

11281

3  
29



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

PROPIEDADES MOLECULARES Y CATALITICAS  
DE LA CITOCROMO OXIDASA bo' en *Bacillus cereus*.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
P R E S E N T A :  
M. en C. MARTHA LUCINDA CONTRERAS ZENTELLA

MEXICO, D. F.

272825

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*Con mi agradecimiento para:*

*Mi comité tutorial*

*Dr. Edgardo Escamilla  
Dr. Edmundo Chávez  
Dr. Salvador Uribe*

*Mi jurado*

*Dra. Marieta Tuena  
Dr. Diego González  
Dr. Edgardo Escamilla  
Dr. Mario Soberón  
Dr. Rafael Moreno  
Dr. Federico Martínez  
Dr. Alfonso Carábez*

*A los Dr. Armando Gómez Poyou,  
Marieta Tuena y Adolfo García Saenz por su  
apoyo a lo largo de mi carrera académica.*

*GRACIAS*

*A quien ha iluminado mi vida:*

*Martha Gabriela.*

*A mi familia:*

*Mis padres: Martha y Manuel*

*Mis hermanos: Irma, María de Lourdes,  
Juan y José Gabriel.*

*Mis sobrinos: José Gabriel, María  
Fernanda, Lorena y Daniela.*

*Por su cariño y apoyo.*

*GRACIAS*

*A Edgardo.  
por su amistad y apoyo.*

*A Juan:  
Amigos por siempre*

*GRACIAS*

*A todos aquellos que en su paso por el laboratorio, me han dejado una enseñanza de vida.*

*Especialmente a todos aquellos que además, me han permitido ser su amiga.*

*GRACIAS*

*A la Sra. Virginia Godínez por su  
excelente apoyo secretarial.  
Al Sr. Juan Méndez Franco por su  
excelente trabajo administrativo en el  
laboratorio.*

## ABSTRACT

In a spontaneous mutant (*PYMI*) of *Bacillus cereus* impaired in the synthesis of haem A, no haem-A-containing cytochromes were detected spectroscopically. The haem A deficiency was compensated by high levels of haem O and CO-reactive cytochrome bo' in membranes: no other oxidases were detected. In contrast, the wild type strain had considerable amounts of hem A and negligible levels of haem O. The mutant *PYMI* exhibited normal colony morphology, growth and sporulation in nonfermentable media, whereas on fermentable media, the mutant overproduced acid which led to poor growth and inhibition of sporulation. External control of the pH of the medium in fermentable media allowed close-to -normal growth and massive sporulation of the mutant. Analysis of the growth kinetics in this condition showed that logarithmic growth was biphasic. During the second phase, the control of the medium pH by wild type strain was related to an increase in oxygen demand. This paralleled the induction of cytochrome caa<sub>3</sub>. At the same phase the mutant exhibited a three fold increase in an o-like cytochrome, but the control of pH and oxygen demand was lower than in the wild type. The respiratory oxidase activities and the levels of cytochromes b and c in the mutant increased 2.6 to 4.2 fold on the transition from exponential growth in either of two media, to sporulation stage III, as previously observed for the wild-type strain. NADH oxidase activity at both stages of culture was several-fold higher than ascorbate plus tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) oxidase activity, consistent with the TMPD- phenotype of strain *PYMI*. Oxidase activity with ascorbate as substrate was significant even in the absence of TMPD as electron mediator, suggesting that the terminal oxidase receives electrons from a cytochrome c. The effect of several respiratory inhibitors on the respiratory system of *PYMI* strain suggested that the terminal oxidase is highly resistant to KCN and CO and that a c-type cytochrome might be involved in the electron transfer sequence to the putative cytochrome bo'. The presence of membrane-bound cytochrome caa<sub>3</sub>-OII and aa<sub>3</sub>-II subunits in strain *PYMI* was confirmed by Western blots and hem C staining (CoII subunit). Western blotting also revealed that in contrast to the wild-type-strain *PYMI* contained the membrane-bound subunits caa<sub>3</sub>-COI and aa<sub>3</sub>-I, but in low amounts. The CO complex of the oxidases in wild type and *PYMI* strains were photodissociables: The photodissociation spectra (photolysed minus CO-ligated) in the wild type strain exhibited a trough at 430nm and a peak at 445 nm, consistent with the presence of a type-a cytochrome (cytochromes aa<sub>3</sub> and caa<sub>3</sub>). In the mutant, the photodissociation spectrum exhibited a trough at 416 nm and a peak at 436 nm, consistent with the presence of a cytochrome o-like pigment.

Evidence that these pigments were the oxidases responsible for substrate oxidation in each strain, was obtained by photodissociating the CO complexes at subzero temperatures (-70 to -110 °C ) in presence of oxygen; these resulted in faster recombination, attributed to oxygen binding. In the strain *PYMI* we observed an extensive oxidation of cytochromes c and b, confirmed that a c-type cytochrome is the electron transfer to the putative cytochrome bo'. The oxygen affinity of the oxidase was determined by using the deoxygenation of oxyleghaemoglobin as a sensitive reporter of dissociated oxygen concentration. A single oxidase was revealed with a  $K_m$  for oxygen of about 8 nM, this is one of the highest affinities yet reported for a terminal oxidase.

# INDICE

## INTRODUCCION

Generalidades sobre oxidasas	1
Clasificación de oxidasas	4
Biosíntesis de grupos hemos	6
Citocromo <u>bo</u> '	9
Cadena respiratoria en la familia Bacillaceae	11

## ANTECEDENTES

Estudios en citocromos	13
Métodos de purificación	14

## HIPOTESIS

17

## OBJETIVOS

18

## MATERIALES Y METODOS

Cepas y medios de cultivo	19
Actividades respiratorias y análisis espectral	20
Tinción de hemo-proteínas	21
Composición de hemos	
Inmunodetección tipo western	21
Espectros de fotodisociación e intercambio de ligandos	22
Determinación de la afinidad por oxígeno	23
Esquema de purificación	24
Otros métodos	26

## RESULTADOS

### La cadena respiratoria de la mutante *PYMI* en comparacion con la cepa silvestre

Actividades respiratorias y citocromos.	27
Inhibidores de la cadena respiratoria.oxidación de citocromo c en la mutante <i>PYMI</i>	37
Citocromos tipo-c	40
Apoproteínas	40
Hemos	41

### Crioenzimología con membranas de *B. cereus*

Espectros diferenciales con CO y de fotodisociación en la mutante <i>PYMI</i>	47
Determinación de un hemo de alto spin en la mutante <i>PYMI</i>	49
Cepa silvestre. cinética de reasociación con CO a temperaturas subcero	52
Cepa silvestre. cinética de la reacción con oxígeno a temperaturas subcero	52
Cepa mutante <i>PYMI</i> . Cinética de reacción con CO a temperatura subcero	57
Cepa mutante <i>PYMI</i> . Cinética de la reacción con oxígeno a temperaturas subcero.	58

### La afinidad por oxígeno de la oxidasa bo'

presente en la mutante <i>PYMI</i>	62
------------------------------------	----

<b>Purificación de la oxidasa presente en la mutante <i>PYMI</i></b>	65
<b>DISCUSION</b>	72
<b>CONCLUSIONES</b>	78
<b>PERSPECTIVAS</b>	80
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	81

## INTRODUCCION.

### GENERALIDADES SOBRE LAS OXIDASAS.

Se ha estimado que el 90% de la reducción del oxígeno molecular en la biósfera está catalizada por oxidasas respiratorias, muchas de las cuales son oxidasas bacterianas (82).

Las oxidasas respiratorias son enzimas membranales presentes en los organismos aeróbicos, las cuales catalizan la reducción de oxígeno molecular a agua y utilizan la energía libre obtenida de esta reacción para bombear protones a través de la membrana (64).

El gradiente de protones y de voltaje generado por las oxidasas y otros componentes de la cadena respiratoria aeróbica son convertidos directamente por sistemas conservadores de energía asociados a membrana, a una forma de energía útil (101). Se sabe que el sistema respiratorio bacteriano es ramificado, teniendo oxidasas terminales distintas (3), a diferencia de la única oxidasa terminal presente en mitocondria. Estas diferentes oxidasas bacterianas han despertado un gran interés tanto para conocer su naturaleza, como para saber como están constituidos estos complejos respiratorios.

La gran diversidad encontrada entre las oxidasas bacterianas responde a la gran variedad de medio ambientes en las que se encuentran las bacterias. La cantidad específica de una oxidasa presente en la membrana bacteriana va a depender de las condiciones o estadio de crecimiento. Por ejemplo: *Escherichia coli* tiene dos diferentes oxidasas respiratorias (28) que se expresan dependiendo de la tensión de oxígeno a la que se crezca la bacteria: en condiciones aeróbicas la citocromo oxidasa que se expresa es la quinol oxidasa bo', mientras que en condiciones de microaerofilia, la oxidasa presente es la quinol oxidasa bd', que presenta una mayor afinidad por oxígeno: en células enteras su  $K_m$  por  $O_2$  es de 20 nM, mientras que la  $K_m$  por  $O_2$  de la quinol oxidasa bo' es de 100 nM (28). El precio por esta mayor afinidad por el oxígeno se paga con una menor eficiencia en el acoplamiento de la translocación de protones. La translocación neta de protones a través de la membrana para quinol oxidasa bd' es de  $1H^+/e^-$  (69), aunque hay reportes que indican que la quinol oxidasa bd' no bombea protones ( 87). En el caso de la quinol oxidasa bo' la eficiencia de translocación de protones es de  $2 H^+/e^-$  (71). Sin embargo, es importante hacer notar que no siempre el bombeo de protones es lo que más interesa a un organismo. Aunque la función primaria de la cadena respiratoria es la generación de la fuerza protón-motriz, la cual es utilizada para la síntesis de ATP, la cadena respiratoria es también necesaria para reciclar  $NAD^+$  a partir de NADH y así eliminar exceso de equivalentes reductores. Esta función puede ser muy importante

especialmente bajo condiciones de crecimiento en las que las células tienen un camino alternativo de obtención de energía, por ejemplo la glicólisis o la fotosíntesis. Además bajo ciertas condiciones de crecimiento, el sistema respiratorio puede ser importante para reducir el nivel basal de oxígeno intracelular, con lo cual daría protección a enzimas sensibles al oxígeno. Bajo estas condiciones la tasa respiratoria puede ser más importante para la sobrevivencia celular, que la eficiencia del acoplamiento con la translocación de protones.

Un ejemplo muy representativo de la diversidad en las cadenas respiratorias bacterianas lo tenemos en la bacteria no sulfurosa *Rhodobacter sphaeroides*. Esta bacteria puede crecer aeróbica, anaeróbica o fotosintéticamente, presentando tres distintas oxidasas respiratorias; dos de estas oxidasas utilizan ferrocitocromo c como sustrato y una de ellas utiliza al quinol como sustrato (25, 35). La citocromo oxidasa aa<sub>3</sub>, es predominante cuando se crece en presencia de altas tensiones de oxígeno (35) y la citocromo oxidasa cbb' (también conocido como cbb<sub>3</sub>) (25,26), presente en condiciones microaerófilas y fotosintéticas; ambas son citocromo c oxidasas. La oxidasa bb', es una quinol oxidasa y se presenta en condiciones donde se ha perdido el complejo bc<sub>1</sub>, obteniéndose en la cadena respiratoria bajo estas condiciones, suficiente energía para sostener el crecimiento aeróbico (105). Este esquema básico de cadena respiratoria se encuentra en otros tipos de bacterias como *Bradyrhizobium japonicum* (9, 68, 41,84) y *Paracoccus denitrificans* (48,76), donde la quinol oxidasa es del tipo ba (también conocida como ba<sub>3</sub>); o en *Rhodobacter capsulatus* (33), donde está ausente la citocromo oxidasa aa<sub>3</sub>, pero presenta las otras dos oxidasas mencionadas. En *Bradyrhizobium japonicum* se han analizado los genes correspondientes a las citocromo oxidasas aa<sub>3</sub> y cbb', observándose que la citocromo oxidasas cbb' es inducida bajo condiciones de microaerofilia y es requerida para la formación de bacteroides funcionales en las plantas (68).

A pesar de que las oxidasas bacterianas estudiadas presentan diferencias en cuanto a su sustrato (quinol o citocromo c), a sus afinidades por oxígeno, a la presencia de los centros CuA y al tipo de hemo que las constituyen, todas son miembros de una gran superfamilia de oxidasas, que incluye a la oxidasa mitocondrial: la superfamilia hemo-cobre. La pertenencia a esta superfamilia se da con base en la presencia de una subunidad homóloga a la subunidad I de la citocromo c-oxidasa mitocondrial de mamífero. Esta subunidad contiene un centro bimetalico o centro binuclear, que es el sitio donde el oxígeno es reducido a agua. Este centro binuclear consiste de un hemo de alto spin, pentacoordinado (con unión a un residuo de histidina) y un cobre, llamado Cu B. También contiene un segundo hemo, de bajo

spin, hexacoordinado (con unión a dos residuos de histidina), cuya función parece ser la de mediar la transferencia de electrones al centro binuclear. De acuerdo a una caracterización espectroscópica, se han observado diferencias cualitativas y cuantitativas con respecto a los grupos prostéticos hemo y cobre. Análisis bioquímicos revelan diferencias en cuanto a los sustratos fisiológicos que utilizan. Sin embargo, después de la clonación y secuenciación de los loci que codifican para las diferentes oxidasas, se ha reconocido que muchos complejos de oxidasas están estructuralmente relacionados y conforman por tanto a la superfamilia hemo-cobre. La única excepción reportada es el citocromo bd', una quinol oxidasa que no se encuentra relacionada con esta superfamilia por no tener un centro bimetálico Fe-Cu; a cambio, un hemo D y un hemo B de alto spin forman el centro catalítico (21,99).

En cuanto a su secuencia de aminoácidos, casi todas las oxidasas presentan alta similitud principalmente en la subunidad I, y con menor grado en la subunidad II y III. La excepción sería las oxidasas cbb' presente en bacterias fijadoras de nitrógeno, ya que carecen de las subunidades II y III. Al analizar las secuencias de aminoácidos de algunas oxidasas, se ha visto que los genes estructurales están dentro de un solo operón y en el mismo orden físico: subunidad II, subunidad I y subunidad III. Algunas veces los genes de las subunidades I y III se encuentran fusionados (50). La citocromo c oxidasa cbb' se encuentra codificada por un solo operón: el operón fix NOQP (68).

Los genes que codifican las subunidades de la citocromo c oxidasa de *Rhodobacter sphaeroides* y de *Paracoccus denitrificans* están organizados de manera diferente; En estos casos la subunidad I está codificada en un gen separado del agrupamiento génico que codifica para las subunidades II y III (26,99).

Los resultados obtenidos por mutagénesis indican que la composición mínima para que una oxidasa funcione como bomba de protones requiere de la presencia de las subunidades I y II. El descubrimiento de la oxidasa cbb' aislada de *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodobacter capsulatus* (26), y que ha sido caracterizada genéticamente en *Bradorhizobium japonicum* (9), ha cambiado esta idea. La enzima está constituida por dos citocromos tipo-c, unidos a la membrana en lugar de la subunidades II y III. Esta oxidasa es capaz de bombear protones, demostrando que la subunidad I es suficiente para esta función (26).

Las secuencias de las subunidades I y II, con excepción de la oxidasa cbb', están bien conservadas en esta superfamilia (26, 37). Un cobre denominado CuA, está presente en la subunidad II de la citocromo oxidasa aa<sub>3</sub> y otras citocromo c oxidasas, pero se encuentra ausente en los otros tipos de oxidasas que pertenecen al grupo de quinol oxidasa. En cuanto a los grupos hemo, su identidad química

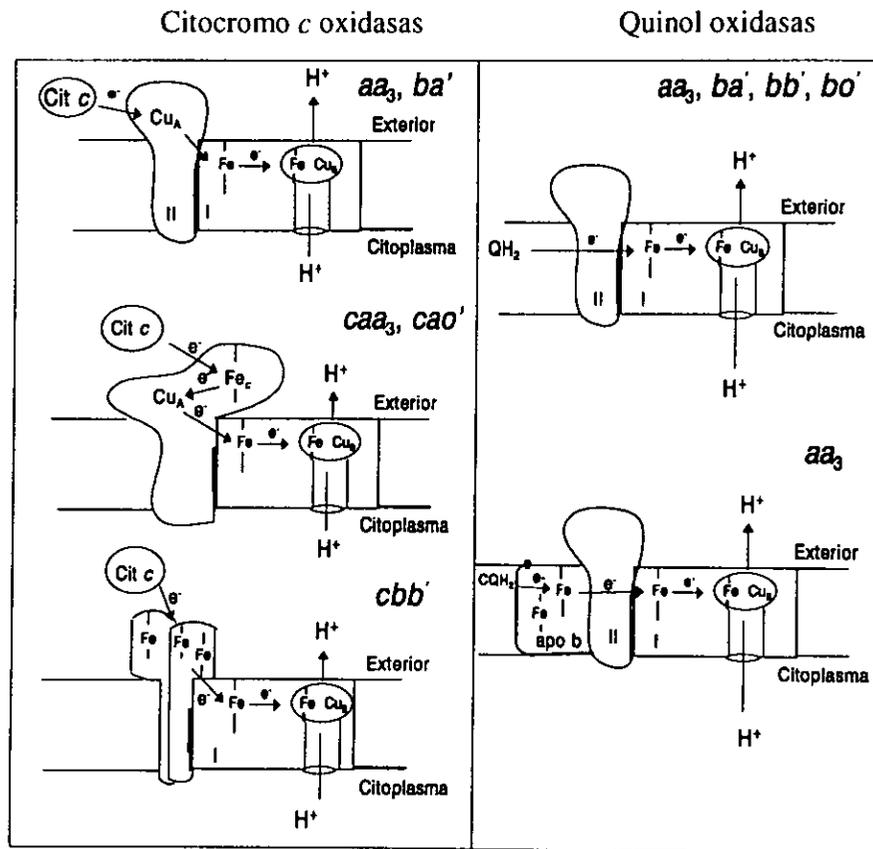
puede variar, encontrándose el hemo A, hemo B o hemo O. Todas las oxidasas de esta superfamilia poseen CuB unido a la subunidad I. El centro binuclear está formado por un hemo A, B u O de alto spin y el CuB, éste es el sitio donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno. En las quinol oxidasas, donde no existe un sitio para el centro CuA, este sitio ha podido ser instalado artificialmente por ingeniería de proteínas (102).

## CLASIFICACION.

La superfamilia de oxidasas hemo-cobre ha sido clasificada en dos ramas principales de acuerdo a sus especificidades por sustrato (26,37,99). La oxidasa mitocondrial y muchas oxidasas bacterianas usan ferrocitocromo c como sustrato y por lo tanto se denomina citocromo c oxidasas. Como ejemplos de oxidasas bacterianas de este tipo se pueden nombrar la citocromo oxidasa aa<sub>3</sub> presente en *Bradyrhizobium japonicum* (8), *Paracoccus denitrificans* (97). y *Rhodobacter sphaeroides* (81). La citocromo oxidasa ba' de *Thermus thermophilus* (31) y la citocromo oxidasa caa<sub>3</sub> presente en *Thermus thermophilus* (50), *Bacillus cereus* (24), *Bacillus stearothermophilus* (87), el bacilo termofílico PS3 (85) y *Bacillus subtilis* (98) (Esquema I).

Otro grupo de oxidasas terminales usan un quinol como sustrato, por lo que son llamadas quinol oxidasas. Dentro de estas oxidasas encontramos a la citocromo oxidasa bo' de *Escherichia coli* (69) y *Acetobacter aceti* (52,54); la citocromo oxidasa ba' de *Acetobacter aceti* (53) y la citocromo oxidasa aa<sub>3</sub> de *Bacillus subtilis* (44) y *Sulfolobus acidocaldarius* (2). Algunos autores (99), consideran que la citocromo oxidasa cbb', por carecer de las subunidades II y III, daría lugar a un tercer tipo de oxidasas dentro de esta superfamilia. Esta oxidasa tiene como sustrato al citocromo c y está presente en *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodobacter sphaeroides* (99) (Esquema I).

Hay mucha información acerca de las oxidasas respiratorias. Se ha descrito la estructura molecular y topología de cuatro subunidades de la oxidasa aa<sub>3</sub> de *Paracoccus denitrificans* (COX)(36), seguida de la estructura de la citocromo c oxidasa de corazón de bovino (96). Más recientemente se han determinado la proyección estructural de la ubiquinol oxidasa de *E. coli* (30) y la estructura en tres dimensiones de dos de las subunidades de *P. denitrificans* (61).



Esquema I. Estructura y topografía de las citocromo *c* oxidasas y las quinol oxidasas.

Durante los pasados 10 años, se han desarrollado muchos estudios de mutagénesis sitio-dirigida combinados con espectroscopía para revelar la relación estructura-función de las oxidasas. Estos estudios fueron hechos principalmente en tres oxidasas bacterianas: la quinol oxidasa bo' de *E. coli*, la citocromo c-oxidasa aa<sub>3</sub> de *Rhodobacter sphaeroides* y la citocromo c-oxidasa aa<sub>3</sub> de *Paracoccus denitrificans*. La citocromo c-oxidasa aa<sub>3</sub> bacteriana ha sido purificada en varios estados oligoméricos y está constituida de 2 subunidades como en *Bacillus cereus* (23,24), 3 subunidades como en *Paracoccus denitrificans* o *Rhodobacter sphaeroides* o 4 subunidades como la caa<sub>3</sub> de *Bacillus subtilis* (27,37,99). Todas ellas se encuentran embebidas en la membrana citoplásmica de la bacteria. La citocromo oxidasa aa<sub>3</sub> es muy similar en su centro catalítico a su contraparte más compleja encontrada en eucariotes: la citocromo c oxidasa aa<sub>3</sub> mitocondrial. Se localizan cuatro centros redox en las subunidades I y II : dos hemos A y dos cobres.

La citocromo c oxidasa de mamíferos contiene 13 subunidades de las cuales 3 son codificadas dentro del genoma mitocondrial (las subunidades I, II y III) y las 10 restantes son codificadas por el genoma nuclear (11). Además de la homología con la subunidad I, casi todas las oxidasas bacterianas contienen homólogos a las subunidades II y III de la oxidasa aa<sub>3</sub> mitocondrial. Las excepciones son la quinol oxidasa tipo aa<sub>3</sub> presente en *Sulfolobus acidocaldarius* (46) y la citocromo c-oxidasa tipo ba' de *Thermus thermophilus* (106), las cuales pierden la subunidad III; y la citocromo c oxidasa cbb' presente en las bacterias fijadoras de nitrógeno que pierden tanto la subunidad II como la subunidad III (25). Subunidades homólogas a las 10 subunidades de la oxidasa de mamíferos codificadas por el núcleo, no han sido encontradas en bacterias. Algunas de las oxidasas bacterianas contienen subunidades adicionales que no están relacionadas con ningún producto de un gen eucariótico.

## BIOSINTESIS DE GRUPOS HEMO

Los agrupamientos de genes que codifican para las diferentes oxidasas terminales, también contienen genes que no codifican para subunidades de estos complejos. Al examinar la función de los genes asociados con la quinol oxidasa de *E. coli* (78) y con la citocromo oxidasa caa<sub>3</sub> de *Bacillus subtilis*

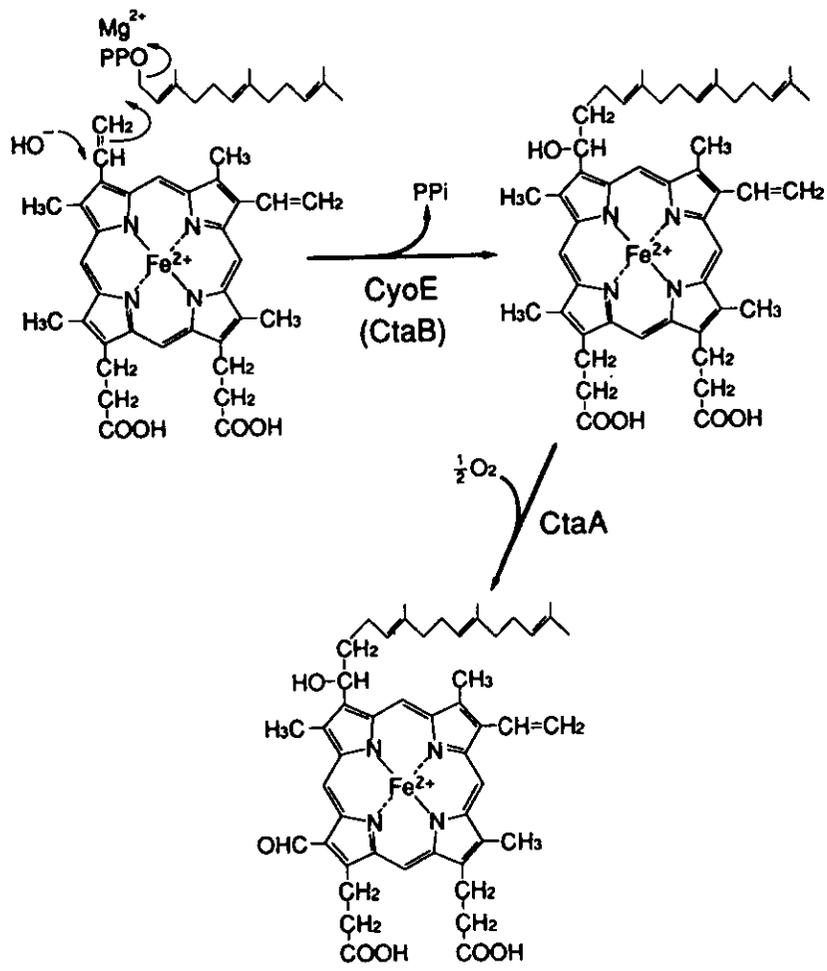
(91) se obtuvieron resultados indicativos de la función de estos genes en la biosíntesis de los grupos hemo.

Los tres tipos de hemos asociados con la subunidad I de las oxidasas hemo-cobre son el hemo B, el hemo O y el hemo A. El hemo O fue descubierto en 1991 por Puustinen y col (71). En el camino de la biosíntesis, el hemo B es el precursor del hemo O y difieren por la presencia en el hemo O de una cadena lateral hidroxietilfarnesil (71); El hemo B y el hemo O tienen propiedades espectroscópicas similares y ambos confieren un color rojo a las oxidasas que los contienen. El hemo O es el precursor del hemo A; el hemo A y el hemo O, tienen la cadena lateral hidroxietilfarnesil pero se diferencian en que el hemo A tiene un grupo formilo en lugar del grupo metilo en el carbono 8 del núcleo de la porfirina del hemo O. Esta diferencia produce un corrimiento en el espectro de absorción de tal manera que el hemo A y las oxidasas que la contiene tienen color verde (Esquema II).

Se ha demostrado que el producto del gen *cyoE*, que es parte del operón *cyoABCDE* de la oxidasa *bo* de *E. coli*, es la farnesiltransferasa responsable de la conversión de hemo B a hemo O en *E. coli* (77). Podemos encontrar homólogos del gen *cyoE* en *B. subtilis* (*ctaB*), (100), y en *Sacharomyces cerevisiae* (*COX10*) (60); en *P. denitrificans* (75), *B. japonicum* (8), y *R. sphaeroides* (10), el gen homólogo es el Orf 1. El producto del gen *ctaB* de *B. subtilis* es una proteína de 34 Kda.

El hemo O se encuentra en *E. coli* y otras bacterias, como el hemo de alto spin que forma parte del centro binuclear de la quinol oxidasa *bo'*. La conversión de hemo O a hemo A no ocurre en una cepa silvestre de *E. coli*. La expresión en *E. coli* del gen clonado *ctaA* de *B. subtilis*, resulta en acumulación del hemo A en las membranas de *E. coli* (91). Este resultado indica que el gen *ctaA* tiene un papel importante en la biosíntesis del hemo A a partir de hemo O. En *B. subtilis* no es posible encontrar hemo O acumulado y la razón sería la presencia de este gen, cuyo producto codificado, transforma en forma continua el hemo O sintetizado a hemo A (100). Lo mismo sucede aparentemente en *R. Sphaeroides* (26) y *P. denitrificans* (17), aunque en estos casos el gen homólogo al *ctaA* no ha sido encontrado; a la fecha el gen *ctaA* solo se ha observado en especies de *Bacillus* como *B. subtilis* y *B. firmus* (91). Los resultados obtenidos en *B. subtilis* (91) sugieren que la función de la proteína, producto del gen *ctaA*, es la de oxigenación/oxidación del grupo lateral metilo del carbono 8 del hemo O (Esquema II).

El hemo O ha sido detectado en la bacteria termofílica *Bacillus PS3* (87) y en *Bacillus stearothermophilus* (98); en *B. subtilis* ha sido detectado solo en una mutante (RB829) carentes del gen *ctaA* (38).



Esquema II. Biosíntesis de grupos hemo B, O y A .

## CITOCROMO bo'

El citocromo bo', descrito originalmente por Chance (64) en *Staphylococcus aureus* como un pigmento capaz de unir CO y con propiedades espectrales de una enzima conteniendo protohemo IX, funciona como oxidasa terminal en ésta y otras bacterias. Se le nombró "citocromo o'" precisamente por funcionar como oxidasa y es probablemente la oxidasa bacteriana mas ampliamente distribuida (64), formando parte de la cadena de transporte de electrones de muchas bacterias.

En *E. coli*, donde ha sido mas estudiada, este complejo enzimático es una de las dos ubiquinol oxidasas del sistema respiratorio aeróbico, catalizando en la membrana citoplásmica la oxidación por dos electrones de la ubiquinol-8 y la reducción por 4 electrones del oxígeno molecular al agua (3); el flujo de electrones está acoplado a la generación de una fuerza protón-motriz a través de la membrana (12,51,55). El complejo de citocromo bo' de *E. coli* ha sido purificado (64) y se reportó que está constituido por 4 a 5 subunidades con dos protohemos IX (hemo b 555 y hemo b 562) como grupos prostéticos. Uno de estos grupos es el sitio de unión del CO (ligando alterno al O<sub>2</sub>) y conforma un centro binuclear con el CuB. Es ahí donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno para formar agua y es el principal responsable de la banda alfa (562 nm) que se encuentra presente en los espectros diferenciales reducido-oxidado de la enzima.

