

LAS HEMOGLOBINAS DE LAS BACTERIAS*

Reinier Gesto Borroto y Raúl Arredondo Peter**

Laboratorio de Biofísica y Biología Molecular, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Ave. Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, México. **Autor de correspondencia correo E: ra@uaem.mx

RESUMEN

Durante los últimos años se han identificado genes de hemoglobina (*hb*) en organismos que pertenecen a los tres dominios de la vida. Estos genes se clasifican en las familias M, S y T. La familia M incluye a las flavohemoglobinas (fHbs) y a las Hbs de un solo dominio (SDgbs), la familia S incluye a los sensores acoplados a globinas (GCSs), a las protoglobinas (Pgbs) y a las globinas sensoras de un solo dominio (SSDgbs), y la familia T incluye a las Hbs truncadas (Hbts). En el dominio Eubacteria se han detectado todos los tipos de Hbs que se conocen (fHbs, SDgbs, GCSs, SSDgbs, Pgbs y Hbts), sin embargo, en el dominio Archaea solamente se han detectado GCSs, Pgbs, SSDgbs y Hbts. En esta revisión se describen aspectos generales sobre los avances recientes en el estudio de las Hbs bacterianas desde una perspectiva evolutiva, estructural y funcional.

PALABRAS

CLAVE:

Archaea, estructura, Eubacteria, evolución, función.

ABSTRACT

During the last years hemoglobin (*hb*) genes have been detected in organisms from the three domains of life. These genes are classified into the M, S and T Hb families. The M Hbs include flavohemoglobins (fHbs) and single-domain Hbs (SDgbs), the S Hbs include globin-coupled sensors (GCSs), protoglobins (Pgbs) and sensor single domain Hbs (SSDgbs), and the T Hbs include truncated Hbs (tHbs). The fHbs, SDgbs, GCSs, SSDgbs, Pgbs and tHbs have been detected in Eubacteria, however only the GCSs, Pgbs, SSDgbs and tHbs have been detected in Archaea. In this review we describe general aspects on the recent advances on the study of bacterial Hbs from an evolutionary, structural and functional perspective.

KEY WORDS:

Archaea, Eubacteria, evolution, function, structure.

GENERALIDADES SOBRE LAS HEMOGLOBINAS

Probablemente la hemoglobina (Hb) es la proteína más estudiada desde los puntos de vista molecular, estructural, funcional y evolutivo. Esta proteína confiere el color rojo a la sangre de los mamíferos, en donde funciona al transportar el O₂ desde los pulmones hasta los tejidos para la respiración aerobia de las células. Durante las últimas décadas la secuenciación de numerosos genomas ha permitido identificar genes de *hb* en organismos que pertenecen a los tres dominios de la vida, es decir, en Archaea, Eubacteria y Eukarya. Aunque existen variaciones en la secuencia de aminoácidos y en el grado de multimerización, la estructura terciaria de las Hbs se ha conservado a lo largo de la evo-

lución, desde las bacterias hasta los vertebrados. Esta estructura se conoce como el plegamiento del tipo globina, la cual consiste de 6 a 8 hélices α (las cuales se designan con las letras A a la H) que forman una región hidrofóbica en donde se localiza el grupo prostético hemo. A su vez, el hemo contiene a un átomo de Fe, el cual está coordinado por los cuatro grupos pirrol del hemo y por la His proximal del polipéptido. Como resultado, la sexta posición del Fe queda libre, lo que le permite unir ligandos gaseosos, tales como el O₂ y el óxido nítrico (NO). Además del transporte de O₂, las Hbs muestran una gran variedad de funciones ya que intervienen en reacciones de oxigenación, protección contra sulfuros, regulación de la expresión genética y el metabolismo celular, y en la inactivación del NO (1).

