; no plasmid); lane 5, RKP2206 treated with 50 μM SNP; lane 6, RKP4702 (ΔFD); lane 7, RKP4702 (ΔFD) treated with 50 μM SNP. Numbers to the left indicate the calculated molecular masses (kDa) corresponding to the observed bands.



weak band that might be due to a degradation product (Fig. 3, lane 1). When extracts from RKP4703 cells were used, which harbored plasmid pPL341ΔHD, a 28-kDa band (corresponding to the expected size of the FD domain of Hmp) was evident (Fig. 3, lane 2). Similarly, extracts from RKP4702 cells, which harbored plasmid pPL341ΔFD, displayed only one band of 16 kDa, the expected size of the heme domain (Fig. 3, lane 6). As expected, extracts from strain RKP4545 (*hmp*<sup>-</sup>, no plasmid) did not react with Hmp antibodies (Fig. 3, lane 3).

To test whether the *hmp* constructs present in plasmids pPL341ΔHD and pPL341ΔFD were regulated in a similar fashion to the wild-type gene, we grew cell cultures of strain RKP2206 (wild type) and RKP4702 (*hmp*<sup>-</sup> harboring plasmid pPL341ΔFD) in the absence or in the presence of 50 μM SNP, a potent inducer of *hmp* (41). Cell extracts were obtained and subjected to Western blot analysis. Extracts from wild-type strain RKP2206 displayed a 44-kDa band that increased markedly in intensity in the presence of SNP (Fig. 3, compare lanes 4 and 5). Likewise, when extracts from cultures of strain RKP4702 (*hmp*<sup>-</sup>, harboring plasmid pPL341) treated with

SNP were used, an increase in the intensity of the 16-kDa reactive band was observed (Fig. 3, compare lanes 6 and 7). Taken together, these results demonstrate that plasmids pPL341ΔHD and pPL341ΔFD encode truncated versions of the Hmp protein and that the regulation of the genetic constructs remains unaltered.

*CO-difference Spectroscopy of Cell-free Extracts and Whole Cells from Cultures of Strains Carrying Plasmids pPL341ΔHD and pPL341ΔFD*—To confirm the identity of the proteins expressed from the mutated *hmp* gene and determine whether heme was still incorporated into the ΔFD construct, cultures of strains RKP4701 (*hmp*<sup>-</sup>, harboring plasmid pPL341 *hmp*<sup>+</sup>), RKP4702 (*hmp*<sup>-</sup>, harboring plasmid pPL341ΔFD), RKP4703 (*hmp*<sup>-</sup>, harboring plasmid pPL341ΔHD), RKP4545 (*hmp*<sup>-</sup>), and RKP2206 (wild type, no plasmid) were grown in LB media, and difference spectra (CO + reduced - reduced) were run on the whole cells in a dual wavelength spectrophotometer (Fig. 4A). Cell-free extracts were also prepared and centrifuged at 77,000 × *g* to remove membrane-associated terminal oxidases (cytochromes *bo'* and *bd*) that would confound the signals of

