

03081

(4) 2ef

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

EXPRESION DE DOS ISOFORMAS DE LA CITOCROMOOXIDASA
TIPO aa_3 DURANTE LA ESPORULACION DE *Bacillus cereus*
PURIFICACION Y CARACTERIZACION

TESIS que para obtener el Grado de
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
(BIOQUIMICA)

presenta el

M. en C. JUAN ARTURO GARCIA HORSMAN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

	Página
INDICE DE FIGURAS.	i
INDICE DE TABLAS	ii
RESUMEN.	iii
SUMMARY.	iv
ABREVIATURAS	v
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES.	3
I. Citocromos oxidasas.	3
Citocromo c.	5
Citocromo d.	6
Citocromo a ₃	8
II. Citocromo c-oxidasas tipo aa ₃	9
Oxidasas Mitocondrial	9
Oxidasas bacteriana	18
<i>Paracoccus denitrificans</i>	19
Bacteria Termofila PS3	22
<i>Thermus thermophilus</i>	24
<i>Bacillus subtilis</i>	25
<i>Nitrobacter agilis</i>	26
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	27
<i>Pseudomonas AM1</i>	28

<i>Nitrosomonas europaea</i>28
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>29
Otras bacterias30
ANTECEDENTES34
MÉTODOS EXPERIMENTALES39
Cepa, medios y cultivo39
Preparación de las membranas39
Protocolo de purificación41
Análisis espectral y de grupos prostéticos45
Ensayos enzimáticos46
Inhibición con DCCD46
Electroforesis47
Obtención de anticuerpos49
Inmunotransferencia tipo Western50
Determinación de proteína52
RESULTADOS54
Purificación54
Citocromo aa_354
Citocromo caa_358
Caracterización espectral de aa_3 y caa_361
Naturaleza del complejo caa_365
Interacción del citocromo c en el caa_365
Expresión de caa_3 durante el crecimiento67
Peso molecular de aa_3 y caa_369
Composición polipeptídica72

Relación estructural entre aa_3 y caa_3	75
Evidencias inmunológicas	75
Caracterización cinética.	78
Efecto de lípidos y detergentes.	78
Cinética por oxígeno y citocromo c	80
Inhibición por cianuro y monóxido de carbono	82
Inhibición por DCCD.	85
DISCUSION.	88
Isoformas	88
Masa Molecular	90
Relación entre el citocromo aa_3 y el caa_3	91
Cinética	92
Composición polipeptídica	99
Consideraciones evolutivas	100
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	104
BIBLIOGRAFIA	107
APENDICE	118
A. García-Horsman J.A., Barquera B., González-Halphen D., Escamilla J.E (1990) "Purification and characterization of a two subunit cytochrome aa_3 from <i>Bacillus cereus</i> " Mol.Microbiol. En prensa.	
B. García-Horsman JA, Barquera B, Escamilla JE (1990) "Two o different aa_3 -type cytochromes can be purified from <i>Bacillus cereus</i> " J.Biol.Chem. En revision.	

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de la citocromo oxidasa mitocondrial	10
Figura 2. Características espectroscópicas de la citocromo oxidasa mitocondrial	13
Figura 3. Esquema del protocolo de purificación de los citocromos aa_3 y caa_3 de <i>B.cereus</i>	42
Figura 4. Patrones de elución durante la purificación del citocromo aa_3 de <i>B.cereus</i>	55
Figura 5. Patrones de elución durante la purificación del citocromo caa_3 de <i>B.cereus</i>	59
Figura 6. Caracterización espectral del citocromo aa_3 de <i>B.cereus</i>	62
Figura 7. Caracterización espectral del citocromo caa_3 de <i>B.cereus</i>	63
Figura 8. Electroforesis en Poliacrilamida-LDS de los citocromos aa_3 y caa_3 de <i>B.cereus</i>	70
Figura 9. Filtración molecular de los citocromos aa_3 y caa_3 de <i>B.cereus</i>	72
Figura 10. Electroforesis en poliacrilamida-SDS de los citocromos aa_3 y caa_3 de <i>B.cereus</i>	74
Figura 11. Inmunttransferencia tipo Western	76
Figura 12. Efecto de fosfolípidos en la actividad del citocromo aa_3 de <i>B.cereus</i>	79
Figura 13. Cinética por oxígeno y citocromo c de los citocromos aa_3 y caa_3 de <i>B.cereus</i>	81
Figura 14. Efecto del cianuro y el monóxido de carbono en la actividad de los citocromos aa_3 y caa_3 de <i>B.</i>	

ceruus 84

Figura 15. Efecto del DCCD sobre la actividad del citocromo

α_3 de *S. cereus*. 86

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Características de algunos citocromo oxidasas tipo α_3 de bacterias.	4
Tabla II. Composición del Medio G.	40
Tabla III. Electroforesis en poliacrilamida-LDS	48
Tabla IV. Electroforesis en poliacrilamida-SDS.	48
Tabla V. Purificación del citocromo α_3 de <i>E. cereus</i>	57
Tabla VI. Purificación del citocromo caa_3 de <i>E. cereus</i>	60
Tabla VII. Determinación de cofactores.	64
Tabla VIII. Relación c:a en caa_3	66
Tabla IX. Expresión de los citocromos α_3 y caa_3 de <i>E. cereus</i>	68
Tabla X. Constantes cinéticas de α_3 y caa_3	83
Tabla XI. Constantes cinéticas de oxidasas bacterianas.	97
Tabla XII. Clasificación de los citocros α_3 bacterianos.	101

RESUMEN

En el presente trabajo se describe la purificación y caracterización de dos citocromo oxidasas tipo aa_3 de *Bacillus cereus*. Las enzimas se purificaron en presencia de Tritón X-100 por cromatografía de intercambio iónico. El citocromo aa_3 purificado tuvo una masa molecular de 85,000 (según electroforesis), mientras que el complejo caa_3 de 92,000; ambas enzimas posiblemente forman dímeros en solución (165,000 y 195,000 según filtración molecular, respectivamente).

Las dos enzimas mostraron tener dos subunidades: 50,000 y 31,000 para aa_3 ; 50,000 y 27,500 para caa_3 . Los anticuerpos contra el citocromo aa_3 cruzaron con el complejo caa_3 . La subunidad II de este último posee un hemo c y posiblemente esta constituida por la fusión de una proteína tipo subunidad II del cit aa_3 y un polipéptido de un citocromo tipo c.

El citocromo aa_3 oxidado, presenta una señal espectroscópica a 423 nm, y reducido bandas a 440 y 600 nm. El complejo caa_3 tiene además las características espectrales de un citocromo c (picos a 417 y 550 nm). Las dos enzimas poseen Cu en una estequiometría 2 Cu:2 hemos a.

El citocromo aa_3 se detectó tanto en el crecimiento vegetativo, como en fase esporulante, mientras que el complejo caa_3 solo se detectó en la fase esporulante.

La actividad de los dos citocromos fue dependiente de fosfolípidos. Ambos presentaron una cinética hiperbólica para oxígeno y citocromo c de lavadura, mostrando constantes cinéticas parecidas. Las dos enzimas se inhibieron con CO y con cianuro. El citocromo aa_3 se inhibe fuertemente con DCCD, sin embargo, este

reactivo no se uni6 covalentemente a la enzima, contrario a lo que se ha reportado para otras oxidasas de este tipo.

Este es el primer reporte de isoenzimas de la citocromo oxidasa tipo α_2 en bacterias.

SUMMARY

The purification and characterization of two α_3 -type cytochrome oxidases from *Bacillus cereus* are described in this work. The enzymes were purified by ion-exchange chromatography in the presence of Triton X-100. The enzymes seem to be dimeric in solution giving molecular masses of 165 and 195 kDa (α_3 and caa_3 respectively) as determined by molecular sieving compared with those values obtained by electrophoretic methods (85 and 92 kDa, respectively).

Both enzymes showed to be composed by two subunits: 50,000 and 31,000 for the cytochrome α_3 and 50,000 and 37,500 for the cytochrome caa_3 . Both subunits of the caa_3 complex crossreacted with *B. cereus* anti-cytochrome α_3 . Cytochrome caa_3 subunit II has a heme c moiety and it is probably composed of a protein fusion between an α_3 -type subunit II polypeptide and a cytochrome c polypeptide. The oxidized cytochrome α_3 spectra showed a peak around 423 nm, while 440 and 600 nm bands appeared when the enzyme was reduced. The caa_3 complex gave similar signals plus typical cytochrome c spectral features (peaks at 417 and 550 nm). The content of copper was such that the stoichiometry of 3 Cu:2 heme a was found in the two oxidases.

The cytochrome α_3 was expressed in logarithmically grown cells as well as in sporulating cells, but the caa_3 complex was detected only in the sporulating cells.

Either cytochrome α_3 or caa_3 showed hyperbolic kinetics towards oxygen and yeast cytochrome c, in a phospholipid dependent manner, giving comparable kinetic constants. Cyanide as well as carbon monoxide were able to inhibit both enzyme activities. The

cytochrome $\alpha\alpha_p$ electron transport activity was inhibited by DCCD. The results suggest that DCCD does not bind covalently to the enzyme, opposed to the proposed for other oxidases of this type.

This is the first report involving the presence of isoforms of $\alpha\alpha_p$ -type oxidase in bacteria.

ABREVIATURAS

CD	Dicroísmo circular
CO	Monóxido de carbono
COI	Subunidad I de la Citocromo oxidasa
COII	Subunidad II de la cit.oxid.
COIII	Subunidad III de la cit.oxid.
DCCD	N-,N-Diciclo-hexil-carbodiimide
DEAE	Dietyl amino etil-
DNA	Ac. desoxiribonucleico
ENDOR	Doble resonancia electrón nuclear
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
EXAFS	Absorción de rayos X de estructura fina
HEPES	ácido N-2-Hidroxietyl piperazina-N'-2-etanosulfónico
LDS	Dodecil sulfato de litio
NAD ⁺	Niacin adenin dinucleótido oxidado
NADH	Niacin adenin dinucleótido reducido
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TMPD	N,N,N',N'-tetrametil p-fenilendiamina
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano

INTRODUCCION

Las citocromo oxidasas juegan un papel central en el metabolismo energético de los organismos aeróbicos (Poole, 1983; Ludwig, 1987). Estas enzimas son parte terminal en los sistemas respiratorios, esto es, representan el vertedero del poder reductor generado en el metabolismo, pues son la salida última de electrones hacia el oxígeno. En este proceso la mayoría de las oxidasas catalizan la reacción redox en forma acoplada a la generación de un gradiente electroquímico de protones. La citocromo c oxidasa del tipo α_3 es una enzima ampliamente distribuida en los procariotes, así como prácticamente la única entre los eucariotes (Poole, 1983; Ludwig, 1980, 1987).

El citocromo α_3 bacteriano se ha aislado y purificado de una gran cantidad de bacterias (Ludwig, 1980; 1987; García-Horsman y Escamilla, 1990) y ha resultado ser una enzima homóloga funcional y estructuralmente a la enzima mitocondrial: a diferencia de que esta última posee trece subunidades (Kadenbach y Reiman, 1987) mientras que la bacteriana es mucho más sencilla.

En esta tesis se presenta la purificación y caracterización de dos citocromos tipo α_3 de la bacteria *Bacillus cereus*: una constituida por 2 subunidades (51,000 y 30,000) con una relación Fe:Cu de 2:3; y otra también de dos subunidades (51,000 y 37,500) con un citocromo c unido a la subunidad II. Inicialmente, se revisará el esquema general de las citocromo oxidasas y posteriormente se presentarán detalladamente, tanto los métodos

utilizados, como los resultados obtenidos. Finalmente se discutirán, desde el punto de vista comparativo, los datos y se abundará en aspectos evolutivos.

GENERALIDADES

I. Citocromo oxidasas.

Las citocromo oxidasas son genéricamente enzimas que catalizan la transferencia de electrones desde un citocromo (generalmente citocromo c) hasta el oxígeno (Brunori y Wilson, 1982; Wikström y Krab, 1978); es decir, oxidan un citocromo (ó quinonas en algunas bacterias) reducido por los acarreadores previos de la cadena de transporte de electrones, consumiendo oxígeno del ambiente. Existen varios tipos de oxidasas. En eucariotes superiores, la única enzima de este tipo se ha llamado inespecíficamente citocromo c-oxidasa, pues oxida un citocromo tipo c. Más específicamente podemos denominarla ferrocitocromo c:oxígeno oxidorreductasa del tipo aa_3 (de acuerdo con sus grupos prostéticos). En algunos eucariotes inferiores como en protozoarios y hongos (Bisson y Schivato, 1986), se presenta un sistema ramificado de transporte de electrones expresándose alternativamente un citocromo c (de tipo b) como oxidasa.

Por otro lado, en los procariotes, la diversidad es aún mayor (Poole, 1983; Ludwig, 1987). En los microorganismos aerobios, ya sean estrictos como facultativos, se presentan sistemas de transporte de electrones ramificados (ver por ejemplo: White y Sinclair, 1970; Haddock y Jones, 1977; Jursthuik y Yang, 1980; Anraku, 1988). Estos sistemas, están constituidos de varias deshidrogenasas, así como de una variedad de ramas terminales. Como oxidasas terminales en las bacterias se pueden encontrar: citocromo c, citocromo d, citocromo a_1 y citocromo aa_3 (Tabla I).

TABLA I. Características de algunos citocromos aa de Bacterias.

Bacteria	Tipo de hemo	Hemo a nmol/mg	Estequiometria Cu:hemo a	Espectro H	Inhibición DCCD	No. de subunidades	Actividad (+)
<i>P. denitrificans</i>	a	27	3:2	si	si(?)	3	731
Bacteria P53	c, a	15.9	2:2	si	si	3	60
<i>T. Thermophilus</i>	c, a	21.3	2:2	si	no	2	26
<i>B. subtilis</i>	a	15-17	2:2	si	-	3	16
<i>N. agilis</i>	a	20	3:2	no	-	2	0.1
<i>P. sphaeroides</i>	a	>14	-	no	-	3	300
<i>Pseudomonas AM1</i>	a	14.9	2:2	no	-	2	-
<i>N. europaea</i>	a	11	2:2	-	-	3-2	165
<i>S. acidocaldarius</i>	a	-	-	-	-	1-3 (?)	-
<i>T. novellus</i>	a	14.9	2:2	-	-	2	120
<i>B. firmus RAB</i>	c, a	17.3	2:2	-	-	3	12
<i>B. stearothermophilus</i>	c, a	16	3:2	si	-	3	6

+ seg^{-1} (en las mejores condiciones reportadas)

La presencia de este tipo de oxidasas en las bacterias depende tanto de su existencia intrínseca (codificadas en el genoma), como de las condiciones de cultivo y aereación. Es decir, por un lado una cierta bacteria puede poseer desde uno hasta los cuatro tipos de oxidasas, expresándose estos de una forma regulada dependiendo del tipo de bacteria y del ambiente en el cual se desarrolla. En algunos casos especiales se ha descrito tanto la aparición de citocromos tipo *c* como oxidasas (Appleby y col., 1975; O'Brian y Maier, 1982), así como la de flavoenzimas que reaccionan directamente con oxígeno (O'Brian y Maier, 1983). Sin embargo, estos últimos casos son raros por lo que no se abundará más sobre ellos.

Citocromo *o*.

El citocromo *o* es la oxidasa más ampliamente distribuida entre las bacterias (Poole, 1983). Este citocromo se ha estudiado exhaustivamente en *Escherichia coli* (Matsuchita y col., 1984; Kita y col., 1984). Es una enzima mebranal que recibe electrones del ubiquinol-8 y no del citocromo *c* (*in vivo*). Es identificado por las características espectroscópicas de su complejo con monóxido de carbono (CO) (pico a 416 nm, valle a 432) (Kita y Anraku, 1981).

Esta enzima se ha purificado a partir de varios microorganismos, como por ejemplo *Azotobacter vinelandii* (Yang y Jurtshuk, 1978a y b), *Vitreocilla* (Webster y Hackett, 1966; Webster y Liu, 1974), *Pseudomonas aeruginosa* (Matsushita y col., 1982; Yang, 1982), *Alcaligenes eutrophus* (Probst y col., 1979), *Rhodopseudomonas sp.* (King y Drews, 1976), *E. coli*, etc. En esta última bacteria la enzima ha sido bastante estudiada: la oxidasa

está constituida por cuatro polipéptidos (66, 35, 22 y 17 kDa), dos grupos hemo, b_{558} y b_{568} , y dos átomos de cobre (Ludwig, 1987). La formación de complejos con CO, la sensibilidad a la luz de estos y su espectro de acción, son evidencias del papel del citocromo *c* como oxidasa (Castor y Chance, 1955). Este citocromo puede presentarse como única oxidasa o bien terminar una de las ramales en un sistema de electrones ramificado en donde las otras oxidasas sean *d*, α_3 o quizás α_1 (Poole, 1983).

El citocromo *c*, cuando es reconstituido en liposomas artificiales, cataliza la reacción acoplada de transporte de electrones (desde ubiquinol hasta oxígeno) (Kita y col., 1982; Matsushita y col., 1984) con la generación de un potencial de membrana (Hamamoto y col., 1985), por lo que se le considera un sitio de acoplamiento. El gradiente de electrones que se genera se debe a reacciones escalares y no de translocación vectorial de protones (Carter y Gennis, 1985).

El citocromo *c*, a pesar de estar ampliamente distribuido entre las bacterias, se encuentra en las mitocondrias de ciertos protozoarios (Bisson y Schivato, 1986). Este citocromo se ha propuesto como un posible precursor evolutivo de las citocromo oxidasas tipo α_3 . Inclusive el análisis estructural y genético, revelan homología entre estos dos tipos de oxidasas (R.B.Gennis, comunicación personal).

Citocromo *d*.

El citocromo tipo *d*, anteriormente llamado α_2 , es común particularmente en las bacterias heterótrofas gram-negativas, las cuales son muy adaptables en ambientes inestables (Poole, 1983).

Esta oxidasa generalmente coexiste con citocromo c , citocromo a_1 , mientras que es muy raro encontrarla junto con citocromo a_3 . El citocromo d se presenta raramente en heterótrofos, fotótrofos o quimiolitótrofos gram-positivos; su presencia en anaerobios estrictos se relaciona con su alta afinidad por oxígeno (K_m de 0.018 a 0.35 μM), sugiriendo su papel como de protección respiratoria de las enzimas lábiles al oxígeno (Poole, 1983).

Se ha sugerido que la tensión de oxígeno regula la expresión del citocromo d (Scott y Poole, 1982; Escamilla y col., 1987), sin embargo, en una gran cantidad de casos, se observa expresión de esta oxidasa en condiciones de limitación de nutrientes, vitaminas, cofactores (Sweet y Peterson 1978; Shipp, 1972), o también en presencia de inhibidores (Ashcroft y Haddock, 1975) o en medios poco amortiguados (Haddock y Schairer, 1973).

El citocromo d posee un grupo clorina (una porfirina con un anillo pirrólico saturado) como centro redox (Timkovich y col., 1985) y, a diferencia del citocromo d_1 , está fuertemente unido a la membrana. Su señal espectroscópica más característica es un máximo a 630 nm en el espectro diferencial reducido menos oxidado (Murphy y Siegel, 1973). En *E. coli* donde se ha estudiado profundamente, el citocromo d está constituido por dos polipeptidos (57 y 43 kDa) y tres grupos hemo (Lorence y col., 1980): un hemo d y uno b_{558} , asociados a la subunidad II, mientras que otro hemo, b_{558} , está unido a la subunidad I (Green y col., 1984). Aparte de los grupos hemo, no se ha encontrado ningún otro cofactor metálico. Desde el punto de vista funcional, el citocromo d se parece al c : acepta electrones de ubiquinol-8 y establece un potencial de membrana y un gradiente de protones; como la

oxidación del quinol y la formación de agua muy probablemente se efectúan en sitios opuestos de la membrana, el gradiente de pH se genera en forma escalar (Miller y Gennis, 1985; Ludwig, 1987).

Citocromo a_1

El citocromo a_1 es el menos entendido dentro de los citocromos que funcionan como oxidasas terminales. Este citocromo exhibe señales espectroscópicas muy débiles (alrededor de 589 nm), y a pesar de que es capaz de reaccionar con CO, solo en muy pocos casos se sugiere su papel como oxidasa, debido al análisis de sus espectros de acción (Poole y col., 1984; Ludwig, 1987).

Recientemente, un tipo nuevo de oxidasa se detectó en *Thermus thermophilus*, el citocromo ba_3 (Zimmermann y col., 1988). Esta enzima es homóloga a la oxidasa aa_3 , esta constituida de un solo polipeptido de 35 kDa que une un hemo b uno a_3 y dos átomos de cobre de una forma muy similar a la oxidasa aa_3 (Einarsdóttir y col., 1989). Podemos especular que esta enzima es el paso intermedio de evolución desde el citocromo o hacia el citocromo aa_3 .

Citocromo aa_3

Probablemente, una de las razones principales por la que el cit aa_3 bacteriano ha recibido mucha atención, es que se ha querido utilizar como modelo de la citocromo oxidasa mitocondrial por su homología tanto estructural como funcional; pues la oxidasa bacteriana es mucho más simple. A continuación se detallará más sobre esta enzima.

II. Citocromo c-oxidasa tipo aa_3 .

Oxidasa Mitocondrial

Después de una gran discusión acerca del número de subunidades en el complejo de la citocromo oxidasa en diferentes especies -- discusión basada principalmente en la dificultad para separar e identificar los polipéptidos pequeños con pesos moleculares muy similares -- generalmente se acepta que la citocromo oxidasa de mamíferos está constituida por 13 subunidades (Kadenbach y col., 1983; Takamiya y col., 1987), mientras que la enzima de levadura por 9 (Power y col., 1984); con pesos moleculares entre 5 y 60 kDa, formando un complejo que atraviesa la membrana interna de la mitocondria. Las estructura primaria se conoce tanto por la secuenciación directa de las proteínas (Buse y col., 1983), como por la secuenciación del DNA mitocondrial (Anderson y col., 1982). Las tres subunidades mas pesadas están codificadas por el DNA mitocondrial, mientras que las restantes lo están por el DNA nuclear (Anderson y col., 1982).

La topología de las subunidades de la enzima de corazón de bovino se ha estudiado con varias técnicas: modificación química (Ludwig y col., 1979; Prochaska y col., 1980), inmunológica (Chan y Tracy, 1978) y fotomarcaje (Prochaska y col., 1980; Erecinska y col., 1980), entre otras. El arreglo estructural y funcional de las subunidades de la citocromo oxidasa se ha revisado ampliamente (Capaldi y col., 1983; Wikstrom y Saraste, 1984). Un modelo del tamaño y forma de la enzima se ha elaborado por Fuller y col., (1979) y ampliado por Deatherage y col., (1982 a y b). Estos estudios muestran que las subunidades están asociadas formando una

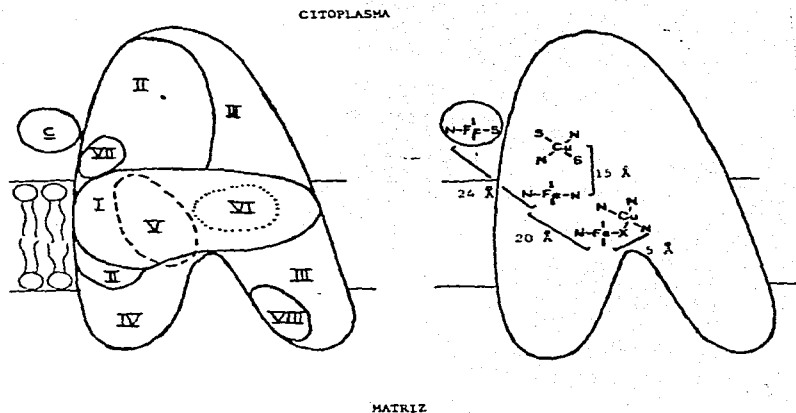


Figura 1. Posible arreglo de subunidades y grupos prostéticos de la citocromo c-oxidasa mitocondrial. El grupo entre el Cit c y Cu_2 designado como "X" puede ser un átomo de azufre, nitrógeno o oxígeno (ver texto). Este no está presente en ese sitio en todos los estados de la enzima.

estructura en forma de 'Y', de aproximadamente 12.5 nm de longitud, con la base del lado del citoplasma y los brazos del lado de la matriz mitocondrial (Fig.1).

La enzima aislada contiene al menos cuatro centros redox: dos hemo α (α_a y α) y dos átomos de cobre (Cu_A (ó Cu_α) y Cu_B (ó Cu_β)) (Wikström y col., 1981; Van Gelder, 1966; Malmstrom, 1979). Estos grupos metálicos intervienen en el flujo de electrones desde el citocromo c hasta el oxígeno. Recientemente, se han determinado otros metales unidos fuertemente a la enzima: un tercer átomo de cobre (denotado frecuentemente por Cu_x) (Einarsdóttir y Caughey, 1985; Steffens, y col., 1987); un átomo de zinc y un átomo de magnesio (Einarsdóttir y Caughey, 1984;1985). Sin embargo, no se ha definido una función para estos metales en el mecanismo catalítico de la enzima; posiblemente estos juegan un papel en el mantenimiento de la estructura de la proteína. La posición exacta de los grupos prostéticos dentro de la enzima no está bien definida. Sin embargo, por lo general se reconoce que las dos subunidades mayores contienen los cuatro centros redox (Winter y col., 1980; Cortley y Azzi, 1984; Darley-Usmar y col., 1981; Steffens y col., 1987; Holm y col., 1987), además del sitio de unión del citocromo c (Briggs y Capaldi, 1978; Erecinska y col., 1980; Fuller y col., 1981; Miller y col., 1983; Bisson y Montecucco, 1982). En la subunidad I muy probablemente están asociados el hemo α y el llamado centro binuclear hemo α_a - Cu_B (Müller y col., 1988a y b), siendo éste último el sitio de activación del oxígeno y de unión de CO, cianuro, azida, etc., (Hill y col., 1986). La subunidad II, por otro lado, enlaza el centro Cu_A y posee el sitio de unión de citocromo c (Garber y

col., 1988; ver Fig.1). Se han hecho muchos esfuerzos en definir el microambiente que rodea a cada uno de los grupos prostéticos y para determinar las interacciones entre ellos; todo esto usando técnicas espectroscópicas como EPR, ENDOR (Stevens y col., 1982), EXAFS (Scott, 1989), Raman, IR y CD (Babcock y col., 1979; Eglinton y col., 1984), aunados a los datos de secuencias de aminoácidos. En la figura 1 se presenta una visión esquemática de la localización de los centros redox. Los metales del centro binuclear: Fe (α_3) y Cu_B, interaccionan probablemente por medio de un ligando común, cuya identidad no se ha esclarecido concluyentemente (X en la fig.1). Este ligando podría ser un átomo de azufre de un residuo de cisteína (Powers y col., 1981), uno de nitrógeno de histidina (Palmer y col., 1976) o un átomo de oxígeno (Blumbers y Peisach, 1979). A éste ligando se le atribuye un papel dinámico; se supone que ocupa el sitio de activación del oxígeno y que es capaz de desplazarse hacia y desde este sitio durante los cambios redox de la enzima.

Las características espectrales de los centros redox en la citocromo oxidasa se han estudiado ampliamente (Wikström y col., 1979; Malmström 1979; Brunori y Wilson, 1982). El espectro de absorción de la enzima se caracteriza por varias bandas (Figura 2): la enzima oxidada presenta una banda en la zona de los 420 nm, máximo que depende de las condiciones de medición. La reducción de la enzima provoca la aparición de una banda alrededor de 440 nm (señal de Soret), a la cual contribuyen los dos hemos a aproximadamente de igual forma (Wikström y col., 1976). Este banda puede recorrerse o cambiar de tamaño dependiendo del nivel de reducción y de la presencia de ligandos como CO u O₂. En la zona

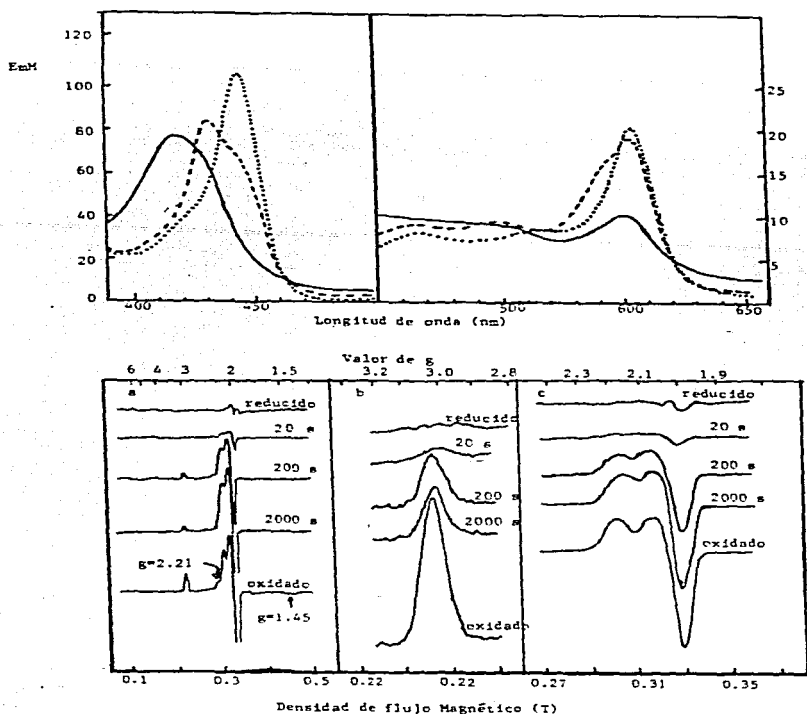


Figura 2. A. Espectros de absorción de la citocromo c oxidasa de corazón de bovino solubilizada. Espectro de la enzima oxidada (—), reducida con ditionita (.....) y reducida con ditionita + monóxido (----). La absorbancia esta dada en $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (por hemo a). (Tomada de Colosmic y Antonini 1980).
 Figura 2. B. Espectros de resonancia paramagnética electrónica de los intermediarios de la citocromo c-oxidasa de corazón de bovino, obtenidos por fotólisis del complejo con CO a 173 K; se uso el método diferencial (muestra menos enzima totalmente reducida). La medición se realizo a 10 K de las muestras: reducida, a los 20, 200 y 2000 s después de la adición de oxígeno y totalmente oxidada (Tomada de Hill, y col., 1986).

del visible, se presenta una banda alrededor de los 600 nm, debida principalmente a la reducción del hemo α (más del 80%; Brunori y Wilson, 1982). En la región del infrarojo cercano aparece una banda a 830 nm atribuida al Cu_A reducido (Greenwood y col., 1983; Beinert y col., 1980). Las señales en EPR de la enzima también están bien caracterizadas (Figura 2) (Malmström, 1979; Powers, 1981). El Cu_A presenta una señal en el estado oxidado, mientras que el Cu_B es paramagnético --posiblemente por la interacción con el hemo α_3 --. Durante el ciclo catalítico de la enzima se presentan señales intensas de alto y bajo espín, mientras que en la enzima oxidada el hemo α_3 no se puede detectar.

No existe un consenso para explicar el mecanismo por el cual los electrones son llevados a través de la citocromo oxidasa (Hill y col., 1986; Einarsson y col., 1988; Brunori y Wilson, 1982; Gorren y col., 1988; Hendler y Sidhu, 1988). Sin embargo, se cree que los electrones fluyen desde el citocromo c hacia el hemo α , desde aquí pueden seguir dos rutas, hacia el Cu_A ó hacia el centro binuclear, de tal forma que se considera al Cu_A como una poza de electrones cuestionando su papel en el flujo hacia el oxígeno (Hubbard y col., 1989). En el estado estacionario se encuentra reducido el hemo α , mientras que el centro binuclear esta oxidado (Hill y col., 1986).

Se ha demostrado que la reducción de oxígeno a agua se efectúa en la oxidasa paralelamente a un consumo de protones en la matriz mitocondrial (Wikström, 1977), mientras que los electrones atraviesan la oxidasa desde el lado citosólico hacia el lado interno de la membrana. Esto significa que el ciclo catalítico de

la enzima es electrogénico; una carga transportada por electrón, dando como resultado un gradiente de pH. Aún cuando no se translocaran protones, las reacciones redox catalizadas por la enzima equivalen a mover un protón por electrón a través de la membrana.

Desde hace ya más de diez años, Wikström (1977) demostró que las reacciones redox de la enzima se acompañan de la transferencia de protones a través de la membrana mitocondrial. En ese tiempo, esto causó controversia, sin embargo, hoy día es casi acuerdo general, que la enzima bombea un protón electrogénicamente por cada electrón; aparte del consumo de protones asociado a la producción de agua en el interior de la mitocondria (Moody y col., 1987). Por lo tanto, un ciclo catalítico de la enzima equivale a transportar $2 H^+ / e^-$ a través de la membrana.

A pesar de que existe un concenso sobre la estequiometría de la reacción catalizada por la citocromo oxidasa, todavía está en disputa la forma en que los protones son transportados y a que proceso (ó procesos) redox está asociado este transporte. Existen evidencias de que la enzima puede sufrir transiciones dímero-monómero *in vivo*, siendo la forma dimérica la única capaz de transportar los protones (Brunori y col., 1986; Finel y Wikström, 1986; Sone y Kosako, 1986). No obstante, no se sabe qué es lo que provoca esta transición. Principalmente dos tipos de mecanismos se han propuesto para explicar el bombeo de protones: aquellos en los que existe una interacción de H^+ (ó OH^-) con uno o mas centros redox y aquellos en los que la bomba está apartada de cualquier centro redox. Se le ha dado mucha importancia a la subunidad III (que carece de centros redox) en el proceso de

bombeo de protones (Nalecz y col., 1985; Brunori y col., 1987), sin embargo, parece ser que esta subunidad solo facilita el proceso sin intervenir directamente en el mecanismo (Prochaska y Fink, 1987). Por otro lado, aunque los potenciales de oxidorreducción de los hemos dependen del pH en el rango fisiológico (Wilson y col., 1976; Blair y col., 1986; Hendler y Sidhu, 1988), no se conoce un centro que, a diferencia de los grupos hemo, sea pequeño y móvil para poder acarrear protones en un ciclo redox clásico. Una proposición a este respecto, plantea la existencia de una molécula de oxígeno enlazada en el interior de la enzima (Mitchell y col., 1985). Si esta molécula está en equilibrio entre O_2 y H_2O "dentro" de la enzima, los protones podrían ser transportados por un mecanismo semejante a los ciclos propuestos para las quinonas en el complejo bc_1 . Un dato experimental contrario a esta propuesta es que el flujo neto de electrones a través de la oxidasa va en sentido inverso al flujo de protones (Vygodina y Konstantinov, 1987).