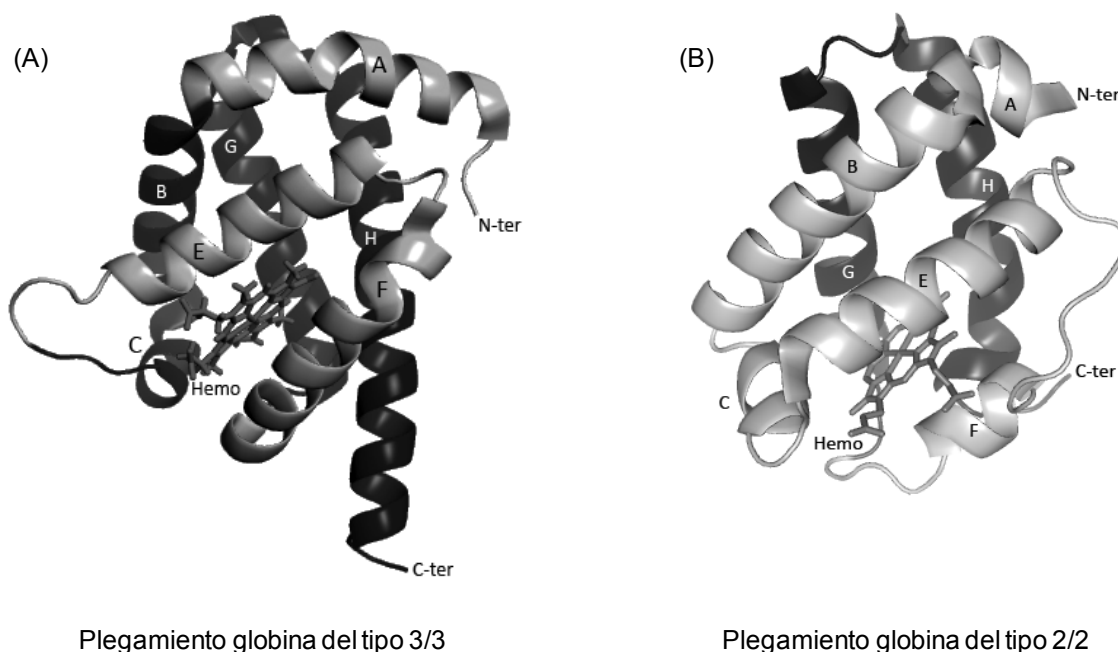


Figura 1. Disposición de las hélices α en la estructura terciaria de la Hb de *Vitreoscilla* (A) y la Hbt de *Chlamydomonas eugametos* (B) (Brookhaven ProteinDataBase ID 3TM9 y 1DLY, respectivamente). Las hélices se indican con las letras A a la H.

Se han identificado tres familias de Hbs: las familias M, S y T (2). La familia M incluye a las flavohemoglobinas (fHbs) y a las Hbs de un solo dominio (SDgbs), las cuales se han detectado en eucariontes y bacterias. La familia S incluye a los sensores acoplados a globinas (GCSs) y a las protoglobinas (Pgbs), los cuales se han detectado en bacterias, y a las globinas sensoras de un solo dominio (SSDgbs), las cuales se han detectado en procariontes y en eucariontes que pertenecen al reino Fungi. Estas familias presentan el plegamiento globina del tipo 3/3, en donde las hélices A, E y F se sobreponen a las hélices B, G y H (Fig. 1A). La familia T incluye a las Hbs truncadas (Hbts), las cuales se han detectado en bacterias, eucariontes unicelulares y plantas. Con base en la identidad en las secuencias de aminoácidos, las Hbts se dividen en las clases 1, 2 y 3. Las Hbts presentan un plegamiento globina del tipo 2/2, en donde las hélices B y E se sobreponen a las hélices G y H (Fig. 1B).

EL ORIGEN DE LAS HEMOGLOBINAS EN LAS BACTERIAS

El origen de la vida en la Tierra se estima en un tiempo anterior a los 4,100 millones de años. Se cree que la diversificación de la vida en tres dominios ocurrió a partir de un ancestro universal común (AUC), que

más que un sólo organismo correspondió a una comunidad de microorganismos que compartían genes entre sí. El tiempo de divergencia que dio lugar a los dominios Archaea y Eubacteria a partir del AUC se estima entre hace 4,100 y 3,900 millones de años. Es probable que el ancestro de las Hbs surgiera en las poblaciones del AUC como una adaptación a los cambios ambientales. Se cree que hace aproximadamente 3,500 millones de años la atmósfera de la Tierra era predominantemente anóxica, aunque existían regiones en donde la concentración de O_2 era elevada. En esas regiones la presencia de Hbs quizás permitió controlar la concentración de O_2 en las células ya que el O_2 es letal para los seres vivos (3).

