



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**Análisis de la solubilización de membranas  
de *Bacillus subtilis* para una purificación  
parcial del complejo  $b_6c$**

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de Biólogo

PRESENTA:

PICÓN GARRIDO GERARDO IGNACIO

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid

México, Estado de México, Octubre, 2012





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

Agradecimientos especiales para:

DGAPA-PAPIIT por el donativo al proyecto 1N221611.

CONACYT por el donativo al proyecto 102102.

Nuevamente al CONACY por el apoyo de la beca de asistente de proyecto.

A la Doctora Emma Berta Gutiérrez Cirlos-Madrid y a la Maestra en ciencias Tecilli Cabellos Avelar por enseñarme a trabajar y principalmente por enseñarme a pensar y a comprender.

Gracias a mis padres Juan Gerardo Picón González y María de la Cruz Virginia Garrido Estrada por apoyarme a lo largo de todos mis estudios.

A mis hermanos Andrea y Leonardo por apoyarme y ser un incentivo para alcanzar mis metas, para poder llegar a ser un ejemplo para ellos.

A toda mi familia por siempre estar detrás de mí. A mi abuelita Celia por darme los consejos y la fuerza para seguir adelante. A mi prima Lili que ha sido una de mis más cercanas amigas y una de las personas por las cuales terminé en esta carrera je.

A mis amigos, Hugo, Foxo, Roy, Omar. A Emmanuel por ser mi amigo en las buenas pero sobretodo en las malas, que aunque muchas veces nos hemos sentido con el mundo encima siempre decimos una tontería y nos vamos riendo.

A todos mis compañeros y amigos a lo largo de mi carrera.

A mis compañeros de laboratorio, Tecilli, Led, Víctor, César, Edisa, Irlanda, Juan Carlos, Obed. A Ana (=3) por apoyarme tanto, enseñarme tantas cosas y mostrarme lo que significa el cariño y el respeto hacia una persona.



## Dedicatorias

Este trabajo lo dedico principalmente a mis padres, porque por ellos soy lo que soy y por ellos llegaré muy alto. A mi madre por inculcarme el alcanzar mis metas siempre teniendo en mente el respeto y la nobleza hacia los demás y a mi padre por enseñarme el valor del trabajo duro y la honestidad.

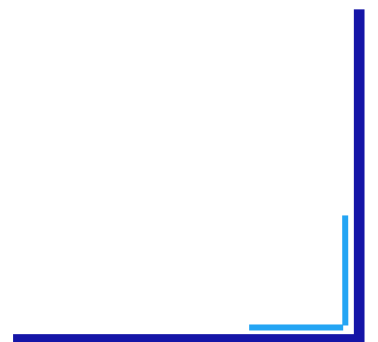
## Índice

Índice de figuras.....	VIII
Índice de tablas.....	X
Lista de Abreviaturas.....	XII
Resumen.....	1
Introducción.....	3
1. Cadena respiratoria.....	3
1.1 Grupos redox.....	3
1.2 Complejos respiratorios.....	5
1.3 Cadenas respiratorias bacterianas.....	6
2. <i>Bacillus subtilis</i> .....	8
2.1 Cadena respiratoria de <i>B. subtilis</i> .....	10
3. Complejos tipo <i>bc</i> .....	15
3.1 Complejos tipo <i>bc</i> <sub>1</sub> .....	15
3.2 Complejos tipo <i>b</i> <sub>6</sub> <i>f</i> .....	16
3.3 Complejo tipo <i>b</i> <sub>6</sub> <i>c</i> de <i>Bacillus subtilis</i> .....	17
4. Utilización de detergentes para aislar proteínas de membrana.....	19
5. Purificación de los complejos <i>bc</i> .....	21
Antecedentes.....	23
Antecedentes directos.....	23
Hipótesis.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos particulares.....	24

Materiales y métodos.....	25
1. Crecimiento de las células de <i>B. subtilis</i> .....	25
2. Cosecha de cultivos saturados de <i>B. subtilis</i> .....	25
3. Obtención de membranas.....	25
4. Solubilización con Dodecil maltósido (DDM) /g proteína.....	26
5. Diálisis de la muestra.....	27
6. Cromatografía de intercambio iónico.....	27
7. Obtención de espectros de absorción.....	28
8. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.....	28
9. Geles de poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Litio (LiDS).....	29
10. Geles claros nativos de alta resolución (primera dimensión).....	30
11. Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS).....	30
12. Tinción de geles con tetrametil bencidina (TMBZ).....	31
13. Tinción con azul de Coomasie.....	31
14. Tinción con nitrato de plata.....	31
15. Medición de actividades enzimáticas.....	32
16. Medición del consumo de oxígeno por el método de oximetría.....	32
Resultados.....	34
1. Crecimiento de las células de <i>Bacillus subtilis</i> .....	34
2. Espectros de absorción de membranas.....	34
3. Solubilización de membranas con diferentes proporciones de DDM/mg de proteína de membrana. Análisis por espectros diferenciales de absorción de las fracciones obtenidas de la solubilización.....	35