Los primeros modelos para el bombeo de protones involucraban a los grupos hemos, quizás por la dependencia de pH de sus potenciales redox. Wikström y Krab (1987), sugirieron que un ligando axial al hemo α protonado (posiblemente histidina) desplazaba a un ligando hidroxilo en el momento en que el hemo se reducía, de modo que se liberaba una molécula de agua del lado citosólico. La reoxidación del hemo podría estar acompañada por el desplazamiento del ligando por un hidroxilo proveniente del lado citoplásmico, seguida de su reprotonación en el lado opuesto de la membrana, translocándose 1 H^+ por cada e^- . Otros esquemas que involucran al hemo α han surgido, y tal vez el mejor documentado

es el modelo de Babcock y Callahan (1983). En este modelo, con el uso de espectroscopía de resonancia Raman, se sugiere que el grupo carbonilo del formilo del hemo α es capaz de formar puentes de hidrógeno con un residuo cercano de la proteína, aumentándose la energía de este enlace después de la reducción del hemo (ΔE 10.5 kJ/mol). En esta propuesta se plantea el uso de ésta energía para la translocación de un protón (Babcock y Callahan, 1983).

La independencia del pH de los potenciales redox de los átomos de cobre (Wilson y col., 1976), no ha sido motivo para descartarlos como parte integral de la bomba. Por ejemplo, si la forma oxidada de una de estos átomos tuviera un ligando protonado de un lado y este ligando se moviera concomitantemente a la reducción, un protón se movería sin cambio neto en la protonación Gelles y cols. (1986), sugieren que el Cu_A es el sitio redox responsable de la translocación de protones. Ellos proponen que el cobre intercambia un ligando cuando el metal se reduce, de una cisteína por un lado a una tirosina por el otro, dándose el proceso reverso para la oxidación. Si bien hay evidencia de la existencia de tales ligandos, no existen pruebas experimentales de tal intercambio.

Por otro lado, Mitchell ha propuesto recientemente que la geometría de la esfera de coordinación del Cu_B cambia entre dos estados tetrahédricos, pasando por un intermediario cuadrado plano, durante la transición redox (Mitchell, 1987a y b). En este proceso se transporta un hidroxilo a través de la membrana. Esta propuesta resalta el hecho de que la translocación de protones hacia un lado de la membrana es indistinguible de la traslocación de hidroxilos hacia el lado inverso.

Más recientemente, el grupo de Wikström (1988; 1989) ha dado evidencia de que las especies involucradas en la translocación de protones son los intermediarios "peroxi" y "oxiferril" en la reducción de oxígeno en el centro binuclear, pues los equilibrios donde participan estos intermediarios, se afectan por la fuerza protón motriz como por el potencial de membrana.

En un análisis final sin embargo, ningún modelo de translocación de protones (ó OH^-) para la citocromo oxidasa es satisfactorio al momento, pues no explican la irreversibilidad del proceso. Ciertamente, la mayoría de los autores, atendiendo a este problema, se han extendido discutiendo este punto, referido comunmente como 'gating' (Wikström y Krab, 1978; Babcock y Callahan, 1983; Gelles y col., 1986; Mitchell, 1987a y b; Blair y col., 1986; Krab y Wikström 1988). Por su lado, Krab y Wikström (1988) han propuesto que el cambio de energía libre asociada a la transferencia de electrones, debe de desplazar al sistema de un estado de "entrada" a otro de "salida". Aún con todo esto, no existen modelos para la explicación, a nivel molecular, de estas conversiones; entonces "el lector escéptico puede inclinarse a decir: "y entonces un milagro ocurre" en lugar de los argumentos de cambios conformacionales que se han usado" (Prince, 1988).

Oxidasa bacteriana.

Bacillus subtilis fue el primer microorganismo al cual se le analizó su contenido de citocromos, obteniéndose una banda de absorción a 603 nm indicativa de citocromo α_3 (Keilin, 1966).

Esta oxidasa, como el citocromo *c*, esta distribuida entre las bacterias aeróbicas (Poole, 1983; García-Horsman, 1990b). Bajas tensiones de oxígeno, generalmente tienden a reprimir la expresión de α_3 y a inducir la expresión de *c*; por ejemplo en *Paracoccus denitrificans* (Sapshead y Wimpenny, 1972), *Rhodobacter sphaeroides* (Sasaki y col., 1970), la bacteria termófila PS3 (Baines y Poole, 1985), *Bacillus cereus* (Escamilla y Benito, 1984), etc. Las propiedades ópticas de las enzimas bacterianas son similares a las de la oxidasa mitocondrial (Poole, 1983). En general la gran diferencia entre las oxidasas mitocondrial y bacteriana es en el número de subunidades, siendo evidentemente menor este para la enzima bacteriana (entre 1 y 3; ver Gai y col., 1990).

Para fundamentar la discusión que se presentara al final de esta tesis, se abundará ahora en forma más detallada sobre los citocromos del tipo α_3 de la mayoría de las bacterias para las cuales se ha descrito.

Paracoccus denitrificans. En cultivos aerobios de *Paracoccus denitrificans* la bacteria sintetiza un sistema respiratorio muy similar al de la mitocondria (Albracht y col., 1980; John y Whatley, 1977). Por esto, y por otras razones, se ha relacionado a esta bacteria con el ancestro endosimbionte de la mitocondria (John y Whatley, 1977; Küntzel y Köchel, 1981; Steffens y col., 1983). La oxidasa de *P. denitrificans*, inicialmente se purificó como una enzima de dos subunidades (Ludwig y Schatz, 1980; Ludwig y col., 1982; Ludwig, 1986), sin embargo, después de que se descubrió el gen para la subunidad III (Saraste y col., 1986), se pudo aislar como un complejo de tres subunidades (Haltia y col.,

1988). Las tres subunidades presentan homología con las subunidades mayores de la oxidasa mitocondrial (Steffens y col., 1983; Saraste y col., 1986; Raitio y col., 1987). El citocromo aa_3 de *Paracoccus* se ha usado insistentemente como modelo de la enzima mitocondrial (Kadenbach y Reiman, 1988) y una gran cantidad de estudios indican la homología estructural y funcional de las dos enzimas.

Debido al aislamiento inicial de la enzima de dos subunidades, se ha cuestionado el papel central que se le había otorgado a la subunidad III en el bombeo de protones; la enzima de dos subunidades es capaz de bombear protones (Solioz y col., 1982), aunque con cierta dificultad (Pütner y col., 1983). De igual manera, estudios comparativos con la oxidasa mitocondrial carente de la subunidad III (sitio de fijación para el DCCD) y con la enzima de dos subunidades de *Paracoccus* (Nalecz y col., 1985), han permitido sugerir la función de esta subunidad como la responsable de la dimerización de la enzima (dimerización que facilita el bombeo de protones; Ludwig y col., 1982).

Las subunidades de la citocromo oxidasa de *Paracoccus* tienen pesos moleculares de 23.5, 28, y 44 kDa, respectivamente (Haltia y col., 1988). La actividad de la enzima depende de las condiciones de medición (Nicholls y Sone, 1984; Nalecz y col., 1985): observándose mayor actividad a concentraciones fijas de ferrocitocromo c (es decir en presencia de ascorbato), midiendo el consumo de oxígeno, en lugar del consumo de ferrocitocromo c espectrofotométricamente (Nalecz y col., 1985). Aparentemente, el paso limitante de la reacción, en el ensayo espectrofotométrico, es la disociación del complejo entre la citocromo oxidasa y el

citocromo c oxidado, lo que permite la reacción con otra molécula de citocromo c reducido. En general, la actividad se estimula por fosfolípidos y es máxima utilizando citocromo c bovino y apreciablemente menor con citocromo c del mismo *Paracoccus* (Ludwig, 1986; Smith y col., 1988). Aún más, en mutantes deficientes en citocromo c, las actividades, tanto de NADH oxidasa, como de citocromo c-oxidasa, son comparables con las que se obtienen con la cepa silvestre (Bolgiano y col., 1989; Smith y col., 1988). No se sabe en estas mutantes, cual es el donador fisiológico de la citocromo oxidasa, que aparentemente es la principal oxidasa en condiciones aeróbicas; se piensa que la enzima recibe los electrones del citocromo b ó de ubiquinona. Sin embargo, no se han aportado evidencias experimentales claras a este respecto (Bolgiano y col., 1989).

Se conoce la secuencia y organización de los genes de la citocromo oxidasa α_3 de *Paracoccus* (Steffens y col., 1983; Saraste y col., 1986; Raitio y col., 1987; Steindrücke y col., 1987; Ludwig y col., 1988). Estos se encuentran organizados en dos loci. Uno de ellos contiene los genes COII (Citocromo oxidasa sub.II) y COIII junto con dos o tres marcos de lectura abiertos, dentro de un operón. El otro locus, es un operón constituido por el gen COI y un marco de lectura abierto. El análisis de la secuencia de aminoácidos de los productos génicos muestran, por un lado, que COII tiene una estructura de "asa" con dos segmentos transmembranales, similar a la subunidad II mitocondrial. Dos residuos de histidina en esta subunidad son los supuestos ligandos para el Cu_A . Por otro lado, el producto del gene COI tiene probablemente doce segmentos transmembranales siendo la proteína

mas conservada de las subunidades de la oxidasa. Los dos grupos hemos parecen estar empareados entre dos segmentos transmembranales, uno de los cuales posee un residuo ligando (histidina) para el Cu_b . Un tercer segmento provee los otros dos ligandos para este metal. Existen evidencias bioquímicas de que la subunidad I posee los tres grupos prostéticos, puesto que una preparación proteolizada de la oxidasa de *Paracoccus*, con actividad significativa, esta constituida solo por la subunidad I y presenta las señales espectroscópicas de los hemos y de un cobre (Müller y col., 1988 a y b). El producto génico de COIII, es una proteína transmembranal, que posee dominios de uno y otro lado de la membrana (Haltia y col., 1989)

A pesar de que no se ha estudiado la enzima de tres subunidades de *Paracoccus*, se han aislado mutantes deficientes en la subunidad III (Haltia y col., 1989); el fenotipo que presentan estas mutantes esta relacionada con una actividad disminuida, un espectro de absorción distorcionado y la aparición de nuevos sitios accesibles a proteasas. Cuando se aisla la enzima de estas mutantes, ésta se obtiene como una mezcla de COI y COII formando un complejo, además de COI libre de hemos, COII libre y hemo a libre (Haltia y col., 1989). Esto indica que la subunidad III, al menos tiene un papel importante en el ensamblaje de la citocromo oxidasa en la membrana, así como posiblemente en la incorporación de los grupos prostéticos a ésta (Haltia y col., 1989).

Bacteria termófila PS3. De esta bacteria se ha aislado y purificado un citocromo α_a , que se caracteriza, en su estado reducido, por un pico a 604 nm correspondiente al hemo α y otra

banda 550 nm correspondiente al hemo c (Sone y Yanagita, 1982; Sone 1986; Baines y Poole, 1985). El contenido específico de hemo es 15.9 nmol hemo α /mg, 8.9 nmol hemo c/mg y el de cobre 16-18 nmol/mg. Esta enzima presenta una gran inestabilidad a bajas temperaturas (Baines y col., 1984), mientras que presenta actividades máximas alrededor de los 50 °C, perdiendo su actividad hacia arriba de los 60°C. La enzima es marcadamente resistente a agentes desnaturalizantes o caotrópicos, por ejemplo resiste urea 7 M, LiCl 5 M ó 40 % de etanol (Ludwig, 1987).

A pesar de algunas discrepancias iniciales (Sone y col., 1979), el complejo está formado de tres subunidades en estequiometría equimolecular (56, 38 y 22 kDa (Sone y Yanagita, 1982), ó 55,28 y 22 kDa (Baines y Poole, 1985)). La subunidad II representa al citocromo c que se encuentra fuertemente asociado al complejo, de hecho, esta asociación se ha observado en otras bacterias termófilas (ver más adelante). Las tres subunidades parecen ser homólogas a las tres mayores de la oxidasa mitocondrial (Sone y col., 1988).

Se ha estudiado mucho esta enzima desde el punto de vista cinético: los valores de K_m para varios sustratos se han determinado (Sone y Yanagita, 1982): 67 μ M para citocromo c_{552} de PS3; 11 μ M para el citocromo c_{552} de *Thermus*; 130 μ M para citocromo c de corazón de caballo. La adición de fosfolípidos estimula la actividad de la enzima (Sone, 1986). El complejo caa_3 de PS3 se comporta como lo hace la enzima mitocondrial cuando tiene unido el citocromo c en el sitio de alta afinidad (Nicholls y Sone, 1984), pues cuando se agrega citocromo c exógeno, solo se ve el sitio de baja afinidad. Por otro lado, los electrones pueden

ser transferidos directamente desde el TMPD hasta el citocromo *c* fuertemente unido, aún en presencia de citocromo *c* exógeno.

De acuerdo con su estructura cuaternaria, análisis recientes mostraron que la enzima es estable como dímero en la estructura activa para el bombeo de protones en la membrana (Sone y Kosako, 1980), dando un peso de 190-230 kDa, mientras que el complejo funcional en el transporte de electrones da una masa de 180 a 100 kDa.

La enzima purificada y reconstituida, bombea protones en una forma sensible al DCCD, con una estequiometría alta (0.8 a 1.4 H⁺/e⁻; Sone y Yanagita, 1982; Sone y Hinkle, 1982; Sone y Yamagita, 1984).

El gene para la subunidad I de la enzima, está aislado y secuenciado (Sone y col., 1988). El producto génico es una proteína de 58,516 de masa molecular y es homóloga a la correspondiente subunidad de la oxidasa mitocondrial; aparentemente está compuesta de 12 segmentos transmembranales. Los residuos para los ligandos propuestos para los hemo y el cobre, están conservados en esta secuencia.

Thermus thermophilus. La oxidasa de este termófilo, como en el caso de PS3, se aísla como un complejo caa_3 (Fee y col., 1980; Hon-nami y Oshima, 1980; 1984). De acuerdo con los datos de EPR, el hemo *c*, enlazado a una de las subunidades e inicialmente identificada como c_1 , no está magnéticamente acoplada al aa_3 (Fee y col., 1980). El cobre unido a la enzima presenta las mismas señales características de EPR que el de la enzima mitocondrial. El contenido de hemo α de una preparación purificada es 21.3

nmol/mg y la estequiometría reportada de 2:1:2 para hemo α , c y cobre (Yoshida y col., 1984).

La enzima posee dos subunidades (Fee y col., 1980; Hon-nami y Oshima, 1984). La subunidad I, que en geles de poliacrilamida da una masa aparente de 55 kDa, es una proteína hidrofóbica que contiene, supuestamente, los cuatro centros redox (hemo α y cobres) en un ambiente muy similar al observado para otras oxidasas por espectroscopía de rayos X (Powers y col., 1981b). La proteína menor, (33 kDa) es la que enlaza el hemo c ; exámenes genéticos recientes indican que esta proteína, anteriormente identificada como c_1 , es el producto de una fusión entre la subunidad II de la oxidasa y un citocromo c (Buse y col., 1989).

La oxidasa de *Thermus* es capaz de mostrar alta actividad usando TMPD-ascorbato como reductor. No obstante, la enzima posee una alta afinidad por su citocromo c_{552} (2-3 μ M; Hon-nami y Oshima, 1980; Yoshida y Fee, 1984)). La oxidasa es capaz de bombear protones y no se ha encontrado ningún rastro de la presencia de la subunidad III, por lo tanto el bombeo de protones es insensible a DCCD (Hon-nami y Oshima, 1980; Yoshida y Fee, 1984).

Bacillus subtilis. El citocromo α_3 de esta bacteria se purificó por cromatografía de afinidad a partir del solubilizado membranal con lauril maltósido (De Vrij y col., 1983; 1986a). Las características espectroscópicas son las usuales. El complejo puro posee 15-17 nmol hemo α /mg en tres subunidades (57, 37 y 21 kDa), cuya secuencia no se conoce.

La citocromo c -oxidasa de *B. subtilis* tiene alta afinidad por

el citocromo *c* de levadura ($K_m = 2 \mu M$) y depende de la presencia de fosfolípidos para su actividad (De Vrij y Konings, 1987). La enzima es transmembranal y al reconstituirla en liposomas, es capaz de generar un gradiente electroquímico de protones (De Vrij y col., 1986b).

La regulación genética de la expresión de la oxidasa se ha estudiado por medio del aislamiento de mutantes deficientes en la enzima (Müller y Taber, 1989a y b). Se ha localizado un gene (*ctaA*) requerido tanto para la expresión de la oxidasa, como para el proceso de la esporulación (Müller y Taber, 1989a). El análisis de este gen, revela que codifica para una proteína extremadamente hidrofóbica, probablemente con algunos dominios transmembranales y de un peso molecular estimado de 34,065 sin similitud de aminoácidos con cualquier de los polipéptidos mas conservados de la citocromo oxidasa bacteriana o mitocondrial. Las evidencias genéticas indican que el producto génico de *ctaA* podría ser requerido, tanto como una proteína accesoria para la expresión genética del citocromo α_3 , o como para la biogénesis post-traducciona de este complejo (o para ambos procesos) durante los primeros pasos de la esporogénesis.

Nitrobacter agilis. El citocromo α_3 de esta bacteria está constituida por dos subunidades (51 y 31 kDa; Yamanaka y col., 1981). La enzima posee dos hemo α y posiblemente tres átomos de cobre. El contenido específico de hemo es de alrededor de 20 nmol/mg y el cobre está presente en una estequiometría de 1.6 con respecto al hemo α (Yamanaka y col., 1981; Sato y col., 1983).

La oxidasa presenta dos afinidades por citocromo *c* de corazón

de caballo y tres para el de *N. agilis* en un proceso que depende de la presencia de fosfolípidos (Fukumori y Yamanaka, 1984). La actividad de transporte de electrones se inhibe fuertemente por DCCD, en una forma dependiente del tiempo y de la concentración del inhibidor; probablemente, este reactivo interacciona con la subunidad II de la enzima, de acuerdo con los datos de marcaje con el inhibidor radioactivo (Fukumori y Yamanaka, 1985).

La oxidasa, tanto purificada y reconstituida en liposomas, como *in situ* en la membrana, es incapaz de translocar protones (Sone y col., 1983).

Rhodobacter sphaeroides. La citocromo oxidasa de esta bacteria se purificó hace algún tiempo usando cromatografía de afinidad (Gennis y col., 1982; Azzi y Gennis, 1986). El contenido de hemo de una preparación con 80 % de pureza es de 14 nmol/mg. La oxidasa está constituida por tres subunidades (45, 37 y 35 kDa), las dos pequeñas tienen reactividad cruzada inmunológica con anticuerpos anti-subunidad II de *Paracoccus* y de levadura; por lo tanto se pensó que la subunidad III de *Rhodobacter* era un producto de degradación de la subunidad II. Sin embargo, en presencia de inhibidores de proteasas se obtuvieron resultados similares. Por otro lado, la subunidad I de *Rhodobacter* reacciona con anticuerpos anti-subunidad I de la enzima de *Paracoccus*.

La enzima es capaz de oxidar citocromo *c* de levadura con una alta afinidad (K_m de alrededor de 1 μM) observándose estimulación por Tritón X-100 e inhibición por cianuro y azida. Aunque la enzima reconstituida en liposomas, presenta un control respiratorio de 5, ésta no bombea protones.

Recientemente, los genes del citocromo aa_3 de *Rhodobacter* se han aislado y secuenciado parcialmente (J.Shapleigh y R.Gennis, comunicación personal) y, como era de esperarse, presentan homología con las subunidades mayores de la oxidasa mitocondrial.

Pseudomonas AM1. La oxidasa de *Pseudomonas* presenta máximos de absorción a 442 nm y 604 nm que reflejan la presencia de hemos α , también se ha detectado cobre en niveles estequiométricos de 1.2 por hemo α (Fukumori y col., 1985). Según los resultados reportados de electroforesis en presencia de detergentes desnaturizantes, la oxidasa está compuesta por dos subunidades (50 y 30 kDa). El contenido de hemo reportado es de 14.9 nmol/mg, que no concuerda con el peso molecular de la enzima y con dos hemos α por monómero, por lo que se piensa que parte del hemo se pierde durante la purificación. La composición de aminoácidos de la enzima completa es muy parecida a la composición de la enzima de *Nitrobacter*.

La enzima es capaz de oxidar varios citocromos c : de *Candida crusei* ($K_m = 8 \mu M$), de *Pseudomonas* AM1 ($K_m = 50 \mu M$) y de corazón de caballo. La enzima es fuertemente inhibida por cianuro (Fukumori y col., 1985a y b).

La enzima reconstituida en liposomas, presenta control respiratorio pero no se ha detectado bombeo de protones.

Nitrosomonas europaea. El citocromo aa_3 de esta bacteria, antes confundido con un citocromo tipo a_1 , se ha purificado en dos laboratorios distintos, obteniéndose algunas diferencias. Por un lado, Dispirito y col., (1986) muestran una oxidasa de tres

subunidades (51.38 y 35.5 kDa) conteniendo dos hemo α (α_1 y α_2) y dos átomos de cobre; éstos autores, sin embargo, señalan que el peso de las subunidades varía de acuerdo con el sistema electroforético empleado. Por otro lado, Yamazaki y colaboradores (1988), purificaron una enzima con dos subunidades. Mientras que una enzima (la de Dispirito) se reduce con citocromo c_{554} , y no con citocromo c_{552} , ambos de *N. europaea*, la otra oxidasa (Yamazaki) se reduce con el c_{552} . Es posible que se trate de dos enzimas diferentes, sin embargo no existe aún un estudio comparativo de ambas preparaciones.

Sulfolobus acidocaldarius. Dos preparaciones del citocromo α_3 purificado de *Sulfolobus* se han reportado. Inicialmente, Anemüller y Schäfer (1989) publicaron la purificación y propiedades de un citocromo α_3 compuesto de una sola subunidad (38 kDa) con dos grupos hemo α y dos átomos de cobre, que carece de actividad de citocromo c oxidasa, aunque es capaz de oxidar la quinona caldariella (quinona isoprenoide que contiene azufre aislada inicialmente de *Caldariella acidophila*) que se encuentra en las membranas de *Sulfolobus*. A pesar de que las membranas de esta bacteria son capaces de oxidar citocromo c exógeno de varias fuentes, su sistema respiratorio se caracteriza por carecer totalmente de citocromos tipo c y de complejo bc_1 , por lo que resultaba lógico pensar en un donador diferente del citocromo α_3 . Por otro lado, Wakagi y cols. (1989), fueron capaces de aislar una fracción con actividad de citocromo c -oxidasa. La enzima pura está constituida de tres subunidades (37, 23 y 14 kDa) y posee dos grupos hemo. Sin embargo, el hemo α presenta una banda máxima

atípica en su espectro a 589 nm. La oxidasa es capaz de oxidar citocromo *c* de corazón de caballo rápidamente, así como al TMPD. De acuerdo con sus características tanto estructurales como cinéticas y espectrales, estas dos enzimas parecen ser dos proteínas diferentes, sin embargo no se ha reportado información adicional para decidir la identidad relativa de ambas enzimas (Wakagi y col., 1989).

Otras bacterias. La oxidasa aa_3 de *Thiobacillus novellus* purificada está compuesta de dos subunidades (32 y 23 kDa), dos átomos de cobre y dos hemo α (α y α_2) (Yamanaka y col., 1979; Yamanaka y Fujii, 1980). Esta enzima puede oxidar citocromos *c* de varias fuentes: citocromo c_{550} de *Thiobacillus* (K_m 11 μ M) y citocromo *c* de caballo. Con este sustrato, la actividad es apenas del 5% de la obtenida con el citocromo c_{550} de *T. novellus*.

El citocromo aa_3 de otras dos especies del género *Bacillus* se ha purificado. La oxidasa de *B. firmus* esta constituida por dos subunidades (56 y 41 kDa) y un citocromo *c* fuertemente unido a la enzima (14 kDa; Kitada y Krulwich, 1984). Se encuentran asociados a la enzima dos moles de hemo α y dos de cobre por mol de la oxidasa pura. Por otro lado el citocromo aa_3 de *B. stearothermophilus*, presenta características espectrales típicas (De Vrij y col., 1989). Este citocromo está compuesto de 3 subunidades (57, 37 y 22 kDa), teniendo la subunidad intermedia un hemo *c* covalentemente unido. La oxidasa de este termófilo es extremadamente termoestable (la temperatura de inactivación es de 81°C). La enzima reconstituída en liposomas puede generar una fuerza protón-motriz consistente en un potencial de membrana y un

gradiente de protones trans-membranal, lo que indica su función como bomba de protones.

El citocromo α_3 de la bacteria aeróbica heterótrofa *Erythrobacter longus* posee propiedades espectrales típicas mientras que oxida más rápidamente al citocromo c eucariótico que al suyo propio. Su actividad es inhibida por CO y cianuro. La enzima está compuesta de dos subunidades aparentemente idénticas (de 43 kDa: Fukumori y col., 1987).

La oxidasa tipo α_3 de algunas cianobacterias también se ha descrito. En este tipo de bacterias la principal dificultad para identificar el citocromo α_3 , o para seguir el curso de una purificación, es la presencia de una gran cantidad de pigmentos que interfieren en el espectro aún cuando éstas se cultiven con alta aereación y en la obscuridad. Las enzimas tanto de *Anacystis nidulans* (Peschek y col., 1989), *Anabaena variabilis* (Häfele y col., 1988), *Phormidium foveolarum* (Häfele y col., 1989) como de *Synechocystis* 6714 (Wastyn y col., 1987) se han aislado y purificado parcialmente. Estas enzimas en general presentan alta sensibilidad a cianuro y características espectrales típicas. La oxidasa de *Anacystis* se ha probado contra anticuerpos del citocromo α_3 de *Paracoccus* y con base a su reactividad con éstos, se cree que la cianobacteria posee una enzima de dos subunidades (55 y 30 kDa) (Trinka y Peschek, 1986). Para las oxidasas de las otras cianobacterias todavía no es clara su composición polipeptídica.

Fujiwara y cols (1989) purificaron de *Halobacterium halobium* un citocromo tipo α cuyo espectro corresponde al de una oxidasa tipo α_3 . Sin embargo, este citocromo, no presenta actividad de

citocromo c oxidasa y carece de cobre. Por lo anterior, dichos autores sugieren que posiblemente la enzima es muy lábil y que durante el proceso de purificación pierde los átomos de cobre y, por ende, su actividad.

Como podemos darnos cuenta, la oxidasa α_2 , se ha purificado y estudiado en una gran cantidad de bacterias y, a pesar de que poseen diferencias tanto estructurales como cinéticas, podemos resaltar ciertas generalidades de dichas enzimas (Tabla I). Por ejemplo, todas las enzimas aisladas en su forma activa, poseen dos hemo tipo α y, por lo menos, dos átomos de cobre por enzima. Podríamos pensar entonces, que estos son los grupos prostéticos esenciales para la actividad. No obstante, se ha cuestionado el papel del cobre Cu_A en el mecanismo de transporte electrones. Aún más, se han aislado dos enzimas, por un lado la oxidasa de *Nitrosomonas europaea* (Numata y col., 1989) y por otro la de *Paracoccus denitrificans* (Hubbard y col., 1989), cultivadas en cantidades mínimas de cobre en el medio, en las que se detectó la casi total ausencia del Cu_A . En ambas enzimas, aunque las bandas de absorción están un poco modificadas, puede reconstituirse la actividad enzimática de forma comparable a la de la enzima "normal". Por lo tanto, la necesidad de dicho grupo metálico para la actividad se cuestiona con estos experimentos.

En general, se puede decir que las enzimas de bacterias termófilas poseen un hemo c unido covalentemente a la subunidad II de la enzima (Baines y col., 1984; Hon-nami y Oshima, 1984; De Vrij y col., 1989), o que copurifican con un citocromo c que sólo puede, o no, ser separado en las fases finales de purificación

(Kitada y Krukwich, 1984).

Generalmente la subunidad II que tiene el hemo c unido, está constituida por la fusión de dos proteínas: un segmento correspondiente a la subunidad II de la citocromo oxidasa y un segmento de un citocromo tipo c (y no c_1 como se había pensado) (Buse y col., 1989; García-Horsman y col., 1990).

De acuerdo a las características funcionales, las oxidasas tipo aa_3 bacterianas son capaces, por lo general, de oxidar varios tipos de citocromo c (Poole, 1983; Ludwig, 1987). Esto no resulta raro, pues pensando que son enzimas homólogas estructural y químicamente (grupos prostéticos), la especificidad para sus sustratos debe ser muy parecida. En general, la afinidad por citocromos c eucarióticos es menor (o igual) en relación con los sustratos bacterianos. Sin embargo, en muchos casos, la velocidad máxima alcanzada es menor cuando se utilizan citocromos c procarióticos.

ANTECEDENTES

El sistema respiratorio de *Bacillus cereus* se ha venido estudiado desde hace más de cinco años en el laboratorio (Escamilla y Benito, 1984; Escamilla y col., 1986; 1987; 1988). Este sistema está compuesto de una cadena de transporte de electrones ramificada. En condiciones aeróbicas, presenta varias deshidrogenasas, entre ellas la NADH-deshidrogenasa y la succinato-deshidrogenasa (Escamilla y Benito, 1984; Escamilla y col., 1986). La segunda enzima, parece estar formando un complejo con un citocromo b (Jaramillo y Escamilla, comunicación personal) que probablemente, al igual que la NADH-deshidrogenasa, cede sus electrones al acarreador móvil liposoluble: la menaquinona. Desde aquí los electrones pasan a un sector de citocromos, iniciando con un citocromo tipo b y después a uno tipo c. Como oxidasas terminales se han reportado a la oxidasa o, considerada como constitutiva, y el citocromo α_3 , inducido por oxígeno (Escamilla y col., 1987). No se conoce con certeza el donador directo del citocromo o, sin embargo se tiene evidencia de que pudiera ser un citocromo tipo c (Escamilla y col., datos no publicados). Con respecto al citocromo α_3 , muy seguramente recibe los electrones de un citocromo c. En condiciones microaerofílicas, la expresión del citocromo α_3 se reprime y se induce la de una nueva oxidasa: el citocromo d (Escamilla y col., 1986). Este citocromo también se induce en condiciones anaerobias, así como cuando la bacteria está limitada en nutrientes, bajo casi cualquier condición de aereación. La expresión de los citocromos también está regulada por la fase de crecimiento (Escamilla y col., 1986). En la fase

vegetativa. el crecimiento logaritmico se sostiene por la utilización de sustratos fermentables que pueden ser más fácilmente degradados por la bacteria, acumulándose ácidos orgánicos en el medio. En esta etapa, aunque si se presenta una actividad respiratoria medible, la expresión de los citocromos es baja, presentándose como oxidasa principal el citocromo o. Al final de la etapa logaritmica, cuando casi la totalidad de los sustratos fermentables se han agotado, se inicia la utilización de los ácidos orgánicos acumulados durante el crecimiento y las actividades respiratorias empiezan a aumentar, llegando a un máximo entre las 1.5 y 2.5 horas después de que el crecimiento ha concluido (Escamilla y col., 1986; 1987; 1988). Esta inducción responde, tanto a la disponibilidad de sustratos adecuados, como a la necesidad de obtener energía más eficientemente para sostener el proceso morfogénico de la esporulación (Escamilla y col., 1988). Se sabe también, que existe una expresión diferencial del sistema respiratorio de acuerdo con la identidad de la membrana durante la esporulación, es decir, si la membrana pertenece a la célula madre o a la espora en formación (Escamilla y col., 1986). Mientras que en la célula madre existe una gran actividad respiratoria, en la espora se efectúa una desactivación del sistema respiratorio a medida que avanza el proceso (Escamilla y col., 1988). Esta desactivación se ha atribuido por un lado, a la disminución en general de todos los acarreadores respiratorios, pero sobre todo a la disminución en la cantidad de menaquinona endógena, llegando a niveles mínimos en la espora madura (Escamilla y col., 1988).

De acuerdo con el grado de conocimiento del sistema

respiratorio de *B. cereus*, resultaba atractivo empezar con el aislamiento y purificación de los complejos respiratorios de este sistema, pues, aunque se tenía evidencias espectrales y funcionales de las oxidasas en particular, resultaba dudoso explicar por un lado la cinéticas de inhibición de cianuro y monóxido de carbono, como la identidad de los donadores de electrones de las oxidasas. Con respecto a la sensibilidad a inhibidores, el cianuro era capaz de inhibir el consumo de oxígeno presentándose dos componentes: una de alta sensibilidad (en el rango μM y atribuida al citocromo α_3) y otra a concentraciones más altas (rangos mM atribuida al citocromo c) (Linares, 1988). Sin embargo, con el aislamiento de una de las oxidasas se podría comprobar la identidad de los dos componentes. Para monóxido de carbono, se ha determinado un comportamiento análogo al del cianuro; sólo que en este caso la actividad de consumo de oxígeno en membranas, no se inhibe más de un 50 %, lo que resultaba hasta cierto punto difícil de explicar (Linares 1988; García-Horsman, 1988).

De acuerdo a las características espectrales de las preparaciones membranales inhibidas con cianuro, parecía claro que el citocromo c estaba directamente conectado a la oxidasa α_3 , mientras que a altas concentraciones de cianuro, solamente un citocromo b podía ser oxidado, supuestamente identificado como el citocromo c . Sin embargo, como existe más de un citocromo b en las membranas, la sobreposición de las señales espectroscópicas en un rango estrecho, dificultaba la identificación precisa de los citocromos que aparecían en el espectro.

Los problemas planteados arriba ya habían empezado a atacarse

con la búsqueda de mutantes en el sistema respiratorio de esta bacteria. Después de analizar una gran cantidad de mutantes, se aisló una de ellas que carece de señal de citocromo α_3 , por responder negativamente al análisis con la prueba NADI. Esta mutante es capaz de expresar el resto de los citocromos, inclusive una cantidad apreciable de citocromo c, así como de crecer a niveles comparables en relación a la cepa silvestre. Aún más, esta mutante es capaz también de esporular cuando se cultiva en un medio fuertemente amortiguado (Escamilla y col., datos no publicados) a pesar de que se ha sugerido que la integridad del sistema respiratorio es esencial para la esporulación. El análisis cinético y espectral de membranas de la mutante (denominada como PYM) ha revelado que muy posiblemente el citocromo o está conectado con el citocromo c.

Por otro lado, ya se habían hecho intentos para purificar el citocromo α_3 de *Bacillus cereus* (García-Horsman, 1988). Sin embargo, se obtenían preparaciones con baja actividad (20% de la que se media *in situ* en las membranas). Además, no se obtuvo información reproducible de su composición polipeptídica, aparentemente de tres subunidades. Por medio de los protocolos establecidos con anterioridad, se obtenían dos poblaciones del citocromo α_3 , una que co-purificaba con un citocromo c y otra que no. Sin embargo, no se sabía nada sobre la interacción entre estos citocromos.

Por consiguiente, tanto para tratar de abundar más en el esclarecimiento de estos problemas, como para estudiar en sí las propiedades del citocromo α_3 de esta bacteria, se decidió optimizar la purificación y caracterizarla, tanto desde el punto

de vista estructural como funcional. Adicionalmente, se podía también comparar los resultados obtenidos con aquellos pertenecientes a los citocromos α_p de otras fuentes para poder hacer inferencias evolutivas.