Con base en el análisis de identidad entre las secuencias de aminoácidos de las Hbs de bacterias, se propuso que el ancestro común de las Hbs era similar a las SDgbs que existen en la actualidad y que presentaban un plegamiento globina del tipo 3/3 (3). Sin embargo, Nakajima *et al.* (4), mediante el análisis del plegamiento de las SDgbs de plantas, encontraron que el módulo E/H de estas proteínas, el cual está formado por las hélices E a la H, presenta una similitud estructural elevada con el plegamiento globina del tipo 2/2 de las Hbts. Por esta razón, Nakajima *et al.* propusieron que el módulo E/H corresponde a la estructura terciaria ancestral, la cual evolucionó para dar lugar al plegamiento

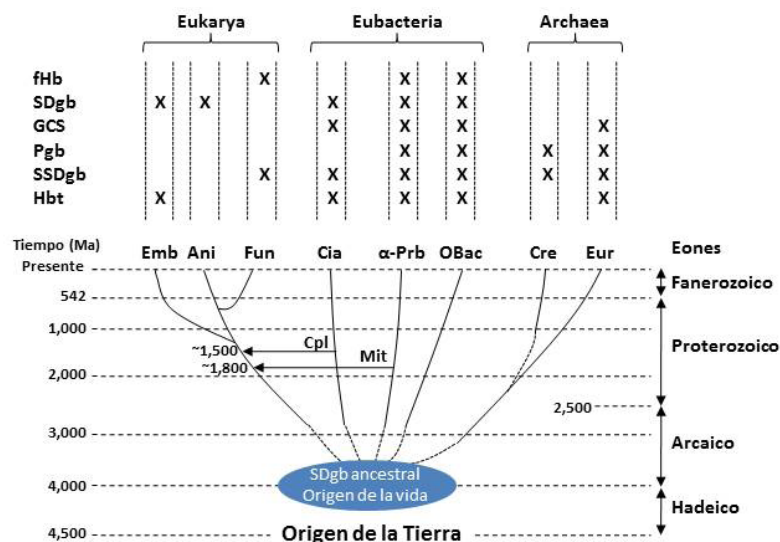


Figura 2. Eventos principales que ocurrieron durante la evolución de las Hbs en los tres dominios de la vida. Las "Xs" indican la existencia de Hbs en los grupos de organismos. Las flechas horizontales muestran los eventos que originaron a las mitocondrias (Mit) y los cloroplastos (Cpl). Abreviaturas: Emb: Embriofitas; Ani: Animales; Fun: Fungi; Cia: Cianobacterias; α-Prb: α-Proteobacteria; OBac: otras bacterias; Cre: Crenarchaeota; Eur: Euryarchaeota. Figura modificada de Vinogradov et al. (2) y Vinogradov et al. (3).

globina del tipo 3/3 de las Hbs actuales mediante la adición posterior del módulo que está formado por las hélices A a la C.

Se cree que el origen de las Hbs ocurrió en el ancestro de las eubacterias debido a que las tres familias de Hbs (M, S y T) solamente se han detectado en el dominio Eubacteria. Además, se ha propuesto que la fusión de genes *hb* ancestrales con genes que codifican para los dominios FAD/NAD(P)⁺ reductasa y transductor de señales, la cual dio lugar a las fHbs y a los GCS, respectivamente (ver la sección *Generalidades sobre la estructura de las hemoglobinas de las bacterias*), ocurrió después del surgimiento del dominio Eubacteria (2). Con base en el análisis de las secuencias de aminoácidos de las Hbs de bacterias, se propuso que las Hbts evolucionaron a partir de una Hb con plegamiento del tipo 3/3, la cual era similar a las Hbts de clase 1, y que a partir de ella surgieron las Hbts de clase 2 y, posteriormente, las Hbts de clase 3. Se cree que las Hbs actuales que están presentes en Eukarya son el resultado de una o más transferencias génicas horizontales a partir de organismos que pertenecían al dominio Eubacteria, las cuales ocurrieron concomitantemente al origen de las mitocondrias y los cloroplastos (hace 2,300 a 1,800 millones de años y 1,600 a 1,500 millones de años, respectivamente) (Fig. 2) (3).

GENERALIDADES SOBRE LA ESTRUCTURA DE LAS HEMOGLOBINAS DE LAS BACTERIAS

La estructura terciaria de las Hbs de las bacterias consiste en el plegamiento globina del tipo 3/3 o 2/2 (ver la sección *Generalidades sobre las hemoglobinas*) (Fig. 1). El plegamiento globina del tipo 3/3 es característico de la estructura terciaria de las SDgbs, SSDgbs, Pgbs y el dominio globina de las

fHbs y los GCSs. En cambio, las Hbts presentan un plegamiento globina del tipo 2/2.