4. Cromatografía de intercambio iónico con la resina DEAE-Biogel A.....	41
4.1 Análisis de las fracciones obtenidas de la cromatografía.....	43
4.2 Fracción I.....	46
4.3 Fracción II.....	49
4.4 Fracción III.....	53
4.5 Fracción IV.....	55
4.6 Fracción V.....	57
4.7 Fracción VI.....	59
5. Cromatografía de la fracción IV (DEAE-Biogel A) en una columna DEAE-Toyopearl.....	61
5.1 Análisis de las fracciones obtenidas de la cromatografía con DEAE-Toyopearl....	62
5.2 Fracción I.....	63
5.3 Fracción II.....	69
5.4 Fracción III.....	73
6. Cromatografía de las fracciones 5 y 6 (DEAE-Biogel A) en la cromatografía DEAE-Toyopearl.....	77
6.1 Análisis de las fracciones obtenidas de la cromatografía con DEAE-Toyopearl.....	79
6.2 Fracción I.....	79
6.3 Fracción II.....	87
6.4 Fracción III.....	92
Discusión.....	99
1. Obtención de células, membranas y espectros diferenciales de <i>Bacillus subtilis</i> .....	99
2. Solubilización de las membranas con el detergente DDM.....	100

3. Fracciones de la cromatografía con DEAE-Biogel A.....	100
4. Cromatografía DEAE-Toyopearl para la Fracción IV (DEAE-Biogel A).....	104
5. Cromatografía DEAE-Toyopearl para la Fracción V y 6 (DEAE-Biogel A).....	105
Conclusiones.....	107
Referencias.....	108

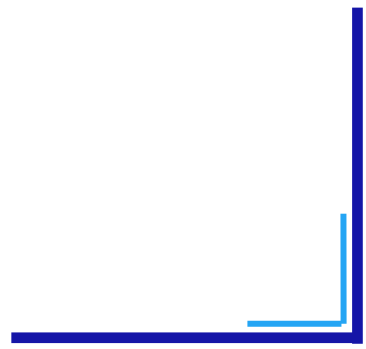




## Índice figuras

Figura 1.....	4
Figura 2.....	6
Figura 3.....	11
Figura 4.....	12
Figura 5.....	17
Figura 6.....	17
Figura 7.....	19
Figura 8.....	35
Figura 9.....	37
Figura 10.....	42
Figura 11.....	42
Figura 12.....	46
Figura 13.....	49
Figura 14.....	51
Figura 15.....	55
Figura 16.....	57
Figura 17.....	59
Figura 18.....	61
Figura 19.....	62
Figura 20.....	67
Figura 21.....	71
Figura 22.....	75

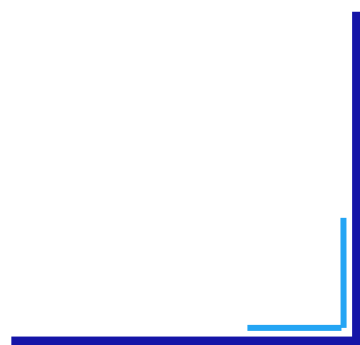
Figura 23.....	78
Figura 24.....	84
Figura 25.....	89
Figura 26.....	95



## Índice tablas

Tabla 1.....	9
Tabla 2.....	28
Tabla 3.....	34
Tabla 4.....	35
Tabla 5.....	40
Tabla 6.....	43
Tabla 7.....	44
Tabla 8.....	44
Tabla 9.....	47
Tabla 10.....	47
Tabla 11.....	48
Tabla 12.....	62
Tabla 13.....	64
Tabla 14.....	64
Tabla 15.....	64
Tabla 16.....	65
Tabla 17.....	65
Tabla 18.....	66
Tabla 19.....	78
Tabla 20.....	80
Tabla 21.....	80
Tabla 22.....	81