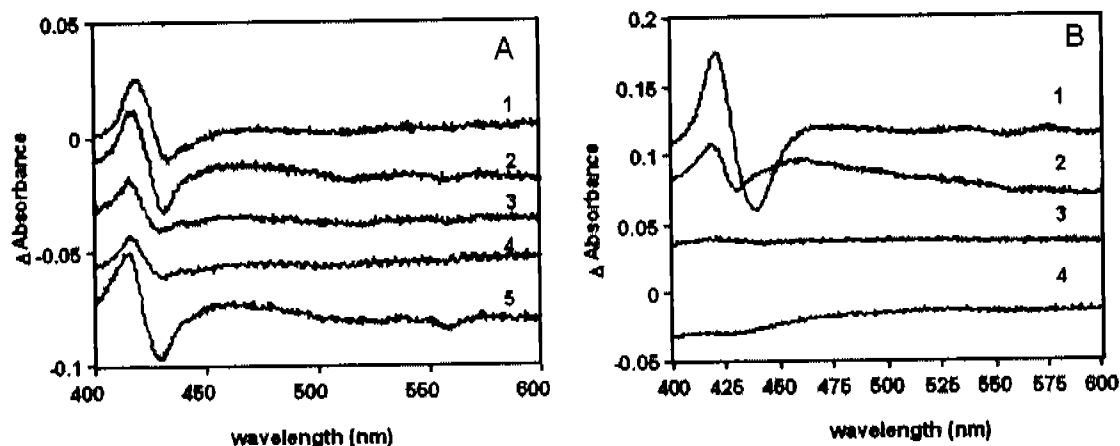


FIG. 4. Detection of Hmp in whole cells and high speed cell-free extracts using CO-difference spectrophotometry. CO + reduced - reduced difference spectra were run on whole cells (A) and high speed cell-free extracts (B) of RKP4701 (*hmp*<sup>+</sup>) (1), RKP4702 ( $\Delta$ FD) (2), RKP4703 ( $\Delta$ HD) (3), RKP4545 (*hmp*<sup>-</sup>) (4), RKP2206 (wild type, no plasmid) (5). Concentrations of proteins in A (1-5) were 3.5, 3.5, 3.7, 7.8, and 6.0 mg ml<sup>-1</sup>, respectively. In B (1-4) the concentrations were 4.7, 4.1, 4.5, and 3.0 mg ml<sup>-1</sup>, respectively.

Hmp. Glucose was used to reduce the whole cells (Fig. 4A), and sodium dithionite was used to reduce cell-free extract samples (Fig. 4B).

CO-difference spectra of whole cells from all strains showed a signal with a peak at ~421 nm and a trough at ~437 nm. The similarity of spectra 1 to 5 in Fig. 4A suggests that the signals are due not only to Hmp (42) but also to the presence of other CO-binding proteins in whole cells (Fig. 4A). By contrast, CO-difference spectra of the cell-free extract of strain RKP4701 (Fig. 4B, trace 1) showed strong signals at 421 nm (peak) and 439 nm (trough), very similar to the band positions observed with purified Hmp (42). Strain RKP4702, which expressed only the heme domain, also gave an intense signal similar to that seen with Hmp, but with a slightly blue-shifted peak at 419 and a broad trough with a  $\lambda_{\text{min}}$  of 430.5 nm (Fig. 4B, trace 2). Strain RKP4703, which expressed only the flavin domain, and mutant strain RKP4545 (Fig. 4B, traces 3 and 4, respectively) revealed no detectable CO-binding hemoproteins. These results suggest that neither strain RKP4545 nor RKP4703 expresses the heme domain, which is the site of oxygen and CO binding, and that the remaining heme domain produced by plasmid pPL341 $\Delta$ FD could still bind CO, albeit with altered spectral characteristics.

**Effect of the Expression of Plasmids pPL341 $\Delta$ HD and pPL341 $\Delta$ FD on the Growth Physiology of *E. coli***—The benefits of expressing the single-domain hemoglobin Vgb for the growth physiology of different microorganisms and several eukaryotes have been widely reported (4, 24–25). Vgb is 45% identical and 67% similar to the heme domain of Hmp (Fig. 1). To determine whether strains carrying plasmids pPL341 $\Delta$ HD and pPL341 $\Delta$ FD display alterations in growth physiology, such as those reported for cells overexpressing Vgb, we grew cultures of the *hmp*<sup>-</sup> (RKP4545) strain transformed with different plasmids in LB media at 37 °C under aerobic conditions. As shown in Fig. 5A, differences in growth behavior became apparent after ~10 h of cultivation, probably suggesting that, beyond that point, oxygen concentration or utilization became growth-limiting (Fig. 5A).  $A_{600}$  values at this time point gave a clear indication that the strains expressing the holo-Hmp protein, the heme-only Hmp, or the Vgb hemoglobin grew significantly better relative to the control strain RKP5107 or RKP5108 carrying the pBR322 or pUC18 control plasmids. However, for strains carrying plasmids pPL341 (*hmp*<sup>+</sup>) and pPL341 $\Delta$ FD, the growth improvement was less pronounced than for the strain expressing Vgb. No growth improvement was observed for cells harboring the pPL341 $\Delta$ HD plasmid (Fig. 5A). These results demonstrate a slight growth improvement for all

strains expressing hemoglobin from a plasmid-borne gene.

