



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Caracterización de la actividad del complejo tipo *bc* de *Bacillus subtilis* con diferentes quinonas

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de Bióloga

PRESENTA:

ANA PAULA GARCÍA GARCÍA

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid

Junio 2010





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.

Agradecimientos

Son muchas las personas a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de la vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón. Sin importar en dónde estén o si algún día llegan a leer estas dedicatorias, quiero darles las gracias por formar parte de mi, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones

Gracias al programa de PAPIIT por el apoyo económico que me brindó para la realización de este proyecto.

A mi tutora, la Doctora Emma que me permitió trabajar con ella en éste proyecto de tesis y a Tecilli una gran amiga, ambas por enseñarme, orientarme, motivarme, por todos aquellos consejos y sobre todo por la gran confianza y paciencia que me tuvieron todo el tiempo, porque siempre tendrán todo mi respeto y admiración. GRACIAS.

Gracias a mis padres. Ma. Angélica García Maya y Armando García Ríos por apoyarme en mis estudios y ayudarme a salir adelante, porque sin ellos esto no hubiera sido posible.

Alma mi hermana, también quiero darte las gracias, porque aunque en ocasiones eres muy enojona y no te entiendo, sé que me adoras. Gracias por esas largas noches y escucharme cuando más lo necesitaba haciéndome ver las cosas de diferente manera. Gracias fea, te amo.

A Joyce y Cuchis!! gracias por su amistad incondicional, por todo el cariño que me brindaron, por ser mis mayores confidentes y estar conmigo en las buenas y en las malas, por todos esos momentos que compartimos (aunque algunos trato de reprimirlos, ja), las quiero amigas!!!

Y no crean que me olvidé de ustedes monstruosidades (Vic, Led y César), porque Gera es precioso😊, aunque me dieron mucha lata y me torturaban mentalmente cada día, la verdad me hubiera encantado conocerlos desde antes, porque créanlo o no todos fueran una parte crucial para la formación de esta muchachona jajaja, admítanlo me aman!, gracias chicos los quiero mucho.

Dedicatorias

Mami y Papi, les dedico esta tesis agradeciéndoles por todos los esfuerzos y sacrificios que hicieron para formarme moral y profesionalmente, gracias por confiar en mí, haberme apoyado en todo momento y seguir a mi lado. Con todo el cariño y amor del mundo. GRACIAS!

Sin dejar atrás a todas aquellas personas que tuve la dicha de conocer, que me acompañaron al o largo de estos 4 años y que dejaron una marca muy importante en mi, con las que crecí en todos los aspectos de la vida, GRACIAS!, porque aunque la vida nos haya llevado por caminos distintos, siempre los tendré presentes.

Índice

Lista de Abreviaturas	VI
Resumen	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Grupo Firmicutes.....	3
1.1 Género <i>Bacillus</i>	4
1.2 <i>Bacillus subtilis</i>	6
2. Cadenas respiratorias.....	7
2.1 Aspectos particulares de los grupos prostéticos (grupos redox) de los complejos respiratorios.....	7
2.2 Complejos respiratorios.....	12
2.3 Menaquinonas.....	14
3. Cadena respiratoria de <i>Bacillus subtilis</i>	18
4. Los complejos tipo <i>bc</i> . Comparación.....	23
4.1 Complejo citocromo <i>bc₁</i>	23
4.1.1 Ciclo Q.....	24
4.2 Complejo citocromo <i>b_{6f}</i>	25
4.3 Complejos citocromos <i>bc</i> de <i>Bacillus subtilis</i>	26
5. Antecedentes directos.....	30
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
RESULTADOS	47
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIÓN	72
PERSPECTIVAS	73
ANEXOS	74
REFERENCIAS	91

Índice de figuras

Fig. 1 Relaciones dentro de los Firmicutes.....	4
Fig. 2 <i>Bacillus subtilis</i> bacteria Gram positiva.....	7
Fig. 3 Cadenas respiratorias bacterianas con citocromos.....	9
Fig. 4 Tipos del grupo hemo	10
Fig. 5 Espectro de absorción. Ubicación de citocromos	11
Fig. 6 Cadena respiratoria “clásica”	14
Fig. 7 Comparación estructural de benzoquinonas y naftoquinonas	15
Fig. 8 Uso de quinonas por diversas especies.....	16
Fig. 9 Cadena respiratoria mitocondrial. Potenciales redox	17
Fig. 10 Sistema respiratorio aeróbico de <i>B. subtilis</i>	18
Fig. 11 Complejos I y II. Relación.....	20
Fig. 12 Citocromos <i>c₅₅₀</i> (CccA) y <i>c₅₅₁</i> (CccB)	22
Fig. 13 Ciclo Q.....	25
Fig. 14 Comparación estructural de complejos citocromo <i>bc₁</i> mitocondrial, bacterial y <i>b_{6f}</i> fotosintético.....	26
Fig. 15 Organización de los dominios protéicos de los complejos citocromos <i>bc₁</i> , <i>b_{6f}</i> y <i>bc</i> de <i>B. subtilis</i>	27
Fig. 16 Posible modelo tridimensional del complejo <i>b_{6c}</i> de <i>B. subtilis</i>	28
Fig. 17 Dendrograma, comparación de secuencia QcrB del citocromo <i>b₆</i> de los complejos citocromos <i>b_{6f}</i> , y citocromo <i>b</i> de los complejos <i>bc₁</i>	29
Fig. 18 Comparación, espectros diferenciales de membranas crecidas en medios MSR y LB.....	47
Fig. 19 Espectro diferencial de las membranas aisladas de <i>B. subtilis</i>	48
Fig. 20A Actividad del Complejo III <i>b_{6c}</i> en membranas de <i>B. subtilis</i>	50

IV

Fig. 20B Actividad del Complejo III bc_1 en membranas de mitocondrias de levadura...	51
Fig. 21 Actividad del Complejo II SDH en membranas de <i>B. subtilis</i> y levadura	52
Fig. 22 Actividad del Complejo tipo <i>bc</i> con diferentes naftoquinonas.....	54
Fig. 23 Titulación de la actividad de quinol: citocromo <i>c</i> reductasa y succinato: citocromo <i>c</i> reductasa en membranas de <i>B. subtilis</i>	57
Fig. 24A Inhibición de las Aox en membranas de Levadura.....	59
Fig. 24B Inhibición de las Aox en membranas de <i>B. subtilis</i> (DBH).....	60
Fig. 24C Inhibición de las Aox en membranas de <i>B. subtilis</i> (con Juglona).....	60
Fig. 24D Inhibición de las Aox en membranas de <i>B. subtilis</i> (con Naftazarina).....	61
Fig. 25A Inhibición del complejo bc_1 en membranas de Levadura.....	62
Fig. 25B Inhibición del complejo <i>bc</i> en membranas de <i>B. subtilis</i>	63
Fig. 26 Comparación estructural menaquinona, ubiquinona y decil benzoquinol (DBQ).....	67

Lista de Abreviaturas

Ácido etilendiamino tetra acético – EDTA

Ácido Salicilhidroxámico - SHAM

4-(2- Aminoetil) benzenesulfonil fluoruro hidrocioruro – AEBSF

Bacillus subtilis - *B. subtilis*

Caldarielaquinonas – CQ

Decil benzoquinona – DBQ

Decil hidroxiquinol – DBH

2,6-Diclorofenol indolfenol – DCPIP

Dimetil sulfóxido – DMSO

Ditiotreitol– DTT

Dodecil sulfato de sodio – SDS

Flavin adenin dinucleótido – FAD

Flavin mononucleótidos - FMN

Luria Broth – LB

Medio Súper Rico – MSR

Menaquinona – MK

Metil sulfato metilfenazonio - PMS

Oxidasas alternas - Aox

Plastoquinonas – PQ

Rodoquinonas – RQ

Sobrenadante – SN

Suero de albúmina bovina – BSA

Ubiquinonas – UQ

Resumen

Las cadenas respiratorias son la principal fuente de energía de todos los organismos vivos, éstas se encargan de catalizar el transporte de electrones hacia diferentes aceptores finales, produciendo agua, un gradiente de protones y ATP. La mayor parte del ATP de las células eucariontes es producido por la fuerza protón-motriz generada en la membrana interna mitocondrial ó en la membrana tilacoidal del cloroplasto. Un proceso muy similar aunque algunas veces más complejo ocurre en la membrana celular de muchas bacterias, donde el aceptor final de electrones aparte del oxígeno puede ser el sulfato, nitrato o dióxido de carbono según la especie (Santana y cols., 1992).

La cadena respiratoria está formada por los siguientes complejos: el complejo I ó NADH deshidrogenasa transfiere los electrones donados por una molécula de NADH a una quinona y hacia el complejo III, el cual a su vez transfiere estos a un citocromo *c* y posteriormente al complejo IV. El complejo II ó Succinato deshidrogenasa por su parte reduce succinato a fumarato y transfiere los electrones a otra quinona que será oxidada por el complejo III.

Las bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* sólo presentan una membrana celular y una pared celular muy gruesa de peptidoglicanos. En esta membrana coexisten los componentes de la cadena respiratoria y muchas proteínas de funciones variadas. En general *B. subtilis* respira utilizando al O₂ como aceptor final de electrones y bajo condiciones anóxicas, puede realizar metabolismo fermentativo o respiratorio con nitrato o nitrito como aceptor final de electrones (Nakano y Zuber, 1998).

El complejo III ó *bc₁* es una proteína oligomérica que transfiere los electrones del ubiquinol a un citocromo *c* produciendo una fuerza protón motriz a través de la membrana (Trumpower, 1990a). La quinona que reduce el complejo puede ser del tipo benzoquinona o naftoquinona. Cualquiera de estas quinonas puede servir como un mediador en la respiración siempre y cuando tenga un potencial redox

tal que pueda donar electrones al siguiente aceptor, sin distinción en que sea un complejo tipo *bc* o una quinol oxidasa.

El complejo III tipo citocromo *bc* reductasa de *Bacillus subtilis* es difícil de estudiar, pues no se ha podido aislar la naftoquinona nativa de su cadena respiratoria. En particular nuestro laboratorio está interesado en caracterizar la actividad de este complejo en *Bacillus subtilis*, comparándola con la actividad del complejo II. Ambos complejos utilizan naftoquinonas. La actividad del complejo *bc* de *Bacillus* es baja utilizando un análogo del quinol (DBH) y citocromo *c* de corazón de caballo. Por tanto se utilizaron análogos de la naftoquinona para obtener al mejor sustrato que permitiera medir la actividad enzimática de este complejo, y así poder comparar las actividades obtenidas con las que se obtienen en complejos tipo *bc₁* mitocondrial (quinol citocromo *c* reductasa) con el decilhidroxiquinol (DBH). Además se trató de inhibir el complejo *bc* con antimicina, estigmatelina y mixotiazol con el fin de entender un poco más su funcionamiento, así como tratar de inhibir a las quinol oxidasas alternas (Aox) con el fin de promover la ruta clásica y no la ruta alternativa en el transporte de los electrones.

En este trabajo la actividad de *B. subtilis* fue de 10.43 nmoles cit *c* reducido min⁻¹ mg⁻¹ proteína usando el decilhidroxiquinol. La actividad obtenida es menor a la actividad del *bc₁* de levadura (218.3 nmoles cit *c* reducido min⁻¹ mg⁻¹ proteína). Además se utilizaron 12 diferentes naftoquinonas sintéticas, para así poder determinar la más afín para el complejo *bc* de *B. subtilis*. La mejor actividad fue obtenida con Juglona y Naftazarina (148.61 y 155.49 nmoles citocromo *c* reducido min⁻¹ mg⁻¹ proteína respectivamente). También se midió la actividad del complejo II ó succinato deshidrogenasa en membranas de *B. subtilis* obteniendo 728.7 nmoles DCPIP reducido min⁻¹ mg⁻¹ proteína a diferencia que en las de Levadura (317.4 nmoles DCPIP reducido min⁻¹ mg⁻¹ proteína).

Introducción

1. Grupo Firmicutes

El mundo de la evolución bacteriana es extenso en comparación con la de los eucariontes de los cuales nosotros formamos parte (Wolf y cols., 2004).

En la actualidad se aceptan tres dominios propuestos por Woese, en los que la división de procariontes consta de dos grupos primarios, denominados archaeobacteria (*Archaea*) y eubacteria (*Bacteria*), se ha propuesto que los procariontes más tempranos fueron bacterias Gram positivas, de las cuales tanto archaeobacterias y Gram negativas evolucionaron en respuesta a mecanismos de presión de selección (Gupta, 2000).

Las bacterias Gram positivas se caracterizan por su pared celular gruesa que está constituida por cadenas lineales de polisacáridos, entrelazadas por péptidos cortos (proteín glicanos) en las que se inserta el ácido lipoteicoico. Este grupo parece consistir de cuatro subdivisiones, de las cuales sólo dos están bien caracterizadas con base en su composición de DNA; el primero comprende especies que contienen más del 55% de G+C y el otro especies que contienen menos del 50% de G+C (Woese, 1987). Por análisis filogenético se determinó que los Firmicutes pertenecen a las bacterias Gram positivas de bajo G+C (Wolf y cols., 2004).

Los miembros del filo de bacterias Firmicutes (del latín “*firmus*: firme y *cutis* piel”) ocupan una amplia gama de hábitats y pueden ser beneficiosos o perjudiciales al hombre en diversos entornos, incluyendo las industrias relacionadas con alimentos y bebidas como la cerveza (Haakensen y cols., 2008). La detección rápida y la identificación de una bacteria como Firmicutes es difícil debido a la transferencia genética general y diversidad fenotípica de estas bacterias (Haakensen y cols., 2008). Firmicutes comprende tres grandes grupos: *Bacillus*, *Clostridia* y *Mollicutes* Fig. 1 (Wolf y cols., 2004).

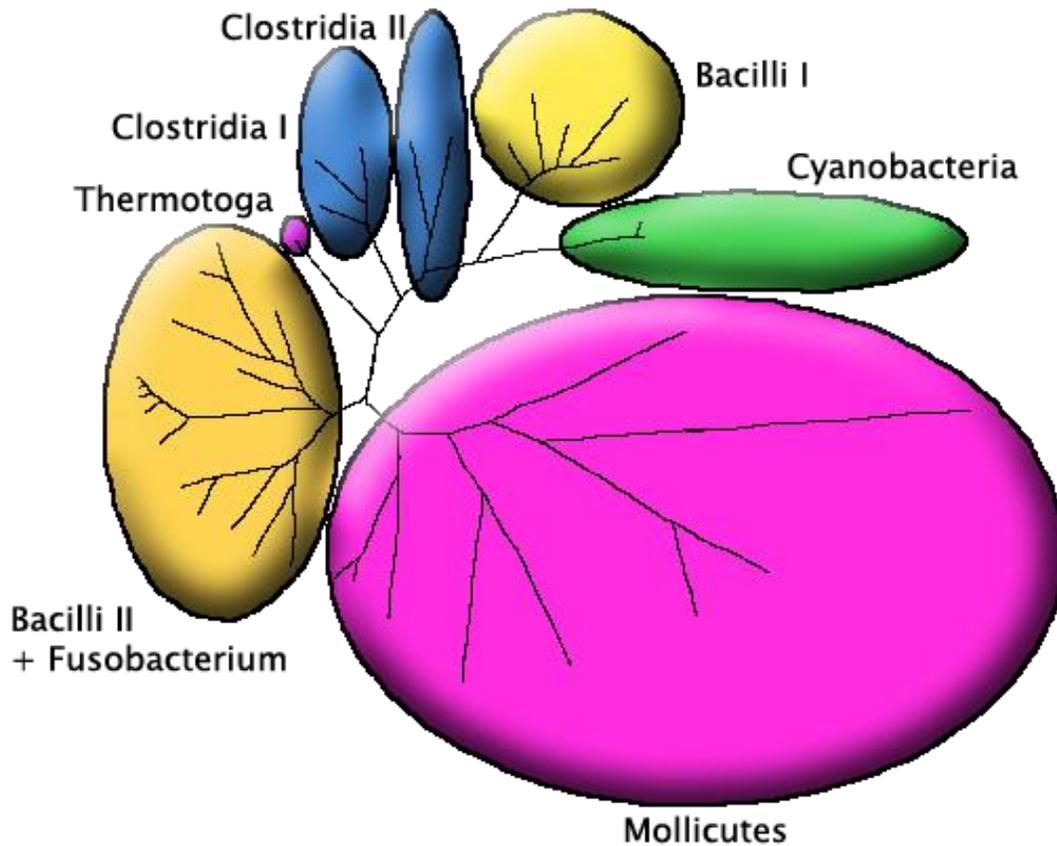


Fig. 1 Representación de las relaciones dentro de las Firmicutes (Wolf y cols., 2004).

1.1 Género *Bacillus*

Los miembros del género *Bacillus* son bacterias Gram positivas, aeróbicas, en forma de bastón y formadoras de esporas, son especies fenotípica y genotípicamente heterogéneas (Porwal y cols., 2009); pero su mayor característica es su gran versatilidad metabólica y habilidad para crecer bajo condiciones fisicoquímicas extremas (Sass y cols., 2008). El género *Bacillus* representa bacterias de gran importancia económica, médica y biodefensiva como los pesticidas y biocarburantes, así como patógenos (Porwal y cols., 2009).

Otras especies del género también tienen gran importancia, por ejemplo *Bacillus thuringiensis* se utiliza para el control biológico de insectos y en la protección de cultivos, *Bacillus subtilis* produce una amplia gama de péptidos bioactivos con

gran potencial en las aplicaciones biotecnológicas y biofarmacéuticas, *Bacillus licheniformis* también produce una variedad de péptidos antibióticos como la bacitracina bacteriocina y son conocidos también como contaminantes en procesos industriales y de comida envenenada. *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* son importantes patógenos de los mamíferos incluyendo al ser humano (Porwal y cols., 2009).

También pertenecientes a los Firmicutes se encuentran las Heliobacterias (como *Heliobacterium modesticaldum*, *Heliobacterium gestii*, *Heliobacterium chlorum* y *Heliobacillus mobilis*) que son filogenéticamente notables, ya que son los únicos organismos fototróficos que producen endosporas, una propiedad importante que comparten con sus parientes no fototróficos; razón por la que aún se discute la clasificación de los grupos representantes de este filo (Tabla 1 y 2). A pesar de que Heliobacteria agrupa a los únicos representantes fototróficos del filo de bacterias Firmicutes, el análisis de éstos organismos aún no se ha reportado (Sattley y cols., 2008).

Tabla 1. Clasificación del filo Firmicutes (Wolf y cols., 2004).

<i>Bacillus anthracis</i>	Bacilli I	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Mollicutes
<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Mycoplasma genitalium</i>	
<i>Bacillus megaterium</i>		<i>Ureaplasma parvum</i>	
<i>Bacillus holadurans</i>		<i>Mycoplasma penetrans</i>	
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>		<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	
		<i>Mycoplasma pulmonis</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Bacilli II + Fusobacterium	<i>Mycoplasma mycoides</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>		<i>Mycoplasma capricolum</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		<i>Spiroplasma citri</i>	
<i>Streptococcus thermophilus</i>		<i>Thermotoga maritima</i>	
<i>Streptococcus mutans</i>			
<i>Lactococcus lactis</i>		<i>Clostridium thermocellum</i>	Clostridia I
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Clostridium tetani</i>	Clostridia II
<i>Fusobacterium nucleatum</i>		<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Listeria innocua</i>		<i>Clostridium acetobutylicum</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>			Cyanobacteria (Outgroup)
<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Nostoc punctiforme</i>	
<i>Lactobacillus subsp bulgaricus</i>		<i>Nostoc sp.</i>	
<i>Lactobacillus subsp lactis</i>			
<i>Lactobacillus gasseri</i>			
<i>Lactobacillus plantarum</i>			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			
<i>Oenococcus oeni</i>			

Tabla 2. Clasificación del filo Firmicutes. National Center for Biotechnology Information (EE.UU.AA.).

<p>Bacillales</p> <p><u><i>Alicyclobacillaceae</i></u></p> <p><u><i>Bacillaceae</i></u></p> <p><u><i>Listeriaceae</i></u></p> <p><u><i>Paenibacillaceae</i></u></p> <p><u><i>Pasteuriaceae</i></u></p> <p><u><i>Planococcaceae</i></u></p> <p><u><i>Sporolactobacillaceae</i></u></p> <p><u><i>Staphylococcaceae</i></u></p> <p><u><i>Thermoactinomycetaceae</i></u></p> <p>Lactobacillales</p> <p><u><i>Aerococcaceae</i></u></p> <p><u><i>Carnobacteriaceae</i></u></p> <p><u><i>Enterococcaceae</i></u></p> <p><u><i>Lactobacillaceae</i></u></p> <p><u><i>Leuconostocaceae</i></u></p> <p><u><i>Streptococcaceae</i></u></p>	BACILLI	<p>Clostridiales</p> <p><u><i>Catabacteriaceae</i></u></p> <p><u><i>Clostridiaceae</i></u></p> <p><u><i>Eubacteriaceae</i></u></p> <p><u><i>Graciibacteraceae</i></u></p> <p><u><i>Heliobacteriaceae</i></u></p> <p><u><i>Lachnospiraceae</i></u></p> <p><u><i>Oscillospiraceae</i></u></p> <p><u><i>Peptococcaceae</i></u></p> <p><u><i>Peptostreptococcaceae</i></u></p> <p><u><i>Ruminococcaceae</i></u></p> <p><u><i>Syntrophomonadaceae</i></u></p> <p><u><i>Veillonellaceae</i></u></p> <p>Halanaerobiales</p> <p>Natranaerobiales</p> <p>Thermoanaerobacterales</p>	CLOSTRIDIA
		<p>Thermolithobacterales</p>	THERMOLITHOBACTERIA
<u><i>Erysipelotrichales</i></u>	ERYSIPELOTRICHI		

1.2 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva (Fig. 2) que presenta sólo una membrana celular y una pared celular muy gruesa de peptidoglicanos, en esta membrana coexisten los componentes de la cadena respiratoria y muchas proteínas de funciones variadas, como proteínas de control de estrés o translocasas (Bunai y Yamane, 2005; Volker y Hecker, 2005). Generalmente respira utilizando al O₂ como aceptor final de electrones, pero bajo condiciones anóxicas, puede realizar metabolismo fermentativo o respiratorio con nitrato o nitrito como aceptores finales de electrones (Nakano y Zuber, 1998); es una bacteria que vive principalmente en el suelo y está asociada a las fuentes de agua, en estos ambientes naturales la bacteria está expuesta a cambios en las condiciones ambientales. La alta variabilidad de hábitats naturales donde vive *B. subtilis* refleja el complejo aparato de genes reguladores que le permiten su rápida y eficaz adaptación a la utilización de una variedad de fuentes de carbono, incluyendo muchas moléculas de origen vegetal; además ha evolucionado para desarrollar un estado fisiológico casi inanimado (Moreno-Campuzano y cols., 2006), la endospora (estructura durmiente altamente resistente que posee una

base central de citoplasma que contiene ADN y ribosomas, rodeada por una corteza y protegida por una cubierta impermeable y rígida cuya función primaria es sobrevivir cuando las condiciones ambientales son adversas como altos niveles de luz ultravioleta, rayos gamma, detergentes, desinfectantes, calor, presión ó desecación), que puede medir de 0.2 – 2.5 μm (Setlow y cols., 2001; Tuminello y cols., 1997).

B. subtilis es el miembro de las bacterias Gram positivas mejor caracterizado, la publicación de su secuencia genómica, el posterior análisis sistemático y funcional, junto con una comprensión amplia de su bioquímica y fisiología, hace a este microorganismo un excelente candidato para estudios de modelos de redes de regulación *in silico* siguiendo sólo a *Escherichia coli* (Moreno-Campuzano y cols., 2006).

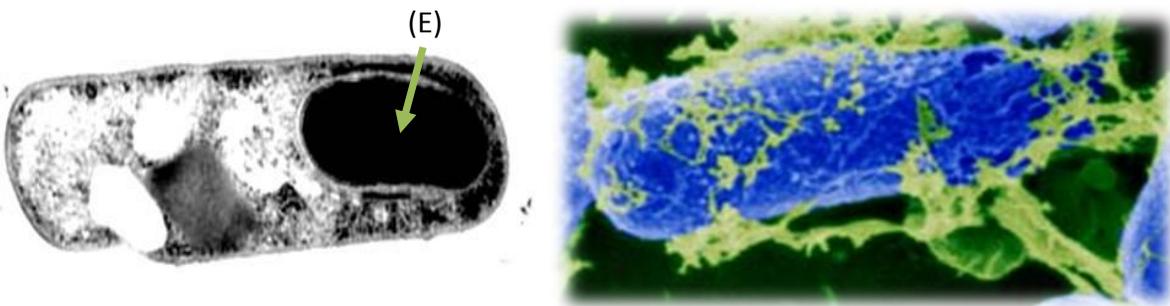


Fig. 2 Bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis*. Izquierda fotografía mostrando endospora (E), Derecha microscopía electrónica de barrido. Tomada de <http://www.dailytech.com> cortesía de Waterscan.co.yu.

2. Cadenas Respiratorias.

2.1 Aspectos particulares de los grupos prostéticos (grupos redox) de los complejos respiratorios:

Las cadenas respiratorias están compuestas, además de los complejos proteicos de una variedad de transportadores de electrones, como las flavoproteínas, hemos, centros fierro azufre, quinonas, proteínas fierro azufre y citocromos (Thony-Meyer, 1997).

Las flavoenzimas que contienen Flavin mononucleótidos (FMN) y/o Flavin adenin dinucleótido (FAD) como grupos prostéticos, catalizan muchas de las reacciones críticas de óxido reducción de uno y dos electrones de los sistemas metabólicos como la fotosíntesis y la respiración aeróbica. Estos procesos catabólicos sólo pueden seguir funcionando en una célula, si las coenzimas reducidas $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 son reoxidadas a NAD^+ y FAD (Mansoorabadi y cols., 2007).

Las coenzimas NAD y FAD son muy versátiles en el metabolismo, funcionan como aceptores de electrones de varias enzimas oxidoreductasas. El NAD generalmente se une a las enzimas de manera no covalente, a diferencia del FAD que generalmente está unido como grupo prostético a las enzimas que lo usan como coenzima (flavoproteínas). Las formas oxidadas y reducidas de estas coenzimas que están libres, pueden difundir dentro del compartimento en el que se encuentran (citoplasma, mitocondria, cloroplasto, etc.) pero no pueden atravesar las membranas porque no existe un sistema transportador para ellas (Mansoorabadi y cols., 2007).

Se dice entonces que existe un reservorio de cada una de estas coenzimas en los diferentes compartimentos de la célula, y la relación de la forma reducida a la oxidada de cada uno de ellos, dependerá del potencial redox del sistema en el que se encuentra (Mansoorabadi y cols., 2007).

Los citocromos (Fig. 3) son proteínas transportadoras de electrones que poseen un hemo como grupo prostético (hemoproteínas); sus funciones redox están íntimamente relacionadas al cambio de valencia del hemo fierro. Exhiben ciertas características espectrales, dependiendo del tipo de hemo con el cual estén asociados y los sitios de unión de éstos a la proteína (Thony-Meyer, 1997).

Los hemos son compuestos que están directamente involucrados en reacciones de oxidoreducción, oxigenación, hidroxilación y en aquellas relacionadas al transporte y almacenamiento de oxígeno y otros gases biatómicos (CO , NO). Si bien los grupos hemo forman parte de los citocromos que participan en la transferencia de electrones en las mitocondrias en condiciones aeróbicas, también

son importantes en sistemas anaeróbicos bacterianos que emplean aceptores de electrones alternos como nitrato en sus complejas cadenas respiratorias (Castro y Moreno, 2004). Los hemos se clasifican en *a*, *b*, *c*, *d* y *o* dependiendo de las funciones que realizan y de su estructura (Fig. 3 y 4).

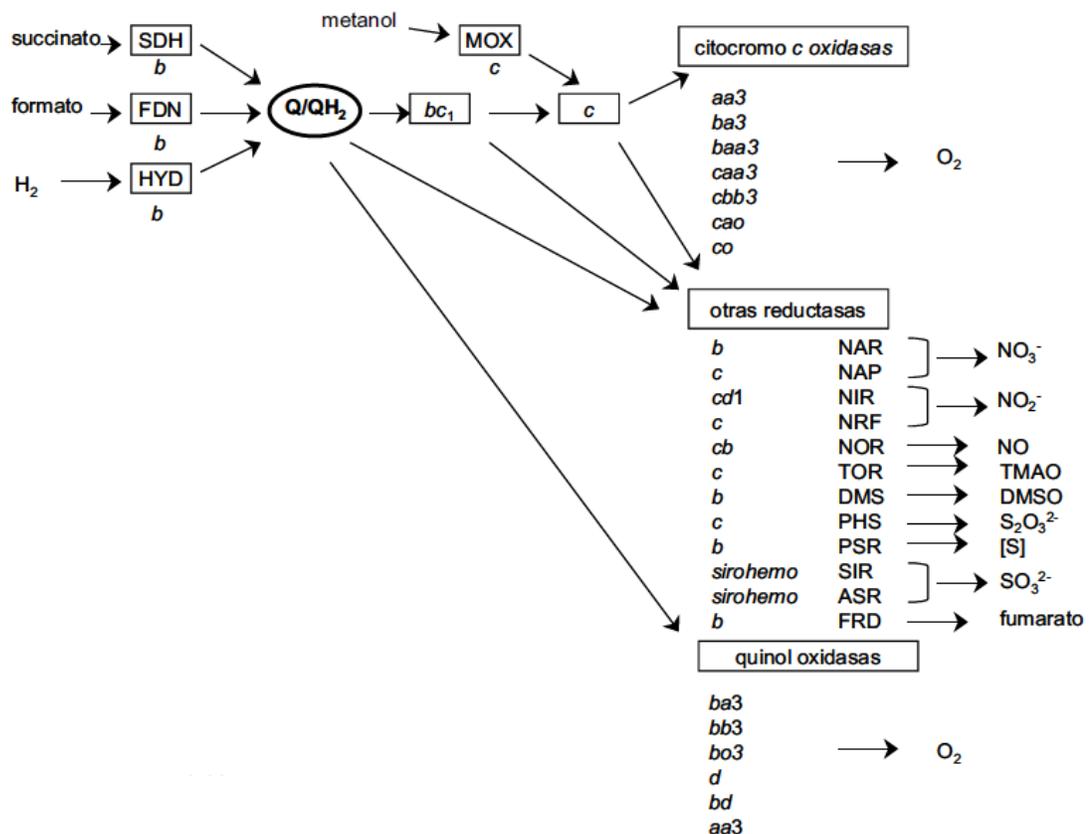


Fig. 3 Cadenas respiratorias bacterianas que contienen citocromos. En la izquierda se muestran las vías por las que la Q = ubiquinona o menaquinona es reducida, a la derecha las vías de oxidación del quinol. (Thony-Meyer, 1997).

Los hemos tipo *c* se unen covalentemente a la proteína mediante dos enlaces tioéter que se establecen entre grupos vinilo del hemo con dos residuos de cisteína. Por otro lado, los hemos tipo *a*, *b*, *d* y *o* se unen de manera no covalente a la proteína (Castro y Moreno, 2004)

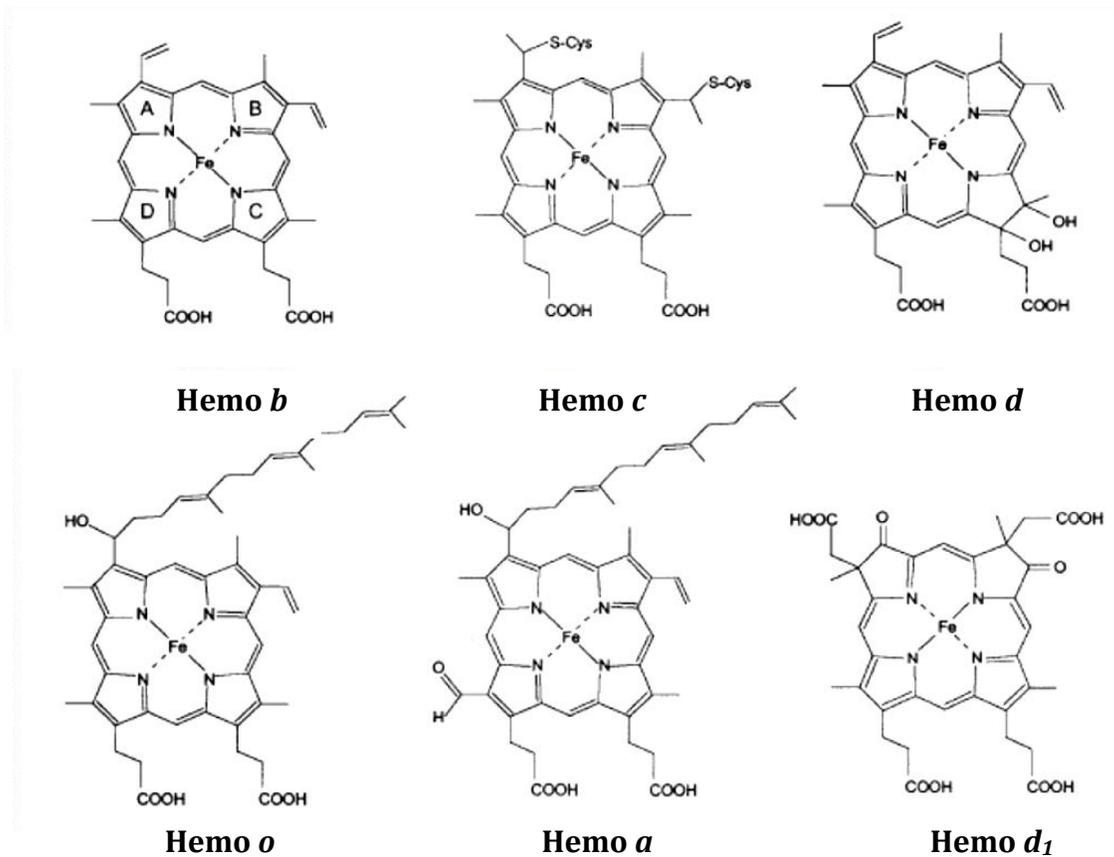


Fig. 4 Diferentes tipos del grupo hemo (Castro y Moreno, 2004).

La forma reducida de los citocromos da lugar a tres principales picos de absorción que van desde el espectro visible al UV, designados picos α , β y γ (Fig. 5). Los picos α (≥ 550 nm) se utilizan para clasificar citocromos específicos: los citocromos tipo *c* tienen un pico máximo entre 550-557 nm, los tipo *b* y *o* tienen un pico máximo de 555 y 565 nm, los citocromos tipo *a* tienen un pico máximo alrededor de los 600 nm y los citocromos tipo *d* oscilan alrededor de los 630 nm (Thony-Meyer, 1997).

¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.

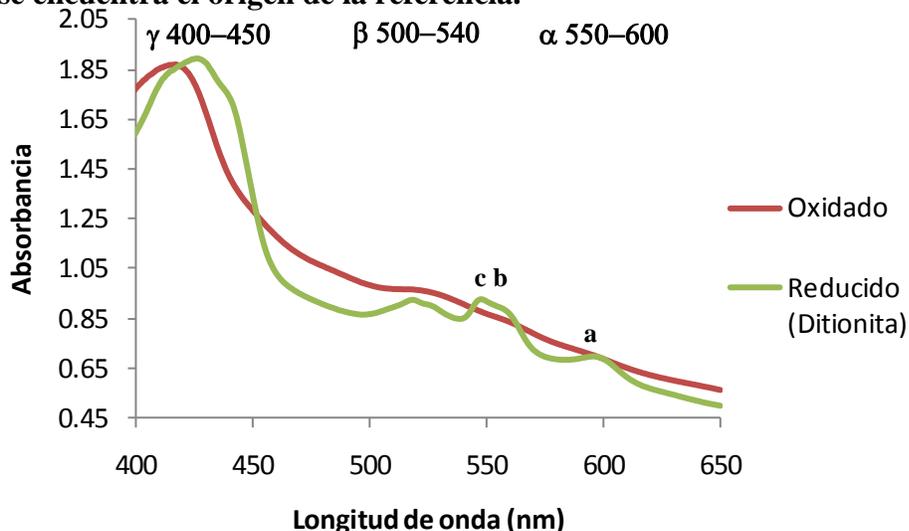


Fig. 5 Espectro de absorción de varios citocromos presentes en una misma membrana (de *B. subtilis*). Línea roja espectro oxidado, línea verde espectro reducido con ditionita. Ubicación de los picos α , β y γ en la parte superior de la figura, y de acuerdo al valor del pico α , la ubicación de los citocromos *a*, *b* y *c* en el espectro reducido.

Otros centros óxido reductores son los centros hierro y azufre. Los centros que envuelven hierro y sulfito inorgánico con coordinación a residuos de aminoácidos tipo cisteína constituyen unos de los más antiguos grupos biológicos prostéticos. Los tipos más comunes de centros son $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$, $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ y el $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$, y una o más de éstas unidades son encontradas en más de 120 clases distintas de enzimas y proteínas (Johnson, 1998).