Tabla 23.....	81
Tabla 24.....	81
Tabla 25.....	82
Tabla 26.....	83



## Lista de Abreviaturas

ADP - Adenosín difosfato

AEBSF – 4-(2-Aminoetil) benceno sulfonilo fluoruro clorhidrato

ATP – Adenosín trifosfato

*B. subtilis* – *Bacillus subtilis*

CAT – Ciclo del ácido tricarboxílico

Cit - Citocromo

CMC – Concentración micelar critica

DBH<sub>2</sub> – Decil hidroxiquinol

DCPIP – 2,6-Diclorofenol indofenol

DDM – Dodecil-β-D-maltósido

DEAE - Dietilaminoetil

DH - Deshidrogenasa

Dit - Ditionita

DTT - Ditionitro

DQ – Decil ubiquinona

EDTA - Ácido etilendiamino tetra acético

FAD - Flavín adenín dinucleótido

LiDS - Dodecil Sulfato de Litio

MK-7 – Menaquinona-7

MSR – Medio súper rico

NAD - Dinucleótido de nicotinamida y adenina

NDH – Nitrato deshidrogenasa

Oxi - Oxidado

PDCs – Complejo proteína-detergente soluble en agua

PM – Peso molecular

Red - Reducido

SAB – Suero de albúmina de bovino

SDH – Succinato deshidrogenasa

SDS – Dodecil sulfato de sodio

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

TMBZ – 3,3',5,5'-Tetrametil benzidina

TMPD - Tetrametil-p-fenilendiamina

TTFA - tenoiltrifluoroacetona

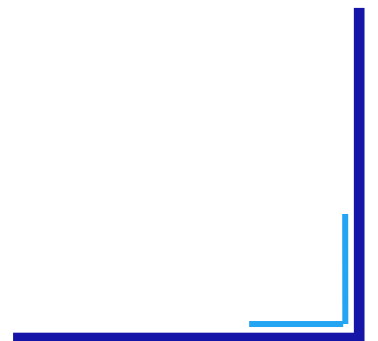
U - Unidades

## Resumen

La bacteria gram positiva *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de crecer aeróbica, pero también anaeróbicamente utilizando nitrato o nitrito como aceptores terminales de electrones o por fermentación. Su cadena respiratoria consta de una NADH deshidrogenasa (NDH Tipo 2), una succinato deshidrogenasa y una glicerol fosfato deshidrogenasa que transfieren sus electrones a una poza intermembranal de menaquinona-7. Esta poza de menaquinona-7 puede ser oxidada aeróbicamente por varias quinol oxidasas, o por la citocromo *c* oxidasa *caa*<sub>3</sub> vía el complejo menaquinol:citocromo *c* oxidoreductasa, o complejo *b*<sub>6</sub>*c* y dos citocromos *c*, un citocromo *c*<sub>550</sub> que se cree ayuda al paso de los electrones entre el *b*<sub>6</sub>*c* y la *caa*<sub>3</sub>, y un citocromo *c*<sub>551</sub> del cual no se conoce su función aún, ambos unidos a la membrana (Yu y cols., 1995, Azarkina y cols., 1999). El complejo tipo *b*<sub>6</sub>*c* de esta bacteria es de particular interés porque tiene características semejantes a los complejos fotosintéticos tipo *b*<sub>6</sub>*f*, aunque este no sea fotosintético. El complejo está codificado en un sólo operón, *qcrABC*. El citocromo *b* está escindido en los genes *qcrB* y *qcrC* y por tanto es un citocromo tipo *b*<sub>6</sub>. La subunidad III (QcrC) está fusionada a un citocromo tipo *c* pequeño en la región carboxilo terminal. La secuencia de aminoácidos del citocromo tipo *b*<sub>6</sub> muestra una cisteína en la posición 43 que corresponde a la cisteína 35 que une al hemo *x* (*c*<sub>i</sub>) en cloroplastos y cianobacterias (Yu y Le Brun, 1998). El complejo de *B. subtilis* es semejante a los fotosintéticos pero pertenece al grupo de las proteínas Fierro-Azufre (PFA) de bajo potencial redox y que utiliza naftoquinonas de bajo potencial redox. El complejo *b*<sub>6</sub>*c* aún no ha sido purificado y por tanto aún no se conoce del todo su estructura y función.

En este trabajo se planteó el análisis de la solubilización de membranas de *Bacillus subtilis* con el detergente sintético no iónico dodecil maltósido (DDM) a una relación detergente/proteína de 1.5mg DDM/mg proteína membranal, y 0.1 M de NaCl. En este paso, se extrajo el 80% del citocromo *b* en el sobrenadante, el cual se utilizó como un indicador del complejo *b*<sub>6</sub>*c*. Se realizó una cromatografía de intercambio iónico, donde se purificó parcialmente y además se obtuvieron varios indicios de la presencia de súper complejos. Cada paso de la purificación fue seguido mediante espectros de absorción, electroforesis en geles de poliacrilamida, análisis en segunda dimensión de geles claros nativos de alta resolución, actividades enzimáticas y ensayos de oximetría.