La estructura terciaria de las fHbs consiste de un dominio N-terminal del tipo globina y un dominio con actividad de óxidorreductasa que se localiza en el extremo C-terminal (Fig. 3). El dominio globina de las fHbs se caracteriza por presentar la hélice H de mayor longitud al compararla con la hélice H de otras Hbs de bacterias. El dominio con actividad de óxidorreductasa contiene sitios de unión para los cofactores FAD y NAD(P)⁺. Este dominio se divide en dos subdominios: el subdominio que une al FAD, el cual está formado por 6 láminas β antiparalelas, y el subdominio que une al NAD(P)⁺, el cual está formado por 6 láminas β paralelas flanqueadas por dos hélices α por un lado y por una hélice α por el otro lado (Fig. 3) (5).

La estructura terciaria de las SDgbs corresponde a la estructura canónica de las Hbs con el plegamiento globina del tipo 3/3 (Fig. 1A). La SDgb de la bacteria ferruginosa *Vitreoscilla* fue la primera Hb de bacterias en ser cristalizada. Esta Hb se sintetiza cuando *Vitreoscilla*, que es una bacteria aerobia estricta, crece bajo condiciones de hipoxia (6).

La estructura terciaria de los GCSs consiste de un dominio sensor (que corresponde a un dominio del tipo globina) que se localiza en el extremo N-terminal, al cual se une el O₂ (y otros ligandos gaseosos, como el NO), y un dominio transductor de señales que se localiza en el extremo C-terminal, el cual es similar a los transductores aerotáticos de *Escherichia coli*. Los primeros GCSs que se caracterizaron fueron los transductores aerotáticos de *Halobacterium salinarum* y *Bacillus subtilis* (7). Hasta el momento solo se conoce la estructura cristalográfica del dominio globina de los GCSs de *B. subtilis* (Brookhaven ProteinDataBase ID 1OR4) y

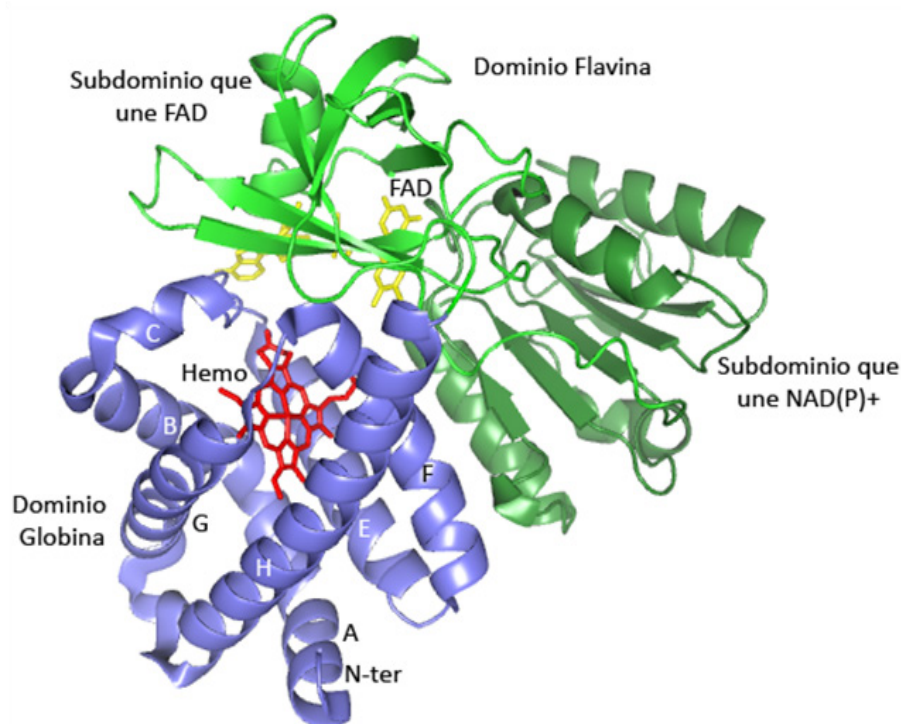


Figura 3. Estructura terciaria de la fHb de *Cupriavidus necator* (Brookhaven ProteinDataBase ID 1CQX). El dominio globina y los subdominios que unen FAD y NAD(P)⁺ se muestran en color azul, verde claro y verde oscuro, respectivamente. El grupo hemo y el FAD se muestran en color rojo y amarillo, respectivamente. Las hélices en el dominio globina se indican con las letras A a la H.