METODOS EXPERIMENTALES

Cepa, medios y cultivos. Se trabajó con una cepa de *Bacillus cereus* inicialmente aislada y caracterizada por Andreoli y col., (1973). La bacteria se cultivó en medio G doble cuya composición se detalla en la tabla II y está constituido principalmente de sacarosa, extracto de levadura y sulfato de amonio. Después de efectuar de cuatro a cinco transferencias (10 ml cada una, cada 3 horas) se sembraron de 1 a 4 l de inóculo para el cultivo en un biofermentador (Centro de Instrumentos UNAM) de 20 l. Las condiciones fueron de alta aereación (5 a 6 l de aire/min), 200 rpm de agitación y 30°C. El crecimiento se siguió tomando alícuotas cada hora y midiendo la densidad óptica a 540 nm. En estas condiciones un cultivo promedio alcanza una densidad óptica de 6 a 8, en un tiempo de 4 a 5 horas. Las bacterias se cosecharon ya sea a la mitad del crecimiento logarítmico (D.O. 3 a 4, las cuales se denominan células vegetativas) o dos horas después de que se alcanzó el máximo de densidad óptica (referidas como células esporulantes). Después de la cosecha, las células se lavaron dos veces con el amortiguador TCM (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7.4).

Preparación de membranas. Las células lavadas resuspendidas en amortiguador TCM (150 ml con aprox. 0.5 g/ml), se mezclaron con perlas de vidrio (0.1 mm de diámetro) y se llevaron a un volumen final de 300 ml con el mismo amortiguador que además contenía 15 µg/ml de PMSF. La mezcla se vació a la cámara de una licuadora de alta velocidad (Bead-Beater) y se homogenizó por 10 minutos, en un

TABLA II. COMPOSICION DEL MEDIO G

SUSTANCIA	CONCENTRACION (% w/v)
SACAROSA	0.2
EXTRACTO DE LEVADURA	0.2
SULFATO DE AMONIO	0.4
FOSFATO ACIDO DE POTASIO	0.15
SULFATO DE MAGNESIO 7. H ₂ O	0.02
CLORURO DE CALCIO 2 H ₂ O	0.0025
SUFATO DE COBRE 5 H ₂ O	0.0005
SULFATO DE ZINC 7 H ₂ O	0.0005
SULFATO FERROSO 7 H ₂ O	0.00005
SULFATO DE COBALTO 7 H ₂ O	0.00002
pH*	7

* No es necesario ajustar el pH.

baño de hielo con pulsos de 30 seg con intervalos de 2 min. Las células enteras y los restos de pared celular se separaron del homogenado por centrifugación a 8.500 rpm en un rotor JA10 (Beckman). La pastilla se sometió a un segundo ciclo de ruptura, mientras que el sobrenadante se centrifugó a 45,000 rpm (Rotor Beckman 45 Ti) en una ultracentrifuga por 45 min (equivalente 144 K Xg). Las membranas sedimentadas se lavaron dos veces con amortiguador TCM y se resuspendieron en el mismo amortiguador a 20 mg de proteína/ml aproximadamente.

Protocolo de purificación. El procedimiento que se utilizó para la purificación del citocromo α_3 (Figura 3) es una modificación del protocolo previamente descrito (García-Horsman, 1988) y a continuación se detalla.

Los pasos iniciales de la purificación son una adaptación del método inicialmente reportado por Sone (Sone, 1986, Baines y Poole, 1985). Las pastillas membranales de células vegetativas o esporulantes, se resuspendieron en un amortiguador de sales biliares (colato de sodio 2%; desoxicolato de sodio 1%; sulfato de sodio 0.2 M; ditiotreitól 0.5 mM; Tris- H_2SO_4 30 mM, pH 8.0) hasta una concentración de 5 a 10 mg de proteína/ml. Posteriormente, la mezcla se sonicó en un sonicador Branson (Sonifier B-12) por un periodo de 10 min con pulsos de 30 seg a intervalos de 2 minutos, en un baño de hielo. La suspensión de membranas se centrifugó a 144 K Xg por 40 min. El sobrenadante se descartó y las membranas se resuspendieron en un amortiguador de 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0) que contenía Tritón X-100 al 6% y NaCl 50 mM, para solubilizar a los citocromos. Esta mezcla se incubó 20-30 min, con agitación en

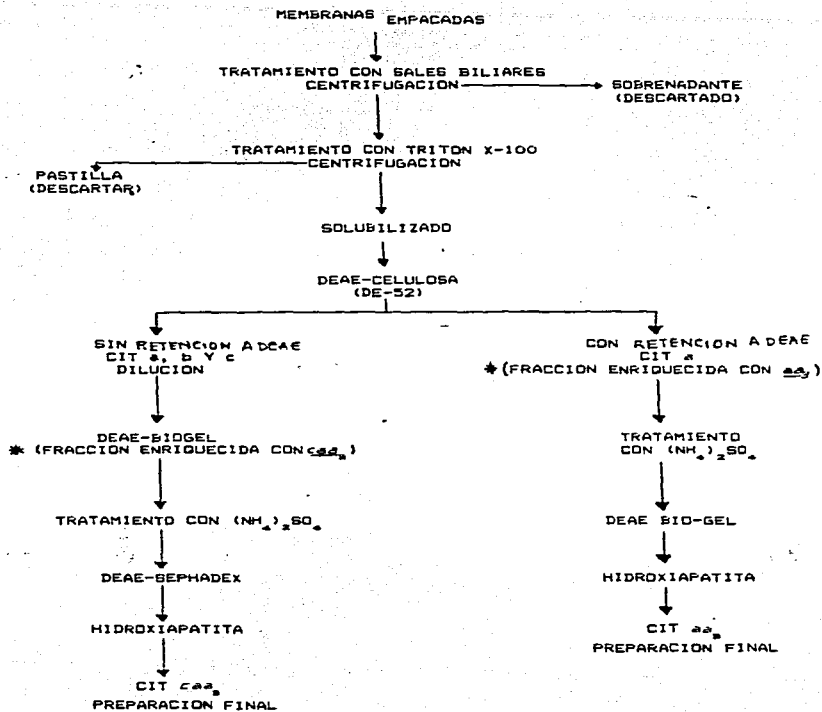


Figura 3. Esquema del protocolo de purificación de los citocromos aa_3 y caa_3 de *Bacillus cereus*.

Baño de hielo. A continuación, se centrifugó a 144 kg por 40 minutos, la pastilla se desechó y el sobrenadante se diluyó tres veces con Tritón al 0.5% para iniciar el fraccionamiento en cromatografía de intercambio iónico. Para esto se utilizó una columna empacada con DEAE-celulosa (Whatman DE-52) de 20 X 3 cm. equilibrada con Tritón al 0.5% en Tris-HCl 50 mM (pH 8) (Figura 4A). Posteriormente, la columna se lavó con 2 o 3 volúmenes de Tritón 0.5%, Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 500 mM en el mismo amortiguador¹. El patrón de elución se siguió con un monitor "UV-cord" por la absorción a 405 nm. Las fracciones correspondientes al citocromo α_9 (ver resultados), juntaron (típicamente constituían un volumen de 75-100 ml) y se añadió sulfato de amonio hasta el 40% de saturación, se incubó por 30 min en baño de hielo con agitación constante. La proteína junto con el Tritón X-100 salió fuera de fase y formó un levitado viscoso que se separó de la solución centrifugando a 33 K X g por 10 min. El levitado se colectó y se resuspendió en un amortiguador Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) hasta un volumen final de 100 ml y se dializó contra 10 vol. del mismo amortiguador. El dializado se diluyó al doble con un amortiguador de Tris-HCl 25 mM (pH 8.0) que contenía 0.25% de Tritón X-100 y se aplicó a una segunda columna de DEAE Bio-Gel de 15 X 3 cm. equilibrada con éste último amortiguador (Fig.4B). El citocromo α_9 absorbido en la columna se lavó con tres volúmenes de amortiguador de equilibración y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0-250 mM. La preparación obtenida fue dializada contra

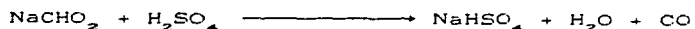
¹En todos los casos el gradiente salino se corroboró por conductimetría

agua destilada (10 vol) por 4 horas y después contra fosfato de potasio 10 mM (pH 6.8, 10 vol) por 10 horas (dos cambios). La preparación dializada se aplicó a una columna (1 X 10) de hidroxilapatita equilibrada con Tritón X-100 al 0.25% en fosfato de potasio 10 mM pH 6.8 (Fig.4C). El citocromo unido a la columna se lavó con 3 vol. de amortiguador de equilibración y se eluyó con un gradiente lineal de fosfatos (10-75 mM). Las fracciones del pico se juntaron y se dializaron contra HEPES 50 mM. KCl. 50 mM (pH 7.5) (HEPES-K⁺) exhaustivamente. Finalmente el dializado se incubó por 2 horas con "Bio-Beads" (SM-2, Bio-Rad) para separar el Tritón y la suspensión, sin perlas, se llevó a una concentración final de 0.5 mg de proteína/ml con asolectina en amortiguador HEPES-K⁺ (concentración final 10 µg de asolectina/ml). Todos los pasos se realizaron a 4°C.

La purificación del complejo $ca\alpha_3$ se realizó de una forma análoga. El tratamiento inicial de las membranas (en este caso de células esporulantes) y la solubilización se efectuó igual que para la obtención de citocromo α_3 . Durante el primer fraccionamiento en DEAE-Celulosa (Fig.4A), todo lo que no se unió a la columna (Pico IV, Fig.4A), que presentó señales de citocromos α , b y c , se diluyó tres veces y se aplicó a una columna de DEAE Bio-Gel (3 X 15 cm) equilibrada con Tritón X-100 0.25% en Tris-HCl 25 mM (Fig.5a). Casi la totalidad de hemo α se absorbió a la columna, la cual se lavó con 3 vol. del amortiguador de equilibración. Después se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0-250 mM). El pico obtenido, enriquecido con el complejo $ca\alpha_3$, se procesó para la purificación de este complejo por un protocolo similar al de la purificación del citocromo α_3 .

con la diferencia que la concentración de Tris-HCl y de NaCl en todos los amortiguadores se redujo a la mitad, permaneciendo todos los demás componentes en concentraciones idénticas. Por lo tanto, de la fracción anterior del complejo se realizó la precipitación con sulfato de amonio, el fraccionamiento en DEAE Sephadex (Fig.5B), el fraccionamiento en hidroxapatita (Fig.5C) y la eliminación del Tritón con Bio-Beads.

Análisis espectral y de grupos prostéticos. Los ensayos espectrofotométricos se efectuaron en un espectrofotómetro SLM-Aminco Dw-2a de acuerdo con Escamilla y col., (1988). Los espectros absolutos se registraron oxidando la muestra con unos granos de persulfato de amonio o reduciendo con hidrosulfito de sodio (ditionita), y registrando contra aire en la celda de referencia. Los espectros diferenciales reducido vs. oxidado se registraron reduciendo con unos granos de ditionita contra la misma muestra oxidada con aire en la referencia. Los espectros diferenciales reducido + CO menos reducido se registraron reduciendo la muestra con ditionita y, después de dividirla en las dos celdas, se burbujeó CO en la celda de la muestra por un lapso de 3-5 min. El CO se generó haciendo reaccionar formiato de sodio y ácido sulfúrico de acuerdo con la siguiente reacción:



Todos los espectros se registraron a temperatura ambiente. La determinación del hemo se hizo tomando el coeficiente de extinción molar de $16.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (603-630 nm) para el hemo α y $19 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (550-540 nm) para el hemo c . El contenido de cobre y de fierro se determinaron por absorción atómica (Perkin-Elmer) usando

sulfato de cobre y cloruro férrico como patrones.

Ensayos enzimáticos. La actividad de oxidasa se midió registrando el consumo de oxígeno con un electrodo tipo Clark en respuesta a la adición de ascorbato-TMPD (20 mM y 200 μ M respectivamente) ó ascorbato (20 mM) y citocromo c (en concentraciones variables), a una mezcla de la muestra en amortiguador HEPES-K⁺ en un volumen final de 2 ml. La actividad se midió a 30°C. Otros detalles se especifican en las leyendas de las figuras.

Inhibición con Dicitclohexil carbodiimida (DCCD). Se probó la inhibición de la actividad de citocromo c-oxidasa por DCCD, incubando muestras de 0.5 mg de oxidasa/ml (1 ml) con concentraciones variables de DCCD (concentración final de 0, 20, 200 y 2000 μ M de DCCD, adicionando alícuotas de soluciones etanólicas de 0, 2, 20 y 200 mM). por 0, 0.25, 0.5, 1, 2, y 3 horas a 4°C. Posteriormente se midió la actividad a cada tiempo de incubación como se estableció anteriormente. Para la medición de la unión de DCCD, las muestras se incubaron durante 3 horas en presencia de 0, 20, 200 y 2000 μ M de DCCD (que contenían 0, 4, 40 y 400 de ¹⁴C-DCCD), que correspondieron a relaciones de 0, 1:1, 1:10 y 1:100 de hemo α :DCCD. Después de la incubación se tomó una alícuota para determinar la actividad y el resto se filtró por Sephadex G-25 y se precipitó con ácido tricloro acético (0.5%). El precipitado se lavó dos veces con agua destilada y se resuspendió en amortiguador de digestión por SDS para su electroforesis (ver más adelante).

Electroforesis. Se usaron dos sistemas electroforéticos para el análisis de masa molecular: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de litio (LDS) a 4°C y electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS). La electroforesis en presencia de LDS se realizó utilizando el método de Laemmli (1980) de acuerdo con lo reportado por Delepelaire y Chua (1979), usando un gel concentrador al 3% de acrilamida y un gel separador al 7.5% de monómero. El SDS fué eliminado del gel concentrador, del gel separador y de los amortiguadores de cátodo y ánodo. (ver Tabla III). Las muestras se mezclaron con en el amortiguador de digestión (LDS 2%, 2-mercaptoetanol 5 %, glicerol 10%, Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8) inmediatamente antes de la electroforesis manteniendo la mezcla a 4°C. La electroforesis se corrió en minigeles (Hoefler, Mighty small II), de 1.5 mm de espesor por aproximadamente 3 horas a corriente continua (30 mA). La electroforesis en presencia de SDS se efectuó de acuerdo con el método reportado por Schägger y col., (1988). Las muestras se incubaron de 4 a 8 horas en el amortiguador de muestra (c.f. SDS 5%; glicerol 15%; Tris-HCl 50 mM (pH 6.8), β -mercapto- etanol; y azul de bromofenol 0.003%) a temperatura ambiente. El gel concentrador fué de 4% y el separador de 16% (ver Tabla IV). Se corrieron también minigeles a 40 V por 30 min más 3 horas a 80 V. voltaje continuo.

La tinción de las proteínas se realizó con azul de Coomasie; para esto, los geles de LDS se fijaron con metanol 50%, ac. acético 10% por 1 hora, seguidos de la tinción con azul de Coomasie al 0.01% en ac. acético 10% durante 2 h a temperatura ambiente.

TABLA III. ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE LDS

	GEL		AMORTIGUADOR	
	SEPARADOR	CONCENTRADOR	DEL TANQUE	
ACRILAMIDA BIS- ACRILAMIDA (%)	10-0.27	4-0.1	--	
TRIS-HCL (M)	0.375	0.125	0.02	
GLICINA (M)	--	--	0.0912	
pH	8.8	6.8	8.3	
PERSULFATO DE AMONIO (%)	0.1	0.05	--	
TEMED (%)	0.07	0.05	--	

TABLA IV. ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS

	GEL		AMORTIGUADOR	
	SEPARADOR	CONCENTRADOR	CATODO	ANODO
ACRILAMIDA BIS- ACRILAMIDA (%)	16-0.5	4-0.125	--	--
TRIS-HCL (M)	1.0	1.0	0.1	0.2
TRICINA (M)	--	--	0.1	--
GLICEROL (%)	13	13	--	--
SDS (%)	0.1	0.075	0.1	--
pH	8.45	8.45	8.25	8.9
PERSULFATO DE AMONIO (%)	0.1	0.05	--	--
TEMED (%)	0.07	0.05	--	--

Posteriormente se destiñó con ac. acético 10%. Los geles de SDS se tñieron de la misma forma solo que el tiempo de incubación con el colorante, fue de 12 horas. La tñición para citocromos se realizó por la actividad de peroxidasa de los grupos hemos utilizando el colorante 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMBZ) según el método de Thomas modificado por Goodhew (Goodhew y col., 1986) para esto los geles se incubaron en una solución de TMBZ 1.25 mM en metanol:acetato de sodio 0.25 M pH 5 (30:70) con agitación constante por 30 min. Subsecuentemente se agregó H_2O_2 hasta una concentración de 26 mM y se siguió incubando por 15 min ó hasta que aparecieron las bandas. Posteriormente, se lavó el gel dos veces con propanol:acetato de sodio 0.25 M pH 5 (30:70).

Obtención de anticuerpos. Se obtuvieron antisueros contra el citocromo aa_3 de *B. cereus* inmunizando cuatro conejos con 1 mg de proteína pura en 2 ml de adyuvante completo de Freund para cada conejo. Se aplicaron refuerzos cada dos semanas de 100 μ g de proteína en el amortiguador HEPES- K^+ -asolectina 10 μ g/ml. Los conejos se sangraron antes de la inmunización (suero preinmune) y a las 4 a 8 semanas después de la primera inyección. La sangre se incubó a temperatura ambiente para que coagulara durante 1 hora, posteriormente se retiró el suero y el cuáguulo se mantuvo en refrigeración por una noche. Al término, el demás suero se decantó y se juntó, se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min para eliminar los eritrocitos restantes. Los sueros se dividieron en alicuotas (100 μ l) y se almacenaron a $-70^\circ C$.

Inmunotransferencia tipo Western. Después de separar las proteínas por electroforesis en SDS, estas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por el método de Towbin y col. (1983). Para esto, los geles se incubaron en el amortiguador de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0.1% en metanol al 20% a pH 8.3) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.45 μ de diámetro de poro) en una cámara de transferencia (Mini-Transphor TE 22, Hoefer Scientific Inc.), en el amortiguador de transferencia, a 300 mA por 4 horas o a 180 mA toda la noche a temperatura ambiente (enfriando la cámara con agua corriente). Al final de la transferencia, una parte de las membranas de nitrocelulosa se tuvieron incubando en amortiguador PBS (NaCl 150 mM; Na₂PO₄ 10 mM pH 7.4) que contenía Tween 20 al 0.3% y tinta china al 0.2% por dos horas. Las membranas se lavaron dos veces por quince minutos con amortiguador PBS-Tween 0.3%. La tinción con antisuero se realizó de dos maneras. La primera, utilizando proteína A-oro como revelador, fué como sigue: después de la transferencia las membranas de nitrocelulosa se incubaron en amortiguador PBS-Tween 0.1% por 30 min a temperatura ambiente, para bloquear los sitios inespecíficos. Subsecuentemente se añadió el suero en diluciones 1:10 a 1:100 y se continuó la incubación por 2 horas. Posteriormente las membranas se lavaron con PBS-Tween 0.1% por 10 min 6 veces. Los complejos antígeno-anticuerpo se tuvieron con proteína A-oro por 2 horas. Después de esto, las membranas se lavaron con PBS por 5 minutos 5 veces, con PBS-Tween 0.1% por 5 min por 2 veces y, finalmente, con PBS por 5 min dos veces.

La segunda técnica de tinción usada consistió en la adición de un segundo anticuerpo, complejo peroxidasa-anti inmunoglobulina de conejo: las membranas de nitrocelulosa se incubaron en solución bloqueadora (BSA 3% en amortiguador TBS (NaCl 500 mM, Tris 20 mM, pH 7.5)), con agitación suave por 1 hora, seguida por dos lavados de 5 min en amortiguador TTBS (Tween-20 0.05% en amortiguador TBS). Posteriormente las membranas se incubaron en la solución del primer anticuerpo (0.5 a 5% de suero en gelatina 1%-TTBS), por toda la noche con agitación suave. Después de la incubación se removió el primer anticuerpo no unido lavando las membranas en TTBS, dos veces, por 5 min cada una, con agitación constante. Se añadió el segundo anticuerpo (anti-inmunoglobulina de conejo-acoplada a peroxidasa de rábano) en dilución de 0.03 a 0.1% en gelatina 1% en TTBS, por 1.5 horas. Se lavó con TTBS dos veces por 5 min y con TBS una vez (5 min) y se añadió el amortiguador alcalino (NaHCO₃ 0.1 M MgCl₂ 1 mM pH 9.8) y se reveló con 500 µl de BCIP (5-bromo,4-cloro,3-indolil fosfato, sal de toluidina) 0.75 % mas 500 µl de NET (azul de nitro tetrazolio 1.5%) (por cada 50 ml de amortiguador alcalino). Las bandas aparecieron inmediatamente, las membranas se secaron con papel filtro y se guardaron protegidas de la luz.

En el uso de técnicas tales como la inmunotransferencia, es importante excluir las respuestas inespecíficas, especialmente cuando proteínas de diferentes orígenes se prueban en su cruce inmunológico. Para asegurar que las cruces inmunológicas aquí presentadas fueron específicas, los siguientes controles fueron hechos: (i) La especificidad de los anticuerpos usados fué confirmada haciendo el análisis por inmunotransferencia de

extractos crudos, a partir de los cuales se purificó el antígeno. (ii) Se hicieron diluciones del anticuerpo para estos experimentos. (iii) Los extractos crudos y las enzimas purificadas se examinaron con los anticuerpos de fondo por análisis de inmunotransferencia, con los sueros preinmunes a las mismas concentraciones que los sueros inmunes. En ningún caso los sueros preinmunes reaccionaron con las proteínas examinadas. (iv) Se utilizaron proteínas control no homólogas con los antígenos para analizar respuestas inespecíficas. Las proteínas usadas para esto fueron: Lisozima de huevo; β -lactoalbúmina de leche; tripsinógeno pancreático; pepsina; albúmina de huevo; y albúmina de plasma bovino. En ningún caso, se obtuvo reacción cruzada con estas proteínas. (v) Se usaron dos técnicas de revelado de los complejos antígeno-anticuerpo; los resultados fueron los mismos.

Determinación de la concentración de proteína. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) modificado por Markwell (Markwell y col., 1981): La muestra proteica (en un volumen de 1 ml que contenía de 10 a 100 μ g de proteína) se mezcló con 3 ml de reactivo C (una mezcla de 100 partes de reactivo A (Na_2CO_3 2%; NaOH 0.4%; tartrato de sodio 0.16%; SDS 1.0%) con una parte de B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 4%)) y se incubó a temperatura ambiente por un mínimo de 10 min. Se añadió después el reactivo de Folin (0.3 ml de una dilución del reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N, 1:1 (v/v) con agua desionizada) y se agitó vigorosamente. Se incubó 45 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbencia a 660 nm contra un blanco de reactivos. La curva patrón se generó utilizando

muestras estándar de albúmina de suero bovino (0.1 mg/ml en agua desionizada) de 0 (blanco), 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 y 1.00 ml diluidas hasta 1 ml.

RESULTADOS

Purificación.

Citocromo oxidasa α_2 . Anteriormente el citocromo α_2 de *Bacillus cereus* se había purificado parcialmente en nuestro laboratorio (García-Horsman, 1988). El protocolo que se había usado incluía los pasos de tratamiento con sales biliares, solubilización con Tritón X-100, fraccionamiento en DEAE-Celulosa y precipitación con sulfato de amonio, los cuales son comunes con los primeros pasos de la purificación que se reportan aquí. En el protocolo anterior, se seguía el procedimiento sustituyendo al Tritón X-100 por Sarkosil (0.05%) usando una columna de DEAE-Celulosa. En este paso se obtenía una activación del 100 %, razón por la cual se había introducido este paso. Sin embargo al final de el proceso, se obtenía una purificación del 20 veces con un rendimiento del 4% y una enzima con 8.1 nmol de hemo α /mg con una actividad de 10 s^{-1} . Por lo tanto, era necesario que el protocolo se modificara de tal forma que se pudiera obtener la enzima mas pura y mas activa (ver Tabla V). Para esto, se modificaron algunos pasos (ver Fig.3). Durante la cromatografía en DEAE-celulosa (Fig.4A), la mayoría del citocromo α_2 se absorbió a la columna (aprox. el 90% en el caso de las células vegetativas y 60% con las esporulantes, en este último caso, el resto del citocromo α_2 no tuvo afinidad por la resina). Es necesario hacer notar que la fracción que no tuvo afinidad por el adsorbente y que eluyó con el amortiguador inicial, expresó actividad de

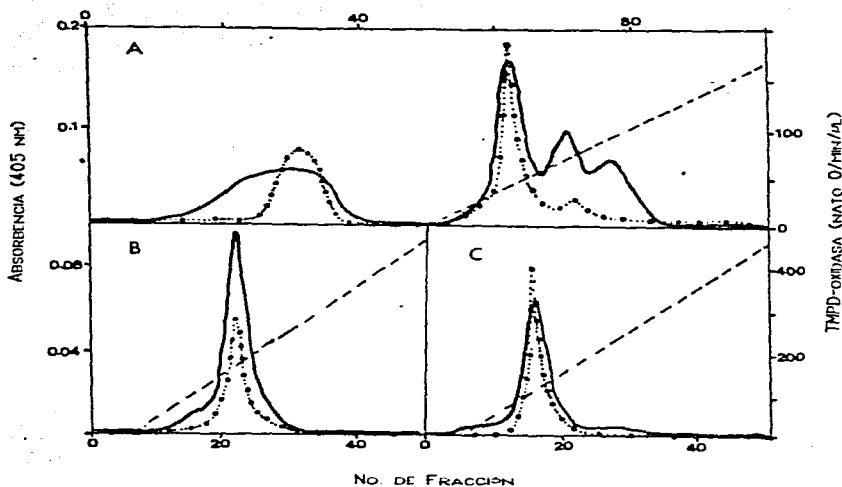


Figura 4. Purificación del citocromo c_a de *Bacillus cereus*. patrones de elución durante la cromatografía en: A. DEAE-celulosa (DE-52); B. DEAE Bio-gel; y C. hidroxilapatita. En las gráficas están representados la absorbencia a 405 nm (—) y la actividad (●.....●). La concentración de sal durante la elución también está representada (---) y se indica de 0 a 500 mM de NaCl para A, de 0 a 250 mM de NaCl para B y de 0 a 50 mM de fosfato de sodio para C.

TMPD-oxidasa; esto se debió, probablemente, a la presencia de citocromo *c* en esta fracción. Los diferentes picos que eluyeron en esta cromatografía, se analizaron por actividad y contenido de citocromos al obtener su espectro de absorción. Las fracciones II y III contenían mezclas variables de citocromos *b* y *c*, además de cantidades mínimas de α_2 (menores al 10%), mientras que la fracción I (correspondiente a aproximadamente 150 mM de NaCl), presentó principalmente una señal de citocromo α y actividad de Ascorbato-TMPD oxidasa. En este paso se obtuvo una fracción enriquecida con citocromo α_2 , con citocromos *b* y *c* como impurezas que, espectralmente, representaban de un 10 a 15% de la absorción de los citocromos. Después de la cromatografía en DEAE-celulosa se llevó a cabo un fraccionamiento con sulfato de amonio, en el cual aparentemente no se veía un aumento importante en la purificación (ver Tabla V), sin embargo, fue necesario para aumentar la concentración específica de hemo α en la columna de intercambio iónico en DEAE Bio-Gel (de 8.1 nmol/mg después del sulfato de amonio, a 19.5 después de DEAE Bio Gel). Si se evitaba el paso de sulfato de amonio, no era posible obtener la separación de impurezas durante la posterior cromatografía en DEAE Bio-Gel (Fig. 4B). Esto puede deberse a la eliminación de algunas proteínas quizá de tipo aniónico que interfieren en la cromatografía en DEAE. Aún más, la contaminación con citocromo *b* y *c* en este último paso disminuyó apreciablemente, de alrededor de 10 % hasta 1 %. Posteriormente, la cromatografía en hidroxiapatita provocó una ulterior purificación (22 nmol hemo α /mg de proteína, ver Tabla I). Con respecto al aumento de actividad que exhibe la enzima durante el protocolo actual de purificación, en relación al

Tabla V. Purificación del citocromo a_a de *Bacillus cereus*

Paso	Proteína (mg)	Hemo a (nmol)	Hemo a / proteína (nmol/mg)	Rendimiento (%)	Veces de purific.
Membranas	2,500	725	0.29	(100)	1
1. Tratamiento sales biliares	1,200	540	0.45	74.5	1.45
2. Extracción Tritón X-100	250	300	1.2	41.4	4.13
3. Fraccionamiento DEAE-Celulosa	30	222	7.4	30.6	25.21
4. Fraccionamiento sulfato de amonio	15	121	8.1	16.7	27.93
5. Fraccionamiento DEAE Bio-gel	4	78	19.5	10.8	67.24
6. Fraccionamiento Hidroxiapatita	3	66	22.0	9.0	75.86

anterior, podemos sugerir que la sustitución de Tritón X-100 por Sarkosil, aunque causaba un aumento en la actividad específica, daba lugar a una enzima que no podía ser activada. Se ha reportado que los detergentes iónicos (como Sarkosil) por lo general desnaturalizan las proteínas. De hecho, baja la cantidad específica de hemo α a la que se llegaba, con respecto a una proteína electroforéticamente pura (más del 90%) indicaba que se tenía una desnaturalización parcial, y una pérdida del grupo hemo.

Con el presente protocolo, la enzima se obtuvo con 22 nmol hemo α /mg, el cual es el valor más alto reportado en la literatura (Ludwig, 1987). Esto puede deberse, tanto a que efectivamente se tiene una preparación muy pura, ó a que el valor de proteína, utilizado en los cálculos de las concentraciones específicas de hemo α esté subestimado. Para esto es necesario hacer notar que cuando la proteína se determinó por los métodos usuales (Lowry, Bradford, Biuret), los valores son más bajos de lo que se obtuvo por el método de Lowry-SDS (ver Métodos). Además, considerando la relativa estabilidad de las proteínas a tratamientos agresivos (sales biliares (3%), Tritón X-100 (6%), LDS (1%, 4°C)), es posible que el citocromo aa_3 , usando el método de Lowry-SDS, no se desnaturalice totalmente, de tal forma que no todos los sitios reactivos de la proteína al reactivo de Lowry estén disponibles. Inclusive, en la electroforesis en presencia de SDS, a pesar del tratamiento previo tan largo de desnaturalización, parte de la proteína se encuentra agregada (ver mas adelante).

Citocromo oxidasa caa_3 . Con respecto a la purificación del complejo caa_3 , con un protocolo similar al empleado para la

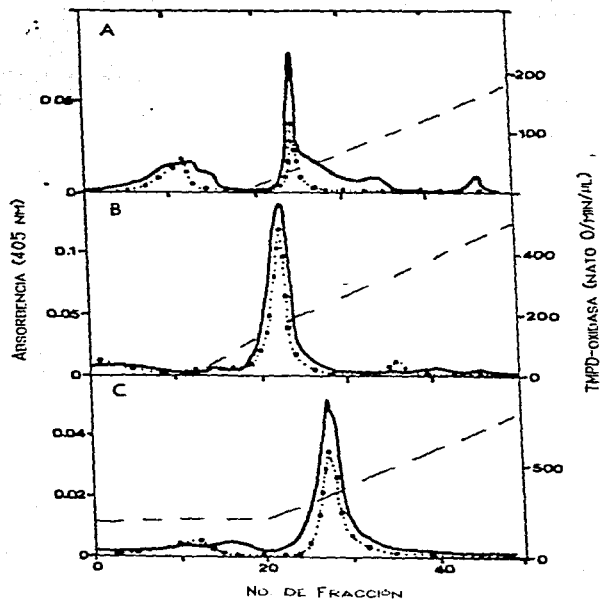


Figura . Purificación del citocromo c_{a_9} de *Bacillus cereus*, patrones de elución durante la cromatografía en: A, DEAE-Bio-gel; B, DEAE Sephadex; y C, hidroxilapatita. En las gráficas están representados la absorbencia a 405 nm (—) y la actividad (●.....●). La concentración de sal durante la elución también está representada (---) y se indica de 0 a 250 mM de NaCl para A, de 0 a 125 mM de NaCl para B y de 0 a 50 mM de fosfato de sodio para C.

Tabla VI. Purificación del citocromo caa_3 de *Bacillus cereus*

Paso	Proteína (mg)	Hemo a (nmol)	Hemo a proteína (nmol/mg)	Rendimiento (%)	Veces de purific.	Cociente a:c
Membranas	3,600	1,044	0.29	(100)	1	0.59
1. Tratamiento sales biliares	1,740	783	0.45	75	1.55	0.61
2. Extracción Tritón X-100	362	434	1.2	41	4.13	0.59
3. Fraccionamiento DEAE-Celulosa	110	231	2.1	20	7.24	0.5
4. Fraccionamiento en DEAE Bio-gel	30	174	5.8	17	20.0	0.8
5. Fraccionamiento sulfato de amonio	16	120	7.5	11	26.0	0.85
6. Fraccionamiento DEAE Sephadex	8	104	13.0	9.9	45.04	0.95
7. Fraccionamiento Hidroxiapatita	2.4	48	20	5.0	75.86	1.1

purificación del citocromo aa_3 (ver Figura 5 y Tabla VI). también se mejoró la preparación obtenida anteriormente (García-Horsman, 1988). El complejo se obtuvo con una proporción con 20 nmol y 13 nmol/mg de hemo α y c respectivamente (Tabla VI). comparado con los valores de 8.9 y 4.5 determinados usando el método anterior. No obstante, el rendimiento ahora fué mas bajo (1.2%) que el obtenido anteriormente (3.3%).

Caracterización espectral de los citocromos aa_3 y caa_3 .