Su principal función es permitir y mediar la transferencia de un electrón en el proceso redox, ya que son componentes integrales de las cadenas fotosintéticas y respiratorias de transferencia de electrones. Los centros Fe-S poseen características de absorción en la región cercana al infrarrojo del espectro magnético de dicroísmo circular (MCD, siglas en inglés) (aunque también se utiliza la resonancia magnética) que permiten su identificación y caracterización (Johnson, 1998).

Estos centros también constituyen en buena parte el sitio de unión del sustrato de un gran número de enzimas redox y no redox, lo que ayuda a determinar la estructura de la proteína (Johnson, 1998).

Las proteínas Fe-S son proteínas complejas no hémicas, en las que el grupo prostético Fe se encuentra unido a la proteína mediante terminales sulfhidrilo (SH) del aminoácido cisteína. Recientes estudios para definir la estructura de las proteínas Fe-S indican que el potencial electrostático de los centros deriva de la estructura de la proteína y la exposición a solventes, que es el mayor factor para determinar el potencial del punto medio (Johnson, 1998).

Las quinonas son pequeñas moléculas orgánicas lipofílicas que están presentes en todas las membranas celulares animales (Villalba y cols., 1995), difunden en la membrana energética y alternan entre la forma quinona e hidroquinona (generando un radical semiquinona altamente reactivo) por aceptación reversible de dos hidrógenos. El espacio de esta difusión que electroquímicamente conecta a los complejos I con el II y el III, es llamado poza de quinonas (Schoepp-Cothenet y cols., 2009).

Existen diferentes tipos de quinonas como las ubiquinonas, plastoquinonas, menaquinonas, rodoquinonas y caldarielaquinonas que han sido identificadas en diferentes especies. La menaquinona es la quinona más ampliamente distribuida en el árbol filogenético, en particular en los filos *Archaea* y *Bacteria* (Schoepp-Cothenet y cols., 2009).

2.2 Complejos respiratorios

Las cadenas respiratorias son la principal fuente de energía de todos los organismos vivos, éstas se encargan de catalizar el transporte de los electrones provenientes del catabolismo de glúcidos y lípidos principalmente hacia diferentes aceptores finales, produciendo un gradiente de protones, agua y ATP. La mayoría de las cadenas están formadas por 5 complejos respiratorios. En este caso se describirán primero los complejos de la mitocondria (Nelson y Cox, 2005): el Complejo I ó NADH deshidrogenasa (NADH ubiquinona oxidorreductasa) es una proteína redox en forma de “L” con un brazo embebido en la membrana y el otro en la matriz mitocondrial, oxida NADH transfiriendo los electrones vía un flavin

mononucleótido (FMN) y una serie de centros hierro azufre hacia una quinona, acoplado a la translocación de cuatro protones hacia la matriz mitocondrial del espacio intermembranal (Carroll y cols., 2006). Por su parte el Complejo II ó Succinato deshidrogenasa (Succinato: quinona reductasa) es una proteína heterotrimérica o tetramérica compuesta por una flavoproteína, una proteína hierro azufre y una o dos proteínas de anclaje, además de un citocromo con un hemo tipo *b*. Cataliza la oxidación de dos electrones del succinato al fumarato proveniente del ciclo de Krebs (Hederstedt y Heden, 1989; Kurokawa y Sakamoto, 2005; Lancaster y Kroger, 2000), y al igual que el complejo I también transfiere los electrones hacia la quinona, la cual reduce al Complejo III (Nelson y Cox, 2005) ó complejo citocromo *bc₁* (quinol: citocromo *c* oxidorreductasa).

Este complejo es una proteína membranal oligomérica que oxida al ubiquinol y reduce al citocromo *c*. Posee dos citocromos, uno con dos hemos tipo *b*, y un citocromo tipo *c₁*, además de una proteína con un centro 2Fe-2S. Al mismo tiempo transloca protones permitiendo un gradiente electroquímico a través de la membrana (Yu y Le Brun, 1998). Éste citocromo *c* es oxidado a su vez por el Complejo IV ó Citocromo *c* oxidasa, enzima transmembranal terminal conformada por cuatro centros redox: un cobre A (CuA), un hemo *a*, hemo *a₃* y un cobre B (CuB), que catalizan la reducción del O₂ hacia el agua al donarle los electrones y generando al mismo tiempo un potencial electroquímico de membrana al translocar 4 protones hacia la matriz mitocondrial (Gorbikova y cols., 2006). El complejo ATPsintetasa F₁F₀ aprovecha el gradiente de protones translocados por los complejos I, III y IV para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato (P) y es conocido como Complejo V (Fig. 6) (Saddar y cols., 2008).

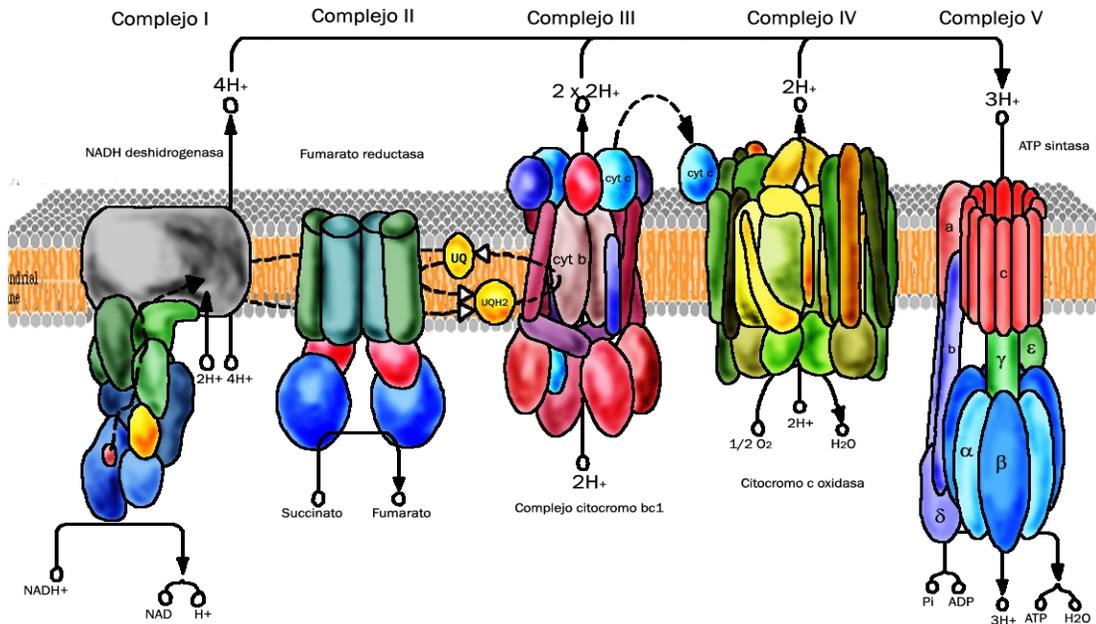


Fig. 6 Cadena respiratoria “clásica” se muestran los cuatro complejos respiratorios. Las estructuras de cada complejo fueron obtenidas de diferentes organismos (señalados en paréntesis). El Complejo I ó NADH deshidrogenasa (*Thermus thermophilus*) y el Complejo II Fumarato reductasa (*Escherichia coli*) alimentando a la poza de quinonas, que es oxidada por el Complejo citocromo bc_1 (Bovino) el cuál reduce un citocromo tipo c y dona los electrones al complejo citocromo c oxidasa (Bovino). El gradiente de protones es aprovechado por la ATPsintetasa (*Escherichia coli*) para la formación de ATP. Tomada de <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00190.html>.

La mayor parte del ATP de las células eucariontes es producido por la fuerza protón-motriz generada en la membrana interna mitocondrial ó en la membrana tilacoidal del cloroplasto. Un proceso muy similar aunque algunas veces más complejo ocurre en la membrana celular de muchas bacterias, esta complejidad podría deberse a la capacidad de responder a diferentes fuentes de energía y aceptores finales de electrones, que aparte del oxígeno, puede ser el sulfato, nitrato o dióxido de carbono según la especie (Santana y cols., 1992).

2.3 Menaquinonas

Las menaquinonas (MK) han estado implicadas como transportadores de electrones en muchas especies bacterianas, incluyendo a *B. subtilis* (Farrand y Taber, 1974). Las MK constituyen un grupo muy complejo de moléculas, en parte,

consistente en el 2-metil, 3-alkilo, 1,4-naftoquinonas, en donde la sustitución en la posición 2-3 puede contener 20- 45 átomos de carbono (4-9 unidades isoprenoides) (Fig. 7) (Dunphy y cols., 1971).

¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.

Fig. 7 Comparación de la estructura de las benzoquinonas o ubiquinonas (izquierda) con las naftoquinonas, a las que pertenecen las menaquinonas (derecha).

Existen algunos grupos de organismos donde la menaquinona (MK) ha sido complementada o sustituida por otros tipos de quinonas como la plastoquinona (PQ) en el linaje de las cianobacterias plastídicas, o por la ubiquinona (UQ) en $\alpha/\beta/\gamma$ - proteobacterias y consecuentemente en mitocondria, o caldarielaquinonas (CQ) en los sulfobales (Fig. 8). Estas islas de organismos contienen predominantemente organismos aeróbicos facultativos u obligatorios (Schoepp-Cothenet y cols., 2009).

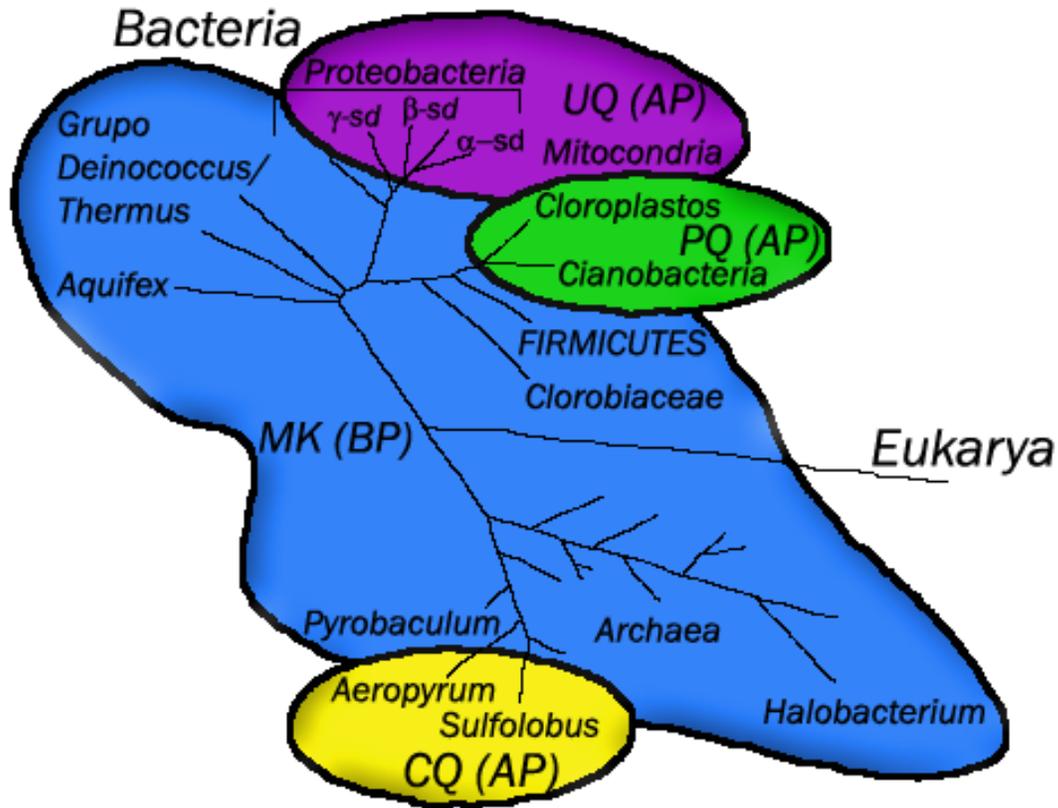


Fig. 8 Representación esquemática que denota el uso de diferentes clases de quinonas por diversas especies. (Schutz y cols., 2000).

A pesar de sus estructuras químicas muy divergentes, todas estas quinonas más recientes tienen características idénticas, como el potencial redox medio que es significativamente más positivo (de 150 mV) que el de la MK (~ -70mV). Se ha sugerido que estos potenciales altos de las quinonas aparecieron en las especies periódicamente o permanentemente expuestas a una alta concentración de O₂ (Schoepp-Cothenet y cols., 2009).

Sin embargo, no todos los filas que tienen especies aeróbicas abandonaron a la MK como poza de quinonas, por ejemplo, las bacterias Gram positivas y las *Chloroflexaceae* basan su cadena de transporte de electrones en la MK y por ello contienen un bajo potencial (Schoepp-Cothenet y cols., 2009).

Las funciones de la ubiquinona (Q) y menaquinona (MK) en el transporte de electrones han sido establecidas en varias especies de bacterias (Hollander, 1976). Cualquier quinona o menaquinona puede servir como un mediador en la respiración siempre y cuando tenga un potencial redox tal que pueda donar electrones al siguiente aceptor, sin distinción en que sea un complejo tipo *bc* o una quinol oxidasa (Fig. 9) (Tielens y cols., 2002).

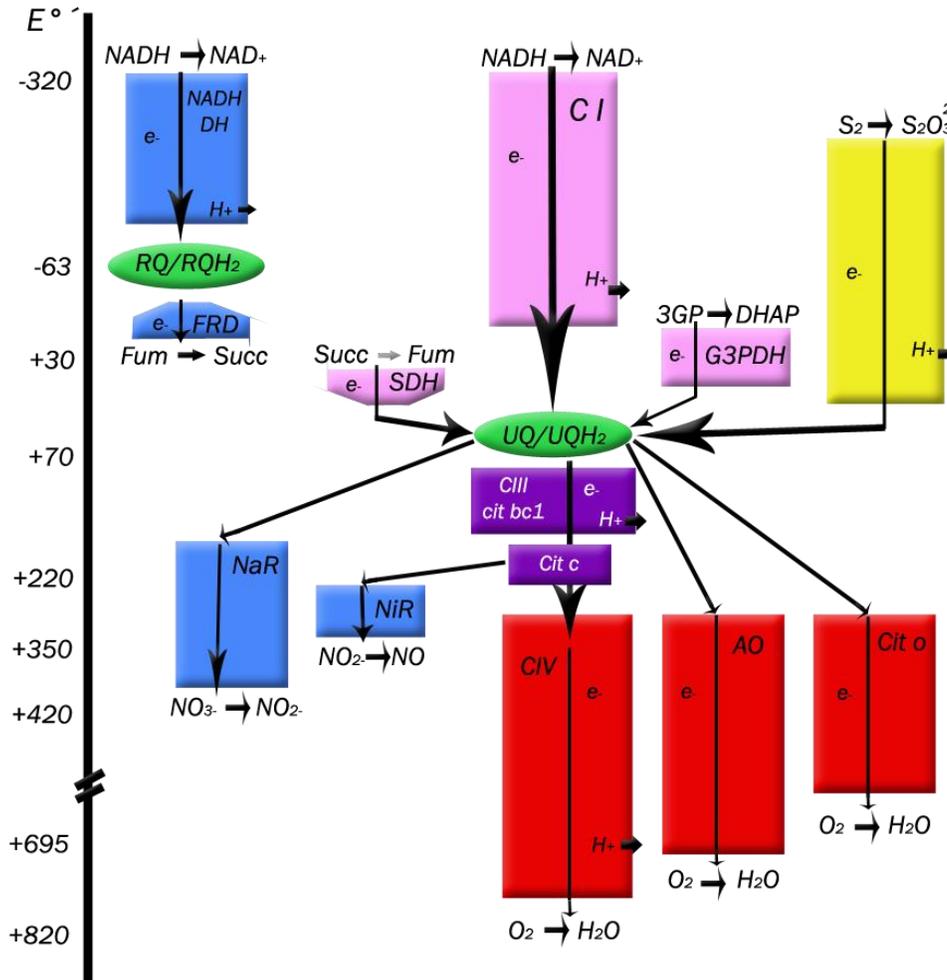


Fig. 9 Cadena respiratoria mitocondrial. Las cajas indican los complejos proteicos transportadores de electrones, los óvalos representan los transportadores de electrones ubiquinona (UQ) y rodoquinona (RQ). Los tres cuadros de color rosa representan los complejos implicados en la entrada de e⁻ transportados de sustratos orgánicos y el cuadro amarillo representa la entrada a partir de sustratos inorgánicos. Cajas de color rojo representan complejos con el oxígeno como aceptor final de electrones, cajas azul oscuro representan complejos implicados en el transporte de electrones anaerobios. La barra vertical muestra una escala para los potenciales redox estándar en mV y la translocación de protones por los complejos se indica por H⁺ →. Abreviaturas: AO, oxidasa alternas; C I, complejo I de la cadena respiratoria; bc₁, el complejo III de la cadena respiratoria, Cyt c, citocromo c; Cyt o, citocromo o; DHAP, dihidroxiacetonafofato; Fum, fumarato, G3P, glicerol-3-fosfato; G3PDH, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; NADH DH, NADH deshidrogenasa; Nar, nitrato reductasa, NiR, nitrito reductasa, RQ, rodoquinona, SO, sulfuro oxidasa; Succ, succinato; UQ, ubiquinona. (Tielens y cols., 2002).

3 Cadena respiratoria de *Bacillus subtilis*

La cadena respiratoria de *B. subtilis* se muestra en la figura 10, posee diferentes deshidrogenasas membranales como la succinato deshidrogenasa (SDH), NADH deshidrogenasas y la NAD glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, que oxidan diferentes sustratos solubles alimentando a la poza de quinonas, que en el caso de *B. subtilis* es menaquinona 7 (MK-7); desde este punto se pueden seguir dos rutas de transporte de los electrones: la ruta “clásica” donde el menaquinol es oxidado por el complejo *bc* (o complejo III), el cual transfiere los electrones a una citocromo *c* oxidasa (o complejo IV) a través del citocromo *c*₅₅₀ que presenta un cruce transmembranal. En la segunda ruta, la “alternativa”, el menaquinol es oxidado directamente por tres diferentes quinol oxidasas alternas (Azarkina y cols., 1999; Henning y cols., 1995).

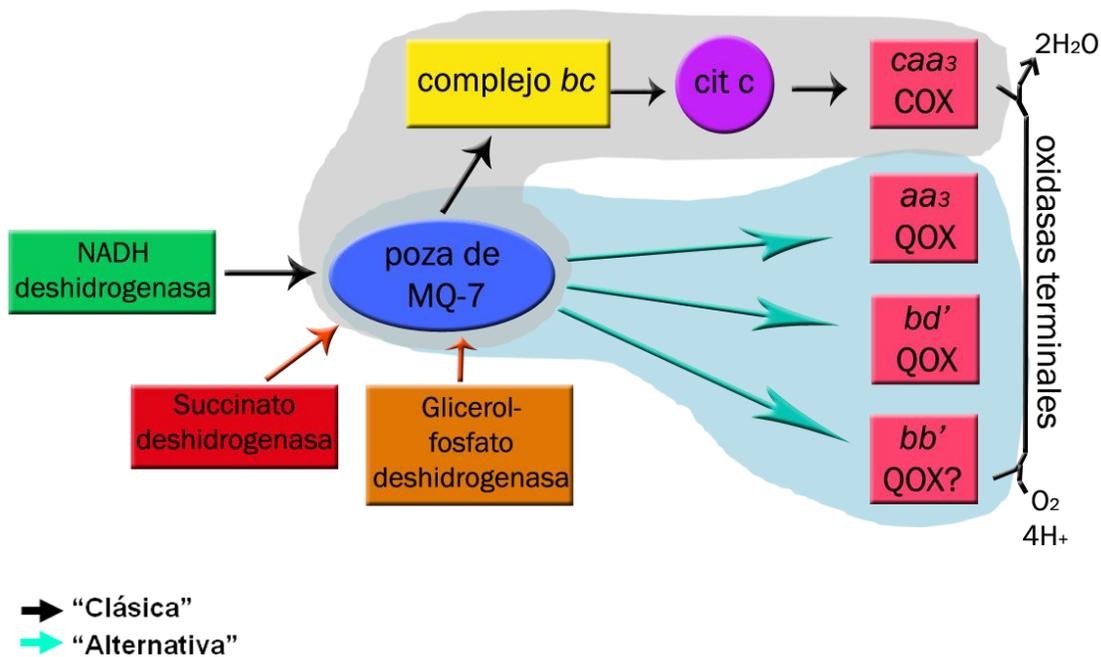


Fig. 10 Sistema respiratorio aeróbico de *B. subtilis*. MQ-7, menaquinona 7. QOX: quinol oxidasa, Cit: citocromo, COX: citocromo oxidasa, MQ-7: menaquinona 7. En gris se muestra la vía clásica de oxidación y en azul, la vía alterna. Adaptada de (Azarkina y cols., 1999).

Los complejos respiratorios de *B. subtilis* poseen ciertas peculiaridades, por ejemplo la NADH deshidrogenasa (Fig. 11), está formada por una sola subunidad que tiene un peso de aproximadamente 64kDa a diferencia de la NADH deshidrogenasa de bovino con aproximadamente 900kDa y compuesta por 43 subunidades (Bergsma y cols., 1982b). Sin embargo, no se sabe cómo es su estructura tridimensional ya que no se ha logrado modelar *in silico*.

Su grupo prostético es el FAD del cual una molécula está presente por molécula de proteína; es posible que sus centros no hémicos jueguen un papel importante en el transporte de electrones para esta enzima, sin embargo, aún no se conoce el proceso. El componente flavo proteína sólo oxida NADH y no NADPH; la afinidad de ésta enzima por el NADH es de $60 \mu\text{M}$ comparable con el reportado para otras bacterias (Bergsma y cols., 1982b). Además algunos genes que codifican para las subunidades de translocación de protones no se encuentran en el genoma de *B. subtilis*, lo que la hace insensible a la rotenona y piericidina (Schnorpfeil y cols., 2001). En adición a ésta NADH deshidrogenasa específica, se ha detectado una NADPH deshidrogenasa específica en vesículas membranales de *B. subtilis*, pero el papel que juega en la cadena respiratoria aún no es claro (Bergsma y cols., 1982b).

En cuanto al complejo II, el genoma de *B. subtilis* contiene al operón *sdhCAB* que codifica para una succinato deshidrogenasa (succinato: menaquinona reductasa, la cual, cataliza la oxidación del succinato por menaquinonas) que es diferente de la familia de genes *sdh/frd* (Schnorpfeil y cols., 2001). Consiste en dos partes, una expuesta al citoplasma en la membrana periférica y la otra en la membrana integral. La parte periférica es un heterodímero compuesto por una flavoproteína (SdhA) y una proteína hierro azufre (SdhB). SdhA contiene una unión covalente a FAD y sitios de unión del succinato para ser oxidado a fumarato. SdhB posee tres diferentes centros hierro azufre ([2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S]) que constituyen una transferencia lineal de los electrones desde el FAD a la parte de la membrana integral, que consiste de un polipéptido, SdhC y dos hemos tipo *b*, *b_P* (proximal) y *b_D* (distal) (a diferencia de la SDH mitocondrial que sólo tiene uno). Además posee

una velocidad considerable, que es inhibida por HQNO considerado como un análogo de menaquinona y que es un inhibidor típico del complejo bc_1 mitocondrial (Hederstedt, 2002). Mutantes deficientes de menaquinona y succinato deshidrogenasa no indican la presencia de una Fumarato reductasa alterna (Schnorpfel y cols., 2001).

Por lo tanto la reducción del fumarato vía el menaquinol es realizada por la succinato: menaquinona reductasa (proteína SdhCAB), por lo que la SDH de *B. subtilis* opera en dirección inversa con menaquinol, y se puede decir que es capaz de catalizar la reducción de Fumarato, el cual es producido anaeróticamente de la glucosa y probablemente reducido por la NADH deshidrogenasa (Fig. 11). El sistema enzimático para esta reducción es debido al transporte de electrones comprendido entre la NADH deshidrogenasa, menaquinona y succinato deshidrogenasa (Schnorpfel y cols., 2001).

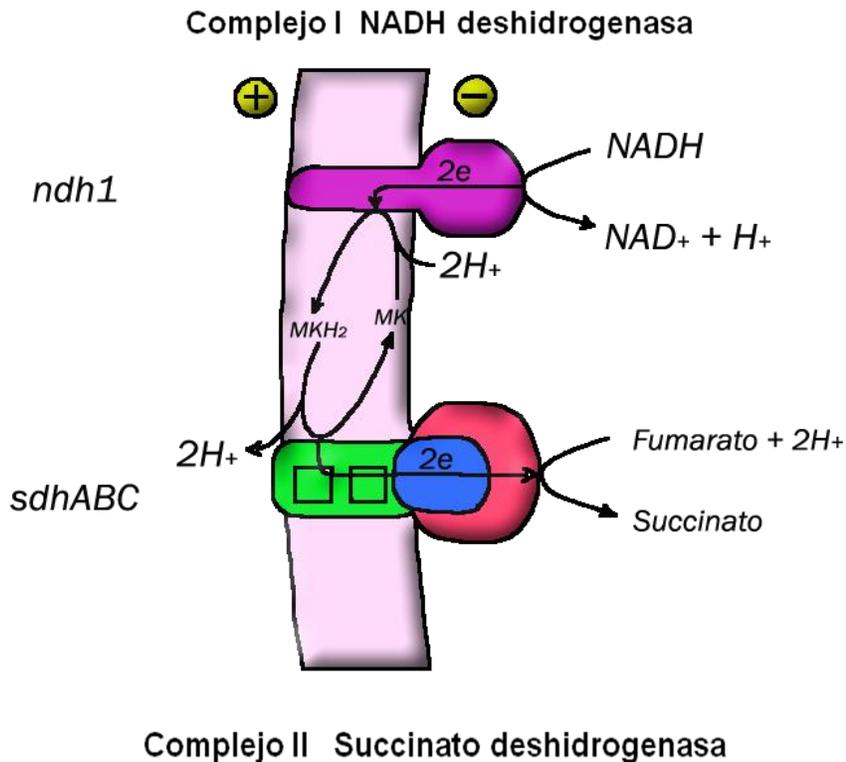


Fig. 11 Representación esquemática de los componentes de la reducción del fumarato por la NADH deshidrogenasa de *B. subtilis* (Schnorpfel y cols., 2001).

Particularmente nuestro laboratorio está interesado en el complejo III o complejo *bc* de *B. subtilis* y por tanto se hará una descripción detallada más adelante.

Las oxidasas terminales son complejos con alguno de los cuatro diferentes hemo que existen, por lo que las oxidasas bacterianas se clasifican en cuatro grupos (*o*, *d*, *a*₁, y *aa*₃) dependiendo del componente al que se unen. Las proteínas de al menos dos oxidasas terminales han sido identificadas en *B. subtilis*, la *caa*₃ y la *aa*₃ (Santana y cols., 1992).

El complejo IV ó citocromo *c* oxidasa (COX) tipo *caa*₃ está codificada por los genes *ctaBCDEF* se caracteriza porque posee un citocromo tipo *c* como subunidad extra, fusionado a una subunidad II, la cual se encuentra altamente conservada en otros miembros de esta familia de citocromo *c* oxidasas (Henning y cols., 1995). Esta oxidasa posee un centro hemo-cobre (ya que posee hemo y cobre como cofactor) y bombea protones, además se expresa durante el crecimiento en substratos no fermentables como el succinato (Azarkina y cols., 1999). También difiere espectralmente de la quinol oxidasa *aa*₃ ya que su pico α se localiza a 605 nm (Santana y cols., 1992).

La oxidasa de tipo *aa*₃ es una quinol oxidasa (QOX) codificada por el operón *qoxABCD* que contiene cuatro subunidades (proteínas QoxA, -B, -C y -D), se expresa en cualquier estado de crecimiento de la bacteria y bombea protones perteneciendo así a la superfamilia de hemo-cobre (Azarkina y cols., 1999); a diferencia de la COX, la *aa*₃ tiene poca o ninguna afinidad con citocromos *c* como donadores de electrones, sino que cataliza la oxidación de un quinol; no es sensible a cianuro y su banda α se localiza a 600 nm (Santana y cols., 1992).

Un análisis espectral reveló la existencia de dos más QOX, la *bd* que está codificada por el operón *cydABCD* y al igual que la QOX *aa*₃ sólo puede crecer en condiciones anaeróbicas y la otra que contiene sólo hemo *b* y es denotada como una oxidasa de tipo *bb*' , ésta es relativamente resistente al cianuro con un 50% de inhibición con 120 μ M, pero se puede inhibir con auriquina D; esta oxidasa es posible que esté codificada por varios genes de función desconocida, además bajo

ciertas condiciones y por razones desconocidas incorpora hemo *b* en lugar de hemo *d* en el sitio de óxido reducción (Azarkina y cols., 1999).

La membrana citoplásmica de *B. subtilis* contiene citocromos tipo *a*-, *b*-, *c*- y *d*-, pero los citocromos tipo *c* tienen un hemo covalentemente unido al polipéptido por medio de dos residuos de cisteína en el motivo consenso Cys-Xaa-Xaa-Cys-His, en el cual el residuo histidina funciona como el quinto ligando axial al hemo fierro (Bengtsson y cols., 1999).

Tres diferentes citocromos *c* han sido descritos en *B. subtilis*, la subunidad II del complejo citocromo *c* oxidasa ó *caa*₃ (codificado por el gen *ctaC*), el citocromo *c* del complejo citocromo *bc* (codificado por el gen *qcrC*) y el citocromo monomérico *c*₅₅₀ (codificado por el gen *cccA*) que es una proteína de 13kDa con un dominio de unión membranal de un segmento transmembranal α hélice de 30 residuos y un dominio hemo de 74 residuos, localizado en la superficie externa de la membrana citoplásmica (Fig. 12). Sin embargo, el análisis de la secuencia entera del genoma de esta bacteria reveló que el gen *cccB* posiblemente codifica para un nuevo citocromo *c* (*c*₅₅₁) con unión membranal a una lipoproteína, deducido por un 35% de identidad con la proteína CccA (Bengtsson y cols., 1999).

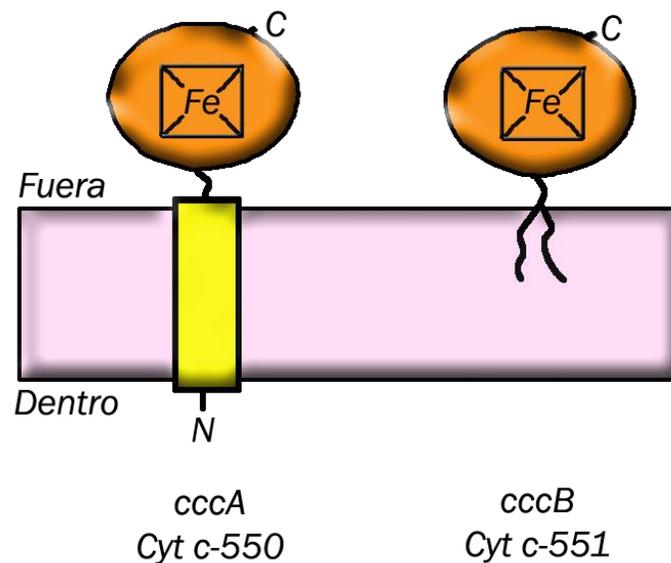


Fig. 12 Representación esquemática del citocromo *c*₅₅₀ (*CccA*) con un cruce transmembranal y *c*₅₅₁ (*CccB*) con unión a fosfolípidos. Ambos citocromos están unidos a la membrana citoplásmica de *B. subtilis*. (Bengtsson y cols., 1999).

Los transportadores de electrones en la cadena respiratoria son proteínas integrales de membrana con grupos prostéticos capaces de aceptar y/o donar 1 o 2 electrones (Trumpower, 1990a). La MK 7 que posee un potencial redox de -70 mV (de Vrij y cols., 1987), es un componente lipofílico redox no proteínico de la cadena transportadora de electrones de *B. subtilis* que media la transferencia de electrones entre deshidrogenasas y citocromos (Rowland y cols., 1995). Adicionalmente es necesaria para la esporulación y la propia regulación de la formación de citocromos (Farrand y Taber, 1974).

4. Los complejos tipo *bc*. Comparación

Los complejos *bc* representan a la única enzima común de casi todas las cadenas transportadoras respiratorias y fotosintéticas, sin embargo, parece ser que la detallada información molecular de estos complejos se limita a ciertas áreas del árbol filogenético como proteobacterias, cianobacterias, Firmicutes y un miembro de los *Archaea* (Schutz y cols., 2000).

4.1 Complejo citocromo *bc₁*

El complejo *bc₁* es común pero no único de eucariontes, también se encuentra en bacterias Gram positivas y Gram negativas, las cuales utilizan oxígeno, nitrógeno y sulfuro como aceptores finales de electrones, así como en bacterias fotosintéticas oxigénicas y anoxigénicas (Trumpower, 1990a).

Todos los complejos *bc₁* contienen tres subunidades con cuatro centros redox (Ljungdahl y cols., 1987): la proteína hierro azufre constituida por dos dominios, un dominio transmembranal y uno extrínseco donde se encuentra el centro [2Fe-2S] que está unido a cisteínas e histidinas, el citocromo *b* es una proteína membranal integral (Thony-Meyer, 1997) que consiste de 400 residuos de aminoácidos organizados como 8 hélices transmembranales (Yu y Le Brun, 1998), con dos hemo (*b_p* y *b_n*) de bajo spin unidos no covalentemente a dos residuos de histidinas, pero con diferentes propiedades electroquímicas (el potencial del hemo *b_n* ó *b₅₆₀* también llamado *b_H* es aproximadamente 60-120mV más positivo que el *b_p* ó *b₅₆₆* también llamado *b_L*). El citocromo *c₁* posee un hemo covalentemente

unido localizado en la región N-terminal en el sitio periplásmico de la membrana, con una unión axial a un residuo de histidina y uno de metionina (Yu y Le Brun, 1998). Este citocromo está anclado por un cruce transmembranal hidrofóbico de la región C terminal (Thony-Meyer, 1997). Además el complejo de citocromos bc_1 de eucariontes tiene hasta 8 subunidades, de las cuales varias son extrínsecas como las subunidades denominadas core 1 y core 2 (de un peso molecular alrededor de 50 kDa), una subunidad 9, una 6 y una 8, de bajo peso molecular, menor a 20 kDa (Smith y cols., 2004).

4.1.1 Ciclo Q

El mecanismo por el cual el complejo bc_1 transfiere electrones y simultáneamente transloca protones es el ciclo Q protón motriz, propuesto por Peter Mitchel (1967). El complejo bc_1 transfiere 2 electrones del ubiquinol (QH_2) a dos moléculas de citocromo c y deposita dos protones del ubiquinol en el lado positivo de la membrana. Adicionalmente transloca dos protones del lado negativo de la membrana por cada par de electrones transferidos. Específicamente sucede lo siguiente: el ubiquinol (QH_2) es oxidado en el centro P (o de oxidación del ubiquinol) y al mismo tiempo un electrón es transferido a la proteína Fe-S y después será transferido al citocromo c_1 formando un anión ubisemiquinona ($Q^{\cdot -}_p$). Esta oxidación deposita dos protones en el lado positivo de la membrana. Esta ubisemiquinona ($Q^{\cdot -}_p$) inmediatamente reduce al hemo b_{556} de bajo potencial redox, que a su vez reduce al b_{560} de potencial más alto; este citocromo b_{560} , reduce una ubiquinona (Q) a un anión ubisemiquinona ($Q^{\cdot -}_n$) en el centro N; entonces una segunda molécula de ubiquinol es oxidada por la proteína Fe-S que transfiere el electrón al citocromo c_1 repitiendo los pasos (Fig. 13). En este momento, se completa el ciclo Q. En total, dos moléculas de ubiquinol son oxidadas, dos citocromos reducidos, cuatro protones translocados al lado positivo de la membrana y dos protones tomados el lado negativo de la membrana con la siguiente estequiometría: $QH_2 + 2H^+_n + 2C_{ox} \rightarrow Q + 4H^+_p + 2C_{red}$ (Trumpower, 1990b).