En 1992 Puustinen trabajando con *E. coli*, (71) cuestionó que el citocromo bo' este formado por dos hemo B como grupos prostéticos, basándose en la falta de homogeneidad de la banda alfa observada en los espectros diferenciales reducidos menos oxidados y el espectro diferencial con CO de la enzima reducida. Puustinen determinó el tipo de hemos que forman el complejo, estudiando el espectro de sus piridín-hemocromos y su comportamiento en HPLC. Concluye que los hemos que conforman el complejo son semejantes a hemos tipo A, conteniendo una cadena lateral de hidroxietilfarnesil en el carbono 17 y propone que a este nuevo hemo se le de el nombre de hemo O. Originalmente postula que el "citocromo o'" tiene como grupos prostéticos dos hemos de tipo O; análisis posteriores efectuados por Puustinen (72) demuestra que el citocromo o' de *E. coli* es un complejo formado por un hemo B y un hemo O. En algunas bacterias, se ha reportado la presencia de hemo O en asociación con otros hemos diferentes al hemo B como es el caso de *Azotobacter vinelandii* (39) y *Methylophilus methylotrophus* (73) donde el complejo es un citocromo co' oxidasa.

El análisis de secuencias de las subunidades de la oxidasa mitocondrial y de la oxidasa bo', nos muestra que hay relación filogenética entre ellas, lo que permite concluir que son miembros de una superfamilia de oxidasas hemo-cobre (100).

Se ha reportado que existe una relación funcional y estructural entre las citocromo oxidasas del tipo a y el citocromo bo'; por estudios realizados utilizando resonancia raman y ESR (27,80) se ha determinado que el complejo del citocromo bo' esta formado por un centro de bajo spin y otro de alto spin. El de alto spin esta electrónicamente acoplado al CuB formando el típico centro binuclear hemo-Cu, que es el sitio donde se une el CO y se reduce el oxígeno a agua. Este centro binuclear es similar al que se encuentra presente en las citocromos oxidasas tipo a, tanto en eucariotes como en procariotes. Además, el análisis de secuencia del operón que codifica para citocromo bo en *E. coli* muestra también una relación cercana con estas oxidasas (27) por lo que se piensa deben tener estructuras similares, al menos en la vecindad de los centros catalíticos y posiblemente también en los mecanismos de bombeo de electrones. Estas características confirman que esta enzima es miembro de la superfamilia de oxidasas Fe:Cu (79).

En algunos casos, la presencia del hemo O se ha asociado a crecimiento en baja tensión de oxígeno; en una cianobacteria aeróbica, *Anacystis nidulans* (62), se ha observado una acumulación transitoria de citocromo bo' (hemo O), cuando la cianobacteria se incubaba en presencia de un inhibidor del fotosistema II y baja tensión de oxígeno (10 uM). En células crecidas con alta aereación (210 uM de oxígeno), la cianobacteria presenta como oxidasa terminal la oxidasa aa<sub>3</sub>; al disminuir la tensión de oxígeno, se observa una disminución en el contenido de hemo A y un aumento en el contenido de hemo O. Si la cianobacteria regresa a condiciones de alta aereación, vuelve a aumentar el contenido de hemo A.

La presencia del citocromo bo' clásico en la familia Bacillaceae es controvertida. Baines (6) y Sone (86) reportaron la purificación de dos diferentes pigmentos semejantes a citocromo bo' en la bacteria PS3. En ambos casos, el citocromo purificado reaccionaba con CO dando las características espectrales de un verdadero citocromo bo'. Este citocromo era capaz de oxidar TMPD reducido o citocromo c exógeno a velocidades apreciables. En el caso del citocromo descrito por Baines (6), este se purificó a partir de células crecidas en aereación vigorosa y estaba constituido de una sola subunidad de 48 Kda, mientras que Sone (86) purificó citocromo bo' a partir de células crecidas en aereación limitada y estaba compuesto de tres subunidades (60, 30 y 16 Kda). En ningún caso se demostró la presencia de

hemo O asociado a la proteína purificada, pues para esta época (1984-1990), no se había reconocido la existencia del hemo O y su determinación por HPLC.

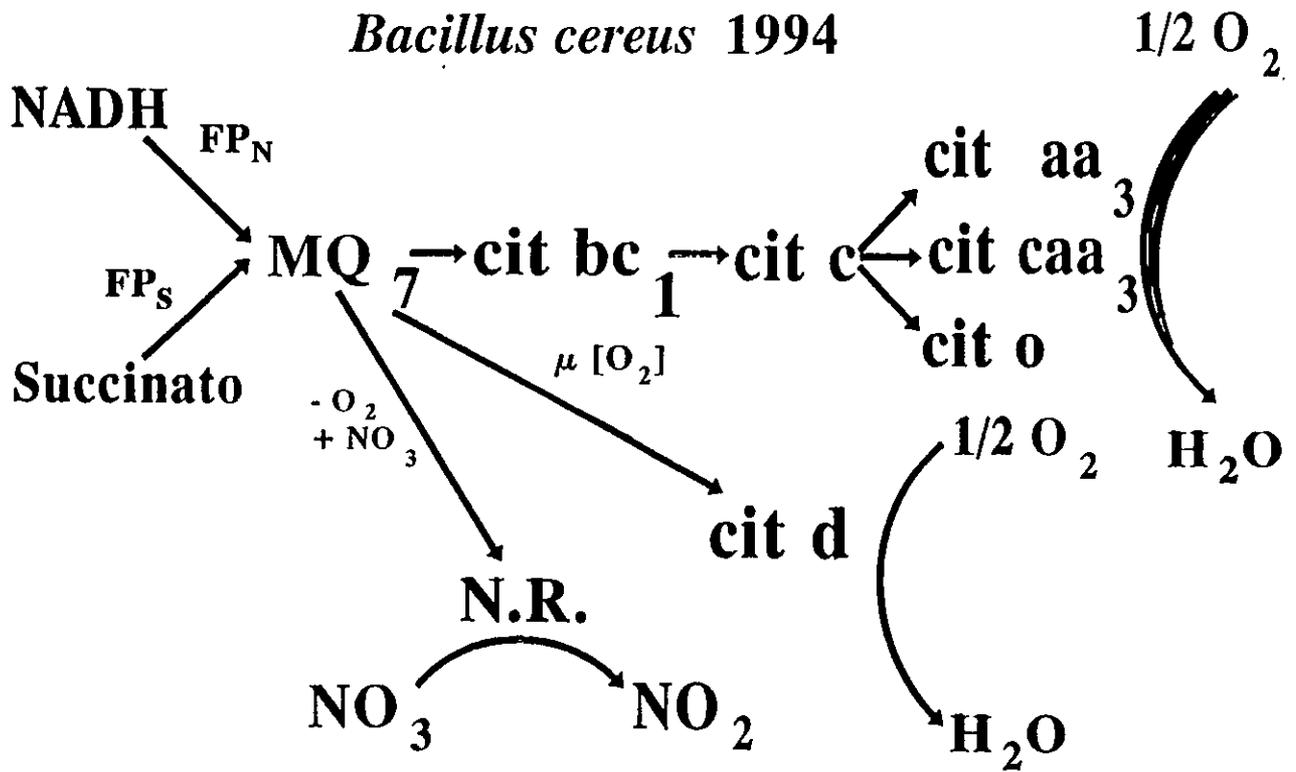
La síntesis de hemo O parece que ocurre bajo condiciones especiales, tanto en las bacterias en general como en la familia Bacillaceae en particular; entre estas condiciones está la restricción en la cantidad de oxígeno presente durante el cultivo, donde el hemo O se puede encontrar solo o asociado con hemos diferentes al hemo B, como se observa en *Rhodobacter palustris* (73), *Azotobacter vinelandii* (88) y *Methylophilus methylotrophus* (3) donde el complejo se ha reportado como una oxidasa co'; en *Acetobacter aceti* (53) y *Bacillus sp* cepa PS3 (88), se ha encontrado que el hemo O también reemplaza al hemo a en el centro binuclear de la misma oxidasa cuando las células son crecidas con baja tensión de oxígeno. El significado funcional de esta sustitución no es del todo clara; sin embargo, al menos en PS3 se demostró que la enzima resultante, la oxidasa cao', es más afín por el oxígeno que la enzima original, la oxidasa caa<sub>3</sub>; este hecho estaría en relación con el crecimiento a baja tensión de oxígeno como factor de selección. También hay que considerar que la síntesis del hemo A, a partir de su precursor directo, el hemo O, requiere de una tensión elevada de oxígeno, ya que implica reacciones de oxigenación/oxidación y por lo tanto, la conversión del hemo O en A estaría limitada por la condición de crecimiento con poco oxígeno. En cepas mutantes, como *Bacillus subtilis* cepa RB-829 que no presenta hemos del tipo A por carecer del gen *ctaA* (gen que participa en la biosíntesis de hemo A), también ha sido posible detectar la presencia de hemo O (58).

#### CADENA RESPIRATORIA EN LA FAMILIA Bacillaceae.

En los últimos años se ha incrementado el conocimiento de los componentes citocrómicos de la cadena respiratoria en la familia Bacillaceae (100). En *B. subtilis* (80, 99) y *B. cereus* (23,24) (esquema III) se ha observado que estas bacterias pueden sintetizar dos oxidasas conteniendo hemos A: aa<sub>3</sub> y caa<sub>3</sub>, cuya expresión depende de la fuente de carbono (80,99) y del estado morfogenético del cultivo (23,24).

Estudios realizados con mutantes respiratorias de *B. subtilis* afectadas en la expresión de citocromos tipo a, llevan a proponer que las mutantes que carecen de citocromo aa<sub>3</sub> son asporogénicas (92, 58). Sin embargo, los resultados con mutantes de *B. subtilis* que carecen específicamente de oxidasa caa<sub>3</sub> (98) muestran un crecimiento y una morfología colonial normal al compararse con una cepa silvestre. Las mutantes carentes de ambas oxidasas son viables, pero su crecimiento es pobre (98).

*Bacillus cereus* 1994



Esquema III. Cadena respiratoria de *B. cereus*.

## ANTECEDENTES.

### Estudios sobre citocromos.

Las técnicas espectrofotométricas han sido muy usadas para el estudio de las cadenas respiratorias. Los citocromos que conforman estas cadenas han sido identificados durante muchos años con base en sus características espectrales, tanto de sus espectros diferenciales reducidos menos oxidados, como de los complejos de las oxidasas reducidas con CO. Desde hace varios años, Lucile Smith (83) había definido las señales características asociadas al complejo cit o-CO, y estas características se usaron para presumir la presencia de este citocromo en las diferentes cadenas respiratorias estudiadas. En ese momento, se pensaba que el citocromo bo' estaba constituido por dos hemos del tipo B, ya que sus características espectrales estaban asociadas con ese tipo de hemo. Con base en esa metodología espectrofotométrica, en el laboratorio del Dr. Escamilla (21) se propuso la existencia de un citocromo bo' de *B. cereus* como una oxidasa constitutiva, es decir, que se expresaba en cualquier condición de crecimiento: desde aerobiosis hasta microaerofilia y con fuentes de carbono, ya sea fermentables o no fermentables.

En 1991, Puustinen (71), analizando los espectros de la oxidasa bo' purificada de *E. coli*, decide determinar por HPLC los hemos que la constituyen. Encuentra un nuevo hemo, el hemo O, de tal manera que el citocromo bo' está constituido por un hemo B y un hemo O, en lugar de los dos hemos B antes reconocidos. A partir de ese momento no es suficiente el criterio espectroscópico para determinar la presencia de citocromo bo' "bona fide", sino se hace necesaria la determinación de hemo para comprobar la presencia del hemo O. Este resultado hace necesario reexaminar las muchas oxidasas reportadas como oxidasas bo', y definir si son oxidasas bo' "bona fide" o citocromos b reactivos con CO.

En el género *Bacillus* no ha sido detectada una oxidasa bo', más que en condiciones especiales. Esta oxidasa se presenta en mutantes carentes del gen *ctaA* como sucede en *B. subtilis* (38) (este gen participa en la síntesis de hemo A a partir de hemo O) o en condiciones de aereación limitada como ocurre en el bacilo *PS3* (88).

Para entender el papel funcional de los citocromos aa<sub>3</sub> y caa<sub>3</sub> en el crecimiento aeróbico, y definir la naturaleza del citocromo bo' que habíamos previamente descrito como constitutivo en la cadena respiratoria de *B. cereus*, se estudió una mutante espontánea de esta bacteria, a la cual no se le

detectó espectroscópicamente la presencia de citocromos tipo-a (16). Se observó que esta cepa mutante, a la que llamamos *PYMI*, retenía los niveles normales de expresión de citocromo c y sobre-expresaba , de acuerdo a la formación de complejo con CO, un pigmento semejante al citocromo bo'.

A pesar de los reportes previos, en los que se menciona que cepas mutantes de *B. subtilis* carentes de citocromos tipo-a son asporogénicos (91), la mutante *PYM 1* fue capaz de crecer y esporular de manera normal cuando se crece en medios no fermentables, como el hidrolizado de caseína y en medios fermentables con una capacidad amortiguadora del doble de la que normalmente se usa, pues el mutante *PYMI* acidifica notablemente los medios fermentables.

En esta mutante decidimos reexaminar la presencia de citocromo bo'. Utilizando los nuevos criterios introducidos por Puustinen (72), para identificar al hemo O y como criterios alternativos utilizando técnicas de intercambio de ligandos ( $CO/O_2$ ) a temperaturas subcero, demostraremos la reacción de este citocromo con el oxígeno. Adicionalmente, estas técnicas nos permitirán definir la naturaleza del donador de electrones para la oxidasa en estudio.

En el bacilo *PS3*, Sone (88) ha reportado que en condiciones de crecimiento en las que la tensión de oxígeno es baja, la bacteria expresa una oxidasa promiscua; en esta oxidasa el citocromo o sustituye al citocromo a<sub>3</sub> en la oxidasa caa<sub>3</sub>, dando origen a una oxidasa cao'. Este caso nos indica que no es suficiente el determinar la presencia de un hemo O constituyendo a una oxidasa para definirla como una oxidasa bo' "bona fide", sino que es necesario purificarla para poder establecer sin lugar a dudas su naturaleza. Basándonos en estos datos, fué necesario proceder a la purificación de la oxidasa presente en la mutante para determinar sus características y definir si se trataba de un citocromo bo' "bona fide".

#### METODOS DE PURIFICACION.

Los procedimientos utilizados para la purificación de citocromos bo' (5, 27,88) se basan en la utilización de cromatografía de intercambio iónico (generalmente DEAE), y en algunos casos se añade al protocolo de purificación una columna de filtración molecular. Durante el proceso de purificación, se ha reportado una pérdida importante de la actividad enzimática del complejo, lo que se debe a la necesidad de utilizar detergentes para su solubilización, generalmente Tritón X100.

En *B. subtilis*, de Vrij (20) ha reportado el fraccionamiento de los diferentes pigmentos respiratorios que constituyen su cadena respiratoria, utilizando sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. Identificó 6 diferentes citocromos, de los cuales 2 podían formar complejo con CO y presentaban sensibilidad a KCN. Uno de estos citocromos fue identificado como la oxidasa aa<sub>3</sub>, mientras que el otro contiene, de acuerdo a sus resultados, dos citocromos del tipo b (en esa fecha, 1987, aún no se identificaba al hemo O como componente del citocromo bo). Ambas oxidases pueden ser reducidas con ascorbato. El espectro diferencial del complejo con CO de la oxidasa compuesta por citocromos b, muestra la firma característica del citocromo bo, aunque no puede afirmarse que se trate de un citocromo bo "bona fide".

En cuanto al número de subunidades y los pesos moleculares de citocromo bo y algunas otras oxidases relacionadas, se ha determinado lo siguiente:

ORGANISMO	# DE SUB-UNIDADES	DONADOR DE ELECTRONES	PESO MOLECULAR (KDa)	TIPO DE OXIDASA
<i>Bacillus SP3</i> (89)	4	cit <u>c</u>	56, 38, 22, 12	<u>cao</u>
<i>Bacillus SP3</i> (87)	3	cit <u>c</u>	60, 30, 16	<u>bb<sub>3</sub></u>
<i>Bacillus firmus</i> OF4 (74)	3	cit <u>c</u>	No reportado	<u>caa<sub>3</sub></u>
<i>Escherichia coli</i> (56)	4	Quinol	55, 33, 18, 13	<u>bo</u>
<i>Bacillus YN2000</i> (73)	3	cit <u>c</u>	52, 41, 22	<u>cao</u> (hemo O?)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> (87)	3	cit <u>c</u>	No reportado	<u>caa<sub>3</sub></u>
<i>Acetobacter methanolicus</i> (54)	No reportado	cit <u>c</u>	No reportado	<u>co</u> (hemo O?)
<i>Azotobacter vinelandii</i> (40)	No reportado	No determinado	No reportado	<u>co</u> (hemo O?)

<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (25)	3	cit c	45, 35, 29	<u>cbb<sub>3</sub></u>
<i>Bacillus cereus</i> (23,24)	2	cit c	51, 30	<u>aa<sub>3</sub></u>
<i>B. cereus</i> (23,24)	2	cit c	51, 37.5	<u>caa<sub>3</sub></u>

Basándonos en estos reportes se planteó un esquema de purificación para la oxidasa bo' presente en la mutante *PYM 1* de *B. cereus*.

## HIPOTESIS

### Contexto:

Históricamente los citocromos tipo "o" han sido identificados por el espectro diferencial de su complejo con monóxido de carbono. Sin embargo en 1992, Pustinen y Wikström (72) demostraron que los verdaderos citocromos bo' poseen un nuevo tipo de hemo que fue nombrado hemo O. Así, por definición los citocromos bo' "bona fide" deben contener hemo O y ser reactivos a oxígeno.

Las cepas silvestres de *B. subtilis* (38) y *B. cereus* (16) no contienen hemo O en sus citocromos; sin embargo el hemo O es precursor directo en la biosíntesis de hemo A. Una mutación en el gen *ctaA*, cuyo producto se encarga de la oxigenación/oxidación de un grupo lateral metilo en el carbono 8 del hemo O y convierte el hemo O en hemo A, debe causar que el hemo O se acumule.

### Hipótesis.

*B. cereus* cepa silvestre no contiene oxidasas de tipo bo'; sin embargo una mutación en la síntesis de hemo A (gen *ctaA*), debe resultar en la acumulación de hemo O. Esta condición podría favorecer la expresión de alguna oxidasa alterna tipo bo' "bona fide" o propiciar el ensamble promiscuo de las oxidasas aa<sub>3</sub> y caa<sub>3</sub> con hemos B y O para constituir enzimas promiscuas y funcionales bo' y/o cbo'.

El mutante *PYMI* (hemoA-) de *B. cereus* compensa la ausencia de oxidasas tipo A con una nueva oxidasa bo'.

## OBJETIVOS.

El objetivo general de este trabajo fue comprobar la existencia de una oxidasa bo' "bona fide" en *Bacillus cereus*, así como avanzar en el conocimiento de su identidad.

Para ello en la presente tesis estudiamos una mutante espontánea de *Bacillus cereus*, la mutante *PYMI*, incapaz de sintetizar hemo A y que por lo tanto no contiene citocromos aa<sub>3</sub> y caa<sub>3</sub> detectables espectroscópicamente. La pérdida de hemo A resulta en un aumento en la expresión de un citocromo semejante al citocromo bo', de acuerdo a su firma espectral con CO, sin detectarse la presencia de otras oxidasas.

Para lograr nuestro objetivo general deberán aplicarse los nuevos criterios introducidos por Puustinen (72) y determinar los hemos asociados a esta oxidasa.

También será necesario demostrar la función de esta proteína como oxidasa terminal, para lo cual usaremos técnicas de intercambio de ligandos a temperatura subcero, lo que nos permitirá determinar la reacción de este posible citocromo bo' con oxígeno. El uso de estas técnicas nos permitirá definir la naturaleza del donador de electrones para esta oxidasa.

Para definir sin lugar a dudas la naturaleza de la oxidasa será necesario purificarla y definir sus propiedades moleculares.

## MATERIALES Y METODOS.

### CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizó como cepa silvestre, una cepa de laboratorio de *B. cereus* con las mismas propiedades bacteriológicas de *B. cereus* cepa 9373 (1). La bacteria se crece a 30°C en un fermentador New Brunswick modelo bioflow 5000 con capacidad de 60 l de medio, a 30 °C con una agitación de 200 rpm y aereación vigorosa (60 l de aire min<sup>-1</sup>). El fermentador se inocula con 1 l de un cultivo activo, de acuerdo a Collier (15). Este cultivo activo se obtiene al crecer el bacilo en medio líquido en las mismas condiciones, hasta que llega a fase de crecimiento logarítmica (D.O. 540 nm = 1); se transfiere un alícuota de este cultivo a medio líquido y se vuelve a crecer hasta fase logarítmica; la transferencia se repite entre 2 y 3 veces más, para lograr que el cultivo esté sincrónico.

El medio de cultivo fermentable está compuesto por una mezcla de sales descrita por Hanson (34), añadiéndose sacarosa al 0.1 % y extracto de levadura al 0.1 %; el pH del medio fue de 7.4. El medio de cultivo no fermentable usa la misma mezcla de sales además de un hidrolizado de caseína 0.8 %, ácido glutámico 0.32%, DL-alanina 0.21 % y L- asparagina 0.12 % (93). El pH del medio fue ajustado a 7.4 con NaOH.

La mutante espontánea *PYM 1* fue aislada a partir de la cepa silvestre (16) cultivando sobre medio sólido conteniendo 0.1 % de extracto de levadura y sacarosa al 0.01 % (10 veces menor que la concentración normal). La baja concentración de sacarosa evita el crecimiento excesivo de las colonias, y por tanto evita su confluencia. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 hr. Para seleccionar mutantes, cada colonia se determinó su capacidad para oxidar 0.1 mM de TMPD reducido por cantidad en trazas de ascorbato. En un solo experimento, una colonia, de  $2 \times 10^4$  probadas, permanece sin reaccionar (no viró el color de leuco a azul) después de 5 min. Esta colonia fue aislada y se determinó espectroscópicamente su contenido de citocromos. Esta mutante llamada *PYMI*, no presenta citocromos del tipo a.

Para el crecimiento de la mutante se probaron los dos medios mencionados; cuando se crece en un medio no fermentable, la mutante crece y esporula de la misma manera que lo hace la cepa silvestre. Sin embargo, al crecer en el medio fermentable, fue necesario incrementar la capacidad amortiguadora del medio. En esta condición, la mutante *PYMI* creció y esporuló de manera semejante a la cepa silvestre. Las células obtenidas fueron cosechadas por centrifugación, lavadas tres veces y

resuspendidas en un amortiguador que contiene 50 mM de Tris-HCl (pH 7.4) 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Para obtener las membranas, las células fueron rotas en un Dyno Mill (WAB Maschinen-Fabrik, Basel, Suiza), utilizando perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro a 4,500 rpm y 4 °C. Las células que no se rompieron fueron eliminadas por centrifugación. Las membranas se recuperaron del sobrenadante centrifugando a 144 000 x g durante 45 min y se lavaron con el mismo amortiguador.

#### ACTIVIDADES RESPIRATORIAS Y ANALISIS ESPECTRAL.

Las actividades de oxidasas y oxidorreductasas fueron determinadas en preparaciones membranales, de acuerdo a lo reportado anteriormente (21). La actividad de NADH deshidrogenasa se determinó usando NADH 0.5 mM y 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) 0.08 mM como aceptor final de electrones, utilizando un coeficiente de extinción de  $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 600 nm. Las actividades de oxidasas fueron medidas a 30 °C en un oxímetro YSI modelo 53 (yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Ohio, EEUU), con NADH 0.5 mM o la mezcla de ascorbato de sodio 10 mM y N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) 0.1 mM, como sustratos. Para la determinación de quinol oxidasa se utilizó 2,3,5,6-tetraclorohidroquinona 3.5 mM reducida con ascorbato 2 mM.

Los espectros diferenciales de los citocromos se obtuvieron con preparaciones membranales, de acuerdo a lo reportado previamente (21). Las membranas se resuspendieron en un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4 conteniendo glicerol al 50% (v/v) y se obtuvieron los espectros en un espectrofotómetro SLM DW 2000 a temperatura ambiente, utilizando celdas de 1 cm de paso de luz, o a 77K con celdas de 2mm de paso de luz. La concentración de citocromos fue calculada de los espectros diferenciales (reducido menos oxidado o reducido acomplejado con CO menos reducido), obtenidos a temperatura ambiente, usando los siguientes pares de longitud de onda y coeficientes de extinción (83, 94): citocromo aa<sub>3</sub>, 603-630 nm,  $24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; citocromo b, 563-575nm,  $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; citocromo c 550-540 nm,  $19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; citocromo aa<sub>3</sub>-CO, 590-605 nm,  $10.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; citocromo o-CO, 415-430 nm,  $160 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

El contenido de citocromo c fue determinado en residuos membranales obtenidos después de extraer la preparación con acetona ácida (71).

## TINCION DE HEMO-PROTEINAS.

Las subunidades de las proteínas que contienen hemos fueron detectadas en el gel por su actividad de peroxidasa. Para ello se corrió una electroforesis SDS-PAGE que fue teñida con tetrametil bencidina disuelta en metanol al 30 % en acetato de sodio 0.25 mM pH 5.0; el gel se incubó durante dos horas en la oscuridad y la reacción se inicia al añadir  $H_2O_2$  a la mezcla.(32,94)

## COMPOSICION DE HEMOS

La composición de hemos fue analizada en un sistema de cromatografía líquida de alta presión Waters usando un detector con arreglo de diodos modelo 996 y una columna Waters Delta Pak-HPI C 18 fase inversa, de 300 Å. Los datos fueron procesados usando el software Millennium 2000. Los hemos fueron extraídos y purificados a partir de membranas (40 mg de proteína) de la cepa silvestre de *Bacillus cereus* y de la mutante *PYMI*, de acuerdo con el procedimiento descrito por Puustinen y Wikström (71). Los hemos purificados fueron resuspendidos en ácido trifluoro acético (TFA) 0.5 % en acetonitrilo y fueron aplicados a la columna previamente equilibrada con 0.5 % de TFA y 25% de acetonitrilo, en agua. La columna se eluye con un gradiente de 0.5 % de TFA en acetonitrilo-0.5 % TFA en agua, de acuerdo a Lübben y Morand (47). La columna fue calibrada con los siguientes hemos extraídos de la manera descrita: hemo B y hemo O extraídos de membranas de *E. coli*, hemo B y hemo A, extraídos de partículas submitocondriales de bovino y protohemo IX comercial.

## INMUNODETECCION TIPO WESTERN.

La inmunodetección tipo Western se desarrolló a partir de una electroforesis SDS-PAGE al 12 % de membranas de *B. cereus* silvestre y de la mutante *PYMI*; el gel fue electrotransferido a

membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad). Se utilizó suero de conejo contra citocromo  $aa_3$  purificado de membranas de la cepa silvestre y anticuerpo contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano para revelar las bandas (96)

#### ESPECTROS DE FOTODISOCIACION E INTERCAMBIO DE LIGANDOS.

Las membranas de células de la cepa silvestre y de la cepa mutante *PYM 1* (8 mg de proteína final) se diluyeron en un amortiguador compuesto por etilenglicol al 30 % en fosfatos 0.1M pH 7.0; las muestras fueron reducidas con unos pocos granos de ditionita de sodio, NADH 5 mM, ascorbato 10 mM, ó ascorbato 10 mM más TMPD 1.0 mM, en celdas de 2mm de paso de luz (14,39). Después de 30 min de incubación con el reductor, las preparaciones fueron burbujeadas con CO durante 2 min a temperatura ambiente. Cuando se requería, las muestras eran llevadas a  $-23^{\circ}\text{C}$  en un baño de hielo seco/etanol y se deja equilibrar durante 10 min en la oscuridad. El oxígeno se introduce por agitación de la muestra dentro de la celda, con un agitador de alambre, durante 30 seg y después fueron rápidamente congeladas en un baño de hielo seco/ etanol a  $-78^{\circ}\text{C}$ , permitiendo que la muestra se equilibrara durante 5 min en la oscuridad. La preparación se llevó a la temperatura deseada equilibrándose durante 10 a 20 min en el compartimiento de la muestra de un espectrofotómetro de doble longitud de onda Johnson Foundation SDB3, usando un crióstato descrito por Jones y Poole (39). La muestra se barrió dos veces entre 400 y 800 nm y la diferencia se graficó para generar la línea basal. La preparación se expuso a luz actínica (enfocando un rayo de 150 W de un proyector) durante 2 min y su espectro se registró entre 400 y 700 nm, repetidamente, en los tiempos indicados; a cada barrido se le restó el espectro obtenido antes de la fotólisis.

DETERMINACION DE LA AFINIDAD POR OXIGENO DE LA OXIDASA PRESENTE EN *B. cereus*  
MUTANTE *PYMI*

Las oxidasas respiratorias son las enzimas que tienen la mayor afinidad por el oxígeno; sus  $K_m$ 's por  $O_2$ , están en el rango de concentración de  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  M. Esta enorme afinidad plantea problemas técnicos muy serios para la correcta medición de la concentración del  $O_2$  en solución y su variación durante la catálisis de las oxidasas. Las técnicas amperométricas basadas en el uso de electrodos de  $O_2$  tipo Clark, presentan importantes problemas, pues el consumo de  $O_2$  a nivel del electrodo, se ve seriamente limitado por la velocidad de difusión del  $O_2$  a través de la membrana de teflón. El resultado es que las  $K_m$ 's calculadas son, con mucho, sobreestimadas.

La introducción de la técnica espectrofotométrica basada en el uso de hemoproteínas (i.e. mioglobina y leghemoglobina), como monitores de la concentración de  $O_2$  en solución, ha venido a solucionar el problema. Los estados oxigenado y desoxigenado de una globina, se pueden medir de manera dinámica y precisa y su proporción es el reflejo exacto de la concentración de  $O_2$  en solución, ya que de acuerdo a su constante de disociación, la globina se encontrará en equilibrio con el  $O_2$  libre en solución. El espectro óptico de la leghemoglobina en sus diferentes estados, indica el promedio de concentración de oxígeno. El espectro de absorción en la zona del visible de la oxileghemoglobina está caracterizado en la zona  $\alpha$  y  $\beta$  por sus máximos de absorbencia a 541 y 575 nm. En contraste la desoxigenación de la leghemoglobina (edo. reducido), tiene su máxima absorbencia a 560 nm. La determinación de los cambios de absorbencia entre 560-575 nm, monitorea la transición oxi-desoxi que acompaña a la respiración y por tanto el consumo de  $O_2$  de la solución (18). El uso de mioglobina permite medir el  $O_2$  en la solución en un rango de 0.1 a 10  $\mu$ M, mientras que la leghemoglobina ( $K_m O_2 = 0.026$   $\mu$ M) permite medir concentraciones muy pequeñas en el rango de 0.003 a 0.3  $\mu$ M (19).