El citocromo aa_3 de *B. cereus* presentó las características espectroscópicas típicas de este tipo de enzimas. En la Figura 6, se presentan espectros en varias condiciones de medición. El trazo a, corresponde al espectro absoluto de la enzima oxidada, observándose la señal correspondiente a 423 nm. El trazo b es el espectro absoluto de la enzima reducida apareciendo las bandas características a 443 nm y 599. El espectro diferencial reducido menos oxidado se presenta en el trazo c, con sus máximos correspondientes (445 nm y 602 nm). Cuando se burbujó monóxido de carbono a una muestra reducida y se registró el espectro absoluto (Trazo d), se observa una disminución del 50% en la señal de 445. Esto indica la presencia del hemo a_3 , que es parte del sitio de unión del monóxido (ver la sección de Generalidades). El espectro diferencial reducido más monóxido contra reducido presenta las señales esperadas: picos a 430 nm y 595, y valles a 445 nm y 610 nm. El citocromo caa_3 presenta las mismas características espectrales con respecto a las señales de hemo α y además,

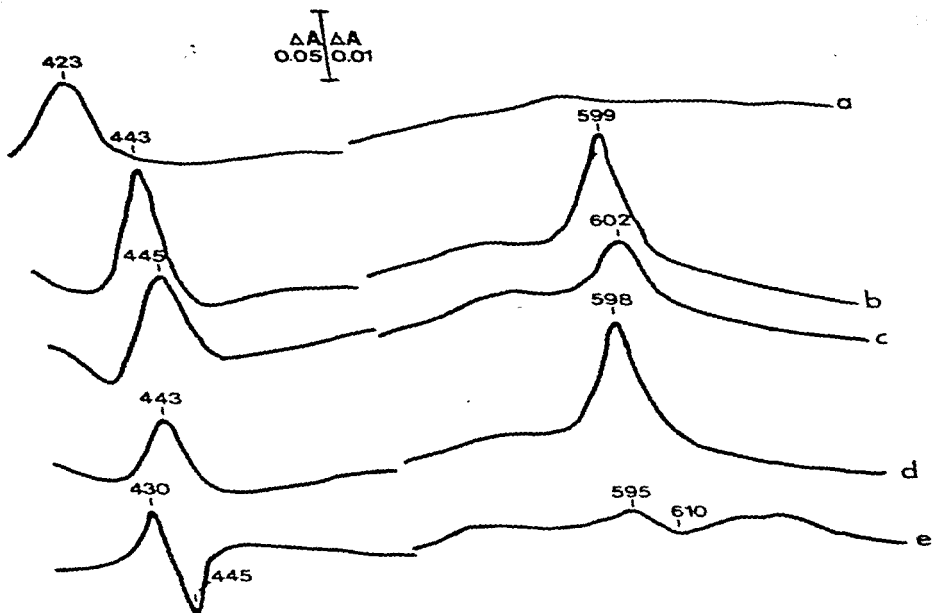


Figura 6. Caracterización espectral del citocromo aa_3 de *Bacillus cereus*. Se utilizaron 0.1 mg de proteína en amortiguador de Tritón X-100 0.1%. Tris-HCl 100 mM pH 8.0. Se presenta el espectro (a) absoluto oxidado; (b) absoluto reducido; (c) reducido menos oxidado; (d) absoluto reducido + CO; y (e) reducido + CO menos reducido. Los registros se efectuaron a temperatura ambiente.

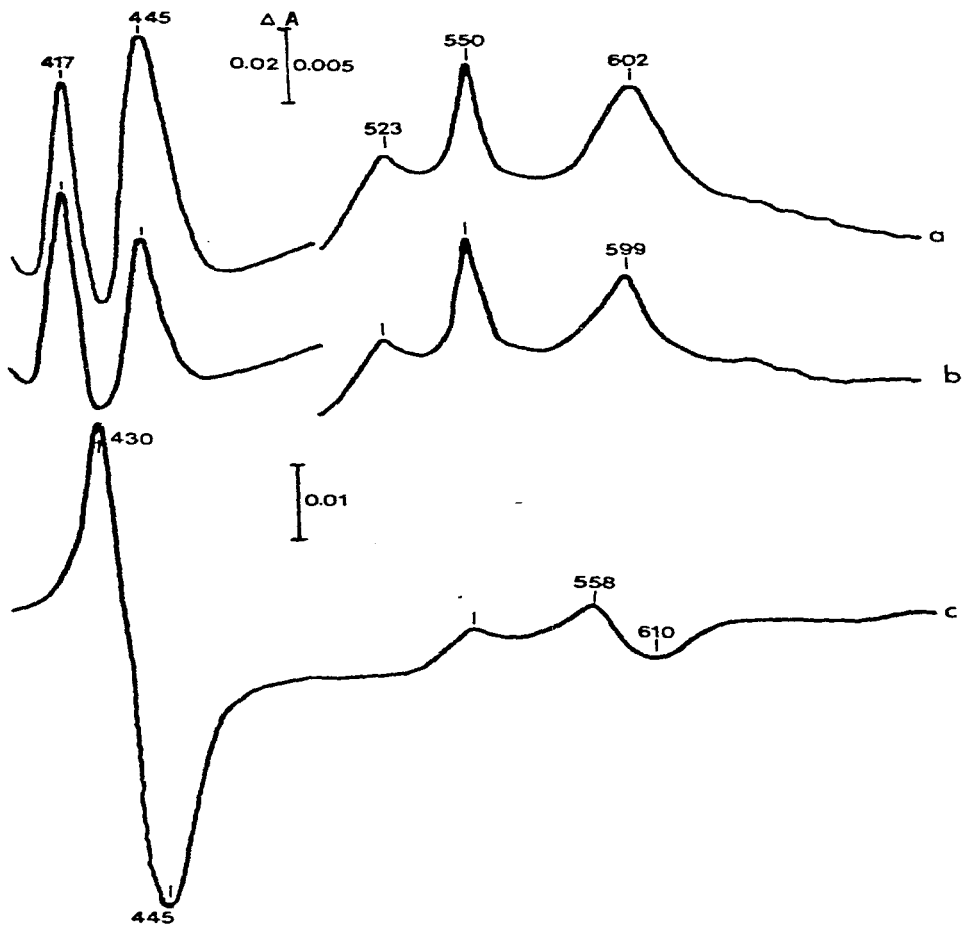


Figura 7. Caracterización espectral del citocromo *caa3* de *Bacillus cereus*. Las condiciones fueron las mismas que en la Fig.6. Espectro (a) reducido menos oxidado; (b) reducido + Co menos oxidado; (c) reducido + CO menos reducido. Los registros se efectuaron a temperatura ambiente.

Tabla VII. Determinación de cofactores en los citocromos aa_3 y caa_3 de *Bacillus cereus*.

	Cit aa_3	Cit caa_3
Hemo a. c. (nmol/mg) ^a	22. --	20. 11
Cu (nato/mg) ^b	35	30
Cu/ Hemo a	1.68	1.25
E ₆₀₁₋₆₃₀ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)	13.3	10.5
E ₅₅₀₋₅₄₀ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)	---	30

^a Determinados espectrofotométricamente.

^b Determinados por absorción atómica.

señales correspondientes a un hemo c (picos a 417 y 550 nm en el espectro reducido menos oxidado, Figura.7).

Se determinaron las cantidades de hierro y cobre en ambas enzimas por absorción atómica (ver Tabla VII). Los resultados indican la presencia de hierro y cobre en una proporción cercana a 2:3 y 3:3 para el citocromo α_3 y el caa_3 , respectivamente (ver discusión).

Naturaleza del complejo caa_3 .

Interacción del citocromo c con el α_3 . Inicialmente, cuando se aisló parte del citocromo α_3 asociada a la señal de un citocromo tipo c de membranas de *B. cereus* en fase estacionaria (ver García-Horsman, 1988), se pensó que la asociación era de tipo enzima-sustrato gobernada por interacciones no covalentes. Por lo anterior, se decidió tratar de disociar el complejo. Para esto se sometió el complejo a varios tratamientos: (i) incubación a 250 mM de NaCl seguida de dilución hasta 25 mM y filtración molecular; (ii) sustitución del Tritón X-100 por Sarkosil (0.05%) y cromatografía en DEAE-Celulosa; (iii) sustitución de Tritón por lauril maltósido (0.1%) y cromatografía en DEAE-Celulosa ó filtración molecular; (iv) sustitución de Tritón por asolectina (50 μ g/ml) y fraccionamiento en las mismas columnas; y (v) sometimiento del complejo a los primeros pasos de purificación es decir: tratamiento con sales biliares (más sonicación), tratamiento con Tritón al 6% y cromatografía en DEAE-Celulosa (ver Métodos). En ninguno de los casos anteriores, se pudo obtener una

Tabla VIII. Relación c:a del complejo caa_3 de *Bacillus cereus* después de los tratamientos indicados.¹

TRATAMIENTO	CIT c: CIT aa_3 *
i. Filtración molecular	1.05
ii. Sustitución de Tritón por Sarkosyl	1.11
iii. Sustitución por Lauril-maltósido	1.0
iv. Sustitución por Asolectina	1.05
v. Tres primeros pasos de purificación	0.95
Fracción purificada	0.97

1. Para detalles ver el texto.

* Determinados espectrofotométricamente.

separación del citocromo c (Tabla VIII). En todos los casos se obtuvo una preparación que contenía señales de hemo α :hemo c de 1:1 aproximadamente, es decir un citocromo caa_9 , (ver Tabla VI).

Expresión del citocromo caa_9 durante el crecimiento de la bacteria. Como se habían podido aislar y purificar dos oxidasas del tipo aa_9 de *B. cereus*, una pregunta que surgió fue la de si estas dos oxidasas se expresaban a todo lo largo del crecimiento de la bacteria. Como se sabe, la expresión de las oxidasas bacterianas, está regulada en general por las condiciones del medio de cultivo, así como por la etapa de crecimiento (ver Antecedentes). Por lo tanto, se pensó en determinar la expresión de las dos oxidasas a lo largo del crecimiento. Dado que no se podía determinar dichas cantidades directamente en las membranas intactas, puesto que las señales espectroscópicas se sobreponen, fue necesario procesar las membranas de acuerdo con el protocolo de purificación (ver Figura 3) hasta donde ambas formas enzimáticas se separarán (* en la Fig.3). De tal forma, las cantidades detectadas resultaron relativas considerando la pérdida en rendimiento que se obtiene hasta ese paso de purificación, no obstante dan una idea clara de la relación entre las dos oxidasas.

Se aislaron membranas a partir de células en crecimiento logarítmico (ver Metodos), así como a partir de células en fase esporulante. Dichas membranas, cada una por separado, se sometieron al proceso de aislamiento de cada una de las oxidasas (ver Figura 3) y se analizaron espectrofotométricamente las fracciones correspondientes a las enzimas; con respecto a las células esporulantes, fué posible obtener tanto citocromo aa_9 .

Tabla IX. Expresión de los citocromos $\alpha\alpha_3$ y $c\alpha\alpha_3$ en las fases vegetativa y esporulante de *Bacillus cereus*

FRACCION	VEGETATIVAS	ESPORULANTES
Membranal:		
Hemo a^1	0.11	0.31
Hemo c^1	0.19	0.55
Solubilizado de Tritón:		
Hemo a total ²	38.1	67.2
Rendimiento:		
Cit $\alpha\alpha_3$ Hemo a^3	12.2	20.5
Proteína ⁴	1.52	3.44
Cit $c\alpha\alpha_3$ Hemo a^3	0.313	9.18
Proteína ⁴	---	0.97
Relación $c\alpha\alpha_3 : \alpha\alpha_3$	0.03	0.5

¹nmol·mg⁻¹. ²nmol. ³nmol/250 mg de proteína membranál. ⁴mg/250 mg de proteína membranál.

como caa_3 en proporción 2:1 aproximadamente (Tabla IX).

En el caso de células en crecimiento logarítmico, no se pudo aislar el complejo caa_3 en cantidades apreciables. Sin embargo, casi toda la absorción correspondiente de hemo α detectada en el solubilizado, se aisló como citocromo aa_3 en este caso (Tabla IX).

De acuerdo con estos resultados, existe una expresión diferencial de las dos oxidasas: en la fase logarítmica de crecimiento podemos aislar casi exclusivamente al citocromo aa_3 (más del 95% de la absorción de hemo α), sin encontrar cantidades detectables del complejo caa_3 . En la fase esporulante, se pudieron aislar las dos formas de la enzima en una proporción de 2:1 de $aa_3:caa_3$ aproximadamente.

Peso molecular de las oxidasas aa_3 y caa_3 .

Para determinar el peso molecular de las dos enzimas, inicialmente se intentó hacer la determinación por electroforesis en condiciones nativas. Para esto se corrieron geles con el sistema Leammli en varias condiciones: a) en ausencia de detergentes; b) en presencia de varias concentraciones de Tritón X-100; y c) en presencia de varias concentraciones de Sarkosyl. En ninguno de los casos mencionados se pudo obtener buenos resultados, puesto que la proteína se precipitaba o se agregaba sin entrar al gel. Por otro lado, se ha reportado que la electroforesis en poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de litio (LDS) a 4°C ha funcionado en algunos sistemas respetando las interacciones proteicas. De acuerdo a este antecedente, se

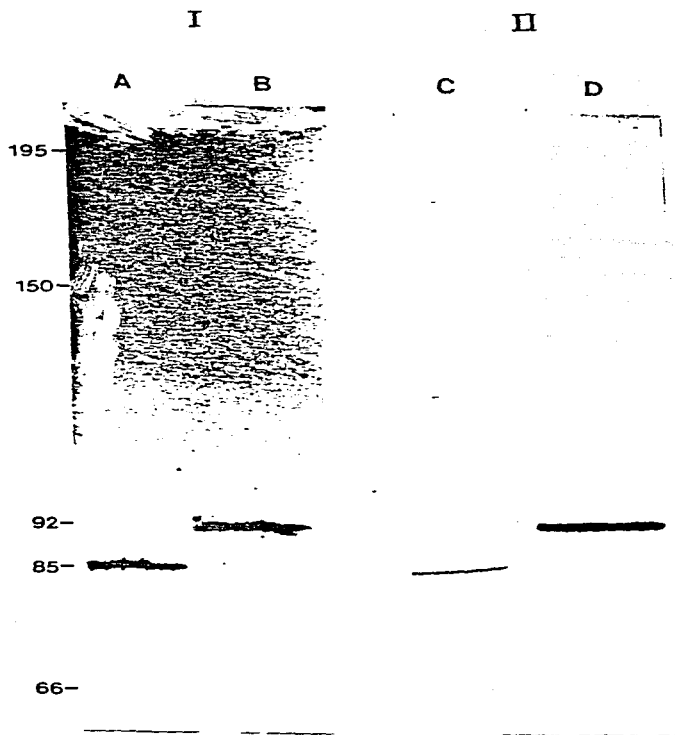


Figura 8. Electroforesis en poliacrilamida en presencia de LDS a 4°C de los citocromos aa₃ (carriles a y c) y caa₃ (carriles b y d). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (I) ó bencidina (II). Para detalles ver la sección de MATERIAL Y METODOS.

corrió una electroforesis en el sistema de Laemmli en presencia de 0.1% de LDS a 4°C (Fig. 8). Como se puede apreciar, tanto el citocromo α_3 (carriles a y c) como el $c\alpha_3$ (carriles b y d), corrieron como una sola banda en estos geles como lo reveló la tinción para proteína (Fig.8, carriles a y b). Del mismo modo, las bandas tuvieron actividad de peroxidasa (carriles c y d) debido a la presencia de los grupos hemo, lo que sugiere la preservación de la estructura terciaria de las proteínas (En geles con SDS a temperatura ambiente, por lo menos para el citocromo α_3 , no se tiene actividad de peroxidasa). El citocromo α_3 migró como una banda de masa molecular relativa de 85,000, mientras que el complejo lo hizo con una banda de 92,000. Esto puede tomarse como evidencia de que el hemo c está unido covalentemente a una de las subunidades de la enzima (ver más adelante).

También se realizó una estimación del peso molecular por filtración molecular. Para esto se utilizó una columna de Ultrogel Aca-34 (2 X 150 cm) equilibrada con Sarkosyl 0.05%, KCl 50 mM, HEPES 50 mM (pH 7.4). En la Figura 9 se presenta el perfil de elución del citocromo α_3 , así como del $c\alpha_3$. En los dos casos, la muestra eluyó en un solo pico con una masa molecular relativa de 165,000 para la oxidasa α_3 y de 190,000 para el citocromo $c\alpha_3$. Estos valores no corresponden con los obtenidos en la electroforesis con LDS, sin embargo, coinciden aproximadamente con una agregación dimerica en la filtración molecular. Para tratar de monomerizar el supuesto dímero, se repitió la filtración molecular sustituyendo el Sarkosyl por asolectina (10 μ g/ml), por β -D-lauril maltósido (0.01%) ó por Tritón X-100 (de 0.01 a 0.1%), y en cada uno de los casos la cromatografía se corrió con 50 ó 0 mM de KCl.

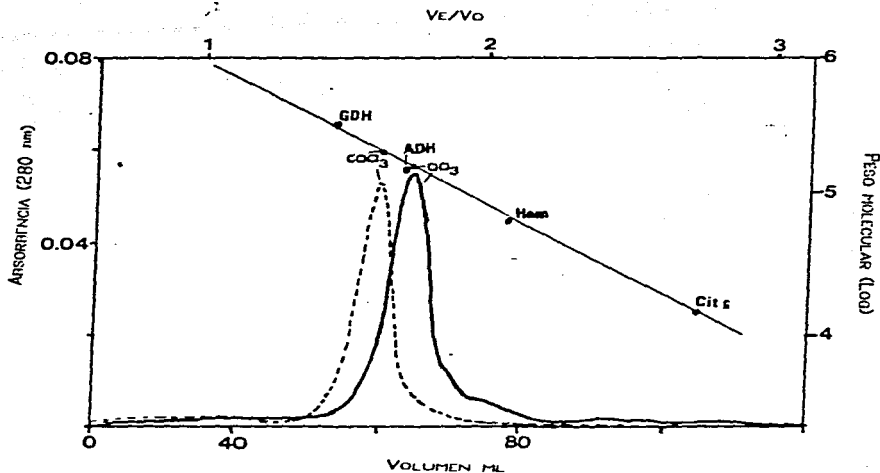


Figura 9. Patrón de elución en Ulto-gel ACA 34 de los citocromos aa_3 (—) y caa_3 (- -) de *Bacillus cereus*. La columna se equilibró con amortiguador HEPES K (HEPES 50 mM, KCl 50 mM pH 7.4) en presencia de asolectina 10 μ g/ml. Las muestras se encontraban suspendidas en el mismo amortiguador. La recta represente la curva de calibración con proteínas con peso molecular conocido: GDH, glutamato deshidrogenasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; Hem, hemoglobina; Cit c, citocromo c.

En todos los casos mencionados, se obtuvieron resultados análogos, es decir un peso molecular correspondiente a un dímero. Para concluir sobre el valor de peso molecular se requirió correr una electroforesis en SDS, de tal forma que la suma de los pesos moleculares de las subunidades nos diera una aproximación del peso molecular de las holoenzimas (ver adelante).

Composición polipeptídica de los citocromos aa_3 y caa_3 .

Para conocer la composición polipeptídica de las dos enzimas, se corrió una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS con el sistema reportado por Schäger y col., (1986). En la figura 10 se muestra el patrón electroforético. El citocromo aa_3 presentó dos bandas con masas moleculares aparentes de 51 kDa (I) y 30 kDa (II) (carriles a y b). El citocromo caa_3 también mostró dos subunidades (50 kDa y 37.5 kDa carril c). De acuerdo con la suma de las masas moleculares de las subunidades I y II, para el citocromo aa_3 el peso molecular de la holoenzima sería de 81 kDa, lo que concuerda con el valor de 85 kDa obtenido por electroforesis en presencia de LDS a 4°C. Del mismo modo, los valores concuerdan para el citocromo caa_3 , 87.5 con 92 kDa. Por lo tanto, podemos decir que la enzima presenta una estructura dimerica en solución. Sin embargo, esta conclusión debe tomarse con cuidado, puesto que no se determinó la cantidad de fosfolípidos o detergente unido a la enzima.

Por otro lado, cuando después de la electroforesis en SDS se tiñó para actividad de peroxidasa, usando el colorante TMBZ, la

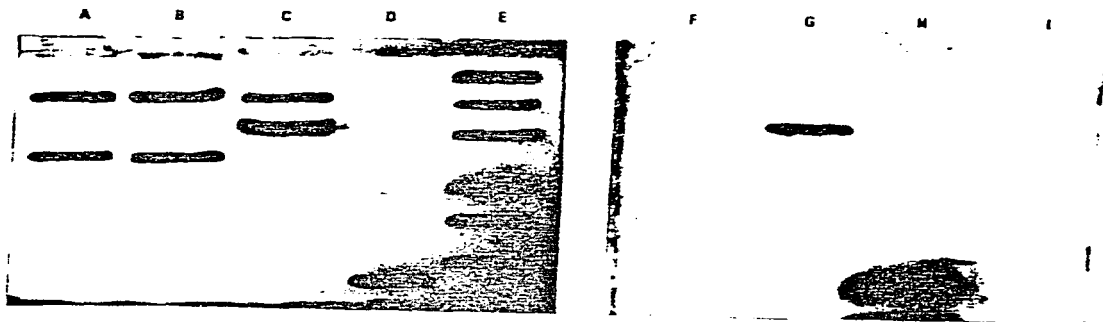


Figura 10. Electroforesis en poliacrilamida en presencia de SDS de los citocromos aa_3 y caa_3 de *Bacillus cereus*. Se utilizaron 50 μg de citocromo aa_3 purificado a partir de células vegetativas (carril A) o esporulantes (carriles B y F); 60 μg de citocromo caa_3 (carriles C y G). Se utilizaron como estándares citocromo c de caballo (15 μg) (carriles D y H) y una mezcla de proteínas (25 μg , ver sección de MATERIALES Y METODOS) (carriles E e I). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (del carril A al E), o con bencidina (del carril F al I).

subunidad II del citocromo caa_3 presentó actividad (Fig.10, carril g). Lo que indica que el hemo c se encuentra unido a esta subunidad. Resultó evidente, que la subunidad II de las dos enzimas fue diferente; en el citocromo caa_3 , esta subunidad es más pesada y posee el hemo c (ver mas adelante).

Suponemos que la subunidad I es el mismo polipéptido para las dos enzimas pues ambas presentan el mismo comportamiento electroforético. Además, los hemos α (α y α_3) y cobre, son los mismos en las dos enzimas. Por lo que existe razón para pensar que dichos cofactores no se encuentren unidos a la subunidad I como se ha demostrado para varios citocromos del tipo $\alpha\alpha_3$. Por lo tanto, podemos pensar que la bacteria posee un gene para la subunidad I y no dos genes para dos subunidades idénticas con la misma función. Sin embargo, estas suposiciones necesitan evidencia experimental adicional (ver mas adelante).

Relación estructural entre los citocromos $\alpha\alpha_3$ y caa_3 .

Evidencias inmunológicas. De acuerdo con los resultados electroforéticos, se habían planteado dos preguntas: cual es la similitud entre las dos oxidasas y cual es la identidad del citocromo c unido a la subunidad II de caa_3 . Para tratar de contestar estas preguntas, se obtuvo antisuero de conejo contra el citocromo $\alpha\alpha_3$ de *B. cereus* y se ensayó la cruz con el citocromo caa_3 por inmunotransferencia tipo "Western". En la Figura 11.1 se muestra el gel de poliacrilamida de fracciones semipurificadas de los citocromos $\alpha\alpha_3$ y caa_3 (carriles d y e), las bandas de las

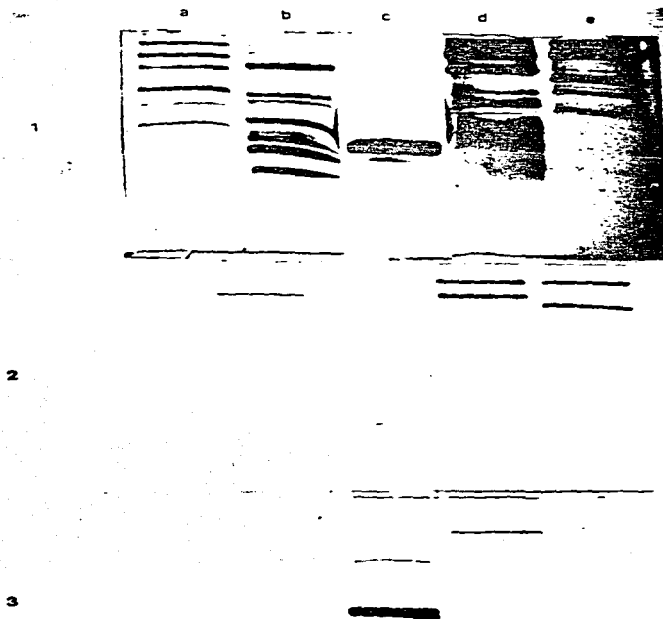


Figura 11. Inmunotransferencia de los citocromos aa_3 y caa_3 de *Bacillus cereus*. 1. Gel de la electroforesis en poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. 2. Proteína transferida a una membrana de nitrocelulosa y decorada con anticuerpos anti-cit aa_3 de *B. cereus*. 3. Proteína transferida a nitrocelulosa y decorada con anticuerpos anti-cit c de caballo. Los complejos antígeno-anticuerpo fueron teñidos por la reacción de peroxidasa de un segundo anticuerpo anti-IgG-Peroxidasa. Carril a, marcadores de peso molecular; carril b, citocromo c -oxidasa de bovino (15 μ g); carril c, citocromo c de caballo (15 μ g); carril d, citocromo caa_3 de *Bacillus cereus* fracción 5 (Tabla VI) (70 μ g); carril e, citocromo aa_3 de *Bacillus cereus* fracción 5 (Tabla V) (80 μ g).

subunidades I y II de cada enzima están indicadas. Un gel idéntico, se transfirió a nitrocelulosa y se expuso al suero anti- α_3 (Fig.11.2). Después de haber sido reveladas las bandas de los complejos antígeno-anticuerpo, se observó que las dos bandas correspondientes a las subunidades I y II del citocromo caa_3 , cruzaron con el anti- α_3 . La cruce entre las subunidades I no resultó sorprendente, pues consideramos que se trataba del mismo polipéptido para ambas enzimas. Sin embargo, la cruce con la subunidad II de caa_3 fue un resultado que nos indicó que dicha subunidad tiene una estructura polipeptídica muy similar a la subunidad II de α_3 . Por otro lado, los anticuerpos contra el citocromo α_3 de *B. cereus*, fueron capaces de reaccionar con la subunidad I de la citocromo c-oxidasa de bovino, sugiriendo fuertemente la analogía entre estas dos oxidasas, por lo menos con respecto a la subunidad I, cosa que es común para otros citocromos α_3 bacterianos (ver introducción).

Por otro lado, se probó la reacción de anti-citocromo c y de anti-citocromo c_1 de bovino con el citocromo caa_3 del *B. cereus*. En la figura 11.3 se muestra la inmunotransferencia utilizando suero anti-cit c de caballo. Como se puede observar, la banda correspondiente a la subunidad II del citocromo caa_3 de *B. cereus*, que posee un hemo c, cruzó con los anticuerpos anti-cit c, no siendo así para la subunidad II del citocromo α_3 . No hubo reacción en ninguno de los casos con el anticuerpo contra cit c_1 . Por consiguiente, podemos sugerir que la subunidad II del citocromo caa_3 , esta constituida por un segmento de la subunidad II de α_3 , fusionado con un polipéptido de un citocromo tipo c,

que enlaza covalentemente un grupo hemo.

Es necesario hacer notar que para estos experimentos se hicieron controles para determinar la especificidad de los sueros (aparte de los expuestos en la sección de METODOS). En el caso del anti α_3 de *B. cereus*, las proteínas usadas como marcadores de peso molecular (Fig. 11, carril A) y el citocromo *c* de corazón de caballo (Carril C) fueron controles negativos, así como las proteínas contaminantes que aparecen en los carriles D y E, y el citocromo α_3 de *B. cereus* como control positivo. En el caso del anti-cit *c* de caballo, los marcadores, la citocromo oxidasa de bovino y el citocromo α_3 de *B. cereus*, fueron controles negativos, mientras que el citocromo *c* de corazón de caballo fue el control positivo.

Caracterización cinética.

Efecto de lípidos y detergentes. Tanto el citocromo α_3 como el citocromo $\text{c}\alpha_3$ que son obtenidos después de la última cromatografía en hidroxapatita, en presencia de Tritón X-100, presentaron bajos números de recambio (menos de 10 seg^{-1}). Para reconstituir la actividad, fue necesario eliminar el detergente. Para esto, las muestras se incubaron en presencia de perlas micro-reticulares de copolímero estireno-divinilbenceno (BIO-BEADS SM-2), en las cuales el detergente se adsorbe (ver métodos). Después de la incubación, la proteína formó un precipitado ligero y fue necesario agregar fosfolípidos o algún detergente que no afectara la actividad. Para determinar la condición adecuada para

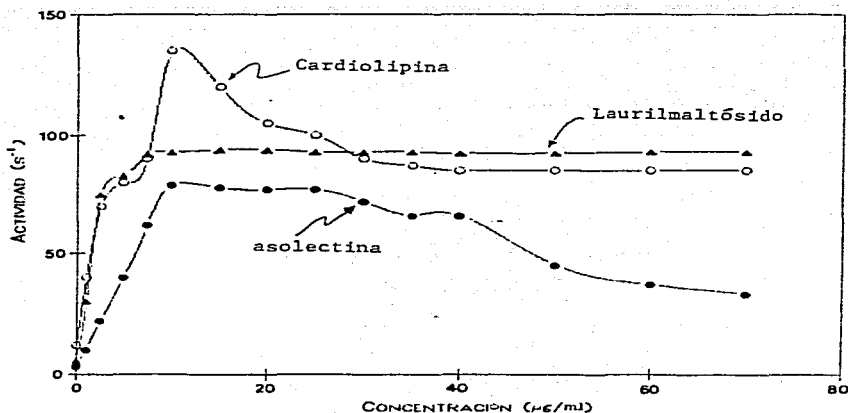


Figura 12. Efecto de cardiolipina (○—○), β -lauril maltésido (△—△) y asolectina (●—●) sobre la actividad del citocromo aa_3 de *Bacillus cereus*. Se midió la actividad de citocromo c-oxidasa después de sonicar la enzima (en el medio de Tritón X-100 tal como se obtiene en el paso 6 de la Tabla V) en presencia de las cantidades marcadas del anfifilo, por 30 seg. La actividad se midió polarográficamente en amortiguador HEPES-K (2 ml).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

hacer el estudio cinético, se examinó el efecto de activación de varios compuestos anfifílicos. Se midió la actividad de TMPD-oxidasa después de sonicar las enzimas por 30 seg en presencia de cantidades variables de asolectina, cardiolipina y β -laurilmaltósido (Fig.12). Como se puede observar en la figura 12, la adición de estos tres compuestos activaron a la enzima de 10 a 15 veces dependiendo del compuesto y de su concentración. Con respecto a la cardiolipina, esto dió lugar a la máxima activación a una concentración alrededor de 15 $\mu\text{g/ml}$, para después tener un efecto inhibitorio a concentraciones mayores, llegándose a una actividad estable entre 25 y 100 $\mu\text{g/ml}$. La cardiolipina también fue capaz de activar a la enzima de acuerdo a un comportamiento saturable, obteniéndose la máxima activación alrededor de los 10 $\mu\text{g/ml}$. La asolectina tuvo un efecto similar al de lauril maltósido, solo que el efecto activador fué menor alcanzándose una meseta desde 10 hasta 25 $\mu\text{g/ml}$. A concentraciones más altas se observó una inhibición del 50% en la concentración más alta de asolectina que se utilizó (70 $\mu\text{g/ml}$). En lo sucesivo, los datos presentados de actividad se midieron en presencia de asolectina 10 $\mu\text{g/ml}$, pues, aunque se tiene una mayor activación con β -lauril maltósido, la asolectina resulta ser mucho más barata y además no presentó efectos desactivadores tan rápidos como con el detergente.

Cinética por oxígeno y citocromo c. Se realizaron las curvas de sustrato para oxígeno y citocromo c de la forma usual, variando la concentración de uno de los sustratos y manteniendo el otro saturante. Los experimentos para obtener la curva para oxígeno se

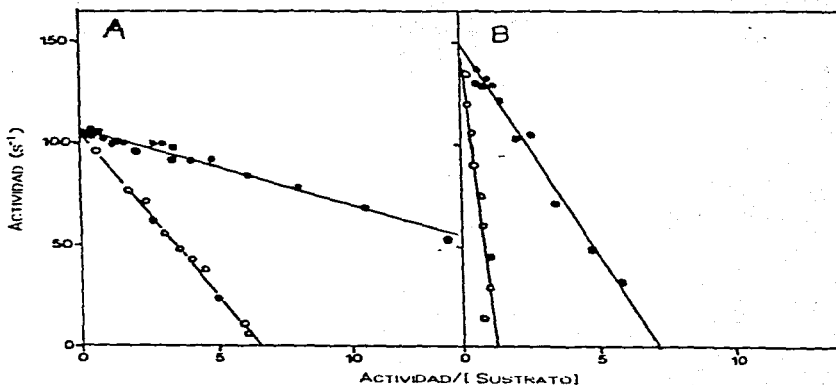


Figura 13. Curvas de Hofstie de la cinética por oxígeno (●—●) y por citocromo c (○—○) de los citocromos a_3 (A) y ca_3 (B). La actividad se midió polarográficamente en amortiguador HEPES-K que contenía 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de azolectina (2 ml) manteniendo uno de los sustratos saturantes (200 μM oxígeno o 150 μM de citocromo c) y variando el otro. La aproximación de las curvas se realizó por el programa SIMPLEX (Instituto de Fisiología Celular).

realizaron de la siguiente manera: la enzima se incubó en el amortiguador de medida (ver pie de figura) saturado con oxígeno (aprox 400 ngato O/ml ó 200 μM) y se arrancó la reacción con sustrato (ascorbato-TMPD ó ascorbato-citocromo c), a concentración saturante, a medida que el oxígeno se fue consumiendo (registrado por el electrodo Clark), se midió el cambio en la pendiente a lo largo de todo el trazo en el registrador, relacionando la concentración de oxígeno en cada punto. La cinética resultó ser de tipo Michaelis-Menten como lo revelan las curvas de Hoffstie presentadas (Fig 13a) para las dos enzimas, con una $K_{m_{\text{op}}}$ de 4 μM y de 15 μM para el citocromo aa_3 y caa_3 respectivamente.

Con respecto a la curva de citocromo c, se midió registrando la pendiente en presencia de condiciones saturantes de oxígeno y de ascorbato, variando la concentración de citocromo c de levadura. Como se observa en la figura 13b, la cinética es también de tipo Michaelis-Menten, con una $K_{m_{\text{op}}}$ de 10 μM y 78 μM para el citocromo aa_3 y caa_3 respectivamente. Es necesario hacer notar que el citocromo aa_3 tiene una mayor afinidad por citocromo c pero una menor actividad ($\text{act.} = 100 \text{ seg}^{-1}$) comparado con el citocromo caa_3 ($\text{act.} = 150 \text{ seg}^{-1}$), mientras que la afinidad por oxígeno es muy parecida para ambas enzimas (ver Tabla X).

Inhibición por cianuro y monóxido de carbono. Las dos enzimas presentaron un comportamiento muy parecido ante el cianuro y el monóxido de carbono, inhibidores clásicos de las citocromo c-oxidases. El cianuro inhibió las dos enzimas con una K_i de aproximadamente 4 μM , mientras que el monóxido de carbono lo hizo con una $K_{0.5}$ de alrededor de 12% de saturación (Fig.14).

Tabla X. Constantes cinéticas de los citocromos aa_3 y caa_3 de *Bacillus cereus*.