En conclusión se obtuvo una fracción bastante pura y con buena actividad enzimática del complejo  $b_6c$  y formando asociaciones con la NADH DH, la  $caa_3$  y los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$  además de otros supercomplejos como por ejemplo la SDH y la quinol oxidasa  $aa_3$  los cuales fueron analizados en una segunda cromatografía con la resina DEAE-Toyopearl. Se encontró que estos supercomplejos no pueden ser separados por la acción del NaCl sobre ellos.





## Introducción

La fosforilación oxidativa es la culminación de la producción de energía en el metabolismo de los organismos aeróbicos. Todos los pasos oxidativos de la degradación de grasas, carbohidratos y aminoácidos convergen en la respiración celular, en la cual la energía de oxidación impulsa la síntesis de ATP. En la fosforilación oxidativa se produce la reducción del oxígeno a agua gracias a los electrones cedidos por el NADH y el FADH<sub>2</sub>. En esta ocurre un flujo de electrones a través de una cadena de transportadores de electrones ligados a la membrana. La energía libre generada por este flujo de electrones “cuesta abajo” está acoplada al transporte “cuesta arriba” (consumiendo energía libre) de protones a través de una membrana impermeable a los protones. La energía libre de oxidación se conserva en forma de un potencial electroquímico transmembranal. El flujo transmembranal de protones a favor del gradiente de concentración mediante complejos proteicos específicos proporciona la energía libre para la síntesis de ATP, catalizada por la ATP sintasa que acopla el flujo de protones a la fosforilación del ADP (Nelson y Cox, 2009).

### **1. Cadena respiratoria**

#### **1.1 Grupos redox**

La cadena respiratoria consta de cuatro complejos multiméricos que se encargan del transporte de electrones por medio de la oxidación y reducción de sustratos. Los citocromos son proteínas que forman parte de estos complejos y tienen tres picos de absorción,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , debido a su grupo prostético, un hemo que contiene hierro. Su pico de absorción denominado alfa está situado a una longitud de onda característica (de Vrij y cols., 1987). Las mitocondrias y las bacterias contienen varias clases de citocromos designados *a*, *b*, *c*, *d* y *o*, los cuales se distinguen porque su pico  $\alpha$  se localiza en diferentes regiones de su espectro de absorción. Cerca de 600nm para el citocromo *a*, alrededor de 560nm para el *b*, cerca de 550nm para el *c* (de Vrij y cols., 1987) y cerca de 630nm para el hemo *d* (Lauraeus y Wikström, 1993). Los citocromos *o*, se han identificado como un citocromo tipo *b* que une monóxido de carbono (CO) (de Vrij y cols., 1987).

El protohemo IX (hemo *b*) es la variante más común de hemos encontrados en proteínas. Este es el grupo prostético de los citocromos tipo *b* y *c*. El hemo *a* y el hemo *d*, los cuales son sintetizados del hemo *b*, son grupos prostéticos en oxidasas respiratorias terminales aeróbicas (Sonenshein y cols, 2002). Los hemos de los citocromos *a*, *b* y *d* están unidos a las proteínas por enlaces de coordinación; sólo en el citocromo *c* el grupo hemo está unido covalentemente a la proteína mediante dos enlaces tioéter entre los grupos vinilo del hemo con dos residuos de cisteína. Aunque el citocromo *o* y el citocromo *a* presentan una cadena extra, una cadena lateral de hidroxialquilos, estos difieren en que el hemo *o* tiene un grupo metil en la posición 8 en lugar de un grupo formil del hemo *a* (Puustinen y Wikström, 1991). Esto hace al hemo *o* más hidrofóbico y causa que su hemocromo absorba más hacia el rango azul en comparación con el hemo *a* (Mogi y cols., 1994) (Figura 1).