Para la determinación de afinidad se utilizó como amortiguador de oxígeno la leghemoglobina, lo que nos permitió tener un método muy sensible de determinación (18,19). La leghemoglobina de soya (LHb, donada por el Dr. F. Bergersen, División Industrial de Plantas, CSIRO, Camberra, Australia) se obtuvo de acuerdo a Appleby and Bergersen (1980)(4). La concentración de LHb fue determinada a partir de un espectro absoluto de la forma oxigenada, diluyéndose en un amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7.0, conteniendo 1 mM de EDTA, para obtener concentraciones entre 10 y 20  $\mu$ M; el amortiguador fue previamente burbujado con una mezcla de oxígeno al 1% en argón. La

desoxigenación fue monitoriada por espectrofotometría (65) en modo dual con filtros de interferencia (omega Optical Inc) con máxima transmisión a 560 y 575 nm a una frecuencia de 100 Hz. La solución de HLb (15uM) se vació en una celda de vidrio de 1.3 ml con 1 cm de paso de luz (la celda debe estar completamente llena) y se selló con un tapón que tiene un canal muy fino que permite la entrada de una jeringa Hamilton y que será el lugar por donde se apliquen los reactivos. El sustrato, NADH 3.8 mM, se inyectó en la celda y se esperó a que se estabilizara la forma oxigenada, monitoreando la absorbencia durante 5 a 10 min. Se adicionaron las membranas (0.1 mg de proteína) y se monitoreó en forma continua la deoxigenación de la LHb, graficando el cambio en absorbencia (575 menos 560 nm). Los datos obtenidos fueron digitalizados por medio de scanner usando un software Apple Scan Flexitrace. La velocidad de consumo de oxígeno (V) y el promedio de la concentración de oxígeno libre disuelto (s) se calcularon usando el método de Bergersen y Turner (7) por medio de un software de Microsoft EXCEL. Las gráficas fueron obtenidas usando regresión lineal de un software Cricket Graph. Un valor de K (velocidad de disociación de oxígeno/ velocidad de asociación) de  $50 \times 10^{-9}$  M para la HLb oxigenada, fue usado para estos cálculos (4). Se usaron graficas de V contra V/S (Eadie-Hofstee), para calcular los valores de Km haciendo 5 determinaciones y obteniendose los promedios.

#### **PURIFICACION DE LA OXIDASA PRESENTE EN LA MUTANTE *PYMI* DE *Bacillus cereus*.**

La purificación se hizo a partir de membranas de células de la mutante *PYMI*, crecidas en un medio no fermentable. El esquema de purificación fue el siguiente:

##### **Extracción de citocromos de las membranas.**

- Las membranas fueron resuspendidas en amortiguador con sales biliares (9 mg proteína ml<sup>-1</sup> final). El amortiguador está compuesto por colato de sodio 2 %, desoxicolato de sodio 1%, sulfato de sodio 0.2 M, ditiotreitól 0.5 mM en Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 mM pH 8.0.
- La preparación fue sonicada durante 10 min, con pulsos de 30 seg e intervalos de 2 min, en un baño de hielo; se centrifugó a 144 000 x g durante 40 min.

- El precipitado fue resuspendido en amortiguador de 50 mM de NaCl, 4 % Tritón X 100, en Tris-HCl 50mM pH 8.0, utilizando el mismo volumen usado con el amortiguador de sales biliares. Se incubó durante 30 min en baño de hielo, con agitación lenta y después se centrifugó a 144 000 x g durante 40 min.
- El sobrenadante fue diluido 4 veces en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0, asolectina (10 ug ml<sup>-1</sup>) y se aplicó a una columna de DEAE-Sepharosa Cl-6B.

### **Cromatografía.**

- La columna de DEAE-Sepharosa CL-6B (16cm de largo por 7 cm de ancho; volumen de cama de 350 ml), se equilibró y se lavó con tres volúmenes de un amortiguador conteniendo Tritón X100 0.1 % en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y se eluyó con un gradiente de NaCl (0-600 mM) en el mismo amortiguador. Las fracciones eluidas de la columna se siguieron con un detector Uvicor SII (Pharmacia LKB) equipado con un filtro de 405 nm. De las fracciones con contenido de citocromos se analizaron sus espectros diferenciales de CO (dicionita +CO menos dicionita), en un espectrofotómetro DW 2000. La actividad de oxidasa se midió utilizando como sustratos Asc-TMPD (en las mismas concentraciones mencionadas antes) o tetracloroquinol (4.6 mM) reducido con ascorbato (2mM), en un oxímetro YSI y bajo las condiciones descritas anteriormente. Las fracciones que contenían citocromos capaces de acomplejarse con CO y /o presentaron actividad, fueron mezcladas y dializadas contra el amortiguador de Tritón X100 0.1 % en Tris-HCl 50 mM pH 8.0, durante toda la noche y aplicadas a la siguiente columna.
- La muestra se aplicó a una columna de QAE Toyopearl (22 cm de largo por 2.5 cm de ancho; volumen de cama 100 ml), equilibrada y lavada con amortiguador Tritón X100 0.1 % en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 que se eluyó con un gradiente de NaCl (0-600 mM). Los citocromos se siguieron de la manera mencionada anteriormente y se recuperaron las fracciones que fueron positivas al complejo con CO y /o que presentaron actividad de oxidasa; se dializaron contra amortiguador que contenía Tritón X100 0.1 % en Tris-HCl 50 mM pH 8.
- La muestra se aplicó a una columna de HA ultrogel (20 cm de largo por 2.5 cm de ancho; 80 ml de cama), equilibrada y lavada con Tritón X100 0.1 % en fosfatos de potasio 10 mM pH 7.4. La columna fue eluida con un gradiente de fosfatos (0-500 mM). Los citocromos se siguieron de la

manera mencionada anteriormente y se recuperaron las fracciones que presentaron formación de complejo con CO y/o actividad.

#### **OTROS METODOS.**

La concentración de proteína fue determinada de acuerdo al método descrito por Lowry (45) y modificado por Markwell (49), utilizando como estandar albúmina sérica bovina .

## RESULTADOS.

### LA CADENA RESPIRATORIA DE LA MUTANTE *PYMI* EN COMPARACION CON LA CEPA SILVESTRE

#### Actividades Respiratorias y citocromos.

Examinamos el contenido de citocromos de las cepas silvestre y mutante *PYMI* en células en estadio III de esporulación, crecidas en un medio fermentable; (en el caso de la mutante *PYMI*, el medio contenía K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, en lugar de 0.05 % presente en el medio típico). Obtuvimos los espectros diferenciales reducido con ditionita menos oxidado con persulfato de amonio a 77 K. La **figura 1A trazo a**, muestra que la cepa silvestre contiene citocromo caa<sub>3</sub>, con máxima absorbencia a 445 y 605 nm; los citocromos del tipo b se detectaron por su máxima absorción a 425, 529 y 557 nm y un hombro a 564 nm; observamos también señales muy fuertes a 418, 521 y 550 nm, asociadas a la presencia de citocromos tipo-c. Estos resultados nos muestran los citocromos asociados la cadena respiratoria aeróbica previamente reportada para *B. cereus* (23) compuesta de citocromos tipo-b y -c y la oxidasa terminal, caa<sub>3</sub>. En contraste a la cepa silvestre, la mutante *PYMI* (**Figura 1A trazo b**) no muestra bandas de absorción para citocromos tipo-a; sin embargo las bandas asociadas a los citocromos tipo-b, son observadas a 423, 529 y 554 nm; esta última banda de absorción se ha asociado a la presencia del citocromo bo'. Es importante hacer notar la presencia en la mutante de citocromos tipo-c (520 y 548 nm), cuya función será discutida posteriormente.

De la misma manera que lo muestran los espectros diferenciales reducidos menos oxidados, los espectros diferenciales del complejo con CO de la mutante *PYMI* (**Figura 1B trazo b**), muestran la ausencia de máximas de absorción de citocromos tipo-a, siendo evidentes en el espectro las máximas asociadas con el complejo con CO de un posible citocromo bo' (máxima a 417, 538 y 573 nm, con valles a 431 y 556 nm). Para el caso de la cepa silvestre (**figura 1B, trazo a**) podemos observar tanto las señales características del complejo con CO de los citocromos tipo-a, como las señales para un posible citocromo bo'. Se presenta un hombro a 431 nm, que es la señal combinada de los complejos con CO de citocromos tipo-a (pico a 430 nm) y el posible citocromo bo' (valle a 430 nm). Esta señal combinada se resuelve

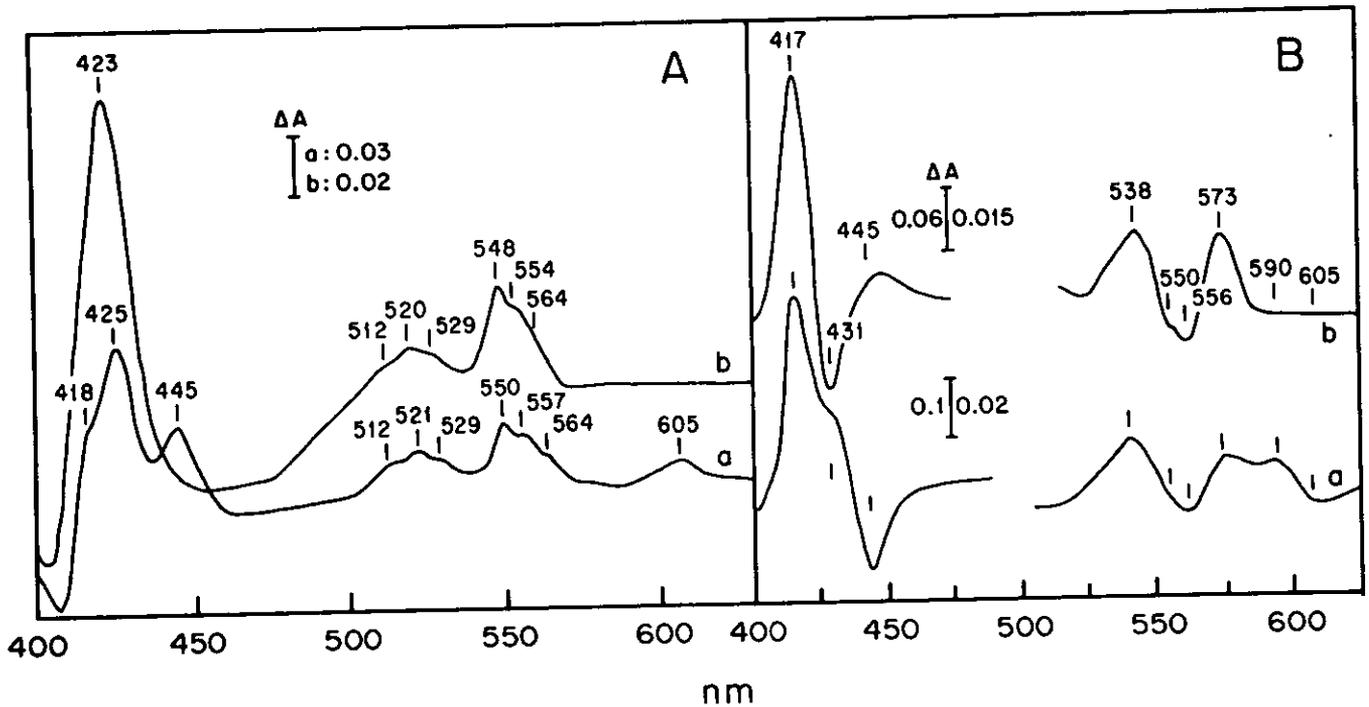


Figura 1. Comparación de los citocromos presentes en *Bacillus cereus* cepa silvestre (trazo a) y mutante *PYMI* (trazo b). Los espectros se obtuvieron a 77 K, con células completas de ambas cepas crecidas en un medio no fermentable hasta fase de esporulación (estadio III). Se tomaron 50 ml de cultivo que fueron cosechados y lavados dos veces con amortiguador Tris-HCl, pH 7.4. El panel A muestra los espectros diferenciales reducido menos oxidado y el panel B los espectros diferenciales del complejo reducido-CO menos reducido. Como reductor se utiliza ditionita y como oxidante persulfato de amonio.

claramente en la región alfa del espectro, produciendo picos a 538 nm y 573 nm y un valle a 556 nm para el caso del complejo con el posible citocromo bo'. El pico a 590 nm y el valle a 604 nm se deben a las bandas de absorción del complejo de CO con citocromos tipo-a. Un pequeño valle a 550 nm se observa en la mutante *PYM 1*, sugiriendo la presencia de un citocromo tipo-c reactivo a CO; esta señal no es evidente en la cepa silvestre.

Las actividades respiratorias, fueron determinadas en membranas de células de ambas cepas crecidas en medio fermentable, hasta el estadio III de esporulación (Tabla II). La capacidad de la cepa mutante *PYM1* para oxidar NADH, no fue afectada significativamente por la ausencia de citocromos tipo-a. En esta mutante las actividades de NADH deshidrogenasa y NADH oxidasa representan de 15% a 20 % menos de las actividades mostradas por la cepa silvestre. De acuerdo con el fenotipo mostrado cuando se aisló en placa, la cepa mutante *PYM1*, muestra actividad de TMPD oxidasa 3.4 veces menor, en comparación a la cepa silvestre.

**Tabla II.** Actividades respiratorias encontradas en membranas de células de *B. cereus* cepa silvestre y *B. cereus* mutante *PYM1*, crecidas en medio fermentable hasta un estadio III de esporulación.

ACTIVIDADES RESPIRATORIAS	<i>B. cereus</i> CEPA SILVESTRE	<i>B. cereus</i> CEPA <i>PYM1</i>
NADH DESHIDROGENASA (nmol DCP/IP/min/mg prot)	164.6 D=3.786 (3)	131.6 D=3.5118 (3)
NADH OXIDASA (natO <sub>2</sub> /min/mg prot).	127 D=2 (3)	101.66 D=7.023 (3)
ASC-TMPD OXIDASA (natO <sub>2</sub> /min/mg prot.)	97 D= 2.6457 (3)	28.66 D=1.5275 (3)

Determinamos la concentración de citocromos presentes en las membranas de células de ambas cepas, crecidas en medio fermentable hasta estadio III de esporulación (Tabla III); de acuerdo con los espectros diferenciales ditionita menos persulfato presentados, los citocromos tipo-a están ausentes en la cepa mutante. En cuanto a los citocromos tipo-c, el contenido fue similar en ambas cepas, lo cuál sugeriría un papel funcional de este tipo de citocromos en la cepa mutante. De los citocromos tipo-b, encontramos 1.6 veces mayor concentración en la cepa mutante (0.463 nmol/mg), que en la silvestre (0.286 nmol/mg); este resultado se asoció con un aumento en la concentración del pretendido citocromo bo' (0.3066 nmol/mg; 4.5 veces mayor en la cepa mutante en relación a la silvestre), determinada por su espectro diferencial del complejo cit bo'-CO. A pesar que la cepa silvestre mostró señales espectrales que sugieren la presencia de un complejo cit bo'-CO (0.068 nmoles/mg), como se verá más adelante, solo cantidades traza de hemo O pudieron ser detectadas por HPLC; estas señales pueden deberse a un citocromo b reactivo con CO que fue descrito previamente en *B. subtilis* por Lauracus y Wikström (43).

. En el caso de *PYMI*, el análisis de hemos mostró cantidades significativas en el contenido de hemo O, el cual se reflejó en el mencionado aumento en la concentración de citocromos tipo b (1.6 veces mayor en la mutante), determinada a partir del espectro reducido menos oxidado (en este tipo de espectros la absorción de citocromo bo' no puede diferenciarse de la de citocromos del tipo b; Figura 1A trazo b). La presencia del hemo O, también se reflejó en la concentración del pretendido citocromo bo' (0.306 nmol/mg), calculada a partir del complejo cit bo'-CO observado en la figura 1B trazo b).

**Tabla III.** Contenido de citocromos presentes en membranas de células de *B. cereus* cepa silvestre y mutante *PYMI*, crecidas en un medio fermentable hasta estadio III de esporulación.

TIPO DE CITOCROMO	<i>B. cereus</i> CEPA SILVESTRE (nmol/mg prot)	<i>B. cereus</i> MUTANTE <i>PYMI</i> (nmol/mg de prot.)
<u>a</u>	0.2166 D= 0.0208 (3)	No detectado
<u>c</u>	0.20 D= 0.2645 (3)	0.2766 D= 0.02516 (3)
<u>b</u>	0.2866 D= 0.0152 (3)	0.463 D=0.01527 (3)
<u>bo</u> -CO	0.068 +/- 0.003 (3)	0.3 066 D= 0.01154 (3)

En estudios previos efectuados en el laboratorio (21) se mostró que la cepa silvestre de *B. cereus* expresaba las mayores actividades respiratorias y concentraciones de citocromos durante las primeras fases de esporulación. Decidimos analizar el patrón de citocromos de las cepas silvestre y mutante *PYMI*, en un medio fermentable en varias fases de desarrollo; también determinamos las curvas de crecimiento, el pH del medio durante el cultivo y el consumo de oxígeno.

Las curvas de crecimiento de ambas cepas fueron bifásicas (Figura 2 A) con una fase fermentativa similar, como lo indicó la rápida caída en el pH del medio (Figura 2 B) y un incremento en la demanda de oxígeno, medida como respiración endógena (Figura 2 C); ambos parámetros son paralelos a las curvas de crecimiento. Una vez que el pH del cultivo de la cepa silvestre alcanzó un pH de 6.6 (a las 3.45 hr) la velocidad de crecimiento disminuyó por un corto período, para después volver a incrementar su velocidad a expensas de los ácidos orgánicos acumulados (poli- $\beta$ -hidroxibutirato). Durante la corta fase lag, la demanda de oxígeno del cultivo se incrementó significativamente y el pH se recuperó. En las fases finales de crecimiento, la inducción de las vías oxidativas permitió la adecuada utilización de los ácidos orgánicos acumulados, recuperándose el pH a sus valores originales. La mutante *PYMI* no fue capaz de incrementar su demanda de oxígeno a un nivel suficiente para permitir la recuperación del pH; de hecho el pH cae hasta 4.5. Este problema en el manejo del pH sugiere que la mutante fue afectada en la inducción de las vías oxidativas, debido a la ausencia de los citocromos del tipo-a, y por lo tanto en su capacidad de utilización de los ácidos acumulados. Aumentando la capacidad amortiguadora del medio, mediante una mayor concentración de  $K_2HPO_4$  (i.e. de 0.05% a 0.1%), la mutante fue capaz de controlar adecuadamente el pH del medio, crecer y esporular de manera casi normal.

Los espectros diferenciales de células enteras reducidos con ditionita menos oxidados con persulfato de amonio se muestran en la Figura 2 D y E; hay cambios claros en el patrón de citocromos durante el crecimiento. De acuerdo a la máxima de absorción observada a 600 nm en la cepa silvestre (98), se sugiere que esta cepa utiliza el citocromo aa<sub>2</sub> durante las fases de crecimiento logarítmica temprana y logarítmica media (trazos a y b en la figura 2 D). Una vez que la fuente de carbono se acaba y el cultivo alcanza el mínimo valor de pH, el citocromo aa<sub>2</sub> aparentemente disminuye para ser sustituido por el citocromo caa<sub>3</sub>; esto puede ser concluido al observar el corrimiento de la señal de 600 nm, primero a 602 y después a 604 nm (máxima de absorción característica del citocromo caa<sub>3</sub>) (Figura 2 D trazos c y

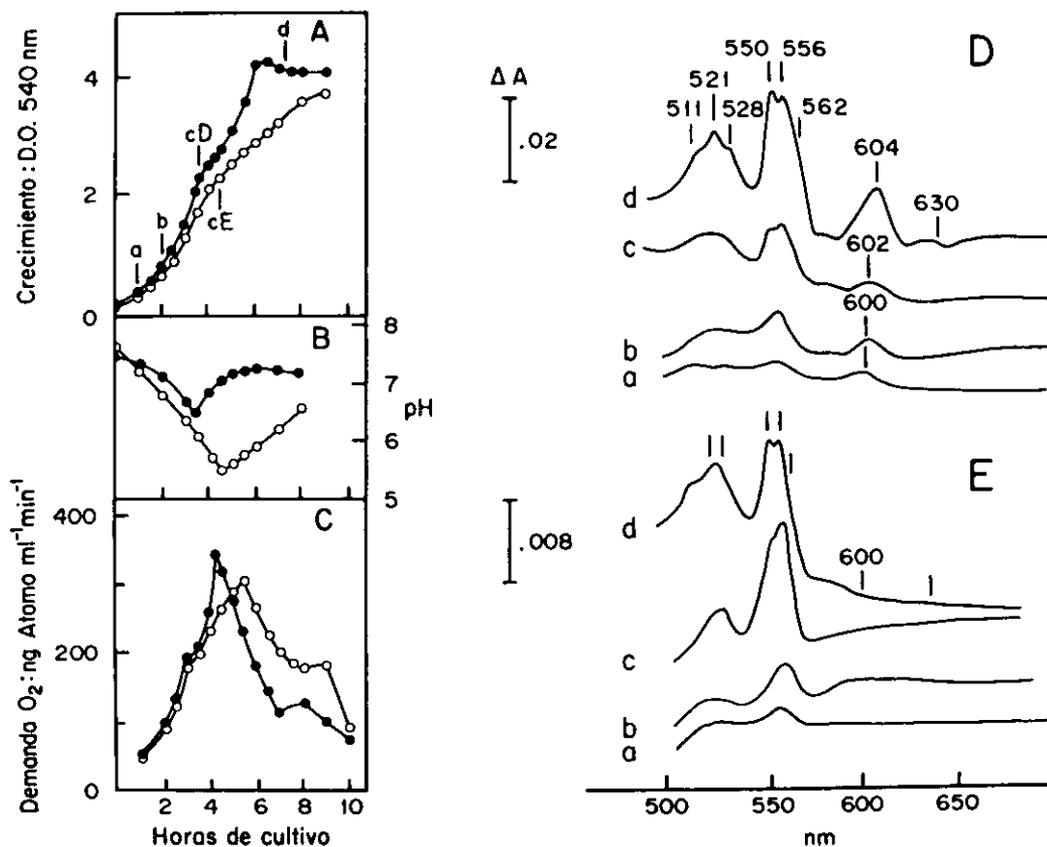


Figura 2. Propiedades de crecimiento y expresión de citocromos en *Bacillus cereus* cepa silvestre (símbolos llenos) y la mutante *PYMI* (símbolos vacíos). El cultivo se realizó en un medio fermentable (sacarosa y extracto de levadura). Se tomaron muestras cada 20 ó 30 minutos y se determinó: (A) absorbencia a 540 nm; (B) pH, y (C), respiración endógena. A partir de 50 ml de muestras del cultivo tomadas a los tiempos indicados en el apartado A, se obtuvieron espectros diferenciales reducidos (ditionita) menos oxidados (persulfato) de la cepa silvestre (D) y de la mutante *PYMI* (E) a 77 K. Los trazos a,b,c y d indican los tiempos a los que fueron tomadas las muestras de acuerdo al panel A.

d respectivamente). Es claro que el citocromo caa<sub>3</sub> juega un papel central durante la esporulación, como se sugiere por su inducción cuando la fuente de carbono se ha agotado y se alcanza el pH mínimo.

En cuanto al citocromo c, las células mostraron un contenido relativamente bajo de este citocromo (máxima absorción a 550 nm) durante las fases logarítmica temprana y logarítmica media (trazos a y b en la figura 2 D), al agotarse la fuente de carbono fue posible observar un incremento en el contenido de citocromo c, el cual se asocia a la presencia en este estadio de crecimiento del citocromo caa<sub>3</sub>.

En contraste a la cepa silvestre, la mutante *PYMI* no muestra las señales características de citocromos del tipo a, en ninguna fase de crecimiento (Figura 2 E). Durante los primeros estadios, la expresión de citocromos del tipo b y c fue evidente por la presencia de un pico asimétrico a 556 nm y pequeños hombros a 550 y 562 nm (Figura 2 E trazos a y b); es importante hacer notar que durante la segunda fase de crecimiento de la mutante *PYMI*, el contenido de citocromo c (máxima absorción a 550 nm) se incrementa simultáneamente con una señal a 556 nm. El citocromo bo' de *E. coli* y algunas otras bacterias ha sido distinguido por su máxima absorción en la zona alfa a 554-556 nm en los espectros reducidos menos oxidados (64), por lo que el incremento en citocromos de tipo-c podría estar relacionado a un incremento en el posible citocromo bo'.

Conocido el patrón de reducción de citocromos en células enteras en presencia de ditionita, era necesario extender nuestro estudio a partículas membranales, obtenidas de distintos estadios del ciclo de vida de la mutante *PYMI*. Se obtuvieron espectros diferenciales (reducidos menos oxidados con persulfato) a 77 K, usándose como sustratos ditionita (A), NADH (B), ascorbato (C) y ascorbato-TMPD (D) (Figura 3); se investigaron los patrones de reducción en membranas de células crecidas en medio fermentable, que fueron cosechadas en diferentes fases de crecimiento: logarítmica (D.O 540 nm de 2.5), estacionaria temprana (D.O. 540 nm de 5.0) y esporulación (estadio III). El patrón de reducción, con todos los donadores de electrones (ditionita, NADH, ascorbato y ascorbato/TMPD) y en todos los estadios de crecimiento (logarítmica, estacionaria temprana y esporulante), son muy parecidos a los que se presenta en las figuras 1 y 2, para células enteras reducidas con ditionita. Como se esperaba, la concentración de citocromos fue mayor en las membranas de células esporulantes, en relación a los otros dos estadios de crecimiento (Tabla IV). En particular, la concentración de citocromo c (máximas de absorción a 416, 520 y 548 nm) es significativamente mayor en membranas de células esporulantes, con cualquiera de los sustratos utilizados (Figura 3 A-D). Van der Oost (98), reportó que la reducción con

ascorbato, puede ser usada para identificar aquellas oxidasas terminales que usan citocromo c como donador de electrones. En nuestro caso, cuando usamos solamente ascorbato como sustrato, observamos máximas de absorción a 548, 553 y 560 nm (Figura 3 C); este patrón sugiere la reducción de citocromos tipo-c, tipo-b y probablemente de tipo- bo'. De acuerdo a este resultado, juzgamos como probable, la participación de un citocromo c, como donador directo de electrones para la oxidasa terminal de la mutant *PYMI*.

Se midieron las actividades respiratorias asociadas a membranas de células cosechadas en dos de los estadios de crecimiento mencionados (logarítmico y esporulante). Las actividades respiratorias en el estadio III de esporulación, fueron entre 2.6 y 3.3 veces más altas que aquellas presentes en la etapa vegetativa. La mutante *PYMI*, fue aislada por presentar una lenta reacción con ascorbato/TMPD en placa (ver materiales y métodos); de acuerdo con este fenotipo, la actividad de NADH oxidasa, fue varias veces mayor que la actividad de ascorbato/TMPD oxidasa (Tabla IV).

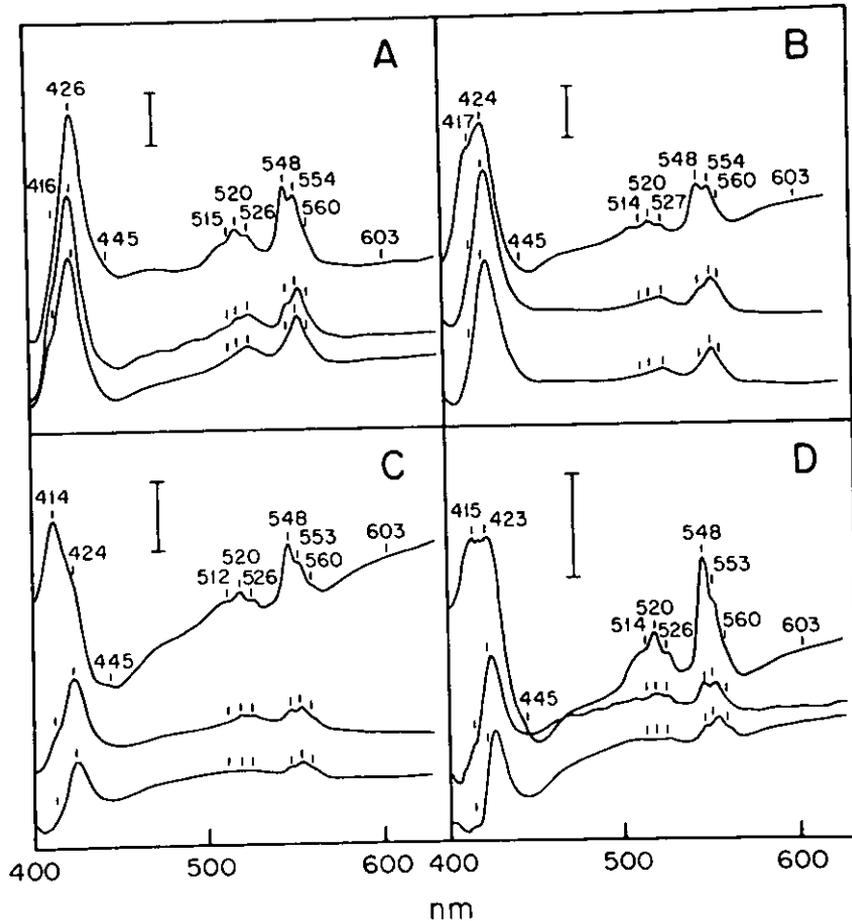


Figura 3. Patrón de reducción de citocromos presentes en membranas de *Bacillus cereus* cepa mutante *PYMI*. La bacteria fue crecida en un medio fermentable y cosechada en fase de crecimiento logarítmica (D.O. 540= 2.5; trazos inferiores en cada recuadro), fase estacionaria (D.O: 540= 5; trazos intermedios en cada recuadro) y fase esporulante estadio III (trazos superiores en cada recuadro). Se obtuvieron espectros diferenciales reducidos menos oxidados a 77 K, utilizando los siguientes reductores (A) ditionita; (B) NADH 5.0 mM (C) ascorbato 10 mM ó (D) ascorbato 10 mM más TMPD 1,0 mM y como oxidante persulfato de amonio; preparaciones con 6 mg de proteína de membrana fueron incubados durante 30 min a temperatura ambiente, con cada uno de los sustratos, y después congelados para obtener el espectro correspondiente.

**Tabla IV.** Actividades respiratorias y concentraciones de citocromos en fase logarítmica y esporulante (estadio III) de crecimiento de la mutante *PYMI*.