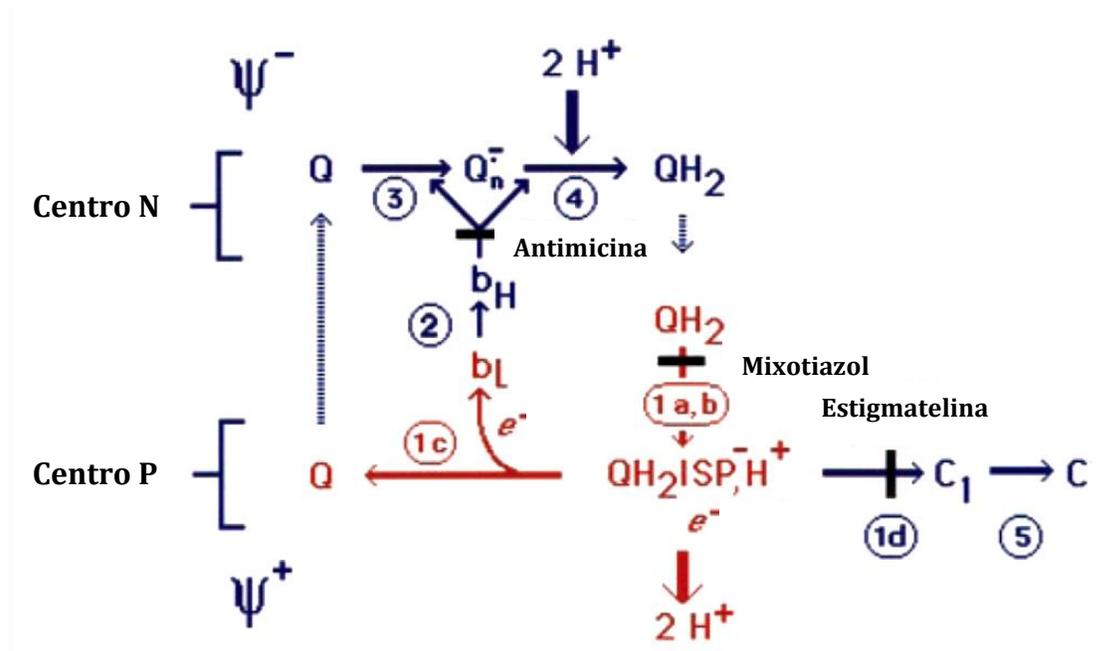


Fig. 13 Ciclo Q. Transferencia de electrones y el mecanismo de la translocación de protones en el complejo del citocromo bc_1 , así como los inhibidores del complejo y su sitio de acción (Antimicina, Mixotiazol y Estigmatelina) (Snyder y cols., 2000).

4.2 Complejo citocromo b_6f

El complejo b_6f es una de las tres proteínas oligoméricas membranales responsable del transporte de electrones y transducción de energía en membranas fotosintéticas oxigénicas, ocupando una posición central electroquímicamente, ya que el también llamado plastoquinol: plastocianina (citocromo c_6) oxidorreductasa provee una conexión entre los dos centros de reacción, fotosistema I (PSI) y el fotosistema II (PSII) (Baniulis y cols., 2008).

El complejo citocromo b_6f (Fig. 14) está conformado por: una proteína hierro azufre [2Fe2S] con unión a un residuo de aminoácido cisteína y uno de histidina, un citocromo b que a diferencia del citocromo b del bc_1 , se encuentra escindido en dos subunidades, una de aproximadamente 220 residuos (llamada citocromo b_6) ordenados en cuatro cruces transmembranales donde se encuentran los dos hemos tipo b (b_p y b_n) ambos con unión a dos residuos de histidina, y la otra llamada subunidad IV de aproximadamente 160 residuos ordenados en 3 cruces

transmembranales equivalentes al carboxilo terminal del bc_1 , y finalmente en lugar del citocromo c del bc_1 posee un citocromo f con un hemo de unión axial a un residuo de histidina y uno de tirosina (con un grupo α amino) (Yu y Le Brun, 1998).

Recientemente, la estructura cristalográfica mostró que el citocromo b_6 posee un hemo adicional llamado hemo x (también llamado hemo c_i ó hemo c_n) covalentemente unido a la proteína en el sitio Q_n (Yu y Le Brun, 1998). El hemo x es único ya que no tiene una cadena lateral de aminoácidos como ligando axial. Por estructuras cristalográficas se ha mostrado que se encuentra posicionado muy cerca del hemo b_n . Además de éste tercer grupo prostético, el complejo b_6f también posee otros, una clorofila a y una molécula β -caroteno por monómero de b_6f (Baniulis y cols., 2008).

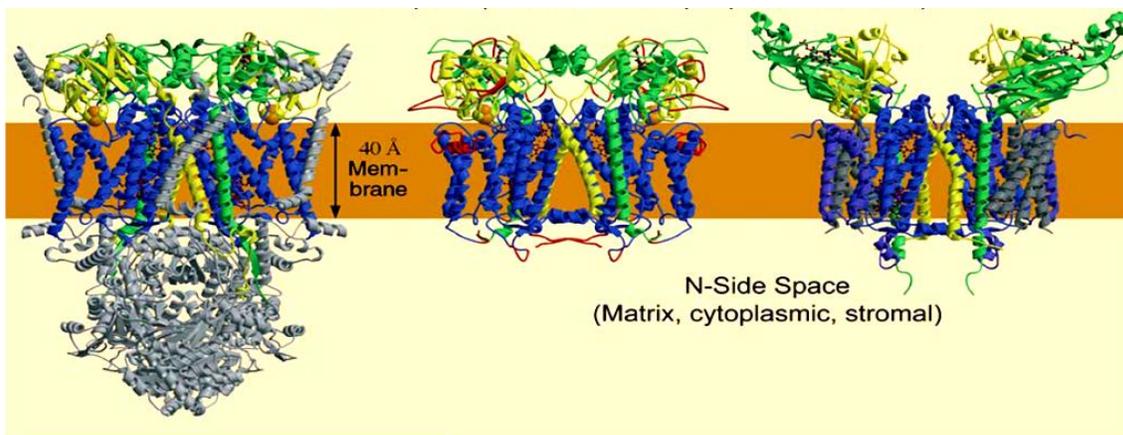


Fig. 14 Comparación de las estructuras de los complejos citocromo bc_1 mitocondrial (izquierda, corazón de bovino) y bacteriano (en medio, *Rhodobacter capsulatus*) y complejo citocromo b_6f de cloroplasto (derecha, *Chlamydomonas reinhardtii*). Las subunidades de las enzimas se muestran con sus citocromo b , citocromo c_1 o f y proteína FeS coloreadas en azul, verde y amarillo respectivamente. Las otras subunidades de las enzimas mitocondrial y cloroplasto se muestran en gris, y en rojo las diferencias entre éstas. (Berry y cols., 2004).

4.3 Complejo de citocromos bc de *Bacillus subtilis*

En *Bacillus subtilis* el operón $qcrABC$ codifica para el complejo tipo bc con únicamente tres subunidades (Fig. 15), donde sus productos proteicos parecen constituir una tercera clase de complejos que puede denominarse b_6c , ya que

tiene una gran similitud con los dos complejos b_{6f} y bc_1 . Cabe hacer hincapié que ninguna de las bacterias que pertenecen a este género es fotosintética. La subunidad hierro-azufre (QcrA) es similar (43–55%) a la proteína hierro azufre de los complejos bc_1 y b_{6f} , su subunidad QcrB es similar (69–72%) al citocromo b_6 del complejo b_{6f} , ya que contiene 224 residuos de aminoácidos, y una cisteína conservada en la posición 43 que es equivalente a la cisteína 35 que une al hemo x en el complejo b_{6f} que es indicio de la existencia del tercer hemo tipo x covalentemente unido. Así mismo se obtuvo tinción positiva del citocromo b con tetrametil benzidina en geles de acrilamida desnaturalizantes con SDS con los que los hemos unidos por coordinación se pierden (Yu y cols., 1995). Por otra parte su tercera subunidad (QcrC) consiste en una fusión de una “subunidad IV” (similar (51-57%) a la del complejo b_{6f} y al carboxilo terminal del citocromo b) y un citocromo tipo c (similar en un 45-54% al del complejo bc_1) (Yu y cols., 1995). En la Fig. 16 se muestra el posible modelo tridimensional de este complejo.

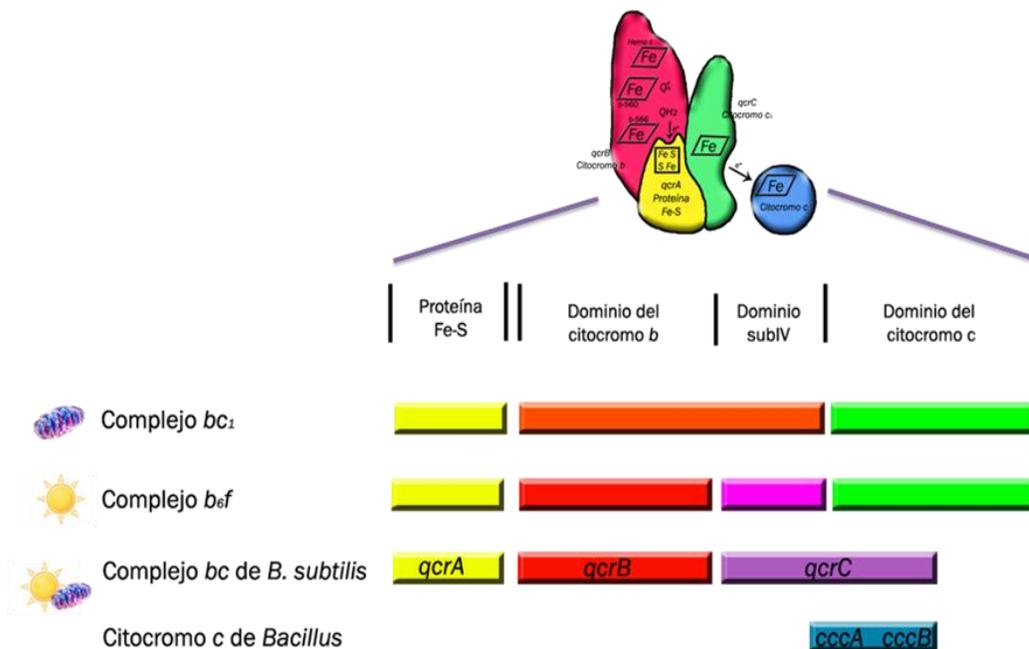


Fig. 15 Organización esquemática de los dominios en las proteínas de los complejos citocromos bc_1 , b_{6f} y bc de *B. subtilis* con sus pequeños citocromos c (*ccCA* y *ccCB*). Modificado de (Yu y cols., 1995).

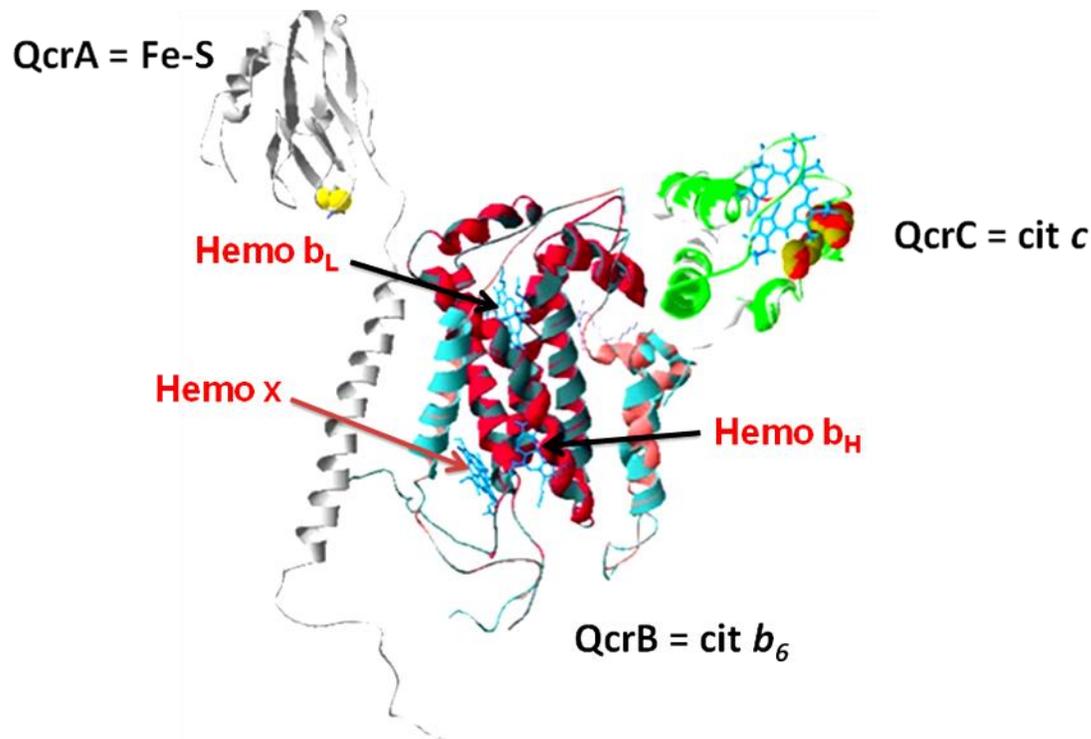


Fig. 16 Posible modelo tridimensional del complejo b_6c de *B. subtilis*. El modelo se hizo alineando la secuencia de aminoácidos de las tres subunidades de *B. subtilis* con el complejo b_6f de *Mastigocladus laminosus*. En gris se muestra a la proteína hierro-azufre (QcrA). Para mostrar la alta coincidencia entre las subunidades se muestra a QcrB y QcrC de dos colores: en rojo oscuro QcrB correspondiente a *B. subtilis* y en verde oscuro a *M. laminosus*. Para QcrC verde claro corresponde a la secuencia de *M. laminosus* y en rosado a *B. subtilis*.

El complejo III o citocromo b_6c (que también puede denominarse menaquinol:citocromo c oxidorreductasa) de *B. subtilis* no entra en la clasificación conocida (Fig. 17) debido a que comparte características tanto fotosintéticas como respiratorias, no se conoce con claridad el funcionamiento del transporte de electrones en su cadena, por lo que es de gran interés estudiar el complejo para poder caracterizar su actividad y conocer los detalles del ciclo Q que opera en este complejo, además de su relación con el resto de la cadena respiratoria de esta bacteria. Al igual que se desconocen detalles del ciclo Q que opera en el complejo b_6f , en particular cabe señalar que el donador de electrones para *B. subtilis* es una naftoquinona, la menaquinona 7 (MK-7) y para el complejo b_6f una plastoquinona (que es una benzoquinona).

Nuestro laboratorio está interesado en caracterizar funcionalmente al complejo *bc* de *B. subtilis*, sin embargo, no es posible hacer un estudio con naftoquinonas ya que su potencial redox las hace muy inestables y el tiempo en el que permanecen reducidas es muy corto.

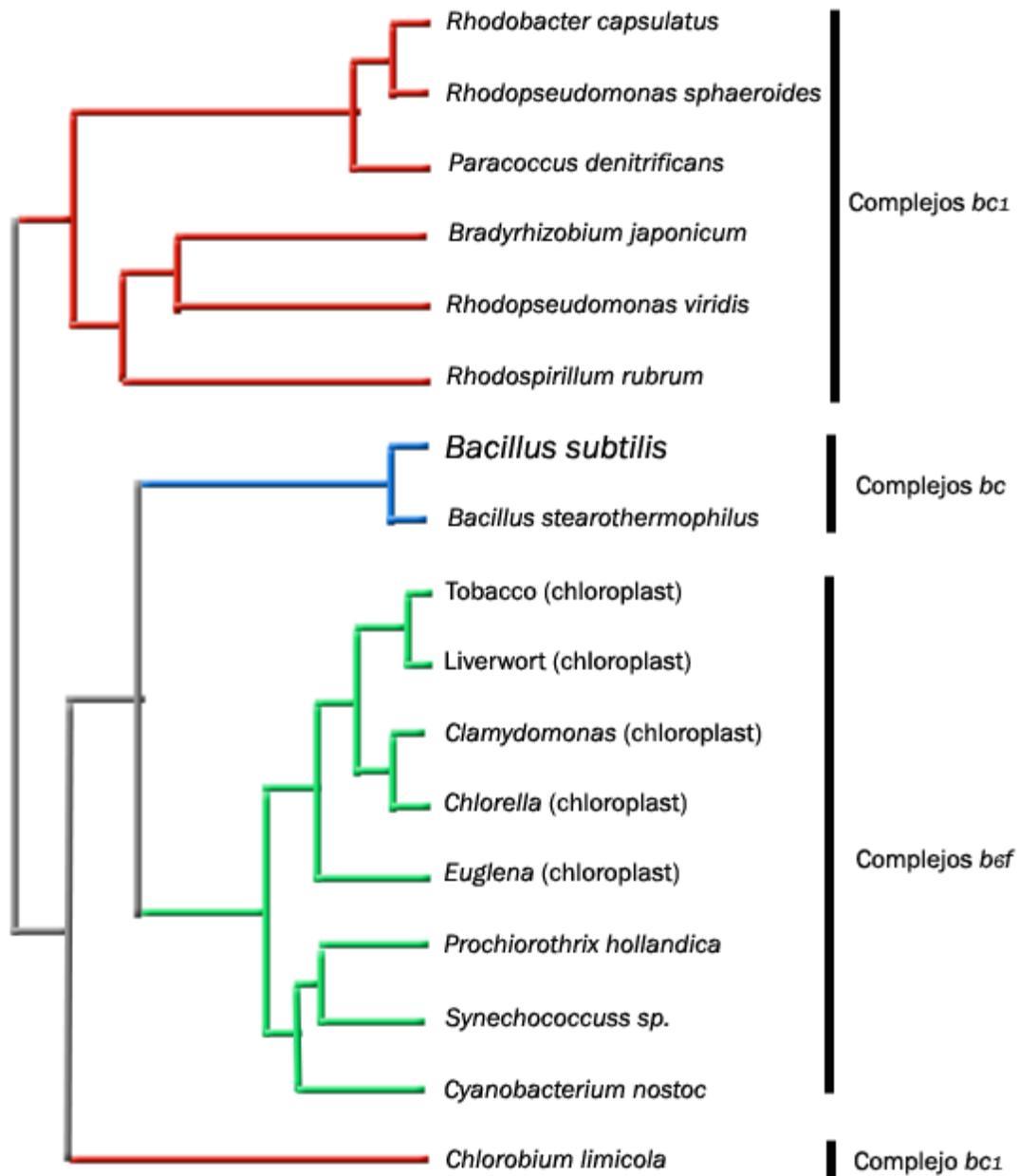


Fig. 17 Dendrograma basado en la comparación de secuencia QcrB del citocromo *b*₆ de los complejos citocromos *b*₆*f*, y la parte N-terminal de los primero cuatro segmentos transmembranales del citocromo *b* de los complejos *bc*₁ (Yu y cols., 1995).

4. Antecedentes directos

Con el fin de entender mejor el funcionamiento y transporte de electrones de la cadena respiratoria de *B. subtilis*, se han utilizado a las quinonas. Ya sea restaurando la oxidación del NADH (Bisschop y Konings, 1976) o el transporte de glutamato incorporando análogos de quinonas o quinonas insolubles en liposomas que después se fusionan a membranas aisladas para medir la actividad. Se utilizaron ocho diferentes quinonas, los mejores efectos fueron logrados con la naftoquinona juglona (5-Hidroxi- 1,4 Naftoquinona) con 5316 nmoles por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, seguida por la plumbagina y la 1,4 naftoquinona (Bergsma y cols., 1982a). Lemma y cols., (1991) han utilizado DMN, MD, MK y NQ para medir la actividad tanto de SDH como de fumarato reductasa en *B. subtilis* y en *Wolinella succinogenes*. Para medir la actividad de la SDH de *Bacillus cereus*, también se han utilizado a las naftoquinonas como la lawsona (2-hidroxi-1,4 naftoquinona), duroquinona, 1,4 naftoquinona, 1,2 naftoquinona, antraquinona 2-sulfonato, menadiona y 1,4-benzoquinona (Garcia y cols., 2008). Algunas bacterias Gram negativas como *E. coli* desarrollan quinol oxidasas específicas cuando crecen en condiciones anaeróbicas (crecidas con fumarato, nitrato o DMSO), por lo que también se han probado diferentes naftoquinonas (plumbagina, lapacol, o menaquinona-1) para demostrar su uso como sustratos para estas distintas oxidasas (Rothery y cols., 1998).

En otro estudio (Fernandes y cols., 2005) se purificó la parte intramembranal dihémica de la succinato:quinona oxidoreductasa (SQR) de *Rhodotermus marinus* y fue incorporada en liposomas con el fin de medir el efecto del potencial de membrana impuesto, utilizando diferentes naftoquinonas (1,4-naftoquinona, 2, Me-1,4-naftoquinona, 2,3-dimetil,1,4-naftoquinonona).

Objetivo

Caracterizar la actividad del complejo tipo *bc* de *Bacillus subtilis* con diferentes naftoquinonas.

Objetivos Específicos:

1. Medir la actividad de quinol: citocromo *c* reductasa y succinato: citocromo *c* reductasa en membranas aisladas de *Bacillus subtilis*.
2. Analizar la actividad del complejo de *B. subtilis* utilizando el análogo del ubiquinol (decilhidroxiquinol) y compararlo con la actividad que se obtiene en membranas aisladas de mitocondrias de levadura.
3. Utilizar como sustrato diferentes naftoquinonas para determinar cuál es la óptima para la actividad de este complejo mediante el ensayo de succinato: citocromo *c* reductasa.
4. Comparar la actividad obtenida con las diferentes naftoquinonas y el decil quinol con la actividad del complejo *bc*₁ de membranas de mitocondrias aisladas de levadura de pan.

Materiales y métodos

Crecimiento de *Bacillus subtilis* 168 (Henning y cols., 1995)

La cepa de *Bacillus subtilis* 168 se obtuvo del *Bacillus* Genetic Stock Center (Ohio State University), y fue crecida durante dos días en cajas frescas de medio LB. Para la elaboración de medio LB se agregaron: 10 g por litro de peptona de caseína, 5 g por litro de extracto de levadura y 10 g por litro de NaCl (Sambrook y cols.), se agregó 15 g/L de agar, esterilizando a 120 libras de presión por 20 min y vaciando en las cajas de Petri de plástico. A continuación se creció a la bacteria en 3 ml de Medio Súper Rico (MSR: 2.5% Bactotripton, 2% Extracto de levadura, 0.3% K_2HPO_4 y 3% Succinato Na pH 7.5) suplementando con 300 μ l/L de Solución de Micronutrientes (2.2% $MnCl_2$, 0.5% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5% H_3BO_3 , 0.016% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.46% $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ y 0.5% (v/v) H_2SO_4 concentrado). Se colocó una colonia de la cepa sembrada en la caja de LB y se dejó crecer por 23 hrs a 37°C y 250 rpm, revisando la D.O. $_{final} = 0.86$ se inocularon 100 ml de MSR para obtener una D.O. $_{inicial} = 0.6$, nuevamente se dejó crecer por 23 hrs a 37°C y 250 rpm, revisando la D.O. $_{final} = 3.29$, con lo cual se inocularon 1000 ml de MSR para obtener una D.O. $_{inicial} = 0.26$, de igual manera se dejó crecer por 23 hrs a 37°C y 250 rpm revisando una D.O. $_{final} = 4$.

Cosecha de *Bacillus subtilis* 168 (Konings y Freese, 1972)

Se realizó una dilución 1:10 tomando 100 μ l del cultivo y 900 μ l de MSR para medir la D.O. $_{final}$ a 600 nm y que tuviera un valor de 4.0 para cosechar las células. Posteriormente el cultivo se centrifugó por 20 min a 5000 rpm y 4°C en un rotor GSA y en centrifuga Sorvall Evolution, el sobrenadante (SN) fue decantado y la pastilla resuspendida con amortiguador 100 mM de fosfatos de potasio pH 6.6, para después pasarla con pipetas en tubos cónicos de plástico de 50 ml (pesados previamente) y se centrifugó por 10 min a 11,000 rpm y 4°C en una centrifuga Hermle. El SN fue decantado de nuevo, anotando el peso del tubo Falcon con la pastilla se determinaron los gramos de las células cosechadas, las cuales fueron debidamente etiquetadas y guardadas a -20°C.

Obtención de las membranas mitocondriales de levadura para estudio comparativo.

Rompimiento de las levaduras (Gutierrez-Cirlos y Trumpower, 2002)

Un paquete de levadura de pan *Saccharomyces cerevisiae* azteca (deshidratada) de 400 g se disolvió en un vaso de precipitado de 4 litros con agua para después disolverlas con ayuda de un homogenizador Ultra Turrax T 25 Basic agregando 1.5 litros de agua. Una vez bien disueltos los trozos de levadura, se llevaron a centrifugar en una centrífuga Sorvall rotor GSA a 6000 rpm por 10 min; cada vez que sedimentaron las levaduras se resuspendieron con un amortiguador de disrupción (100 mM Tris Cl, 150 mM KOAc, 5 mM MgCl₂, 250 mM Sorbitol y 1 mM Ditiotretitol (DTT)) pH 8 a 4°C para centrifugarlas nuevamente en las mismas condiciones y poder lavar las células.

Posteriormente se desechó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular nuevamente pero en el menor volumen posible con el mismo amortiguador de disrupción para que quedaran bien concentradas las células. Después se congelaron poniéndolas en un vaso tipo Dewar con nitrógeno líquido casi hasta llenarlo, mezclando con una palita se fueron agregando las levaduras resuspendidas que debieron quedar como un hilo delgado para que se formaran pequeñas bolas en el nitrógeno líquido hasta llenar casi el contenedor o se termine el nitrógeno líquido en el Dewar. En seguida se vació todo en un vaso de precipitados de dos litros para después moler rápidamente las células en una licuadora Waring de 5 litros con vaso metálico agregándole un poco de nitrógeno líquido hasta que las cubriera. Esto se repitió 5 veces por un minuto agregándole cada vez nitrógeno líquido; una vez molidas las levaduras se vaciaron en un vaso de precipitado seco y se taparon con papel aluminio para guardarlas en el congelador Revco (-70 °C) toda la noche.

Preparación de membranas de *Bacillus subtilis*168 (Hagerhall y cols., 1992; Hederstedt, 1986)

Una vez obtenidas las células fueron disueltas a una concentración de 30 g/L en un amortiguador 50 mM de fosfatos de potasio pH 8, se les agregaron dos mezclas de inhibidores de proteasas 4-(2- Aminoetil) benzenesulfonil fluoruro

hidrocloruro (AEBSF): 0.1 M de Dimetil Sulfóxido (DMSO)) a una concentración final de 0.1 – 0.15 mM y mezcla de inhibidores de proteasas (250 mM ϵ -aminocaproico y 100 mM Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de Na en proporción de 10 ml de mezcla por 500 ml de medio), 0.3 g/L de lisozima, 10 mg/L de DNAsa y RNAsa, todas las enzimas disueltas en el mismo amortiguador de fosfatos de potasio pH 8. Posteriormente las células se incubaron durante 15 min a 140 rpm y 37°C e inmediatamente después se les agregó 10 mM MgSO₄ y la mezcla de inhibidores de proteasas dejando incubar 30 min más a 37°C, para después agregar 15 mM de EDTA Na final (de una solución 0.3 M pH 7.4). Dos minutos después se agregó MgSO₄ 1 M para incrementar la concentración final a 20 mM (tomando en cuenta los 10 mM iniciales).

Manteniendo una temperatura de 4°C: se centrifugó a 5000 rpm por 20 min en la centrífuga Hermle Z383K ó Sorvall rotor GSA, el SN se junto para ser centrifugado nuevamente a 11,000 rpm por 42 min con el rotor GSA. El sobrenadante fue decantado y la pastilla resuspendida en un amortiguador 0.1 M de fosfatos de potasio pH 6.6, llevando cada tubo a 40 ml próximamente con el amortiguador se volvió a centrifugar a 15,000 rpm por 15 min en el rotor SS-34; posteriormente la pastilla fue resuspendida en un volumen mínimo del mismo amortiguador de fosfatos de potasio pH 6.6 y pasada a un tubo cónico de plástico limpio, donde se les agregó un volumen igual de glicerol, AEBSF a 1 mM final y mezcla de inhibidores, guardando finalmente las membranas a -20 °C.

Preparación de las membranas de mitocondrias de levadura. (Comparación con la actividad de *B. subtilis*). (Gutierrez-Cirlos y Trumppower, 2002)

Inicialmente se descongelaron las levaduras molidas con N₂ líquido de -70 °C, preparando una tina con agua tibia, el polvo de levadura se colocó en un vaso de precipitados de vidrio de un litro haciendo un baño maría, en cuanto empezaron a descongelarse se les agregó 0.5 ml de AEBSF por cada 500 ml de líquido y 2 ml de inhibidores Roche por cada 50 ml de líquido. Una vez descongeladas las células se centrifugaron en la centrífuga Sorvall rotor GSA a 4000 rpm por 10 min para obtener una pastilla, la cual fue resuspendida en 50

ml de amortiguador de disrupción agregándole nuevamente inhibidores de proteasas (Roche y AEBSF).

Posteriormente se centrifugó nuevamente en el rotor GSA a 4000 rpm por 10 min y se juntaron los sobrenadantes agregando más inhibidores de proteasas para volver a centrifugar en la centrifuga Sorvall rotor GSA a 10 000 rpm por 30 min. Después se resuspendió la pastilla en un amortiguador B1 frío (50 mM Tris acético, el cuál fue neutralizado con ácido acético, 400 mM Manitol y 2 mM EDTA para centrifugar nuevamente en la centrifuga Sorvall rotor GSA a 13 000 rpm por 30 min, una vez más se lavó con el mismo amortiguador B1 frío y se centrifugó a 13 000 rpm por 30 min. El tercer lavado se realizó resuspendiendo la pastilla nuevamente con amortiguador B2 frío (50 mM Tris acético, el cuál fue neutralizado con ácido acético, 150 mM KOAc y 2 mM EDTA centrifugando finalmente a 13 000 rpm por 30 min; la pastilla fue resuspendida en un volumen mínimo de amortiguador B2 y se agregó glicerol 1:1 e inhibidores de proteasas (Roche, y 0.1 mM AEBSF) para homogenizar y guardar las membranas de mitocondrias a -20°C.

Cuantificación de proteínas totales (LOWRY y cols., 1951; Markwell y cols., 1978)

Se preparó una curva patrón por duplicado de las siguientes cantidades: 0, 10, 20, 40, 80, 150 y 200 μ l de una solución de 100 μ g/ml de Albúmina Sérica de Bovino (BSA: 100 μ g/ml), a cada tubo, además se le agregó 1 ml de una mezcla de dos soluciones: 99 partes de la solución "A" (20 g de Na_2CO_3 , 4 g NaOH, 2 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 1% SDS) y 1 parte de la solución "B" (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), y se dejó incubar por 10 min, después se agregaron 100 μ l de Folin-Ciocalteau fenol 1:1 con agua a cada muestra se dejó incubar por 30 min.

Las muestras problema (las membranas) se colocaron a las cantidades de 20, 40 y 80 μ l realizando una dilución 1:100 con agua destilada; finalmente todas las muestras fueron leídas a 750 nm en el espectrofotómetro BioMate3 Thermo, tomando como blanco la concentración 0 μ l de BSA. Con estos datos se hizo una curva patrón donde se interpolaron los datos de absorbancia de las muestras para obtener el promedio de la concentración de proteína en μ g/ μ l.

Determinación de la concentración de citocromos en membranas de *Bacillus subtilis* 168

Se utilizó un espectrofotómetro tipo doble haz, doble longitud de onda marca Aminco DW2 con modernización OLIS, manejando el modo SPLIT (donde un haz de luz de cierta longitud pasa por dos celdillas distintas) con luz visible, con una apertura o ancho de haz (slit) de 3 nm. Midiendo en un rango de espectro de absorción de 400 – 650 nm se colocaron dos celdillas, una de muestra y una de referencia ambas con amortiguador de 50 mM fosfatos de potasio pH 7, se corrió una línea base y se calibró a 0 de absorbancia a mitad del rango del espectro. Después se tomó la celdilla de muestra colocando una dilución 1:5 de las membranas aisladas anteriormente en el mismo amortiguador de fosfatos y se corrió un espectro correspondiente a las membranas oxidadas, a continuación se le agregaron unos granos de hiposulfito de sodio (ditionita de sodio) fresca para reducirlas y correr un nuevo espectro obteniendo así el espectro reducido de las membranas.

Finalmente se obtuvo la resta del espectro reducido menos el oxidado obteniendo un espectro diferencial del cual se sacaron los datos de absorbancia de los respectivos picos alfa de los citocromos presentes en la membrana de *Bacillus* (citocromo *a* = 600 nm, citocromo *b* = 560 nm y citocromo *c* = 550 nm) y de los valles de los picos. Posteriormente se calculó la concentración μM de cada citocromo utilizando la Ley de Lambert-Beer y sus ϵ respectivos (citocromo *a* = $16.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, citocromo *b* = $20 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y citocromo *c* = $19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (de Vrij y cols., 1987), usando estos datos y la concentración de proteína total obtenida por el Lowry se calculó la cantidad de citocromo por mg de proteína expresada en nmoles mg^{-1} de proteína.

Determinación de la concentración de citocromos en membranas de mitocondrias de Levadura. (Para la comparación con la actividad de *B. subtilis*).

Siguiendo el mismo protocolo, al obtener el espectro diferencial se obtuvieron los datos de absorbancia de los respectivos picos alfa (citocromo *a* = 600 nm, citocromo *b* = 560 nm y citocromo *c* = 550 nm) y valles de los picos. Posteriormente se calculó la concentración μM de cada citocromo utilizando la

Ley de Lambert-Beer y sus ϵ respectivos (citocromo $a = 24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, citocromo $b = 25 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y citocromo $c = 17.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Covian y cols., 2004; Gutierrez-Cirlos y Trumpower, 2002), para así, usando estos datos y la concentración de proteína total obtenida por el Lowry, calcular la cantidad de citocromo por mg de proteína expresada en nmoles mg^{-1} de proteína.

Reducción del decilubiquinol (Snyder y Trumpower, 1998; Snyder y cols., 1999; Snyder y cols., 2000)

Para 25 o 100 mg se añadieron cinco ml en alícuotas de 1 ml de etanol absoluto anhidro al frasco de la decilubiquinona (DBQ) y se extrajo el contenido hasta que la quinona estaba completamente disuelta, posteriormente se vertieron los 5 ml de la quinona en un tubo de 20 ml con tapa de rosca y se añadieron 10 ml de amortiguador 100 mM fosfatos de potasio pH 6 y 25 μM de EDTA, mezclando bien se agregó hiposulfito de sodio (ditionita de sodio) en polvo hasta que el color cambió a amarillo claro. A continuación se agregaron unos granos de borohidruro de sodio y se agitó en vortex hasta que la solución se tornó transparente; si quedaban partículas naranjas se le agregaba etanol.

Una vez logrado el cambio de color se le agregaron 4 ml de ciclohexano, los cuales agitando bien formaron dos fases, la primera (los 4 ml del ciclohexano junto con el decil hidroxiquinol (DBH)) se extrajo y se vació a un tubo nuevo de 20 ml con 1 ml del mismo amortiguador. Este paso se repitió 3 veces más, obteniendo al final 4 tubos de 20 ml con 4 ml de ciclohexano + DBH y 1ml de amortiguador. A continuación se juntaron en un tubo nuevo de 20 ml los 4 ml de cada tubo y al final esos 16 ml fueron evaporados con argón obteniendo una pastilla, la cual fue resuspendida en 2 ml de etanol con 100 μl de 0.1 M HCl.

Determinación de la concentración del DBH

La concentración del DBH fue determinada utilizando la Ley de Lambert-Beer ($A = cb\epsilon$; A= absorbancia obtenida, c= concentración de la solución, b= paso de luz a través de la celdilla y ϵ = coeficiente de extinción molar) y el ϵ de 4.14 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ absorbiendo a 290 nm en el espectrofotómetro BioMate 3 Thermo. Se realizó un espectro de absorción obteniendo primero la línea base con

etanol, para después medir diluciones del DBH con el fin de obtener una absorbancia entre 0.15 y 0.2 a 290 nm.

Medición de la actividad quinol: citocromo c reductasa (complejo III) y succinato deshidrogenasa (complejo II) en membranas de *Bacillus subtilis* 168.

Se utilizó nuevamente el espectrofotómetro de doble haz, doble longitud de onda marca Aminco DW2 con modernización OLIS, utilizando el modo DUAL (donde dos haces de luz de diferente longitud de onda pasan por una misma celdilla), con una apertura o ancho de luz de 3 nm, el monocromador 1 en 550 nm y monocromador 2 en 532 nm para la actividad del complejo *bc*.

En una celdilla de 3 ml de capacidad se colocó amortiguador de actividad (250 mM de Sacarosa, 50 mM de fosfatos de potasio pH 7.4, 0.01% Tween-20 y 1 mM NaN_3), citocromo c de corazón de caballo a una concentración final de 40 μM y cianuro de sodio a una concentración final de 1 mM; la celdilla se colocó en el sitio de muestra del espectrofotómetro y se calibró a 0 de absorbancia. Mezclando bien con la barra magnética del espectrofotómetro se colocaron las membranas (dilución 1:2 con amortiguador de actividad e incubadas en hielo 3 horas (anexo 1)) a diferentes cantidades de proteína (0.15-2.4 mg) y se inició el trazo para después de algunos segundos disparar la reacción con DBH en etanol que quedó a una concentración final de 200 μM ; una vez obtenido el trazo se obtuvo la pendiente de la velocidad de reducción del citocromo c por el complejo III.