	<u>CITOCROMO aa_3</u>	<u>CITOCROMO caa_3</u>
Km (μM)		
Oxígeno	5	20
Citocromo c	10	76
TMPD	31	60
Actividad mol. (seg^{-1})	100	150

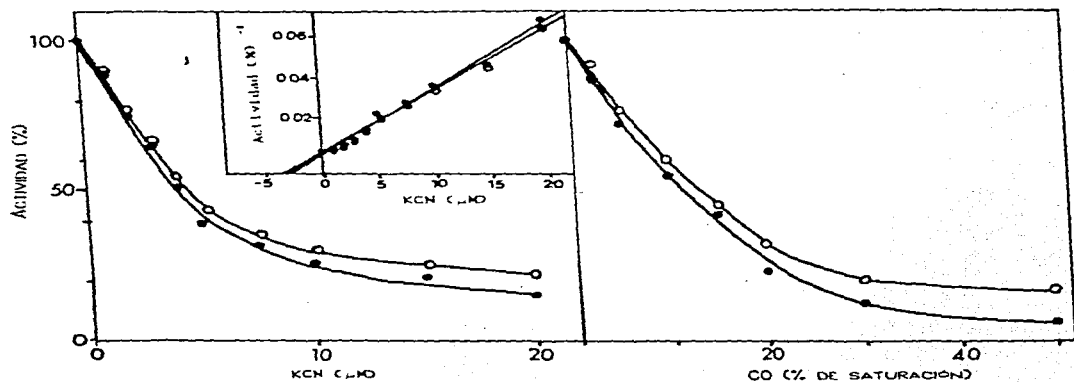


Figura 14. Inhibición de la actividad de citocromo c-oxidasa de los citocromos aa_3 (●—●) y aa_3 (○—○) por cianuro (A) y por monóxido de carbono (B). La actividad se midió en amortiguador HEPES-K asolectina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2 ml). Para las adiciones de CO , se utilizó un amortiguador saturado con monóxido de carbono y se mezcló con amortiguador saturado de aire para obtener los porcentajes señalados. Este experimento se hizo en ausencia de luz directa.

Inhibición por DCCD. Una de las características de los citocromos aa_3 es que unen DCCD covalentemente dando lugar a una enzima con bombeo de protones inhibido, mientras que la actividad de transporte de electrones permanece inalterada. Se decidió, como paso previo a los ensayos de bombeo de protones, hacer los controles de actividad en presencia de DCCD. Para lo cual, se incubó al citocromo aa_3 de *B. cereus* con diferentes concentraciones de DCCD. Cuando se midió la actividad de citocromo c-oxidasa de la enzima, sorprendentemente se encontró que ésta actividad se inhibía conforme se aumentaba el tiempo de incubación, o cuando se aumentaba la concentración de DCCD. El control fue incubado en condiciones idénticas solo que agregando etanol puro, que era el vehículo del DCCD) (ver figura 15). Como se puede observar, la actividad es parcialmente resistente a DCCD a tiempos cortos de incubación y a concentraciones bajas de inhibidor. A medida que aumenta el tiempo, se presenta una rápida inhibición hasta el 20% de actividad remanente (a las 2 horas a 20 μ M; a las 1.5 horas a 200 μ M y a 1 hora a 2000 μ M). Posteriormente la enzima se inactiva completa y lentamente hasta las 3 horas de incubación, con un comportamiento independiente de la concentración de DCCD. Surgió entonces la pregunta de si durante su inhibición, el DCCD se unía covalentemente a la enzima. Para contestar la pregunta se incubó la enzima en presencia de varias concentraciones de DCCD marcado con 14 C y se sometió a electroforesis (ver la sección de Métodos). Los geles se analizaron por autorradioautografía. Alternativamente, el gel se cortó (0.5 mm) y se determinó la radioactividad por centelleo, después de una digestión con peróxido de hidrógeno. En ninguno de

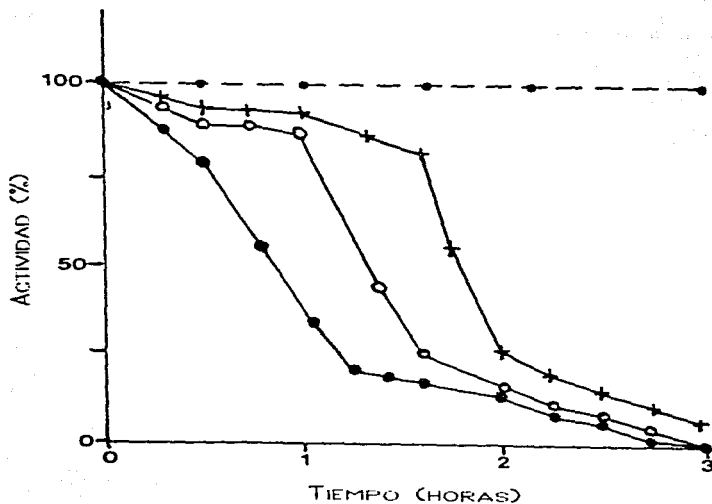


Figura 15. Inhibición de la actividad de citocromo *c*-oxidasa del citocromo aa_3 de *Bacillus cereus* por DCCD. La enzima (10 μ g) se incuba en el amortiguador HEPES-K (1 ml vol. final), con adición de 50 μ l de DCCD en metanol hasta una concentración de 20 μ M (+→), 200 μ M (○—○) o 2000 μ M (●—●), o en presencia de 50 μ l de metanol puro (●—●) por el tiempo indicado. Después se midió la actividad en amortiguador HEPES-K, asolectina 10 μ g/ml.

los dos métodos se pudo determinar marca radiactiva en la enzima incubada con ^{14}C -DCCD. Por lo anterior sugiere que el DCCD no se une a la enzima, por lo menos en las condiciones del ensayo de inhibición de la actividad transportadora de electrones.

DISCUSION

Isoformas.

En esta tesis se presenta la caracterización de dos oxidasas de tipo $\alpha\alpha_3$ de *E. cereus*. Existe, como se vió anteriormente, una creciente información acerca de enzimas de este tipo. En general se ha visto que las oxidasas bacterianas estudiadas son análogas a la enzima mitocondrial. Sin embargo, no se ha reportado concluyentemente la presencia de dos enzimas de este tipo ($\alpha\alpha_3$) en la misma bacteria. Únicamente, en *Sulfolobus acidocaldarius* se aislaron, en laboratorios distintos, dos preparaciones del citocromo $\alpha\alpha_3$ con características estructurales y funcionales diferentes (Anemüller y Schäfer, 1989; Wakagi, y col., 1989). Sin embargo, aunque no existen en este caso razones para pensar que se trata de la misma enzima, no se han efectuado estudios que lo demuestren (Wakagi y col., 1989). Aún mas, no existe información acerca del origen de la cepa que se utilizó para aislar estas dos oxidasas (para algunas bacterias existen diferencias apreciables en la expresión del sistema respiratorio entre cepas de la misma especie, ver por ejemplo Keister y col., (1983).

Por otro lado, en eucariotes superiores, se han descrito isoformas de la citocromo oxidasa dependiendo del tejido a partir del cual se purifica esta (Kadenbach y col., 1983). En eucariotes inferiores, se han detectado isoformas durante la diferenciación (Dispirito y col., 1986). En todos los casos mencionados, la diferencia entre las isoformas radica en la expresión diferencial de las subunidades pequeñas (supuestamente reguladoras)

codificadas por el núcleo, mientras que las subunidades mayores (las catalíticas y codificadas por el DNA mitocondrial) permanecen sin cambio. Aun más, no se ha detectado diferencias significativas en cuanto a la actividad redox entre las diferentes isoformas en eucariotes. Sin embargo, aún no se han hecho estudios comparativos sobre la actividad de bombeo de protones en dichos casos.

Por consiguiente, resulta aún más difícil explicar la presencia de isoformas en *B. cereus*, en donde al parecer, la diferencia radica en la presencia de dos subunidades II distintas, que deben tener un papel importante en la catálisis. Las dos formas de la enzima se expresan diferencialmente a lo largo del crecimiento de la bacteria: durante el crecimiento vegetativo, pudimos detectar solo la expresión del citocromo α_3 , mientras que el complejo caa_3 se detectó solo en la fase esporulante. En este momento (dos horas después de que se inició la fase estacionaria), la expresión de los citocromos es máxima, presentándose una alta tasa respiratoria. Entonces, quizá una manera que tiene la bacteria para enfrentar la necesidad energética, es sintetizar una segunda enzima. Otra posibilidad, es que la nueva forma expresada se localice en la membrana de la pre-espora, para finalmente constituir parte de su sistema respiratorio. Se ha descrito con anterioridad, que el sistema respiratorio inactivo de la espora madura, está constituido por todos los acarreadores protéicos, estando ausente la quinona, lo que propicia su inactividad (Escamilla y col., 1988). Durante el proceso de germinación, la espora es capaz de restablecer una tasa respiratoria apreciable en los primeros 10 a 20 minutos después de iniciada la germinación (Escamilla y col., 1988). Por lo tanto, la presencia de complejos

respiratorios constituidos por más de un componente, como el citocromo $cc\alpha_3$, le daría mayor eficiencia al sistema respiratorio en una membrana, al parecer poco fluida (Setlow, 1983) ó, por otro lado una mayor estabilidad térmica. Subsecuentemente, a medida que la spora se convierte en una célula vegetativa, posiblemente, ya no existe la necesidad de conservar tales complejos, sintetizándose los componentes individuales. Todas estas posibilidades deberán ser consideradas para un posterior examen experimental.

Masa molecular.

Se determinó la masa molecular relativa de las dos enzimas por dos métodos. Por filtración molecular, en varias condiciones, el citocromo $\alpha\alpha_3$ resultó tener un peso molecular de 165 kDa. Sin embargo, en electroforesis en LDS a 4°C, el valor obtenido fue de 85 kDa (valor que representa la mitad del obtenido por filtración molecular). El citocromo $cc\alpha_3$, dio una masa molecular de 190 kDa en filtración molecular y de 92 kDa por electroforesis "no desnaturalizante". Otra vez, este último valor representa la mitad del primero. Se puede sugerir entonces, que las dos enzimas tienen una estructura dimerica en solución, o que poseen 4 subunidades: dos más pesadas con la misma masa molecular y dos ligeras también con igual masa, en una disposición $\alpha_2\beta_2$. Aunque se han reportado enzimas con dos subunidades del mismo peso molecular, resulta difícil pensar que la enzima esté constituida de cuatro subunidades. Aún más, según los cálculos de cantidad de grupos

prostéticos, si se toma el valor de 165 kDa y 190 kDa respectivamente para las dos enzimas, los valores, evidentemente se reducen de 2 hemo y 3 átomos de cobre para el citocromo $\alpha\alpha_3$, a 1 hemo y 1.5 átomos de cobre y de 3:3 a 1.5:1.5 para el complejo caa_3 , lo que no resulta factible por los datos espectroscópicos de la presencia de dos hemos α diferentes.

Relación entre el citocromo $\alpha\alpha_3$ y el caa_3 .

La relación estructural entre las dos enzimas es clara. De acuerdo con los experimentos inmunológicos, la subunidad I de ambas enzimas posiblemente es el mismo polipéptido: Los dos polipéptidos tienen el mismo comportamiento electroforético y, además, la subunidad I del citocromo caa_3 reacciona con anticuerpos contra el citocromo $\alpha\alpha_3$. Por otro lado, la subunidad II del citocromo caa_3 , que posee el hemo c resultó ser mas pesada que la correspondiente del citocromo $\alpha\alpha_3$ (37.5 kDa y 30 kDa respectivamente). Inicialmente se había pensado que correspondía a un citocromo c_1 por ser una proteína hidrofóbica y por el peso molecular (los pesos moleculares de los citocromos tipo c_1 están alrededor de 35 kDa), sin embargo también reacciona con el suero anti-citocromo $\alpha\alpha_3$, lo que indica una homología estructural. La cruzada inmunológica de esta subunidad II de caa_3 con suero anti-citocromo c y la ausencia de reacción con anti-citocromo c_1 , nos da razones para pensar que dicha subunidad es una fusión de proteínas: la subunidad II con un péptido correspondiente a un citocromo tipo c. Podemos comparar el citocromo caa_3 de *E. cereus*

entonces, con aquel purificado de *Thermus thermophilus* (Buse y col., 1989). Este último posee 2 subunidades, una de peso molecular de 55 kDa y otra, que tiene un hemo c unido, con un peso de 33 kDa. De acuerdo con el análisis de la secuencia de bases de esta subunidad, se concluyó que está constituida por una fusión de un polipeptido tipo subunidad II con un péptido tipo citocromo c y no c_1 , como se había pensado inicialmente.

Cinética.

Las dos enzimas presentan actividades muy parecidas. Son capaces de oxidar tanto TMPD como ferrocitocromo c de levadura, en un proceso sensible a cianuro y monóxido de carbono, de forma análoga a lo que ya se ha reportado para otros citocromo oxidasas. Lo que resultó interesante fué la sensibilidad a DCCD de la actividad respiratoria. La inhibición fué dependiente tanto de la concentración de DCCD como del tiempo de incubación. En general, para la mayoría de los citocromos aa_3 , el DCCD se une covalentemente a la subunidad III de la enzima (o al polipeptido homólogo) inhibiendo el bombeo de protones, permaneciendo intacto el transporte de electrones a través de la enzima. Existe, sin embargo, un caso en el cual se tiene un efecto similar al encontrado aquí: el citocromo aa_3 de *Nitrobacter agilis* se ve fuertemente inhibido por DCCD en su actividad de transporte de electrones, aproximadamente a las mismas condiciones que aquí se ensayaron (Fukumori y Yamanaka, 1985). Se investigó también si el DCCD se unía covalentemente a la enzima de *B. cereus*; para esto, se

incubó el citocromo α_3 en presencia de DCCD radioactivo a una concentración de 2 mM (1 μ Ci) por 0, 0.5, 1, 2 y 3 horas. A cada tiempo se detuvo la reacción filtrando por Sephadex G-25 y la proteína se precipitó y se corrió en electroforesis desnaturizante. En ningún caso, se detectó radioactividad unida a las subunidades; tanto en autoradiografía como midiendo la radioactividad por centelleo en rebanadas de gel. Es difícil explicar este fenómeno. Como ya se mencionó, en otras oxidasas el DCCD se une covalentemente a un residuo de glutámico inhibiéndose concomitantemente el bombeo de protones, permaneciendo constante la actividad redox (Sone y Hinkle, 1982; Püttner y col., 1985; Miki y col., 1987; Raitio y col., 1987). En el caso de *B.cereus*, es posible que no se tengan las condiciones adecuadas para la unión covalente del DCCD al citocromo α_3 ; se ha visto que el pH influye en la reacción, por lo que quizá sea recomendable repetir el ensayo a diferentes valores de pH. No obstante, cuando se realizó el ensayo de marcaje paralelo a la determinación de actividad redox, lo que indica que el DCCD sí interacciona con la enzima, quizás en un sitio o sitios diferentes a los de unión covalente inhibiendo con una cinética compleja. Es necesario entonces, hacer un análisis más a fondo de la cinética de inhibición para postular un modelo de unión.

Con respecto a la especificidad de las dos oxidasas, es necesario hacer notar que ninguna de las dos enzimas fué capaz de oxidar ferrocitocromo c de bovino ni de caballo. Resulta difícil explicar este comportamiento. Se podría decir, que como la bacteria se considera evolutivamente más cercana a las levaduras

que a los eucariotes superiores, puede reaccionar con el citocromo c de las primeras preferentemente. Sin embargo, creemos que existe una gran distancia evolutiva entre las bacterias y los eucariotes, ya sean inferiores o superiores, siendo ésta aseveración un tanto desproporcionada. Aún más, la mayoría de los citocromos α_2 bacterianos, presentan una actividad parecida con citocromo c eucariótico comparada con la que exhiben con su propio citocromo c.

La cinética que se observó para citocromo c como para oxígeno es de tipo hiperbólico. El citocromo α_2 tiene una afinidad alta por oxígeno (4 μ M, Tabla X). Es necesario considerar algunas cuestiones técnicas para la determinación de la afinidad por oxígeno: la forma de medición de la cinética se efectuó polarográficamente usando un electrodo de oxígeno tipo Clark, por lo tanto la sensibilidad del electrodo es aproximadamente del mismo orden de magnitud de la K_m encontrada. Por otro lado, el tiempo de respuesta del electrodo a los cambios de concentración de oxígeno en el medio, es relativamente largo ($\tau_{1/2}$ =3 seg). Adicionalmente, la difusión del oxígeno del ambiente al medio, aunque es baja, a concentraciones bajas de oxígeno, podría tener un efecto artificial en la medición, puesto que no se utilizaron cámaras selladas. Por lo tanto, es muy posible que los resultados obtenidos estén sobreestimados y que las K_m reportadas en este estudio sean mayores a las reales. No obstante, si disminuimos la cantidad de enzima, de tal forma que la actividad sea muy baja, podemos disminuir el problema de una baja velocidad de respuesta, aunque posiblemente, aumentemos el efecto de la difusión del oxígeno del ambiente a la cámara de medición. Por el contrario,

podemos tener una situación inversa cuando aumentamos la cantidad de enzima en cada medición, esto es, como la velocidad del consumo es mayor, la velocidad de respuesta puede ser limitante y no la difusión del oxígeno al medio de medición. A pesar de estas consideraciones, tanto a bajas como a altas concentraciones de enzima, los resultados fueron los mismos, quedando entonces solo el problema de poca sensibilidad del electrodo a concentraciones bajas de oxígeno. No existen muchos reportes de afinidades para oxígeno de las oxidasas tipo aa_3 , sin embargo los que hay, muestran valores en el orden de 0.1 a 1 μM (Poole, 1983). Consideramos entonces, que valor de K_m reportado aquí, es una buena aproximación del valor real.

Para el caso del citocromo caa_3 , pensamos que el valor de K_m determinado aquí es más confiable (20 μM), siendo la diferencia significativa con el valor para el citocromo aa_3 .

Cuando se midió la cinética para citocromo c, la diferencia entre las dos enzimas fue un poco más marcada (Tabla X). El citocromo aa_3 , tiene una K_m por citocromo c de alrededor de 10 μM , mientras que el valor para el citocromo caa_3 , es casi 8 veces mayor (78 μM). Podría sugerirse que en el complejo caa_3 , la presencia de un citocromo c, unido muy probablemente en el mismo sitio de unión del citocromo c exógeno, no permitirá una buena interacción con la enzima, cosa que no sucede con el citocromo aa_3 . Esta conclusión puede apoyarse en el hecho de que el TMPD tiene una K_m , aunque mayor para el citocromo caa_3 , muy parecida para ambas enzimas (31 y 60 μM para el cit aa_3 y caa_3 , respectivamente). Al parecer el TMPD, que es una molécula más pequeña, es más accesible su sitio de oxidación (que probablemente

es diferente al del citocromo c).

Como la expresión del citocromo caa_3 coincide con una tasa respiratoria alta, se pensó que la nueva citocromo oxidasa tendría una mayor actividad, o una mejor afinidad por sus sustratos, por lo menos por lo que respecta a citocromo c. Con respecto al citocromo c, aunque si existe diferencia entre las K_m , de todas maneras los valores son del mismo orden de magnitud. Por otro lado, tampoco encontramos diferencia significativa en la actividad molecular de las enzimas (100 y 150 seg^{-1} para el citocromo aa_3 y caa_3 , respectivamente), por lo que no es fácil concluir la "utilidad" de sintetizar una nueva oxidasa. Es importante hacer notar, que en realidad se desconoce el donador fisiológico para cada una de las dos oxidasas. Se tiene cierta evidencia de que un citocromo tipo c es el donador para la oxidasa tipo aa_3 , sin embargo, por el traslape de las señales espectroscópicas, es difícil concluir sobre el donador de caa_3 . Entonces, podría existir diferencia *in situ*, para las dos enzimas. Inclusive, la actividad de una, o de las dos oxidasas, podría depender de algún modulador presente en las membranas pero ausente en la preparación de las enzimas puras.

En general, las constantes cinéticas reportadas aquí, son del orden de aquellas reportadas para otras enzimas (ver tabla XI) aunque existe mucha variación en los datos de la literatura. Con respecto a la K_m por citocromo c, a pesar de encontrar valores por abajo de 1 μM , en general oscilan entre 5 y 10 μM . Con respecto a la actividad, la variación es aún mayor, desde valores de alrededor de 1 s^{-1} , para el citocromo aa_3 de *N. europaea*, hasta

Tabla XI. Constantes cinéticas de algunos citocromos tipo aa_3 bacterianos, para citocromo c.

Bacteria	K_m μM	Actividad - (s^{-1})
<i>B. subtilis</i>	2.1-4.5	16
<i>N. europaea</i>	9.5	4.1
<i>E. longus</i>	11.1	66
<i>Rb. sphaeroides</i>	1.0	300
<i>T. Thermophilus</i>	15.0	6-12
PSS	7.0	80-120
<i>N. agilis</i>	3.8	32
<i>P. denitrificans</i>	4-14	260-900
<i>B. cereus</i> aa_3	10	100
caa_3	20	150

arriba de 300 s^{-1} para *Rb.sphaeroides* ó *P.denitrificans*. Por lo tanto, el valor de 100 a 150 s^{-1} obtenido para las oxidasas de *B. cereus*, las coloca dentro de las enzimas más activas.

Por otro lado, el tipo de cinética reportada para algunas enzimas revela la presencia de dos sitios para citocromo c. Uno de alta y otro de baja afinidad (Yonetany y Ray, 1965; Ferguson-Miller y col., 1976; Fukumori y Yamanaka, 1984; Sinjorgo y col., 1984; Brzezinski y Malmström, 1986; Brzezinski y col., 1986; Garber y col., 1988). Existen varias propuestas para explicar este tipo de cinética. Una idea es la que ha relacionado la cinética bifásica con la dimerización de la enzima; en el dímero, un sitio esta totalmente accesible al citocromo c, mientras que el otro se encuentra escondido entre los dímeros (Naleçs y col., 1983; 1985). Por otro lado se plantea que debido al acoplamiento de la transferencia intramolecular de electrones, a la traslocación de protones, se produce un cambio conformacional de la enzima, lo cual genera un cinética bifásica (Brzezinski y Malmström, 1986). En este caso, la disociación del producto, ferrocitocromo c, es el paso limitante de la reacción y la presencia del producto enlazado inhibe el cambio conformacional. Otro modelo, en el cual se propone la existencia de dos estados cinéticos, uno más activo y menos afin y otro menos activo pero con mayor afinidad. Estos estados dependen de si la enzima esta funcionando en presencia o en ausencia de potencial de membrana (Brunori y col., 1986), o del tiempo transcurrido entre un ciclo catalítico y otro (esto dependiendo a su vez de la velocidad de enlazado y desenlazado del citocromo c; Garber y col., 1988).

Los resultados expuestos aquí, corresponden a una cinética monofásica (independiente de fuerza iónica), para una enzima supuestamente dimerica, lo que no esta de acuerdo con los modelos mencionados arriba. Aún más, existen casos de enzimas monoméricas, eucarióticas como la de tiburón o la de camello (Darley-Usmar y col., 1981b) o bacterianas como la de *N. agilis* (Fukumori y Yamanaka, 1984), las cuales exhiben cinéticas bifásicas. Estos datos, globalmente no apoyan el modelo de la transición dímero-monómero para el comportamiento cinético.

En el caso de las enzimas de *B. cereus*, sin embargo, es necesario efectuar estudios más a fondo sobre el efecto del potencial en la actividad en liposomas.

Composición polipeptídica.

La composición polipeptídica de las enzimas aquí caracterizadas, muestra claramente la presencia de dos subunidades. Por otro lado, el ensamblaje mínimo para la enzima mitocondrial activa, aparentemente consiste de las subunidades I, II y III (Wikström y col., 1981). Se ha mostrado que las subunidades I y II contiene todos los centros redox (Capaldi y col., 1983; Corbley y Azzi, 1984), mientras que la subunidad III esta implicada en el bombeo de protones (Winter y col., 1983; Penttila, 1983; Wikström y Casey, 1985). Sin embargo, la descripción de enzimas de dos subunidades (Robinson y Wiginton, 1985; Thompson y col., 1985; el presente trabajo), ha cuestionado la estructura mínima. El citocrom caa_3 de la bacteria PS3, fue

inicialmente reportada como una enzima de una subunidad (Fee y col., 1980), sin embargo, posteriormente se mostró como compuesta de 3 subunidades (Sone y Yanagita, 1982). En *T. thermophilus* los cuatro centros redox están asociadas a una subunidad (Yoshida y col., 1983). Por lo tanto todavía no existe un acuerdo a la unidad mínima para el citocromo aa_3 .

Resumiendo, la literatura indica que las oxidasas bacterianas de este tipo, caen en cuatro categorías en base a su composición polipeptídica y a la presencia o ausencia de hemo c (Tabla XII): Citocromos aa_3 con tres subunidades; citocromos aa_3 con dos subunidades; citocromos caa_3 con tres subunidades; y citocromos caa_3 con dos subunidades. Esta clasificación difiere de aquella de Dispirito y col. (1986), puesto que aquí se está considerando al polipéptido que posee el hemo c como subunidad. Los citocromos aa_3 y caa_3 de *B. cereus* caerían dentro de los grupos II y IV respectivamente (ver Tabla XII). Podemos observar que las oxidasas tipo caa_3 proceden de bacterias termófilas y/o de bacterias del género *Bacillus*. A este respecto, es notable que las bacterias de este género esporulan, produciendo esporas termorresistentes. Por consiguiente, se puede especular que la presencia de un citocromo c fuertemente unido a la enzima, le confiere termoestabilidad.

Consideraciones evolutivas.

El metabolismo energético de las bacterias aeróbicas y de las células eucarióticas que se presenta en los libros de texto, es casi idéntico, pues en los dos casos se tiene un grupo similar de

Tabla XII. Clasificación del los citocromos tipo aa_3 bacterianos.

Categoría	Bacteria
I. Citocromos aa_3 con tres subunidades	<i>P. denitrificans</i> <i>B. subtilis</i> <i>Rb. sphaeroides</i> <i>N. europaea</i> (?) <i>S. acidocaldarius</i> (?)
II. Citocromos aa_3 con dos subunidades	<i>N. agilis</i> <i>Pseudomonas AM1</i> <i>T. novellus</i> <i>B. cereus</i>
III. Citocromos caa_3 con tres subunidades	Bacteria PS3 <i>B. firmus</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>B. firmus</i> RAB
IV. Citocromos caa_3 con dos subunidades	<i>T. thermophilus</i> <i>B. cereus</i>

enzimas para la glucólisis, el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa. Esta similitud se refiere no solo a las propiedades catalíticas de las enzimas, sino que también a su secuencia de aminoácidos. El citocromo *c* de *Paracoccus* y el de humano, muestran un 38% de similitud en su secuencia (Dickerson y col., 1976), lo que indica su relación evolutiva. La actividad de la citocromo *c*-oxidasa de *Paracoccus* es casi idéntica a la de la enzima de corazón de bovino, siendo los estudios cinéticos de transporte de electrones insuficientes para una identificación funcional entre las dos enzimas (Ludwig y Gibson, 1981; Reichard y Gibson, 1981).

Se han analizado ampliamente la evolución del metabolismo energético (Kadenbach y col., 1988) y existen varias posiciones. En una, se considera una evolución independiente y paralela para procariotes y eucariotes, a partir de un organismo inicial, en cambio otras consideran a los procariotes como ancestros. En una de éstas últimas hipótesis, plantea que la evolución de la citocromo *c*-oxidasa (cuello de botella del metabolismo energético en los organismos más evolucionados) desde los procariotes, hasta los organismos multicelulares, fue acompañada de un incremento de la complejidad regulatoria (Kadenbach y col., 1988). Esta idea se basa en que las proteínas codificadas por el núcleo de la citocromo oxidasa, tienen un papel regulatorio y van aumentando en número desde eucariotes inferiores hasta los mamíferos (Kadenbach y col., 1988; Planques y col., 1989).

A pesar de la cantidad de estudios, existe poca información acerca de la relación evolutiva del metabolismo energético dentro de las bacterias. Quizá la más congruente, es la que usa

secuencias de RNasa T₁ y rRNA 16-s (Pace y col., 1986). Estos trabajos sitúan a *Paracoccus* en una división que también incluye a las bacterias púrpura y a sus ancestros no fotosintéticos, a partir de los cuales, supuestamente, se originó la mitocondria (Pace y col., 1986). En otra línea se encuentran las bacterias del género *Bacillus* y algunas termófilas. Posiblemente, de aquí la similitud entre la composición de los citocromos oxidasa de estas bacterias, por lo menos con lo que respecta al citocromo c fuertemente unido. En algunos casos, en base a la información genética de la subunidades que enlazan el hemo c, en algunas bacterias (Buse y col., 1987), se ha propuesto la fusión entre el gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa y el gen del citocromo c. En *T. thermophilus* se ha reportado una proteína híbrida que contiene estos elementos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta tesis, se describe la presencia de dos citocromos tipo aa_3 en *Bacillus cereus*. Uno de ellos, el citocromo aa_3 , se expresa tanto en fase vegetativa como esporulante y esta constituido por dos subunidades: la subunidad I con 51 kDa y la II con 30 kDa. la enzima muestra una cinética hiperbólica con una K_m por oxígeno de alrededor de 5 μM y por citocromo c de 10 μM y con una actividad molecular de 100 s^{-1} sensible a cianuro ($K_i = 5 \mu M$) y a CO ($K_{0.5} = 10\%$ sat.). La otra enzima, el complejo caa_3 , esta constituida también de dos subunidades: una de 51 kDa homóloga a la subunidad I de aa_3 y otra de 37.5 kDa que posee un hemo c , en este caso homóloga ala sub II de aa_3 y a un citocromo c .

El presente trabajo, sentó las bases para un estudio más a fondo de las enzimas. En primer lugar, desde el punto de vista funcional, resulta atractivo investigar la identidad del, o los donadores, de las dos oxidasas, para tratar de concluir la función de éstas en la bacteria. Por otro lado, la aparición de la segunda oxidasa (caa_3) coincide con el inicio de la esporulación: por un lado, podría pensarse que cada oxidasa se encuentra localizada en una membrana diferente, esas serian la membrana de la célula madre y la membrana, en formación, de la endospora. Es necesario también definir, si las dos enzimas representan sitios de acoplamiento, esto es, si es que bombean protones. Quizás en esta propiedad radique la diferencia entre las dos enzimas.

Desde el punto de vista estructural, una cuestión que resolver, es sobre la posible existencia de una tercera subunidad.

La insistencia a este respecto, está basada en que, para otras bacterias (como *P. denitrificans*), la presencia de una tercera subunidad, que une DCCD, que tiene una interacción débil con la enzima, perdiéndose fácilmente durante la purificación. Además, no se encontró que el DCCD se una a la enzima de *B. cereus*; en general, las oxidasas que bombean protones, son capaces de unir DCCD, que a su vez inhibe el bombeo de protones. En *B. cereus*, no existe alguna razón que indique que las oxidasas α_3 no trasloquen protones, tanto por la analogía que se encontró con el citocromo α_3 , como el hecho de que precisamente tengan expresión máxima durante el comienzo de la esporulación, cuando el requerimiento energético es alto. Por lo tanto se pensaría que una tercera subunidad, que una DCCD es requerida. No obstante, experimentos preliminares a este respecto, indican que en electroforesis en LDS a baja temperatura de membranas intactas, se tienen dos bandas que cruzan con anticuerpos anti- α_3 , con pesos moleculares muy parecidos a los medidos para las enzimas purificadas. Sin embargo, no se puede asegurar que, bajo el tratamiento electroforético, no se disocie también la supuesta subunidad III.

Queda también por definir la relación estructural de las dos oxidasas. Una forma de atacar el problema, sería secuenciando parcial o totalmente las subunidades de cada enzima y compararlas. Otra, sería localizar y estudiar los genes correspondientes. Con los resultados obtenidos, se podría concluir tanto acerca del origen de las enzimas, como de su relación estructural, así como del origen de la subunidad II, unidora de hemo c, del complejo.

Por último, la inhibición de la enzima por DCCD es una cuestión a estudiar. Es necesario mencionar que el DCCD no tiene

efectos sobre la actividad de TMPD-oxidasa en las membranas intactas, por lo que la sensibilidad de la enzima pura, podría ser resultado de exposición de sitios no expuestos *in situ*.

En conclusión, el presente trabajo representa un avance en el estudio de las oxidasas bacterianas, en particular para *B. cereus*. El hallazgo de isoformas del citocromo α_2 , es novedoso y abre interesantes perspectivas para el planteamiento de un diferente tipo de regulación del sistema respiratorio en procariotes. En organismos superiores, ya es común la expresión de isoformas dependientes del tejido o de la fase de crecimiento del organismo. Sin embargo, en bacterias no se ha encontrado algo similar.

BIBLIOGRAFIA

- Albracht SPJ, Van Verseveld HW, Hagen WR, Kalkman ML (1980) Biochem.Biophys.Acta 593:173-186.
- Anderson S, De Bruijn MHL, Coulson AR, Eperon IC, Sanger F, Young IG (1982) J.Mol.Biol 156:638-717.
- Andreoli AJ, Suehiro J, Sakiyama D, Takemoto JU, Vivanco E, Lara JC, Klute MC (1973) J.Bacteriol 115:1159-1166.
- Anemüller S, Schäfer G (1989) FEBS Lett. 244:451-455.
- Anemüller S, Lüben M, Schäfer G (1985) FEBS Lett. 193:83-87.
- Anraku Y (1988) Ann.Rev.Biochem 57:101-132.
- Artzatbanov V, Müller M, Azzi A (1987) Arch.Biochem.Biophys. 257: 476-480.
- Ashcroft JR, Haddock BA (1975) Biochem.J. 148: 349-352.
- Babcock GT, Callahan PM (1983) Biochemistry 22:2314-2319.
- Baines BS, Poole RK (1985) En "Microbial Gas Metabolism. Mechanistic, Metabolic, and Biotechnological Aspects" Poole RK. Dow R (eds.) Accademic Press, London.
- Baines BS, Hubbard JAM, Poole RK (1984) Biochim.Biophys.Acta 766: 438-445.
- Beinert H, Shaw R, Hansen RE, Hartzell CR (1980) Biochim.Biophys. Acta 591: 458-470.
- Bisson R, Montecucco C (1982) FEBS Lett. 150:49-53.
- Bisson R, Schivato G (1986) J.Biol.Chem. 261:43-73-4376.
- Blair DF, Ellis WR, Wang H, Gray HB, Chan SI (1986) J.Biol.Chem. 261:11524-11537.
- Blair DF, Gelles J, Chan SI (1986) Biophys.J. 50:713-730.
- Blumbers WE, Peisach J (1979) En "Cytochrome oxidase" King TE (ed)

Elsevier, Amsterdam. pp 153-159.

Bolgiano B, Smith L, Davies H (1989) Biochim.Biophys.Acta 973: 227-237.

Briggs MM, Capaldi RA (1978) Biochem.Biophys.Res.Commun. 80: 553-559.

Brunori M, Wilson MT (1982) T.Biol.Sci. August: 295-299.