**Sensitivity to PQ and SNP of Cells Carrying Plasmids pPL341 $\Delta$ HD and pPL341 $\Delta$ FD**—Hmp and many other bacterial types of hemoglobin (including single-domain hemoglobins) have been implicated in detoxification of NO and related species (for review, see Refs. 2–4). To test whether the truncated domains of Hmp still confer resistance to nitrosative stress, cultures of strain RKP4545 (*hmp*<sup>-</sup>) carrying different plasmids were grown to mid exponential phase ( $A_{600} = 0.5$ ) and treated with 1 mM SNP, and changes in the growth curves were recorded. As shown in Fig. 5B, RKP4545 cells transformed with either pUC18 or pBR322 suffered an abrupt cessation of growth after the addition of SNP. Cells carrying pPL341 $\Delta$ HD were also severely affected. However, strain RKP4545 (*hmp*<sup>-</sup>) bearing plasmids pPL341 (holo-Hmp), pPL341 $\Delta$ FD (heme only), or pUC8:16 (*vgb*<sup>+</sup>) showed an increased resistance to the SNP stress relative to the vector controls. Importantly, Vgb and holo-Hmp consistently conferred more resistance to SNP than did plasmid pPL341 $\Delta$ FD (heme only) over the first 30 h of culture, whereas cells bearing plasmid pPL341 $\Delta$ FD restarted growth only after 20–30 h of SNP treatment (Fig. 5B). This delayed tolerance is not understood, but the protein structural differences revealed by CO-difference spectra (Fig. 4B) may impede the protective response of the heme-only Hmp protein. Clearly, however, the heme-only form of Hmp is not as effective in conferring SNP tolerance as Vgb or the holo-Hmp.

It is well established that a defined *hmp* mutant strain is impaired in its response to NO and to the superoxide-generating agent PQ (8). To determine whether the truncated versions of Hmp produced by the plasmids pPL341 $\Delta$ HD and pPL341 $\Delta$ FD could increase viability in an *hmp*<sup>-</sup> background on challenge by SNP, we treated exponentially growing cultures of strains RKP4701 (*hmp*<sup>-</sup> but harboring pPL341 *hmp*<sup>+</sup>), RKP4703 (*hmp*<sup>-</sup> but harboring pPL341 $\Delta$ HD), RKP4702 (*hmp*<sup>-</sup> but harboring pPL341 $\Delta$ FD), RKP5108 (pBR322 control), RKP5107 (pUC18 control), and RKP5104 (harboring pUC8:16 *vgb*<sup>+</sup>) with a lethal concentration of SNP (5 mM). As shown in Fig. 5C, maximal protection was provided by expression of plasmid pPL341 (*hmp*<sup>+</sup>; 70% survival after 120 min). The plasmids encoding the heme domain of Hmp (pPL341 $\Delta$ FD) or the Vgb protein maintained viability to a similar extent (30% after 120 min). Surprisingly, the FAD domain of Hmp was more effective because survival was 40% after 120 min. By contrast, control experiments with cells carrying cloning vectors pUC18 or pBR322 displayed no viable counts after 120 min of exposure to SNP. This suggests that the heme domain of Hmp and the