Un control de reducción química se midió, agregando amortiguador de actividad, DBH 200 μM final y citocromo c de corazón de caballo 40 μM final con el fin de descartar la reducción directa del citocromo c por el DBH. El valor de la pendiente se obtuvo en $\Delta\text{Absorbancia}/\text{min}$ y se convirtió a nmoles de citocromo c reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, utilizando la Ley de Lambert-Beer y el ϵ del citocromo c reportado a 550-532 nm es de $21.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Para la medición del complejo II (Succinato deshidrogenasa) se utilizó el espectrofotómetro tipo doble haz, en el modo SPLIT con luz visible, con una apertura o ancho de luz de 3 nm, monocromador 1 en 600 nm. En la celdilla de

3 ml de capacidad se colocó amortiguador de actividad (250 mM de Sacarosa, 50 mM de fosfatos de potasio pH 7.4, 0.01% Tween-20 y 1 mM NaN_3) y cianuro de sodio a una concentración final de 1 mM, colocando la celdilla en el sitio de muestra del espectrofotómetro se calibró a 0 de absorbancia; después se agregaron las membranas (dilución 1:2 con amortiguador de actividad e incubadas en hielo 3 horas) a una concentración final de 0.1 mg/ml de proteína de membranas. Mezclando bien con la barra magnética del espectrofotómetro se añadió succinato de sodio a una concentración final de 20 mM dejando incubar por 1min y se inició el trazo para más tarde adicionar como aceptor de electrones 2,6-Dichlorofenol indolfenol (DCPIP) a una concentración final de 68.9 μM y disparar después de algunos segundos la reacción con Metil sulfato metilfenazonio (PMS- N-Methylphenazonium methyl sulfate) a una concentración final de 1.63 mM, el cual fungió como transportador de electrones desde el complejo II al DCPIP.

Una vez obtenido el trazo se sacó la pendiente de la velocidad de reducción del DCPIP por el complejo II, el valor de la pendiente se obtuvo en $\Delta\text{Absorbancia}/\text{min}$ y se convirtió a nmoles de DCPIP reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína utilizando el ϵ del DCPIP de $16 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nagata y cols., 2008).

Medición de la actividad quinol: citocromo c reductasa (complejo III) y succinato deshidrogenasa (complejo II) en membranas de mitocondrias de Levadura. (Comparación con la actividad de *B. subtilis*)

Esta medición se realizó con una pequeña modificación que consistió en que al mezclar bien con la barra magnética del espectrofotómetro se colocaron las membranas (dilución 1:2 con amortiguador de actividad e incubadas en hielo 3 horas) a diferentes cantidades de proteína (0.15-2.4 mg) y se inició el trazo para después de ciertos segundos disparando la reacción con decil hidroxiquinol (DBH) en etanol que quedó a una concentración final de 50 μM ; una vez obtenido el trazo se sacó la pendiente de la velocidad de reducción del citocromo c por el complejo III. De igual manera, un control de reducción química se midió, agregando amortiguador de actividad, DBH 50 μM final y citocromo c de corazón de caballo 40 μM final con el fin de descartar la reducción directa del citocromo c por el DBH. El valor de la pendiente se obtuvo

en Δ Absorbancia/min y se convirtió a nmoles de citocromo c reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, el ϵ del citocromo c reportado a 550-532 nm es de $21.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

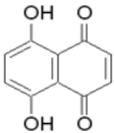
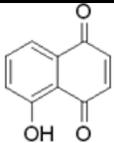
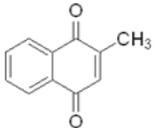
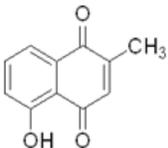
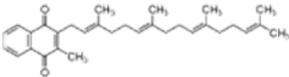
La medición del complejo II (Succinato deshidrogenasa) se realizó de la misma manera que al medir la actividad del complejo II de *B. subtilis*.

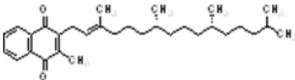
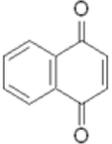
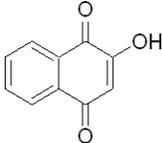
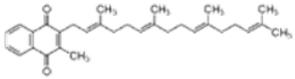
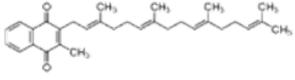
Medición de la actividad succinato: citocromo c reductasa (complejo II - III) con diferentes naftoquinonas en membranas de *Bacillus subtilis* 168

El ensayo se realizó de igual manera utilizando el espectrofotómetro en modo DUAL con luz visible, con una apertura o ancho de luz de 3 nm y monocromadores en 550 (monocromador 1) y 532 nm (monocromador 2).

En una celdilla de 3 ml de capacidad y un cm de paso de luz, se colocó amortiguador de actividad (250 mM de Sacarosa, 50 mM de fosfatos de potasio pH 7.4, 0.01% Tween-20 y 1 mM NaN_3), citocromo c de corazón de caballo a una concentración final de 40 μM y cianuro de sodio a una concentración final de 1 mM. La celdilla se colocó en el sitio de muestra del espectrofotómetro y se calibró a 0 de absorbancia. Mezclando bien con la barra magnética y usando el agitador del espectrofotómetro se colocaron las membranas (dilución 1:2 con amortiguador de actividad e incubadas en hielo 3 horas) a la concentración final de 0.3 mg, cada una de las diferentes naftoquinonas (2-Hidroxi- 1,4 Naftoquinona (Lawsona), 2-Metil-3 Fitol- 1,4 Naftoquinona (Filoquinona), Undecilmenaquinona, 1-4 Benzoquinona, Nonilmenaquinona, 5-Hidroxi- 2 Metil- 1,4 Naftoquinona (Plumbagina), 2- Metil- 3 Heptaprenil- 1,4 Naftoquinona (Menaquinona), 1-4 Naftoquinona, 2- Metil- 1,4 Naftoquinona (Menadiona), 5-Hidroxi- 1,4 Naftoquinona (Juglona) y 5-8 Dihidroxi- 1,4 Nafthoquinona (Naftazarina)) a una concentración final de 200 μM y se dejó incubar por 1min; en seguida se disparó la reacción con succinato de sodio a una concentración final de 20 mM para reducir a las naftoquinonas a través de la reducción por el complejo II (succinato reductasa).

Tabla 3 Quinonas utilizadas en el ensayo.

QUINONA	ESTRUCTURA	ADQUIRIDO	SOLVENTE	RANGO DEL ESPECTRO (nm)	LONGITUD DE ONDA (nm) MÁX OXIDADO	COEFICIENTE DE EXTINCIÓN (OXIDADO)	POTENCIAL REDOX (mV)	STOCK (mM)	REFERENCIA DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN Y POTENCIAL REDOX
Naftazarina		Fluka	DMSO	240-340	273	17.4mM ⁻¹ cm ⁻¹		84	
Juglona		Sigma	ETOH	400-500	420 270	3.56mM ⁻¹ cm ⁻¹ 11.3mM ⁻¹ cm ⁻¹	30	73.76	(Bergsma y cols., 1982a)
Menadiona		Sigma	ETOH	200-300	262	19mM ⁻¹ cm ⁻¹	-16	9.3 8.62	(Inouye y cols., 1999) (Bergsma y cols., 1982a)
Plumbagina		Sigma	DMSO	350-450	419	3.95mM ⁻¹ cm ⁻¹	-39	155.7	(Bergsma y cols., 1982a) (Rothery y cols., 1998)
Menaquinona		Supelco	DMSO	200-300	249.5	13mM ⁻¹ cm ⁻¹	-74 (MK-7)	133.04	(Inouye y cols., 1999) (Bergsma y cols., 1982a)

Filoquinona			ETOH	200-300	250	15.4mM ⁻¹ cm ⁻¹		11.17	(Inouye y cols., 1999)
1-4 Naftoquinona		Fluka	ETOH	200-300	246	17.4mM ⁻¹ cm ⁻¹	36	54.8	(Bergsma y cols., 1982a)
Lawsona		Sigma	ETOH	240-340	270	17.4mM ⁻¹ cm ⁻¹		118.8	
1-4 Benzoquinona		Sigma	DMSO	240-340	318	16mM ⁻¹ cm ⁻¹	293	310.2	(Bergsma y cols., 1982a)
Nonilmenaquinona		Donación Dr. Trumpower	DMSO					3.07	NR
Undecilmenaquinona		Donación Dr. Trumpower	DMSO					6.12	NR

NR- No reportado. Concentración determinada por cantidad (g) disuelta en 5 ml del solvente.

De igual manera, una vez obtenido el trazo se sacó la pendiente de la velocidad de reducción del citocromo *c* por el complejo III, el valor de la pendiente se obtuvo en Δ Absorbancia/min y se convirtió a nmoles de citocromo *c* reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína utilizando el ϵ del citocromo *c* de $21.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los ϵ de las naftoquinonas y benzoquinonas medidas se muestran en la tabla 3 y fue empleado para determinar la concentración de dicho sustrato, en el caso de las naftoquinonas de las que no se encontró su ϵ se empleó la formula $M = \frac{g}{PM \times L}$. Además de que también se tomó un control de reducción química, agregando amortiguador de actividad, naftoquinonas 200 μM final, succinato de sodio 20 mM final y citocromo *c* de corazón de caballo 40 μM final con el fin de descartar la reducción directa del citocromo *c* por el las naftoquinonas y/o el succinato.

Titulación de diferentes naftoquinonas en membranas de *Bacillus subtilis*

La titulación se realizó con las naftoquinonas que produjeron un incremento significativo en la velocidad del complejo, para poder determinar posteriormente los parámetros de K_m y $V_{m\acute{a}x}$. El ensayo consistió en variar la concentración de las quinonas (sustrato) para medir la velocidad de reducción del citocromo *c* por el complejo III. Se realizó de la misma manera que en el ensayo de succinato: citocromo *c* reductasa (complejo II - III) y se tomó como referencia una titulación del DBH, la cual se realizó de la misma manera que al medir la actividad de quinol: citocromo *c* reductasa (complejo III). Las concentraciones de las naftoquinonas se incrementaron desde 0.07 μM – 1 mM; cada titulación se realizó por triplicado. Para cada punto de concentración se realizó un ensayo de reducción química que se restó en cada caso.

Determinación de los parámetros de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m de diferentes naftoquinonas

Se emplearon dos ajustes distintos para poder determinar el polinomio que mejor se ajustara a los datos. Uno sobre los datos obtenidos (Hill $y = V_{m\acute{a}x} \frac{X^n}{K^n + X^n}$) con $n=1$, graficando actividad (nmoles cit *c* reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) *versus*

$$\frac{C_s}{V} = \frac{K_m^s}{V_s + \frac{1}{V_s(C_s)}},$$

concentración de quinona agregada (mM). El otro lineal (Hanes

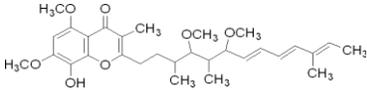
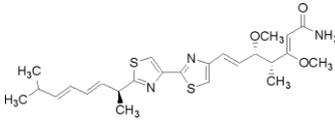
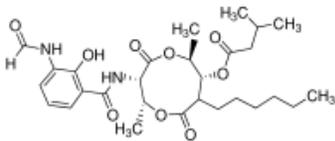
graficando $\frac{C_s}{V}$ versus C_s utilizando el programa Origin 8.

Inhibición del complejo bc en membranas de *Bacillus subtilis* 168

Utilizando nuevamente el espectrofotómetro tipo doble haz, en modo DUAL con luz visible. Con una apertura o ancho de luz de 3 nm y monocromadores en 550 y 532 nm, se agregó en una celdilla de 3 ml de capacidad, amortiguador de actividad y citocromo c de corazón de caballo a una concentración final de 40 μ M. La celdilla se colocó en el sitio de muestra del espectrofotómetro y se calibró a 0 de absorbancia mezclando bien con la barra magnética del espectrofotómetro. Se colocaron las membranas (dilución 1:2 con amortiguador de actividad e incubadas en hielo 3 horas) a una cantidad final de 0.3 mg de proteína, cianuro de sodio a una concentración final de 1 mM, y uno de los 3 inhibidores escogidos (antimicina, estigmatelina y mixotiazol) a una concentración final de 1 mM, se dejó incubar 2 min, inmediatamente después se disparó la reacción con decilhidroxiquinol (DBH) en etanol que quedó a una concentración final de 200 μ M, ó con succinato de sodio a una concentración final de 20 mM. Una vez obtenido el trazo se obtuvo cada una de las pendientes de la velocidad de reducción del citocromo c por el complejo III para después calcular el porcentaje de inhibición del complejo.

El valor de la pendiente se obtuvo en Δ Absorbancia/min y se convirtió a nmols de citocromo c reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína utilizando el ϵ del citocromo c de 21.5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Tabla 4. Características y estructura de los inhibidores empleados para el complejo *bc*

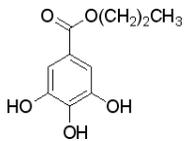
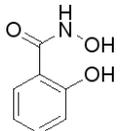
INHIBIDOR	ESTRUCTURA	PESO MOLECULAR	COEFICIENTE DE EXTINCIÓN	LONGITUD DE ONDA (nm) MÁXIMO
Estigmatelina		514.65	65.5mM ⁻¹ cm ⁻¹	267
Myxothiazol		487.68	10.5mM ⁻¹ cm ⁻¹	313
Antimicina		548.63	4.8mM ⁻¹ cm ⁻¹	320

Inhibición de Aox de membranas de *Bacillus subtilis* 168

En el espectrofotómetro tipo doble haz, en modo DUAL con luz visible, con una apertura o ancho de luz de 3 nm y monocromadores en 550 y 532 nm, se agregó en una celdilla de 3 ml de capacidad amortiguador de actividad y citocromo *c* de corazón de caballo a una concentración final de 40 μM. La celdilla se colocó en el sitio de muestra del espectrofotómetro y se calibró a 0 de absorbancia mezclando bien con la barra magnética del espectrofotómetro. Se colocaron 0.3 mg membranas (dilución 1:2 con amortiguador de actividad e incubadas en hielo 3 horas), cianuro de sodio a una concentración final de 1 mM, y uno de los 2 inhibidores escogidos Ácido Salicilhidroxámico (SHAM) a una concentración final 30 mM, y Propilgalato a una concentración final de 1.6 mM, se dejó incubar 2 min, e inmediatamente después se agregó una de las naftoquinonas (las que promovieron una mayor actividad: Juglona, Menadiona y Naftazarina) a una concentración final 200 μM dejando incubar por 2 min más y se disparó la reacción con succinato de sodio a una concentración final de 20 mM (ó con DBH a una concentración final de 200 μM). Una vez obtenido el trazo se obtuvo cada una de las pendientes de la inhibición de velocidad de reducción del citocromo *c* por el

complejo *bc*, el cual se obtuvo en Δ Absorbancia/min y se convirtió a nmoles de citocromo *c* reducido/min⁻¹ mg⁻¹ de proteína utilizando el ϵ del citocromo *c* de 21.5 mM⁻¹ cm⁻¹ (usando la Ley de Lambert-Beer).

Tabla 5. Características y estructura de los inhibidores empleados para las Aox

INHIBIDOR	ESTRUCTURA	PESO MOLECULAR	SOLVENTE	STOCK (mM)	ADQUIRIDO
Propilgalato		212.20	DMSO	236	Sigma
SHAM		153.14	DMSO	326	Sigma

Resultados

1.- Crecimiento de membranas de *B. subtilis* en diferentes medios

Se crecieron membranas de *B. subtilis* en dos medios de cultivo diferentes (Medio Súper Rico - MSR y Luria Broth - LB) para así poder determinar cuál era el mejor en rendimiento total de proteína para la obtención de membranas y cantidad de citocromos. En la Tabla 6 y la Fig. 18 se puede observar que con el medio MSR se obtienen mejores resultados.

Tabla 6. Comparación del rendimiento de proteína membranal de *B. subtilis* y concentración de citocromos en dos diferentes medios de cultivo MSR y LB.

	Citocromos (μM)			Citocromo (nmoles/ mg proteína)			Lowry $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ proteína total	mg proteína en 6ml membranas
	a	b	c	a	b	c		
Medio Súper Rico (MSR)	16.4	25.9	43.5	1.25	0.85	2.12	19.04	114.24 en 1L
Medio Luria Broth (LB)	5.68	13.7	18.3	0.45	0.46	1.02	18.50	111.03 en 2L

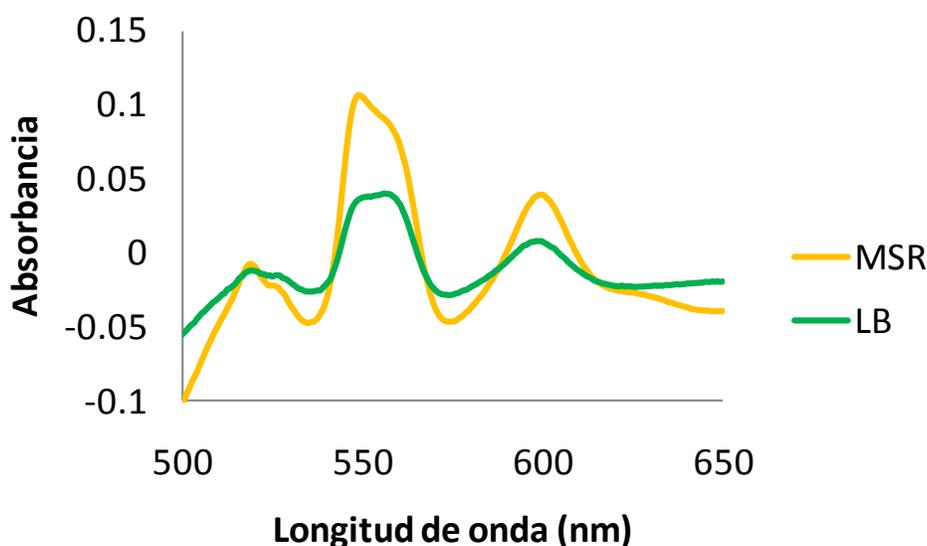


Fig. 18 **Comparación de los espectros diferenciales** (ditiotionita – reducido) de las membranas aisladas de *B. subtilis* crecidas en los dos diferentes medios empleados, MSR y LB. Se puede observar la diferencia de concentración de citocromos obtenida en cada medio.

2.- Obtención de membranas de *B. subtilis*.

La bacteria *B. subtilis* muestra un buen crecimiento en el medio MSR con la aereación apropiada. Generalmente, el rendimiento por litro es en promedio 10.3 g de células/L (peso húmedo). Posteriormente en la preparación de las membranas se obtuvieron 181 mg de proteína de membrana, correspondientes a 15 ml (considerando el glicerol agregado) por cada 26.06 g de células utilizadas. En la Tabla 7 se muestran los datos de concentración de proteína total (obtenida por Lowry), las concentraciones de citocromos (expresadas en μM y nmoles mg^{-1} de proteína de membranas). La Figura 19 muestra el espectro de absorción diferencial (reducido con ditionita menos oxidado) de las membranas aisladas de *B. subtilis*, destacando los picos α de absorción de éstos citocromos.

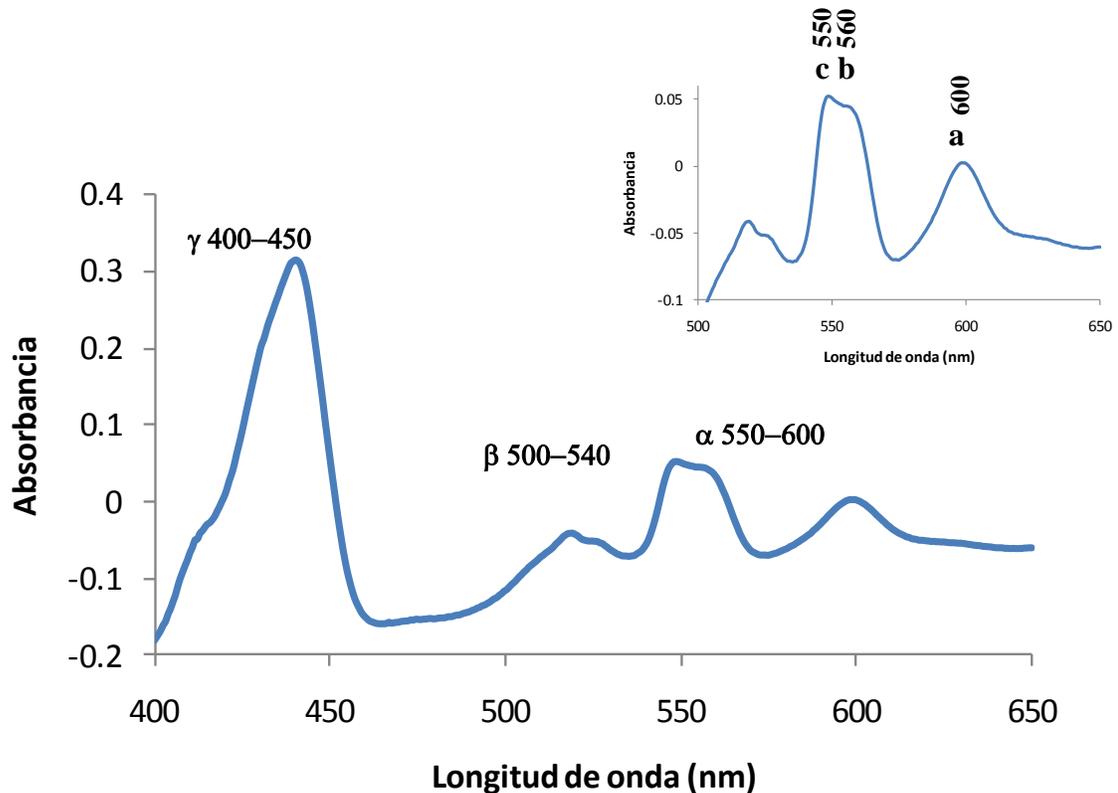


Fig. 19 **Espectro diferencial (Reducido con ditionita menos oxidado) 3mg de proteína de las membranas aisladas de *B. subtilis*.** En la figura se muestra la ubicación (en nanómetros) de los picos de absorción α , β y γ característicos de los citocromos. El inserto muestra la ampliación de los picos α de los citocromos a (600nm), b (560nm) y c (550nm).

Tabla 7. Contenido de citocromos y de proteína en las membranas aisladas de *B. subtilis*

	μM citocromo	Lowry $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ proteína total	nmoles de citocromo mg^{-1} proteína	mg proteína en 15ml membranas
Citocromo <i>a</i>	22		1.81	
Citocromo <i>b</i>	14.34	12.125	1.18	181.88
Citocromo <i>c</i>	16.3		1.34	

2.- Actividad de quinol: citocromo *c* reductasa y succinato deshidrogenasa:

Inicialmente se midió la actividad de quinol: citocromo *c* reductasa variando la cantidad de mg de proteína de membranas (0.07-2.4 mg) de *B. subtilis* y de mitocondrias de levadura para poder determinar a qué concentración se obtendría una mejor actividad. Originalmente se utilizó DBH ya que aunque es una benzoquinona y no una naftoquinona, tiene la ventaja de mantenerse reducida de manera estable, lo que permitió tener una idea de la actividad del complejo. En ensayos previos se determinó que la concentración de trabajo de DBH para *B. subtilis* es de 200 μM final contrastando con 50 μM para levadura. En las figuras 20A y B se muestran los trazos de actividad de quinol: citocromo *c* reductasa representativos para ambas membranas. En las tabla 8 y 9 se muestran los cálculos de actividad específica para cada tipo de membrana. Como se puede observar, entre menos cantidad de proteína, mayor es la actividad específica, se decidió tomar la cantidad de 0.3 mg para ambos casos como estándar para evitar imprecisiones por el valor de d/Abs y sobreestimaciones en la actividad, además de que con 0.3 mg de proteína, se obtiene una buena actividad específica en membranas de *B. subtilis* (alrededor de 13 nmoles de citocromo *c* reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) y un número de recambio de 0.21 nmoles de citocromo *c* reducido por nmoles de *bc* seg^{-1} . No obstante, comparando con la actividad específica obtenida con las membranas de mitocondrias de levadura la actividad del complejo *bc*₁ de levadura es mayor, 218.3 nmoles de citocromo *c* reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína y un número de recambio de 56.7 nmoles de citocromo *c* reducido

por nmoles de *bc* seg, es decir, 17 veces más que con las membranas de *B. subtilis*.

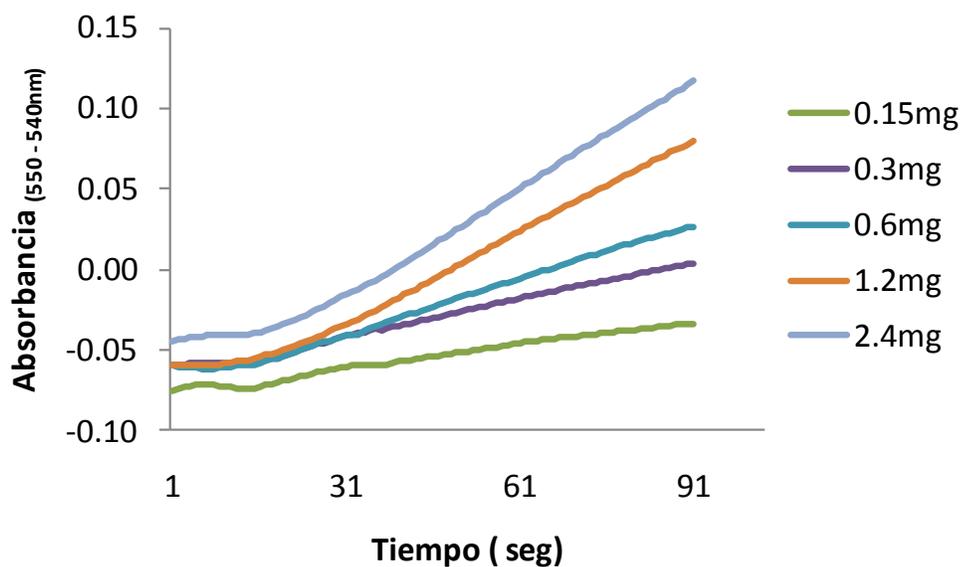


Fig. 20A Actividad del Complejo III *b₆c* en membranas de *B. subtilis* a diferentes cantidades (en mg) de proteína de membrana.

Tabla 8. Actividad del complejo *bc* de membranas de *B. subtilis*

Membranas de <i>B. subtilis</i>				
mg de proteína	Δ Abs/min	Actividad específica*	Número de recambio*	Número de ensayos
0.15	0.029	17.61	0.29	Promedio de 30 ensayos por duplicado
0.3	0.046	12.58	0.21	
0.6	0.069	10.43	0.17	
1.2	0.115	8.82	0.15	
2.4	0.136	5.20	0.09	

*Actividad Especifica expresada en $\text{nmol cit c red min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$

*Número de recambio expresado en $\text{nmol cit c red nmol bc seg}$

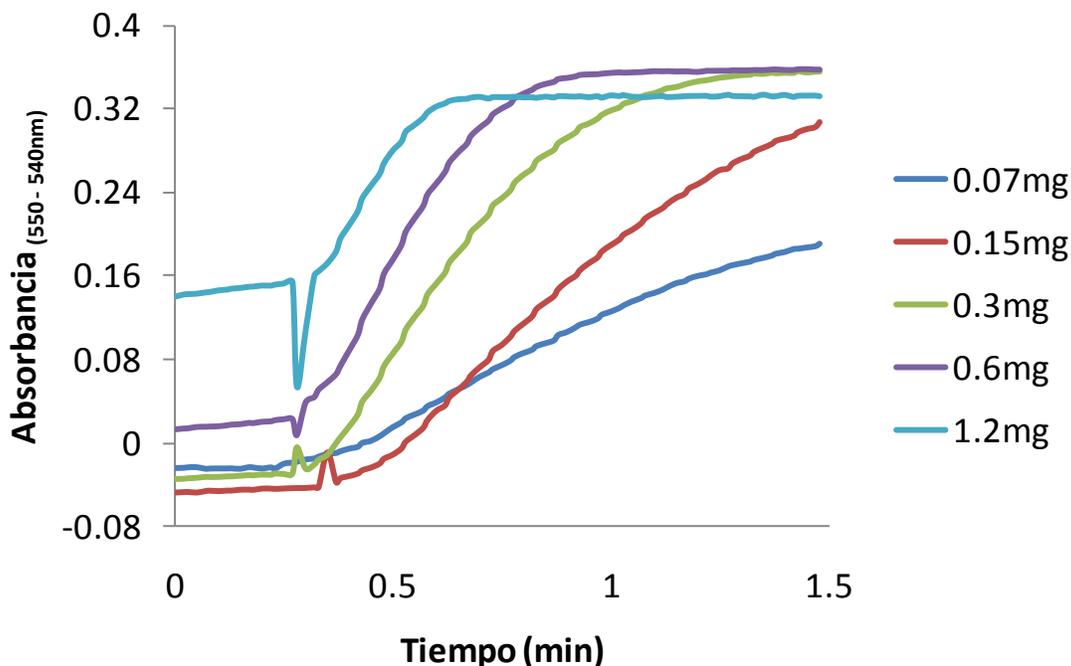


Fig. 20B Actividad del Complejo III bc_1 en membranas de mitocondrias de levadura a diferentes cantidades (en mg) de proteína de membrana.

Tabla 9. Actividad del complejo bc_1 de membranas de mitocondrias de levadura

Membranas de mitocondrias de levadura				
mg de proteína	Δ Abs/min	Actividad específica*	Número de recambio*	Número de ensayos
0.07	0.238	302.12	78.51	Promedio de 30 ensayos por duplicado
0.15	0.432	273.16	70.98	
0.3	0.689	218.28	56.72	
0.6	0.853	135.34	35.17	
1.2	0.762	60.42	15.70	

*Actividad Especifica expresada en $\text{nmol cit c red min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$

*Número de recambio expresado en $\text{nmol cit c red nmol } bc \text{ seg}$

Debido a la baja actividad del complejo bc en *B. subtilis* se pensó que posiblemente el método de extracción de las membranas hubiera afectado la actividad de los complejos respiratorios, por lo que se decidió explorar la actividad

de otro de los complejos respiratorios: el complejo II o SDH, del cual ya se ha reportado que presenta una actividad muy alta en membranas aisladas de *B. subtilis* (Hederstedt, 1986), en la figura 21 y tabla 10 se muestran los trazos representativos de dicho ensayo, como se puede apreciar la actividad obtenida en membranas de *B. subtilis* fue mayor que en las membranas de mitocondria de levadura (968.27 y 56.72 nmoles DCPIP reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína respectivamente), lo que demostró la integridad de las membranas de *B. subtilis*.

3.- Actividad de succinato: citocromo c reductasa con diferentes quinonas:

Como el DBH no es el reductor más adecuado para el complejo, se decidió adquirir diferentes naftoquinonas sintéticas, que fueran semejantes a la MK-7, para así intentar aumentar su actividad. Además de la medición con DBH utilizada por comparación, se midió la actividad del complejo sin añadir ninguna naftoquinona, sólo agregando succinato con la idea de que las membranas podrían tener algo de la quinona endógena y así tener una idea de la actividad del complejo con la naftoquinona propia (MK7).

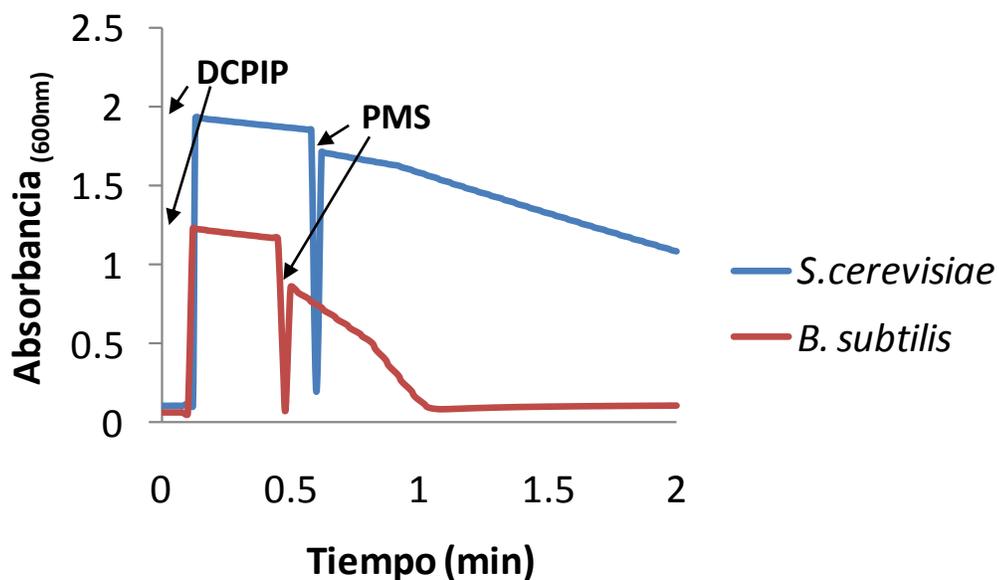


Fig. 21 **Actividad del Complejo II SDH** en membranas de *B. subtilis* y levadura a la cantidad estándar de 0.3 mg de proteína.

Tabla 10. Actividad del complejo SDH en membranas de levadura y *B. subtilis*

	Membranas de <i>B. subtilis</i>	Membranas de levadura	Número de ensayos
Proteína (mg)	nmols de DCPIP reducido min⁻¹ mg⁻¹		Promedio de 5 ensayos por duplicado
0.3	968.27	56.72	

En total se utilizaron 11 naftoquinonas diferentes (cuatro ensayos por duplicado de cada una) (Ver tabla 3) a una concentración final de 200 μM , para hacerlo comparativo con la concentración de DBH utilizada, los resultados se muestran en la tabla 11. Los resultados se pueden dividir en tres grupos: la mayoría de las naftoquinonas presentaron una actividad semejante a la del DBH y a la quinona endógena (MK-7) alrededor de 12 nmoles cit *c* reducido min⁻¹ mg⁻¹ proteína, otras mostraron un pequeño incremento como la Plumbagina y la Menaquinona, pero las que proporcionaron la mayor actividad fueron la Juglona y la Naftazarina (Fig. 22 A, B y C), que aumentaron hasta en un orden de magnitud tanto en la actividad específica (148.61 y 155.49 nmol cit *c* reducido min⁻¹ mg⁻¹ proteína respectivamente) como en el número de recambio (2.51 y 2.67 nmoles cit *c* reducido por nmoles de *bc* seg⁻¹ respectivamente) comparativamente hablando con lo obtenido con el DBH y la quinona endógena. De igual manera se tomó la medición con las membranas de mitocondrias de levadura como referencia.

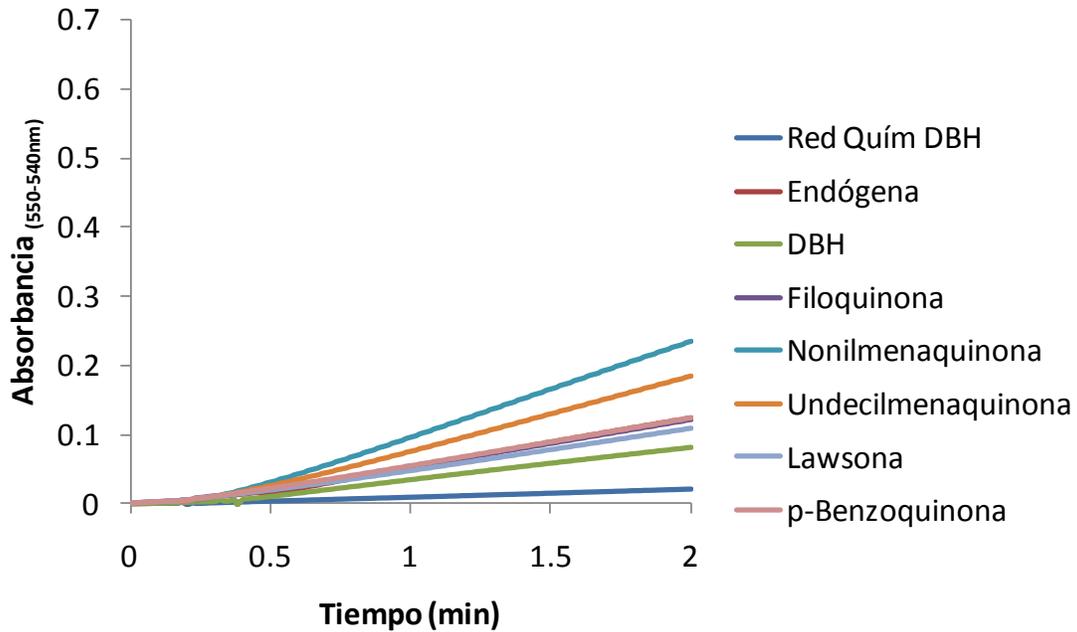


Fig. 22A **Actividad del Complejo tipo *bc* con diferentes naftoquinonas.** Trazos representativos de las actividades de succinato: citocromo *c* reductasa con diferentes naftoquinonas sintéticas en membranas de *B. subtilis* a una cantidad de 0.3mg de proteína. Se incluye un trazo con la actividad obtenida con DBH y la quinona endógena (MK-7). El gráfico incertado muestra una amplificación para que se aprecie con mayor claridad el incremento en actividad obtenido.