Brunori M, Antonini G, Malatesta F, Srti P, Wilson MT (1987) Eur. J.Biochem. 169:1-8.

Brunori M, Sarti P, Antonini G, Malatesta F (1986) J.Bioelec. Bioenerg. 16:159-165.

Buse G, Hensel S, Fee JA (1989) Eur.J.Biochem. 181:261-268.

Buse G, Steffens GCM, Meineke L (1983) En "Structure and Function of Membrane Proteins" Guagliarello E, Palmieri F (eds) Elsevier, Amsterdam pp. 131-138.

Capaldi RS, Malatesta F, Darley-Usman VM (1983) Biochim.Biophys. Acta 726:135-148.

Carter K, Gennis RB (1985) J.Biol.Chem. 260:10986-10990.

Castor LN, Chance B (1955) J.Biol.Chem. 217:453-465.

Chan SHP, Tracy RD (1978) Eur.J.Biochem. 89:595-605.

Corbley MJ, Azzi A (1984) Eur.J.Biochem. 139:535-540.

Darley-Usman VM, Capaldi RA, Wilson MT (1981) Biochem.Biophys.Res. Commun. 103:1223-1230.

Delepelaire P, Chua N (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 76: 111-115.

De Vrij W, Konings WN (1987) Eur.J.Biochem. 166:581-587.

De Vrij W, Azzi A, Konings WN (1983) Eur.J.Biochem. 131:97-103.

De Vrij W, Poolman B, Konings WN, Azzi A (1986a) Meth. Enzimol. 126:159-173.

- De Vrij W, Driessen AJM, Hellingworf KJ, Konings WN (1986b) Eur.J. Biochem. 156:431-440.
- De Vrij W, Burg B, Konings WN (1987) Eur.J.Biochem. 166:589-595.
- De Vrij W, Heyne IR, Konings WN (1989) Eur.J.Biochem. 178:763-770.
- Deatherage JF, Henderson R, Capaldi RA (1982a) J.Mol.Biol. 158: 487-499.
- Deatherage JF, Henderson R, Capaldi RA (1982b) J.Mol.Biol. 158: 501-514.
- Dispirito AA, Lipscomb JD, Hooper AB (1986) J.Biol.Chem. 261: 17048-17056.
- Einarsdóttir O, Caughey WS (1984) Biochem.Biophys.Res.Commun. 124: 836-842.
- Einarsdóttir O, Caughey WS (1985) Biochem.Biophys.Res.Commun. 129: 840-847.
- Einarsdóttir O, Choc MG, Weldon S, Caughey WS (1988) J.Biol.Chem. 263: 13641-13645.
- Einarsdóttir O, Killough PM, Fee JA, Woodruff WH (1989) J.Biol. Chem. 264: 2405-2408.
- Erecinska M, Oshino R, Wilson DF (1980) Biochem.Biophys.Res. Commun. 92:743-748
- Escamilla JE, Benito MC (1984) J.Bacteriol. 160:473-477.
- Escamilla JE, Ramírez R, Del-Arenal P, Aranda A (1986) J. Bacteriol. 167:544-550.
- Escamilla JE, Ramírez R, Del-Arenal P, Zarzoza G, Linares V (1987) J.Gen.Microbiol. 133:3549-3555.
- Escamilla JE, Barquera B, Ramírez R, García-Horsman JA, Del-Arenal P (1986) J. Bacteriol. 170:5908-5912.
- Fee JA, Choc MG, Findling KL, Lorence R, Yoshida T (1980) Proc.

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:147-151.

- Finel M, Wikström M (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 851:99-108.
- Fujiwara T, Fukumori Y, Yamanaka T (1989) *J. Biochem.* 105:287-292.
- Fukumori Y, Yamanaka T (1984) *FEBS Lett.* 170:301-304.
- Fukumori Y, Yamanaka T (1985) *Plant. Cell. Physiol.* 26:961-965.
- Fukumori Y, Nakayama K, Yamanaka T (1985a) *J. Biol. Chem.* 98:493-499.
- Fukumori Y, Nakayama K, Yamanaka T (1985b) *J. Biol. Chem.* 98:1719-1722.
- Fukumori Y, Watanae K, Yamanaka T (1987) *J. Biochem.* 102:777-784.
- Fuller SD, Capaldi RA, Henderson R (1979) *J. Mol. Biol.* 134:305-327.
- Fuller SD, Darley-Usmar VM, Capaldi RA (1979) *Biochemistry* 20:7046-7053.
- Gai WZ, Sun S-M, Sone N, Chan SHP (1990) *Biophysical Soc. 34th Annual Meeting. Biophys. J.* 57, [2], Part 2: 557a.
- Garber EAE, Luntz TL, Margoliash E (1988) En "Oxidases and Related Redox Systems" (eds) Alan R. Liss, New York pp.749-769.
- García-Horsman JA (1988) Tesis de Maestría. Fac. Química UNAM.
- García-Horsman JA, Escamilla JE (1990) *Bol. Est. Méd. Biol.* En prensa.
- Gelles J, Blair DF, Chan SI (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 852:205-236.
- Gennis RB, Casey RP, Azzi A, Ludwig B (1982) *Eur. J. Biochem.* 125:189-185.
- Goodhew CF, Brown, KR, Pettigrew GW (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 852: 288-294.
- Gorren ACF, Dekker H, Vlegels L, Wever R (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 932:277-286.
- Green GN, Kranz JE, Lorence RM, Gennis RB (1984) *J. Biol. Chem.* 259:

7994-7997.

- Greenwood C, Hill BC, Barber D, Eglinton DG, Thomson AJ (1983) Biochim. J. 215:303-316.
- Haddock BA, Jones CW (1977) Bac. Rev. 41: 47-99.
- Haddock BA, Schairer HU (1973) Eur. J. Biochem. 35: 34-45.
- Häfele V, Scherer S, Böger P (1988) Biochim. Biophys. Acta 934: 186-190.
- Häfele V, Scherer S, Böger P (1989) Z. Naturforsch 44C:378-383.
- Haltia T, Finel M, Harms N, Nakari T, Raitio M, Wikström M, Saraste M (1989) EMBO J. 8: 3571-3579.
- Haltia T, Pustinen A, Finel M (1988) Eur. J. Biochem. 172:543-546.
- Hamamoto T, Carrasco N, Matsushita K, Kaback HR, Montal M (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 2570-2573.
- Hendeler RW, Sidhu GS (1988) Biophys. J. 54:121-133.
- Hill BC, Greenwood C, Nicholls P (1986) Biochim. Biophys. Acta 853: 91-113.
- Holm L, Saraste M, Wikström M (1987) EMBO J. 6: 2819-2823.
- Hon-nami K, Oshima T (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 92: 1023-1029.
- Hon-nami K, Oshima T (1984) Biochemistry 23: 454-460.
- Hubbard JA, Huges MN, Poole RK (1989) Arch. Microbiol. 151:300-306.
- John P, Whatley FR (1977) Biochim. Biophys. Acta 463: 129-153.
- Jurtshuk P, Yang T (1980) En "Diversity of Bacterial respiratory systems" (Eds) CRC series pp 137-159.
- Kadenbach B, Reiman A (1988) En "Oxidases and Related Redox Systems" (eds) Alan R. Liss, New York pp. 653-668.
- Kadenbach B, Jarausich J, Hartman R, Merle P (1983) Annal. Biochem. 129:517-521.

- Keilin D (1966) The History of Cell Respiration and Cytochrome. Cambridge University Press pp.269-288.
- Keister DL, March SS, El Mokhadem MT (1983) Plant Physiol. 171: 194-196.
- King M-T, Drews G (1976) Eur.J.Biochem. 68:5-12.
- Kita K, Anraku Y (1981) Biochem.Int. 2:105-112.
- Kita K, Kasahara M, Anraku Y (1982) J. Biol.Chem. 257: 7933-7935.
- Kita K, Konishi K, Anraku Y (1984) J. Biol.Chem. 259: 3368-3374.
- Kitada M, Kruwich TA (1984) J. Bacteriol. 158:963-966.
- Krab K, Wiström M (1988) Biochim. Biophys. Acta 895: 25-40.
- Kützel H, Köchel HG (1981) Nature 293:752-755.
- Laemmli UK (1970) Nature 227: 680-685.
- Linares V (1988) Tesis Profesional. Biología. Fac.Ciencias. UNAM.
- Lorence RM, Koland JG, Gennis RB (1986) Biochemistry 25:2314-2321.
- Lowry OH, Rosenborough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) J.Biol.Chem. 193: 265-275.
- Ludwig B (1980) Biochim. Biophys. Acta 596: 177-189.
- Ludwig B (1986) Meth. Enzymol. 126: 153-159.
- Ludwig B (1987) FEMS Microbiol. Rev. 46: 41-56.
- Ludwig B, Schatz G (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 196-200.
- Ludwig B, Grabo M, Gregor I, Lustig A, Regenass M, Rusenbusch JP (1982) J. Biol. Chem. 257: 5576-5578.
- Ludwig B, Panskus G, Steinruke P (1988) en "Oxidases and related redox systems. (Eds) Alan R.Liss. pp 605-617.
- Ludwig B, Downer NW, Capaldi RA (1979) Biochemistry 18: 1401-1407.
- Malström BG (1979) Biochim. Biophys. Acta 547:281-303.
- Malström BG (1979) Biochim. Biophys. Acta 549: 281-303.
- Markwell MAK, Hass SM, Tolbert NE, Bieber LL (1981) Meth. Enzymol.

72: 296-303.

Matsushita K, Patel L, Kabach HR (1984) Biochemistry 23:
4703-4714.

Matsushita K, Shingawa E, Adachi D, Aneyama M (1982) FEBS Lett.
139: 255-258.

Miller MJ, Gennis RB (1985) J. Biol. Chem. 260: 14003-14008.

Miller F, De Jong C, Paulson L, Capaldi RA (1983) Biochemistry 22:
546-552.

Mitchell P (1987) FEBS Lett. 22: 235-245.

Mitchell P (1987) Glynn Biol. Research Reports 3: 1-7.

Mitchell P, Mitchell R, Moody AJ, West IC, Baum H, Wrigglesworth
JM (1985) FEBS Lett 188: 1-7.

Moody AJ, Mitchell R, West IC, Mitchell P (1987) Biochim. Biophys.
Acta 894: 209-227.

Morphy MJ, Siegel LM (1973) J. Biol. Chem. 248: 6911-6919.

Muller JP, Taber HW (1989a) J. Bacteriol. 171: 4967-4978.

Muller JP, Taber HW (1989b) J. Bacteriol. 171: 4979-4986.

Müller M, Schläpfer B, Azzi A (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
85: 6647-6651.

Müller M, Schläpfer B, Azzi A (1988a) En "Oxidases and related
redox systems (Eds) Alan R. Liss, Inc. New York. pp 591-604.

Nalecz KA, Bolli R, Ludwig B, Azzi A (1985) Biochim. Biophys.
Acta 808: 259-272.

Nichols P, Sone Y (1984) Biochim. biophys. Acta 767: 240-247.

Nichols P, Sone Y (1984) Can. J. Biochem. Cell Biol. 63: 153-161.

Nichols P, Cooper CE, Chan SHP (1988) En "Oxidases and related
redox systems. (eds) Alan R. Liss, Inc. New York pp 637-651.

Numata M, Yamazaki T, Fukumori Y, Yamanaka T (1989) J. Biochem.

105: 245-248.

Pace NR, Olsen GJ, Woese CR (1986) Cell 45: 325-326.

Palmer G, Babcock GT, Vickery LE (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 2206-2210.

Peschek GA, Wastym M, Trinka M, Molitor V, Fry IV, Packer L (1989) Biochemistry 28: 3057-3063.

Poole RK (1983) Biochim. Biophys. Acta 726: 205-243.

Poole RK, Bains BS, Curtis S, Williams HD, Wood PM (1984) J. Gen. Microbiol. 130: 3055-3058.

Power SD, Lochrie MA, Sevarino KA, Patterson TE, Poyton RO (1984) J. Biol. Chem. 259: 6564-6570.

Powers L, Blumberg WE, Chance B, Barlow CH, Leigh JS, Smith J, Yonetani TVKS, Peisach J (1979) Biochim. Biophys. Acta 546: 520-538.

Powers, L, Chance B, Ching Y, Angiolillo P (1981a) Biochim. Biophys. Acta 34: 4654-498.

Prince RC (1988) Trend. Biochim. Sci. May. 159-160.

Probst I, Wolf G, Schlegel HG (1979) biochim. Biophys. Acta 576: 471-478.

Prochaska LJ, Fink PS (1987) J. Bioenerg. Biomem. 19: 143-166.

Prochaska LJ, Bisson R, Capaldi RA (1980) Biochemistry 19: 3174-3179.

Püttner I, Solioz M, Carafoli E, Ludwig B (1983) Eur. J. Biochem. 134: 33-37.

Raitio M, Jalli T, Saraste M (1987) EMBO J 6: 2825-2833.

Sapshead LM, Wimpenny JWT (1972) Biochim. Biophys. Acta 267: 388-397.

Saraste M, Raitio M, Jalli T, Perämma A (1986) FEBS Lett. 206:

- 154-156.
- Sasaki T, Motokawa Y, Kikuchi G (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 197: 284-291.
- Sato M, Tanaka N, Kakiuchi F, Fukumori Y, Yamanaka T, Kasai N, Kakudo M (1983) *Biochem. Int.* 7: 345-352.
- Scott RA (1989) *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18: 137-158.
- Scott RI, Poole RK (1982) *J. Gen. Microbiol.* 128: 1685-1696.
- Schägger H, Aquila H, Von Jagow G (1988) *Anal. Biochem.* 173: 201-205.
- Shipp WS (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 150: 459-472.
- Smith L, Bolgiano B, Davies HC (1988) In "Oxidases and related redox systems, (Eds) Alan R. Liss pp 619-635.
- Solioz M, Carafoli E, Ludwig B (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 1579-1582.
- Sone N (1986) *Methods Enzymol.* 126: 145-153.
- Sone N, Hinckle PC (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 12600-12604.
- Sone N, Kosako T (1986) *EMBO J.* 5: 1515-1519.
- Sone N, Yanaguita Y (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 682: 216-226.
- Sone N, Yanaguita Y (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 1405-1408.
- Sone N, Hon-nami K, Fukumori Y, Yamanaka T (1983) *FEBS Lett.* 155: 150-154.
- Sone N, Oyama T, Kagawa Y (1979) *FEBS Lett.* 106: 39-42.
- Sone N, Sekimachi M, Fukumori Y, Yamanaka T (1987) *J. Biochem.* 102: 481-486.
- Sone N, Yokoi F, Fu T, Ohta S, Metso T, Raitio M, Saraste M (1988) *J. Biochem.* 103: 606-610.
- Steffens GCM, Biewald R, Buse G (1987) *Eur. J. Biochem.* 164: 295-300.

- Steffens GCM, Buse G, Oppliser W, Ludwig B (1983) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 116: 431-439.
- Steinrücke P, Steffens GCM, Paskus G, Buse G, Ludwig B (1987) *Eur. J. Biochem.* 167: 431-439.
- Stevens TH, Martin CT, Wang H, Bruduig GW, Scholes CP, Chan SI (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 12106-12113.
- Sweet WJ, Peterson JA (1978) *J. Bacteriol.* 133: 217-224.
- Takamiya S, Lindorfer MA, Capaldi RA (1987) *FEBS Lett.* 218: 277-282.
- Timkovich R, Cork MS, Gennis RB, Johnson PY (1985) *J. Am. Chem. Soc.* 107: 6069-6075.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- Trnka M, Peschek GA (1986) *biochem. Biophys. Res. Commun.* 136: 235-241.
- Van Gelden BF (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 118: 36-46.
- Vygodina T, Konstantinov AA (1987) *FEBS Lett.* 219: 387-392.
- Wakagi T, Yamauchi T, Oshima T, Müller M, Azzi A, Sone N (1989) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 165: 1110-1114.
- Wastyn M, Achatz A, Trnka M, Peschek GA (1987) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 149: 102-111.
- White DC, Sinclair PR (1970) *Ad. Microbiol. Phys.* 173-211.
- Webster DA, Hackett PP (1966) *J. Biol. Chem.* 241: 3308-3315.
- Webster DA, Liu CY (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 4257-4260.
- Wikström M (1977) *Nature* 266: 271-273.
- Wikström M (1988) *FEBS Lett.* 231: 247-252.
- Wikström M (1989) *Nature* 338: 776-778.
- Wikström M, Krab K (1978) *En "Energy conservation in Biological*

- Membranes (Schafer, G y KingenberG M. eds) SApronger-Verlag pp 128-139.
- Wikström M, Saraste M (1984) En Bioenergetics (Ernester, L. ed) pp 49-95. Elsevier. Amsterdam.
- Wikström M, Harmon HJ, Ingledew WJ, Chance B (1979) FEBS Lett. 65: 259-277.
- Wikström M, Krab K, Saraste M (1981) En "Cytochrome oxidase: a synthesis. Academic Press. London.
- Wilson DF, Erecinska M, Owen CS (1976) Arch. biochem. Biophys. 175: 160-172.
- Winter DB, Bruynickx WJ, Foulke FG, Grinich NP, Mason HS (1980) J. Biol. Chem. 255: 11408-11414.
- Yamanaka T, Fujii K (1980) Biochim. Biophys. Acta 591: 53-62.
- Yamanaka T, Fujii K, Kamita Y (1979) J. Biochem. 86: 821-824.
- Yamanaka, T, Kamita Y, Fujii K (1981) J. Biochem. 89: 265-2273..
- Yamasaki T, Fukumori Y, Yamanaka T (1988) J. Biochem. 103: 499-503.
- Yang TY (1982) Eur. J. Biochem. 121: 335-341.
- Yang TY, Jurtshuk P (1978a) Biochim. Biophys. Acta 502: 543-548.
- Yang TY, Jurtshuk P (1978a) Biochim. Biophys. Res. Commun. 81:1032-1039.
- Yoshida T, Fee JA (1984) J. Biol. Chem. 259: 1031-1036.
- Yoshida T, Lorence RM, Choc MG, Tarr GE, Findling KL, Fee JA (1984) J. Biol. Chem. 259: 112-123.
- Zimmerman BH, Nitsche CI, Fee JA, Rusnak F, Münk E (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85: 5779-5783.

APENDICE

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A TWO SUBUNIT
CYTOCHROME aa_3 FROM *Bacillus cereus*.

Key words: cytochrome aa_3 ; cytochrome-c oxidase; *Bacillus cereus*.

J.A. GARCIA-HORSMAN, B. BARQUERA, D.GONZALEZ-HALPHEN AND
J.E. ESCAMILLA*

Departamento de Microbiología.
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-242, C.F. 04510, D.F. México.
Tel. 550 52 15 ext 4857 and 4835.
Fax No. (5) 548 03 67

SUMMARY

CO_2 -type cytochrome oxidase (EC 1.9.3.1.) was purified to homogeneity from vegetative *Aspergillus cereus* by ion-exchange and hydroxylapatite chromatography in the presence of Triton X-100. Gel filtration analysis suggested a dimeric structure ($M_r = 172,000$); however, only a monomer of $M_r 81,000$ was detected when analyzed by non denaturing gel electrophoresis. Denaturing gel electrophoresis analysis of the protein showed the presence of two subunits (51,000 and 30,000). Atomic absorption and visible spectroscopy, showed typical CO_2 redox centers with heme *a* iron and copper in a ratio of 22 nmol and 35 ng atomg per mg protein respectively. No heme *c* was found associated with the purified enzyme in the conditions reported here. Oxidase activity was fully reconstituted by phospholipids in the presence of N,N,N',N' -tetramethyl-*p*-phenylenediamine or reduced yeast cytochrome *c* (but not horse cytochrome *c*) as electron donors. This activity was abolished by cyanide and carbon monoxide.

INTRODUCTION

The mitochondrial CO_2 oxidase is one of the best understood and the most intensively studied of the cytochrome oxidases. However, in recent years an upsurge of interest in bacterial CO_2 type cytochrome oxidase has led to its purification and characterization from several bacteria (for review see Ludwig, 1987; Poole, 1988). These studies indicate that there is close functional analogies with the more complex eukaryotic oxidase: i.e. the presence of similar redox centers, reaction mechanism and proton pumping capacity. Results reported (Ludwig, 1987) indicate that bacterial cytochromes aa_3 represent a diverse structural group of enzymes that may contain from one to three subunits, in addition to a loosely or firmly bound cytochrome c . Moreover, a covalently bound cytochrome c has been reported in thermophilic bacteria. The CO_2 enzyme of three *Eschillius* species has been purified and characterized: *E. firmus* (Mitada and Krulwich, 1984), *E. subtilis* (De Vrij et al., 1989) and *E. steuderothermophilus* (De Vrij et al., 1989). In all cases the enzyme is constituted by three subunits. However with respect to its interaction with cytochrome c , it has been found that cytochrome c is loosely bound to *E. subtilis* oxidase (De Vrij et al., 1989) and it is removed with the final step of the purification procedure (De Vrij et al., 1989). The *E. firmus* enzyme is purified with a cytochrome c , that is dissociated only under denaturing conditions (Mitada and Krulwich, 1984). On the other hand, *E. steuderothermophilus* cytochrome oxidase is purified as a three subunit enzyme with an heme c covalently attached to the intermediate molecular mass subunit (De Vrij et al., 1989).

In the *E. cereus* CO_2 enzyme we observed a subunit composition that differs from that of the *Eschillius* species mentioned above. The *E. cereus* CO_2 enzyme seems to be composed of two subunits (50,000 and 50,000 daltons, respectively), and that cytochrome c seems to be covalently attached to the CO_2 complex but lost during the purification. The spectral features and kinetic characteristics of the purified enzyme were determined.

RESULTS

Purification of cytochrome aa_3 .

The sonication of *E. cerevis* membranes and bile salts (see Experimental Procedures) yielded a pellet that contained most of the heme a , but about 50 % of the total protein (Table 1). About 80 % of the protein of bile salts treated-membranes was solubilized with 6% Triton X-100, and nearly all heme a absorbance (Table 1). Cytochromes of b and c types were solubilized (not shown). The Triton X-100 supernatant was diluted three-fold with 0.5 % Triton X-100 and loaded to a DEAE-cellulose column (Fig. 1A). Cytochrome aa_3 was retained in the column, but nearly all the cytochromes b and c were washed out with the equilibration buffer. In this step, care was taken in maintaining the Triton X-100 concentration at or over 0.5%, otherwise cytochrome b remained in the column. Cytochrome aa_3 (Peak 1 in Fig. 1A) was eluted with a 0 to 500 mM NaCl linear gradient. After this step, cytochrome aa_3 preparations were still found to be contaminated with variable quantities of cytochrome b . To eliminate this impurities and other non-heme proteins, the fractions of Peak 1 were pooled and precipitated with ammonium sulfate (40% saturation), dialyzed, and applied to a DEAE-Fiogel column (Fig. 1B) and eluted with 0 to 0.5 M NaCl gradient in the equilibration buffer. The eluted cytochrome aa_3 (Fig. 1B), was found to be spectroscopically free of cytochrome b contamination; its electrophoretic analysis revealed the presence of minor contaminants (not shown). Cytochrome aa_3 was dialyzed against 10 mM K-phosphate (pH 6.8) and absorbed to a hydroxylapatite column (Fig. 1C). The aa_3 enzyme was eluted with a 0 to 50 mM K-phosphate linear gradient.

← Figure

Table 1 summarizes the purification procedure. The starting material (2.8 g of membrane proteins) contained 0.19 (7%) of heme a mg⁻¹ protein. At the time step cytochrome aa_3 was purified 78 fold with a yield of 5%. Similar data have been reported for other bacteria aa_3 -type cytochrome oxidases (Lindig, 1977).

← Table 1

Spectral properties.

The purified enzyme showed the typical spectral properties of an a_2 -type cytochrome a_2 (Pridmore, 1987; Eschenlitz et al., 1987). Absorbance spectra for oxidized and reduced forms (trace a and b in Fig.1) showed a broad peak at 423 nm in the former case and peaks at 442 and 600 nm for the reduced enzyme. On the other hand, reduced minus oxidized spectrum (trace c in Fig.2) exhibited absorption bands at 445 and 603 nm, in agreement with a typical a_2 oxidase. *B.cereus* reduced-cytochrome a_2 reacted with CO, producing a characteristic a_2 -CO complex (trace d in Fig.2) with spectral peaks (CO-reduced minus reduced spectrum) at 430 and 590 nm and troughs at 448 and 602 nm. Similar spectral patterns were obtained when the enzyme was reduced with sodium dithionite (above) or ascorbate-TMPD (not shown). As expected, physiological substrates, such as NADH or succinate were not able to reduce the purified enzyme (not shown).

← Figure

In the purified enzyme the heme a_2 to protein ratio (nmol/mg) was 22, in agreement with that obtained in other bacterial enzymes (Ludwig, 1987).

Molecular weight and subunit composition.

The apparent molecular mass of the purified a_2 enzyme was determined under non-denaturing conditions by either gel filtration (Ultragel ACA-34 column) or PAGE in the presence of lithium lauryl sulfate at 4°C (LDS-PAGE). The gel filtration elution pattern (Fig 3A) showed a single peak (405 nm) that appeared at M_r 172,000. The elution pattern did not change by a ten times lowering of ionic strength (from 50 mM to 5 mM), or when Triton X-100 was replaced by 0.1 % G-D-lauryl maltoside or 0.05 % N-lauryl sarcosine. Thus, a minimal molecular weight of 170,000 could be estimated from gel filtration analysis.

← Figure

Polyacrylamide gel electrophoresis in presence of lithium dodecyl sulfate (PAGE-LDS) at 4°C has been used when protein-cofactor interactions need to be preserved (Delepeleire

and Chua, 1979). Cytochrome aa_3 was run in a PAGE-LDS system at 4°C. The gels were stained with either Coomassie brilliant blue (Fig. 31, lane 11) or 2,2',4,4'-tetraethyl benzidine (TEMED) (lane 1). Only one band appeared with a Mr 81,000 that bears hemoproteins as visualized as a green-yellow band (not shown), or after staining with TEMED. Comparing the M.W. determined by this method with that obtained by gel filtration, suggested that the enzyme is dimeric in solution and monomerized under conditions used in the PAGE-LDS analysis.

To gain further insight on the subunit composition of the *E. cereus* cytochrome aa_3 , PAGE analysis in the presence of SDS at room temperature was carried out. (Fig. 4). Coomassie blue staining revealed two bands at Mr 50000 and 31000. Considering that the enzyme has two subunits, a minimal molecular mass of Mr 81,000 was calculated for the purified *E. cereus* aa_3 oxidase. Noteworthy is that other purified *Bacilli* aa_3 -type oxidases, have shown a three subunit structure (De Vrij et al., 1983; De Vrij et al., 1985; Kitada and Krulwich, 1984; Eaines and Poole, 1985).

← Figure

Kinetic characterization.

The catalytic activity of the purified enzyme was fully reconstituted by addition of phospholipid or detergent (Fig. 5). Oxidase activity increased nearly linear with aslectin concentrations that went from 0 to 10 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 5); at higher concentrations the activity decreased. The effect of cardiolipin was analogous to aslectin (Fig. 5), in this case the activation reached a maximum between 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ and then decreased. *N*-D-lauryl-malteside produced maximal activation at 50 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 5); further increment up to 500 $\mu\text{g/ml}$ (not shown) did not decrease the activity. The following kinetic data were obtained in the presence of 10 μg aslectin/ml (not shown), similar results were obtained either with cardiolipin (15 $\mu\text{g/ml}$) or *N*-D-lauryl-malteside (50 $\mu\text{g/ml}$).

← Figure

The enzyme exhibited hyperbolic kinetics with oxygen (TMPL oxidase) or to reduced yeast cytochrome c_1 (Fig. 6). An apparent

Km for oxygen of $5 \mu\text{M}$, and a value of $10 \mu\text{M}$ for cytochrome c were calculated. There was a small stimulation of enzyme (i.e. 30%) activity by increasing the ionic strength from 0 to 10 mM HCl (ca. 10 mM HCl); but this same ionic strength caused a decrease in substrate affinity. Apparently there is a nonspecific activation of the enzyme by ionic strength. Inset in Fig. 6 shows that cytochrome c was not an effective electron donor to the enzyme. ← Figure 6

E. cereus cytochrome c_9 was severely inhibited by either cyanide or carbon monoxide (Fig. 7). The calculated K_i were $5 \mu\text{M}$ and 6% saturation, respectively. At saturation, both inhibitors caused complete loss of activity. ← Figure 7

DISCUSSION

The heme to protein ratio of the purified enzyme was 11 nmol per mg. Using these data and considering a minimal molecular weight of 110,000 Da (Fig. 3), this molecule has a heme to protein ratio of 1.73. This value is higher than that of the 20% fraction from PSE (Sone, 1986), *Escherichia coli* (Yoshida and Hradwisch, 1989) and *E. steuderothrophilus* (De Vrij et al., 1989), where heme to monomer ratios of 1.55, 1.66, and 1.73 respectively were reported. On the other hand, cytochrome cc_2 from *E. subtilis* (De Vrij et al., 1983) purified by affinity chromatography (cytochrome c as a ligand) exhibited a higher heme to monomer ratio of 1.88 to 1.98.

Hydrodynamic characterization of previously purified bacterial (Sone and Yanagita, 1982; Sone and Kosako, 1986) or bovine heart (Finel, 1987; Nalecz et al., 1983) cc_2 enzymes have suggested a dimeric structure as studied by gel filtration or sucrose density gradient. Our purified preparation suggested a dimeric association ($M_r = 170,000$) with gel filtration analysis (Fig. 3A) that revealed the existence of monomers ($M_r = 85,000$ each) when examined by PAGE-LDS (Fig. 4). Interestingly, the elution pattern of our preparation ($M_r = 170,000$) did not change as result of lowering ionic strength (50 mM to 5 mM KCl) or switching to other detergent, as seems to occur with the bovine (Finel, 1987) and the PSE enzyme (Sone and Kosako, 1986).

The kinetic behavior of the dimeric *E. cereus* cytochrome cc_2 toward oxygen and cytochrome c, was shown to be monophasic in a ionic strength independent manner (Fig. 6). This is also the case for cytochrome c oxidases from PSE (Nicholls and Sone, 1984; Sone and Yanagita, 1984; Sone and Kosako, 1986), *Th. thermophilus* (Yoshida and Fee, 1984), and *E. subtilis* (De Vrij and Bindings, 1987). A different behavior was observed in the *A. denitrificans* enzyme (Nalecz et al., 1983) and the eukaryotic oxidase (Nalecz et al., 1983) where a monomeric or dimeric aggregation state has been related to a monophasic or biphasic kinetic behavior respectively.

SDE-PAGE analysis (Fig. 4) revealed the presence of two

← Tab. 1

different subunits (Mr 30,000 and 31,000) in the cytochrome aa_3 from *S. cerevisiae*. The sum of the apparent molecular weights of the subunits indicated the presence of one of each subunit per active site when related to the data obtained by SDS-PAGE. There are several reports claiming a two subunit structure for aa_3 -type bacterial cytochrome oxidases, i.e. *Thermus thermophilus* (Hon-nami and Oshima, 1984; Yoshida et al., 1984), *Nitrobacter agilis* (Yamanaka et al., 1979; Yamanaka et al., 1981) *Pseudomonas* sp. (Fukumori et al., 1985) and *Erythrobacter longus* (Fukumori et al., 1987). However, it is important to consider that evolutionary close related species to *S. cerevisiae*, like *S. subtilis*, *S. firmus*, *S. staroboothenophilus*, and the thermophilic bacterium P53, all possess a cytochrome aa_3 (or aa_3) with a three subunit structure. This three subunit structure has been postulated since the larger subunits (I, II, and III) of the eukaryotic enzyme are all coded by the mitochondrial DNA (Anderson et al., 1982). Accordingly, a minimal functional unit for the bacterial oxidase has been proposed to be composed of these three subunits (Ludwig, 1987). Moreover, the *Paracoccus denitrificans* (probably related to the mitochondrial ancestor) cytochrome aa_3 oxidase was initially reported to be composed of two subunits (Ludwig and Schatz, 1980). However, later on a gene encoding the third subunit was discovered (Saraste et al., 1986; Raitio et al., 1987) subsequently an enzyme composed of three subunits was isolated (Haltia et al., 1988). However, the role of the third subunit has not been ascertained in *Paracoccus* (Haltia et al., 1988). This third subunit has been proposed to be necessary (i) for the proper conformation of the enzyme for proton pumping (Saraste et al., 1986; Haltia et al., 1988) as well as to be the case in other aa_3 type enzymes, i.e. *Thermus thermophilus* (Hon-nami and Oshima, 1984; Yoshida et al., 1984) and *Erythrobacter longus* (Fukumori et al., 1987). (ii) for the reduction of nitrite to nitric oxide by *Thermus thermophilus* (Hon-nami and Oshima, 1984; Yoshida et al., 1984). (iii) for the reduction of nitrite to nitric oxide by *Erythrobacter longus* (Fukumori et al., 1987). (iv) for the reduction of nitrite to nitric oxide by *Paracoccus denitrificans* (Ludwig and Schatz, 1980). (v) for the reduction of nitrite to nitric oxide by *Paracoccus denitrificans* (Haltia et al., 1988). Thus, it could be that the *S. cerevisiae* enzyme contains a third loosely associated subunit that is lost during the

purification procedure, probably due to the relatively high concentration of Triton X-100 used in the solubilization step in this study. Future work with *B. cereus* α_2 oxidase must include alternative purification procedures and genetic analysis to decide whether or not a third subunit is present in the functional complex.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strain and culture techniques.

A *Bacillus cereus* strain originally isolated by Andreoli et al. (1973) was used in these studies. Growth was carried out in modified G medium as described elsewhere (Escamilla et al., 1988) containing 0.2% sucrose and 0.1% yeast extract. A fermentor containing 350 liters of medium (adjusted at 30°C, 10 liters of air/min and agitation at 60 rpm) was seeded with 40 liters of an overnight culture. Cells were harvested in logarithmic growth ($A_{540} = 4.0$) in a continuous flow centrifuge and washed twice with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂ (TCM buffer).

Preparation of membrane particles.

Washed cells (150 g w/v) were mixed with 150 ml of glass beads (0.1-0.2 mm diameter) and resuspended in buffer TCM containing phenylmethylsulfonyl fluoride (15 µg/ml final concentration, added from a stock solution of 15 mg/ml in methanol) to give a final volume of 300 ml, then disrupted in a Dyno-Mill homogenizer (WAB Maschinenfabrik, Basel, Switzerland) at 4500 rpm and 4°C. Debris were eliminated by centrifugation at 8,000 X g for 10 min and membranes were recovered and washed twice with TCM buffer at 144,000 X g for 45 min.

Membrane extraction and purification procedures.