Geobacter sulfurreducens (Brookhaven ProteinDataBaseID 2W31). El dominio transductor de señales no se ha logrado cristalizar por lo que se desconoce su estructura terciaria.

La estructura de la Pgb de *Methanosarcina acetivorans* (Brookhaven ProteinDataBase ID 2VEB) es la única estructura cristalográfica de Pgbs que se conoce. La estructura terciaria de esta proteína consiste en el plegamiento globina del tipo 3/3, el cual está precedido por una pre-hélice A.

Las Hbts deben su nombre a que la longitud de las primeras Hbts que se describieron era aproximadamente 20 a 40 aminoácidos menor que la longitud de las SDgbs. Se ha dilucidado la estructura cristalográfica de varias Hbts de bacterias. Por ejemplo, se conoce la estructura terciaria de la Hbt de clase 1 de *Mycobacterium tuberculosis* (Brookhaven ProteinDataBase ID 1S56), la Hbt de clase 2 de *Agrobacterium tumefaciens* (Brookhaven ProteinDataBase ID 2XYK) y la Hbt de clase 3 de *Campylobacter jejuni* (Brookhaven ProteinDataBase ID 2IG3). En la estructura terciaria de las Hbts de bacterias la hélice A está prácticamente ausente, y la región CD-D está reducida a alrededor de tres aminoácidos. Además, la mayor parte de la hélice F de las Hbts está sustituida por un segmento en conformación extendida, seguido por la hélice F que consiste de una sola vuelta (8). En las Hbts de bacterias la migración de ligandos desde el solvente hasta el sitio distal del empaque hemo aparentemente ocurre a través de túneles: el túnel LT (por

sus siglas en Inglés "Long Tunnel"), que se localiza entre las hélices B y E, el túnel STG8 (por sus siglas en Inglés "Short Tunnel"), que se localiza entre los aminoácidos que se ubican en la posición G8 y H11 de las hélices G y H, respectivamente, y el túnel que se conoce como puerta E7 (Fig. 4). El análisis por mutagénesis dirigida sugiere que la migración de ligandos en el interior de estos túneles está regulada por la arquitectura interna de cada túnel (9).

LA DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN DE LAS HEMOGLOBINAS EN LAS BACTERIAS

En las bacterias se han detectado fHbs, SDgbs, GCSs, SSDgbs, Pgbs y Hbts. Al analizar 2,415 genomas de bacterias Vinogradov *et al.* (10) mostraron que la distribución de las Hbs en estos genomas no es uniforme. En el dominio Archaea solamente detectaron GCSs, Pgbs, SSDgbs y Hbts de clase 1 en 32 de los 140 genomas que analizaron. En cambio, en el dominio Eubacteria detectaron todos los tipos de Hbs que se han descrito hasta el momento, aunque solamente detectaron Hbs en 1,185 de los 2,275 genomas que analizaron. Entre los grupos del dominio Eubacteria que contienen la mayor cantidad de Hbs se encuentran las α - y β -proteobacterias, en las cuales se detectaron Hbs en 183 de 256 y 121 de 144 genomas, respectivamente (10).

La función aparente de las fHbs consiste en inactivar el NO mediante la actividad de NO dioxigenasa. Esta actividad se lleva a cabo mediante un ciclo en

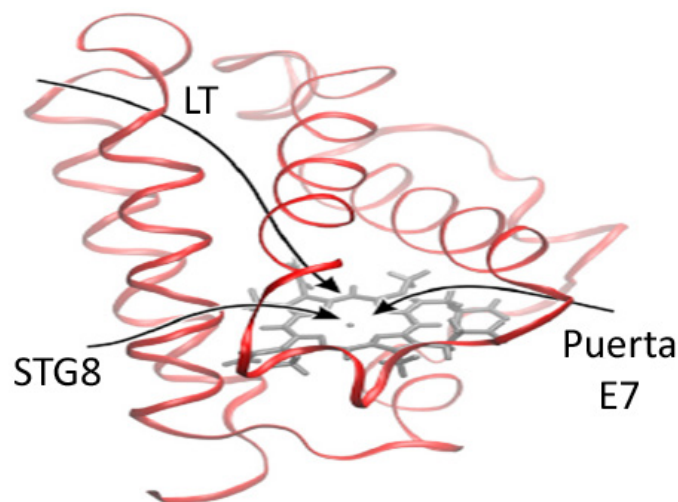


Figura 4. Túneles propuestos para el acceso de ligandos gaseosos al Fe del hemo de las Hbts bacterianas. Los túneles LT, STG8 y Puerta E7 se indican con flechas. El hemo se muestra con color gris. Figura modificada de Boron et al. (9).