ACTIVIDADES RESPIRATORIAS	ESTADIO DE CRECIMIENTO		
	FASE LOGARITMICA	ESPORULACION III	RELACION SPO/LOG
NADH DESHIDROGENASA <sup>1</sup>	63 D=3.60555 (3)	131.6 D=3.5118 (3)	2.08
NADH OXIDASA <sup>2</sup>	31 D=2 (3)	101.66 D=7.023 (3)	3.28
ASCORBATO OXIDASA <sup>2</sup>	7.93 D= 0.0441 (3)	21.33 D=2.5166 (3)	2.6
ASCORBATO/TMPD OXIDASA <sup>2</sup>	10.23 D= 1.0785 (5)	28.66 D= 1.5275 (5)	2.8
CONCENTRACION DE CITOCROMOS (nmol/mg)			
<u>c</u>	0.07066 D= 0.0020 (3)	0.2766 D= 0.02516 (3)	3.9
<u>b</u>	0,223 D=0.0152 (3)	0.463 0.01527 (3)	2.04
CO- <u>o</u>	0.1033 D= 0.0152 (3)	0.3 066 D=0.01154 (5)	2.96
<u>aa<sub>3</sub></u>	No está presente	No está presente	-----

1 actividad en nmol de DCPIP/min /mg proteína

2 natO<sub>2</sub> / min /mg de proteína.

Tanto para *B. subtilis* (98) como para *B. firmus*, (29) ha sido reportado que la mayor parte de la actividad de TMPD oxidasa es atribuible a la citocromo caa<sub>3</sub>. Para el caso de la mutante *PYMI*, que carece tanto de citocromo aa<sub>3</sub> como de citocromo caa<sub>3</sub>, la actividad de TMPD oxidasa observada es presumiblemente debida a la expresión de un posible citocromo bo. El hecho de que las actividades con

ascorbato o con ascorbato/TMPD oxidasa, en ambos estadios de crecimiento, son muy similares, apoya la propuesta de un papel funcional para uno o más citocromos del tipo  $c$  en la cadena respiratoria de la mutante *PYM I*.

### INHIBIDORES DE LA CADENA RESPIRATORIA Y OXIDACION DE CITOCROMO $c$ EN LA MUTANTE *PYMI*

Se probó el efecto que inhibidores de sitio II y III tienen sobre la actividad de NADH oxidasa en membranas obtenidas de células de ambas cepas. La actividad promovida por NADH en los dos tipos de membranas fue sensible a la inhibición por el análogo de quinona 2-n-heptil-4-hidroxi-quinolin-N-óxido (HOQNO) (Figura 4A), observándose una inhibición de entre 80 y 90 %; el TMPD fue capaz de restaurar la respiración en ambas cepas, sugiriendo que los electrones son donados a un citocromo  $c$  que se encuentra después del quinol.

Para el caso de usar como inhibidores antimicina y mixotiazol, Kutoh y Sone (42) han reportado que el citocromo  $bc_1$  del bacilo *PS3* es un complejo del tipo  $bc_1$  y como consecuencia este complejo es menos sensible al efecto de antimicina y mixotiazol. De la misma manera que para *PS3*, la NADH oxidasa de *B. cereus*, tanto en la cepa silvestre como en la mutante *PYMI*, fue poco sensible a estos inhibidores. Tanto la cepa silvestre como la mutante fueron inhibidas a concentraciones altas de antimicina (figura 4 B) o mixotiazol (Figura 4 C), lo que sugiere que el complejo  $bc_1$  presente en *B. cereus* es semejante al reportado en el bacilo *PS3*. Como ocurrió para HOQNO, en todos los casos la actividad respiratoria puede ser restaurada por adición de TMPD.

Los citocromos  $aa_3$  y  $caa_3$  de *B. cereus* son altamente sensibles a la inhibición por CO y KCN (24). Así, nuestros resultados muestran que la TMPD oxidasa de membranas de la cepa silvestre fue significativamente más sensible a CO que su contraparte en las membranas de la mutante *PYMI* (Figura 4 D), observándose que a 30 % de saturación de CO, la oxidasa de la cepa silvestre estaba inhibida un 80 %, mientras que la enzima de la mutante *PYMI*, solo lo estaba en un 30 %.

Al usar KCN como inhibidor, la diferencia fue aún mayor (Figura 4 E); para el caso de la cepa silvestre la actividad de TMPD oxidasa fue muy sensible (figura 4 E, círculos llenos), observándose una inhibición del 90 % a una concentración de KCN de entre 5 y 10  $\mu$ M, mientras que la curva de inhibición de la actividad de NADH oxidasa fue bifásica (Figura 4 E triángulos llenos),

presentando un componente de alta resistencia al inhibidor. En la mutante *PYMI*, tanto la actividad de NADH como la de TMPD oxidasa (Figura 4 E círculos y triángulos vacíos) fueron de manera semejante resistentes a la inhibición por KCN; con una concentración de KCN de 0.2 mM se obtuvo una inhibición de entre el 40 y el 50 %. Esta resistencia a la inhibición por KCN, nos muestra que la oxidasa presente en la mutante *PYMI* se comporta de manera diferente a un citocromo bo' clásico, como el que se presenta en *E. coli*; este citocromo presenta una sensibilidad intermedia (entre citocromos del tipo a y la oxidasa de *PYMI*) al KCN. Las propiedades de resistencia a CO y KCN de esta oxidasa, la hacen muy interesante y serán necesarios estudios adicionales para explicar su baja sensibilidad.

Como hemos mencionado, se ha postulado que en el género *Bacillus* el donador de electrones para citocromos tipo bo' podrían ser citocromos del tipo c (6, 20,86). Cuando reducimos preparaciones membranales de la mutante *PYMI* de manera selectiva con ascorbato (figura 3 C), podemos observar además de la reducción de citocromo c (548 nm), la reducción de un previsto citocromo bo' (554 nm). Decidimos investigar si la oxidación de este citocromo bo' es acompañada por la oxidación de un citocromo c; con este propósito, se llevó a cabo una titulación con KCN de la oxidación de citocromos reducidos con NADH presentes en la cadena respiratoria de la mutante *PYMI*. Se hicieron espectros diferenciales a 77 K de muestras anaeróbicas reducidas con NADH menos referencias reducidas con NADH y a continuación, oxidadas con aire (se agitaron en el vortex durante 1 min). Tanto las muestras como las referencias tienen KCN en las concentraciones crecientes mostradas en la figura 4F. Se observa que la oxidación de citocromo c (550 nm) y b (556 y 563 nm) disminuye de manera paralela conforme se incrementa la concentración de KCN (Figura 4 F); se requirió una concentración de 0.8 mM de KCN para detener el transporte de electrones a través de estos citocromos. Las curvas de inhibición por KCN de la oxidación de los citocromos y de la actividad de NADH oxidasa en la cepa mutante *PYMI* (figura 4 E) pudieron sobreponerse (figura 4 G), sugiriendo que un citocromo tipo c es un intermediario en el camino de electrones a citocromo bo' oxidasa. Más adelante aportaremos mayor evidencia que demuestra claramente que un citocromo c es el donador de electrones para la oxidasa bo' de la mutante *PYMI*.

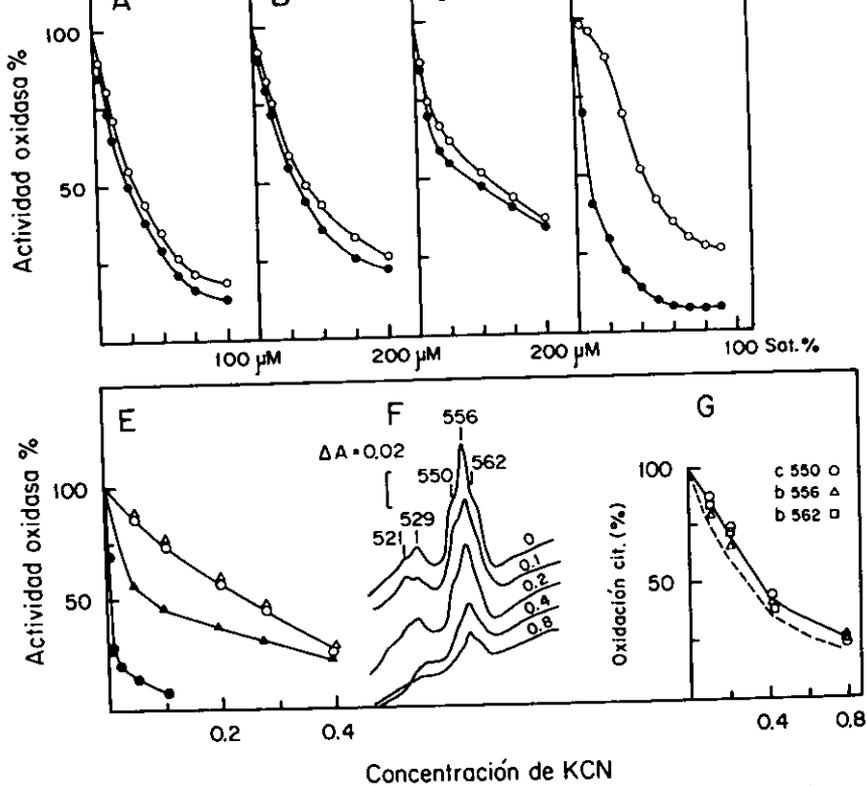


Figura 4. Efecto de inhibidores sobre la respiración dependiente de sustrato, de membranas de células crecidas en medio fermentable hasta fase de crecimiento logarítmica, de *B. cereus* cepa silvestre (símbolos llenos) y la cepa mutante *PYMI* (símbolos vacíos). La actividad de NADH oxidasa (5 mM de NADH) se tituló con HOQNO (A), antimicina (B) ó mixotiazol (C). El efecto inhibitorio del CO sobre la actividad de Asc-TMPD oxidasa se muestra en D. En E, se muestra el efecto del KCN sobre la actividad respiratoria utilizando como sustratos 5 mM de NADH (triángulos) o 10 mM de ascorbato más 0.1 mM de TMPD (círculos); para todos estos casos, la cantidad de proteína de membrana utilizada fue de 1.2 mg /ml. Las actividades específicas en ausencia de inhibidor fueron: membranas de la cepa silvestre, NADH oxidasa 130 y ascorbato/TMPD oxidasa 90 ngat O<sub>2</sub>/min/mg proteína; para la cepa mutante *PYMI*, NADH oxidasa 100 y ascorbato/TMPD oxidasa 29 ngat de O<sub>2</sub>/min/mg proteína. En los siguientes paneles mostramos para la mutante *PYMI*, el efecto de la concentración de KCN sobre la oxidación de citocromos reducidos por NADH y posteriormente oxidados con aire (F). Muestras de membranas (6.0 mg de proteína/ml) fueron burbujeadas con N<sub>2</sub> (gas) e incubadas con 10 mM de NADH a las concentraciones indicadas de KCN, durante 30 min. La muestra que será usada como referencia se oxida por agitación vigorosa durante 1 min y se congela inmediatamente en nitrógeno líquido. Se obtiene los espectros diferenciales anaeróbico menos aeróbico a 77 K. En G, se muestra la gráfica con los resultados obtenidos del efecto del KCN sobre la oxidación de los diferentes citocromos observada en los espectros (línea continua) y la actividad de NADH oxidasa (línea punteada).

## Citocromo c.

El citocromo bo' clásico, que se presenta en *E. coli*, es una oxidasa que recibe los electrones del quinol y al parecer la oxidasa presente en la mutante *PYM1* sería un citocromo bo', que recibe electrones de un citocromo c. Habiendo varios tipos de citocromo c es pertinente identificar los citocromos c que están presentes en las membranas de esta mutante y especular acerca de su función. Para ello, membranas de las cepas silvestre y *PYM1*, fueron lavadas con acetona ácida para extraer los hemos unidos no covalentemente y se obtuvieron espectros diferenciales (reducido con ditionita menos oxidado con persulfato) de los residuos membranales; los espectros obtenidos (Figura 5 A), muestran un patrón homogéneo para citocromos del tipo-c, con máximas de absorción a 419, 509, 520 y 550 nm. El análisis electroforético (SDS-PAGE), de membranas de ambas cepas, nos muestra que este espectro es debido a la presencia de al menos 4 diferentes citocromos c asociados a membrana (Figura 5 B). Las masas moleculares (Mr) estimadas fueron de 14, 25, 29 y 37.5 Kda; este patrón es muy similar al descrito por Van der Oost en *B. subtilis* (98). La proteína representada por la banda de 14 KDa es muy similar al citocromo c<sub>550</sub> de *B. subtilis* (100). La banda de 37.5 KDa corresponde a la subunidad COII de la oxidasa caa<sub>3</sub> de *B. cereus* (24) y de *B. subtilis* (97). Las banda de 29 y 25 KDa podrían relacionarse a las subunidades de 29 y 25 Kda de la quinol citocromo c oxidoreductasa identificada en *B. subtilis* (104) donde el citocromo c (Mr 29KDa) y el citocromo b (Mr 22KDa), tienen sus respectivos citocromos unidos covalentemente. En el bacilo *PS3* (41) se ha identificado el mismo patrón de Mr aquí descrito.

## Apoproteínas.

De acuerdo a los resultados mostrados con la tinción de hemos en la figura 5B, la cepa mutante expresa a la subunidad COII (Mr= 37.5) en cantidad semejante a la que se encuentra en la cepa silvestre. Esto es particularmente interesante pues a pesar de que no se detecta por espectroscopía citocromo caa<sub>3</sub>, la subunidad COII parece estar expresándose e incorporándose a las membranas, en cantidades normales. Lo anterior nos motivó para probar si la COI de caa<sub>3</sub> así como las dos subunidades de la oxidasa aa<sub>3</sub>, están presentes en las membranas de la mutante *PYM1*. Para responder a esto, se extrajeron proteínas de membranas de ambas cepas con SDS y se analizaron por inmunoréplica tipo Western, utilizando antisuero contra la oxidasa aa<sub>3</sub> purificada de *B. cereus* cepa silvestre. Para ambas

cepas, el antisuero contra aa<sub>3</sub> reveló la presencia de tres bandas principales (figura 5 C): una banda a 30 KDa que corresponde a la subunidad II de la oxidasa aa<sub>3</sub>; la banda de 37.5 KDa de la subunidad COII de caa<sub>3</sub> (subunidad II), que ya había sido observada con la tinción de hemos y una banda a 51 KDa que podría ser el resultado de la comigración de COI (subunidad I) de la oxidasa caa<sub>3</sub> y la subunidad I de la oxidasa aa<sub>3</sub> (24); esta última banda en la mutante *PYMI* tiene una reacción significativamente más débil que en la cepa silvestre, sugiriendo niveles más bajos de una o de ambas de las subunidades pesadas que comigran. La presencia de las apoproteínas de las oxidasas tipo-a en la cepa mutante *PYMI*, donde no existen las holoenzimas funcionales, abre la posibilidad de un ensamble promiscuo de las apoenzimas caa<sub>3</sub> y/o aa<sub>3</sub> con hemos B y O, de la misma manera que ocurre en la enzima promiscua cao' descrita en el bacilo PS3 cuando se le obliga a crecer en baja aereación (87).

### Hemos.

La identificación de un citocromo tipo bo' debe ser avalada por la identificación de su hemo O. Como hemos mencionado, a partir del descubrimiento del hemo O por HPLC, se hizo posible y necesario confirmar la presencia de hemo O en nuestra preparación. Se decidió determinar la composición de hemos de las oxidasas de membranas de células esporulantes de las dos cepas crecidas en un medio no fermentable, para lo cual se hizo la extracción de hemos con acetona ácida y se analizaron por HPLC en fase inversa (Figura 6). Para este ensayo la columna fue calibrada con hemos A, B y O (obtenidas de las fuentes indicadas en materiales y métodos). El cromatograma de la preparación obtenida de membranas de la cepa silvestre (Figura 6A) mostró 2 picos principales con tiempos de retención correspondientes a hemo B (27 min) y hemo A (32 min), observándose cantidades traza de hemo O (34.5 min); Por otro lado, la cepa mutante *PYMI* (Figura 6 B) muestra también 2 picos principales, aunque con un patrón diferente: puede observarse el hemo B (27.5 min) y el hemo O (34.5 min); de acuerdo con su fenotipo solo se puede observar cantidades traza de hemo A (32 min). La cantidad relativa de hemos B:A:O en la cepa silvestre fueron estimadas en la siguientes proporciones: 1.0:0.5:0.014, mientras que en la cepa mutante *PYMI* la relación fue 1.0:0.009:0.46, lo que va de acuerdo con los resultados encontrados en los espectros diferenciales donde observamos, en la cepa mutante *PYMI*, señales relevantes para un citocromo bo'.

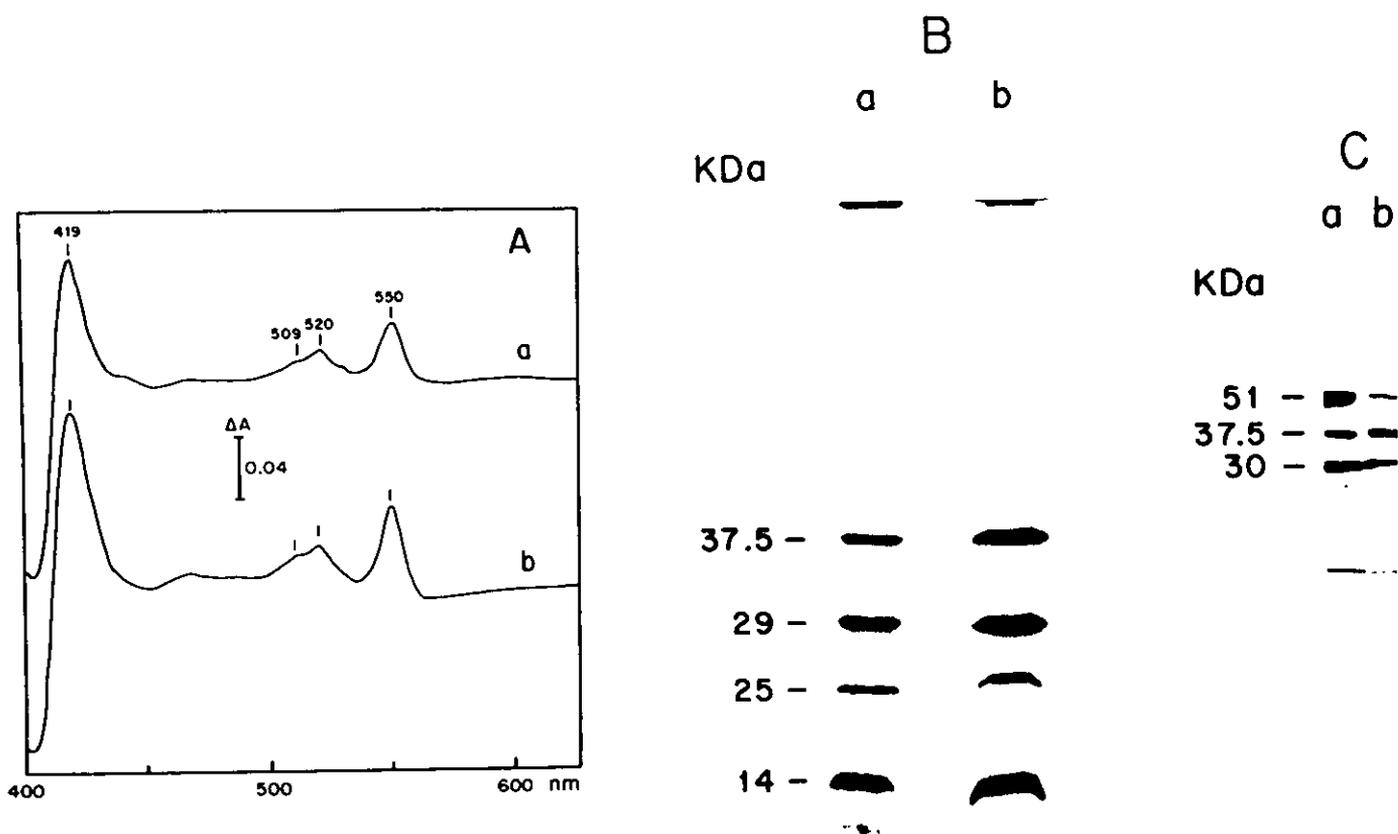


Figura 5. Patrones espectrofotométrico y electroforético de proteínas con hemo tipo-c, y de subunidades de las apoproteínas presentes en *Bacillus cereus* cepa silvestre y mutante *PYM1*. A: 3.4 mg de proteína de membranas de las cepas silvestre (a) y mutante *PYM1* (b), fueron lavadas con acetona ácida y se obtuvieron sus espectros diferenciales reducido (ditionita) menos oxidado (persulfato) a 77 K. B: Con 0.5 mg de proteína de membranas de las cepas silvestre (a) y mutante *PYM1* (b) se realizó una electroforesis SDS-PAGE en un gradiente de concentración de acrilamida (10% a 16 %); las proteínas fueron teñidas por su actividad de peroxidasa. C: Inmunoréplica tipo Western. Con 0.15 mg de proteína de membranas de las cepas silvestre (a) y mutante *PYM1* (b) se realizó una electroforesis SDS-PAGE (10 % de acrilamida). Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa, las cuales se hicieron reaccionar con anticuerpos contra la oxidasa  $\alpha\alpha_3$  purificada de membranas de la cepa silvestre; la reacción fue revelada con anticuerpos contra antisuero de conejo, conjugados con peroxidasa de rábano.

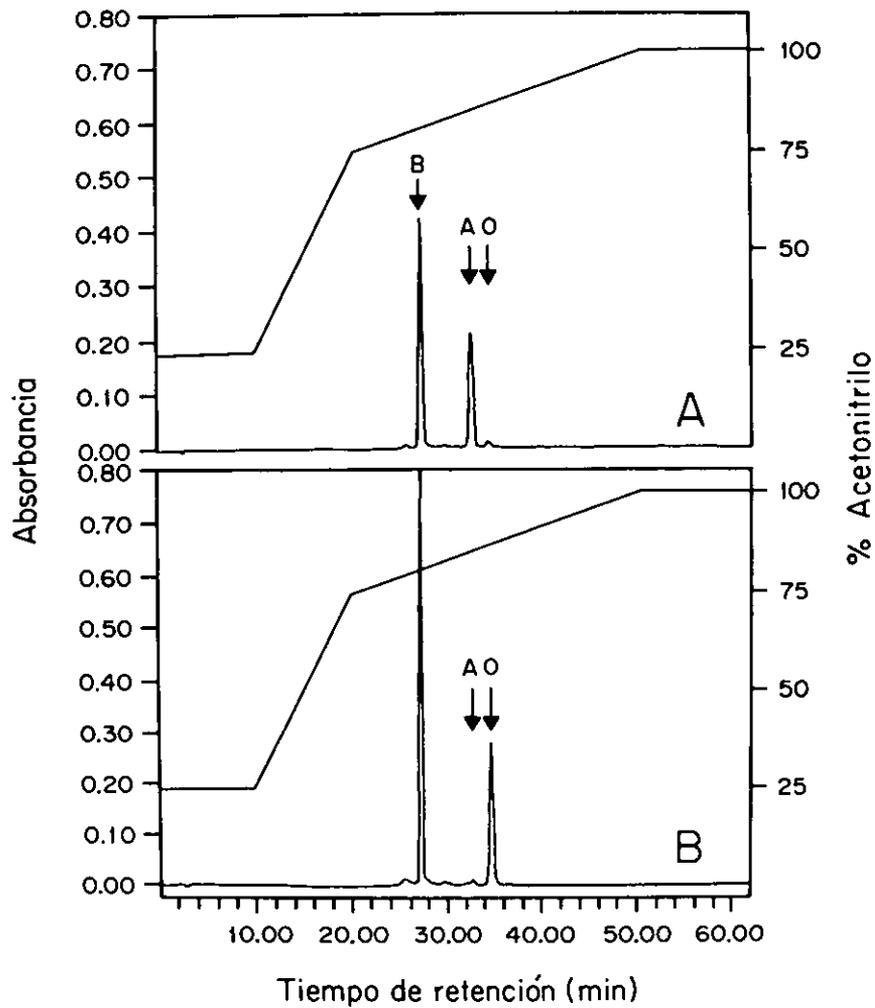


Figura 6. Cromatograma de HPLC fase reversa de los hemos extraídos de membranas (40 mg) de *B. cereus* cepas silvestre (A) y mutante *PYMI* (B). El sistema fue calibrado con los siguientes estándares: hemos B y O extraídos de *E. coli*; Hemos B y A extraídos de partículas submitocondriales de corazón de bovino y protohemo IX obtenido de Sigma. Los tiempos de retención obtenidos para los estándares y de los hemos de ambas cepas de *B. cereus* fueron: hemo B, 27.5 min; hemo A, 32 min; hemo O, 34.5 min.

El análisis de hemos demostró que en las membranas de la cepa silvestre no se detectaron cantidades significativas de hemo O y por lo tanto no hay citocromo bo'. En la cepa mutante *PYMI*; la ausencia de hemo A, es compensada por cantidades significativas de un hemo O. Sin embargo, este resultado no nos asegura que se trate de un citocromo bo' "bona fide", sobre todo tomando en cuenta que las apoproteínas que constituyen a las oxidasas de tipo a están presentes en la mutante *PYMI*. De esta manera la posible oxidasa bo' de esta mutante podría tener su origen en una sustitución promiscua con los hemos B y O en las apoproteínas de los citocromos tipo a. Esta pregunta podría contestarse al purificar la oxidasa presente en la mutante *PYM 1*.

También en estudios previos hechos en el laboratorio (21) reportamos que la expresión de los diferentes citocromos en la cepa silvestre dependen del medio en donde se crece la bacteria. Decidimos determinar el tipo de hemos que se expresan en ambas cepas, silvestre y mutante *PYMI*, cuando se crecen en diferentes medios. Para hacer esto se obtuvieron membranas de células crecidas en un medio fermentable (sacarosa y extracto de levadura), mixto (casaminoácidos y sacarosa/extracto de levadura) y no fermentable (casaminoácidos o caldo nutriente). Los resultados fueron similares para la cepa silvestre en los tres tipos de medio. En la **figura 7**, mostramos los cromatogramas de hemos extraídos de membranas crecidas en medio fermentable (**esquema A**) y de membranas extraídas de medio no fermentable (**esquema B**) donde los cromatogramas muestran picos asociados a hemo B (27.5 min) y hemo A (32 min) sin importar el medio utilizado para el crecimiento.

El panorama fue distinto cuando se analizan los hemos de la cepa mutante *PYMI* crecida en diferentes medios. Para los medio no fermentable y mixto, encontramos el mismo perfil que ya mencionamos, con un tiempo de retención de 27.5 min para hemo B y un tiempo de retención de 34.5 min para el hemo O (**Figura 8 B**). Sin embargo, cuando se analizan los hemos de membranas de células crecidas en medio fermentable encontramos diferencias en el tiempo de retención (**Figura 8A**): el hemo B muestra el tiempo usual de retención (27.5 min), pero el hemo O es retenido durante más tiempo (36.5 min). En un reporte sobre análisis de hemos en una *Archaea*, *Thermoplasma acidophilum* (47), mencionan una serie de hemos nuevos, con modificaciones en la cadena lateral del anillo pirrólico. Encuentran tres variantes preniladas de hemo O a los que llaman Ot, Op1 y Op2; estas variantes de hemo O presentan mayor hidrofobicidad como resultado de los cambios en sus cadenas laterales; este aumento en la hidrofobicidad se refleja como mayores tiempos de retención en un análisis de HPLC, como el que

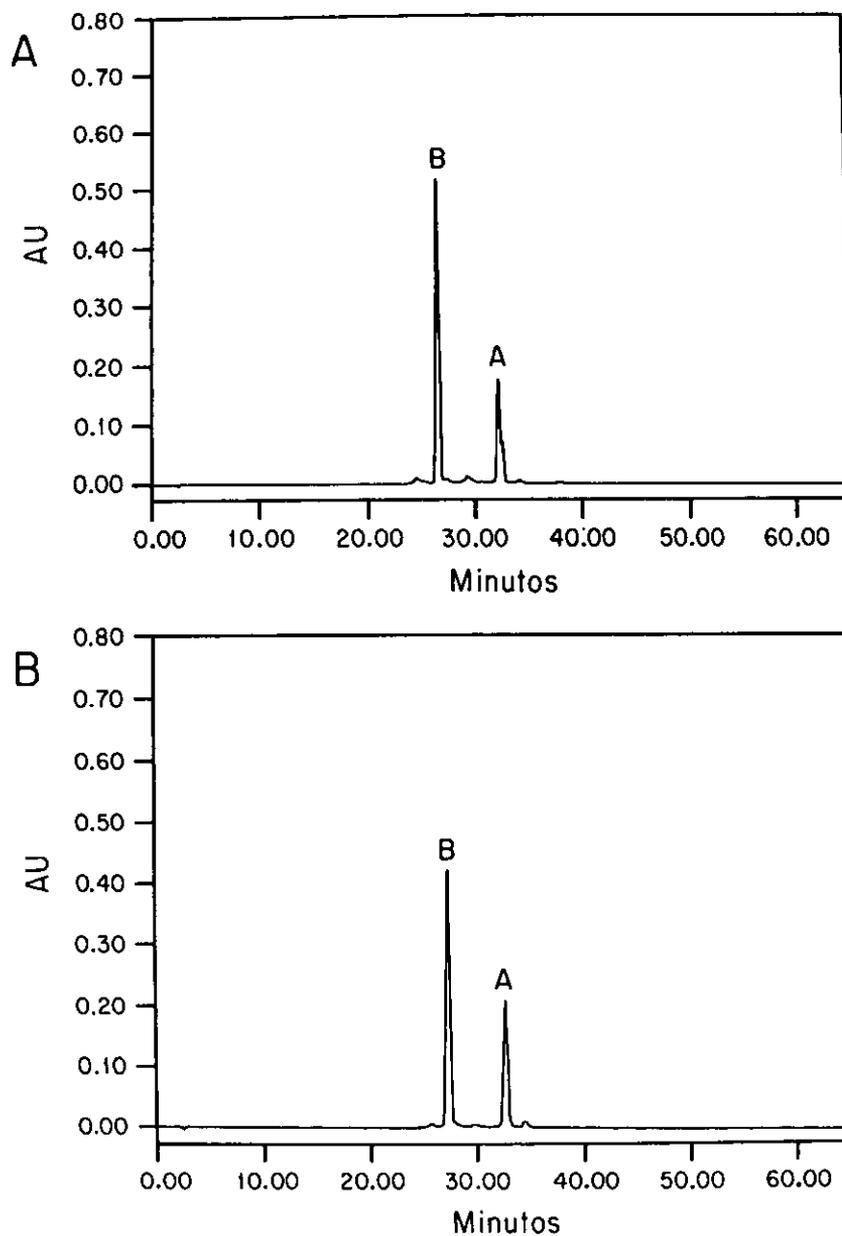


Figura 7. Cromatogramas de HPLC fase reversa de hemomas extraídos de membranas de *B. cereus* cepa silvestre crecida en dos diferentes medios: (A) medio fermentable; (B) medio no fermentable. La calibración de la columna y los tiempos de retención obtenidos son los mismos que para la figura 5.