Initial procedures for membrane extraction were adapted from the method described by Sore (1974, 1986; Balinas and Paoletti, 1988). Membrane particles were resuspended in the following buffer: 1% sodium dodecylsulfate, 0.2% sodium lauryl sulfate, 0.1 M dithiothreitol, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 5-10 mg membrane protein/l. The mixture was extracted in the same way for 10 min and centrifuged at 144,000 X g for 45 min. The

pellet obtained was stirred with 100-150 ml of 6% Triton X-100, 50 mM NaCl, and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8) for 20 min and centrifuged at 144,000 X g for 30 min. The amber supernatant was diluted with 0.5% Triton X-100 (3 vol) and applied to a DEAE-cellulose (Whatman DE-52) column (20 X 3 cm) equilibrated with 0.5% Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8) (Fig.1A). Most of the cytochrome cc_p is adsorbed in this step. Column was washed (2-5 vol) with equilibration buffer followed by elution with 0-500 mM NaCl gradient in equilibration buffer. Fractions around 150 mM NaCl with heme absorption at 405 nm were collected (peak 1, Fig.1A), and brought to 40% saturation ammonium sulfate, incubated at 4°C for 30 min with stirring. Flocculent material was recovered by centrifugation at 50,000 g for 10 minutes and the upper green-brown layer was resuspended in 10 mM Tris buffer (pH 8) and dialyzed against 10 volumes of the same buffer. The dialyzed was diluted twice with 0.25% Triton X-100 and 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8) and loaded to a DEAE-BioGel (Bio-Rad DEAE Bio-gel A) column (15 X 3 cm) equilibrated with the same buffer (Fig.1B). Adsorbed cytochrome cc_p was washed with equilibration buffer (3 vol) and eluted with 0-250 mM NaCl gradient. Peak (405 nm) fractions were collected and dialyzed against water (10 vol) for 4 hours, then against 10 mM potassium phosphate (10 vol) for 10 hours (two changes). Dialyzed solution was applied to a hydroxylapatite (BDH Biochemicals) column (10 X 1 cm) then washed with 10 mM potassium phosphate, 0.25% Triton X-100 (2 vol) and eluted with 50 mM potassium phosphate containing 0.25% Triton X-100 (pH 6.8) (Fig.1C). The final preparation was obtained incubating peak fractions with copolymer beads (Bio-Beads SM-2, Bio-Rad) at 4°C for 2 hours. The supernatant was diluted to 0.5 mg protein/ml with purified ascotition to a final concentration of 10 µg/ml. All steps were made at 4°C.

Spectra and Electrophoretic g. 0.05%

Spectra were recorded on a ELN-AN-100 10-12

spectrophotometer. Samples (approx. 0.1 mg/ml) were reduced with a few grains of dithionite. Air-oxidized preparations were used as references. CO-spectra were obtained by bubbling CO (3 min) to sample reduced with dithionite and recording against a dithionite reduced reference. All spectra were recorded at room temperature. Heme c content was determined from spectra using millimolar extinction coefficient (603-630 nm) $18.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (De Vrij and Konings, 1987).

Copper and iron content were determined by atomic absorption with a Perkin-Elmer atomic absorption spectrophotometer (Model), using copper sulfate as standard.

Electrophoretic analysis.

LDS- PAGE was performed according Laemmli (1970) at 4°C using 3% acrylamide in stacking gel) and 7.5% acrylamide in separating gel at 0.1% lithium dodecyl sulfate (LDS). Samples were incubated 4-10 hours in Laemmli treatment buffer with or without 1% LDS.

SDS-PAGE method reported by Schägger and von Jagow (1987) was used. A 15% acrylamide gel was used as a separating gel overlaid by a 4% acrylamide-bisacrylamide stacking gel.

Gels were stained with Coomassie brilliant blue (G-250) or with 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (Goodhue, et al., 1986).

Enzymatic assays.

Cytochrome oxidase was assayed using ascorbate-TMPD (20 mM and 200 μM respectively) or ascorbate-yeast cytochrome c concentration indicated in legend figures as substrates. Measuring oxygen consumption with a Clark-type electrode (Oxygraph; O2) incorporated oxygen number and 8500. Electrophoretic assay was performed using recombinations of 10 μM cytochrome and reducing ascorbate changes at 850-855 nm (in 1000 $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Protein concentration was determined by Lowry method (Lowry et al., 1951) modified by Markwell (Markwell et al., 1961) using bovine serum albumin as standard.

REFERENCES

- Anderson, S., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F., and Young, I.G. (1982) Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J Mol Biol* 156:683-717.
- Andreoli, A.J., Suehiro, J., Sakiyama, D., Takemoto, J.J., Vivanco, E., Lara, J.C., and Klute, M.C. (1973) Release and recovery of forespores from *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 115:1159-1166.
- Azzi, A., Casey, R.P., and Nalecz, M.J. (1984) The effect of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide on enzymes of bioenergetic relevance. *Biochim Biophys Acta* 768:209-226.
- Baines, B.S., and Poole, R.K. (1985) Cytochrome oxidases from the thermophilic bacterium P83: solubilization with various detergents, purification and preliminary characterization. In *Microbial Gas Metabolism: Mechanistic, Metabolic, and Biotechnological aspects*. Poole, R.K., and Dow G.S. (eds). London: Academic Press, pp. 63-71.
- Delepeleire, P., and Chua, N.H. (1979) Lithium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of thylakoid membranes at 4°C: characterizations of two additional chlorophyll a-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:111-115.
- De Vrij, W., Azzi, A., and Konings, W.N. (1983) Structural and functional properties of cytochrome c oxidase from *Bacillus subtilis* W33. *Eur J Biochem* 131:97-103.
- De Vrij, W., and Konings, W.N. (1987) Kinetic characterization of cytochrome c oxidase from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* 166:551-557.
- De Vrij, W., Heyne, R.J.R., and Konings, W.N. (1989) Characterization and application of a thermostable primary standard system: Cytochrome oxidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Eur J Biochem* 170:765-770.
- Escanilla, J.E., Ramirez, R., Del Arrenal, F., Zalazar, G., and Linares, V. (1987) Expression of cytochrome oxidases in *Bacillus cereus*: effects of oxygen tension and carbon source. *J Gen Microbiol* 133:3149-3151.

Escamilla, J.E., Barquera, B., Ramirez, R., Garcia-Horsman A., and Del-Arenal, P. (1986) Role of menaquinone in inactivation and activation of the *Eschillius cereus* forespore respiratory system. *J Bacteriol* 170:5905-5912.

Finel, M. (1987) Studies on the oligomeric state of isolated cytochrome oxidase using cross-linking reagents. *Biochim Biophys Acta* 894:174-179.

Fukumori, Y., Nakayama, K., and Yamanaka, T. (1985) Cytochrome c oxidase of *Pseudomonas* AM1: purification and molecular and enzymatic properties. *J Biochem* 98:493-499.

Fukumori, Y., Watanabe, K., and Yamanaka, T. (1987) Cytochrome co_2 from the aerobic photoheterotroph *Erythrobacter longus*: purification, and enzymatic and molecular features. *J Biochem* 102:777-784.

Goodhue, C.F., Brown, K.R., and Pettigrew, G.W. (1986) Haem staining in gels, a useful tool in the study of bacterial c-type cytochromes. *Biochim Biophys Acta* 852:296-299.

Haltia, T., Puustinen, A., and Finel, M. (1988) The *Escherichia coli* cytochrome co_2 has a third subunit. *Eur J Biochem* 172:543-546.

Hori-nami, K., and Oshima, T. (1984) Purification and characterization of cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus* HB8. *Biochemistry* 23: 454-460.

Kitada, M., and Krulwich, T.A. (1984) Purification and characterization of the cytochrome oxidase from alkaliphilic *Eschillius firmus* R4B. *J Bacteriol* 158:963-968.

Laemmli, U.K. (1970) Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature* 227:680-685.

Lowry, O.H., Rosenborough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Ludwig, E. and Schatz, G. (1980) A two-subunit cytochrome c oxidase cytochrome co_2 from *Pseudomonas denitrificans*. *Food Natl Assoc Res* 104: 77:191-194.

Ludwig, E. (1987) Cytochrome oxidase in prokaryotes. *FEMS Microbiol Lett* 45:241-255.

Maxwell, M.A.K., Reed, S.M., Tolbert, N.E., and Bieber, L.L.

(1981) Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Meth. Enzymol* 72:296-303.

Nalecz, K. A., Bolli, R., and Azzi, A. (1983) Preparation of monomeric cytochrome c oxidase: its kinetics differ from those of the dimeric enzyme. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 114:822-826.

Nalecz, K. A., Bolli, R., Ludwig, B., and Azzi, A. (1985) The role of subunit III in bovine cytochrome c oxidase. Comparison between native, subunit III-depleted and *Paracoccus denitrificans* enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 808: 259-272.

Nicholls, P., and Sone, N. (1984) Kinetics of cytochrome c and TMPD oxidation by cytochrome c oxidase from the thermophilic bacterium PEB. *Biochim. Biophys. Acta* 767: 240-247.

Poole, R. K. (1983) Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer protein. *Biochim. Biophys. Acta* 726:205-243.

Raitio, M., Jalli, T., and Saraste, M. (1987) Isolation and analysis of the genes for cytochrome c-oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *EMBO J.* 6:2821-2833.

Saraste, M., Raitio, M., Jalli, T., and Peramaa, A. (1986) A gene in *Paracoccus* for subunit III of cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 206:154-156.

Schägger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:365-372.

Schägger, H., Aquila, H., and von Jagow, G. (1988) Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.* 173:201-205.

Sone, N. (1985) Cytochrome oxidase from thermophilic bacterium PEB. *Meth. Enzymol.* 126:145-153.

Sone, N., Kobayashi, T. (1988) Evidence for dimer structure of proton-pumping cytochrome oxidase: an analysis by radiation inactivation. *EMBO J.* 7:1811-1815.

Yamashita, T., Fujita, K., and Kuroda, Y. (1978) Subunits of cytochrome c-type terminal oxidases derived from *Thiobacillus thalassius* and *Paracoccus denitrificans*. *J. Biochem.* 85: 311-321.

Yamanaka, T., Kamita, Y., and Fukumori, Y. (1981) Molecular and enzymatic properties of cytochrome aa_3 -type terminal oxidase from *Nitrobacter agilis* *J Biochem* 89:265-273.

Yoshida, T., Lorence, R.M., Choc, M.G., Tarr, G.E., Findling, K.M., and Fee, J.A. (1984) Respiratory proteins from the extremely thermophilic aerobic bacterium, *Thermus thermophilus*. Purification procedures for cytochromes c_{552} , $c_{550,540}$ and c_{100} and chemical evidence for a single subunit cytochrome aa_3 . *J Biol Chem* 259:112-123

TABLE 1
PURIFICATION OF CYTOCHROME OXIDASE aa_3 FROM *E. cereus*

Step	Protein (mg)	Heme c (nmol)	Heme a/ protein (nmol/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Membranes	2,500	725	0.29	(100)	1
1. Bile salt treatment	1,200	540	0.45	74.5	1.55
2. Triton X-100 extraction	250	300	1.2	41.4	4.13
3. DEAE-Cellulose column	30	222	7.4	30.6	25.51
4. $(NH_4)_2SO_4$ precipitation	15	121	8.1	16.7	27.93
5. DEAE-Biogel column	4	78	19.5	10.8	67.24
6. Hydroxylapatite column	3	66	22.0	9.0	75.85

TABLE 11
SOME PROPERTIES OF CYTOCHROME OXIDASE aa_3 FROM *B. cereus*

Apparent K_m for oxygen ^a	5 μM
Apparent K_m for Cyt c ^a	10 μM
Maximal activity ^a	150 sec^{-1}
Heme c content ^b	22 nmol/protein mg
Cu content ^c	35 nmoles/protein mg
Cu per heme c ^{b,c}	1.76
Absorptivity coefficient ^b	13.3 $mM^{-1}cm^{-1}$

(a) Polarographically determined. (b) Spectrophotometric determined.
(c) Atomic absorption.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Purification cytochrome cc_p from *E.cereus*. Elution patterns obtained from DEAE-Cellulose column (A), DEAE Bio-gel column (B), and Hydroxylapatite column (C). Chromatographic patterns of cytochromes were monitored at 405 nm. Dashed slopes indicates salt concentration during gradient elutions: NaCl for A and B, and K-phosphate for C. The volume per fraction collected were 2.5 ml, 2 ml, and 1 ml for A, B, and C, respectively. See Experimental procedures.

Figure 2. Spectral properties of the purified cytochrome cc_p from *E.cereus*. Spectra were recorded in 1 ml cuvettes that contained 0.05 mg of oxidase protein in 50 mM HEPES buffer (pH 7.4). (a) Absolute spectrum of persulfate oxidized sample; (b) absolute spectrum of dithionite reduced sample; (c) dithionite reduced minus air oxidized; (d) dithionite reduced CO-complex minus dithionite reduced. All spectra was recorded at room temperature.

Figure 3. Molecular weight determination of cytochrome cc_p from *E.cereus*. A. Gel filtration elution pattern. A purified oxidase sample (50 mg protein in 1 ml) was loaded to an Ultrogel AcA-34 column (100x2 cm) equilibrated at 4 °C with 50 mM HEPES buffer (pH 7.4) that contained 0.05 % (β -D-lauryl) maltoside. Bovine glutamic dehydrogenase (M_r 335,000), yeast alcohol dehydrogenase (M_r 150,000), rabbit phosphorilase B (M_r 97,400), bovine hemoglobin (M_r 63,000), and egg albumin (M_r 45,000) were used as molecular weight standards. B. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis was performed as stated in Experimental Procedures section. Coomassie blue staining (Lane 1); Benzidine staining (Lane 2).

Figure 4. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of purified cytochrome cc_p from *E.cereus*. Conditions are detailed in Experimental Procedures. Lane 1: 15 μ g of purified enzyme; lane 2: 20 μ g. Bovine albumin (M_r 63,000); egg albumin (M_r 45,000); pepsin (M_r 34,700); PMSF treated trypsinogen (M_r 24,000);

β -lactoglobulin (Mr: 18,400); and lysozyme (Mr: 14,300) were used as molecular weight markers.

Figure 5. Effect of asolectin, cardiolipin and β -D-lauryl maltoside over cytochrome-c oxidase activity of purified cytochrome aa_3 from *B.cereus*. Activity was measured polarographically as stated in Experimental Procedures. Samples of 50 μ g of oxidase protein were sonicated for 30 sec in presence of the indicated concentration of compounds and the oxygen uptake was monitored in 2 ml of 50 mM HEPES buffer (pH 7.4). Asolectin (O — O); cardiolipin (● — ●); and lauryl maltoside (—).

Figure 6. Kinetics of oxygen reduction (A) and cytochrome c oxidation (B) as catalyzed by purified cytochrome aa_3 from *B.cereus*. Activity of 0.1 mg oxidase protein was polarographically measured in 50 mM HEPES buffer (pH 7.4) 10 μ g/ml asolectin in 2 ml (final volume). A: Oxygen kinetics was measured as the response to the addition of 20 mM ascorbate and 200 μ M N,N,N',N'-tetraethyl-p-phenylenediamine (TEPD). Oxygen concentrations were interpolated in the oxygen uptake trace and the slope in that points were taken to compute activity. B: Cytochrome-c oxidase activity was measured as the response to the addition of indicated concentrations of yeast cytochrome c and 20 mM ascorbate, in the absence (O — O) or presence of : 10 mM (● — ●) and 50 mM KCl (—). Hofstie plots are shown (insets).

Figure 7. Inhibition of the purified cytochrome c-oxidase activity by KCN (A) and carbon monoxide (B). Conditions were the same as stated in Fig.6 and the indicated concentrations of KCN (A) or CO saturated volumes (B) were added. Dixon plot for KCN inhibition is showed (insets).

Fig 1

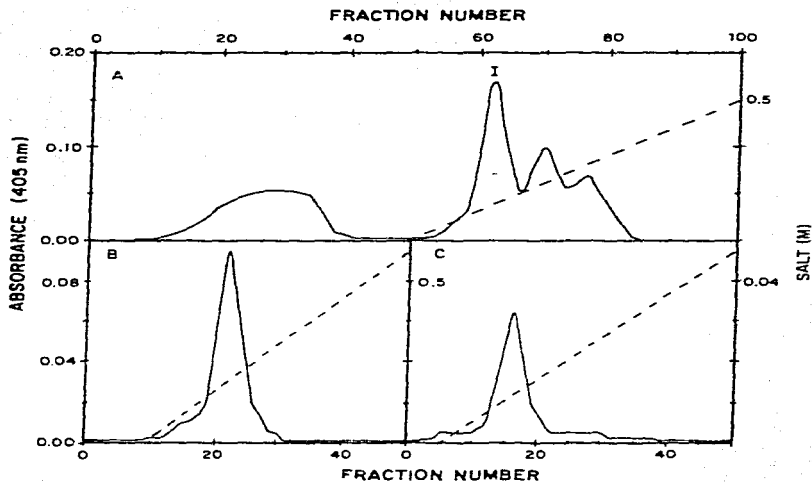
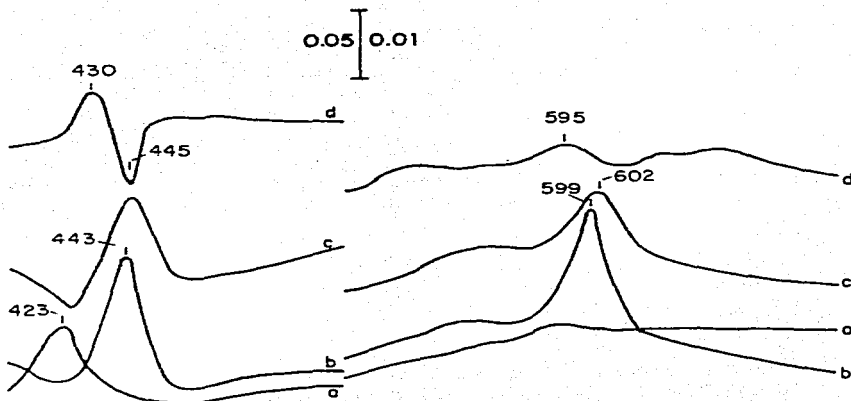


Fig 2



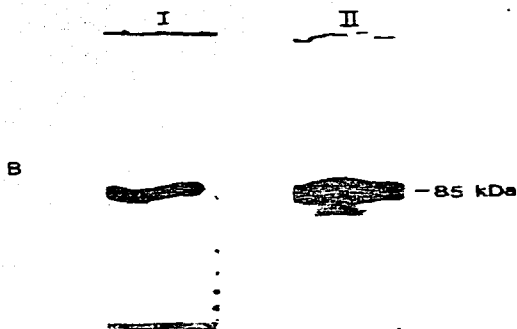
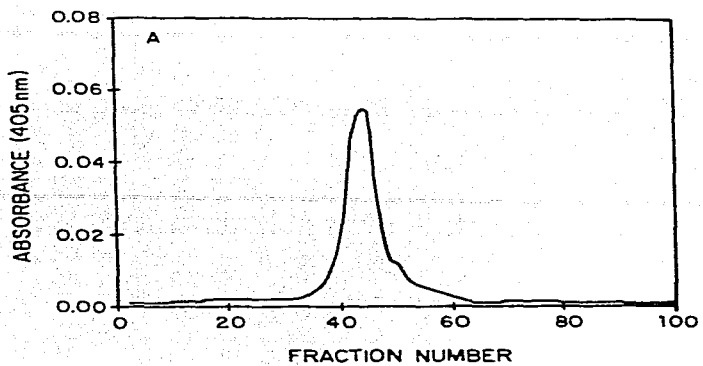


Fig 3

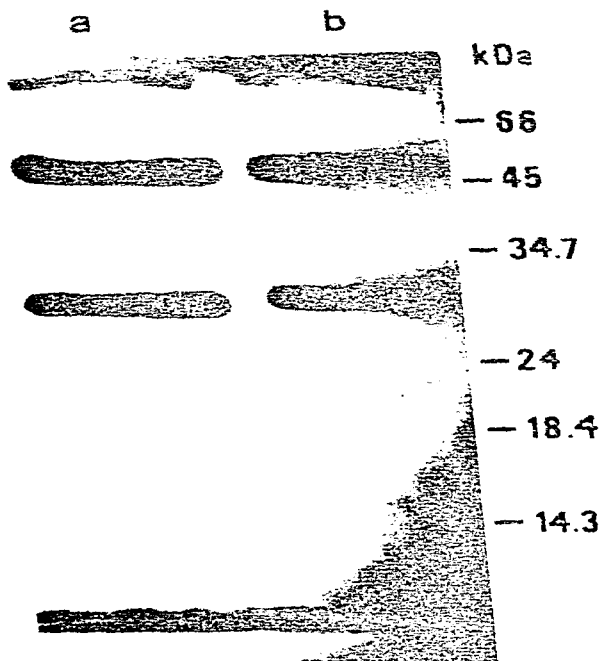


Fig 4

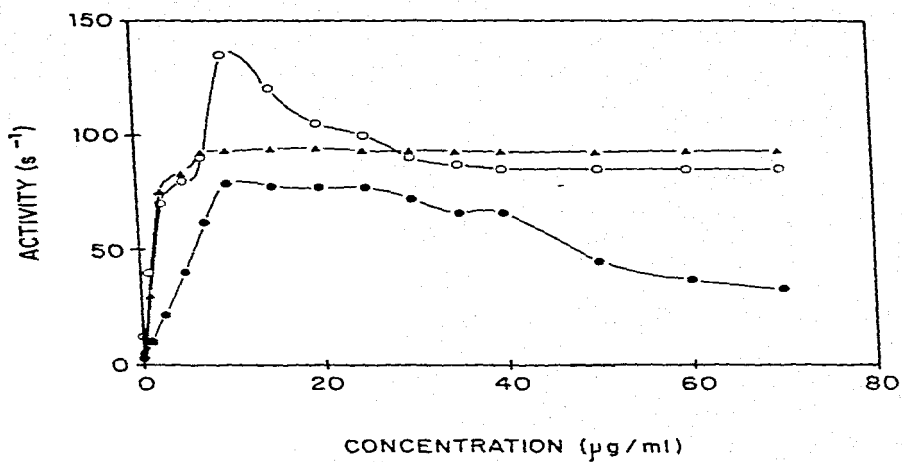


Fig 5

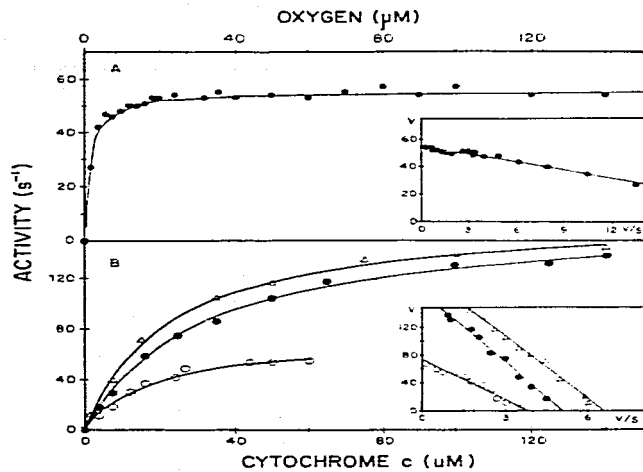


Fig 6

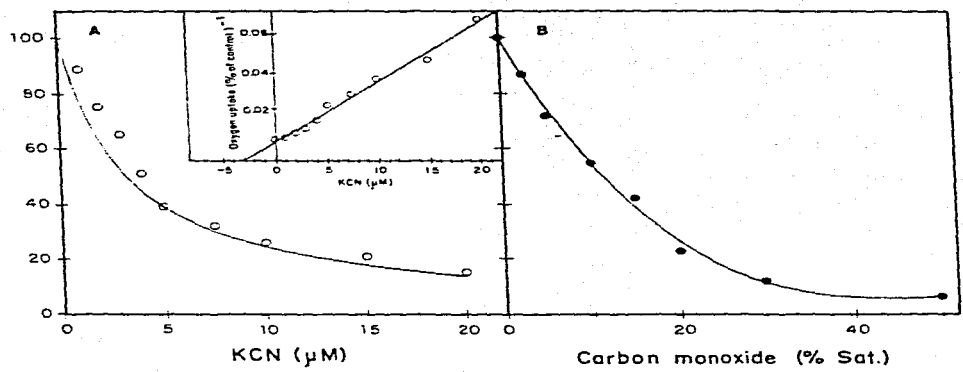


Fig 7

molecular microbiology

Cuernavaca, Mor., Mexico, 2 May 1990.

DR. EDGARDO ESCAMILLA M.
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F. Tel. (52)(5) 550-5215 (ext.4887); Fax (52)(5) 548-0387

Dear Dr. Escamilla:

Your article entitled "Purification and characterization of a two subunit cytochrome aa₃ from Bacillus cereus" by J.A. Garcia-Horsman, B. Barquera, D. González-Halphen, and J.E. Escamilla, has been reviewed by myself and three other referees. Please find enclosed the corresponding comments; they coincide in general and I think that the article can be substantially improved by simply rewriting carefully the appropriate sections.

The opinion of referees A and C is to "Reconsider after extensive revision", although most of the queries have to do with the correct presentation of the protein biochemistry data. I think this can be solved by making the indicated corrections, as well as by pointing out the limitations of your data and the experiments that should be done in the future, for another publication, that might shed other useful information.

Referee B says to "Reject", even though he expresses that "The work is solid and clearly presented..." and that "...I suggest that the work is clearly publishable and represents a foundation for further studies.". Thus, my opinion is that you should, as above, discuss how far your data allows for interpretation and how it could be further improved.

In addition, I have made several editorial comments on your typescript which should enhance its presentation.

Once you have made the appropriate corrections, please send me back the modified typescript so that I can send it to our Editor-in Chief for publication.

Yours sincerely,



DR. EDMUNDO CALVA
Member of the Editorial Board for MOLECULAR MICROBIOLOGY

TWO DIFFERENT a_3 - TYPE CYTOCHROMES CAN BE PURIFIED FROM THE
BACTERIUM *Bacillus cereus*.

J. ARTURO GARCIA-HORSMAN, BLANCA BARQUERA, DIEGO GONZALEZ-HALPHEN
AND JOSE. E. ESCAMILLA

Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular.
Universidad Nacional Autónoma de México

SUMMARY

Two aa_3 -type cytochromes could be purified from membranes of sporulating *Bacillus cereus*. One of them has been characterized (Garcia-Horsman, et al., *J. Mol. Microbiol.*, 1990)¹ and showed to be composed by two subunits (51,000 and 30,000) two hemes a , and 3 copper atoms. The other one is composed by two subunits (51,000 and 37,500) being the smaller subunit a heme- c bearing polypeptide as shown by its peroxidase activity in PAGE-SDS. These two enzymes are immunologically related by its immuno-crosreactivity. Immunological evidence indicates that the cytochrome caa_3 subunit II is composed by a cytochrome c -type peptide covalently bound to the cytochrome aa_3 subunit II.

Enzymatic activity of the two enzymes showed no gross differences: the cytochrome caa_3 seems to be slightly more active ($V_{max} = 150 \text{ sec}^{-1}$) and with less affinity for cytochrome c ($K_m = 76 \text{ } \mu\text{M}$) compared with cytochrome aa_3 (100 sec^{-1} , $10 \text{ } \mu\text{M}$, respectively).

This is the first report pointing out the presence of two different aa_3 -type cytochromes in the same membrane in bacteria.

A cytochrome aa_3 from logarithmically grown *Bacillus cereus* has been purified and characterized in this laboratory elsewhere (Garcia-Horsman, et al. 1990)¹. It was showed to be composed by two subunits (51,000 and 30,000) exhibiting high activity and the usual spectroscopy features.

An enough number of aa_3 -type cytochromes from bacteria have been purified so far (cf. Poole, 1983 and Ludwig, 1987 for review). All of them resemble the more complex mitochondrial cytochrome c oxidase either spectroscopically or functionally. However, they are structurally more simpler than the eukaryotic enzyme, because are composed of one to three subunits², compared with the seven to fiveteen subunits of the mitochondrial oxidase.

Tissue-specific isozymes of cytochrome c oxidase in higher eukaryotes has been established (Kadenbach, et al. 1982; Kadenbach, et al., 1990). Moreover, the existence of different forms of cytochrome c oxidase has been pointed out for the slime mold *Dictyostelium discoideum* enzyme (Bisson and Schivato, 1986) and suggested for the yeast one (Cumsky et al., 1985). In bacteria, it has not been reported the presence of isoforms for cytochrome c oxidase (aa_3 -type). Initially, a one-subunit *Th. thermophilus* cytochrome aa_3 had been proposed that it is differentially associated to a cytochrome c_1 (conforming c_1aa_3 oxidase) or to a cytochrome b (conforming a suggested baa_3) (Yoshida et al., 1984). However, the identity of two different oxidases was further established (Euse, et al., 1989; Zimmermann, et al., 1988). On the other hand, recently a cytochrome aa_3 from the thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*, has been purified by two different laboratories (Anemüller and Schäfer, 1989; Wakagi, et

et al., 1989) leading different structure and activity properties. No reason for considering to be the same enzyme in the two preparations have been stated (Wakagi, et al., 1989).

We report in this paper the purification of two forms of *Bacillus cereus* cytochrome aa_3 . Both are composed by two immunologically homologous subunits, one bearing a cytochrome c-moiety in subunit II but the other does not. Some properties of the caa_3 enzyme are compared with those reported for the aa_3 enzyme (Garcia-Horsman, et al., 1990)¹ and the identity of these enzymes as isoforms is discussed.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

MATERIALS

Bacillus cereus strain was isolated by Andreoli et al. (1973). Yeast extract, sucrose, antifcam A, Triton X-100, Tween 20, TMPD^a, lithium dodecyl sulfate, trizma-base, desoxiribonuclease I, tricine, lauryl maltoside, PMSF, TMBZ, Coomassie brilliant blue G-250, HEPES, formic acid and molecular weight standard Kit for SDS-PAGE were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO); DEAE cellulose was obtained from Whatman Inc. (Clifton, NJ); Protein A-gold, acrylamide, bis, SDS:DEAE-biogel, Bio-beads and hydroxylapatite were obtained from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA); Nitrocellulose membranes was obtained from Millipore (Bedford, MA). The inorganic salts and acids were of reagent grade.

GENERAL METHODS.

Growing conditions and membrane isolation. - *B. cereus* was cultured in a modified G medium as described elsewhere (Escamilla, et al., 1988) in 350 l (500 l fermentor). Cells were harvested at mid log growth (A_{540} between 3-4) or 2 hours late stationary culture, with a continuous flow centrifuge (Sharples, Pennwalt, Warminster, PA). Cell paste was washed and resuspended in TCM buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM calcium chloride, and 5mM magnesium sulfate pH 7.4) to 0.5 g of wet cells per ml. Cells were disrupted in a continuous flow homogenizer (Dync-mill, WAB Maschinenfabrik Basel, Switzerland) with 0.1 mm diameter glass beads at 4500 rpm and 4°C. Unbroken cells and debris were eliminated by centrifugation at 8,000 X g for 10 min and membranes were recovered and washed twice with TCM buffer at 144,000 X g for 45 min. Membranes were frozen until use.

Purification procedure. - Cytochrome aa_3 was purified as described elsewhere (Garcia-Horsman, et al., 1990)². Cytochrome caa_3 was purified as stated in RESULTS section.

Spectra and prosthetic groups. - Spectra were recorded in a SLM-Aminco DW-2a spectrophotometer (Silver Spring, MD). Protein samples were reduced with few grains of sodium dithionite. Air oxidized preparations were used as reference. CO-spectra were obtained by bubbling carbon monoxide for 5 min to a dithionite reduced sample. Dithionite reduced sample was used as reference. All spectra were recorded at room temperature. Heme a content was determined from spectra using a millimolar extinction coefficient of $16.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (600-630 nm) (De Vrij and Honings, 1987).

Copper and iron content were determined by atomic absorption

(Perking-Elmer) using copper sulfate and ferric chloride as standards.

Electrophoretic analysis. - Lithium dodecyl sulfate-PAGE was performed according to Laemmli (1970) at 4°C as described elsewhere (Garcia-Horsman, et al., 1990)¹. SDS-PAGE method reported by Schägger and von Jagow (1987) was used as previously described (Garcia-Horsman, et al., 1990). Protein on gels were stained with Coomassie brilliant blue (G-250) and heme c-bearing proteins were visualized by peroxidase activity assay on gels (Goodhew, et al., 1986). Acetone-acid extraction was performed as Goodhew, et al., (1986).

Antisera preparation. - Antisera against *B. cereus* cytochrome cc_p was obtained from immunizing rabbits with 1 mg of oxidase protein in Freund's complete adjuvant. Rabbits were boosted with 100 μ g of oxidase protein in 0.5% Triton X-100 at 2-monthly intervals. Rabbits were bled either before immunizing (preimmune sera) or after 4 to 8 weeks from the first injection. The blood was allowed to clot overnight and sera was recovered and centrifuged for 20 min at 1500 rpm to remove red cells. Sera was stored at -70°C in 50 μ l aliquotes.

Western Immunoblotting. - SDS-PAGE gels were blotted to nitrocellulose membranes according the method reported by Towbin, et al. (1983) adding 0.1% SDS to the Towbin transfer buffer in a Mini Transphor TE 22 chamber (Hoefer Scientific, San Francisco, CA). For protein staining nitrocellulose membrane was soaked in PBS (150 mM NaCl, 10 mM Na_2PO_4 , pH 7.4) buffer-0.3% Tween 20, containing 0.2% china ink for 2 hours at room temperature with constant shaking. Membrane was washed for 15 min with PBS-0.3% Tween. For immunostaining, blotted membranes were soaked in PBS-0.1% Tween 20 for

30 min to block non-specific binding of immunoglobulins. Then, antisera was added (to 0.1-1%) and incubation was continued for 2 hours. Nitrocellulose membranes were washed with PBS-0.1% Tween 20 for 10 min six times. Then antigen-antibody complexes were stained with Protein A-gold for 2 hours. After this, nitrocellulose membranes were washed twice with PBS for 5 min, twice with PBS-0.1% Tween 20 for 5 min and finally twice with PBS for 5 min.

Enzymatic assay. - Cytochrome oxidase was assayed polarographically with a Clark-type electrode (YSI, Yellow Spring, CA) using either ascorbate-TMPD or ascorbate-yeast cytochrome c as substrates at concentrations stated in figure legends.

Protein concentration was determined by Lowry method (Lowry, *et al.*, 1951) modified by Markwell, *et al.* (1981) using bovine serum albumin as standard.