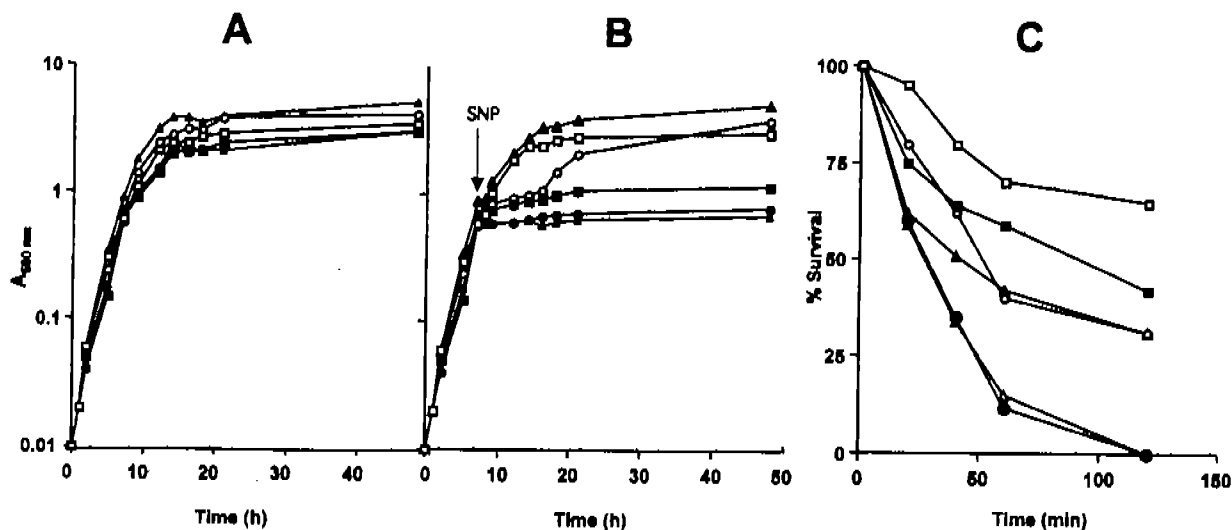


FIG. 5. Growth kinetics and killing by nitrosative stress of *hmp* mutant bacterial cells carrying different *hmp* constructs. Cell cultures of strains RKP4701 (*hmp*<sup>+</sup>; open squares), RKP4703 ( $\Delta$ HD; filled squares), RKP4702 ( $\Delta$ FD; empty circles), RKP5108 (pBR322; filled circles), RKP5107 (pUC18; empty triangles), and RKP5104 (*vgb*<sup>+</sup>; filled triangles) were grown in LB media, and the  $A_{600}$  was determined with time (A). In B, cells at exponential phase of growth were treated with 1 mM SNP, and the  $A_{600}$  was recorded at time intervals. Panel C shows the percentage of cell survival in cultures treated with 5 mM SNP.

Vgb protein prevents killing by SNP by similar mechanisms. Interestingly, when PQ sensitivity was tested, cells expressing Vgb displayed an increased sensitivity when compared with cells carrying each of the single domains or the holo-Hmp (data not shown), suggesting that PQ resistance can be conferred by Hmp but not by Vgb (results not shown).

**Effects of NO on Respiration and the NO Denitrosylase (Oxygenase) Reaction of Strains Carrying Plasmids pPL341 $\Delta$ HD and pPL341 $\Delta$ FD**—Hmp protects cellular respiration catalyzed by cytochrome *bo*' or cytochrome *bd* from the toxic effects of NO (19). To determine the extent of the contribution of each domain of Hmp, whole cell suspensions were prepared of strains RKP4701 (pPL341 *hmp*<sup>+</sup>), RKP4702 (pPL341 $\Delta$ FD), RKP4703 (pPL341 $\Delta$ HD), and RKP4545 (*hmp*<sup>-</sup>). Known amounts of cells were added to a closed oxygen electrode chamber as described under "Experimental Procedures." Because the toxicity of NO is dependent on dissolved O<sub>2</sub> concentration (19), additions of 38  $\mu$ M NO were made at two separate oxygen tensions (at 160–180 and 70–90  $\mu$ M oxygen). Fig. 6A shows the oxygen consumption traces. In the case of strain RKP4701 (*hmp*<sup>+</sup>), but harboring pPL341 *hmp*<sup>+</sup>, the addition of NO gave no inhibition of oxygen uptake (trace a). This indicates that Hmp is able to detoxify NO before it is able to inhibit respiration of whole cells, as we reported previously. On addition of NO to whole cells of strains RKP4702 ( $\Delta$ FD; trace b), RKP4703 ( $\Delta$ HD; trace c), and RKP4545 (*hmp*<sup>-</sup>, no plasmid; trace d) there followed a period of inhibition of respiration. Similar experiments were carried out using strains RKP5109 (*hmp*<sup>-</sup>, but harboring pUC8:16 *vgb*<sup>+</sup>) and RKP5107 (*hmp*<sup>-</sup> and with vector control; Fig. 7). Increasing concentrations of SNP progressively inhibited cell respiration. The presence of plasmid-encoded *vgb*<sup>+</sup> did not markedly affect the tolerance of wild-type *E. coli* to SNP inhibition. An *hmp* mutant containing only the plasmid vector (without *vgb*<sup>+</sup>) was hypersensitive to SNP, but expression of *vgb*<sup>+</sup> restored resistance. These results show that either Hmp or Vgb can protect cell respiration from SNP. Interestingly, cells overexpressing Vgb appeared to be slightly more sensitive to respiratory inhibition by SNP than the wild-type strain (Fig. 7); this may be due to the production of superoxide that has been previously reported in cells overexpressing Hmp (43). By contrast, neither the Hmp heme nor FAD domains separately were able to provide protection to the respiratory chain. This indi-

cates that both domains are necessary for respiratory protection by Hmp.