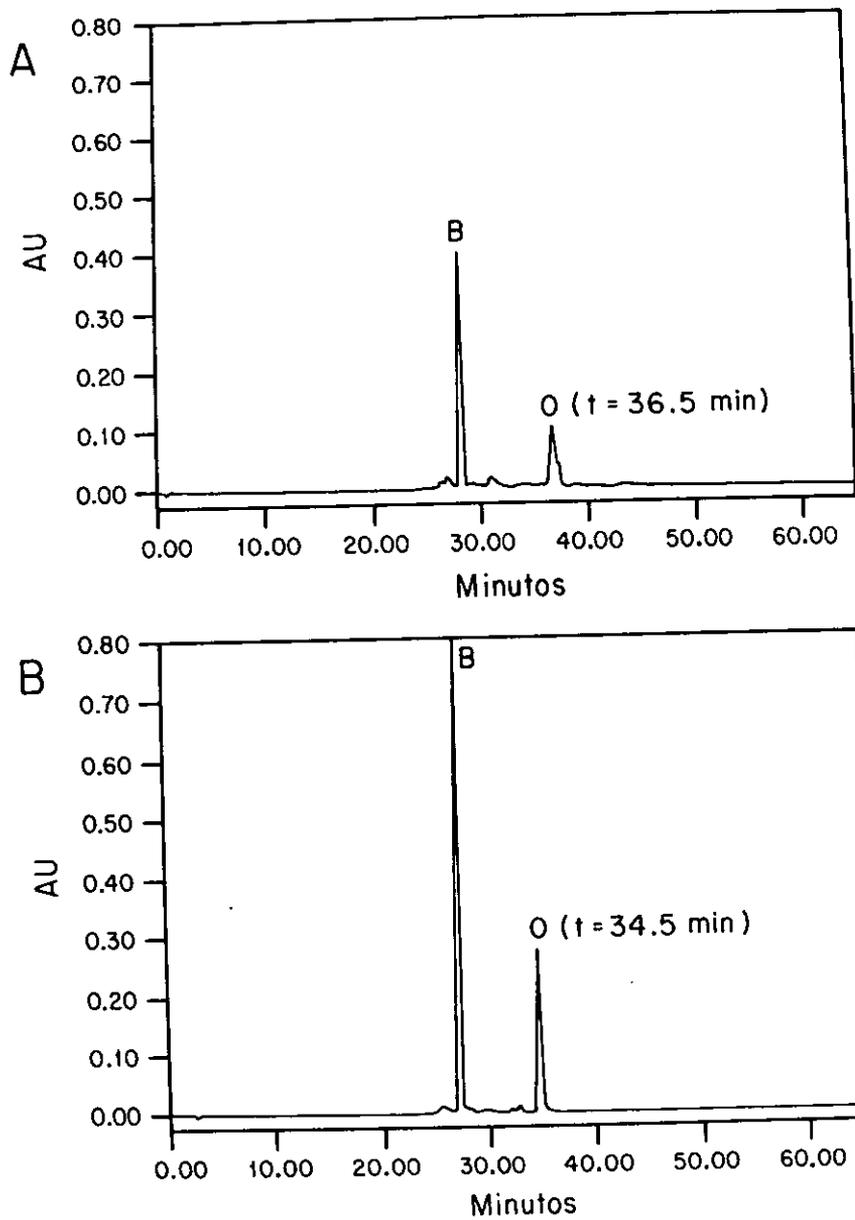


Figura 8. Cromatograma de HPLC en fase inversa de hemos extraídos de membranas de *B. cereus* cepa mutante *PYMI* crecida en diferentes medios. (A) medio no fermentable y (B) medio fermentable. La calibración y los tiempos de retención son los mismos mencionados en la figura 5.

nosotros hacemos. Es posible que el mayor tiempo de retención observado para el del hemo O de membranas de células crecidas en el medio fermentable puede deberse a una modificación química de este hemo. Será necesario hacer estudios adicionales en este sentido.

## CRIOENZIMOLOGIA DE MEMBRANAS DE *B. cereus* CEPA SILVESTRE Y MUTANTE *PYMI*

### Espectros diferenciales con CO y de fotodisociación en la mutante *PYMI*.

Los resultados mostrados anteriormente nos indicaron la existencia de un nuevo citocromo en *B. cereus*, con posible función de oxidasa, y que está conformado por hemos B y O; los resultados también sugirieron la participación del citocromo  $\rho$  como donador de electrones a esta oxidasa. Para demostrar la función de esta proteína como oxidasa terminal, se hicieron estudios de intercambio de ligandos  $O_2/CO$  a temperatura subcero y se determinó su capacidad de formar intermediarios oxigenados.

Se obtuvieron espectros diferenciales red+CO menos reducido a temperatura ambiente, de membranas de células vegetativas de la mutante *PYMI*, crecidas en medio no fermentable (Figura 9A) (los mismos resultados se obtuvieron con membranas de células en fase estacionaria y esporulante); se utilizaron como reductores ditionita (trazo a), NADH (trazo b), ascorbato (trazo c) y ascorbato/TMPD (trazo d). Con cualquier reductor usado, los espectros diferenciales obtenidos muestran las mismas bandas de absorbencia; se observan, en la zona del Soret, un pico a 417 y un valle a 433 nm y en la zona del visible, picos a 540 y 568 nm y un valle a 558 nm; éstas máximas de absorbencia están asociadas con la formación del complejo cit  $\rho$ -CO, de manera similar a lo reportado para el complejo cit  $\rho$ -CO de *E. coli* (63,65).

El complejo formado con el CO y las oxidasas terminales, puede ser fotodisociado por la acción de luz actínica, dando bandas de absorbencia características. La sensibilidad de este complejo a la luz es mucho mayor a bajas temperaturas. Decidimos determinar los espectros de fotodisociación de la oxidasa presente en membranas de la mutante *PYMI* y para ello, preparaciones reducidas con ditionita (trazo a), NADH (trazo b), ascorbato (trazo c) y ascorbato/TMPD (trazo d), fueron burbujeados con CO y congeladas a  $-105^\circ C$ ; las muestras se expusieron a luz actínica para fotodisociar el complejo

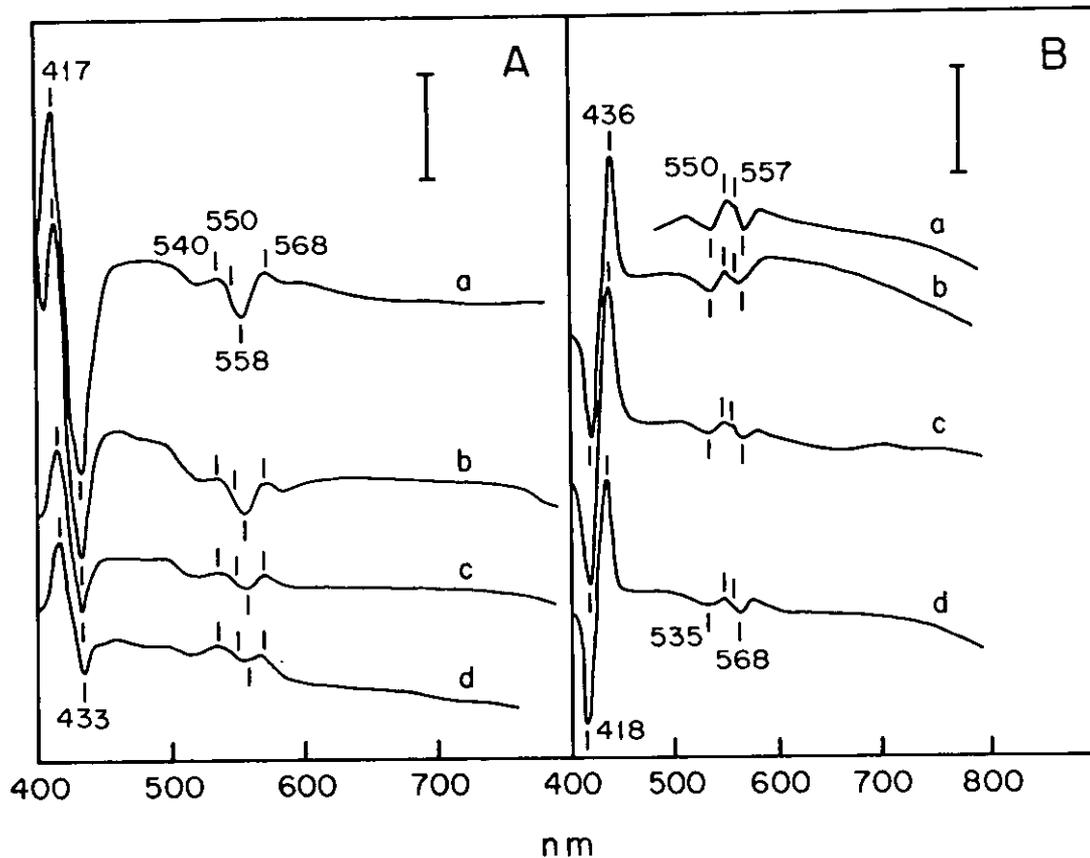


Figura 9. Formación de complejo cito-CO y fotodisociación de este complejo en *B. cereus* mutante *PYM1*. Se obtuvieron espectros diferenciales reducido-CO menos reducido a temperatura ambiente (A) y espectros de fotodisociación del complejo a  $-105^{\circ}\text{C}$  (B) de membranas de células de la mutante *PYM1* crecidas hasta fase logarítmica en medio fermentable. Se utilizaron 8 mg de proteína que fueron reducidas con los siguientes reductores: ditionita (trazo a); NADH 5.0 mM (trazo b); ascorbato 10 mM (trazo c) y ascorbato 10 mM más TMPD 1.0 mM (trazo d). Después de 30 min de reducción, las muestras fueron burbujeadas con CO durante 3 min y se obtuvieron los espectros diferenciales. Para los espectros de fotodisociación las preparaciones reducidas y acomplexadas con CO fueron congeladas y los espectros obtenidos a  $-105^{\circ}\text{C}$ . La línea basal se obtiene de restar el espectro antes de fotodisociar, de él mismo. Cada preparación fue fotodisociada a  $-105^{\circ}\text{C}$  y el espectro obtenido se resta del espectro antes de la fotólisis.

cito-CO y se obtuvieron espectros sucesivos que se restan del espectro obtenido antes de fotodisociar (Figura 9 B). Los espectros obtenidos fueron similares con cualquier reductor usado; en la zona de Soret se observan un valle a 418-419 nm y un pico a 436 nm y en la zona del visible valles a 535 y 568 nm y picos a 550 y un hombro a 557nm. Estas bandas de absorbencia fueron las esperadas cuando se genera un citocromo del tipo-bo' reducido, no ligado a CO, como resultado de la fotodisociación del complejo, y se asemejan al espectro característico de fotodisociación del complejo cit o-CO de *E. coli* (65). No hay indicio espectral de la formación y disociación de complejos típicos para otras oxidasas bacterianas.

### Determinación de la presencia de un hemo de alto spin en la mutante *PYMI*

Un átomo de hierro de alto spin tiene cuatro electrones desapareados en Fe (II) y cinco electrones desapareados en Fe (III), dando como resultado spin de 2 y 5/2, respectivamente; por lo tanto, el hierro de alto spin puede tener uno o dos ligandos axiales, dependiendo de su estado redox. En el hierro de bajo spin, el Fe (II) tiene todos los electrones apareados, obteniéndose un spin de 0, y el Fe (III), tiene 1 electron desapareado, por lo que su spin es de ½.; De acuerdo a esto, los hemos de bajo spin podrían solo transferir electrones y los hemos de alto spin podrían unir ligandos. El hemo de alto spin en las oxidasas, es el sitio donde se lleva a cabo la unión de O<sub>2</sub> y CO.

De acuerdo a Wood (103), el parámetro  $\epsilon (\gamma\text{pico} - \gamma\text{valle}) / \epsilon (\alpha\text{pico} - \alpha\text{valle})$ , determinado a bajas concentraciones de proteína, es muy útil cuando se quiere comparar hemos de alto y bajo spin. Por ejemplo en el caso de mioglobina se obtiene, para éste parámetro, un valor de 32. Otros valores obtenidos para hierro de alto spin son de 75, 95, 104 y 180 para cuatro citocromos c y de 60 para la citocromo c peroxidasa de *Pseudomonas* (103). Hemos de bajo spin dan valores mucho menores; cuatro citocromos c de metilotrófos dan valores muy similares (4.9 a 5.5). Generalizando, los valores de  $\epsilon (\gamma\text{pico} - \gamma\text{valle}) - \epsilon (\alpha\text{pico} - \alpha\text{valle})$  mayores de 30 se asocian a hemos de alto spin, mientras que valores menores a 10, se asocian con hemos de bajo spin. (103). Decidimos obtener éste parámetro para la oxidasa presente en membranas de la mutante *PYMI* y para ello obtuvimos el espectro de fotodisociación de membranas de ésta mutante a -118°C (figura 10); determinamos valores de 37 y 45, los que nos indican la presencia de un hemo de alto spin en la oxidasa presente en las membranas de la mutante *PYMI*. La

existencia de un hemo de alto spin, nos permite afirmar que ésta oxidasa es una oxidasa funcional, capaz de unir oxígeno.

### **Cinéticas para la formación del complejo oxidasa-CO y de la reacción con oxígeno a temperaturas subcero.**

Los espectros diferenciales de complejos con CO, no pueden ser usados como una prueba de la función de oxidasa de una proteína, ya que revelan todas las hemoproteínas reactivas a CO, incluyendo hidroperoxidasas, globinas y las posibles oxidasas. Las oxidasas presentan una cinética de recombinación con el CO relativamente lenta a temperatura subcero, ya que se ha determinado (59) que después de que el complejo con CO se ha fotodisociado, el CO se une de manera transitoria al CuB presente en el sitio catalítico. Esta propiedad puede ser utilizada para indicar si una hemoproteína es oxidasa y si pertenece a la familia hemo-cobre, por su capacidad de unir ligandos y por presentar en el centro catalítico un CuB.

Por otro lado, en presencia de etilenglicol al 50 %, las muestras de membranas reducidas y acomplejadas con CO, se mantienen fluidas a  $-23^{\circ}\text{C}$ ; en esas condiciones es posible introducir el  $\text{O}_2$  al medio, mediante agitación mecánica, con un resorte de alambre de acero. A esa temperatura, el  $\text{O}_2$  no desplaza significativamente al CO del sitio catalítico, de tal manera que el complejo cit-CO se puede llevar a la temperatura subcero deseada, para su posterior fotodisociación (ver métodos); a partir de esta condición ocurre el reemplazo del CO fotodisociado, por el  $\text{O}_2$  atrapado en solución, en el sitio catalítico de las oxidasas. Este intercambio produce la formación de intermediarios oxigenados con bandas de absorción características en el espectro; la formación de estos intermediarios oxigenados es mucho más rápida que la reasociación cit-CO, ya que el oxígeno se asocia directamente al sitio catalítico de la oxidasa (63). La posibilidad de este intercambio, es por tanto una prueba más de la función de oxidasa de una proteína.

PYM 1  
Fotodisociación a -118 °C

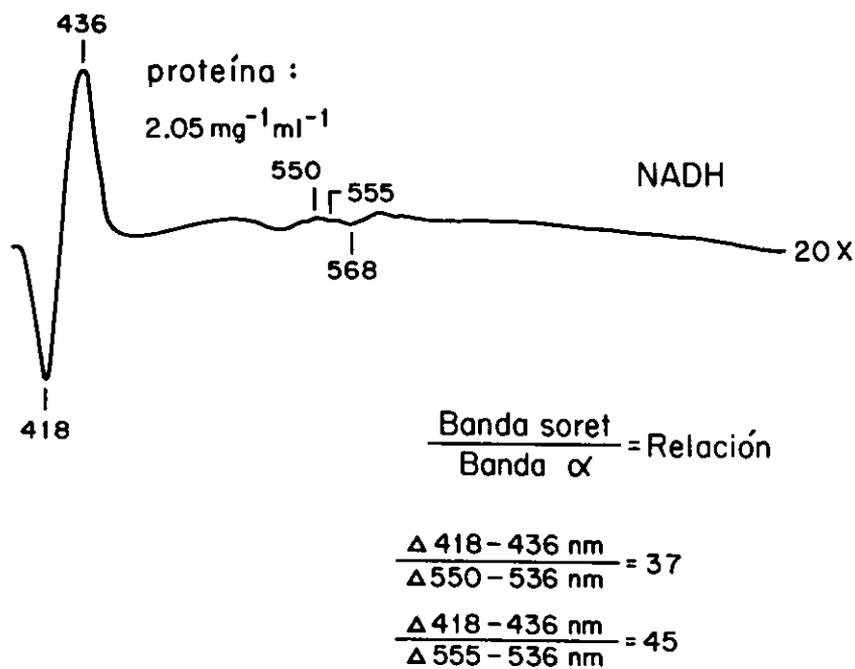


Figura 10. Determinación de la presencia de un hemo de alto spin en la oxidasa citocromo bo' de la mutante *PYM1* de *Bacillus cereus*. Se muestran el espectro diferencial de una preparación fotodisociada menos una preparación pre-fotodisociada a -118°C. La concentración de proteína de membranas de células de la mutante *PYM1* fue de 2.05 mg/ml. Esta concentración de proteína nos permite observar claramente el parámetro descrito por Wood ( $\epsilon$  ( $\gamma$  pico -  $\gamma$  valle) /  $\epsilon$  ( $\alpha$  pico -  $\alpha$  valle)) el cual define un hemo de alto spin.

### **Cepa Silvestre. Cinética de reasociación con CO a temperatura subcero.**

Membranas de células de *B. cereus* cepa silvestre en fase vegetativa y esporulante, crecidas en medio fermentable, fueron reducidas con NADH y burbujeadas con CO. Estas muestras anaeróbicas fueron congeladas a las temperaturas indicadas y fotodisociadas como se describe en materiales y métodos. En la figura 11 mostramos los resultados obtenidos a diferentes temperaturas (se compara la zona del Soret). Los espectros mostraron el mismo patrón para las membranas de células vegetativas (A) que para las esporulantes (B): un valle a 432 nm y un pico a 445 nm consistentes con lo esperado para citocromos del tipo  $a$  (en un espectro de fotodisociación se esperan las bandas invertidas con respecto al espectro diferencial con CO). A  $-70$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ , pudo observarse que tanto el pico a 445 nm, como el valle a 432 nm tuvieron un regreso simétrico a la basal (espectro absoluto con CO restado de sí mismo); los cambios entre el valle a 432 nm y el pico a 445 nm con respecto a la basal fueron de igual magnitud, pero en sentido opuesto. Estos cambios nos indicaron la re-formación del complejo cit  $a_3$ -CO conforme transcurre el tiempo. Se calcularon los tiempos medios de reasociación para  $-90^{\circ}\text{C}$ , obteniéndose un  $T_{1/2}$  de 30 min para la oxidasa  $aa_3$  (membranas de células vegetativas) y de 6 min para la oxidasa  $caa_3$  (membranas de células esporulantes). A temperaturas entre  $-90$  y  $-110^{\circ}\text{C}$ , los cambios se hicieron muy lentos, siendo imposible calcular tiempos medios de reasociación. Los resultados obtenidos nos demostraron que ambas oxidetasas,  $aa_3$  y  $caa_3$ , fueron capaces de volver a formar el complejo con CO, de manera lenta (si se compara con la reacción con  $\text{O}_2$ ; ver más adelante). La lenta reasociación se debió a que el CO se asoció de manera transitoria con el CuB en el centro catalítico; este hecho nos confirma la presencia de un centro catalítico conteniendo el centro CuB y por lo tanto que ambas proteínas son oxidetasas funcionales, pertenecientes a la familia de oxidetasas hemo-cobre.

### **Cepa Silvestre. Cinética de la reacción con oxígeno a temperatura subcero.**

Como mencionamos, una prueba más de la función de oxideta de una proteína es su capacidad de intercambiar ligandos ( $\text{CO}/\text{O}_2$ ), formando en el transcurso de ese intercambio intermediarios oxigenados. El oxígeno se introdujo a una muestra reducida con NADH y acomplejada con CO a  $-23^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la cual, gracias a la presencia de etilenglicol, la muestra todavía es fluida,

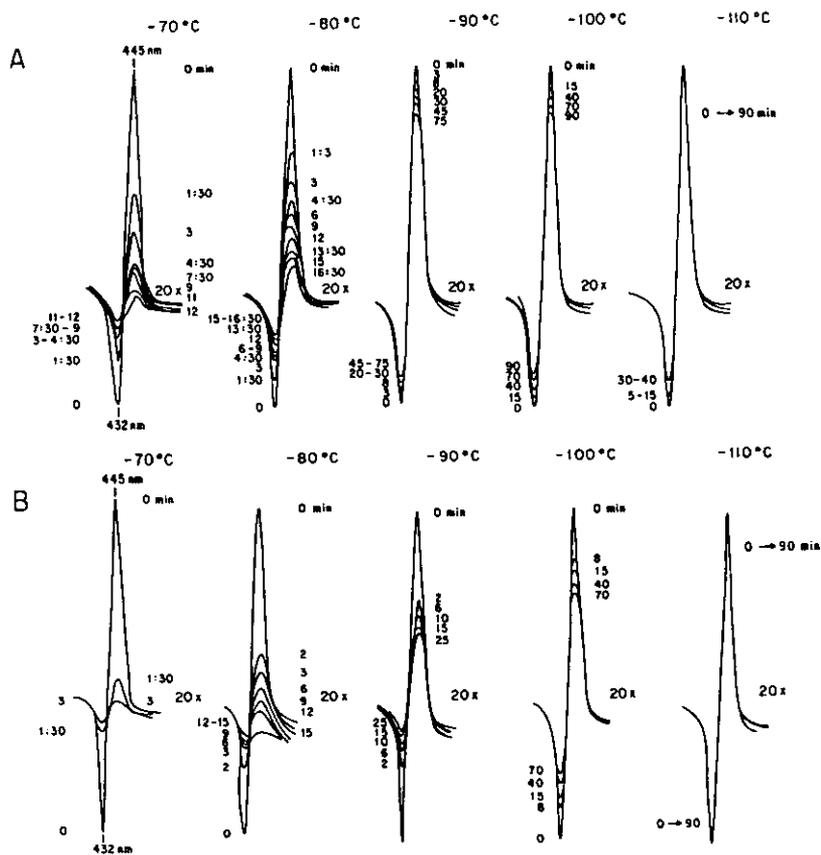


Figura 11. Cinéticas para la formación del complejo con CO de las oxidasas tip-a de *B. cereus* cepa silvestre, en fase de crecimiento vegetativo (A) y esporulante (B), después de fotólisis a temperaturas subcero y ausencia de oxígeno. Membranas (8 mg de proteína / ml) de células crecidas en un medio no fermentable, fueron reducidas con 5.0 mM de NADH y burbujeadas con CO. Se obtuvo el espectro del complejo con CO, que se restó de sí mismo para obtener la basal (no se muestra). Después la preparación se fotodisoció a las temperaturas subcero indicadas y se obtuvieron registros sucesivos de la región de Soret (400-500 nm) a los tiempos indicados; se registraron los espectros diferenciales (registro después de la fotólisis menos el espectro pre-fotólisis).

permitiendo introducir el O<sub>2</sub> al medio, mediante agitación mecánica. Estas preparaciones fueron llevadas a las temperaturas subcero indicadas y fotodisociadas, a partir de lo cual, puede darse el recambio del CO por el O<sub>2</sub> en el sitio catalítico. Se estudió espectrofotométricamente el proceso de intercambio entre CO y O<sub>2</sub> a temperaturas subcero, en membranas de células vegetativas y esporulantes de la cepa silvestre (Figura 12). Se obtuvieron espectros de fotodisociación a -90, -100 y -110 ° C (se muestran aquellos para -100 °C), para estudiar la cinética de la reacción del oxígeno con la oxidasa. También obtuvimos espectros a -70 y -80 ° C (se muestran los resultados a -70 °C); a estas temperaturas se da una oxidación más rápida de la oxidasa, lo que permite observar la posterior oxidación de los componentes ubicados antes de la oxidasa en la cadena.

El espectro obtenido dentro del primer minuto después de la fotólisis a -100 °C (figura 12 A para el caso de membranas de células vegetativas y 12 B para membranas de células esporulantes), muestra las mismas características del espectro fotodisociado correspondiente, en condiciones anaeróbicas (ver la figura 11 A y B). Después de la fotodisociación ocurrió el recambio de ligandos CO por O<sub>2</sub>, y por espectros sucesivos a los tiempos indicados en la figura, se siguió su proceso. Los cambios de absorción hacia la línea basal fueron indicativos de la unión del ligando. El ligando que se unió era oxígeno y no CO. Esto se demostró al comparar las cinéticas de reacción obtenidas en presencia de oxígeno (Figura 12 A y B), con las obtenidas en condiciones anóxicas (Figura 11 A y B). Se calcularon los T<sub>1/2</sub> de combinación con O<sub>2</sub> a -90 °C, obteniéndose un T<sub>1/2</sub> de 3 min para la oxidasa aa<sub>3</sub> (membranas de células vegetativas) y de 1.5 min para la oxidasa caa<sub>3</sub> (membranas de células esporulantes). En condiciones anóxicas, la reasociación del CO fotodisociado al centro catalítico de los citocromos del tipo-a, fueron lentos en comparación a la unión del oxígeno (TABLA V). Los tiempos más cortos para la asociación de la oxidasa con el oxígeno se debieron a que éste se une directamente al centro catalítico, mientras que, como lo hemos mencionado, el CO se une de manera transitoria al CuB antes de reasociarse con la oxidasa. La disminución en la absorbencia a 445 nm se asoció con la reacción de los citocromos tipo-a con oxígeno para dar un oxi-complejo. Se pudo observar que en presencia de oxígeno, el regreso del valle a 432 y el pico a 445 nm hacia la basal, es asimétrico, reflejando la mayor similitud de la forma oxigenada con el aducto-CO a 445 nm en comparación al aducto a 432 nm, donde se observa la mayor absorción del complejo con CO. En la región alfa/beta encontramos un pico a 590 nm y un ligero hombro a 600 nm, para las dos fases de crecimiento; conforme avanzamos en el tiempo, estas señales se definieron

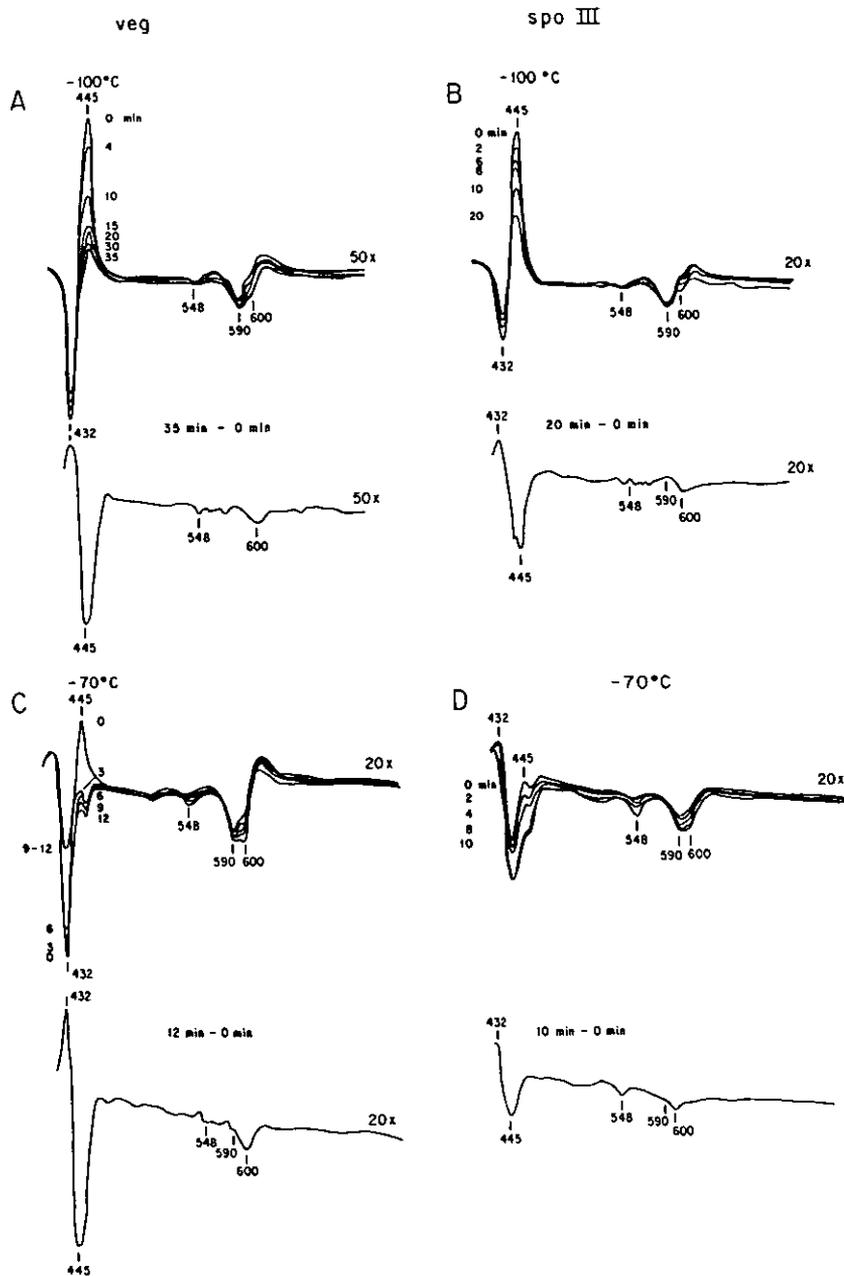


Figura 12. Cinética de reacción con oxígeno de los citocromos del tipo-a de *Bacillus cereus* cepa silvestre a  $-100^{\circ}\text{C}$  y  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las membranas de células de la cepa silvestre en fase de crecimiento vegetativo (trazos A y C) y esporulante (trazos B y D), fueron reducidas con NADH 5.0 mM y burbujeadas con CO durante 3 min; las preparaciones se llevan a  $-23^{\circ}\text{C}$  y se añade oxígeno por agitación vigorosa. Después, las muestras son estabilizadas a las temperaturas requeridas (trazos A y B a  $-100^{\circ}\text{C}$ ; trazos C y D a  $-70^{\circ}\text{C}$ ) y se obtienen los espectros antes de la fotólisis, que se restan de ellos mismos para obtener la basal (no se muestra). A continuación las preparaciones son fotodisociadas a las temperaturas indicadas. Se obtiene espectros sucesivos que son registrados como espectros diferenciales

(espectro después de la fotólisis menos espectro pre-fotólisis). En la parte baja de cada panel se muestra los espectros obtenidos de restar el último espectro del primer espectro, después de fotodisociar. más claramente. Esas máximas de absorbencia fueron aún más claras al restar el primer espectro obtenido del último. Es importante hacer notar un ligero valle a 550 nm en la preparación de membranas de células esporulantes, que mostró la oxidación de un citocromo  $c$ , y de lo cual hablaremos más adelante. Por otro lado, hay que hacer hincapié en que no se presentan ni las bandas características de absorbencia para la formación del complejo  $cyt\ b_5'-CO$  (valle a 417-419 nm y pico a 432 nm), ni la presencia de intermediarios oxigenados asociados a un citocromo  $b_5'$  (valle a 419 y pico a 432 nm); este resultado nos confirma la ausencia de éste citocromo en la cepa silvestre de *Bacillus cereus*, determinada al analizar los hemos por HPLC (Figuras 6 y 7).