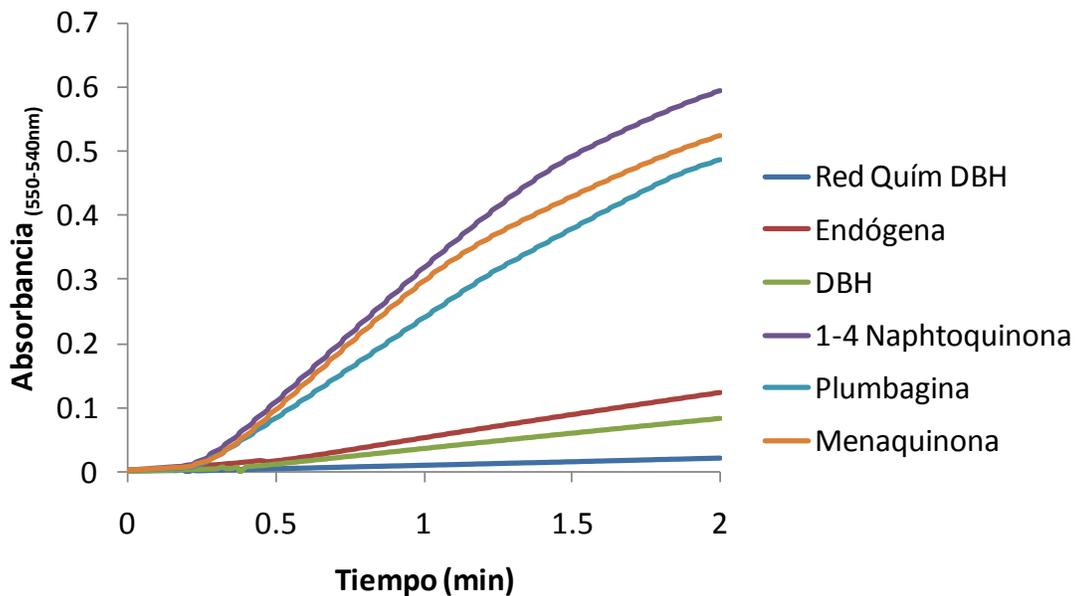


Fig. 22B **Actividad del Complejo tipo *bc* con diferentes naftoquinonas.** Trazos representativos de actividad de succinato: citocromo *c* reductasa con naftoquinonas sintéticas que presentaron un pequeño aumento en la actividad en membranas de *B. subtilis* a una cantidad de 0.3mg. Para comparar el incremento, se muestra el trazo de actividad obtenida con DBH y la quinona endógena (MK-7).

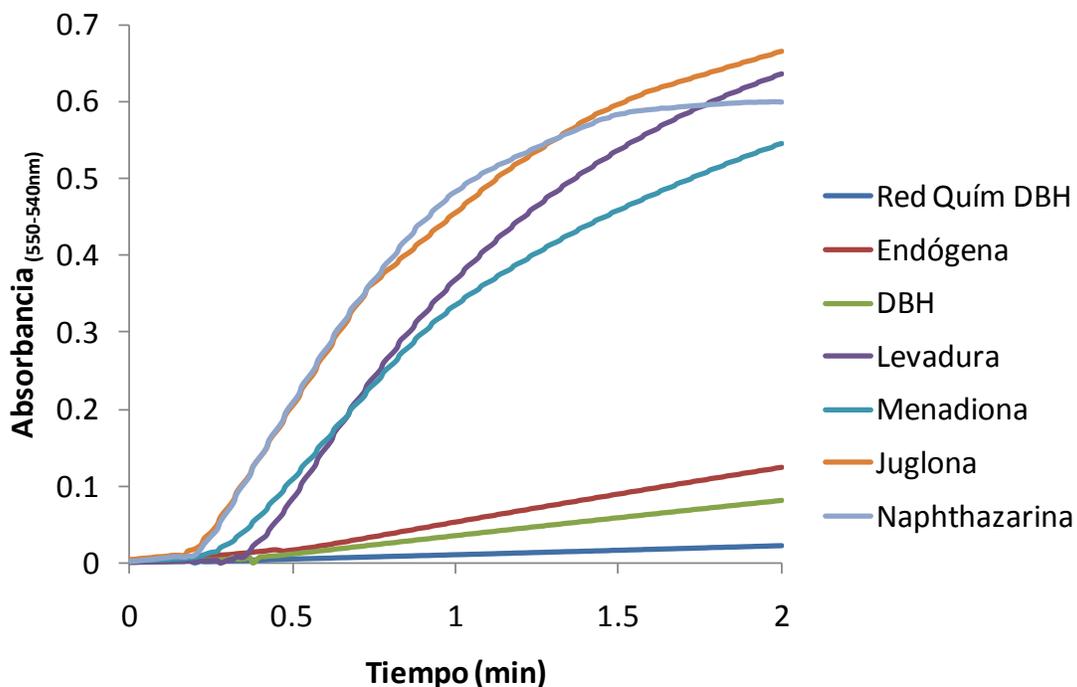


Fig. 22C **Actividad del Complejo tipo *bc* con diferentes naftoquinonas.** Trazos representativos de actividad de succinato: citocromo *c* reductasa con las naftoquinonas sintéticas Naftazarina, Juglona y Menadiona, que aumentan la actividad del complejo significativamente en membranas de *B. subtilis* a una cantidad de 0.3mg de proteína hasta en un orden de magnitud comparativamente con el DBH y la quinona endógena (MK-7).

Tabla 11. Comparación de los promedios de actividad de quinol: citocromo *c* reductasa y succinato: citocromo *c* reductasa con varias naftoquinonas sintéticas a una concentración final de 200 μ M en membranas de *B. subtilis*.

	Actividad específica ^a	Número de recambio ^b
Decilbenzoquinona (200μM DBH)	9.86	0.17
Succinato 20mM (Endógena MK-7)	12.37	0.20
Levadura (50 μM DBH)	322.17	38.35
2-Hidroxi- 1,4 Naftoquinona (Lawsona)	12.38	0.21
2-Metil-3 Fitol- 1,4 Naftoquinona (Filoquinona)	13.21	0.22

Undecilmenaquinona	22.78	0.38
1-4 Benzoquinona	26.50	0.49
Nonilmenaquinona	27.38	0.46
5-Hidroxi- 2 Metil- 1,4 Naftoquinona (Plumbagina)	69.78	1.16
2- Metil- 3 Heptaprenil- 1,4 Naftoquinona (Menaquinona)	89.34	1.49
1-4 Naftoquinona	91.29	1.58
2- Metil- 1,4 Naftoquinona (Menadiona)	97.43	1.55
5-Hidroxi- 1,4 Naftoquinona (Juglona)	148.61	2.51
5-8 Dihidroxi- 1,4 Naftoquinona (Naftazarina)	155.49	2.67

^a Actividad Especifica expresada en $\text{nmol cit c red min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$

^b Número de recambio expresado en $\text{nmol cit c red nmol bc seg}^{-1}$
Promedio de cuatro ensayos por duplicado

4.- Determinación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para tres diferentes naftoquinonas y el DBH:

Posteriormente para obtener las constantes cinéticas del complejo para los diferentes sustratos, se realizaron las titulaciones para las 3 naftoquinonas más sobresalientes en nuestro estudio, más una titulación para el DBH. En la figura 23 se muestra una titulación representativa para cada una de las cuatro quinonas, además del ajuste para obtener la $V_{m\acute{a}x}$ y la K_m . En el caso de la Juglona y Naftazarina se observa un claro incremento en la velocidad comparado con los valores de actividad obtenidos con DBH.

Una vez logradas las titulaciones se obtuvieron por medio de dos ajustes (Hanes y Hill) las constantes de K_m y $V_{m\acute{a}x}$. Cabe señalar que para el ajuste de Hill la $n=1$, suponiendo que no hay sitios de cooperación en el complejo. Podemos ver en las tablas 12 A y B los parámetros de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m para las cuatro quinonas obtenidos por medio de los dos diferentes ajustes. Se aprecia que se obtienen valores más altos de velocidad máxima y K_m con las naftoquinonas Juglona y Naftazarina que con el DBH. El análisis de cada titulación se puede observar en el anexo 2.

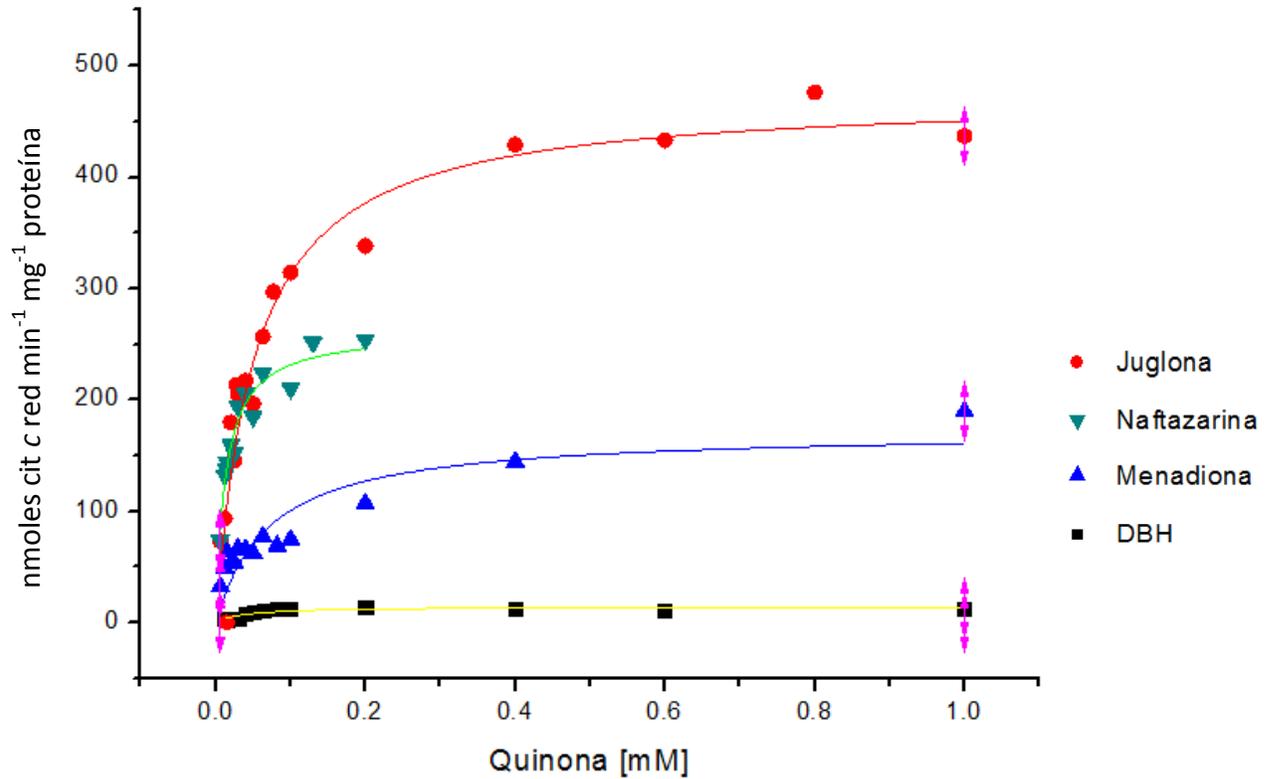


Fig. 23 Titulación de la actividad de quinol: citocromo c reductasa y succinato: citocromo c reductasa con varias naftoquinonas sintéticas (concentración final de 200 μ M) en membranas de *B. subtilis*.

Tabla 12A. Ensayos realizados para la obtención de los parámetros de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m de las mejores naftoquinonas sintéticas (concentración final de 200 μ M) por medio de dos ajustes en membranas de *B. subtilis*

	Fecha de las membranas	Fecha del ensayo	Hill		Hanes	
			$V_{m\acute{a}x}$	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$	K_m (mM)
DBH	28/07/09	14/09/09	15.62	0.04865	10.60	0.02
		06/10/09	12.75	0.02836	15.04	0.05
	08/12/09	06/04/10	10.16	0.0302	10.77	0.038
		07/04/10	14.55	0.04397	14.59	0.04
Promedio			13.27	0.03779	12.75	0.037
Juglona	20/02/09	30/06/09	118.07	0.05454	114.93	0.045
		10/08/09	533.44	0.12391	526.32	0.1
	28/07/09	26/08/09	541.36	0.05475	526.32	0.05
		02/09/09	384.76	0.02769	357.14	0.02
Promedio			473.46	0.05129	469.93	0.056

Naphthazarina	20/02/09	30/06/09	124.19	0.00967	129.87	0.01
		10/08/09	165.69	0.00601	217.4	0.05
	28/07/09	26/08/09	245.35	0.0162	156.25	0.01
		08/09/09	265.45	0.01281	285.71	0.018
Promedio			262.28	0.01336	219.78	0.026
Menadiona	20/02/09	30/06/09	92.1	0.03457	112.36	0.03
	28/07/09	05/10/09	172.18	0.07036	200	0.1
		07/04/10	189.18	0.08155	181.82	0.06
	08/12/09	13/04/10	172.33	0.03649	142.86	0.085
Promedio			177.89	0.0628	174.89	0.082

Tabla 12B. Promedio de los parámetros de $V_{m\acute{a}x}$ y Km de las cuatro mejores naftoquinonas sintéticas por medio de dos ajustes en membranas de *B. subtilis*

Ajuste	$V_{m\acute{a}x}$		Km		Número de ensayos
	Hill	Hanes	Hill	Hanes	
DBH	13.27	12.75	0.038	0.037	4
Menadiona	177.89	174.89	0.063	0.082	4
Naftazarina	262.28	220.18	0.013	0.014	4
Juglona	473.46	469.93	0.051	0.057	4

5.- Inhibición de las Aox de *B. subtilis*:

Una vez determinadas cuáles fueron las naftoquinonas que dieron la mejor actividad del complejo *bc*, se probaron dos diferentes inhibidores de oxidasas alternas (Aox) con el fin de estimular la ruta clásica y no la alternativa en el transporte de electrones (Fig. 10) y asegurar la reducción del citocromo *c* por el complejo *bc* y un mayor incremento en la actividad al agregar las naftoquinonas sintéticas. Sin embargo como se puede observar en la tabla 13 y figuras 24A, B, C

y D la actividad disminuye para el caso del inhibidor propilgalato y se mantiene casi igual al usar el inhibidor SHAM.

Tabla 13. Actividad de quinol: citocromo c reductasa y succinato: citocromo c reductasa con las dos mejores naftoquinonas sintéticas (concentración final de 200 μ M) en membranas de *B. subtilis*, incluyendo los inhibidores de Aox. Actividad específica (parte superior) y número de recambio (parte inferior).

Actividad específica (nmol cit c red min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)				
		Sin inhibidor	Propilgalato	SHAM
<i>Bacillus</i>	Levadura	265.12	64.15	194.06
	DBH	9.81	9.82	15.50
	Juglona	147.29	38.78	135.85
	Naftazarina	124.28	21.23	106.99

Número de recambio (nmol cit c red nmol bc seg ⁻¹)				
		Sin inhibidor	Propilgalato	SHAM
<i>Bacillus</i>	Levadura	31.26	7.56	22.88
	DBH	0.33	0.33	0.52
	Juglona	4.92	1.29	4.53
	Naftazarina	4.15	0.71	3.57

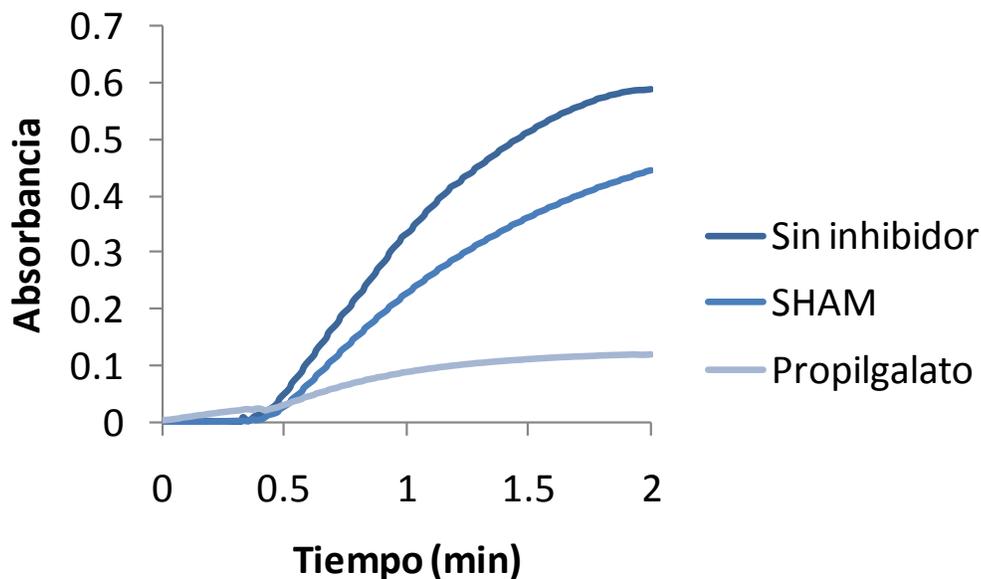


Figura 24A. Actividad de quinol: citocromo c reductasa en membranas de mitocondrias de Levadura, incluyendo los inhibidores de Aox. Ensayos representativos.

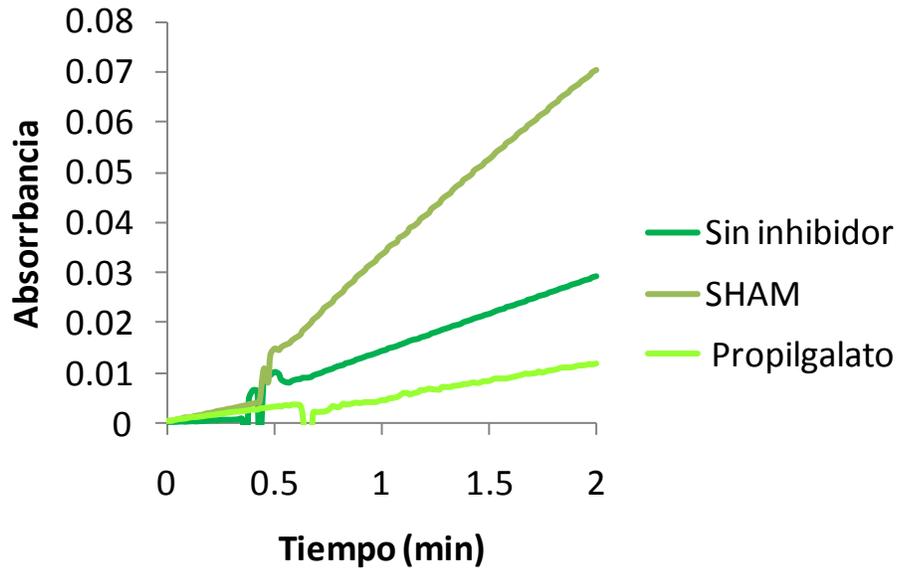


Figura 24B. **Actividad de quinol: citocromo c reductasa en membranas de *B. subtilis* (DBH)**, incluyendo los inhibidores de Aox. Ensayos representativos.

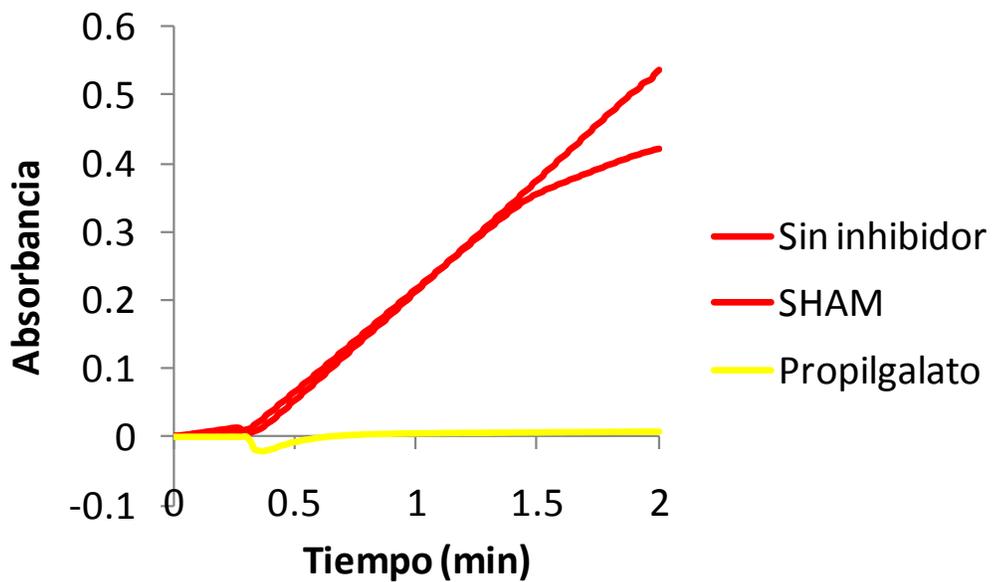


Figura 24C. **Actividad de succinato: citocromo c reductasa con Juglona (naftoquinona sintética)** concentración final de 200 μ M en membranas de *B. subtilis*, incluyendo los inhibidores de Aox. Ensayos representativos.

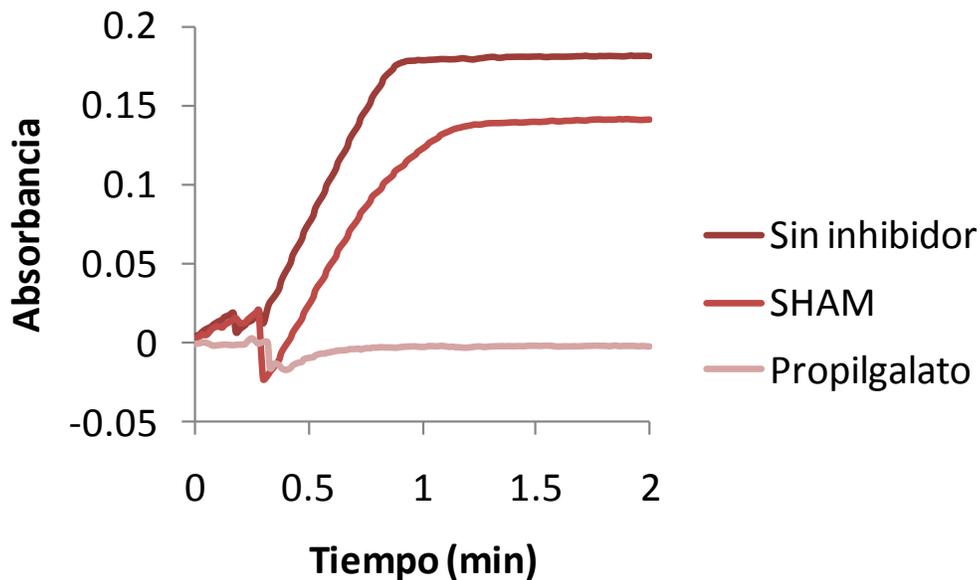


Figura 24D. **Actividad de succinato: citocromo c reductasa con Naftazarina** (naftoquinona sintética) concentración final de 200 μM en membranas de *B. subtilis*, incluyendo los inhibidores de Aox. Ensayos representativos.

6.- Inhibición del complejo *bc* de *B. subtilis*:

Finalmente con el fin de entender un poco más al complejo *b₆c* de *B. subtilis* se procedió a tratar de inhibirlo utilizando a los inhibidores del complejo *bc₁* estigmatelina, mixotiazol y antimicina. En este caso, también se utilizaron membranas de mitocondria de levadura en el ensayo específico de quinol: citocromo c reductasa. Como se puede observar en la tabla 14 y la figura 25A, y B al inhibir el complejo *bc₁* de levadura se obtiene una mayor inhibición con estigmatelina seguido por antimicina y finalmente mixotiazol. Con las membranas de *B. subtilis* midiendo la actividad del complejo *bc* utilizando DBH como transportador de electrones al agregar cualquiera de los tres inhibidores la actividad no sufre ningún cambio. Pero al utilizar las naftoquinonas Juglona o Naftazarina como transportadores de electrones y agregarles los inhibidores del complejo *bc* la actividad aumenta en lugar de disminuir.

Tabla 14. Comparación de la actividad específica (arriba) y número de recambio (abajo) de la actividad de quinol: citocromo *c* reductasa (ensayo para *Bacillus* y Levadura con DBH a una concentración final de 200 y 50 μM respectivamente) y succinato citocromo *c* reductasa (ensayos con Juglona y Naftazarina naftoquinonas sintéticas usadas a una concentración final de 200 μM y reducidas con SDH más 20mM de succinato de sodio) al agregar inhibidores (antimicina, estigmatelina y mixotiazol) para el complejo *bc*₁ en membranas de levadura y *bc* en membranas de *B. subtilis*. Promedio de 7 ensayos por duplicado.

		Actividad específica (nmol cit <i>c</i> red min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)			
		Sin inhibidor	Antimicina 1mM	Estigmatelina 1mM	Mixotiazol 1mM
Levadura	DBH 50μM	286.67	13.21	5.78	28.50
	DBH 200μM	12.04	12.53	12.62	12.28
Bacillus	Juglona	272.44	352.91	348.10	341.23
	Naftazarina	170.47	248.09	208.97	179.97

		Número de recambio (nmol cit <i>c</i> red nmol <i>bc</i> seg ⁻¹)			
		Sin inhibidor	Antimicina 1mM	Estigmatelina 1mM	Mixotiazol 1mM
Levadura	DBH 50μM	33.80	1.56	0.68	3.36
	DBH 200μM	0.19	0.20	0.20	0.20
Bacillus	Juglona	4.36	5.65	5.58	5.47
	Naftazarina	2.73	3.97	3.35	2.88

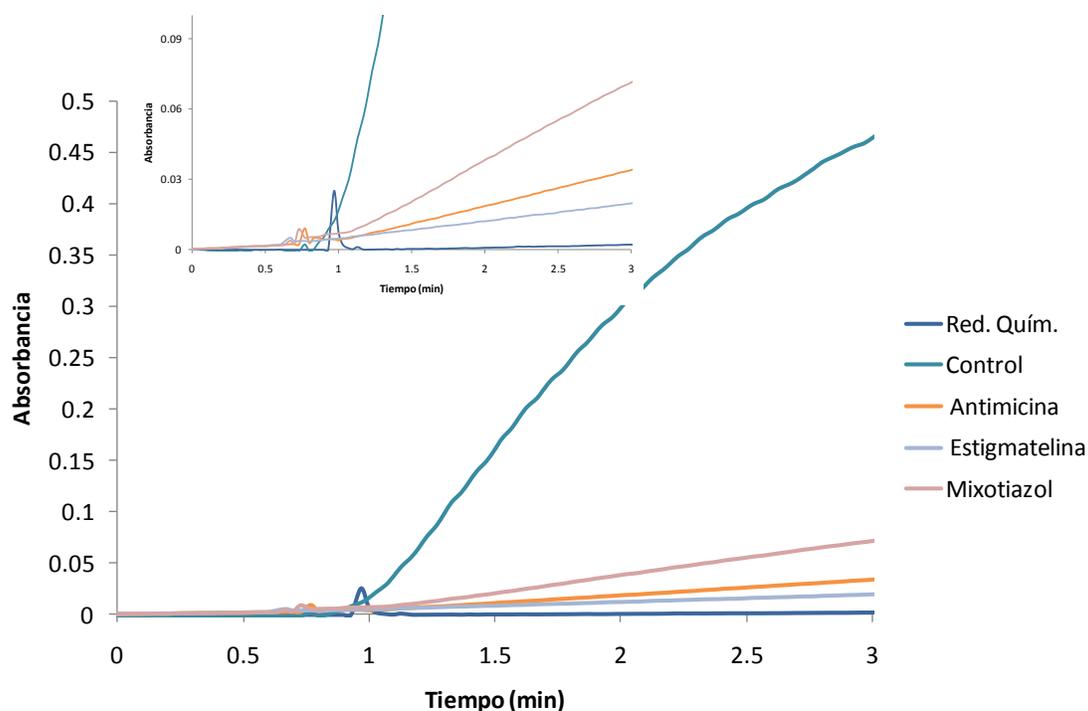


Fig. 25A. **Inhibición del complejo *bc*₁ en membranas de Levadura.** Actividad de quinol: citocromo *c* reductasa utilizando inhibidores del complejo *bc*₁ (Antimicina, Estigmatelina y Mixotiazol a una concentración final de 1 mM) en membranas de Levadura. Control = activadas con DBH 50 μM .

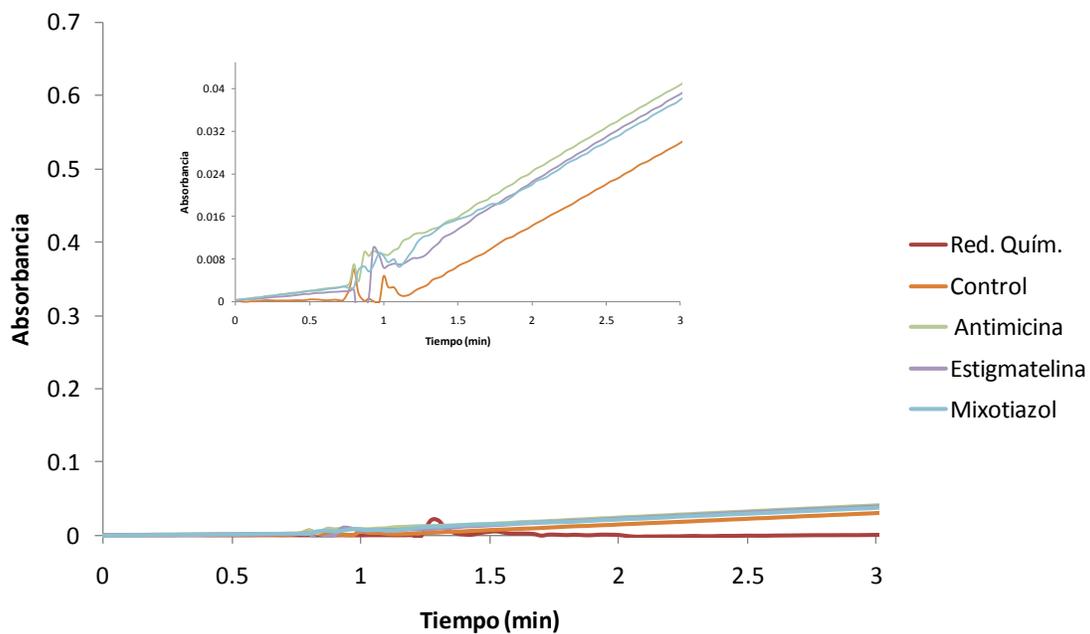


Fig. 25B. **Inhibición del complejo *bc* en membranas de *B. subtilis*.** Actividad de quinol: citocromo *c* reductasa utilizando inhibidores del complejo *bc* (Antimicina, Estigmatelina y Mixotiazol a una concentración final de 1mM) en membranas de *B. subtilis*. Control = activadas con DBH 200 μ M.

Discusión

1.- Características de las membranas aisladas de *B. subtilis*, rendimiento, concentración de proteína y composición de citocromos:

El complejo tipo *bc* es central en la fosforilación oxidativa y en la fotofosforilación fotosintética. Existen dos grupos principales de complejos tipo *bc*: el complejo *bc₁* que se encuentra en bacterias púrpura y verde azufrosas así como en mitocondrias de organismos eucariontes y el complejo tipo *b₆f* que pertenece a cianobacterias y cloroplastos. Dentro de las clasificaciones se puede destacar al complejo tipo *bc* de *B. subtilis* que tiene características semejantes al complejo *b₆f* en un organismo heterótrofo. Es por tanto importante caracterizar al complejo tipo *bc* de *B. subtilis* ya que su estudio podría dar información importante en cuanto a su metabolismo respiratorio, así como de características de los complejos tipo *b₆f* que han sido poco estudiados. Hemos escogido a esta bacteria en particular por las características genéticas que tiene y por el amplio estudio que se ha hecho en esta bacteria para la sobre expresión de proteínas.

Las membranas aisladas de *B. subtilis* muestran características especiales, la composición, organización, función y regulación genética dependen de la composición del medio de cultivo y tensión de oxígeno. Al comparar el rendimiento de proteína membranal y de citocromos (nmol/mg) en los diferentes medios en los que se ha cultivado a *B. subtilis* (MSR y LB), el medio MSR muestra una alta concentración de citocromos y un mayor rendimiento de proteína membranal (Tabla 6 y Fig. 18). Es por esto que hemos escogido al medio con 3% de succinato para obtener la mayor cantidad de citocromos en las membranas aisladas de *B. subtilis* y por tanto obtener una medición confiable de las actividades del complejo *bc* de este organismo. Comparando el rendimiento obtenido de proteína total de membrana con el de las mitocondrias de levadura, se debe decir que en el caso de *Bacillus subtilis* se partió con 26.06 g de bacterias y para levadura de 250 g obteniendo una cantidad final de 181.88 mg y 114.23 mg totales de membranas respectivamente.

2.- Actividad de quinol: citocromo *c* reductasa y succinato deshidrogenasa:

Se realizó la medición de la actividad del complejo *bc* utilizando como sustrato al DBH, por estabilidad reducido y almacenado a -70 °C durante 3-4 meses (además de que existe el antecedente del uso de duroquinol para medir la actividad de otros complejos respiratorios de *B. subtilis* (Jaramillo y cols., 2005)), para ser utilizado como referencia en comparación al medir las actividades con las naftoquinonas, razón por la cual se decidió buscar además una cantidad de proteína específica para estas determinaciones. En cada medición de actividad, se realizó un control de reducción química del citocromo *c* por cada naftoquinona y por el DBH que fue tomada en cuenta para determinar la verdadera reducción.

Entre más cantidad de proteína (en mg) se coloque en la celdilla, más turbidez se provoca, menor es la transmitancia de la celdilla, produciendo una menor absorción y por ende errores en la determinación de la velocidad específica del complejo. Como se muestra en las tablas 7 y 8 los valores de $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ aumentan conforme la cantidad de proteína es mayor. Pero al realizar los cálculos de velocidad se obtiene una mayor actividad específica a menores concentraciones, por tanto, se eligió la cantidad de 0.3 mg y no de 0.15 mg de proteína como cantidad fija de proteína para los ensayos y eliminar así imprecisiones por el $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ y las sobreestimaciones de la actividad. También utilizando el dato del número de recambio que muestra la velocidad y eficiencia del complejo al indicar cuantas nmoles del sustrato oxida por segundo; por ejemplo, la actividad específica del complejo bc_1 en membranas de mitocondria de levadura (con 0.3 mg de proteína) es de aproximadamente 200 nmoles de citocromo *c* reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína y su número de recambio es de aproximadamente 50 nmoles de citocromo *c* reducido nmoles^{-1} del complejo $bc_1 \text{seg}^{-1}$ (o simplificando, seg^{-1}). Comparativamente la actividad obtenida del complejo *bc* de las membranas de *B. subtilis* es de aproximadamente 12 nmoles de citocromo *c* reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína y un número de recambio de aproximadamente 0.2 nmoles de citocromo *c* reducido nmoles^{-1} del complejo *bc* $\text{seg}^{-1}(\text{seg}^{-1})$.

Es posible que nuestro método de purificación de las membranas celulares provocara una desnaturalización del complejo y por tanto la baja actividad del mismo. Para probar que las membranas se encontraban en buen estado se decidió medir la actividad de otro complejo de la cadena respiratoria, en este caso la del complejo II ó SDH ya que se ha reportado en otros trabajos (Hederstedt, 1986) que presenta una alta actividad en membranas de *B. subtilis*. Pero la actividad del complejo II en *Bacillus* fue la esperada, similar a la reportada y mayor que la obtenida en las membranas de mitocondrias de levadura como se puede observar en la tabla 9 (968.27 y 58.72 nmoles DCPIP reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína respectivamente), por lo que se concluyó que las membranas sí se encontraban en buen estado, y por lo tanto el sustrato que se estaba utilizando (DBH) no era el adecuado.

La razón por la cual el complejo bc_1 de levadura sea más rápido que el bc de *B. subtilis* puede deberse a que el DBH no es el sustrato adecuado para la cadena transportadora de *B. subtilis* por ser una benzoquinona y no una naftoquinona, a diferencia de la cadena respiratoria de levadura que trabaja con ubiquinona 6 (Q_6), y aunque el DBH no contiene isoprenoides, la cola hidrocarbonada que tiene le confiere propiedades hidrofóbicas que permiten su uso como análogo de esta quinona natural (Q_6) (Fig. 26) (Rivera y cols., 2005).

En pruebas preliminares se pudo determinar, que la mejor concentración de DBH para el complejo bc en membranas de *B. subtilis* era 200 μM y para levadura de 50 μM (Gutierrez-Cirlos y Trumpower, 2002).