To test whether the separate domains of Hmp conserve the NO denitrosylase activity, we determined the oxygen consumption in cell-free extracts using NADH as the electron donor. NADH was added after establishing no oxygen uptake before the addition (Fig. 6B). NO (13.5  $\mu$ M) was added at each of two separate oxygen tensions (160–180 and 70–90  $\mu$ M), and the resulting mean O<sub>2</sub>/NO ratio at each addition was calculated. RKP4701 (expressing holo-Hmp) showed an O<sub>2</sub>/NO ratio of 1.1 (mean of 4 determinations, S.D. 0.17), indicative of NO denitrosylase activity, i.e. the stoichiometric consumption of O<sub>2</sub> and NO to yield nitrate (11–13). In further quadruplicate experiments, strains RKP4702 ( $\Delta$ FD; ratio 0.4, S.D. 0.05), RKP4703 ( $\Delta$ HD; ratio 0.6, S.D. 0.13), and RKP4545 (*hmp*<sup>-</sup>; ratio 0.5, S.D. 0.21) all showed much lower O<sub>2</sub>/NO ratios, indicating that Hmp with the presence of both domains is necessary for full NO denitrosylase activity. The low ratio seen with RKP4545 (*hmp* mutant strain) was expected, and the ratio was similar to the O<sub>2</sub>/NO ratio seen on the addition of NO to MOPS buffer only (44). Taken together, these results demonstrate that both the heme and flavin domains are necessary for efficient detoxification of NO by Hmp.

#### DISCUSSION

Reactive oxygen and nitrogen species are effective molecules for bactericidal action against invading pathogens (45). The best understood microbial response to nitrosative stress involves flavohemoglobins (2), but these proteins have been also implicated in oxidative stress responses in bacteria (8) and yeast (46). Interestingly, single domain hemoglobins such as *Mycobacterium tuberculosis* HbN (47) and Vgb from *Vitreoscilla* have also been implicated in NO detoxification processes (15, 27). It has been suggested that, because Vgb interacts with a reductase from *Vitreoscilla* (48), this globin may function in a manner similar to flavohemoglobins. The NADH-cytochrome *o* reductase has been shown to constitute an electron-transferring path for the oxidation of NADH and to increase the oxygen uptake severalfold in *Vitreoscilla* (21, 28). When Vgb is functionally expressed in heterologous hosts (for review, see Ref. 4), it seems probable that it interacts in such cells with an unidentified reductase(s) appropriate for trans-