**Tabla V.**  $T_{1/2}$  (min) de recombinación con CO y de la combinación con oxígeno a  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  de las oxidasas presente en las membranas de *Bacillus cereus* cepa silvestre.

Oxidasa	Recombinación con CO	Combinación con $O_2$	Recombinación CO / Combinación $O_2$
oxidasa $aa_3$ (Crecimiento vegetativo)	30	3	10
oxidasa $caa_3$ (Esporulación)	6	1.5	4

Sabemos que en el caso de la cepa silvestre crecida hasta fase esporulante, un citocromo  $c$  es el donador de electrones para la oxidasa  $caa_3$  (24). Entonces investigamos la naturaleza de los componentes responsables de la transferencia de electrones a las oxidasas terminales presentes en la cepa silvestre: durante el crecimiento vegetativo, el citocromo  $aa_3$  y en esporulación, el citocromo  $caa_3$ . Obtuvimos espectros de fotodisociación a temperaturas subcero de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en presencia de oxígeno; a esta

temperatura se da una oxidación más rápida de la oxidasa, permitiendo observar la posterior oxidación de los componentes ubicados antes de ella en la cadena.

Para las membranas de células de la cepa silvestre, en el primer espectro después de fotodisociación (**figura 12**), observamos, para ambos estadios de crecimiento, en la zona del Soret un valle a 432 nm y un pico a 445 nm; y en la zona del visible un valle a 590 nm y un hombro a 600 nm; la presencia de estas bandas está asociada a citocromos del tipo-a. También fue más claro a esta temperatura, en las membranas de células en fase esporulante, un valle a 548 nm debido a la oxidación de un citocromo tipo-c. Al analizarse los espectros sucesivos, en la zona de Soret la banda a 332 nm regresó hacia la basal de manera asimétrica, más lentamente que el pico a 445 nm, de la misma manera que se mencionó ocurre a temperaturas más bajas. En el visible las señales mencionadas se definieron más claramente. Estos cambios nos indicaron la oxidación de citocromos tipo-a. Al restar el primer espectro obtenido del último, observamos un valle bien definido a 548 nm, para el caso de membranas de células esporulantes, que fue el reflejo de oxidación de un citocromo tipo c. Esta señal para citocromo c se puede asociar a la oxidación del citocromo c unido covalentemente a la oxidasa caa<sub>3</sub>, pero también al citocromo c que dona los electrones a esta oxidasa; este citocromo c puede ser el c<sub>550</sub>, observado como el citocromo c de bajo peso molecular presente en las membranas de *B. cereus* (Mr 14 KDa, **figura 5**).

#### **Cepa Mutante PYMI. Cinética de reasociación con CO a temperatura subcero.**

Estudiamos en la mutante *PYMI*, el progreso de la re-formación del complejo cit o-CO utilizando la técnica descrita por Poole (63). La cinética de reasociación con CO se hizo con membranas vegetativas, obteniéndose los resultados mostrados en la **figura 13**. Las membranas fueron reducidas con NADH y burbujeadas con CO. Estas muestras anaeróbicas fueron congeladas a las temperaturas indicadas y fotodisociadas como se describe en materiales y métodos. En este caso, se observó un valle a 419 nm y un pico a 432 nm consistente con la presencia de citocromo bo' (63,65). A -85 y -95°C, la reacción con CO se caracterizó por un regreso simétrico a la basal (espectro absoluto con CO restado de sí mismo); los cambios de absorbencia a 419 nm y a 432 nm con respecto a la basal fueron iguales, pero en sentido inverso. A temperaturas menores el proceso fue muy lento, haciendo imposible seguir la cinética. Estos cambios nos indicaron la reformación del complejo cit bo'-CO, conforme transcurre el tiempo. El

tiempo medio de reasociación fue calculado para  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ , obteniéndose un  $T_{1/2}$  de 18 min. Este resultado está de acuerdo con el comportamiento descrito para el citocromo bo' de *E. coli* (63,65) y nos demostró la capacidad de la oxidasa bo' para unir CO. La lentitud del proceso en comparación a la reacción con  $\text{O}_2$  (se muestran más adelante), se debió a la presencia de un CuB en el centro catalítico de la oxidasa presente en la mutante *PYMI* (recordar que sí existe un CuB en el centro catalítico, el CO se asocia de manera transitoria a él, lo que hace que el proceso de reasociación se haga más lento). La capacidad de la oxidasa para unir ligandos y la presencia del CuB en el centro catalítico, nos permite afirmar la función de oxidasa del citocromo bo' presente en las membranas de la mutante, y que ésta oxidasa es miembro de la familia hemo-cobre.

#### **Cepa Mutante *PYMI*. Cinética de la reacción con oxígeno a temperatura subcero.**

Se estudió, en membranas de células vegetativas de la mutante *PYMI*, el proceso de intercambio de ligandos  $\text{CO/O}_2$ , y la capacidad de la oxidasa para formar intermediarios oxigenados. El oxígeno se introdujo a una muestra reducida con NADH y acomplejada con CO a  $-23^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la cual, gracias a la presencia de etilenglicol, la muestra es todavía fluida, permitiendo introducir el  $\text{O}_2$  al medio mediante agitación mecánica. Las preparaciones donde se ha formado el complejo cit bo'-CO, fueron llevadas a las temperaturas subcero indicadas y fotodisociadas, a partir de lo cual, puede darse el reemplazo del CO por el  $\text{O}_2$  en el sitio catalítico. Investigamos en la mutante *PYMI*, la reacción de la oxidasa bo' con el oxígeno (espectros fotodisociados a  $-114\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; **Figura 14 A**). Encontramos durante la cinética, las máximas de absorción características de un citocromo tipo bo' (63,65). A  $-114^{\circ}\text{C}$  la unión del oxígeno al centro catalítico de la oxidasa, mostrada por el regreso hacia la basal del valle a 419 y el pico a 432 nm, fue más rápida que la re-formación del complejo con CO (ver **figura 13**). La disminución en la absorbencia a 432 nm, se asocia a la reacción del citocromo bo' con el oxígeno, produciéndose un oxi-complejo similar al observado en *E. coli* (63). El  $T_{1/2}$  de asociación con  $\text{O}_2$ , calculado para  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  (espectro no mostrado), fue de 5 min. Que el ligando que se unió era oxígeno y no CO fue demostrado al comparar las cinéticas de reacción obtenidas en presencia de oxígeno ( $T_{1/2} = 5\text{ min}$ ), con las obtenidas en condiciones anóxicas ( $T_{1/2} = 18\text{ min}$ ). Hay una marcada asimetría en el regreso a la basal entre el valle a 419 y el pico a 432 nm, que reflejó una gran similitud de la forma oxigenada a 432 nm con el espectro del

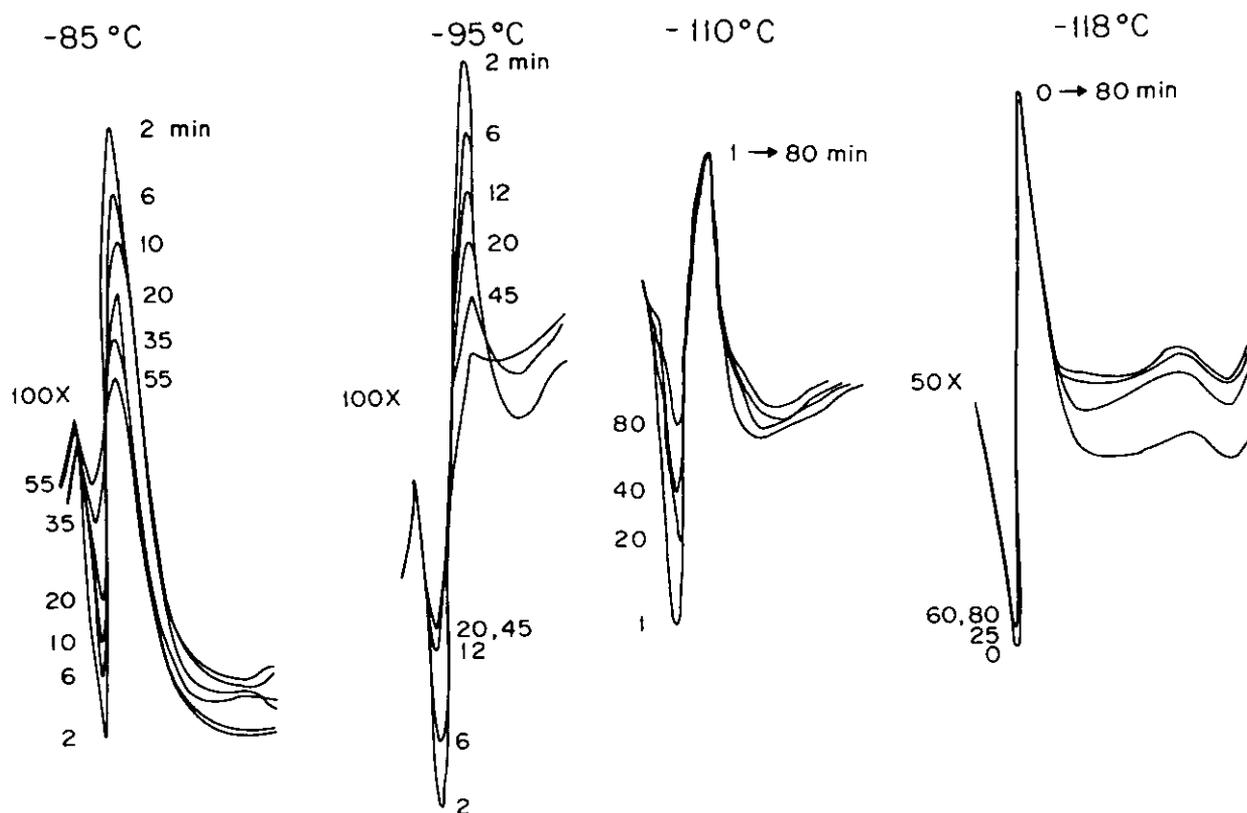


Figura 13. Cinéticas de formación del complejo cito-CO de membranas de células vegetativas de la cepa mutante *PYMI*, después de la fotólisis a temperaturas subcero en ausencia de oxígeno. Las membranas de células crecidas en un medio no fermentable (8.0 mg de proteína/ml), fueron reducidas con 5.0 mM de NADH y burbujeadas con CO durante 3 min. Después, las preparaciones se llevan a la temperatura indicada y se obtiene el espectro del complejo cito-CO, que se resta de si mismo para obtener la basal (no se muestra). Las preparaciones son fotodisociadas a las temperaturas indicadas y se obtienen espectros sucesivos que se registran como espectros diferenciales (espectro fotodisociado menos espectro antes de la fotólisis).

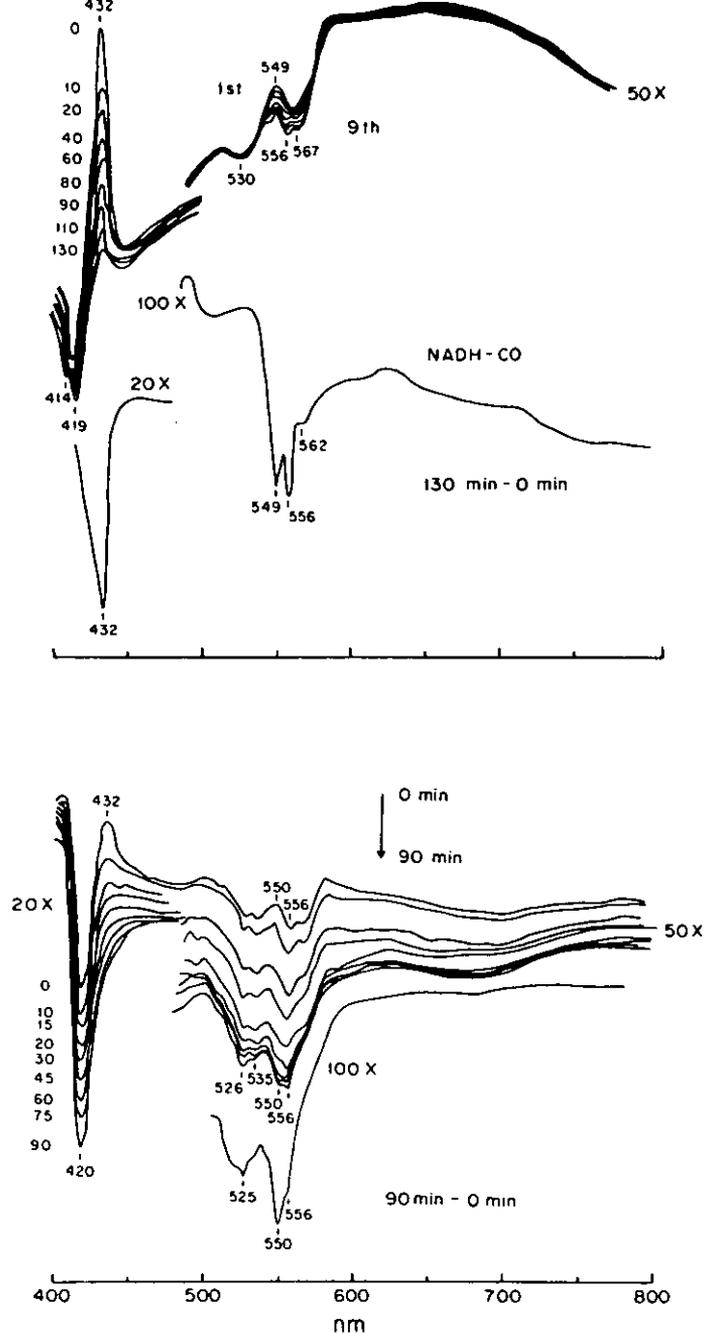


Figura 14. Cinética de reacción con oxígeno del citocromo  $b_5$ , de membranas de células vegetativas de la mutante *PMY1*. Las membranas (8.0 mg de proteína /ml) son reducidas con 5.0 mM de NADH, burbujeadas con CO durante 3 min y llevadas a  $-23^\circ\text{C}$ ; a esa temperatura se introduce el oxígeno a las muestras por agitación vigorosa. Las preparaciones son llevadas a las temperaturas indicadas:  $-114^\circ\text{C}$  (A) y  $-70^\circ\text{C}$  (B) y se obtienen sus espectros, que se restan de ellos mismos para obtener la basal. A estas temperaturas se lleva a cabo la fotodisociación y se obtienen espectros sucesivos a los tiempos indicados. Los registros muestran los espectros diferenciales (espectros después de fotólisis menos espectro pre-fotólisis). Los espectros en la parte inferior muestran los resultados de restar el primer espectro del último espectro obtenidos después de la fotólisis.

complejo con CO a la misma longitud de onda. En la región del visible, en el primer espectro después de la fotólisis, pudimos observar valles a 530 y 567 nm y un pico ancho que va de 549 a 556 nm, de manera semejante al espectro diferencial obtenido después de fotólisis de la preparación anóxica. Los espectros sucesivos revelan que el valle a 567 nm se hace más profundo y se observa un segundo valle a 556 nm, mientras que poco cambio ocurrió a 530 nm. El comportamiento de este proceso está de acuerdo con lo reportado por Poole (63,65) para la reacción del oxígeno con el citocromo bo' de *E. coli* y con lo descrito para el pigmento semejante a citocromo bo' encontrado en *B. subtilis* FG83 (38). Cuando se resta el primer espectro después de la fotólisis, del último obtenido 130 min después, el espectro diferencial resultante mostró valles a 549 y 556 nm, sugiriendo una significativa oxidación de citocromos del tipo b y c. El valle a 432 nm nos habla de la oxidación de citocromos del tipo b. Es muy importante, que una vez más encontramos evidencia de la participación de un citocromo tipo c como donador de electrones para el citocromo bo' en la mutante *PYMI*.

Los resultados presentados en esta tesis nos sugieren que en la mutante *PYMI*, el donador de electrones para la oxidasa bo' es un citocromo tipo c. Entonces investigamos la naturaleza de los componentes responsables de la transferencia de electrones a las oxidasas terminales presentes en la mutante *PYMI*. Para ello, obtuvimos el espectro de fotodisociación a  $-70^{\circ}\text{C}$ , en presencia de oxígeno; a esta temperatura se da una oxidación más rápida de la oxidasa, permitiendo observar la posterior oxidación de los componentes ubicados antes de ella en la cadena.

En el resultado encontrado con la cepa mutante *PYMI* al fotodisociar a  $-70^{\circ}\text{C}$  (figura 14 B) observamos, que el pico a 432nm de la forma reducida del citocromo bo', se presentó solo transitoriamente, debido a la rápida oxidación de la oxidasa. Los registros sucesivos no muestran cambios entre 430 y 445 nm, región del espectro donde se podría observar la oxidación de citocromos del tipo a. En cambio, en la región del visible, el pico pequeño a 550 nm, observado en el primer espectro después de la fotólisis, desapareció para formar un valle profundo a la misma longitud de onda. Al obtener el espectro diferencial de la post-fotólisis (se resta el primer espectro del último), se pudo observar que el mayor cambio fue la formación de este valle profundo a 550 nm, sugiriendo una vez más, la oxidación de un citocromo tipo c. En la región del Soret, el corrimiento del valle a 420 nm puede ser asignado también a un citocromo c. Estos resultados demuestran que un citocromo c actúa como donador de electrones a la oxidasa presente en *B. cereus* mutante *PYMI*. Esta señal de citocromo c puede

asociarse al citocromo c libre (banda de 14 kDa) presente en las membranas de la mutante *PYMI* (Figura 5).

Los datos obtenidos en las cinéticas de reasociación con CO y asociación con O<sub>2</sub> para ambas cepas de *B. cereus*, son comparados en la siguiente tabla:

**Tabla VI.** Tiempos medios (min) a -90 °C, de la reasociación con CO y la asociación con O<sub>2</sub>, para las oxidasas presentes en las membranas de *B. cereus* cepas silvestre y mutante *PYMI*.

Oxidasa	Reasociación con CO	Asociación con O <sub>2</sub>
<u>aa</u> <sub>3</sub> ( <i>B. cereus</i> cepa silvestre durante crecimiento vegetativo)	30	3
<u>caa</u> <sub>3</sub> ( <i>B. cereus</i> cepa silvestre durante esporulación)	6	1.5
<u>bo</u> ' ( <i>B. cereus</i> mutante <i>PYMI</i> )	18	5

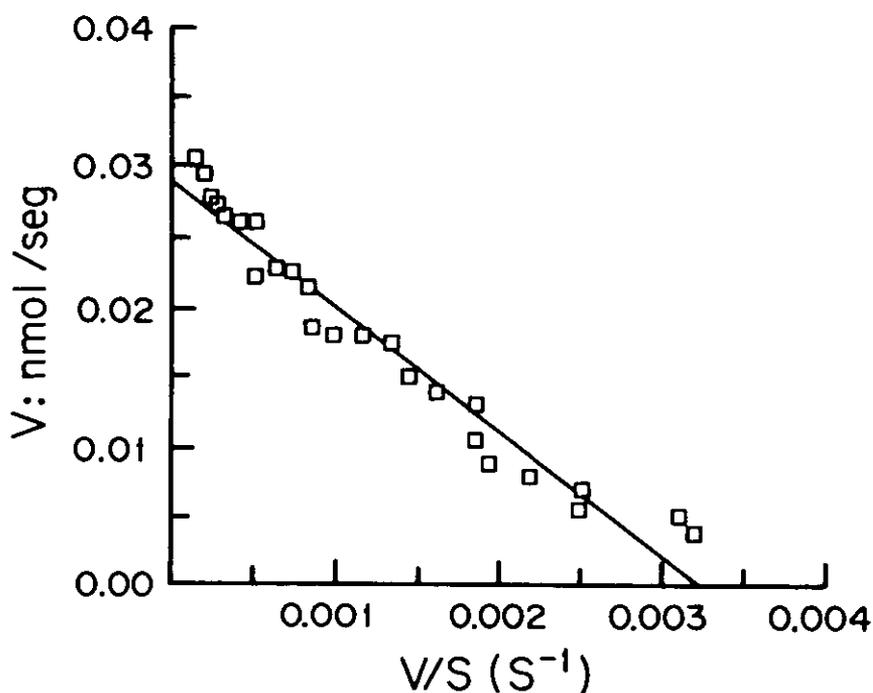
Los datos obtenidos en las cinéticas de reasociación de CO y asociación de O<sub>2</sub>, para *Bacillus cereus* cepa silvestre, son preliminares. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos con las tres oxidasas presentes en las membranas de *B. cereus* (aa<sub>3</sub> y caa<sub>3</sub> en la cepa silvestre y bo' en la mutante *PYMI*), podemos llegar a resultados interesantes. Es importante señalar que la reacción entre la oxidasa bo' y el O<sub>2</sub> es más lenta, en comparación a las oxidasas del tipo-a (la reacción es 1.6 y 3.3 veces más rápida para las oxidasas aa<sub>3</sub> y caa<sub>3</sub> respectivamente; Tabla VI).

#### La afinidad por oxígeno de la oxidasa citocromo bo' presente en la mutante *PYMI*.

Las oxidasas respiratorias son las enzimas que tienen la mayor afinidad por el oxígeno; sus Km's, están en el intervalo de concentración de 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-9</sup> M. Esta enorme afinidad plantea problemas técnicos muy serios para la correcta medición de la concentración del O<sub>2</sub> en solución y su variación

durante la catálisis de las oxidasas. La introducción de la técnica espectrofotométrica basada en el uso de hemoproteínas (i.e. mioglobina y leghemoglobina), como monitores de la concentración de  $O_2$  en solución, ha venido a solucionar el problema (18). Los estados oxigenado y desoxigenado de una globina, se pueden medir de manera dinámica y precisa y su proporción es el reflejo exacto de la concentración de  $O_2$  en solución, debido a que de acuerdo a su constante de disociación, la globina se encontrará en equilibrio con el  $O_2$  libre. El espectro óptico de la leghemoglobina en sus diferentes estados, indica el promedio de concentración de oxígeno. El espectro de absorción en la zona del visible de la oxileghemoglobina está caracterizado en la zona  $\alpha$  y  $\beta$  por sus máximos de absorbencia a 541 y 575 nm. En contraste la desoxigenación de la leghemoglobina (estado reducido), tiene su máxima absorbencia a 560 nm. La determinación de los cambios de absorbencia entre 560 y 575 nm, monitorea la transición de la forma oxi a la forma desoxi que acompaña a la respiración y por tanto el consumo de  $O_2$  de la solución (4,7,18). El uso de mioglobina permite medir el  $O_2$  en la solución en un rango de 0.1 a 10  $\mu M$ , mientras que la leghemoglobina ( $K_m O_2 = 0.026 \mu M$ ) permite medir el intervalo de 0.003 a 0.3  $\mu M$  (19).

Los experimentos de intercambio de ligandos  $CO/O_2$  a temperatura subcero revelaron una sola oxidasa en la mutante PYM1, el citocromo bo' y consideramos interesante conocer su  $K_m$  por  $O_2$ . La afinidad de esta oxidasa por oxígeno se determinó en membranas de células vegetativas de la cepa PYM1, de acuerdo a la técnica descrita por D'Mello (19), utilizando la leghemoglobina oxigenada (LHb) como fuente de oxígeno y como sustrato NADH. Los resultados muestran una cinética de un solo componente en la gráfica de Eadie-Hofstee (Figura 15), con una  $K_m$  de 8.3 nM (promedio de cinco determinaciones). Solamente un componente cinético puede ser identificado en la gráfica y por lo tanto podemos sugerir que la oxidasa bo' es la única oxidasa presente en la mutante PYM1. Este valor indica una muy alta afinidad por oxígeno solo comparable a la reportada para citocromo bo' (18) y bd' (19) de *E. coli* y la cbb<sub>3</sub> de *Bradyrhizobium japonicum*.(41, 67).



Bacillus cereus cyta<sup>-</sup>  
 Km por O<sub>2</sub> = 8.4 nM (LHb)  
 Sustrato = NADH

Figura 15. Determinación de la afinidad por oxígeno del citocromo bo' de *B. cereus* cepa mutante *PYMI*, por desoxigenación de la oxileghemoglobina. Los datos fueron usados para calcular la gráfica de Eadie-Hofstee; la Km calculada de la pendiente de la recta fue de 8.3 nM. Las muestras consistían de amortiguador de fosfato de potasio 25 mM, 1.0 mM de EDTA pH 7, 0.1 mg de proteína de membrana, 10-20 uM de leghemoglobina, en 1.3 ml finales. La reacción se inicia por la adición de 0.5 mM de NADH.

## PURIFICACION DE LA OXIDASA PRESENTE EN LA MUTANTE *PYMI*

Para definir la naturaleza de la oxidasa presente en la mutante *PYMI* fue necesario proceder a su purificación. De acuerdo con los datos presentados, esta oxidasa no es un citocromo bo' clásico, es decir del tipo de citocromo bo' que se encuentra en *E. coli*, ya que no parece ser una quinol oxidasa sino una citocromo c oxidasa (Figuras 3, 4, 8, 12 y 15).

Procedimos a la purificación de la oxidasa de la mutante *PYMI* siguiendo el esquema planteado en material y métodos. Hemos conseguido avances significativos, pero la enzima ha resultado muy difícil de purificar, y no hemos podido mantenerla activa durante su purificación (la enzima es inactiva en presencia de Triton X100); debido a esto la purificación no se siguió por actividad, sino por espectrofotometría (siguiendo la formación del complejo cit bo'-CO) o por HPLC (siguiendo la presencia de hemo O).

Los citocromos se extrajeron con Tritón X100 al 4 % a partir de membranas obtenidas de células de la mutante *PYMI*, crecidas en medio no fermentable. El extracto se diluyó 4 veces con un amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0 con asolectina (10 ug /ml) y se aplicó a una columna de DEAE Sepharosa Cl-6B.

Durante la cromatografía se obtuvo el perfil de elución mostrado en la figura 16 A: hubo una fracción que no se adsorbió a la columna y al aplicar el gradiente de NaCl (0 a 600 mM) se obtuvo un pico que eluye a 200 mM de NaCl. Los espectros diferenciales reducido menos oxidado (trazo a) y reducido+CO menos reducido (trazo b) de estas fracciones, utilizando como reductor ditionita, se muestran en la figura 16 B. El espectro red menos ox de la fracción no adsorbida (pico sombreado), muestra hombros a 427 y 558 nm, característicos de citocromos del tipo- b y picos a 419 y 549 nm característicos de citocromos del tipo-c. El espectro del complejo con CO mostró el perfil característico de un complejo citocromo bo'-CO (pico a 412 nm valles a 427 y 557 nm). Sin embargo, cuando se hizo el análisis de hemos (figura 16 C) pudimos observar que el hemo B (tiempo de retención de 27.5 min) fue el que se presentó en mayor proporción encontrando solo trazas de hemo O (tiempo de retención de 34 min); la relación entre los hemos B:O es de 1.0:0.05.

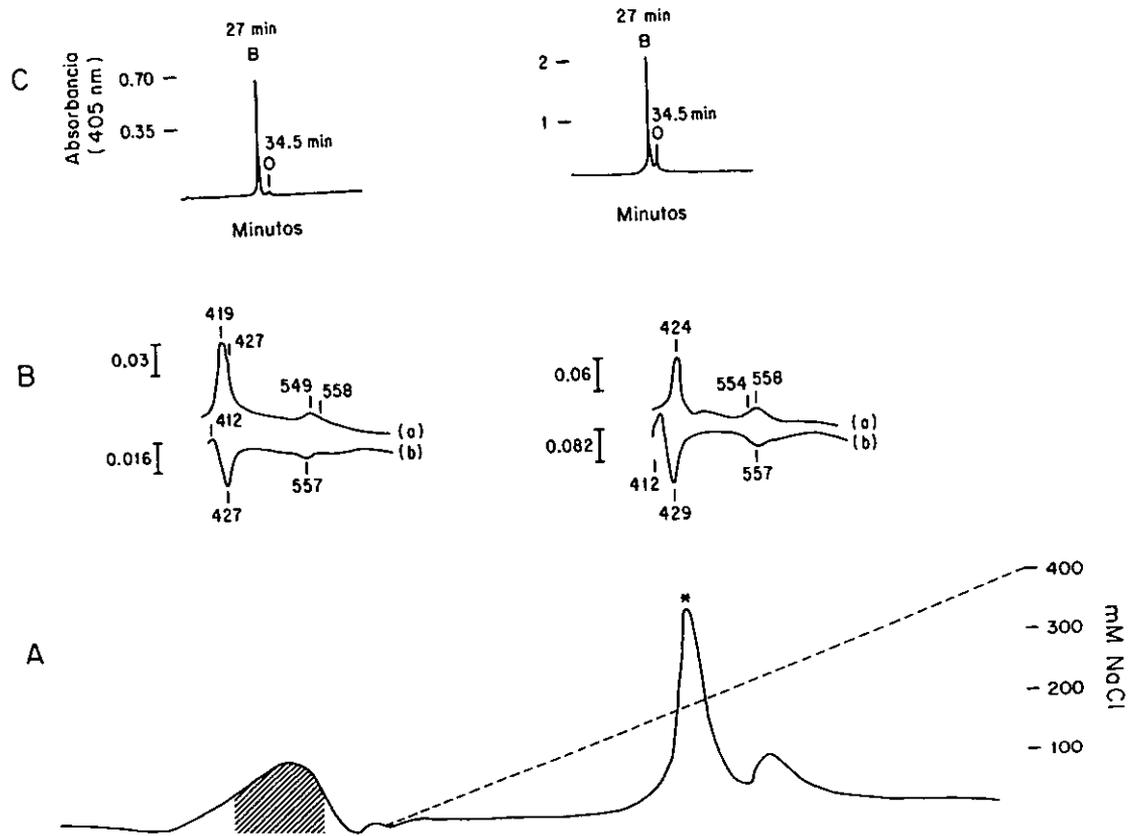


Figura 16. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sepharosa CI-6B de citocromos solubilizados de membranas de la mutante *PYMI*. (A) Perfil de elución de la columna; se muestra con la porción sombreada la fracción que no fue adsorbida y el pico que eluye después de la aplicación del gradiente (200 mM de NaCl); la línea punteada muestra el gradiente de concentración de NaCl con el que se eluyó la columna. (B) espectros diferenciales reducido menos oxidado (trazo a) y reducido-CO menos reducido (trazo b), de la fracción no adsorbida (porción sombreada) y del pico obtenido después de la elución (se analizó la fracción marcada con el asterisco). (C). Cromatograma en HPLC fase inversa de los hemos extraídos con acetona ácida de cada una de las fracciones mencionadas y marcadas en la figura con un asterisco.