3.- Actividad de succinato: citocromo c reductasa con diferentes quinonas:

Debido a que la actividad de SDH en nuestras preparaciones de membrana de *B. subtilis* era muy similar a la reportada podríamos esperar que este complejo fuera capaz de reducir naftoquinonas sintéticas oxidadas que posteriormente redujeran al complejo bc . Por tanto decidimos utilizar el ensayo de succinato: citocromo c reductasa, que facilitaría utilizar naftoquinonas añadidas en el ensayo y que son inestables al reducirse.

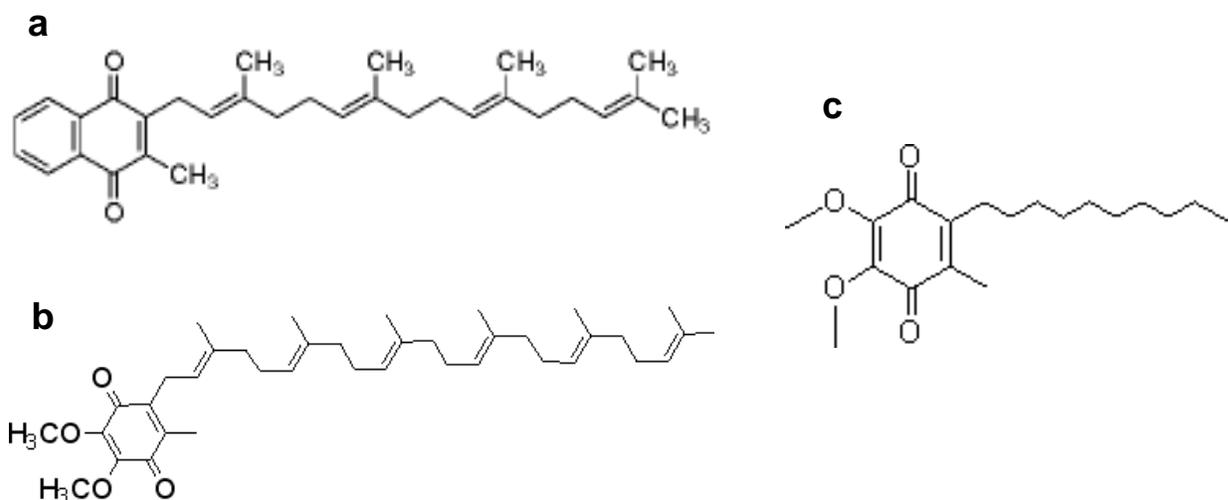


Fig. 26 Comparación estructural de **a.** Menaquinona: transportador de electrones endógeno en *B. subtilis*, **b.** Ubiquinona 6: transportador de electrones endógeno de Levadura y **c.** Decil benzoquinol (DBQ): análogo de quinona.

Por otra parte, todas las naftoquinonas sintéticas fueron escogidas debido a que se tienen diferentes antecedentes de trabajos en los que se reporta el uso de naftoquinonas sintéticas o diferentes a la menaquinona-7 de *B. subtilis* que pueden utilizarse para medir la actividad del complejo *bc* (Bergsma y cols., 1982a; Bisschop y Konings, 1976; Farrand y Taber, 1974; Hollander, 1976; Hughes y cols., 2010). Además utilizamos algunas naftoquinonas donadas al laboratorio semejantes a la menaquinona-7 pero más hidrofóbicas que podrían servir de sustrato (Nonil y Undecilmenaquinona). En este caso, no se hizo una comparación con la actividad de levadura (con las naftoquinonas oxidadas) debido a que se esperaba que no fueran buen sustrato para este complejo. Sin embargo, en todos los casos se hizo una comparación con la actividad que se obtiene al utilizar DBH y al agregar succinato a las membranas de *B. subtilis* sin ninguna naftoquinona. Como se muestra en la tabla 10, con la mayoría de estas naftoquinonas sintéticas se obtuvieron valores de actividad semejantes al obtenido con DBH o con la quinona endógena (MK7). Sin embargo se encontraron dos que lograron estimular la actividad del complejo *bc* (Juglona y Naftazarina con una

actividad específica de 148.61 y 155.5 nmol citocromo *c* reducido min⁻¹ mg⁻¹ de proteína y un número de recambio de 2.51 y 2.67 seg⁻¹ respectivamente), incrementándola hasta en un orden de magnitud, posiblemente por contener en sus estructuras grupos hidroxilo o por ser de las naftoquinonas más pequeñas lo que facilitó que se internalizara en el sitio activo del complejo *bc* dando una mejor actividad.

En los ensayos con las diferentes naftoquinonas utilizadas no se logró alcanzar el valor de actividad obtenido para el complejo *bc*₁ de levadura. Esto podría deberse a que en primer lugar se utiliza citocromo *c* de corazón de caballo que no es idéntico al citocromo *c* de *B. subtilis*. Segundo podría deberse a que a pesar de ser buenos donadores de electrones, las naftoquinonas utilizadas siguen siendo inadecuadas para el complejo, o que la manera de introducirlos en el ensayo (de forma oxidada y no reducida por su poca estabilidad) no sea la adecuada, o simplemente por la preferencia del complejo *bc* por la menaquina 7, o porque los complejos de bacteria no muestran actividad alta (Ljungdahl y cols., 1987). Sería interesante tratar nuevas alternativas de introducir las naftoquinonas, ya sea por medio de liposomas, y de congelaciones y descongelaciones de las membranas (Bergsma y cols., 1982a), para estar seguros que se están particionando en su totalidad a la membrana. El problema de estas propuestas es que aún no se sabe si el complejo *bc* mantenga su actividad después del tratamiento de congelación-descongelación.

Otra de las causas por las que se podría pensar que la actividad del *bc* de *B. subtilis* no se asemeja a la obtenida en las membranas de levadura, es que las naftoquinonas no estuviesen difundiendo en las membranas para hacer contacto con el sitio activo del complejo *bc*. Sin embargo, cabe mencionar que todas las naftoquinonas se disolvieron en dos solventes distintos (ETOH ó DMSO) según fue el caso para asegurar que las naftoquinonas fueran solubles, además de que se agregó el detergente Tween-20 al 0.01% en el amortiguador de actividad. Además, como se muestra en la tabla 3, no todas las naftoquinonas cuentan con el potencial redox suficiente para poder ser reducidas por la SDH y a continuación

ser oxidadas por el complejo *bc*. Por tanto sí se espera que haya diferencias en los resultados obtenidos al usar diferentes naftoquinonas.

4.- Determinación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para las naftoquinonas y DBH:

Debido a que se encontraron diferencias en la velocidad del complejo *bc* de *B. subtilis* con el DBH y las naftoquinonas, se decidió obtener los parámetros cinéticos de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para las cuatro quinonas seleccionadas. En primer lugar el DBH, después la menadiona que dio un valor de actividad intermedio y finalmente, la juglona y la naftazarina que dieron el valor más alto de actividad. Al realizar las titulaciones y los ajustes relativos (Hill y Hanes) y compararlas con la titulación del DBH se puede observar que las dos naftoquinonas, Juglona y Naftazarina, son las más específicas por sus valores de K_m (definida como la concentración, en este caso en μM , del sustrato a la que se obtiene la mitad de la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) de la enzima) y $V_{m\acute{a}x}$ obtenidos en las titulaciones (Tablas 11A y B). Cabe mencionar que, como se puede ver en la figura 22, la Naftazarina fue la única naftoquinona de la cual se realizó una titulación hasta 0.2mM de concentración en el ensayo, esto es debido a que pasando esta concentración, el $\Delta Abs/min$ de la reducción química es mayor que el de la actividad obtenida, causado por la alta concentración del sustrato.

Inicialmente se utilizó el ajuste de Lineweaver-Burk para la obtención de los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m , sin embargo, con este ajuste, no se podían linearizar las gráficas de las cuatro titulaciones obtenidas, por lo que con el criterio de evaluar todas las gráficas por el mismo ajuste, se decidió emplear el de Hanes para linearizar los datos y el ajuste de Hill por medio del programa Origin sobre los datos. En todos los ajustes de tipo Hill, se utilizó una $n = 1$ asumiendo que la unión del sustrato a la enzima no es cooperativo. El valor de n define si una enzima tiene o no un comportamiento cooperativo ante su sustrato, si n es mayor a 1 la reacción es cooperativa positivamente, si n es menor a 1 la enzima se comporta de manera cooperativa negativa ante su sustrato. Sin embargo, en algunos casos, usando un valor de $n=2$ (como para el DBH, ver anexo 2) también

se obtiene un buen ajuste para los datos reales, por tanto es posible pensar que podemos tener una enzima cooperativa con estos sustratos.

5.- Inhibición del complejo *bc* de *B. subtilis*:

En cuanto a los inhibidores del complejo III (antimicina, estigmatelina y mixotiazol), y al estimular las membranas con DBH (50 y 200 μM para levadura y *B. subtilis*, respectivamente) se observó una gran diferencia entre los dos complejos. En el complejo *bc*₁ de levadura si actuaron como se esperaba, disminuyendo su actividad hasta en un 4, 2 y 10% respectivamente (inhibición del 96%, 98% y 90% respectivamente), ya que los inhibidores estigmatelina y mixotiazol bloquean la oxidación del quinol en el centro P y previenen la reducción de los centros de alto potencial redox del complejo (centro hierro-azufre y citocromo *c*₁) y por su parte la antimicina bloquea la re-reducción de la quinona por el citocromo *b* en el centro N del ciclo Q (Gutierrez-Cirlos y Trumpower, 2002). En contraste, estos inhibidores no afectaron la actividad del complejo *bc* de *B. subtilis* en presencia de DBH como quinona. Artículos publicados anteriormente (Baniulis y cols., 2008; Yamashita y cols., 2007) muestran que la antimicina no afecta al complejo *b*₆*f* por la existencia del tercer hemo *x* que se ubica en el sitio de unión de este inhibidor. Ya que se ha reportado que el *bc* de *B. subtilis* tiene un hemo covalentemente unido al citocromo *b*, confirmamos que lo mismo sucede para el complejo *b*₆*c* de *Bacillus*. Llama la atención que ni la estigmatelina ni el mixotiazol hayan tenido efecto en la actividad del complejo al utilizar DBH como sustrato.

No obstante, al utilizar a las naftoquinonas Juglona y Naftazarina la actividad del complejo, aumentó, lo cual nos podría indicar que probablemente ocurra algún tipo de modificación tridimensional en los sitios de interacción de los análogos de naftoquinonas por efecto de los inhibidores.

En diferentes trabajos (Castellani y cols., 2010; Covian y cols., 2007; Gutierrez-Cirlos y Trumpower, 2002) por evidencias cinéticas, se observó que el sitio de oxidación del ubiquinol, o sitio P, está activo cuando el sitio de reducción de la

ubiquinona, o centro N, está ocupado por los inhibidores, y que los electrones rápidamente equilibran entre las subunidades del citocromo *b*. Por lo que se propuso y comprobó la teoría de que los monómeros del complejo *bc₁* pueden trabajar de forma alternante (ya sea que actué uno u otro monómero) y existe una comunicación conformacional entre los centros N – N y P – P de cada monómero (Fig. 13). Así, aunque un inhibidor se situó en uno de los monómeros, el otro monómero seguirá funcionando y los electrones podrán ser pasados a éste para completar la reacción permitiendo un reciclaje de electrones; además de que se puede notar un incremento en la actividad por la rápida transferencia de electrones a nivel de los hemos *b*, caso que podría ser similar en las membranas de *B. subtilis* al obtener un aumento en lugar de una disminución de la actividad con estos inhibidores.

Otra explicación (más sencilla) es que los inhibidores están modificando la unión de las naftoquinonas al complejo, incrementando la actividad del mismo.

6. Inhibidores de las quinol oxidasas de *Bacillus subtilis*.

Al agregar los inhibidores de las Aox y estimular la actividad con el DBH en las membranas de *Bacillus subtilis*, la actividad no mostró ningún estímulo con el propilgalato, pero en el caso del SHAM ésta sí aumenta aunque no considerablemente. En las membranas de mitocondrias de levadura al estimularlas con el DBH, y en las membranas de *Bacillus* al agregar las naftoquinonas (Juglona y Naftazarina) y arrancar la reacción con succinato de sodio, sucede lo contrario, se puede ver una inhibición de la actividad que es más clara con el propilgalato (Tabla 12). Esto puede deberse a la similitud estructural entre el propilgalato y los quinoles, una cabeza benzénica y una cola hidrocarbonada, lo que pudiese estar alterando la actividad.

Sería lógico pensar que estos inhibidores se estén uniendo también al complejo *bc* disminuyendo su actividad, ya que tanto las Aox como el complejo *bc* pueden tener similitudes en el sitio activo donde se une la quinona reducida, y así los electrones puedan pasar, ya sea por la ruta clásica o la alterna.

Conclusiones

Al crecer a *B. subtilis* en medio MSR se obtiene un mejor rendimiento de proteína membranal y de citocromos por mg de proteína, sin embargo, es notorio que al utilizar el ensayo de decilquinol: citocromo *c* reductasa, el complejo III de levadura muestra una actividad específica mayor que el *bc* de esta bacteria, cosa contraria a lo que ocurre al medir la actividad del complejo II SDH en ambas membranas.

Es posible medir la actividad del complejo *bc* en fracciones enriquecidas y membranas aisladas de *B. subtilis* utilizando al DBH como donador artificial de electrones, a pesar de que es una benzoquinona y no una naftoquinona como el transportador endógeno de ésta bacteria. No obstante, usando el ensayo de succinato: citocromo *c* reductasa con diferentes naftoquinonas sintéticas se puede obtener una manera de probar cuáles podrían ser las más indicadas para el ensayo de actividad de este complejo.

Se utilizaron 12 naftoquinonas sintéticas, de las cuales las más efectivas en nuestras manos fueron la Juglona y la Naftazarina con las que se obtuvo un incremento en la actividad hasta de un orden de magnitud (de 10 a 150 nmoles de citocromo *c* reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) al igual que en el número de recambio.

Cuando se utilizaron los inhibidores y 200 μM de DBH no se obtuvo inhibición de la actividad del complejo de *B. subtilis*, pero al utilizar las naftoquinonas Juglona y Naftazarina en el ensayo de succinato: citocromo *c* reductasa la actividad aumenta considerablemente hasta en un 50%. Los inhibidores del complejo *bc* (antimicina, estigmatelina y mixotiazol) si inhibieron al complejo *bc*₁ de la cadena de las membranas de mitocondrias de levadura, hasta en un 96, 98 y 90%.

Con los inhibidores de las Aox propilgalato y SHAM empleados para promover la ruta clásica y no la alternativa en el transporte de electrones, se observó que el propilgalato producía inhibición de la actividad succinato: citocromo *c* reductasa en presencia de las naftoquinonas. Por lo que es necesario realizar más estudios para así poder entender este comportamiento.

Perspectivas

Actualmente se está tratando de clonar y sobreexpresar la región soluble del citocromo *c*₅₅₀ de *B. subtilis* para hacer más específico el ensayo y lograr un aumento en la actividad.

Anexo 1

Tabla 14. Titulación del tiempo de incubación de las membranas de *B. subtilis* a una cantidad de 0.3mg de proteína de membrana para obtener el máximo de actividad.

Tiempo (min)	d/Abs	Actividad específica*	Número de recambio*
30	0.022797	8.29	0.16
90	0.027262	10.37	0.22
120	0.033057	13.07	0.28
150	0.033617	13.33	0.29
180	0.041859	17.16	0.37

*Actividad específica expresada en $\text{nmoles cit c red min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

*Número de recambio expresado en $\text{nmoles cit c red nmoles bc seg}^{-1}$

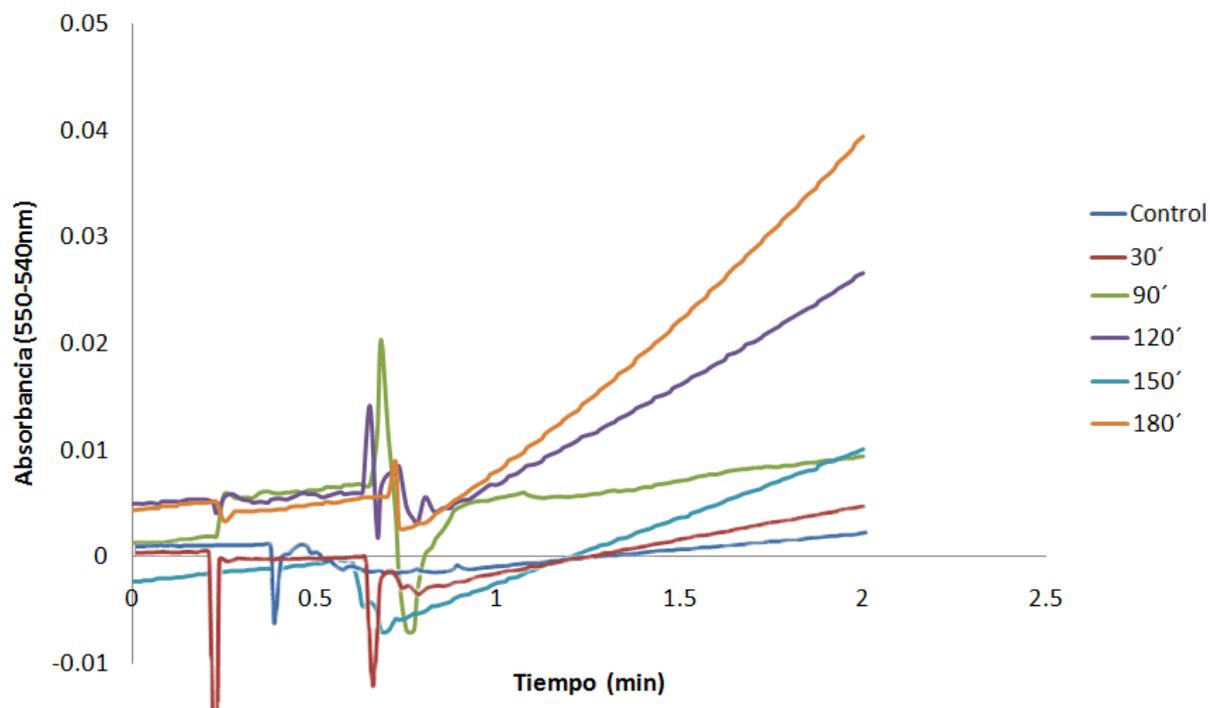


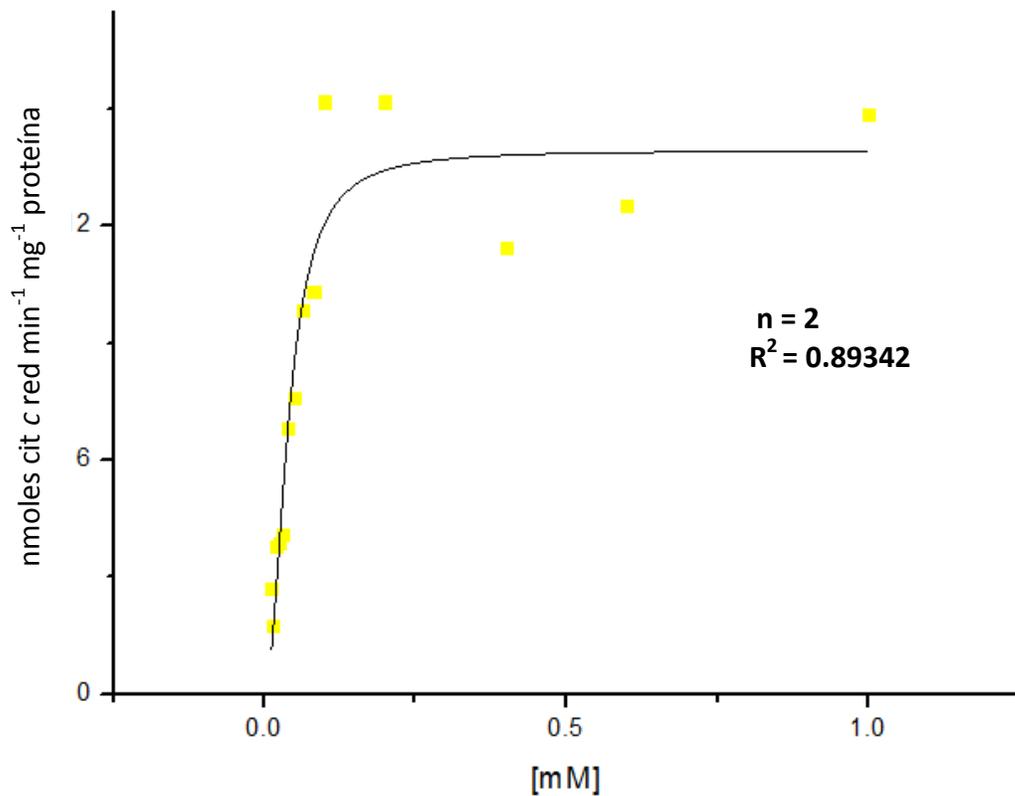
Fig. 27 Titulación del tiempo de incubación de las membranas de *B. subtilis* a una cantidad de 0.3mg de proteína de membrana para obtener el máximo de actividad.

Anexo 2

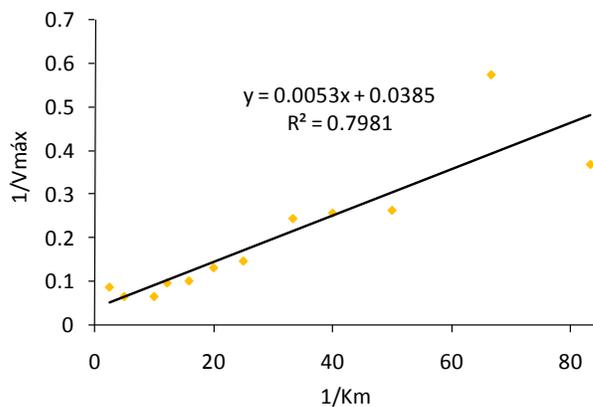
• Ajustes realizados de las titulaciones de las mejores naftoquinonas