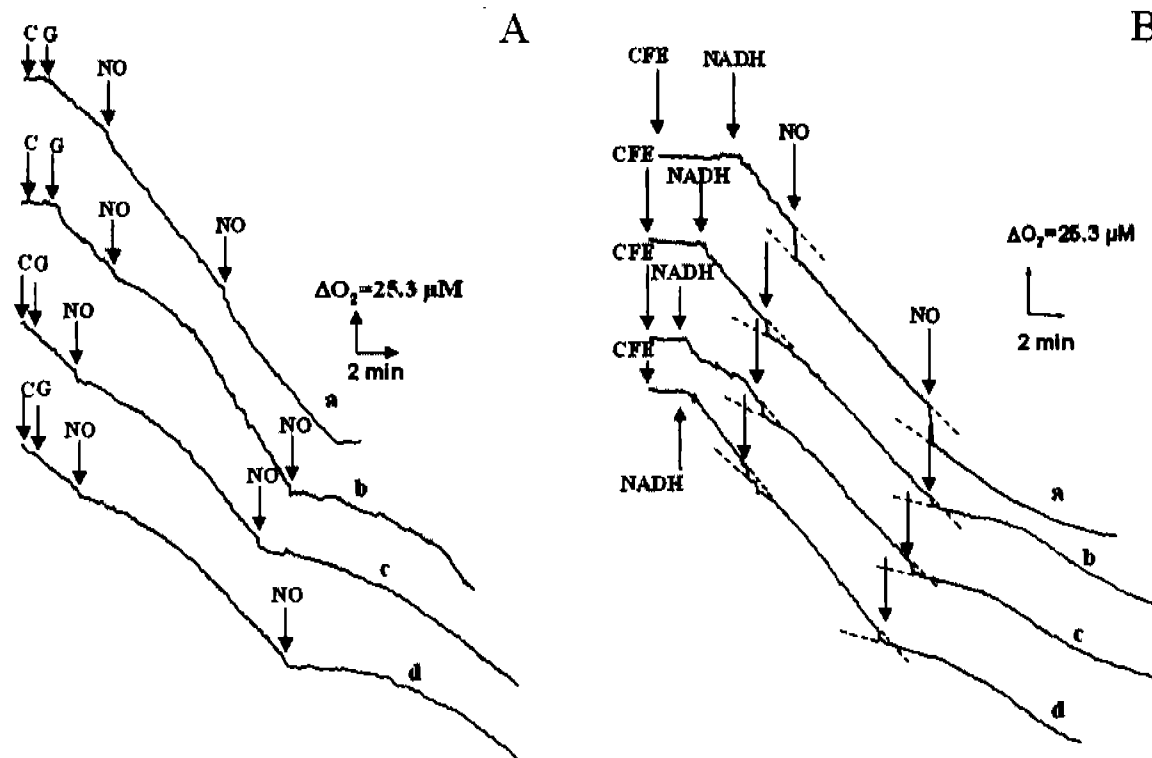


FIG. 6. Effects of NO on respiration and on NO denitrosylase reactions of cells expressing various Hmp constructs. **A**, measurements were made on resuspended whole cells of strains RKP4701 (*hmp*<sup>+</sup>) (a), RKP4702 ( $\Delta$ FD) (b), RKP4703 ( $\Delta$ HD) (c), and RKP4545 (*hmp*<sup>-</sup>) (d). Cells (C) were added to the chamber containing 2 ml of buffer (50 mM MOPS, 50 mM NaCl). Glucose (G) was added to stimulate respiration. Additions of 36  $\mu$ M NO were made at the arrows on the oxygen trace. **B**, measurements were made on high speed cell-free extracts of the same strains labeled as in A. A closed chamber fitted with NO and oxygen electrodes was used. Cell extract (CFE) was added to the chamber containing 2 ml of the same buffer. NADH was added at the labeled arrows. The additions of 13.5  $\mu$ M NO were made twice at the arrows on the oxygen trace.

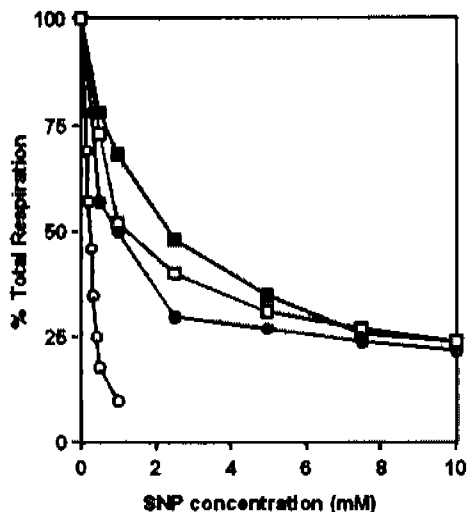


FIG. 7. Respiratory inhibition by SNP in cells carrying the Vgb hemoglobin. Resuspended whole cells of exponentially growing cultures of strains RKP2206 (wild type; open squares), RKP5104 (wild type/pUC8 *vgb*<sup>+</sup>; filled circles), RKP5107 (*hmp*<sup>-</sup>/pUC18; open circles), and RKP5109 (*hmp*<sup>-</sup>/pUC8 *vgb*<sup>+</sup>; filled squares) were used. Cells were added to the chamber containing 2 ml of buffer (50 mM MOPS, 50 mM NaCl). The additions of increasing concentrations of SNP were made, and the residual respiration was expressed as a percentage of the uninhibited rate.

ferring electrons to the globin heme, allowing turnover and ligand chemistry. The wide variety of beneficial consequences that overexpression of Vgb displays has motivated many researchers to genetically modify its structure. A reductase domain from the Fhp (*R. eutropha*) flavohemoglobin was genetically linked to Vgb with an improvement in the beneficial

effects on microaerobic bacterial growth (15, 23, 27). Expression of a double Vgb-Vgb hemoglobin also enhanced growth and alters ribosome and tRNA levels in *E. coli* (49).

The marked shift in the spectral properties of the heme in the  $\Delta$ FD construct (Fig. 4B, trace 2) points to substantial changes in the environment of the heme affecting ligation and/or spin state. Whereas the CO spectrum of the native Hmp protein (Fig. 4B, trace 1) resembles that of the pure protein (42) and myoglobin (50), i.e. a peak near 420 nm and a trough near 440 nm, both bands in the  $\Delta$ FD protein are blue-shifted. Indeed, the peak (419 nm) and trough (430.5 nm) render the spectrum much more similar to that of oxidases of the cytochrome *o*'-type (peak at 415 nm, trough at 432 nm) (50, 51) than to Vgb (peak at 419 nm, trough at 437 nm) (50). The closeness of the trough position to 427 nm and the blue-shifted band of the CO adduct suggest some low spin character (48), but the  $\alpha/\beta$  regions are insufficiently resolved in spectra of crude extracts for further discussion on this point. Nevertheless, the growth data in Fig. 5A demonstrate that, despite the modified ligand binding of the  $\Delta$ FD construct (Fig. 4B), this protein has properties that enhance growth, perhaps by involvement in oxygen metabolism. Furthermore, the  $\Delta$ FD construct conferred resistance to inhibition and killing by SNP (Figs. 5, B and C). Therefore, despite the altered spectral properties, the  $\Delta$ FD construct is functional in these assays yet does not protect cell respiration from NO or exhibit NO consumption (Fig. 6).