El pico obtenido con el gradiente de NaCl, muestra en el espectro diferencial reducido menos oxidado (**trazo a**), la presencia de citocromos del tipo b (pico a 424 y 558 nm) y una banda de absorción a 554 nm que se ha asociado a citocromo bo'; es importante hacer notar la ausencia de bandas correspondientes a citocromos del tipo c. De la misma manera que para la fracción no adsorbida, en el espectro con CO se observó un espectro característico del complejo del citocromo o-CO (pico a 413 nm, valles 429 y 557 nm), pero a diferencia de la fracción anterior, el cromatograma de los hemos extraídos mostró además de hemo B (tiempo de retención de 27.5 min), hemo O (tiempo de retención de 34 min). La relación entre los hemos B:O fué de 1.0: 0.25. De acuerdo a estos resultados la fracción donde encontramos la oxidasa semejante a citocromo bo' es la del pico eluído con el gradiente de NaCl. Las fracciones conteniendo señal de hemo O se juntaron y dializaron toda la noche para aplicarse a una columna de QAE Toyopearl.

La **figura 17** muestra los resultados obtenidos al desarrollar la cromatografía en QAE Toyopearl. El perfil de elución (**figura 17 A**) nos indica que toda las hemo-proteínas se adsorbieron. El gradiente de NaCl (0 a 600 mM) eluyó un pico a aproximadamente 200 mM; el pico no fue homogéneo sino que presentó un hombro. Se tomaron las fracciones del pico (I) y el hombro (II) por separado y se hizo el análisis espectroscópico de la misma manera que para la columna anterior. Hay que recordar que en está fracción ya no contiene citocromo c, ya que se separó en la columna anterior, en la fracción que no se adsorbe. El espectro del complejo con CO (**Figura 17**) nos muestra que ambas fracciones, contienen citocromos reactivos con CO. Las dos fracciones se dializaron y aplicaron por separado a una columna de HA Ultrogel.

La **figura 18 IA** muestra el perfil de elución obtenido cuando se adsorbió el pico de la columna de QAE Toyopearl (columna anterior), a la que llamaré fracción I, en la columna de HA Ultrogel. En esta columna, el primer pico obtenido corresponde a una fracción no adsorbida; en ésta fracción no encontramos señales de citocromo tipo bo'. Después de aplicar el gradiente de fosfatos (5-500 mM), se obtuvo un pico a 50 mM de fosfatos que se analiza espectrofotométricamente, obteniéndose un espectro cuyas características pueden asociarse con la presencia de un complejo citocromo o-CO (**Figura 18 IB**). Sin embargo, el análisis de hemos nos muestra la presencia de hemo B y solo cantidades en trazas de hemo O (**Figura 18 IC**); la relación hemos B:O fue de 1:0.03.

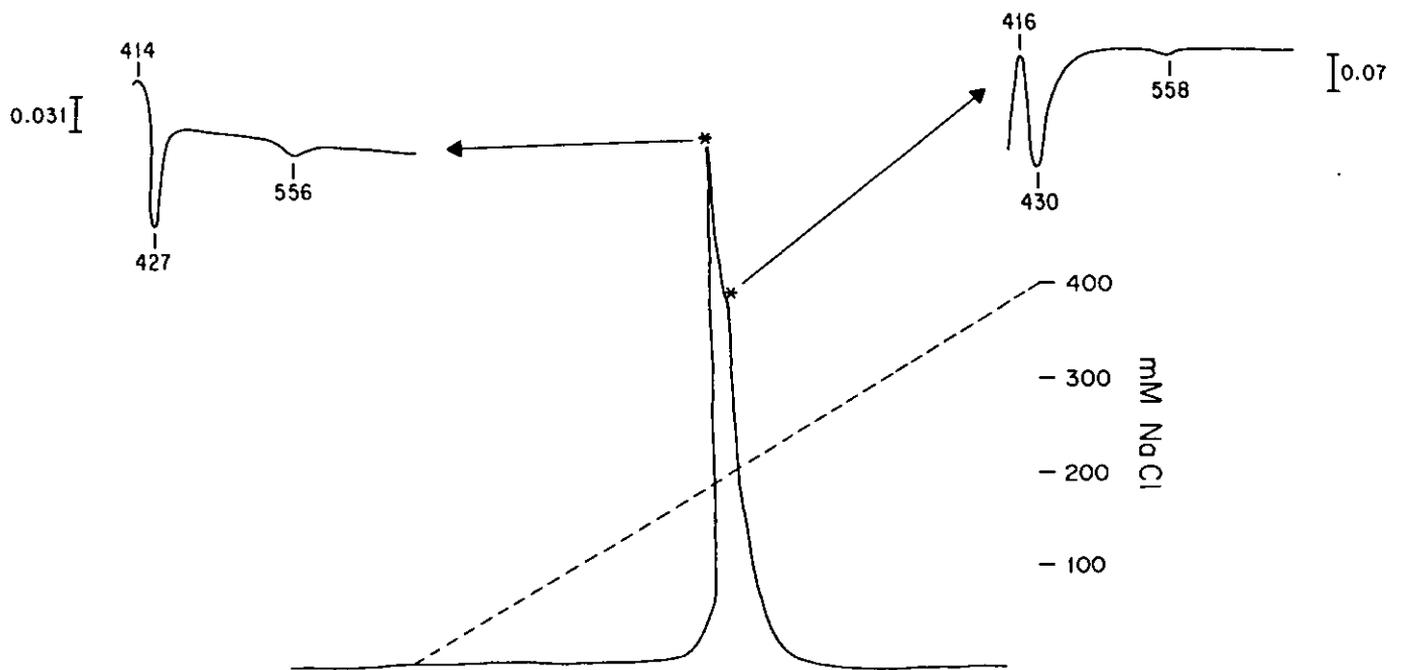


Figura 17. Columna de intercambio iónico en QAE Toyopearl de las fracciones obtenidas de la columna de DEAE Sepharosa Cl-6B. Perfil de elución de la columna; toda la proteína aplicada se adsorbió por lo que se muestra el pico de elución con un gradiente de NaCl (marcado con la línea punteada). Se tomaron alícuotas de las muestras del máximo del pico y del hombro (marcadas con un asterisco) para obtener los espectros diferenciales con CO.

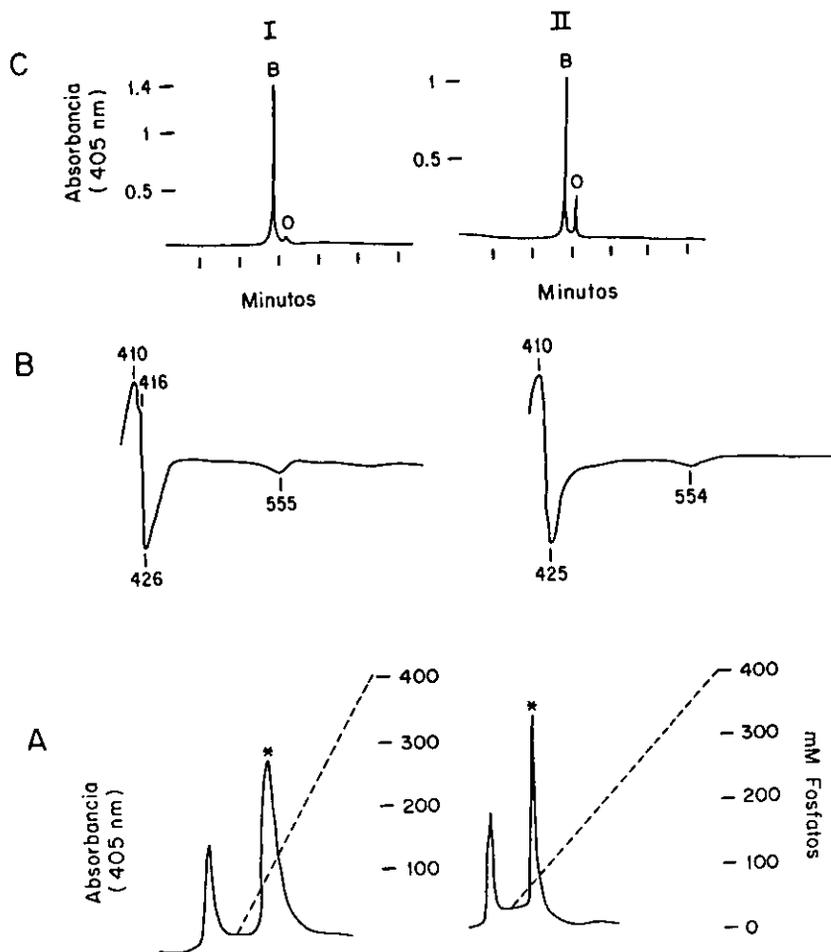


Figura 18. Cromatografía en HA Ultrogel del pico (I) y el hombro (II) obtenidos en la cromatografía de QAE Toyopearl. (A) Perfil de elución ; el primer pico corresponde a la proteína no adsorbida. Se aplicó un gradiente de fosfatos (0-500 mM) y se obtuvo un pico que eluye a 100 mM. (B) espectros diferenciales reducido-CO menos reducido de la fracción correspondiente al máximo de cada uno de los picos. (C) Cromatograma en HPLC fase inversa de los hemos extraídos con ácido acético de cada uno de los picos.

La figura 18 IIA muestra el perfil de elución obtenido cuando se adsorbe en una columna de HA Ultrogel, la fracción correspondiente al hombro de la columna de QAE Toyopearl; a esta fracción la llamaré fracción II. Se observó un pico de proteína no adsorbida, la cual no presentó citocromo bo'. Al aplicar el gradiente de fosfato, se eluye un pico a 65 mM, que al analizarse espectroscópicamente mostró un complejo cit  $\alpha$ -CO (Figura 18 IIB); el análisis de hemos comprobó la presencia de hemo O en esta fracción. La relación hemo B:O encontrada fue de 1:0.25.

El análisis electroforético en SDS-PAGE de algunas de las fracciones se muestran en la figura 19 A. En el carril 5 mostramos el patrón electroforético de la fracción positiva para hemo O, obtenida de HA ultrogel. La fracción no está completamente pura, sin embargo podemos observar 5 bandas; dos bandas tenues, con pesos moleculares de 66 y 51 KDa (probablemente contaminantes); y 3 bandas bien definidas con pesos moleculares de 38, 31 y 16 Kda. Si revisamos la composición de subunidades y los pesos moleculares reportados para citocromos tipo bo', la composición encontrada para la oxidasa de la mutante *PYM 1* es diferente. En *E. coli* Gennis (56) reporta al citocromo bo' compuesto de 4 subunidades con pesos moleculares de 55, 33, 18 y 13 Kda. No pudimos reconstituir la actividad enzimática en esta fracción, por lo que es difícil saber si la composición mostrada corresponde a la oxidasa.

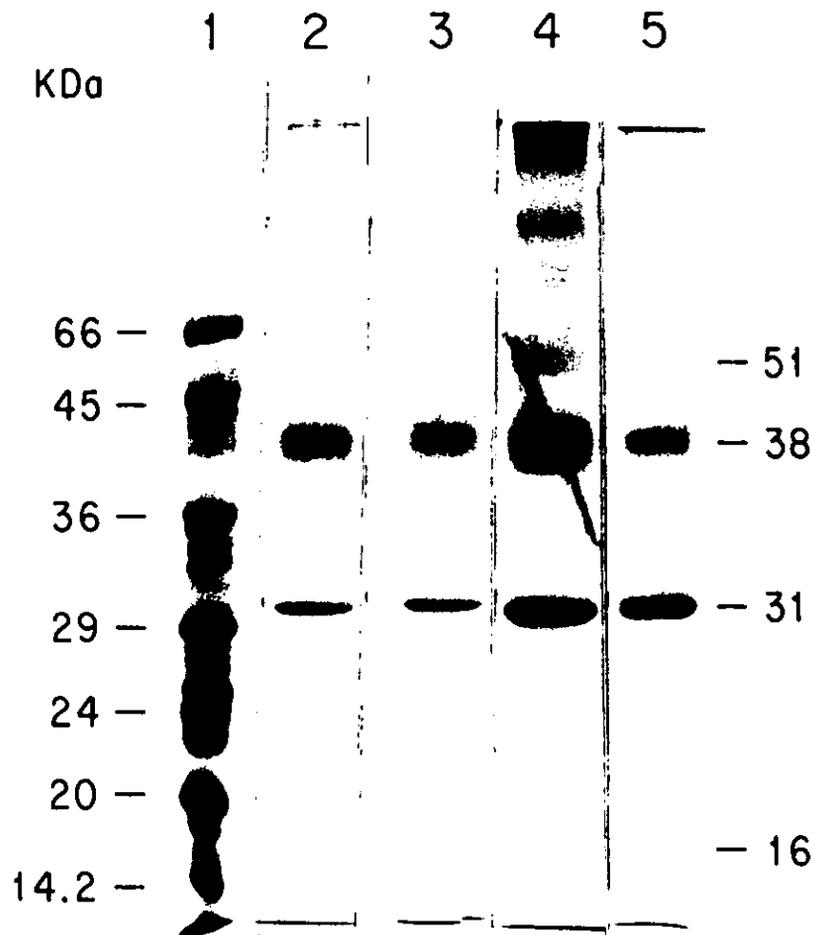


Figura 19. Purificación de la oxidasa presente en *B. cereus* mutante PYMI. Análisis electroforético en SDS-PAGE al 10 %. En el carril 1 se muestra el patrón de los estándares de masa molecular (Mark VII); el carril 2 y 3 corresponden al pico y al hombro respectivamente, de la columna de QAE Toyopearl; el carril 4 muestra el patrón electroforético del pico obtenido en la columna de HA Ultrogel, a partir de la fracción I de la columna de QAE Toyopearl (pico); el carril 5 muestra el patrón electroforético de la fracción II obtenida de la columna de HA Ultrogel (hombro). Esta última muestra corresponde a la fracción que está enriquecida con hemo O.

## DISCUSION

Durante el crecimiento logarítmico en un medio fermentable, las oxidasas terminales presentes se encuentran bajo represión catabólica y su crecimiento depende del metabolismo fermentativo (90). Un período muy importante se da cuando se acaba la fuente de carbono (sacarosa) y los ácidos orgánicos producidos ( $\beta$  hidroxibutirato por ejemplo) durante la fermentación causan una caída en el pH. En este punto puede observarse un claro aumento en la respiración endógena, indispensable para suplir la energía necesaria para la esporulación y para la utilización de los ácidos orgánicos formados. Durante estos eventos el citocromo caa<sub>3</sub> en la cepa silvestre tiene un papel fundamental, lo que se sugiere por su inducción justo antes de que el pH mínimo se haya alcanzado (Figura 2D). En esta misma etapa, el agotamiento de la fuente de carbono fermentable podría ser el factor más importante en la inducción del citocromo caa<sub>3</sub>; sin embargo el papel que tiene la caída en el pH puede ser muy importante, de acuerdo a lo reportado por Quirk (74), quien mostró que la expresión del operón *ctA* en *B. firmus* QF4 está regulada por el pH. También es importante mencionar que Lauraeus y Wikström (43) no encontraron expresión del citocromo caa<sub>3</sub> en un cultivo de *B. subtilis* 168, en fase estacionaria de crecimiento y aereación moderada, cuando el pH del medio se mantiene constante en 7.0. En el caso de la mutante *PYMI* la ausencia de citocromos del tipo-a, es compensada por la presencia de citocromos del tipo-b y un citocromo bo', cuya expresión es máxima cuando se llega a esporulación. Esta oxidasa bo' presente en la mutante *PYMI* muestra características muy interesantes: su actividad de TMPD oxidasa presenta alta resistencia a CO (a 30 % de saturación se inhibe solo 30 %,) si se compara con la sensibilidad al CO, que se observa para la actividad de TMPD oxidasa asociada a la presencia de citocromos de tipo-a (a la misma concentración de CO se inhiben un 80%). La actividad de la oxidasa bo', también es muy resistente a KCN (el 50 % de inhibición se obtiene a 0.2 mM), de manera diferente al citocromo bo' clásico presente en *E. coli*. Además, la oxidación de citocromos b y c y la actividad de NADH oxidasa, presentes en la membrana de la mutante *PYMI*, fueron inhibidas de manera paralela por KCN, sugiriendo la posibilidad de que un citocromo del tipo-c, es el donador de electrones para la oxidasa presente en las membranas de la mutante (Figura 4), a diferencia de lo que ocurre para el citocromo bo' de *E. coli*, que es una quinol oxidasa. Además, el hecho de que la actividad de NADH oxidasa, inhibida con HOQNO, antimicina y mixotiazol (inhibidores de sitio III), sea restaurada por adición de TMPD solo o combinado con ascorbato, sugiere que los electrones son donados a un citocromo c que se encuentra después del

quinol. Estos resultados contrastan con lo reportado por Lauraeus y Wikström (43) quienes mencionan que las quinol oxidasas aa<sub>3</sub> y bd' de *B. subtilis* 168 son fuertemente inhibidas por HOQNO y sus actividades no son restauradas por adición de ascorbato/ TMPD. Los datos presentados sugieren que en la cadena respiratoria de esta mutante encontramos un citocromo bc<sub>1</sub> y un citocromo c<sub>1</sub> que son componentes del camino que los electrones siguen hacia la enzima. Que un citocromo del tipo-c es el donador de electrones para la oxidasa presente en la mutante *PYMI*, fue comprobado cuando se realizó la reacción con oxígeno a temperaturas subcero, donde demostramos que un citocromo tipo-c, probablemente el c<sub>550</sub>, es el donador de electrones para la oxidasa presente en la mutante *PYMI* (Figura 14).

La mutante *PYMI*, que se caracteriza por la ausencia de citocromos aa<sub>3</sub> y caa<sub>3</sub> en su cadena respiratoria, expresa una oxidasa terminal cuya actividad no es limitante para permitir la oxidación de sustratos endógenos y permite la esporulación a niveles cercanos a los observados en la cepa silvestre. Los espectros diferenciales con CO muestran la presencia de una sola oxidasa cuyas características espectrales sugieren que se trata de un complejo CO-citocromo bo'. Esta idea se apoya con los datos obtenidos en HPLC que indican la presencia de hemos del tipo B y O. Por otro lado, la idea inicial basada en el análisis espectral de la formación de complejo con CO, de que *B. cereus* cepa silvestre tenía citocromo bo', no fue confirmada por el análisis de hemos de las membranas de esta cepa, donde se observa solamente la presencia de hemo B y hemo A. Este resultado está de acuerdo con lo reportado anteriormente para *B. subtilis* 168, el cual contiene un citocromo de tipo b de 17 Kda, que reacciona con CO, produciendo un complejo con características espectrales semejantes a las del complejo de CO-citocromo bo'. Este citocromo no contiene hemo O y no es una oxidasa (43).

Se ha postulado que la síntesis de hemo O en la familia Bacillaceae, ocurre solamente bajo condiciones especiales, como en el bacilo *PS3* cuando hay restricción en la concentración de oxígeno (87) ó en mutantes afectadas en el gen *ctaA* (91). Aunque nosotros no tenemos evidencia genética es probable, de acuerdo al fenotipo de la mutante *PYMI*, que esta mutante sea el resultado de un impedimento genético en el último paso de la síntesis del hemo A. Una interrupción en el gen *ctaA* en *B. subtilis*, provoca una acumulación de hemo O, como consecuencia de la falta de oxigenación/oxidación del grupo lateral metilo en el carbono 8 del anillo pirrólico (91).

La presencia de un citocromo bo' clásico en la familia Bacillaceae es controvertida. Por ejemplo Baines (6) y Sone (86) han reportado la purificación de dos diferentes citocromos semejantes a la

oxidasa bo' purificados de la misma bacteria, el bacilo *PS3*. Ambos citocromos muestran reactividad con CO y oxidan citocromo c exógeno a velocidades apreciables. Sin embargo, en ninguno de los dos se examinó la presencia de hemo O asociado a las enzimas purificadas. Aún más, Sone y Fujiwara (87) han reportado para el mismo bacilo *PS3*, que en condiciones de crecimiento a baja tensión de oxígeno, el citocromo o puede reemplazar al citocromo a<sub>3</sub> como centro catalítico en la oxidasa caa<sub>3</sub>, formando una enzima promiscua: la oxidasa cao'.

Nosotros hemos detectado en las membranas de la mutante *PYMI*, la presencia de cantidades normales de la subunidad COII del citocromo caa<sub>3</sub> y de la subunidad II del citocromo aa<sub>3</sub>, mientras que la subunidad COI de caa<sub>3</sub> y la subunidad I de aa<sub>3</sub> se encuentran en cantidades limitadas (Figura 2). De acuerdo con estos resultados, aunque nosotros podamos identificar la presencia de hemo O en nuestra mutante (Figura 3), la naturaleza de la oxidasa presente no está definida y existe la posibilidad de una sustitución promiscua de hemo B y O en las apoproteínas de las oxidasas aa<sub>3</sub> y/o caa<sub>3</sub>.

No obstante, los resultados demuestran la presencia de un citocromo bo', que puede ser reducido por donadores de electrones fisiológicos y no fisiológicos (figura 3) y la forma reducida es reactiva a CO, produciendo un complejo que tiene todas las características espectrales de un complejo CO-citocromo bo' clásico, como ha sido descrito por Poole (63,65). Este complejo es fotosensible (figura 8 B) y su espectro de fotodisociación también está de acuerdo con lo reportado por Poole (63,65). Al hacer la fotodisociación con concentraciones bajas de proteína y a baja temperatura, obtenemos un parámetro descrito por Wood ( $\epsilon(\gamma \text{ pico}-\gamma \text{ valle}) / \epsilon(\alpha \text{ pico}-\alpha \text{ valle})$ ) (103), que nos indica la presencia de un hemo de alto spin formando parte del centro catalítico de la oxidasa. Después de la fotólisis a temperaturas arriba de  $-95^{\circ}\text{C}$  en condiciones anóxicas, el CO se reasocia con una cinética esperada de primer orden y con un regreso simétrico a la basal, del valle a 417 y el pico a 434 nm. El cálculo del  $t_{1/2}$  de resociación fue de 4 veces mayor para el CO que el de la reacción con oxígeno, a temperaturas entre  $-95$  a  $-100^{\circ}\text{C}$ ; los resultados están de acuerdo con las cinéticas observadas para el citocromo bo' de *E. coli* (63). En la citocromo c oxidasa mitocondrial el citocromo a<sub>3</sub> reducido es el sitio de unión con CO bajo condiciones fisiológicas, pero después de la fotólisis a bajas temperaturas, el CO es transferido transitoriamente al CuB causando que su retorno al sitio catalítico sea lento (59). Espectroscopía de infrarrojo ha dado evidencia directa de que el CO se une al cobre en la citocromo oxidasa aa<sub>3</sub>, y más recientemente hay evidencia de su unión en el centro binuclear hemo-cobre del citocromo bo' (59). Por

lo tanto la cinética a baja temperatura descrita para la oxidasa presente en la mutante *PYM1* sugiere que también hay un átomo de cobre suficientemente cerca del hemo reactivo, que es el sitio de unión transitorio del CO después de la fotodisociación a baja temperatura.

Aunque la capacidad de la oxidasa semejante a citocromo bo' presente en la mutante *PYM 1* para actuar como oxidasa terminal, no ha sido establecida usando el criterio clásico del espectro fotoquímico de acción (13), este citocromo exhibe características que son criterios apropiados para ser considerada como oxidasa terminal: forma un complejo con CO que es fotodisociable, reacciona con oxígeno formando intermediarios oxigenados, cataliza la oxidación de citocromo c dependiente de oxígeno y tiene una alta afinidad por oxígeno.

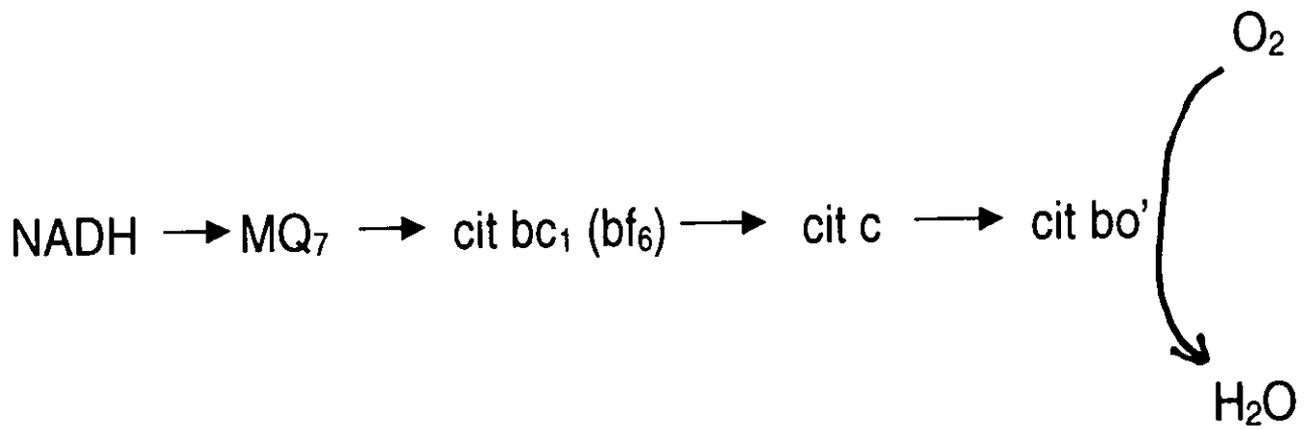
De acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización de membranas la oxidasa presente en la mutante *PYM 1*, podemos postularla como una citocromo c oxidasa. Este resultado está de acuerdo con reportes previos en *B. subtilis* W23 (20) y en el bacilo *PS3* (6, 86), que postulan que es el citocromo c el donador de electrones para citocromo bo' en la familia Bacillaceae. Apoyando este punto de vista, nosotros observamos que en las membranas de la mutante *PYM1*, puede promoverse la respiración con solo ascorbato: esta actividad fue entre el 70 y el 80 % de la que se muestra con la mezcla de ascorbato/TMPD y del 30 % de la que se encuentra con NADH. La ausencia de bandas de absorción de otras oxidasas (aa<sub>3</sub>, caa<sub>3</sub> o bd') en todos los espectros obtenidos y los resultados observados al determinar la afinidad por oxígeno, nos lleva a concluir que esta oxidasa es la mayor o única oxidasa responsable de la respiración en la mutante. Sin embargo no podemos eliminar la posibilidad de que se encuentren cantidades menores de alguna otra oxidasa, con un número de recambio muy alto (67).

La cinéticas de consumo de oxígeno obtenidas al utilizar la LfHb como amortiguador y monitor de oxígeno muestra la presencia de una sola oxidasa con una muy alta afinidad por oxígeno ( $K_m = 8.3 \text{ nM}$ ). La utilización de globinas oxigenadas ha mostrado valores de  $K_m$  en el rango de sub-micromolar para citocromo bo' (46 nM) (18) y bd' (16 nM) en *E. coli* (19). Reportes con otras técnicas en *PS3*, en condiciones de baja aereación (86), han mostrado una  $K_m = 90 \text{ nM}$  para citocromo bb<sub>3</sub> y en *Bradyrhizobium japonicum* la  $K_m$  para el citocromo cbb<sub>3</sub> es de 7 nM (41,68); la afinidad reportada en esta tesis para la oxidasa presente en la mutante *PYM1* es de las más altas ( $K_m = 8.3 \text{ nM}$ ) reportadas en la literatura.

Si analizamos juntos los resultados anteriores, es de llamar la atención que a pesar de que la concentración de citocromo bo' determinada en la mutante *PYMI* (0.32 nmoles/mg), es mayor a la concentración de citocromos del tipo-a encontrada en la cepa silvestre (0.21 nmol/mg) (Tabla III), la actividad de asc-TMPD oxidasa de la mutante *PYMI* (25 nAtO<sub>2</sub>/min/mg), es menor a la actividad correspondiente determinada en la cepa silvestre (60 nAtO<sub>2</sub>/min/mg) (Tabla II). Además, la afinidad por el oxígeno de la oxidasa bo' presente en las membranas de la mutante *PYMI* es muy alta, en el rango de 10<sup>-9</sup>M (Km=8.3 nM), mientras que la afinidad de las oxidasas tipo-a presentes en las membranas de la cepa silvestre está en el rango de 10<sup>-6</sup>M (Km=4 uM).

Proponemos, que la menor velocidad respiratoria determinada en las membranas de la mutante *PYMI*, es un reflejo de la baja velocidad de reacción con el oxígeno de la oxidasa bo' presente en las membranas de la mutante (T<sub>1/2</sub> de asociación =5min a -90 °C). La reacción con el oxígeno de las oxidasas del tipo-a presentes en las membranas de la cepa silvestre es más rápida (T<sub>1/2</sub> aa<sub>3</sub>= 3 min; T<sub>1/2</sub> caa<sub>3</sub>= 1.5 min a -90°C) (Tabla VI) y por lo tanto su respiración es mayor. Este hecho no es extraño en la enzimología, ya que las enzimas han evolucionado hacia una muy alta afinidad por O<sub>2</sub>, como se determinó para la oxidasa presente en las membranas de la mutante *PYMI* y el citocromo bd' de *E. coli*; o hacia una alta velocidad respiratoria, como es el caso de la oxidasa bd' de *A. vinelandii* (65,66). En *A. vinelandii* el citocromo bd' presenta una baja afinidad por oxígeno (4.5 uM) y una de las más altas velocidades respiratorias reportadas. En *E. coli*, el citocromo bd' tiene una baja velocidad respiratoria, pero presenta una muy alta afinidad por oxígeno (16 nM) (65,66)

Con los resultados presentados en esta tesis demostramos que en la mutante *PYMI B. cereus* existe una oxidasa funcional, perteneciente a la familia hemo-cobre y conformada por hemos B y O. Esta citocromo oxidasa bo', es una citocromo c oxidasa, que recibe los electrones de un citocromo c, el citocromo c<sub>550</sub> (Mr 14 Kda) (Esquema IV). Sin embargo, la naturaleza de esta oxidasa solamente podrá ser determinada cuando sea purificada y se obtenga su secuencia amino terminal. Estamos trabajando en su purificación y caracterización.