DBH 06/10/09

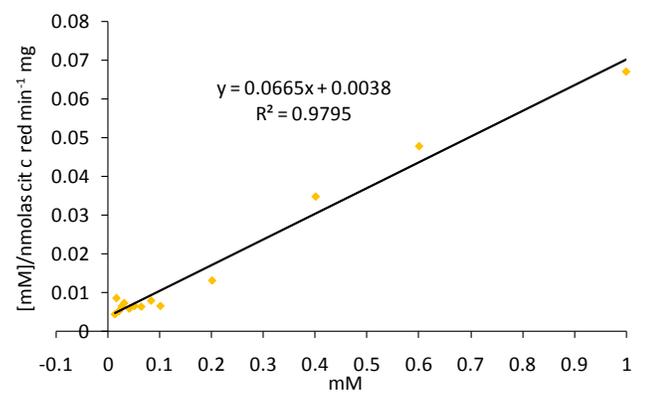
Ajuste de Hill



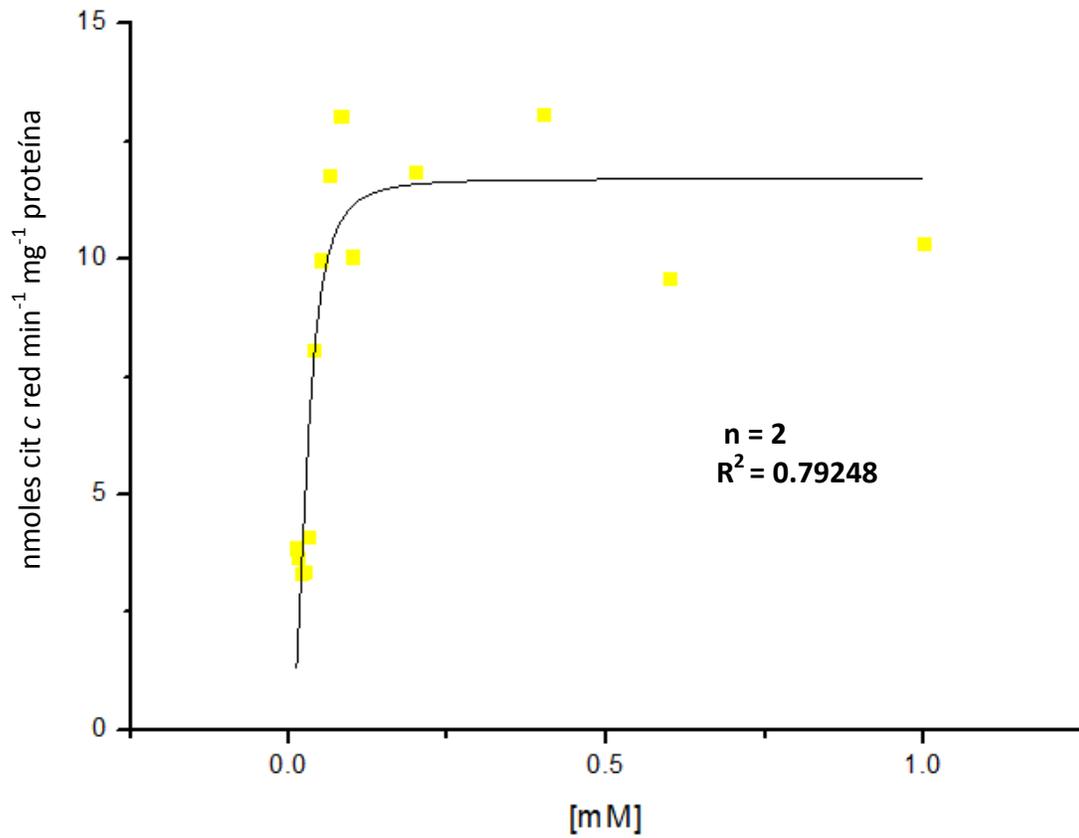
Ajuste Lineweaver-Burk



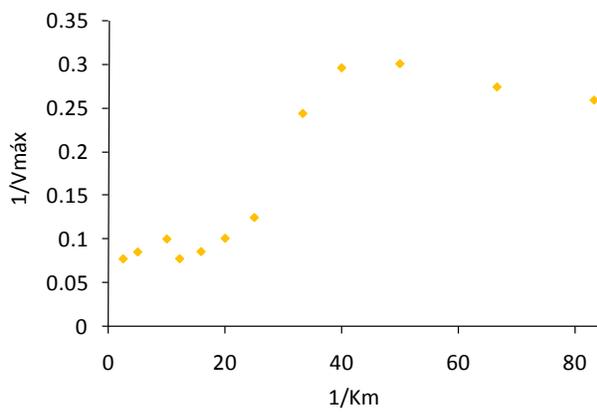
Ajuste Hanes plot



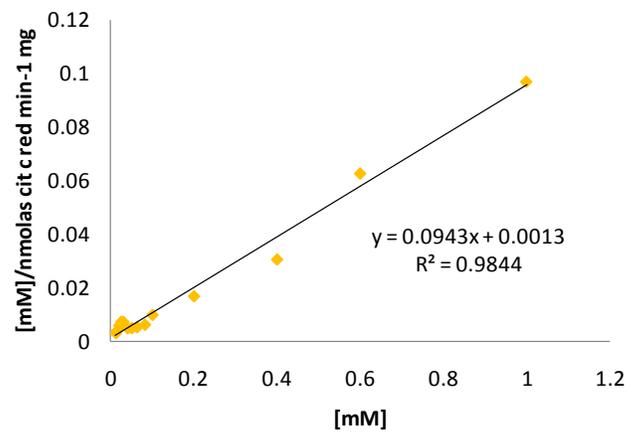
DBH 14/09/09
Ajuste Hill



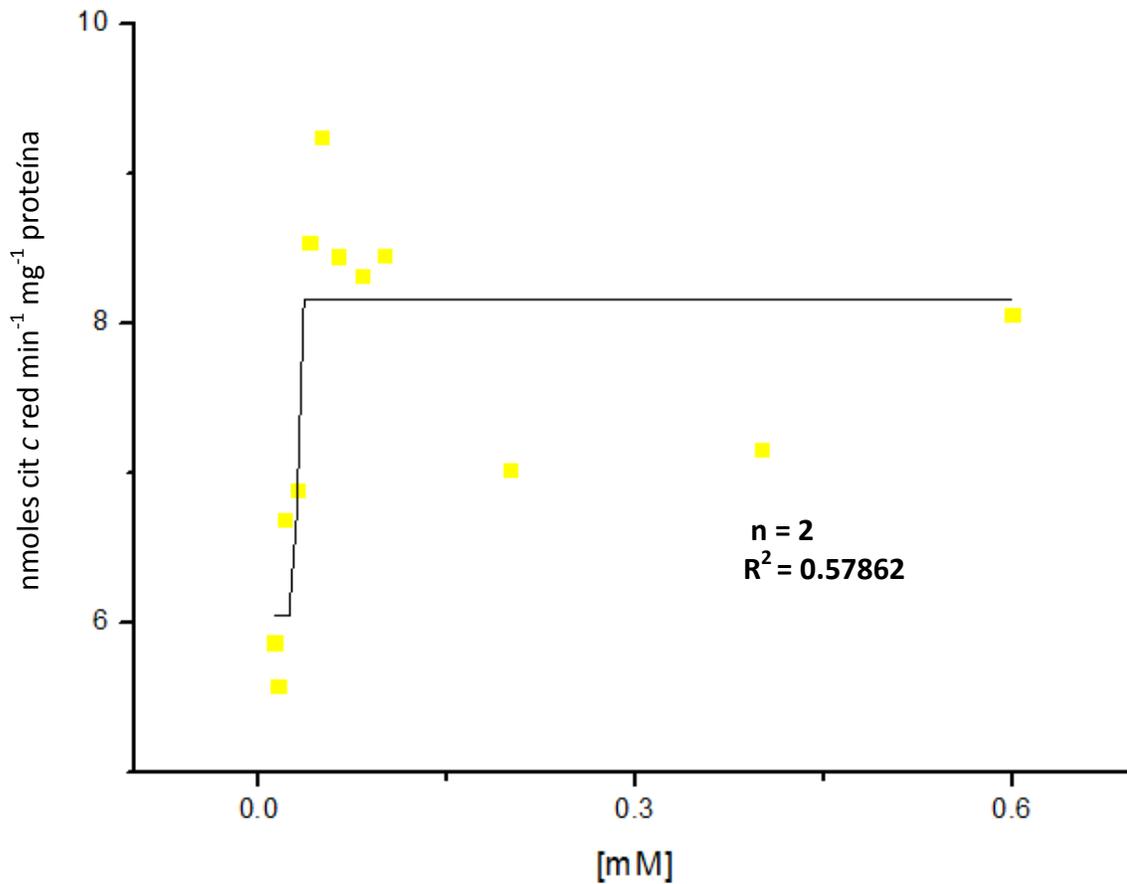
Ajuste Lineweaver-Burk



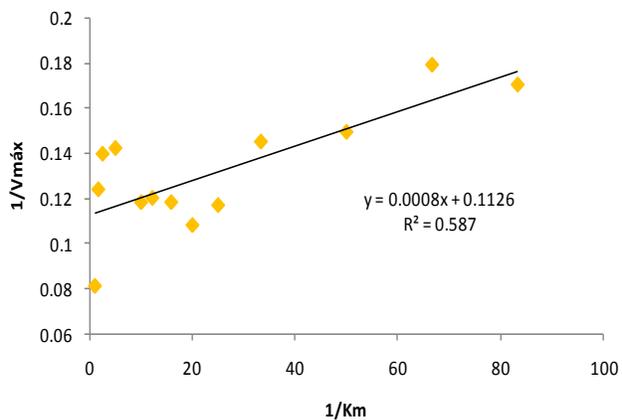
Ajuste Hanes plot



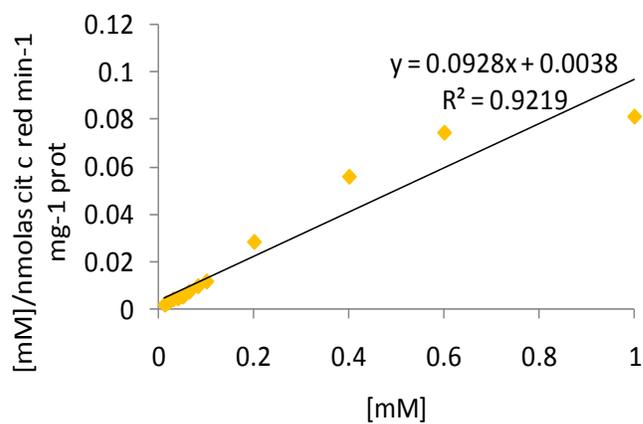
DBH 06/04/10
Ajuste Hill



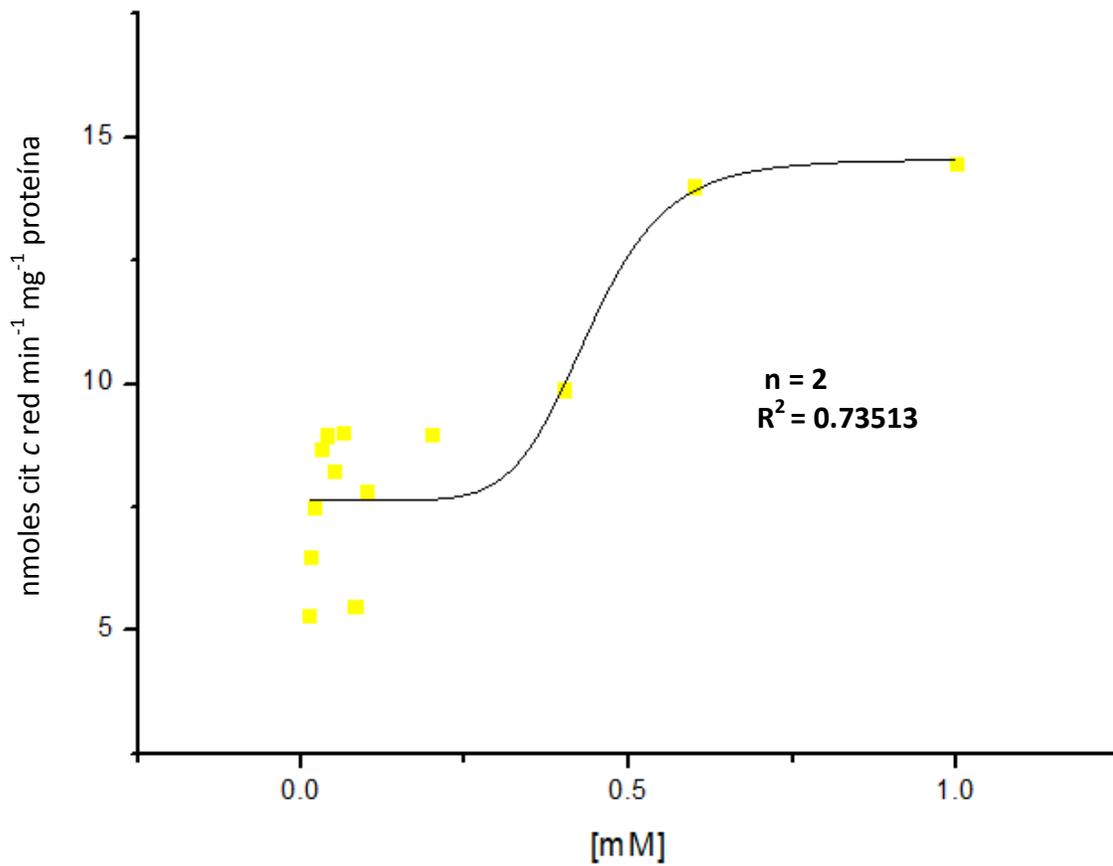
Ajuste Lineweaver-Burk



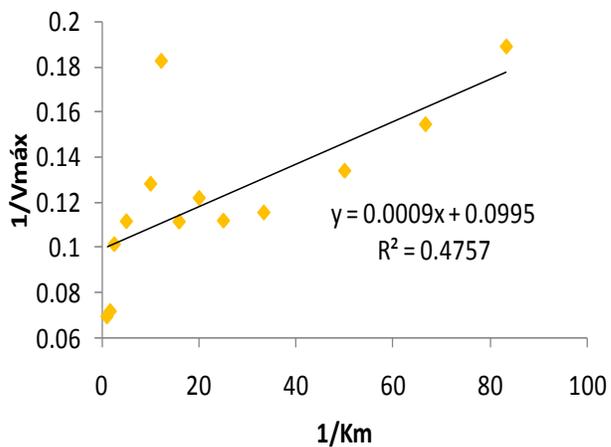
Ajuste Hanes plot



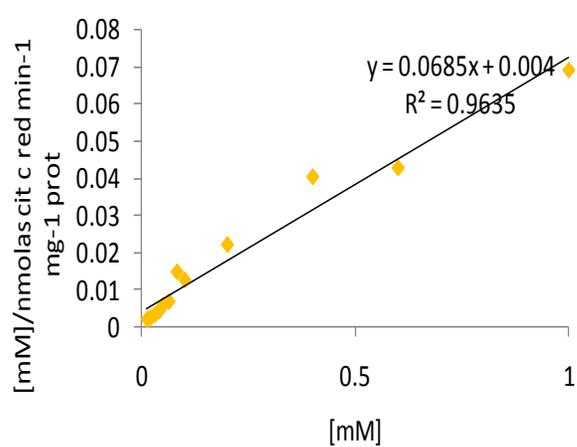
DBH 07/04/10
Ajuste Hill



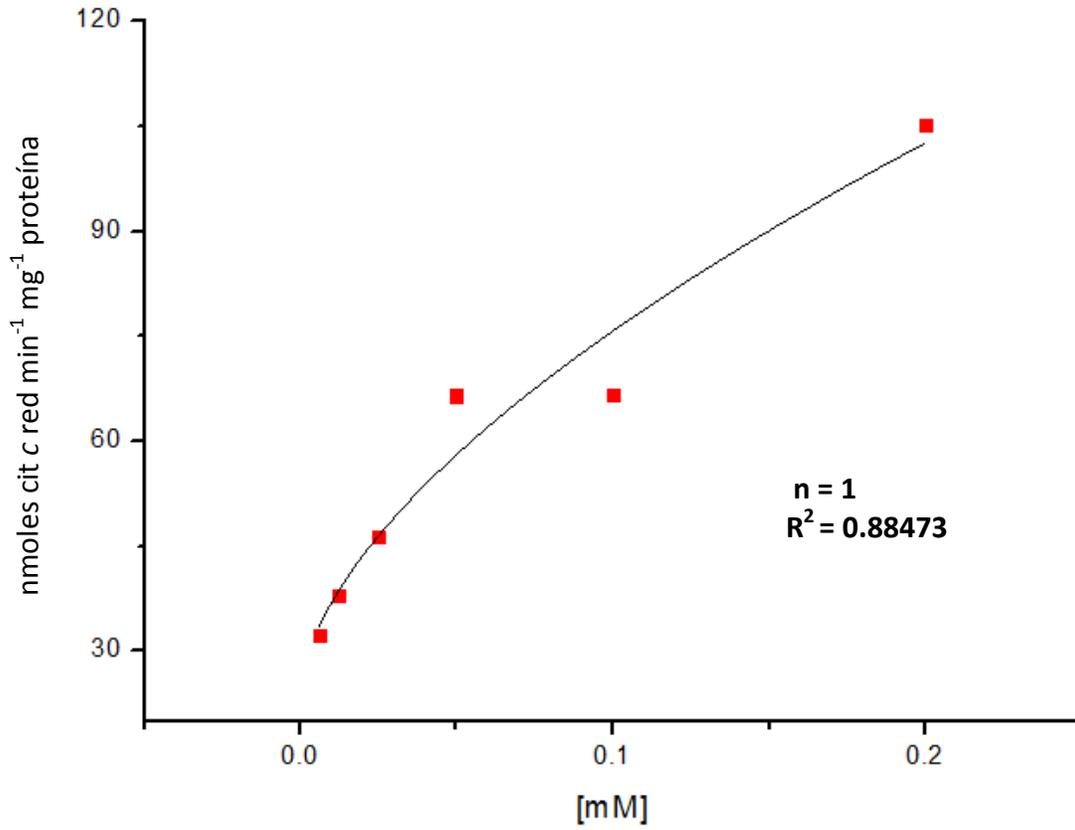
Ajuste Lineweaver-Burk



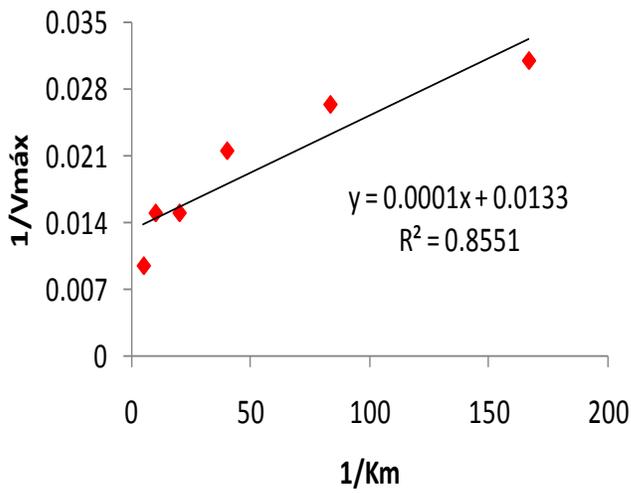
Ajuste Hanes plot



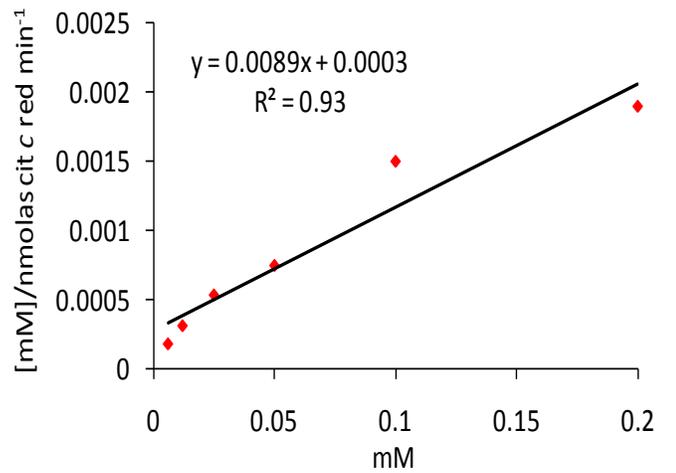
Menadiona 30/06/09
Ajuste Hill



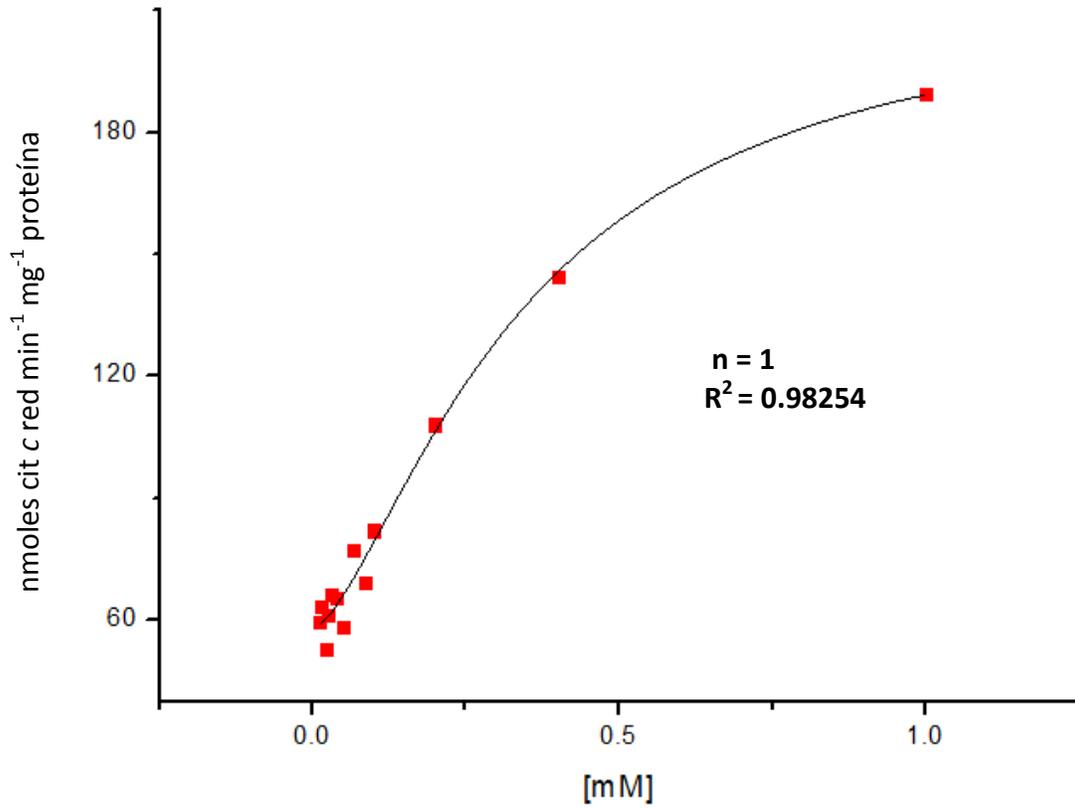
Ajuste Lineweaver-Burk



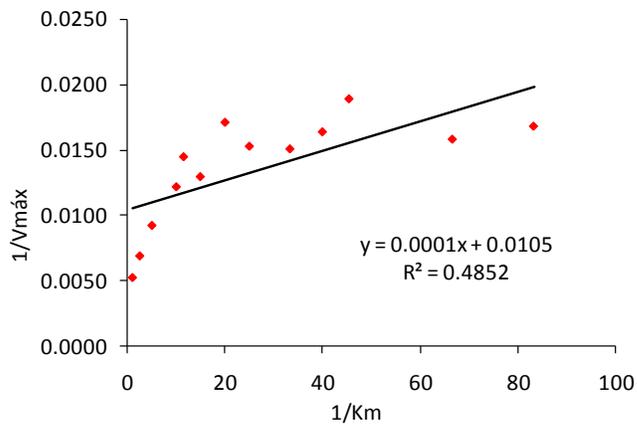
Ajuste Hanes plot



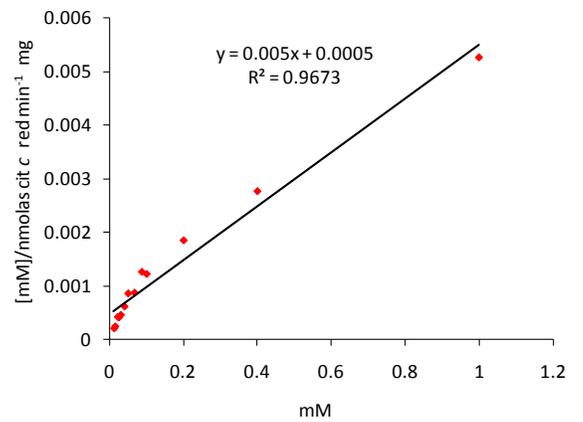
Menadiona 05/10/09
Ajuste Hill



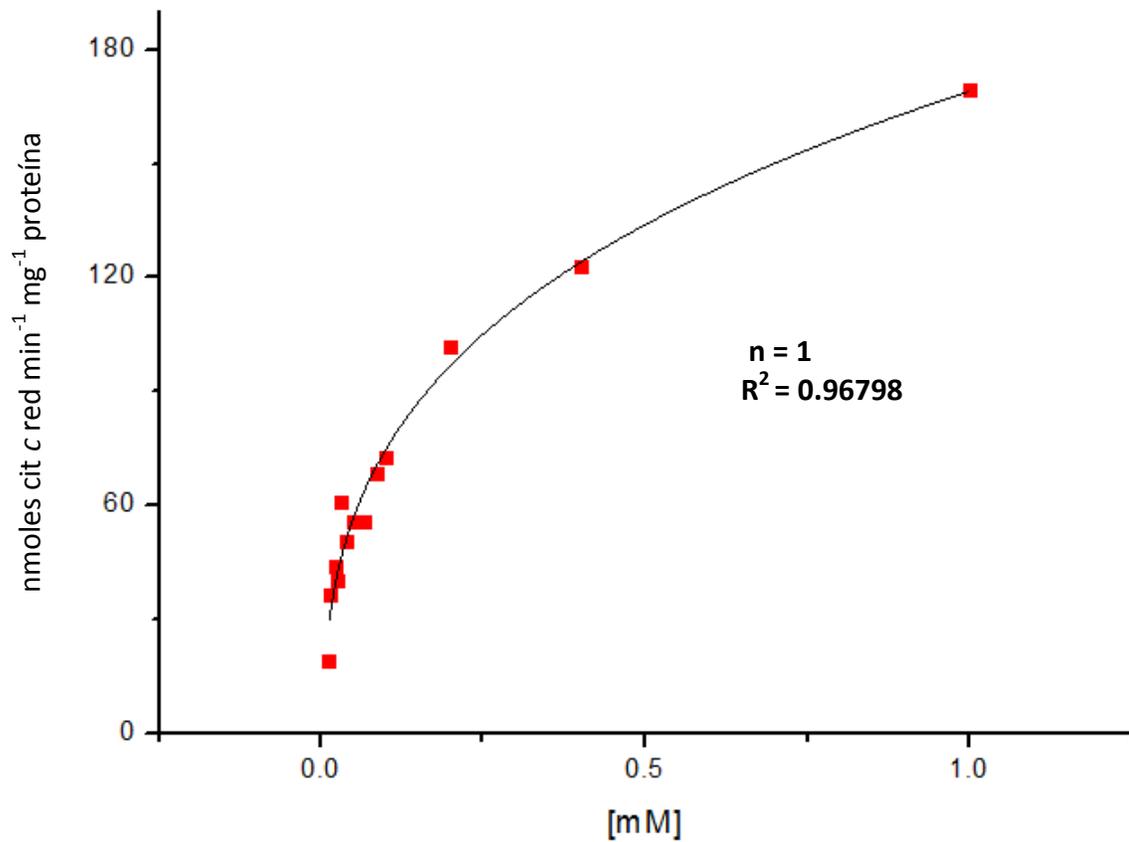
Ajuste Lineweaver-Burk



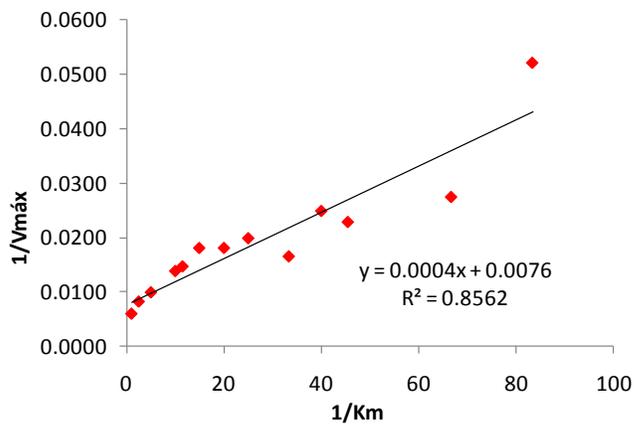
Ajuste Hanes plot



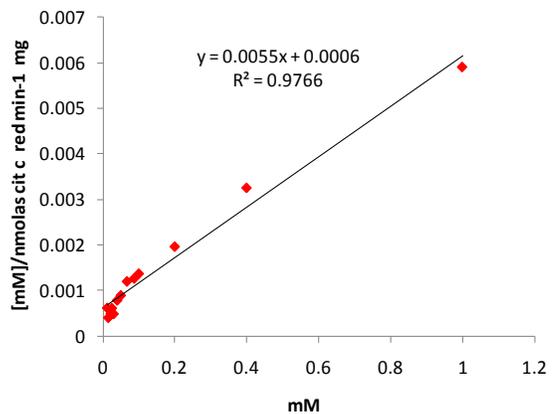
Menadiona 07/04/10
Ajuste Hill



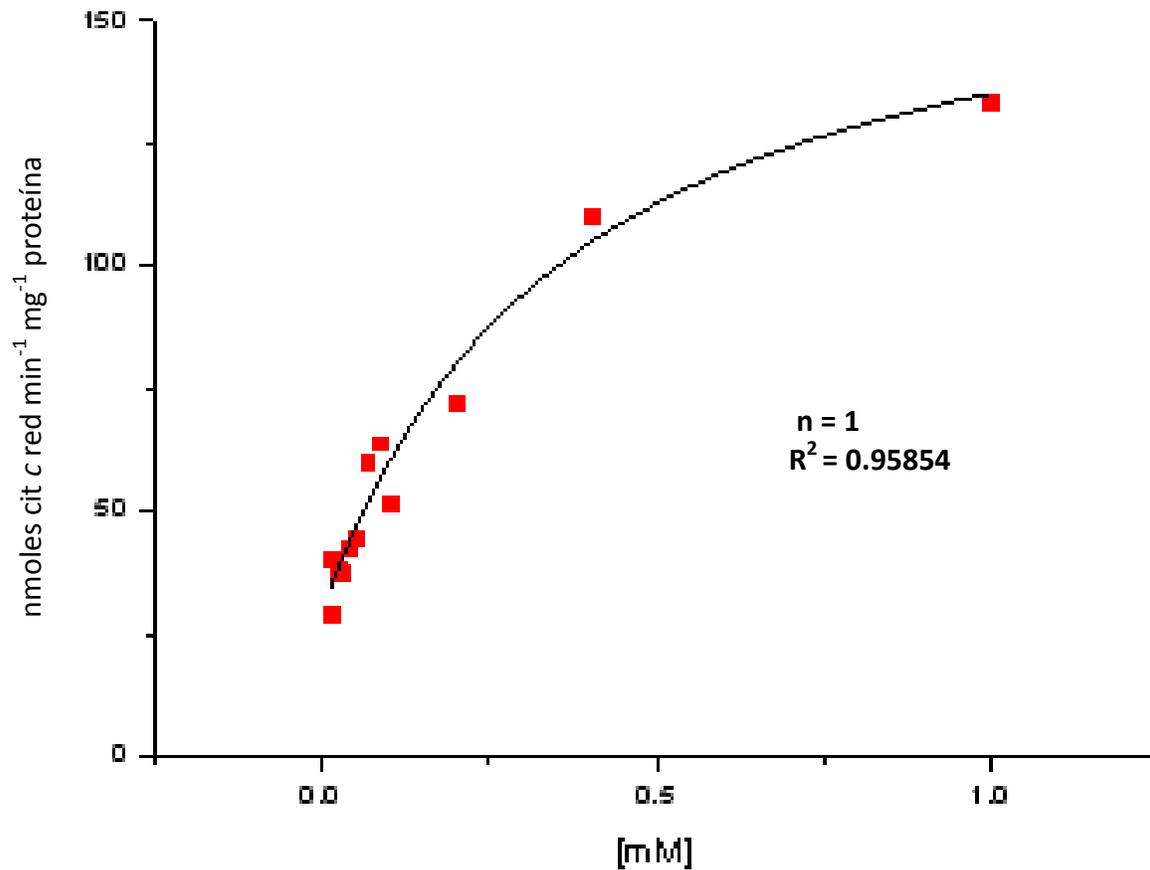
Ajuste Lineweaver-Burk



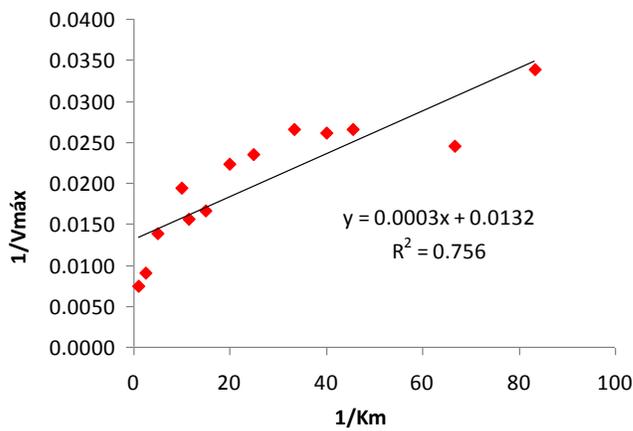
Ajuste Hanes plot



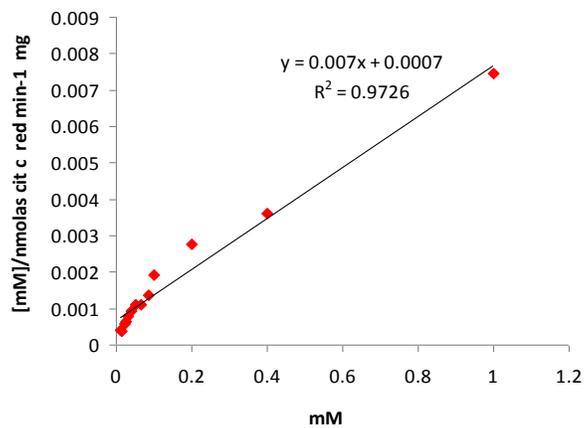
Menadiona 13/04/10
Ajuste Hill



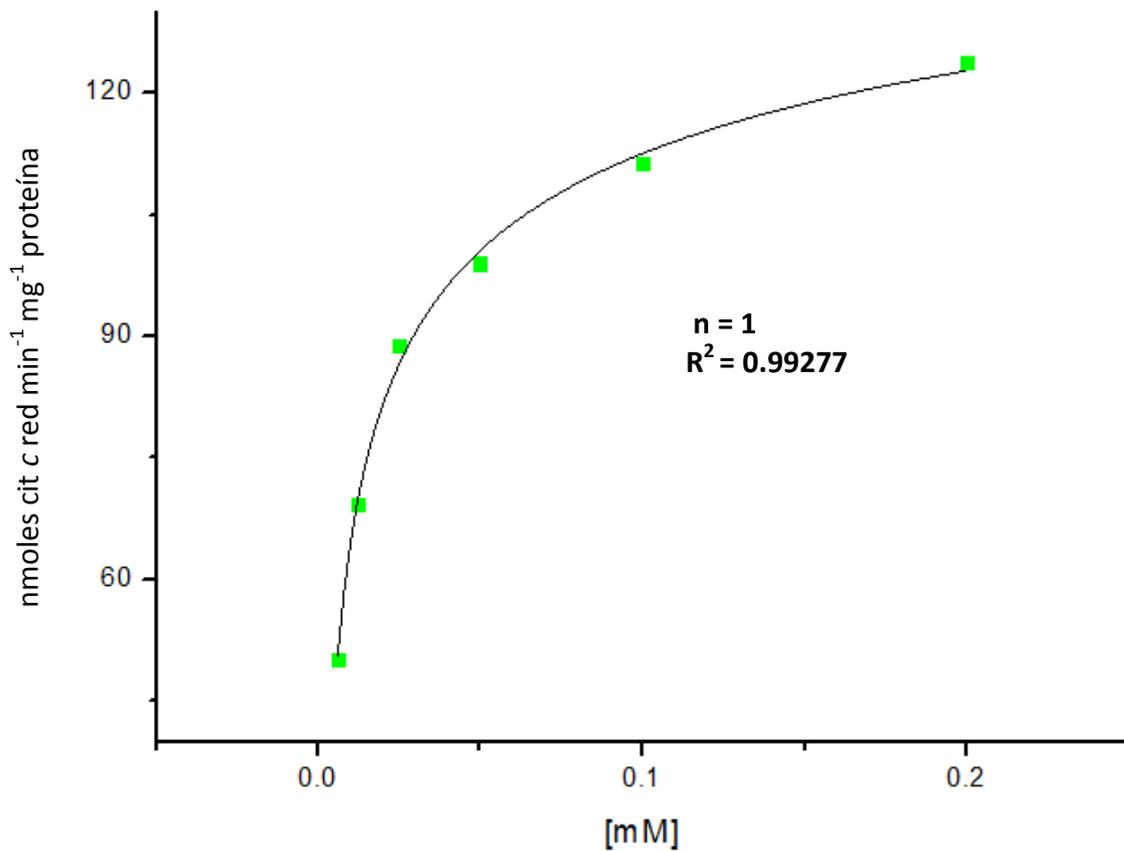
Ajuste Lineweaver-Burk



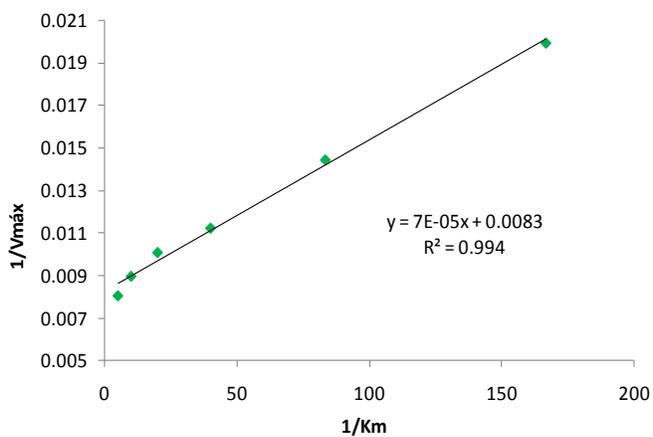
Ajuste Hanes plot



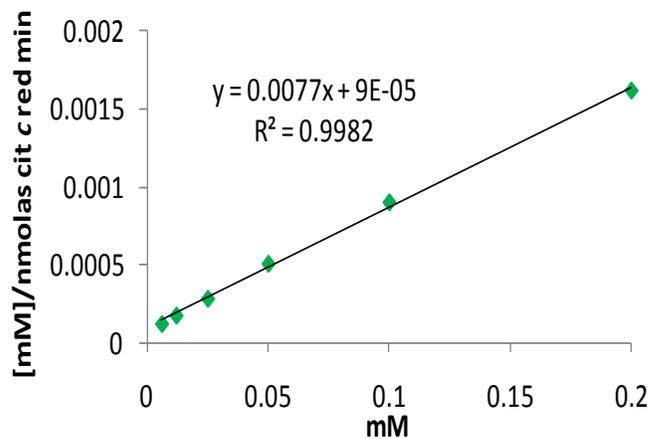
Naftazarina 30/06/09
Ajuste Hill



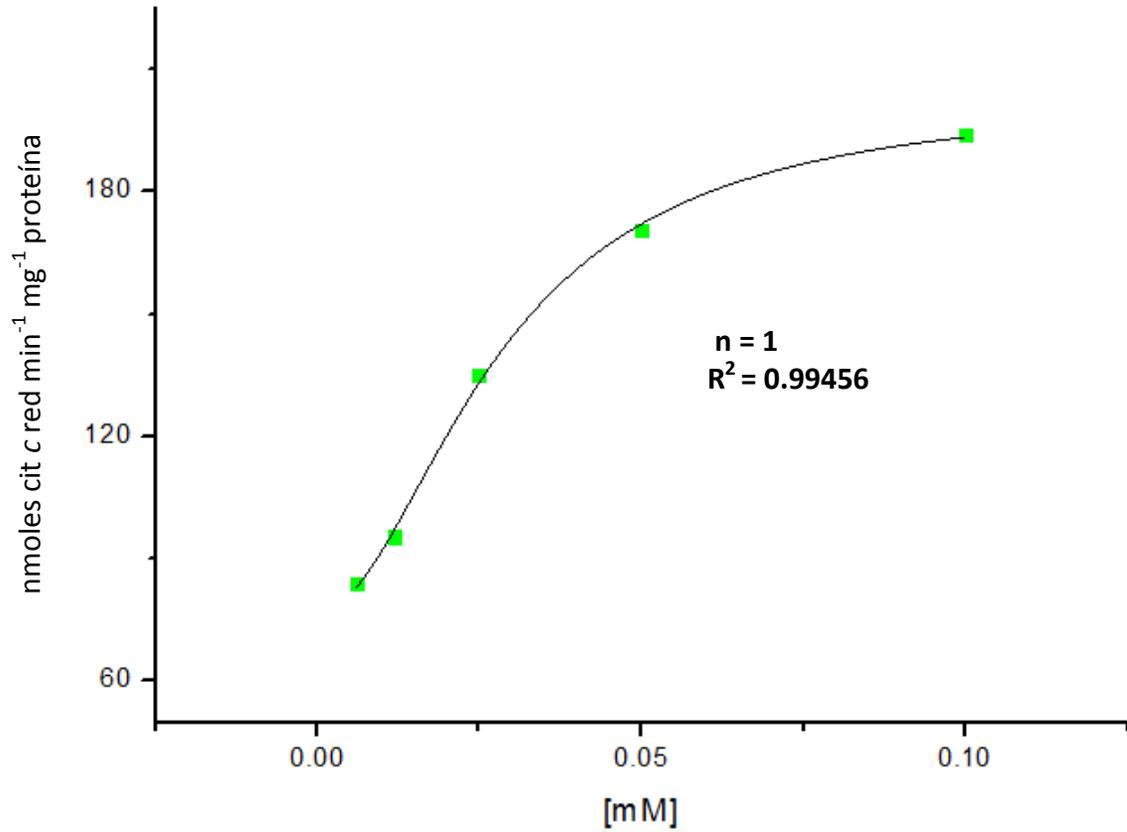
Ajuste Lineweaver-Burk



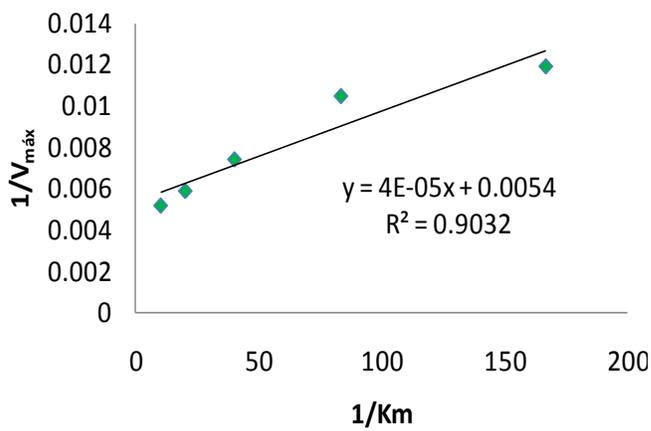
Ajuste Hanes plot



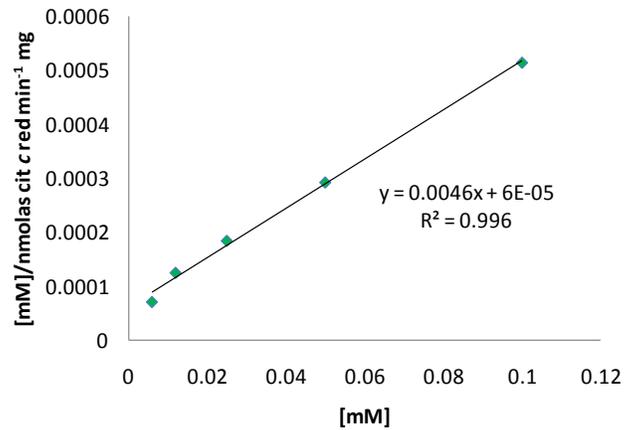
Naftazarina 10/08/09
Ajuste de Hill



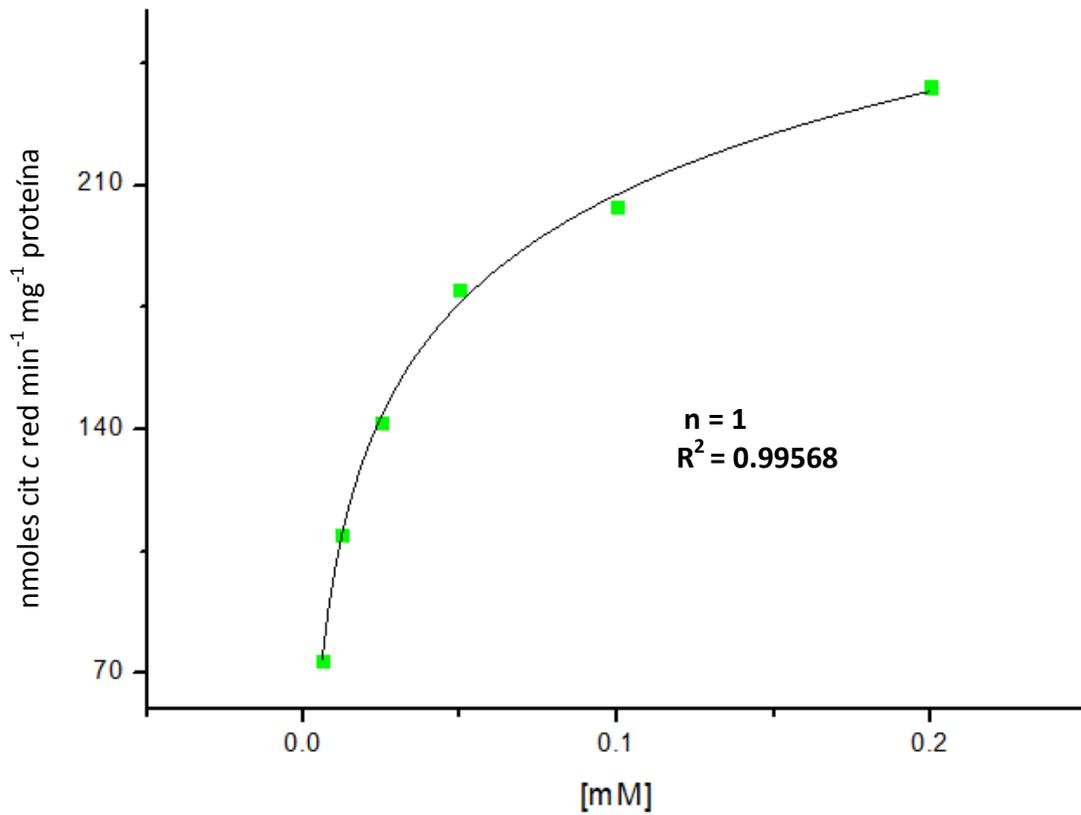
Ajuste Lineweaver-Burk



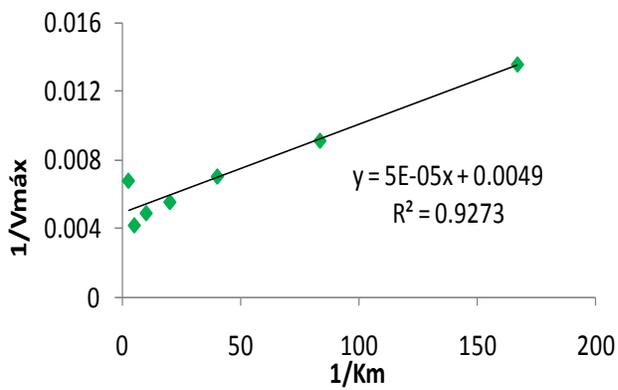
Ajuste Hanes plot



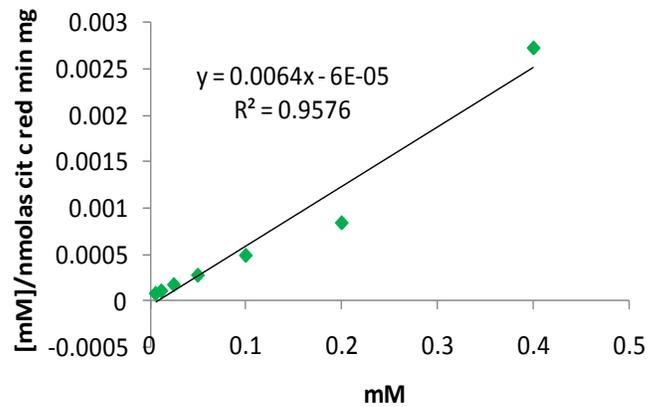
Naftazarina 26/08/09
Ajuste Hill



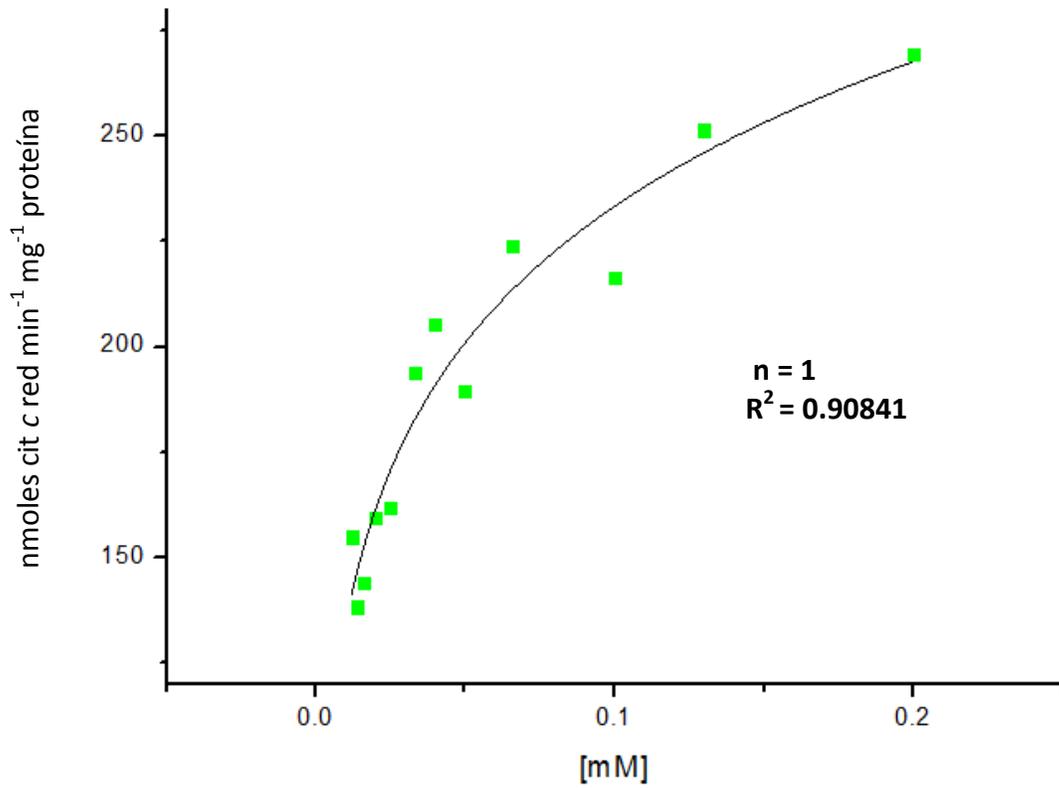
Ajuste Lineweaver-Burk



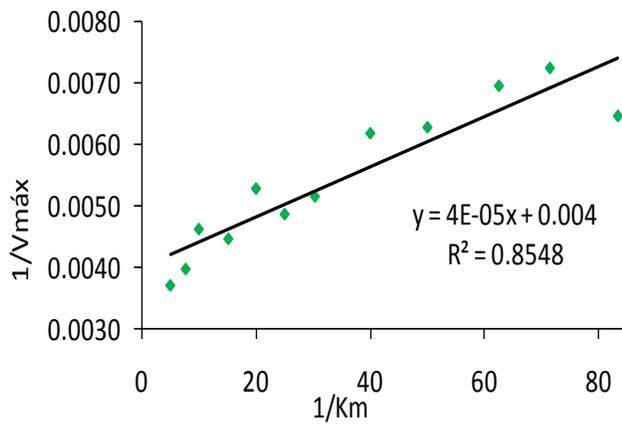
Ajuste Hanes plot



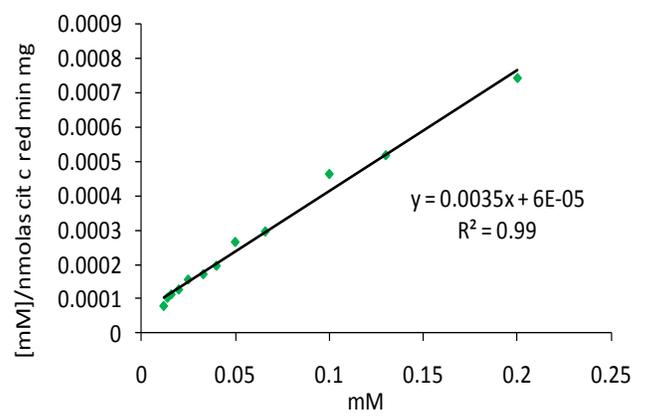
Naftazarina 08/09/09
Ajuste Hill



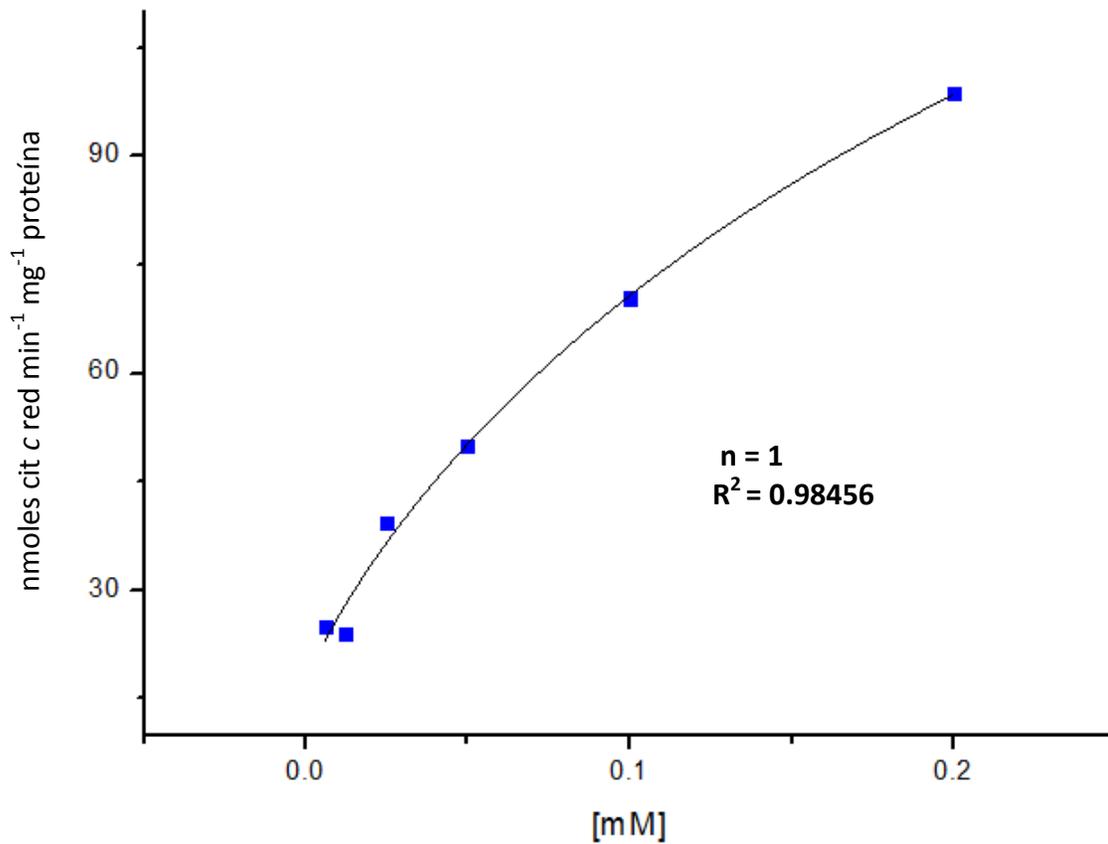
Ajuste Lineweaver-Burk



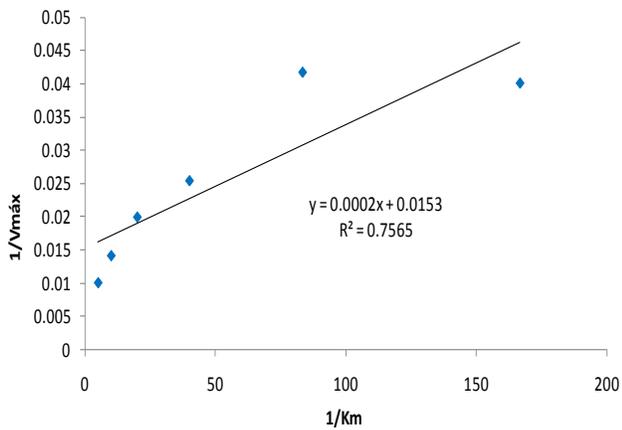
Ajuste Hanes plot



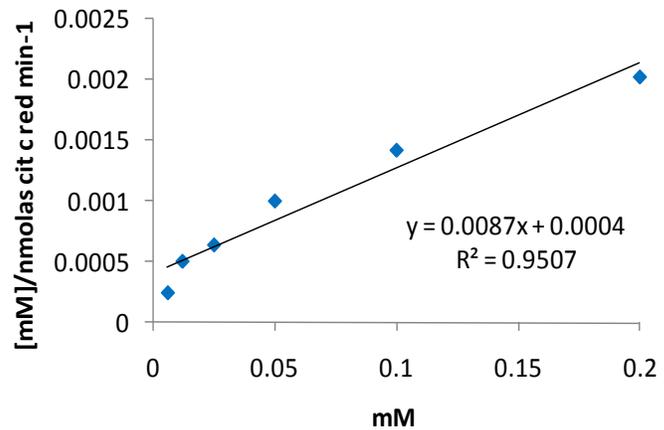
Juglona 30/06/09
Ajuste Hill



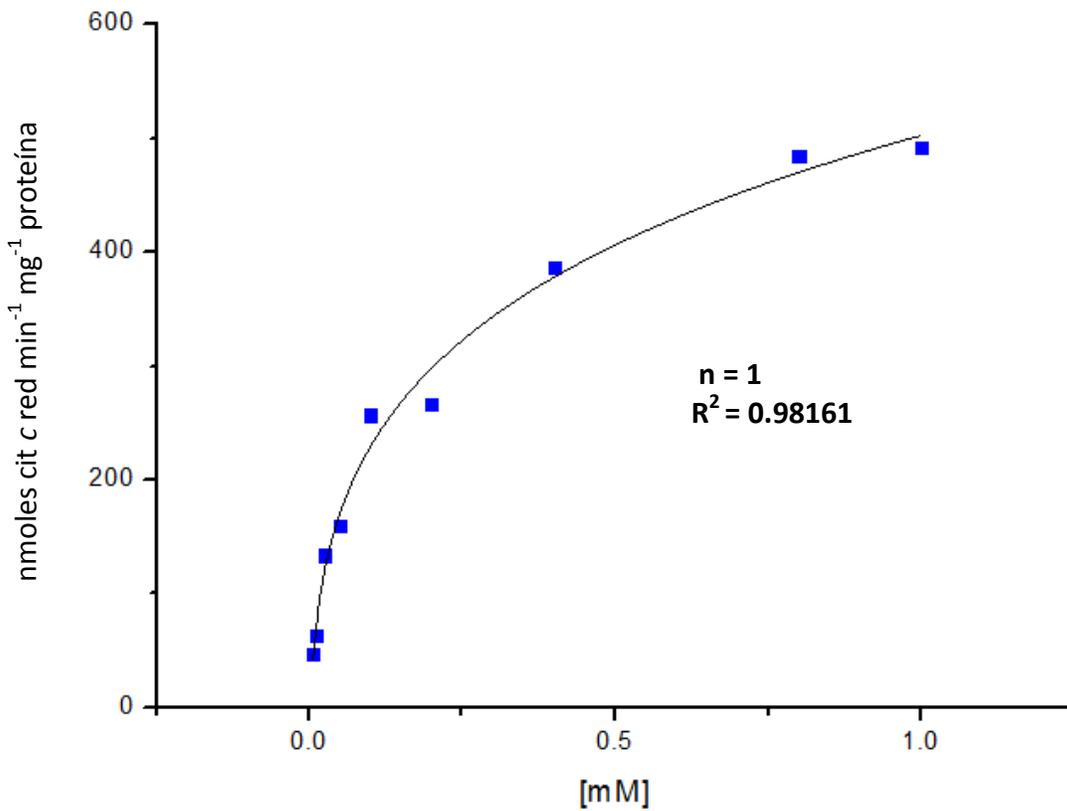
Ajuste Lineweaver- Burk



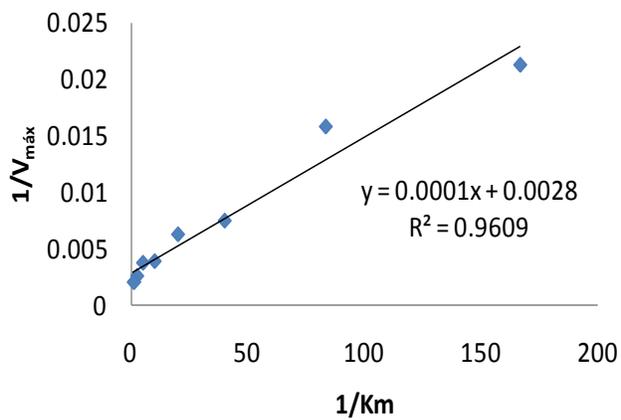
Ajuste Hanes plot



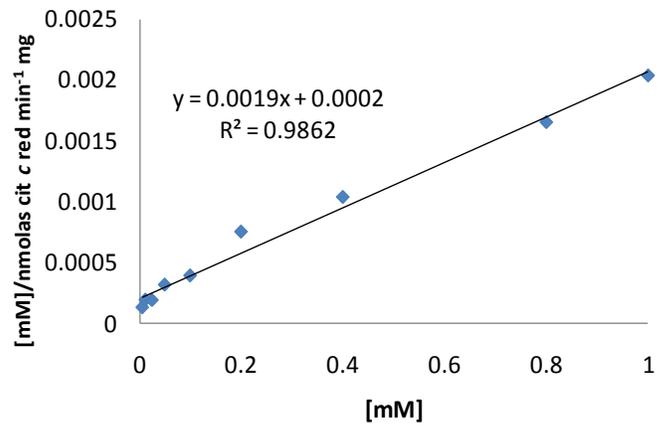
Juglona 10/08/09
Ajuste Hill



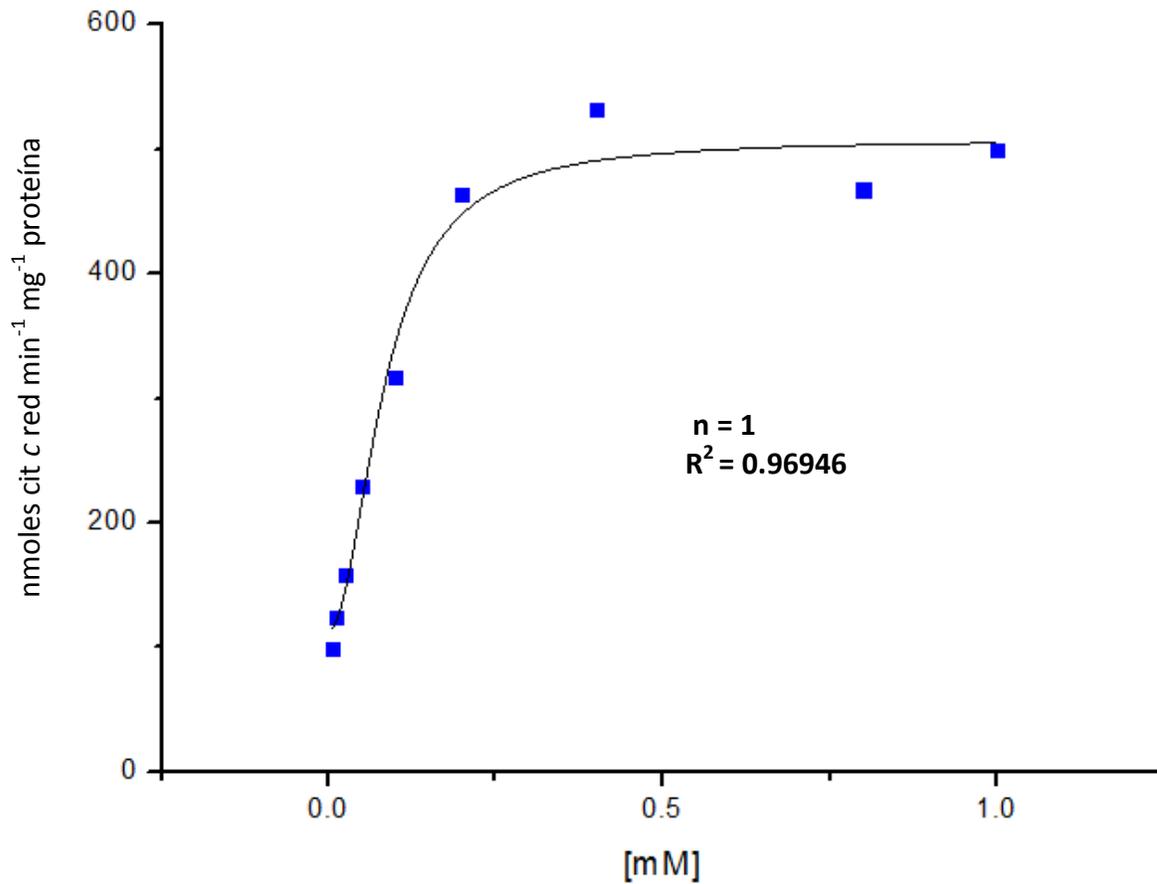
Ajuste Lineweaver-Burk



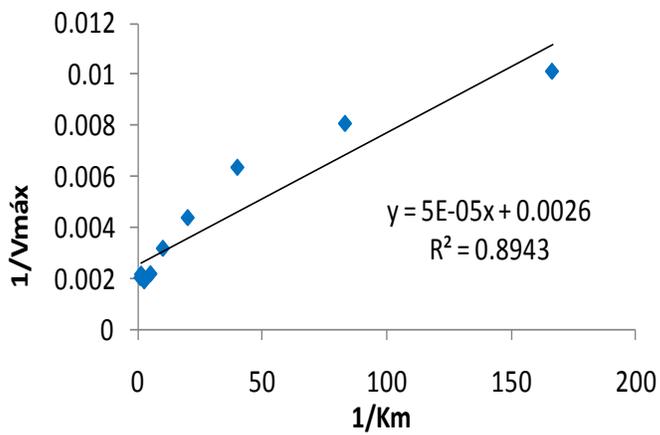
Ajuste Hanes plot



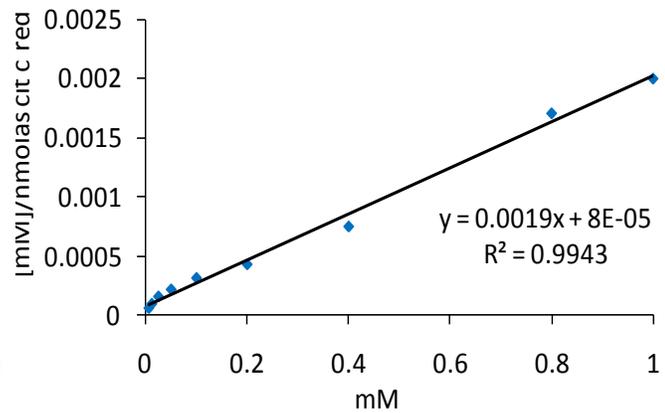
Juglona 26/08/09
Ajuste Hill



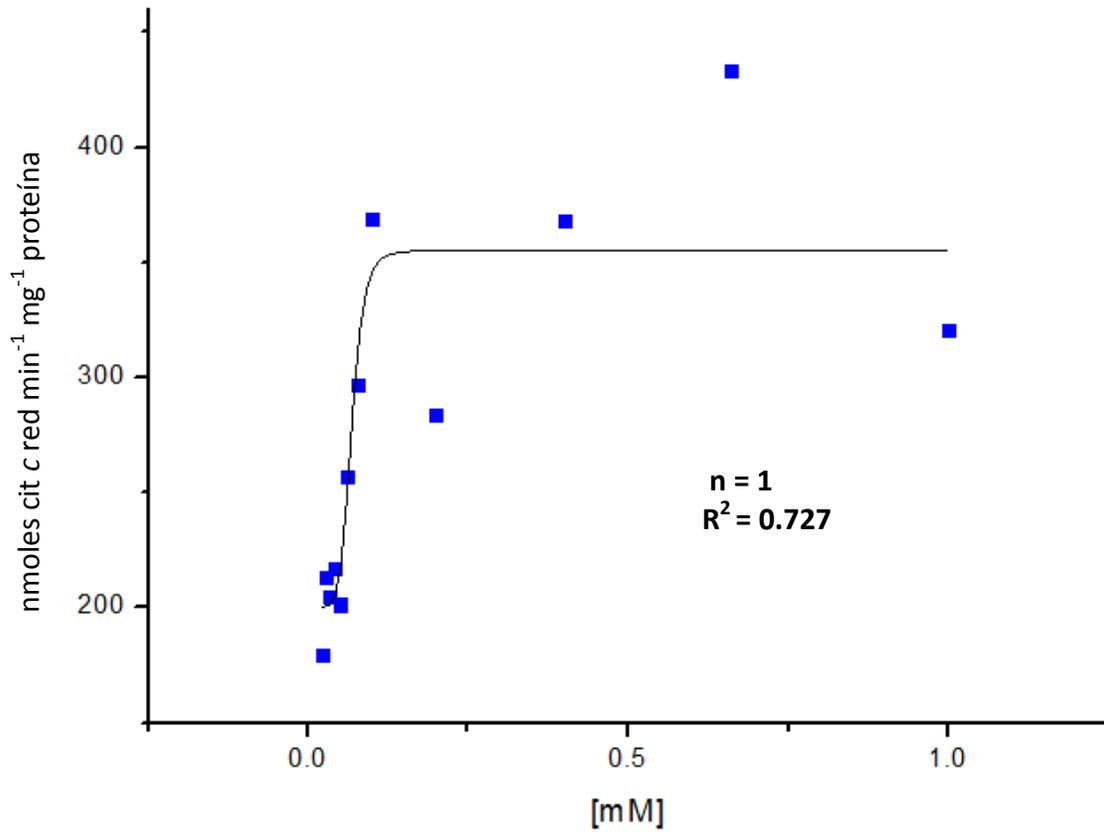
Ajuste Lineweaver-Burk



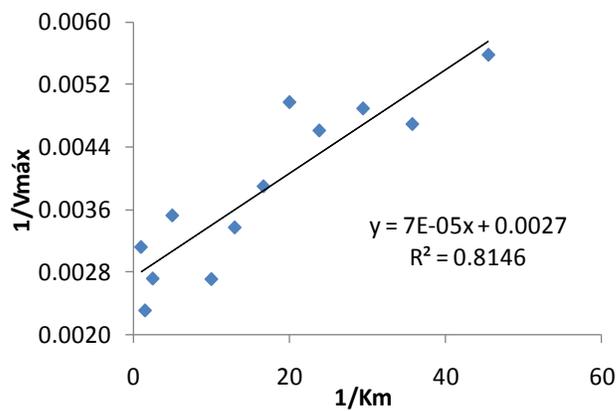
Ajuste Hanes plot



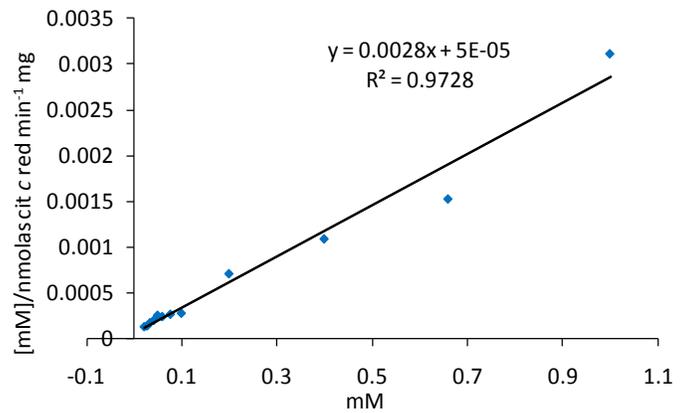
Juglona 02/09/09
Ajuste Hill



Ajuste Lineweaver-Burk



Ajuste Hanes plot



Referencias

- Azarkina,N., Siletsky,S., Borisov,V., von,W.C., Hederstedt,L., y Konstantinov,A.A. (1999). A cytochrome *bb'*-type quinol oxidase in *Bacillus subtilis* strain 168. J. Biol. Chem. 274, 32810-32817.
- Baniulis,D., Yamashita,E., Zhang,H., Hasan,S.S., y Cramer,W.A. (2008). Structure-function of the cytochrome *b₆f* complex. Photochem. Photobiol. 84, 1349-1358.
- Bengtsson,J., Rivolta,C., Hederstedt,L., y Karamata,D. (1999). *Bacillus subtilis* contains two small c-type cytochromes with homologous heme domains but different types of membrane anchors. J. Biol. Chem. 274, 26179-26184.
- Bergsma,J., Meihuizen,K.E., Van,O.W., y Konings,W.N. (1982a). Restoration of NADH oxidation with menaquinones y menaquinone analogues in membrane vesicles from the menaquinone-deficient *Bacillus subtilis* aroD. Eur. J. Biochem. 125, 651-657.
- Bergsma,J., Van Dongen,M.B., y Konings,W.N. (1982b). Purification y characterization of NADH dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. Eur. J. Biochem. 128, 151-157.
- Berry,E.A., Huang,L.S., Saechao,L.K., Pon,N.G., Valkova-Valchanova,M., y Daldal,F. (2004). X-Ray Structure of *Rhodobacter capsulatus* Cytochrome *bc* (1): Comparison with its Mitochondrial y Chloroplast Counterparts. Photosynth. Res. 81, 251-275.
- Bisschop,A. y Konings,W.N. (1976). Reconstitution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase activity with menadione in membrane vesicles from the menaquinone-deficient *Bacillus subtilis* aro D. Relation between electron transfer y active transport. Eur. J. Biochem. 67, 357-365.
- Bunai,K. y Yamane,K. (2005). Effectiveness y limitation of two-dimensional gel electrophoresis in bacterial membrane protein proteomics y perspectives. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 815, 227-236.
- Carroll,J., Fearnley,I.M., Skehel,J.M., Shannon,R.J., Hirst,J., y Walker,J.E. (2006). Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. J. Biol. Chem. 281, 32724-32727.
- Castellani,M., Covian,R., Kleinschroth,T., Anderka,O., Ludwig,B., y Trumpower,B.L. (2010). Direct demonstration of half-of-the-sites reactivity in the dimeric cytochrome *bc₁* complex: enzyme with one inactive monomer is fully active but unable to activate the second ubiquinol oxidation site in response to ligand binding at the ubiquinone reduction site. J. Biol. Chem. 285, 502-510.
- Castro,N. y Moreno,R. (2004). Biosíntesis del grupo hemo. REB. 23, 99-106.

Covian,R., Gutierrez-Cirlos,E.B., y Trumpower,B.L. (2004). Anti-cooperative oxidation of ubiquinol by the yeast cytochrome *bc₁* complex. *J. Biol. Chem.* 279, 15040-15049.

Covian,R., Kleinschroth,T., Ludwig,B., y Trumpower,B.L. (2007). Asymmetric binding of stigmatellin to the dimeric *Paracoccus denitrificans bc₁* complex: evidence for anti-cooperative ubiquinol oxidation and communication between center P ubiquinol oxidation sites. *J. Biol. Chem.* 282, 22289-22297.

de Vrij,W., van den Burg,B., y Konings,W.N. (1987). Spectral and potentiometric analysis of cytochromes from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 166, 589-595.

Dunphy,P.J., Phillips,P.G., y Brodie,A.F. (1971). Separation and identification of menaquinones from microorganisms. *J. Lipid Res.* 12, 442-449.

Farrand,S.K. y Taber,H.W. (1974). Changes in menaquinone concentration during growth and early sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 117, 324-326.

Fernandes,A.S., Konstantinov,A.A., Teixeira,M., y Pereira,M.M. (2005). Quinone reduction by *Rhodothermus marinus* succinate:menaquinone oxidoreductase is not stimulated by the membrane potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 565-570.

Garcia,L.M., Contreras-Zentella,M.L., Jaramillo,R., Benito-Mercade,M.C., Mendoza-Hernandez,G., del Arenal,I.P., Membrillo-Hernandez,J., y Escamilla,J.E. (2008). The succinate:menaquinone reductase of *Bacillus cereus*: characterization of the membrane-bound and purified enzyme. *Can. J. Microbiol.* 54, 456-466.

Gorbikova,E.A., Vuorilehto,K., Wikstrom,M., y Verkhovsky,M.I. (2006). Redox titration of all electron carriers of cytochrome *c* oxidase by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 45, 5641-5649.

Gupta,R.S. (2000). The natural evolutionary relationships among prokaryotes. *Crit Rev. Microbiol.* 26, 111-131.

Gutierrez-Cirlos,E.B. y Trumpower,B.L. (2002). Inhibitory analogs of ubiquinol act anti-cooperatively on the Yeast cytochrome *bc₁* complex. Evidence for an alternating, half-of-the-sites mechanism of ubiquinol oxidation. *J. Biol. Chem.* 277, 1195-1202.

Haakensen,M., Dobson,C.M., Deneer,H., y Ziola,B. (2008). Real-time PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 236-241.

Hagerhall,C., Aasa,R., von,W.C., y Hederstedt,L. (1992). Two hemes in *Bacillus subtilis* succinate:menaquinone oxidoreductase (complex II). *Biochemistry* 31, 7411-7421.

Hederstedt,L. (1986). Molecular properties, genetics, and biosynthesis of *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase complex. *Methods Enzymol.* 126, 399-414.

Hederstedt,L. (2002). Succinate:quinone oxidoreductase in the bacteria *Paracoccus denitrificans* and *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1553, 74-83.

Hederstedt,L. y Heden,L.O. (1989). New properties of *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase altered at the active site. The apparent active site thiol of succinate oxidoreductases is dispensable for succinate oxidation. *Biochem. J.* 260, 491-497.

Henning,W., Vo,L., Albanese,J., y Hill,B.C. (1995). High-yield purification of cytochrome *aa₃* and cytochrome *caa₃* oxidases from *Bacillus subtilis* plasma membranes. *Biochem. J.* 309 (Pt 1), 279-283.