The goal of our experiments was to express separately the heme and FAD domains of the flavohemoglobin Hmp of *E. coli* and study the effects of these constructs on growth, oxygen metabolism, and the protection of respiration from NO and nitrosative stress. Surprisingly, expression of the heme domain of *E. coli* Hmp had effects quite different in some respects to

those observed with Vgb. Thus, in contrast to holo-Hmp, the heme-only truncated Hmp failed to provide protection from NO to the respiratory chain in *E. coli* (Fig. 6A). However, Vgb, holo-Hmp and the heme-only truncated Hmp all conferred resistance to growing cells from SNP (Fig. 5, B and C). Frey *et al.* (15) also report that several diverse hemoglobins were equally capable of sustaining growth of *E. coli* under nitrosative stress conditions irrespective of the presence of a flavin domain. However, only the intact Hmp, and not the flavin or heme domains, protected rates of respiration from NO (Fig. 6A) and elicited O<sub>2</sub> uptake in membrane-free preparations, consistent with NO denitrosylase activity (Fig. 6B). Furthermore, although the Hmp holoenzyme provided protection from PQ-killing, neither Vgb nor the single heme or FAD domains of Hmp did so (results not shown). It has been suggested that Vgb arose during the course of evolution by excision of the FAD-containing reductase domain from a flavohemoglobin (52). The present growth data (Fig. 5) and the alleviation of nitrosative stress provided by the heme domain from the *R. eutropha* flavohemoglobin, Vgb, and a single-domain globin from *C. jejuni* (15) lend experimental support to this proposal, since an "on-board" reductase domain is shown not to be absolutely required for all globin functions.