el que la fHb ferrosa oxigenada ($\text{fHb}^{2+}\text{O}_2$) reacciona con el NO para producir NO_3^- y fHb en la forma férrica (fHb^{3+}). Posteriormente, fHb^{3+} es reducida a fHb^{2+} por la transferencia de 2 electrones del NAD(P)H al FAD y la subsecuente transferencia de 1 electrón del FAD al Fe^{3+} del hemo. Este proceso regenera a la fHb^{2+} , la cual es capaz de unir nuevamente NO después de oxigenarse. El NO es una molécula que modula numerosos aspectos en la fisiología de los seres vivos, incluyendo a los mecanismos de defensa en respuesta al ataque por microorganismos patógenos. El NO es tóxico para las bacterias patógenas, sin embargo, en estas bacterias la síntesis de fHbs que inactivan el NO contrarresta los mecanismos de defensa de las células infectadas (11).

La función aparente de las SDgbs es facilitar la difusión del O_2 hasta las oxidasas terminales que se localizan en la membrana de las bacterias. Igualmente, se ha propuesto que la SDgb de *Vitreoscilla* (VitSDgb) podría funcionar al regular la expresión genética ya que la expresión del gen *vitsdgb* en *E. coli* afecta los niveles de proteínas de diferentes vías metabólicas (12).

Una de las funciones probables de los GCSs es actuar como transductores aerotácticos al mediar respuestas aerofílicas y aerofóbicas en *B. subtilis* y *H. salinarum*, respectivamente (7). Además, se ha demostrado que los GCSs de *E. coli* y *Bordetella pertussis* poseen actividad diguanilatociclasa e

intervienen en la síntesis del diGMP cíclico (diGMPC) (13). En las bacterias el diGMPC es un segundo mensajero que está involucrado en la movilidad, virulencia, desarrollo, comunicación célula-célula y formación de biofilmes. Por lo tanto, es posible que en las bacterias los GCSs funcionen al regular procesos metabólicos que son activados por el diGMPC.

Se conoce poco acerca de la función de las Pgbs y SSDgbs. No obstante, recientemente se demostró que la Pgb^{2+} de *M. acetivorans* posee actividad de nitrito reductasa al reducir NO_2^- a NO. Además, cuando esta Pgb se encuentra en la forma férrica (Pgb^{3+}) interviene en la isomerización del peroxinitrito a NO_3^- (14). Estos resultados sugieren que las Pgbs intervienen en la biosíntesis y eliminación de las especies reactivas del N_2 y O_2 .

Las Hbts muestran una variedad amplia de funciones. Por ejemplo, las Hbts de clase 1 de *M. bovis* (15) y *M. tuberculosis* (16) inactivan el NO al funcionar como NO dioxigenasa mediante un mecanismo similar al descrito para las fHbs (ver arriba). Mediante análisis de cinética de estado estacionario en presencia de H_2O_2 se demostró que la Hbt de clase 2 de *M. tuberculosis* posee actividad peroxidasa (17), lo cual sugiere que esta proteína actúa en reacciones redox. Por su parte, la Hbt de clase 1 de la cianobacteria *Nostoc* posee constantes de asociación y disociación elevadas hacia el O_2 , lo que sugiere que esta proteína interviene en el transporte del O_2 (18).