Hollander,R. (1976). Correlation of the function of demethylmenaquinone in bacterial electron transport with its redox potential. *FEBS Lett.* 72, 98-100.

Hughes,L.M., Covian,R., Gribble,G.W., y Trumpower,B.L. (2010). Probing binding determinants in center P of the cytochrome *bc(1)* complex using novel hydroxynaphthoquinones. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 38-43.

Inouye,K., Mae,T., Kondo,S., y Ohkawa,H. (1999). Inhibitory effects of vitamin A and vitamin K on rat cytochrome P4501A1-dependent monooxygenase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 565-569.

Jaramillo,L.R., Suarez,P.I., Barraza,A.B., Lara,C.A., Teheran,S.L. y Escamilla,M.J., (2005). Efecto de análogos de quinonas sobre la respiración de *Eikenella corrodens*. 2, 25-28.

Johnson,M.K. (1998). Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 173-181.

Konings,W.N. y Freese,E. (1972). Amino acid transport in membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 247, 2408-2418.

Kurokawa,T. y Sakamoto,J. (2005). Purification and characterization of succinate:menaquinone oxidoreductase from *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 183, 317-324.

Lancaster,C.R. y Kroger,A. (2000). Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim. Biophys. Acta* 1459, 422-431.

Lemma,E., Hagerhall,C., Geisler,V., Brandt,U., von,J.G., y Kroger,A. (1991). Reactivity of the *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase complex with quinones. *Biochim. Biophys. Acta* 1059, 281-285.

Ljungdahl,P.O., Pennoyer,J.D., Robertson,D.E., y Trumpower,B.L. (1987). Purification of highly active cytochrome *bc₁* complexes from phylogenetically

diverse species by a single chromatographic procedure. *Biochim. Biophys. Acta* 891, 227-241.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., y RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Mansoorabadi, S.O., Thibodeaux, C.J., y Liu, H.W. (2007). The diverse roles of flavin coenzymes--nature's most versatile thespians. *J. Org. Chem.* 72, 6329-6342.

Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., y Tolbert, N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206-210.

Mitchell, P. (1977). Vectorial chemiosmotic processes. *Annu Rev Biochem* 46:996-1005.

Moreno-Campuzano, S., Janga, S.C., y Perez-Rueda, E. (2006). Identification and analysis of DNA-binding transcription factors in *Bacillus subtilis* and other Firmicutes--a genomic approach. *BMC. Genomics* 7, 147.

Nagata, T., Zharmukhamedov, S.K., Khorobrykh, A.A., Klimov, V.V., y Allakhverdiev, S.I. (2008). Reconstitution of the water-oxidizing complex in manganese-depleted photosystem II preparations using synthetic Mn complexes: a fluorine-19 NMR study of the reconstitution process. *Photosynth. Res.* 98, 277-284.

Nakano, M.M. y Zuber, P. (1998). Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 165-190.

Nelson, D. y Cox, M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth edition, Sarvier, 2005, 1130 págs.

Porwal, S., Lal, S., Cheema, S., y Kalia, V.C. (2009). Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in *Bacillus*. *PLoS. One.* 4, e4438.

Rivera, P.R., Juárez, O.E., Matus, O.M. y Pardo, J.P. (2005). Efecto de las quinonas sobre la NADH deshidrogenasa interna mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*. 1-7-

Rothery, R.A., Chatterjee, I., Kiema, G., McDermott, M.T., y Weiner, J.H. (1998). Hydroxylated naphthoquinones as substrates for *Escherichia coli* anaerobic reductases. *Biochem. J.* 332 (Pt 1), 35-41.

Rowland, B., Hill, K., Miller, P., Driscoll, J., y Taber, H. (1995). Structural organization of a *Bacillus subtilis* operon encoding menaquinone biosynthetic enzymes. *Gene* 167, 105-109.

Saddar, S., Dienhart, M.K., y Stuart, R.A. (2008). The F1F0-ATP synthase complex influences the assembly state of the cytochrome *bc₁*-cytochrome oxidase

supercomplex and its association with the TIM23 machinery. *J. Biol. Chem.* **283**, 6677-6686.

Santana,M., Kunst,F., Hullo,M.F., Rapoport,G., Danchin,A., y Glaser,P. (1992). Molecular cloning, sequencing, and physiological characterization of the *qox* operon from *Bacillus subtilis* encoding the *aa₃-600* quinol oxidase. *J. Biol. Chem.* **267**, 10225-10231.

Sass,A.M., McKew,B.A., Sass,H., Fichtel,J., Timmis,K.N., y McGenity,T.J. (2008). Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments. *Saline. Systems.* **4**, 8.

Sattley,W.M., Madigan,M.T., Swingley,W.D., Cheung,P.C., Clocksin,K.M., Conrad,A.L., Dejesa,L.C., Honchak,B.M., Jung,D.O., Karbach,L.E., Kurdoglu,A., Lahiri,S., Mastrian,S.D., Page,L.E., Taylor,H.L., Wang,Z.T., Raymond,J., Chen,M., Blankenship,R.E., y Touchman,J.W. (2008). The genome of *Heliobacterium modesticaldum*, a phototrophic representative of the Firmicutes containing the simplest photosynthetic apparatus. *J. Bacteriol.* **190**, 4687-4696.

Schnorpfel,M., Janausch,I.G., Biel,S., Kroger,A., y Unden,G. (2001). Generation of a proton potential by succinate dehydrogenase of *Bacillus subtilis* functioning as a fumarate reductase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3069-3074.

Schoepp-Cothenet,B., Lieutaud,C., Baymann,F., Vermeiglio,A., Friedrich,T., Kramer,D.M., y Nitschke,W. (2009). Menaquinone as pool quinone in a purple bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 8549-8554.

Schutz,M., Brugna,M., Lebrun,E., Baymann,F., Huber,R., Stetter,K.O., Hauska,G., Toci,R., Lemesle-Meunier,D., Tron,P., Schmidt,C., y Nitschke,W. (2000). Early evolution of cytochrome *bc* complexes. *J. Mol. Biol.* **300**, 663-675.

Setlow,B., Melly,E., y Setlow,P. (2001). Properties of spores of *Bacillus subtilis* blocked at an intermediate stage in spore germination. *J. Bacteriol.* **183**, 4894-4899.

Smith,J.L., Zhang,H., Yan,J., Kurisu,G., y Cramer,W.A. (2004). Cytochrome *bc* complexes: a common core of structure and function surrounded by diversity in the outlying provinces. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 432-439.

Snyder,C. y Trumpower,B.L. (1998). Mechanism of ubiquinol oxidation by the cytochrome *bc₁* complex: pre-steady-state kinetics of cytochrome *bc₁* complexes containing site-directed mutants of the Rieske iron-sulfur protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 125-134.

Snyder,C.H., Gutierrez-Cirlos,E.B., y Trumpower,B.L. (2000). Evidence for a concerted mechanism of ubiquinol oxidation by the cytochrome *bc₁* complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 13535-13541.

Snyder,C.H., Merbitz-Zahradnik,T., Link,T.A., y Trumpower,B.L. (1999). Role of the Rieske iron-sulfur protein midpoint potential in the protonmotive Q-cycle mechanism of the cytochrome *bc₁* complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 235-242.

Thony-Meyer,L. (1997). Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 337-376.

Tielens,A.G., Rotte,C., van Hellemond,J.J., y Martin,W. (2002). Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* 27, 564-572.

Trumpower,B.L. (1990a). Cytochrome *bc₁* complexes of microorganisms. *Microbiol. Rev.* 54, 101-129.

Trumpower,B.L. (1990b). The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome *bc₁* complex. *J. Biol. Chem.* 265, 11409-11412.

Tuminello,P.S., Arakawa,E.T., Khare,B.N., Wrobel,J.M., Querry,M.R., y Milham,M.E. (1997). Optical properties of *Bacillus subtilis* spores from 0.2 to 2.5 μm . *Appl. Opt.* 36, 2818-2824.

Villalba,J.M., Navarro,F., Cordoba,F., Serrano,A., Arroyo,A., Crane,F.L., y Navas,P. (1995). Coenzyme Q reductase from liver plasma membrane: purification and role in trans-plasma-membrane electron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 4887-4891.

Volker,U. y Hecker,M. (2005). From genomics via proteomics to cellular physiology of the Gram-positive model organism *Bacillus subtilis*. *Cell Microbiol.* 7, 1077-1085.

Woese,C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.

Wolf,M., Muller,T., Dandekar,T., y Pollack,J.D. (2004). Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma* (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 871-875.

Yamashita,E., Zhang,H., y Cramer,W.A. (2007). Structure of the cytochrome *b₆f* complex: quinone analogue inhibitors as ligands of heme cn. *J. Mol. Biol.* 370, 39-52.

Yu,J., Hederstedt,L., y Piggot,P.J. (1995). The cytochrome *bc* complex (menaquinone:cytochrome *c* reductase) in *Bacillus subtilis* has a nontraditional subunit organization. *J. Bacteriol.* 177, 6751-6760.

Yu,J. y Le Brun,N.E. (1998). Studies of the cytochrome subunits of menaquinone:cytochrome *c* reductase (*bc* complex) of *Bacillus subtilis*. Evidence for the covalent attachment of heme to the cytochrome *b* subunit. *J. Biol. Chem.* 273, 8860-8866.