**Acknowledgment**—J. M-H. acknowledges technical support from Miguel Páez-Silva.

#### REFERENCES

- Membrillo-Hernández, J., and Poole, R. K. (1997) *FEMS Microbiol. Lett.* **155**, 179–184
- Poole, R. K., and Hughes, M. N. (2000) *Mol. Microbiol.* **36**, 775–783
- Wu, G., Wainwright, L. M., and Poole R. K. (2003) *Adv. Microb. Physiol.* **47**, in press
- Wu, G., Wainwright, L. M., Membrillo-Hernández, J., and Poole R. K. (2003) in *Respiration in Archaea and Bacteria* (Zannoni, D., ed) Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, Netherlands, in press
- Oshino, R., Oshino, N., and Chance, B. (1973) *Eur. J. Biochem.* **35**, 23–33
- Probst I., Wolf, G., and Schlegel, H. G. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **576**, 471–478
- Poole, R. K., Anjum, M. F., Membrillo-Hernández, J., Kim, S. O., Hughes, M. N., and Stewart, V. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 5487–5492
- Membrillo-Hernández, J., Coopamah, M. D., Anjum, M. F., Stevanin, T. M., Kelly, A., Hughes, M. N., and Poole, R. K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 748–754
- Crawford, M. J., and Goldberg, D. E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 12543–12547
- Stevanin, T. M., Poole, R. K., Demoncheaux, E. A., and Read, R. C. (2002) *Infect. Immun.* **70**, 4399–4405
- Gardner, P. R., Gardner, A. M., Martin, L. A., and Salzman, A. L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10378–10383
- Hausladen, A., Gow, A. J., and Stamler, J. S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14100–14105
- Hausladen, A., Gow, A., and Stamler, J. S. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10108–10112
- Kim, S. O., Orli, Y., Lloyd, D., Hughes, M. N., and Poole, R. K. (1999) *FEBS Lett.* **445**, 389–394
- Frey A. D., Farres, J., Bollinger, C. J., and Kallio, P. T. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4836–4840
- Gennis, R. B., and Stewart V. (1996) in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* (Niedhardt, F. C., Curtis, R., Ingraham, J. R., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley M., Schaechter, M., and Umberger, H. E., eds) 2nd Ed., pp. 217–261, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- D'mello, R., Hill, S., and Poole, R. K. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 867–870
- D'mello, R., Hill, S., and Poole, R. K. (1996) *Microbiology* **142**, 755–763
- Stevanin, T. M., Ioannidis, N., Mills, C. E., Kim, S. O., Hughes, M. N., and Poole, R. K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35868–35875
- Wakabayashi, S., Matsubara, H., and Webster, D. A. (1986) *Nature* **322**, 481–483
- Webster D. A. (1988) *Adv. Inorg. Biochem.* **7**, 245–266
- Boorman, S. J., and Webster, D. A. (1982) *J. Gen. Appl. Microbiol.* **28**, 35–43
- Bollinger, C. J., Bailey, J. E., and Kallio, P. T. (2001) *Biotechnol. Prog.* **17**, 798–808
- Khosla, C., and Bailey, J. E. (1988) *Nature* **331**, 633–635
- Magnolo, S. K., Leenutaphong, D. L., DeModena, J. A., Curtis, J. E., Bailey, J. E., Galazzo, J. L., and Hughes, D. E. (1991) *Biotechnology* **9**, 473–476
- Park, K. W., Kim, K. J., Howard, A. J., Stark, B. C., and Webster, D. A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 33334–33337
- Frey A. D., Bailey J. E., and Kallio, P. T. (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 98–104
- Jakob, W., Webster, D. A., and Kroneck, P. M. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 29–33
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., and Boyer, H. W. (1977) *Gene* **2**, 95–113
- Vasudevan, S. G., Armarego, W. L., Shaw, D. C., Lilley, P. E., Dixon, N. E., and Poole, R. K. (1991) *Mol. Gen. Genet.* **226**, 49–58
- Dikshit, R. P., Dikshit, K. L., Liu, Y. X., and Webster, D. A. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 241–245
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Miller, J. (1972) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Elvin, C. M., Thompson, P. R., Argall, M. E., Hendry, P., Stamford, N. P., Lilley, P. E., and Dixon, N. E. (1990) *Gene (Amst.)* **87**, 123–126
- Kalnenioka, U., Galinina, N., Bringer-Meyer, S., and Poole, R. K. (1998) *FEMS Microbiol. Lett.* **168**, 91–97
- Poole R. K., and Kalnenioka, U. (2000) *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford
- Andrews, S. C., Shipley, D., Keen, J. N., Findlay, J. B., Harrison, P. M., and Guest, J. R. (1992) *FEBS Lett.* **302**, 247–252
- Tarricone, C., Galizzi, A., Coda, A., Ascenzi, P., and Bolognesi, M. (1997) *Structure (Lond.)* **15**, 497–507
- Ileri, A., Bonamore, A., Farina, A., Johnson, K. A., and Boffi, A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 23725–23732
- Ernler, U., Siddiqui, R. A., Cramm, R., and Friedrich, B. (1995) *EMBO J.* **14**, 6067–6077
- Membrillo-Hernández, J., Coopamah, M. D., Channa, A., Hughes, M. N., and Poole R. K. (1998) *Mol. Microbiol.* **29**, 1101–1112
- Ioannidis, N., Cooper, C. E., and Poole, R. K. (1992) *Biochem. J.* **288**, 649–655
- Membrillo-Hernández, J., Ioannidis, N., and Poole, R. K. (1996) *FEBS Lett.* **382**, 141–144
- Mills, C. E., Sedelnikova, S., Søballe, B., Hughes, M. N., and Poole, R. K. (2001) *Biochem. J.* **353**, 207–213
- Schmidt, H. H., and Walter, U. (1994) *Cell* **76**, 919–925
- Zhao, X. J., Raitt, D. V., Burke, P., Clewell, A. S., Kwast, K. E., and Poyton R. O. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 25131–25138
- Pathania, R., Havana, N. K., Gardner, A. M., Gardner, P. R., and Dikshit, K. L. (2002) *Mol. Microbiol.* **45**, 1303–1314
- Gonzales-Prevatt, V., and Webster, D. A. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 1478–1482
- Roos, V., Andersson, C. I., Artvidsson, C., Wahlund, K. G., and Bulow, L. (2002) *Biotechnol. Prog.* **18**, 652–656
- Wood, P. M. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **768**, 293–317
- Poole, R. K., Waring, A. J., and Chance, B. (1979) *Biochem. J.* **184**, 379–389
- Moens, L., Vanfleteren, J., Van de Peer, Y., Peeters, K., Kapp, O., Czeluzniak, J., Goodman, M., Blaxter, M., and Vinogradov, S. (1998) *Mol. Biol. Evol.* **13**, 324–333