Esquema IV. Cadena Respiratoria de la mutante *PYMI* de *B. cereus*.



## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados expuestos, la oxidasa citocromo bo' , presente en la mutante de *Bacillus cereus PYM1*, es una oxidasa con propiedades sorprendentes. A partir de los resultados presentados podemos concluir lo siguiente:

1. Su función de oxidasa fue comprobada por su capacidad para intercambiar ligandos (CO/O<sub>2</sub>), formar un intermediario oxigenado discernible por espectroscopía y catalizar la reducción del oxígeno.
2. De la misma manera, las cinéticas de reasociación con CO demuestran el centro bimetálico típico, compuesto por un Cu y un hemo de alto spin lo que nos indica su función de oxidasa y su pertenencia a la familia de oxidasas hemo-cobre.
3. Los estudios de formación de complejo con CO y los resultados con HPLC nos indican que esta enzima carece de hemos tipo-a y basándonos en éstos resultados postulamos que la oxidasa está formada por hemos B y O.
4. Una de las propiedades más importantes de la oxidasa presente en las membranas de la mutante *PYM1*, es su alta afinidad por oxígeno (K<sub>m</sub>= 8.3 nM), aún mayor que la de los citocromos bo' (K<sub>m</sub>= 46 nM) y bd' (K<sub>m</sub>= 16 nM) de *E. coli* (18,19) y de las más altas reportadas a la fecha..
5. Su resistencia a la inhibición por KCN y CO la muestran como una oxidasa diferente al citocromo bo' clásico que encontramos en *E. coli*.
6. Otra diferencia muy importante con respecto a la citocromo bo' de *E. coli* es que el donador de electrones para esta oxidasa es un citocromo c, como lo demuestran los resultados obtenidos en el curso temporal de oxidación a temperaturas subcero, en los que observamos que la oxidación de la citocromo bo' de la mutante, es seguida por la oxidación de un citocromo tipo c. Otro resultado que apoya la participación del citocromo c como donador de electrones al citocromo bo, es el obtenido en la titulación con KCN de la oxidación de citocromo c y b, monitoreada espectroscópicamente. La oxidación de ambos citocromos disminuye de manera paralela al aumentar la concentración del inhibidor, sugiriendo que un citocromo tipo c, que postulamos es el c<sub>550</sub>, es el donador de electrones al citocromo bo'.
7. En cuanto a la cadena respiratoria completa, en esta mutante determinamos que la actividad de NADH oxidasa presenta una sensibilidad a antimicina y mixotiazol, semejante a la que se observa en el bacilo *PS3*. En este bacilo Sone (89) ha determinado la presencia de un complejo bc<sub>1</sub>, con sensibilidad a antimicina y mixotiazol cercana a la que presenta el complejo bc<sub>1</sub>, cuya sensibilidad a estos inhibidores es

menor que la del complejo bc<sub>1</sub> clásico. Este resultado sugiere la participación de un complejo bc<sub>1</sub> en la cadena respiratoria de la mutante, lo cual apoya la participación de un citocromo c como donador de electrones para su oxidasa.

8. En cuanto a la purificación de la oxidasa citocromo bo' presente en la mutante, una fracción semipurificada no muestra para pesos moleculares aparentes para sus subunidades, semejantes a los que se han reportado para la oxidasa bo' de *E. coli*, mientras que éstos pesos moleculares sí coinciden con los pesos moleculares de las subunidades de la oxidasa aa<sub>3</sub> de *B. cereus* cepa silvestre.

9. Es muy interesante la presencia en las membranas de la mutante *PYMI* de *B. cereus*, de las subunidades que conforman tanto la oxidasa aa<sub>3</sub>, como la oxidasa caa<sub>3</sub>. No sabemos si la oxidasa presente en la mutante *PYMI* es producto de un operón no descrito a la fecha o exista la posibilidad de una sustitución promiscua de los hemo B y O con las apoproteínas de las oxidasas tipo-a. Cualquiera de las dos opciones podrían explicar las diferencias encontradas entre la oxidasa presente en nuestra mutante y la oxidasa bo' clásica que se presenta en *E. coli*.

Para poder definir la naturaleza del citocromo bo' presente en la mutante *PYMI* es necesario purificar a la enzima. La purificación se ha hecho difícil, pero tenemos avances al respecto. Una preparación purificada de la enzima nos permitirá obtener la secuencia amino terminal y determinar si son las subunidades de las oxidasas aa<sub>3</sub> y caa<sub>3</sub> las que conforman a la proteína dando una enzima promiscua o se trata de una nueva enzima no descrita a la fecha.

INSTITUTO DE QUÍMICA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## PERSPECTIVAS

Será necesario completar la purificación de la oxidasa bo' para poder secuenciar el extremo amino terminal, lo que nos dirá sin lugar a dudas, si esta oxidasa es el resultado de un ensamble promiscuo entre las apoproteínas de las oxidasas tipo-a y hemos tipo B y O. Será necesario obtener preparaciones purificadas y activas para poder corroborar la función del citocromo c como el donador fisiológico de electrones para la oxidasa presente en la mutante *PYM 1*. Faltaría también identificar y obtener la relación molar de hemos y metales asociados a esta oxidasa.

Es importante determinar si esta oxidasa es capaz de translocar protones y para ello será necesario introducirla en liposomas y medir su capacidad para formar gradiente protón-motriz..

Será interesante determinar si el ensamble promiscuo se está dando con las subunidades de la oxidasa aa<sub>3</sub>, y/o con las subunidades de la oxidasa caa<sub>3</sub>. De hecho sabemos que la mutante *PYM1* expresa una oxidasa bo' durante crecimiento vegetativo y durante la esporulación, en medio fermentable (glucosa); sabemos que la cepa silvestre expresa citocromo aa<sub>3</sub> en etapa vegetativa y citocromo caa<sub>3</sub> en etapa esporulante. Es probable que ambas enzimas pudieran formar complejos promiscuos con los hemos B y O; nuevamente esta idea solo puede ser comprobada con las enzimas purificadas.

Finalmente cabe preguntarse si el ensamble promiscuo de las oxidasas aa<sub>3</sub> y caa<sub>3</sub> con hemos B y O pudiera tener un significado fisiológico o solo es una compensación fisiológica que resulta de la ausencia de hemo A. La síntesis de hemo A a partir de hemo O resulta de una reacción de oxigenación/oxidación que desde luego necesita de un ambiente aeróbico. Durante el crecimiento de la cepa silvestre en condiciones microaeróbicas hemos observado que desaparecen las oxidasas con hemo A y se incrementan las señales espectroscópicas que presumen la presencia de citocromo bo'. Puesto que se ha demostrado que existen falsos citocromos bo' en *B. subtilis* cepa 168 (43) será necesario probar mediante HPLC que en *B. cereus* crecido en microaerofilia aparece un citocromo bo' oxidasa resultado de un ensamble promiscuo o inducción de un nuevo operón. La sorprendente afinidad por O<sub>2</sub> (Km= 8.4 nM) mostrada en esta tesis, para el citocromo bo' de *PYM1* hace atractiva la idea de que el citocromo bo' en *B. cereus* cepa silvestre solo se exprese en condiciones de microaerobiosis.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Andreoli, A.J., Suehiro, S., Sakeyama, D., Takemoto, J., Vivanco, E., Lara, J.C. y Klute, M.C. (1973) Release and recovery of forespore from *Bacillus cereus*. J. Bact. 115: 1159-1166.
2. Anemuller, S., y Schafer, G. (1990) Cytochrome aa<sub>3</sub> from *Sulfolobus acidocaldarius*. A single-subunit, quinol oxidizing archaeobacterial terminal oxidase. Eur. J. Biochem. 191: 297-305.
3. Anraku, Y. (1988). Bacterial electron transport chain. Annu. Review. Biochem. 57: 101-132.
4. Appleby, C.A. y Bergersen, F.J. (1980). Preparation and experimental use of leghaemoglobin. In methods of evaluating biological nitrogen fixation (F.J. Bergersen, ed) 315-335. John Wiley and Sons LTD Chichester.
5. Arnaud, S., Malatesta, F., Guigliarelli, B., Gayda, J-P., Bertrand, P., Miraglio, R. Y Denis, M. Purification and Characterization of the oxidase from the marine bacterium *Pseudomonas nautica*. Eur. J. Biochem. 198: 349-356.
6. Baines, B.S., Hubbard, J.A.M. y Poole, R.K. (1984). Purification and Partial characterization of two cytochrome oxidases (aa<sub>3</sub> and o) from thermophilic bacterium *PS3*. Biochim Biophys Acta. 766: 438-445.
7. Bergersen, F.J. y Turner, G.L. (1979). Systems utilizing oxygenated leghaemoglobin and myoglobin as sources of free dissolved oxygen at low concentrations for experiments with bacteria. Anal. Biochem. 96: 165-174.
8. Bott, M, Bolliger, M. Y Hennecke, H. (1990). Genetic analysis of the cytochrome caa<sub>3</sub> branch of the *Bradyrhizobium japonicum* respiratory chain. Mol Microbiol. 4: 2147-2157.
9. Bott, M, Preisig, O. Y Hennecke H. (1992). Genes for a second terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 158: 335-343.
10. Cao, J., Hosler, J., Shapleigh, J., Revzin, A y Ferguson- Miller, S. (1992). Cytochrome aa<sub>3</sub> of *Rhodobacter sphaeroides* as a model for mitochondrial cytochrome c oxidase. The *cox II/cox II* operon codes for structural and assembly proteins homologous to those in yeast. J. Biol. Chem. 267: 24273-24278.
11. Capaldi, R.A. (1990) Structure and function of cytochrome c oxidase. Annu. Rev. Biochem. 59: 569-596.
12. Carter, K. y Gennis, R.B. (1985) Reconstitution of the ubiquinone-dependent pyruvate oxidase system of *Escherichia coli* with the cytochrome o. Terminal oxidase complex. J. Biol Chem. 260:10986-10990.

13. Castor, L. N. and Chance, B. (1959) Photochemical Determinations of the oxidases of bacteria. *J. Biol. Chem.* 234: 1587-1592.
14. Chance, B., Legallais, V., Sorge, J. y Graham, N. (1975) A versatile time-sharing multichannel spectrophotometer, reflectometer and fluorometer. *Anal. Biochem.* 66:
15. Collier, R.E. (1957). An approach to synchronous growth for spore formation in *Clostridium roseum*. In spores pp 10-17. Edited by H.O. Halvorson, Washinton, D.C. Amer Inst Biol Sci.
16. Del Arenal, I.P., Contreras, M.L., Svaeteorova, B.B., Rangel, O., Dávila, J.R., Lledías, F. y Escamilla, J.E. (1997). Expression of haem O and a putative cytochrome bo' in a mutant of *Bacillus cereus* that lacks haem A-containing oxidases. *Archives in Microbiology*, 167: 24-31.
17. De Gier, J.W., Lübben, M., Reijnders, W.N.M., Tipker, C.A., van Spanning, R.J.M., Stouthamer, A.H. y van der Oost, J. (1994) The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. *Mol-Microbiol.* 13: 183-196.
18. D'Mello, R., Hill, S. Y Poole, R.K. (1994) Determination of the oxygen affinities of the terminal oxidases in *Azotobacter vinelandii* using the deoxygenation of oxyleghaemoglobin and oxymyoglobin: cytochrome *bd*' is a low affinity oxidase. *Microbiology* 140: 1395-1402.
19. D' Mello, R., Hill, S. Y Poole, R.K. (1995). The oxygen affinity of cytochrome bo' in *Escherichia coli* determined by deoxygenation of oxyleghaemoglobin and oxymyoglobin: Km values for oxygen are in the submicromolar range. *J. Bacteriol* 177: 867-870.
20. De Vrij, W., Burg, B. y Konings, W.N. (1987). Kinetic characterization of cytochrome *c* oxidase from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 166:589-595.
21. Escamilla, J.E., Ramírez, R., Del Arenal, P. y Aranda, A. (1986) Respiratory systems of *Bacillus cereus* mother cell and forespore. *J. Bacteriol.* 167: 544-550.
22. Fu, H., Iuchi, A. Y Lin, E.C.C. (1991). The requirement of ArcA and Fnr for peak expression of the *cyd* operon in *Escherichia coli* under microaerobic conditions. *Mol. Gen Genetic.* 226: 209-213
23. García-Horsman, J.A., Barquera, B., González-Halphen, D. Y Escamilla J.E. (1991) Purification and Characterization of two subunit cytochrome *aa<sub>3</sub>* from *Bacillus cereus*. *Mol. Microbiol.* 5: 197-205.
24. García-Horsman, J.A., Barquera, B. y Escamilla, J.E. (1991). Two different *aa<sub>3</sub>*-type cytochromes can be purified from the bacterium *Bacillus cereus*. *Eur. J. Biochem.* 199:761-768.
25. García- Horsman J.A., Berry, E., Shapleigh, J.P., Alben, J.O. y Gennis, R.B. (1994). A novel cutochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* that lacks CuA. *Biochemistry.* 33: 3113-3119.

26. García-Horsman, J.A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J. Y Gennis R.B: (1994). The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J. Bacteriology*, 176: 5587-5600.
27. Gennis, R.B. (1991). Some recent advances relating to prokaryotic cytochrome reductases and cytochrome *c* oxidases. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1058: 21-24.
28. Georgius, C.D., Duewike, T.J. y Gennis, R.B. (1988). Regulation of expression of the cytochrome terminal oxidase in *Escherichia coli* is transcriptional. *J. Bacteriol.* 170: 961-966.
29. Gilmour, R. Y Krulwich, T.A. (1997). Construction and characterization of a mutant of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 with a disrupted *cta* operon and purification of a novel cytochrome *bd*. *J. Bacteriol.* 179: 863-870.
30. Gohlke, V., Warne, A. y Saraste, M. (1997). Projection structure of the cytochrome *bo* ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* at 6°A resolution. *EMBO J.* 16: 1181-1188.
31. Goldbeck, R.A., Einarsdóttir, O., Dawes, T.D., O'Connor, B. D., Sureus, K.K., Fee, J.A. y Kliger, D.S. Magnetic circular dichroism study of cytochrome *ba<sub>3</sub>* from *Thermus thermophilus*: spectral contributions from cytochrome *b* and *a<sub>3</sub>* and nanosecond spectroscopy of CO photodissociation intermediates. (1992). *Biochemistry*. 31: 9376-9387.
32. Goodhew, C.F., Brown, K.R. y Pettigrew, G.W. (1986). Heme staining in gels, as useful tool in the study of bacterial *c*-type cytochromes. *Biochem. Biophys. Acta*. 852: 288-294
33. Gray, K.A., Grooms, M., Myllykallio H., Moomaw, C., Slaughter, C. Y Dalal, F. (1994). *Rhodobacter capsulatus* contains a novel *cb*-type cytochrome *c* oxidase without a CuA center. *Biochemistry*. 33: 3120-3127..
34. Hanson, R.S., Srinivarsan, V.R. y Halvorson, H.D. (1963). Biochemistry of sporulation. *J. Bacteriol.* 85: 451-460.
35. Hosler, J.P., Fetter, M., Tecklenberg, M.J., Espe, M., Lerma, C. Y Ferguson-Miller, S. (1992) Cytochrome *aa<sub>3</sub>* of *Rhodobacter sphaeroides* as a model for mitochondrial cytochrome *c* oxidase. Purification kinetics, proton pumping and spectral analysis. *J. Biol. Chem.* 267: 24264-24772.
36. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. and Michel, H. (1995). Structure at 2.8 °A resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*. 376: 660-669.
37. Iwata, S. (1998) Structure and function of bacterial cytochrome oxidase *J. Biochem-Tokyo* 123: 369-375.

38. James, W.S., Gibson, F.P., Taroni y Poole, R.K. (1989) The cytochrome oxidases of *Bacillus subtilis*: mapping of a gene affecting cytochrome aa<sub>3</sub> and its replacement by cytochrome o in a mutant strain. FEMS Microbiol Lett. 58: 277-282.
39. Jones, C.W. y Poole, R.K (1985). Analysis of cytochromes. In methods in Microbiology 18 (Gollshalk, G., ed) pp 285-328. Academic Press, London.
40. Jurtshuk, P., Jr., Mueller, T.J., y Wong, T.Y. (1981) Isolation and purification of the cytochrome oxidase of *Azotobacter vinelandii*. Biochim. Biophys. Acta. 637: 374-382.
41. Keefe, R.G. y Maier, R.J. (1993). Purification and characterization of an O<sub>2</sub>-utilizing cytochrome-c oxidase complex from *Bradyrhizobium japonicum* bacteroid membranes. Biochim Biophys. Acta. 1183: 91-104
42. Kutoh E. y Sone, N. (1988) Quinol-cytochrome c oxidoreductase from thermophilic bacterium PS3. J. Biol Chem. 263: 9020-9026.
43. Lauraeus, M. y Wikström, M. (1993) The terminal quinol oxidases of *Bacillus subtilis* have different energy conservation properties. J. Biol Chem. 268: 11470-11473.
44. Lema, E., Schagger, H. Y Kroger, A. (1993). The menaquinol oxidase of *Bacillus subtilis* W23. Arch. Microbiol. 159: 574- 578.
45. Lowry, O.H., Rosenborough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol Chem. 193: 265-275.
46. Lübben, M., Kolmerer, B. y Saraste, M. (1992). An archaebacterial terminal oxidase combines core structures of two mitochondrial respiratory complexes. EMBO J. 11: 805-812.
47. Lübben, M. Y Morand, K. (1994). Novel prenylated hemes and cofactors of cytochrome oxidases. Archea have modified heme A and O. J. Biol Chem. 269: 21473-21479.
48. Ludwig, B. (1992). Terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*. Biochim.-Biophys.-Acta. 1101:195-197.
49. Markwell, M.A.K., Hass, S.M., Tolbert, N.E. y Bieber, L.L. (1981). Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. In methods in Enzymology, vol 72, Lowenstein, S.M. (ed) New York: Academic Press, pp 296-303.
50. Mather, M.W., Springer, P., Hensel, S., Buse, G. Y Fee, J.A. (1993). Cytochrome oxidase genes from *Thermus thermophilus*. Nucleotide sequence of the fused gene and analysis of the deduced primary structures for subunits I and III of cytochrome caa<sub>3</sub>. J. Biol Chem. 268: 5399-5408.

51. Matsushita, K., Patel, L. Y Kaback, H.R. (1984) Cytochrome o type oxidase from *Escherichia coli*. Characterization of the enzyme and mechanism of electrochemical proton gradient generation. *Biochemistry*. 23: 4703-4714.
52. Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O. y Ameyama, M. (1990) Cytochrome a<sub>1</sub> of *Acetobacter aceti* is a cytochrome ba functioning as ubiquinol oxidase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 87: 9863-9867.
53. Matsushita, K., Ebisuya, H., Ameyama, M. y Adachi, O., (1992) Change of the terminal oxidase from cytochrome a<sub>1</sub> in shaking cultures to cytochrome o in static cultures of *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol*. 174: 122-129.
54. Matsushita, K., Takahashi, K., Takahashi, M, Ameyama, M. Y Adachi, O. (1992) Methanol and ethanol oxidase respiratory chains of the methylotrophic acetic acid bacterium, *Acetobacter methanolicus*. *J. Biochem*. 111: 739- 747.
55. Miller, M.J. y Gennis, R.B. (1985) The cytochrome d complex is a coupling site in the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. 260: 14003-14008
56. Minghetti, K.C., Goswitz, V.C., Gabriel, N.E., Hill, J.J., Barasi, C., Georgius, D., Chan, S.I. y Gennis, R.B. (1992) Modified, large-scale purification of the cytochrome o complex of *Escherichia coli* yields a two heme/one copper terminal oxidase with high specific activity. *Biochemistry*. 31: 6917-6924
57. Muller, J.P. y Taber, H.W. (1989). Structure and expression of cytochrome aa<sub>3</sub> regulatory gene cta A of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. 171: 4967-4978.
58. Muller, J.P. y Taber, H.W. (1989). Isolation and sequence of ctaA, a gene required for cytochrome aa<sub>3</sub> biosynthesis and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. 171:4967-4978.
59. Muntyan, M.S., Ludwig, B., Zickermann, I. Y Staeshinova, N.P. (1998) Role of copper during carbon monoxide binding to terminal oxidases. *FEBS-LETTERS* 429: 216-220.
60. Nobrega, M.P., Nobrega, F.G. y Tzagoloff, A. (1990). Cox 10 codes for a protein homologous to the ORF1 product of *Paracoccus denitrificans* and is required for the synthesis of yeast cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem*. 265: 14220-14226.
61. Ostermeier, C. Y Michel, H. (1997). Crystallization of membrane proteins. *Curr. Opin Struct. Biol* 7: 697-701.
62. Peschek, G.A., Alge, D. Fromwald, S. Y Meyer, B. (1995). Transient accumulation of heme o (cytochrome o) in the cytoplasmic membrane of semi-anaerobic *Anacystis nidulans*. Evidence for oxygenase-catalyzed hem O/A transformation. *J. Biol. Chem*. 270: 27937-27941.

63. Poole, R.K., Waring, A.J. y Chance, B. (1979). The reaction of cytochrome  $\text{c}_\text{o}$  in *Escherichia coli* with oxygen. Low-temperature Kinetic and espectral studies. *Biochemical Journal*. 184:379-389.
64. Poole R. K. (1983). Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins. *Biochem Biophys Acta*. 726: 205-243.
65. Poole, R.K., D'Mello, R., Hill, S., Ioannidis, I., Lung D. Y Wu, G. (1994). The oxygen reactivity of bacterial respiratory haemoproteins oxidases and globins. *Biochim.- Biophys.- Acta*. 1187: 226-231.
66. Poole, R.K. (1994) Oxygen reactions with bacterial oxidases and globin, binding reduction and regulation. *Antonie van- Leeuwenhock*. 65: 289-318.
67. Poole, R.K. y Hill, S. (1997) Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. Roles of the terminal oxidases. *Biosci-Rep*. 17: 303-317.
68. Preisig, O., Anthamatten, d. Y Hennecke, H. (1993) Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen fixing endosymbiosis. *Proc. Natl Acad. Sci USA*. 90: 3309-3313.
69. Puustinen, A., Finel, M., Virkki, M. y Wikstrom, M. Cytochrome  $\text{c}_\text{o}$  (bo) is a proton pump in *Paracoccus denitrificans* and *Escherichia coli*. (1989) *FEBS Lett*. 249- 163-167.
70. Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis R.B. y Wikstrom, M. (1991). Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*. *Biochem*. 30: 3936-3942.
71. Puustinen, A. y Wikström, M. (1991) The heme groups of cytochrome  $\text{c}_\text{o}$  from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 6122-6126.
72. Puustinen, A. (1992) A novel type haem group of cytochrome  $\text{c}_\text{o}$  from *Escherichia coli*. *Acta Physiol. Scand-Suppl*. 607: 265-268.
73. Quereshi, M.H., Yumoto, I., Fujiwara, T. y Fukumorii, Y. (1990). A novel  $\text{c}_\text{ao}$  type cytochrome oxidase from a facultative alkalophilic *Bacillus*: purification and some molecular and enzymatic features. *J. Biochem*. 107: 408-485.
74. Quirk, P.G., Hicks, D.B., y Krulwich, T.A. (1993) Cloning of the cta operon from alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 and characterization of the pH-regulated cytochrome  $\text{c}_{aa_3}$  oxidase it encodes. *J. Biol Chem*. 268: 678-685.
75. Ratio, M., Jalli, T. y Saraste, M. (1987) Isolation and analysis of the genes for cytochrome c-oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *EMBO J*. 6: 2825-2833.

76. Richter, O. M., Tao, J.S., Turba, A. y Ludwig, B. (1994). A cytochrome ba<sub>3</sub> functions as a quinol oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Purification cloning and sequence comparison. J. Biol. Chem. 269: 23079-23086.
77. Saiki, K., Mogi, T. y Anraku, Y. (1992). Heme O biosynthesis in *Escherichia coli*: the cyo E gene in the cytochrome bo operon encodes a protoheme IX farnesyltransferase. Biochem Biophys Res Commun. 189: 1491-1497.
78. Saiki, K., Mogi, T., Ogura, K y Anraku, Y. (1993) In vitro hem O synthesis by the cyo E gen product from *Escherichia coli*. J. Biol Chem. 268: 26041-26045.
79. Santana, M., Kunst, F., Francoise, H., Rappaport, G., Danchin, A. y Glase, P. (1992). Molecular cloning, sequencing and physiological characterization of the COX operon from *Bacillus subtilis* encoding the aa<sub>3</sub> 600 quinol oxidase. J. Biol. Chem. 267: 10225-10231.
80. Saraste, M. (1990). Structure feature of cytochrome oxidase. Q. Rev. Biophysica. 23: 331-3336.
81. Shapleigh, J.P., y Gennis, R.B. Cloning, sequencing and deletion from the chromosome of the gene encoding subunit I of the aa<sub>3</sub>-type cytochrome oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. (1992). Mol Microbiol. 6: 635-642.
82. Slater, E.C., van Geler, B.F. y Minnaert, k. 1965. Cytochrome c oxidase, pag. 667-706. En T.E. King H.S. Mason and M. Morrison ed. Oxidases and Related redox System. John Wiley & Son, New York.
83. Smith, L. (1978) Bacterial cytochromes and their spectral characterization. Methods in Enzymology 53: 202-213.
84. Surpin, M.A., Moshiri, L., Murphy, A.M. y Maier, R.J. (1994). Genetic evidence for a fourth terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. Gene 143: 73-77.
85. Sone, N., Yokoi, F., Fu, T., Ohta, S., Metso, T., Raitio, M., y Saraste, M. Nucleotide sequence of the gene coding for cytochrome oxidase subunit I from the thermophilic bacterium PS3. (1988). J. Biochem-Tokio. 103: 606-610.
86. Sone, N., Kutoh, E. y Sato, K. (1990). A cytochrome o type oxidase of thermophilic bacterium PS3 grown under air-limited conditions. J. Biochem. 107: 547-602.
87. Sone, N. y Fujiwara, Y. (1991). Effects of aeration during growth of *Bacillus steurothermophilus* on proton pumping activity and change of terminal oxidases. J. Biochem. 110: 1016-1021.
88. Sone, N. y Fujiwara, Y. (1991) Haem O can replace haem A in the active site of cytochrome c oxidase from thermophilic bacterium PS3. FEBS. Letters. 288: 154-158.

89. Sone, N., Tsucheya, N., Inoue, M. & Shunsuke, N. (1996) *Bacillus stearothermophilus* *qcr* operon encoding rieske FeS protein, cytochrome *b<sub>g</sub>* and a novel type cytochrome *c<sub>1</sub>*, quinol cytochrome *c* reductase. *J. Biol Chem* 271:12457-12462.
90. Srinivasan, V.R. (1995) Intracellular regulation of sporulation of bacteria. In: Campbell. L.L., Halvorson, H.O. (eds) *Spores III*. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp 64-74.
91. Svenson, B., Lübber, M. & Hederstedt, L. (1993) *Bacillus subtilis* *ctaA* and *ctaB* function in heme A biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 10:193-201.
92. Taber (1974) Isolation and properties of cytochrome *a* deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Gen Microbiol.* 81: 435-444.
93. Thomas, P.E., Ryan, D. & Levin W. (1976) An improved staining procedure for the detection of peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 75: 168-176.
94. Tochikubo, K. (1971). Changes in terminal respiratory pathways of *Bacillus subtilis* during germination, outgrowth and vegetative growth. *J. Bacteriol.* 108:652-661.
95. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70: 4350-4354.
96. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Mizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science.* 272:1136-1144.
97. Van-der Oost, J., Haltia, T., Raitio, M. & Saraste, M. Genes coding for cytochrome *c* oxidase in *Paracoccus denitrificans*. (1991). *Bioenerg. Biomembr.* 23: 257-267.
98. Van-der Oost, J., von Wachenfeld, C., Hederstedt, L., & Saraste, M. *Bacillus subtilis* cytochrome oxidase mutants: biochemical analysis and genetic evidence for two *aa<sub>3</sub>* type oxidases. (1991). *Mol. Microbiol.* 5: 2063-2072.
99. Van-der Oost, J., de Boer, A.P.N., de Gier, J.W.L., Zumft, A.H. Stouthamer & Spanning, R.J.M. (1994). The heme-copper oxidase family consists of three distinct types of terminal oxidases and is related to nitric oxide reductase. *FEMS-Microbiol-Lett.* 121:1-9.
100. Von-Wachenfeldt, C.V. & Hederstedt, L. (1992). Molecular biology of *Bacillus subtilis* cytochromes. *FEMS Microbiol Lett.* 100: 91-100.

101. Wikstrom, M. (1989). Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton-pumping. *Nature (London)* 338: 776-778.
102. Wilmanns, M.M Lappalainen, O., Kelly, M., Sauer-Erikson, E. y Saraste, M. (1995). Crystal structure of the membrane-exposed domain from a respiratory quinol oxidase complex with an engineered dinuclear copper center. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11955-11959.
103. Wood, P.M. (1984) Bacterial protein with CO-binding b- or c-type haem. Functions and absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 768: 293-317.
104. Yu, J. Y Le Brun, N.E. (1998) Studies of the Cytochrome subunits of Menaquinone: Cytochrome c reductase (bc complex) of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 273:8860-8866.
105. Yun, C.H., Beci, A.R., Crofts, S., Klapan, S. Y Gennis, R.B. (1990). Cloning and DNA sequencing of the fbc operon encoding the cytochrome bc<sub>1</sub>-complex from *Rhodobacter sphaeroides*: characterization of fbc deletion mutants and complementation by a site-specific mutational variant. *Eur. J. Biochem.* 194: 399-411.
106. Zimmermann, B.H., Nitsche, C.I., Fee, J.A., Rusnak, F. Y Münck, E. (1988). Properties of a copper-containing cytochrome ba<sub>3</sub>: a second terminal oxidase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:5779-5783.