CONCLUSIONES

El análisis reciente de las Hbs de las bacterias sugiere que las Hbs son proteínas que surgieron durante las etapas tempranas del origen de las primeras células, hace aproximadamente 4,100 a 3,900 millones de años. Al parecer, las Hbs ancestrales se diversificaron concomitantemente con la diversificación de las bacterias primigenias. Los resultados de este proceso consistieron en: (i) el surgimiento de dos linajes estructurales altamente conservados que corresponden al plegamiento globina de los tipos 2/2 y 3/3, (ii) la diversificación de las Hbs ancestrales en fHbs, SDgbs, GCSs, SSDgbs, Pgbs y Hbts, y (iii) la diversificación funcional de las Hbs en el metabolismo de las bacterias actuales, la cual incluye, entre otras funciones, transportar el O_2 , modular los niveles de NO y las especies reactivas del O_2 , regular la expresión genética y sintetizar mensajeros secundarios.



REFERENCIAS

1. Vinogradov SN, Moens L (2008) Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage, and sensing. *J Biol Chem* 283:8773-8777.
2. Vinogradov SN, Hoogewijs D, Bailly X, Arredondo-Peter R, Guertin M, Gough J, Dewilde S, Moens L, Vanfleteren JR (2005) Three globin lineages belonging to two structural classes in genomes from the three kingdoms of life. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11385-11389.
3. Vinogradov SN, Hoogewijs D, Bailly X, Mizuguchi K, Dewilde S, Moens L, Vanfleteren JR (2007) A model of globin evolution. *Gene Struct Funct Genom* 398:132-142.
4. Nakajima S, Alvarez-Salgado E, Kikuchi T, Arredondo-Peter R (2005) Prediction of folding pathway and kinetics among plant hemoglobins using an average distance map method. *Proteins: Struct Funct Bioinf* 61:500-506.
5. Ermler U, Siddiqui RA, Cramm R, Friedrich B (1995) Crystal structure of the flavohemoglobin from *Alcaligenes eutrophus* at 1.75 Å resolution. *EMBO J* 14:6067-6077.
6. Wakabayashi S, Matsubara H, Webster DA (1986) Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature* 322:481-483.
7. Freitas TAK, Saito JA, Hou S, Alam M (2005) Globin-coupled sensors, protoglobins, and the last universal common ancestor. *J Inorg Biochem* 99:23-33.
8. Vuletich DA, Lecomte JT (2006) A phylogenetic and structural analysis of truncated hemoglobins. *J Mol Evol* 62:196-210.
9. Boron I, Bustamante JP, Davidge KS, Singh S, Bowman LAH, Tinajero-Trejo M, Carballal S, Radi R, Poole RK, Dikshit K *et al.* (2015) Ligand uptake in *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobins is controlled by both internal tunnels and active site water molecules. *F1000Research* 4:22.
10. Vinogradov SN, Tinajero-Trejo M, Poole RK, Hoogewijs D (2013) Bacterial and archaeal globins-A revised perspective. *Biochim Biophys Acta* 1834:1789-1800.
11. Crawford MJ, Goldberg DE (1998) 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.
12. Tsai PS, Nageli M, Bailey JE (1996) Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin modifies microaerobic *Escherichia coli* metabolism through elevated concentration and specific activity of cytochrome *o*. *Biotechnol Bioengin* 49:151-160.
13. Wan X, Tuckerman JR, Saito JA, Freitas TAK, Newhouse JS, Denery JR, Galperin M, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA, Alam M (2009) Globins synthesize the second messenger Bis-(3'-5')-cyclic diguanosine monophosphate in bacteria. *J Mol Biol* 388:262-270.
14. Ascenzi P, Leboffe L, Pesce A, Ciaccio C, Sbardella D, Bolognesi M, Coletta M (2014) Nitrite-reductase and peroxynitrite isomerization activities of *Methanosarcina acetivorans* protoglobin. *PLoS One* 9:e95391.
15. Ouellet H, Ouellet Y, Richard C, Labarre M, Wittenberg B, Wittenberg J, Guertin M (2002) Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5902-5907.
16. Milani M, Pesce A, Ouellet H, Guertin M, Bolognesi M (2003) Truncated hemoglobins and nitric oxide action. *IUBMB Life* 55:623-627.
17. Ouellet H, Ranguelova K, LaBarre M, Wittenberg JB, Wittenberg BA, Magliozzo RS, Guertin M (2007) Reaction of *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobin O with hydrogen peroxide: evidence for peroxidatic activity and formation of protein-based radicals. *J Biol Chem* 282:7491-7503.
18. Sarma H, Sharma BK, Tiwari SC, Mishra AK (2005) Truncated hemoglobins: a single structural motif with versatile functions in bacteria, plants and unicellular eukaryotes. *Symbiosis* 39:151-158.