RESULTS

Isolation of cytochrome aa_3 and caa_3 . - The cytochrome aa_3 from *E. cereus* has been purified from logarithmically growth cells (Garcia-Horsman, *et al.*, 1990)¹ in presence of Triton X-100 by ion exchange chromatography in a 6 step procedure roughly summarized as follow (Fig. 1): Bile acid treatment, 6% Triton X-100, extraction. DEAE-cellulose chromatography, ammonium sulfate fractionation. DEAE BioGel chromatography and hydroxylapatite chromatography. Cytochrome aa_3 is isolated from other cytochromes mainly in the first fractionation step on DEAE-cellulose. Here almost all of heme a absorption was bound to the column while other heme absorption pass through. When membranes from sporulating cells (2 hours after stationary growth step) had

reached) were used as starting material for obtain cyt a_3 . We noted that some of the heme a absorption (approx 30%) passes through first DEAE-Cellulose fractionation, and this behavior was reproducible, indicating the presence of heme a bearing proteins with low affinity for DEAE. Then, the unadsorbed heme a -containing material was diluted three fold and applied to a second DEAE Bio-gel column (2 X 20 cm) equilibrated with 0.25% Triton X-100, 25 mM Tris-HCl (pH 8). We observed that almost all of the heme a absorption was bound to the column. A cytochrome a_3 containing peak was further eluted using a 0 to 250 mM NaCl linear gradient in the equilibration buffer. Spectroscopic analysis of this fraction revealed mainly the presence of peaks attributable to a -type cytochromes (445 and 605 nm), and cytochrome c (417, 423 and 550 nm) and minor quantities of cyt b (Fig. 2Aa). It seemed that one part of the cytochrome a_3 was being co-purified with the cytochrome c . However, changing Triton X-100 concentration or ionic strength was not enough to dissociate cytochrome c from cyt a_3 in this fraction. Furthermore, to substantiate whether or not this complex constituted a high affinity association between cytochrome a_3 and cytochrome c , the material of this preparation was subject to the first three steps of the purification procedure. If it had been a simple association we would have obtained again two different populations: one that bound to DEAE-cellulose free of cytochrome c and other with low affinity to DEAE-cellulose but associated with cytochrome c . Accordingly, the a_3 fraction was brought to a 40% ammonium sulfate, then the flocculent material was dissolved in the bile acid buffer and sonicated for 10 min (1 min pulses) in an ice bath. Subsequently, material was dialyzed by ultrafiltration and fractionated with

ammonium sulfate (55%). The supernatant was redissolved in 5% Triton X-100 buffer, incubated 20 min and diluted three-fold with 0.5 % Triton X-100. The diluted solution was applied to DEAE-cellulose. However, almost all of heme c absorption passed through the column. Further three-fold dilution of eluted material allowed to the heme c containing protein to bind to DEAE-biogel, that was eluted with a 0 to 250 mM NaCl linear gradient. The spectral analysis of this fraction revealed the presence of heme a and heme c as it had been obtained in the first fractionation (Fig. 2Ab). This results suggest the presence of a cytochrome aa_3 with a cytochrome c tightly bound.

Purification of cytochrome caa_3 . - The caa_3 complex was purified following a similar protocol used for the purification of cytochrome aa_3 (Fig. 1) that is, after DEAE-biogel chromatography, caa_3 complex was brought to 40% saturation ammonium sulfate and incubated for 30 min at 4°C. After centrifugation at 50,000 X g for 10 min, the upper greenish layer was either resuspended in and dialyzed against 10 mM Tris buffer (pH 8) (10 vol, 2 changes) and against 10 mM Tris (pH 8) that contained 0.25% Triton X-100. The material was loaded to a DEAE-Sephadex column (1 X 10 cm) (10 mM Tris, 0.25% Triton X-100, pH 8). The bound caa_3 complex was washed (2 vol) with equilibration buffer and eluted with a 0 to 150 mM NaCl linear gradient. For the pooled fractions, Tris was changed by 10 mM potassium phosphate (pH 6.8), by dialysis and loaded to a hydroxylapatite column (1 X 10 cm) 10 mM potassium phosphate, pH 6.8. Cytochrome caa_3 was eluted with 50 mM potassium phosphate, 0.25% Triton X-100 (pH 6.8). Peak fractions were incubated with Eio-beads for 2 hours at 4°C. Supernatant was diluted to 0.5 mg protein/ml with purified asolectin to a final

concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$. All steps were performed at 4°C (Table 1).

Spectral characterization. - Purified cytochrome aa_3 and caa_3 were spectrophotometrically analyzed (Fig. 2B). Cytochrome aa_3 showed spectral features as described elsewhere (Garcia-Horsman, et al., 1990): i.e. an α peak at 603 nm and a peak at 444 nm in the Soret region (Fig. 2Bb). The heme c containing cytochrome aa_3 showed peaks at 603 and 445 nm, corresponding to an α -type cytochrome and peaks centered at 417, 523 and 550 nm attributable to a c-type cytochrome (Fig. 2Ba). It can be observed a symmetrical peak at 550 nm that indicated the absence of a b-type cytochrome. Using absorption coefficients of 16.6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (603-630 nm) for heme α and 19 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (550-540 nm) for heme c a ratio heme α to heme c of nearly 1:1 was calculated (this ratio did not vary appreciably during last steps of the purified protocol; see Table 1). To support these data, an acid-acetone extraction of the purified caa_3 complex was performed. The acid-acetone precipitate was redissolved in 10 $\mu\text{g/ml}$ asclectin, 50 mM HEPES (pH 7.5) and the spectrum was recorded (Fig 2C). It can be observed peaks at 417, 523 and 550 nm corresponding to a cytochromec. Piridin hemochromogens of the acid-acetone precipitation showed only the presence of heme α (not shown). Carbon monoxide spectra of the caa_3 complex were recorded (Fig. 2D). The CD-reduced minus oxidized differential spectrum (2Db) showed a shift of the α peak to 599 nm and the decreased in the height of the Soret band in nearly 50% as compared with reduced minus oxidized differential spectrum (Fig. 2Dc). This indicated the presence of heme α and aa_3 . The CD-reduced minus reduced spectrum revealed the classical features of an aa_3 -type cytochrome (430,

598 nm peaks, and 446, 610 nm troughs).

Molecular weight and subunits structure.- As it has been reported (Garcia-Horsman, et al., 1990)¹ *B.cereus* cytochrome aa_3 showed a single band of Mr= 85,000 in LDS-PAGE at 4°C (Fig. 3 lane A). Accordingly, cytochrome caa_3 was subject to LDS-PAGE at 4°C. Cytochrome caa_3 ran as a single band that showed peroxidase activity (Fig. 3 lanes B and D) and TMPD oxidase activity (not shown). Cytochrome caa_3 migrated as a single Mr= 92,000 protein (Fig.3. lanes A and D) and not as a 85,000 band plus other band corresponding to the cytochrome c. This result suggested that cytochrome aa_3 and cytochrome caa_3 are different proteins.

To know about the subunit structure of the caa_3 complex, the purified complex was run in SDS-PAGE (Fig. 4). Both, the caa_3 complex as purified (Fig. 4, lane C) or the acid-acetone precipitated (not shown) redissolved in SDS buffer, gave a two subunit pattern. The larger subunit had a Mr= 51,000 the same as did the larger subunit of the cytochrome aa_3 , while the smaller caa_3 subunit (* in Fig. 4) migrated as a 37,500 Mr polypeptide, heavier than cytochrome aa_3 subunit II (30,000) (lanes A and B). The 37,500 band showed peroxidase activity when assayed with TMBZ (lane G). Yeast cytochrome c was used a positive control (lane H) and molecular weights standards as a negative control (lane I). These data indicates that cytochrome caa_3 is composed by two subunits, one of 50,000 Mr and other smaller of 37,500 Mr that bears heme c.

Immunological characterization.- The similarity in electrophoretic mobility between the two enzymes (aa_3 and caa_3) larger subunits is indicative that could be the same polypeptide. Accordingly, an immunoblotting analysis was performed (Fig.5).

Samples of semi-purified cytochrome aa_3 and cytochrome c_{aa_3} were run in SDS-PAGE (Fig. 5.1). Proteins separated in gel were transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was immunostained with *S. cerevisiae* cytochrome aa_3 anti-sera (Fig. 5.2). Protein-A-gold was used for visualization of antigen-antibody complex bands. As can be observed in immunoblotted membranes, both subunits of cytochrome c_{aa_3} (Fig.5. lane d) immunologically cross-reacted with cytochrome aa_3 antisera revealing homology between two enzymes. Furthermore, bovine cytochrome oxidase cross-reacted with cyt aa_3 antisera (Fig. 5.2, lane b) as almost all bacterial aa_3 -type oxidases. Besides, the c_{aa_3} complex was challenged to antibodies against bovine cytochrome c (Fig. 5.3) and cytochrome c_1 (not shown) in order to identify cytochrome c-subunit II of the complex. In the Fig.5.3 are shown the western immunoblots. The subunit II of the c_{aa_3} complex cross-reacted against cytochrome c antiserum (lane d) but not with cytochrome c_1 antiserum (not shown). These data suggest a fusion protein between subunit II and a cytochrome c as it has been reported for cytochrome c_{aa_3} from *Thermus thermophilus* (Buse, et al., 1989).

Activity measurements. - The c_{aa_3} complex was able to oxidize TMPD or yeast ferrocyclochrome c. the kinetic behavior was measured in response to reductor additions as showed in Fig.6A. The enzyme showed a simple kinetics in function of reductant (TMPD or ferrocyclochrome c) or oxygen (Fig. 6A) and the activity was sensitive to carbon monoxide (Fig.6B) as does cytochrome aa_3 . Calculations reveals Km values around 20 μ M, 60 μ M and 76 μ M for O_2 , TMPD and yeast cytochrome c respectively.

DISCUSSION

Two forms of the two subunit cytochrome aa_3 were isolated and purified from *B. cereus*. One of those (Mr= 85,000) has been already characterized (Garcia-Horsman, et al., 1990)¹ and possesses two polypeptides (51,000 and 30,000) having two c hemes and approximately 3 Cu atoms as prosthetic groups. It seems that the enzyme is expressed all along cell growing (TABLE II). The other one, (92,000) referred as caa_3 complex, seems to be composed by two subunits, one has a Mr= 51,000 and the second bearing cyt c with a Mr= 37,500. Both subunits are structurally and immunologically related to two subunits from cytochrome aa_3 (Fig.5). It seems that the two enzymes are differentially expressed in the growth (Table II). The aa_3 -type cytochrome is expressed during all steps of growth while the caa_3 complex become to be expressed at the beginning of sporulating stage, when the levels of respiratory activities are shown to be over-expressed (Escamilla and Benito, 1984). As mentioned both enzymes showed a two subunit structure (Garcia-Horsman, et al., 1990; this paper). For both enzymes subunit i weights approximately 51,000 as showed by SDS-PAGE meanwhile, the caa_3 complex subunit II seems to be heavier than aa_3 subunit II (37,500 and 30,000 respectively) possessing a cytochrome c-moiety as showed either spectroscopically (Fig.2) or by its peroxidase activity in gels (Fig.4). Both enzymes are closely related as was suggested by anti-cytochrome aa_3 binding to both subunits of the caa_3 complex (Fig.5.2). Furthermore, the heme c bearing subunit blotted with bovine cytochrome c antiserum (Fig. 5.3). These data suggest that both cytochromes oxidases are immunologically homologous and that one of them posses a subunit

11 protein fusion between cyt aa_3 subunit 11 and a cytochrome *c* polypeptide. The presence of two similar oxidases has been reported in *Thermus thermophilus* a caa_3 complex (Yoshida, et al., 1984; Yoshida and Fee, 1984; Buse, et al., 1989) and a ba_3 type oxidase (Einarsdóttir, et al., 1989; Zimmermann, et al., 1988). The *Th. thermophilus* caa_3 complex, that is very similar to *B. cereus* one, is a two subunit enzyme and there are evidences that the small subunit 11 is a cytochrome *c*-subunit 11 fused protein (Buse, et al., 1989) while cytochrome ba_3 has only one subunit (Zimmermann, et al., 1988). It seems that prosthetic groups (hemes and Cu atoms) are accommodated in the same way in both enzymes. On the other hand, in the archebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*, two preparations of the aa_3 -type cytochrome *c* oxidase have been isolated separately by two research groups (Anemüller and Schäfer, 1989; Wakagi, et al., 1989) having different substrate specificity to each other, however, evidences that suggest that both are the same enzyme have not been provided yet. In the case of *B. cereus* oxidases, data suggest the presence of two forms of aa_3 -type cytochrome oxidase. The immunological cross-reaction of the two forms lead think in equal or similar protein structure with a cytochrome *c* attachment to the caa_3 complex. However, protein sequencing and/or genetic analysis are required to conclusively discuss about structure relations and genetic origin.

Looking for an explanation of the appearance of a second aa_3 -type oxidase at the beginning of sporulating stage, activity measures were performed. It was expected to find the caa_3 more active or with an enhanced substrate affinity, in some way to explain the 3 to 10 increment in respiratory activity of sporulating cell membranes compared with vegetative cell membranes

(Escamilla and Benito, 1984). However, when the kinetic behavior of the caa_3 complex was assayed, no gross differences were observed in comparison with aa_3 -type oxidase. Table IV summarizes kinetic constants between the two enzymes. As can be observed, the activity is slightly higher for the caa_3 complex and its substrates affinities are slightly lower. Moreover, in search of different enzymatic properties, sensitivity to inhibitors was measured. However, the two forms are inhibited in the same way by carbon monoxide or cyanide (not shown). It can be suggested that cell differentiation might lead to the differential expression of the gene(s) for the same or different subunits resulting in the assembly of two oxidases with different enzymatic properties. However, although no differences could be found in the electron transfer activity of the two purified oxidase forms it is important to note that the physiological donor to the enzyme is not known. Furthermore, the modulation of the enzyme activity could occur within intact membranes via interactions with certain molecules, which are lacking in the purified preparations. Alternatively, the difference could involve other oxidase functions (e.g. H^+ -pumping) that has not been assayed yet. Accordingly, either molecular genetics or more biochemical assays have to be carried on to establish the presence of the two enzymes. It seems that it is more likely to refer these two enzymes as different oxidases, but regarding to their immunological homology and prosthetic group similarities, it can be suggested to be isoforms. On the other hand, in eukaryotic organisms it has been reported the existence of tissue-specific isozymes for cytochrome oxidase, for higher eukaryotic species on one side and physiological condition differential expression of

isoforms for several unicellular eukaryotes. In all of them, differences are regarded to nuclear coded subunits which have been suggested as modifiers or regulatory peptides. Whereas, mitochondrial subunits are unchanged. Any way, it can assumed that after branching between eubacteria and mitochondrial lines, eubacteria develop other types of regulation that have to be searched. However, it is not common that the same bacteria expresses two α_3 -type oxidases. Only in *S. acidocaldarius* it has been suggested before. Whatsoever, the reasons to express two forms of the α_3 -type oxidase remain to be answered.

REFERENCES

- Andreoli, A.J., Suehiro, J., Sakiyama, D., Takemoto, J.U., Vivanco, E., Lara, J.C., & Klute, M.C. (1973) *J. Bacteriol.* 115, 1159-1166.
- Anemüller, S., & Schäfer, G. (1989) *FEBS Lett.* 244, 451-455.
- Bisson, R., & Shivato, G. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 4373-4376.
- Buse, G., Hensel, S., & Fee, J.A. (1989) *Eur. J. Biochem.* 131, 97-103.
- Cumsky, M.G., Ko, C., Trueblood, C.E., & Poyton, R. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 2235-2239.
- De Vrij, W., & Konings, W.N. (1987) *Eur. J. Biochem.* 166, 581-587.
- Einarsdóttir, D., Killough, P.M., Fee, J.A., & Woodruff, W.H. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 2405-2408.
- Escamilla, J.E., & Benito, M.C. (1984) *J. Bacteriol.* 160, 473-477.
- Escamilla, J.E., Barquera, B., Ramirez, R., Garcia-Horsman, A., & Del Arenal, P. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 5908-5912.
- Goodhew, C.F., Brown, K.R., & Pettigrew, G.W. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 852, 288-294.
- Kadenbach, B., Hartmann, R., Blanville, R., & Buse, G. (1982) *FEBS Lett.* 138, 236-238.
- Kadenbach, B., Stroh, A., Becker, A., Eckerskorn, C., & Lottspeich, F. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 105, 368-372.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- Lowry, D.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Ludwig, B. (1987) *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 41-55.

Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Tolbert, N.E., & Bieber, L.L.
(1981) *Meth. Enzymol.* 72, 269-303.

Poole, R.K. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 726, 205-243.

Schägger, H., & von Jagow, G. (1987) *Anal. Biochem.* 166,
368-379.

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979) *Proc. Natl.
Acad. Sci. USA* 76, 3116-3120.

Wakagi, T., Yamaguchi, T., Oshima, T., Müller, M., Azzi, A., &
Sone, N. (1989) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 165, 1110-1114.

Yoshida, T., & Fee, J.A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259,
1031-1036.

Yoshida, T., Lorence, R.M., Choc, M.G., Tarr, G.E., Findling,
K.L., & Fee, J.A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 112-123.

Zimmerman, B.H., Nitsche, C.I., Fee, J.A., Ruswak, F., &
Münk, E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5779-5783.

FOOTNOTES

¹ García-Horsman, J.A., Barquera, B., González-Halphen, D., & Escamilla, J.E. (1990) *Mol Microbiol.* submitted.

² Recently it has been proposed a fourth subunit of cytochrome oxidase from thermophilic bacterium PS3 (Gai, W.-Z., Sun, S.-M., Sone, N., & Chan, S.H.P. (1990) *Biophysical Society 34th Annual Meeting. Biophys. J.* 57, No.2, Part 2, 557a)

³ The abbreviation used are: TMPD, N, N, N', N', tetramethyl p-phenylene diamine; PMSF, phenyl methyl sulfonyl fluoride; TMBZ, N, N, N', N', tetramethyl benzidine; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid; SDS, sodium dodecyl sulfate; LDS, lithium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.

LEGENDS FOR FIGURES

FIGURE 1. Scheme of the purification method used for obtaining cytochromes aa_3 and caa_3 from *S.cereus* membranes. Details are stated in the text. a, b, c indicates heme a, b, and c containing fraction; aa_3 , cytochrome aa_3 containing fraction; caa_3 , cytochrome caa_3 containing fraction; *, cytochrome caa_3 containing fraction was purified by analogous set of steps.

FIGURE 2. Spectra of cytochrome caa_3 containing fractions (A), purified cytochrome caa_3 (B,D), and acetone extracted cytochrome caa_3 (C). A. Reduced minus oxidized spectra of the cytochrome caa_3 as isolated (a) (see text), and the cytochrome caa_3 as isolated and subjected to the first three steps of the purification process (b). Approximately 0.2 mg of protein was suspended in 1 ml 50 mM Tris (pH 8), samples were reduced with dithionite and references were oxidized with air. B. Reduced minus oxidized differential spectra of purified cytochrome caa_3 (a), and cytochrome aa_3 (b). 0.1 mg of protein per cell were used. C. Reduced minus oxidized spectrum of cytochrome caa_3 acid-acetone extract. Approximately 0.5 mg of cytochrome caa_3 (1 ml) was precipitated with 0.01 M HCl in acetone (to 10 vol) and incubated by 30 min, the suspension was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, the pellet was redissolved in 0.5% Triton X-100, 250 mM Tris-HCl (pH 8) ready for spectral analysis. D. reduced minus oxidized (a) and CO-reduced minus oxidized (b) differential spectra of cytochrome caa_3 . Dashed lines indicate the CO-reduced minus reduced differential spectra (a). 0.1 mg of cytochrome caa_3 was used. CO complex was formed by bubbling carbon monoxide in a dithionite reduced sample for 2 min.

All spectra were recorded at room temperature.

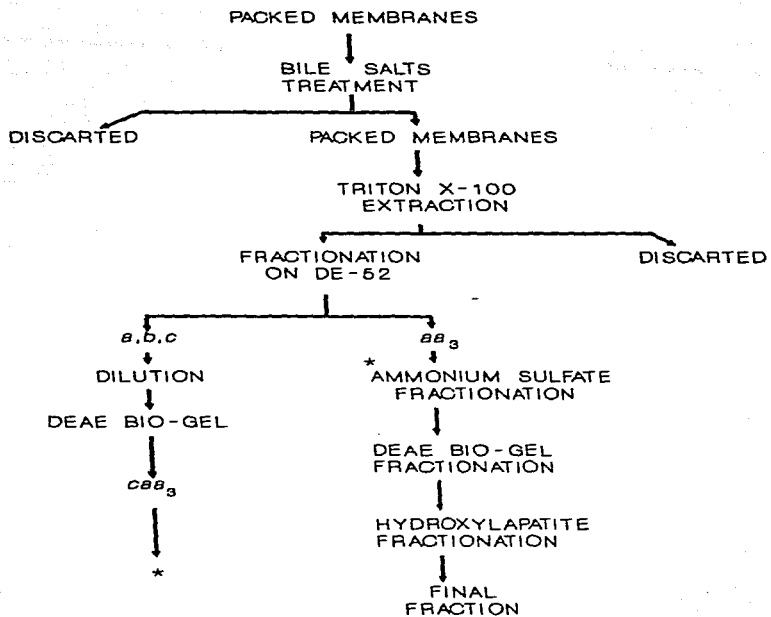
FIGURE 3. LDS-PAGE at 4°C of purified cytochrome aa_3 (lanes A and C) and cytochrome caa_3 (lanes B and D). Electrophoresis was performed as stated in *Experimental Methods*. Approximately 25 μ g of oxidase protein were mixed with Laemmli sample buffer, containing 0.1% LDS, immediately before electrophoretic run. Gels were stained with Coomassie blue (I) or by peroxidase activity (II).

FIGURE 4. SDS-PAGE of purified cytochrome aa_3 (lanes A, B, and F), and cytochrome caa_3 (lanes C and G). Approximately 30 μ g of vegetative (lane A) or sporulating (lanes B and F) cytochrome aa_3 and cytochrome caa_3 (lanes C and G) were electrophorated. 10 μ g horse heart cytochrome c (lanes D and H) was used as standard, as such as 15 μ g of a mixture of lysozyme (14,300), β -lactoglobulin (18,400), trypsinogen (24,000), pepsin (34,700), egg albumin (45,000), and bovine albumin (66,000) (lanes E and I). Gels were stained for protein (lanes A to D) or for peroxidase activity (lanes F to I). * indicates the c-bearing band of the cytochrome caa_3 .

FIGURE 5. Western immunoblotting of cytochrome caa_3 (lane d) and cytochrome aa_3 (lane e) against *B. cereus* cytochrome aa_3 antiserum (2) and bovine cytochrome c antiserum (3). SDS-PAGE (1) of semi-purified samples (25 μ g) of cytochrome caa_3 (lane D) and cytochrome aa_3 (lane E), bovine cytochrome c-oxidase (lane b), horse heart cytochrome c (lane c) and molecular weight markers (lane a) (see Fig. 4 legend). Blotted membranes immunostained with

B. cereus cytochrome aa_3 rabbit antiserum (2) and bovine cytochrome *c* rabbit antiserum (3). The positions of subunit I (\rightarrow), subunit II (\rightarrow), of either *B. cereus* cytochrome caa_3 and cytochrome aa_3 , bovine cytochrome *c* (*), and subunit I of bovine cytochrome *c*-oxidase>(* \rightarrow) are indicated.

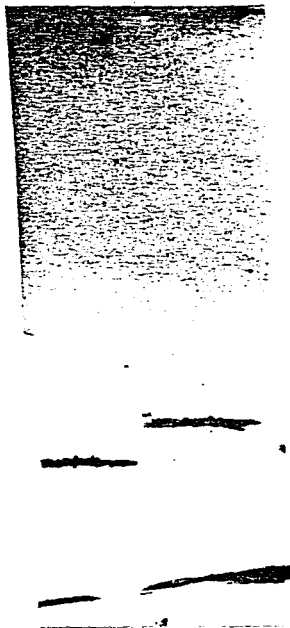
FIGURE 6. Hoffstie plots of the kinetics of cytochrome caa_3 and cytochrome aa_3 (A) and carbon monoxide inhibition pattern of both enzymes (B). Activity was measured polarographically in 2 ml cuvette (10 μ g of oxidase protein) as stated in *Experimental Procedures*, varying oxygen concentration (in 150 μ M cytochrome *c* plus 500 μ M ascorbate) () or yeast cytochrome *c* concentration (in 500 μ M ascorbate, 90-100 air saturated buffer) () for cytochrome aa_3 () and cytochrome caa_3 (). Carbon monoxide inhibition was measured recording oxygen uptake of cytochrome caa_3 (, 130 seg^{-1} control activity) and cytochrome aa_3 (, 87 seg^{-1} control activity) in response of 150 μ M cytochrome *c* and 500 μ M ascorbate, adding varying volumes of CO-saturated measure buffer (50 mM HEPES, 50 mM KCl pH 7.4) to a final volume of 2 ml. The initial slope recorded within 30 sec was taken for calculations of the activity for cytochrome *c* and inhibition kinetics. The slope of each oxygen concentration measured was taken for the oxygen kinetics calculations. The assays were performed at 30°C.



I

A

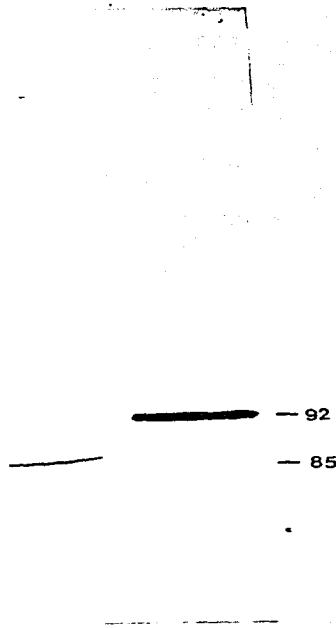
B



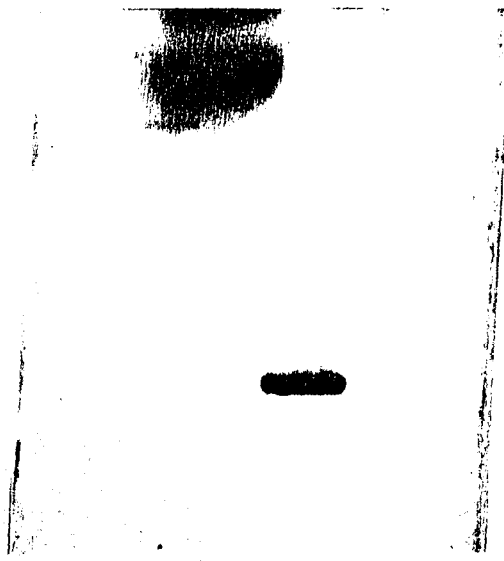
II

C

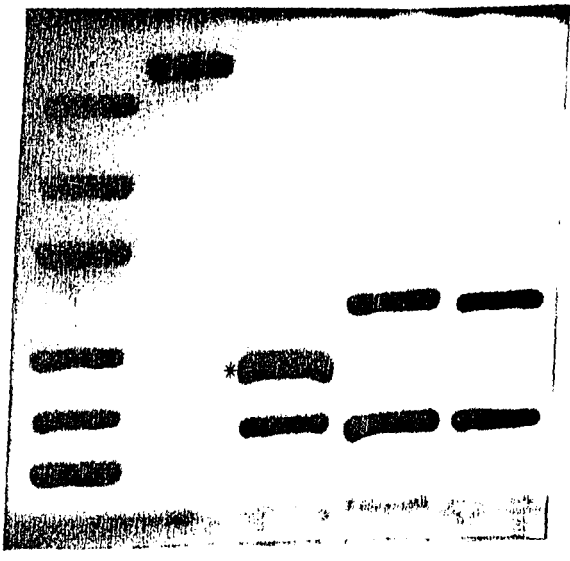
D



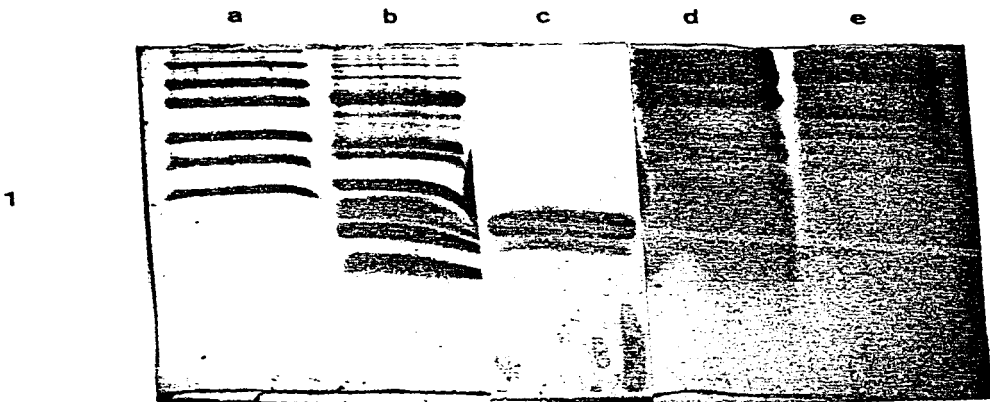
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100



I H G F

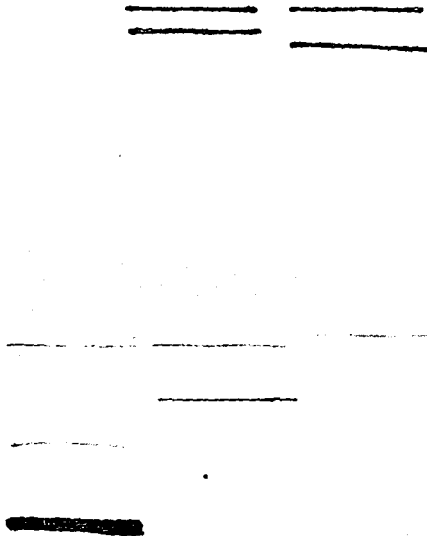


E D C B A



2

3



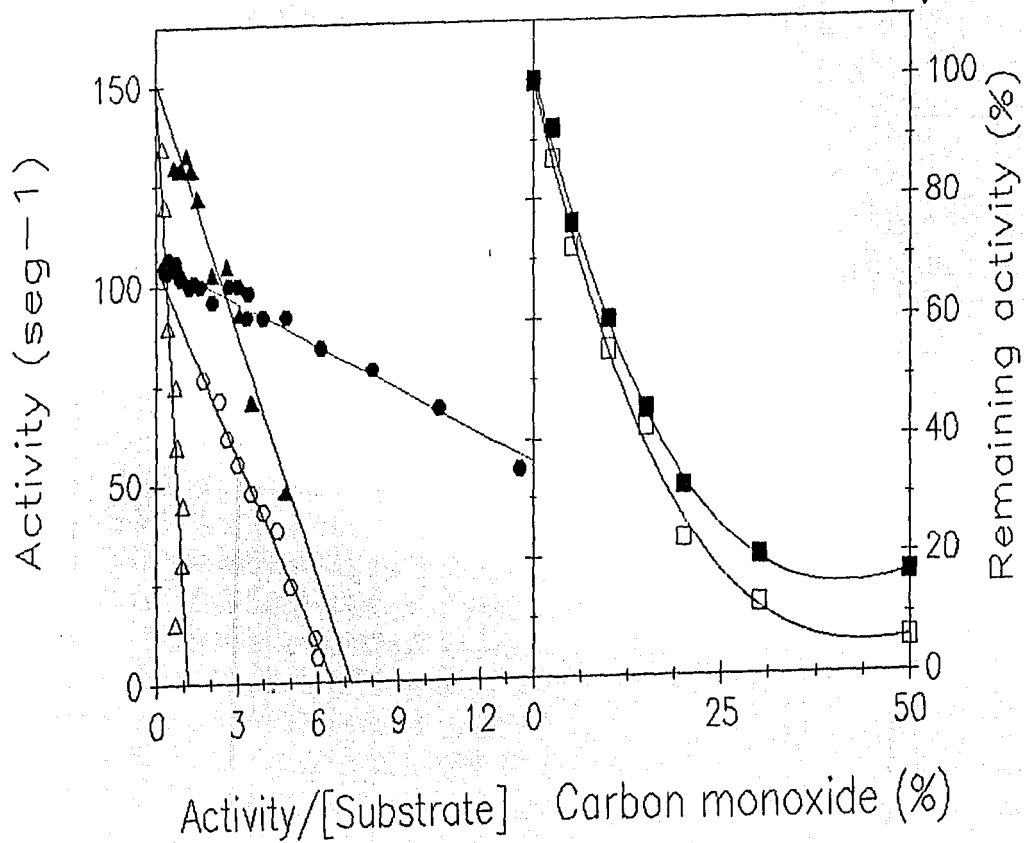


TABLE I. Purification of Cytochrome *caa*₃ from *Bacillus cereus*

Step	Protein (mg)	Heme a (nmol)	Heme a/protein (nmol/mg)	Yield (%)	Purification (fold)	Ratio a:c
Membranes	3,600	1044	0.29	(100)	1	0.59
1. Bile salt treatment	1,740	783	0.45	75	1.55	0.61
2. Triton X-100 extract	362	434.4	1.2	41	4.13	0.59
3. DEAE-Cellulose fractionation	110	231	2.1	22	7.24	0.5
4. Deae Bio-Gel fractionation	30	174	5.8	17	20	0.8
5. Ammonium sulfate fractionation	16	120	7.5	11	26	0.85
6. DEAE-Sephadex fractionation	8	104	13	9.9	45	0.95
7. Hydroxylapatite fractionation	2.4	48	20	5	69	1.1

TABLE 11. Expression of cytochrome aa_3 and cytochrome caa_3 in vegetative and sporulating *Bacillus cereus*.⁽¹⁾

	⁽²⁾ Cytochrome aa_3	⁽²⁾ Cytochrome caa_3
Vegetative cells ⁽³⁾	12.2	0.1
Sporulating cells ⁽⁴⁾	20.5	9.18

⁽¹⁾ Membranes of vegetative or sporulating cells were subjected to purification procedure up to isolation of the cytochrome aa_3 and cytochrome caa_3 were reached (see text).

⁽²⁾ Spectrophotometric determined heme α (nmol).

⁽³⁾ Cells harvested at mid-log stage.

⁽⁴⁾ Cells harvested 2 hours after stationary stage was reached.

TABLE III. Heme and metal components of *Bacillus cereus* cytochrome aa_3 and cytochrome caa_3 .

	Cytochrome aa_3	Cytochrome caa_3
Heme a (nmol/mg) ⁽¹⁾	22	20
Heme c (nmol/mg) ⁽¹⁾	—	13
Copper ⁽²⁾	35	30
Iron:Copper ^(1,2)	1.68	1.25
$\epsilon_{601-690}$ (mM ⁻¹ cm ⁻¹) ⁽³⁾	13.3	10.5
$\epsilon_{550-540}$ (mM ⁻¹ cm ⁻¹) ⁽³⁾	—	15.2

⁽¹⁾ From spectra. ⁽²⁾ Atomic absorption. ⁽³⁾ Assuming Mr of 85,000 and 92,000 for cyt aa_3 and caa_3 respectively.

TABLE IV. Kinetic constants of *Bacillus cereus* cytochrome aa_3 and cytochrome caa_3 .

	Cytochrome aa_3	Cytochrome caa_3
K_m (μM)		
Oxygen	5	20
Cytochrome c	10	76
TMPD	31	60
V_{max} (seg^{-1})	100	150