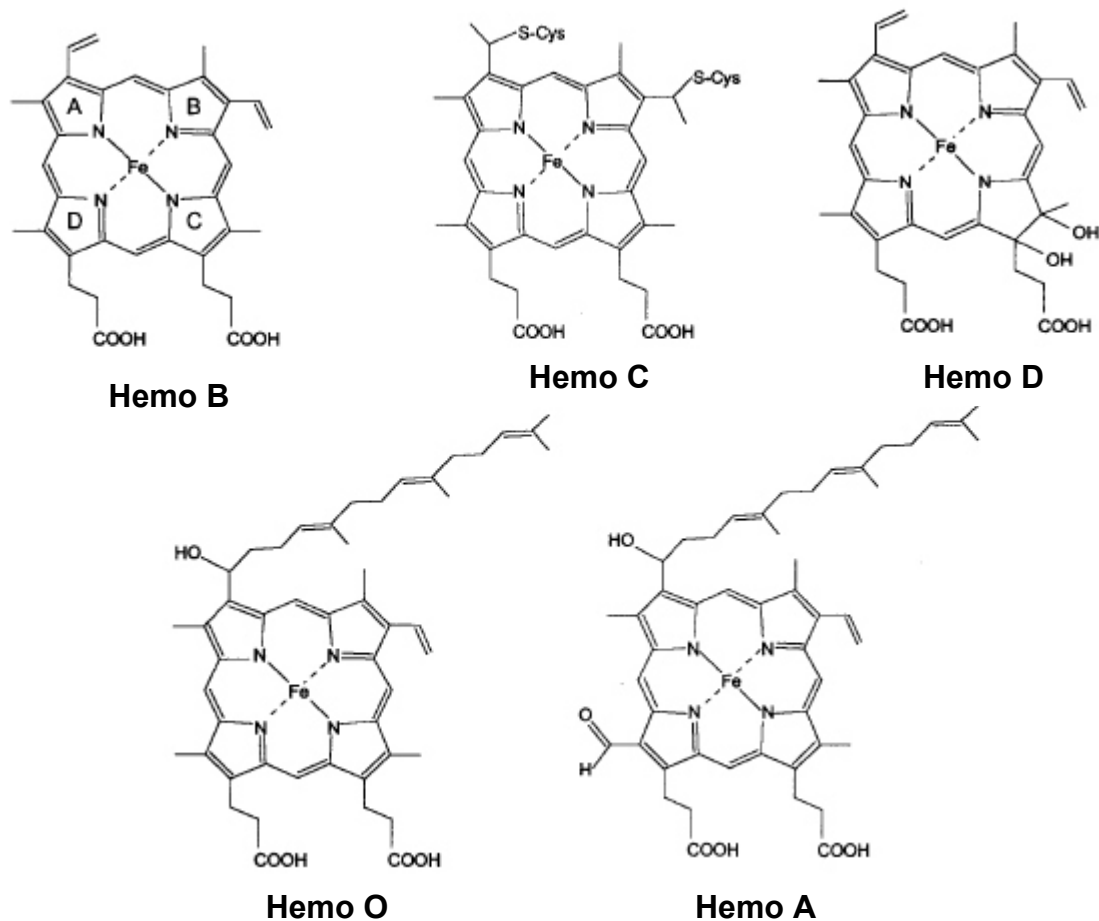


Figura 1. Esquema que muestra las diferentes clases de grupos hemos. Tomado de (Castro y Moreno, 2004)

Otros acarreadores de electrones de la cadena respiratoria son las proteínas hierro-azufre. En las proteínas hierro-azufre, descubiertas primero por Helmut Beinert, el

fierro no está presente en un hemo pero está asociado a átomos de azufre inorgánico o átomos de azufre de residuos de cisteína, o ambos. Estos centros (Fe-S) varían desde una simple estructura con un sólo átomo de Fe coordinados a cuatro grupos Cys-SH hasta centros más complejos con 2 o cuatro átomos de Fe. Las Proteínas Rieske fierro-azufre (llamadas así por su descubridor) son una variante, en el cual uno de los átomos de Fe está coordinado a dos residuos de His en vez de dos residuos de Cys. Todas las proteínas Fe-S participan en la transferencia de electrones, en la que uno o más átomos del grupo fierro azufre son oxidados o reducidos (Nelson y Cox, 2009). La proteína fierro-azufre está presente en numerosas proteínas, involucrándose en procesos biológicos clave como la transferencia de electrones y en procesos metabólicos y regulatorios. La proteína fierro-azufre es una de las subunidades catalíticas de los complejos tipo *bc*, y es esencial para la actividad de este complejo (Conte y Zara, 2011). Contiene un grupo [2Fe-2S] de alto potencial con ligaciones a cisteínas e histidina (Yu y Le Brun, 1998).

Las quinonas son moléculas no proteicas altamente hidrofóbicas que participan en el transporte de electrones. Las quinonas actúan como aceptores de átomos de hidrógeno y como donadores de electrones (Madigan y cols., 2006). Difunden en la bicapa lipídica. La mayor parte de estas quinonas conectan electroquímicamente a las enzimas redox y al conjunto se les llama poza de quinonas, para distinguirlas de las quinonas presentes como cofactores enzimáticos fijos o de las que tienen funciones metabólicas completamente diferentes. La menaquinona (MK) es una de las quinonas más ampliamente distribuidas en el árbol filogenético de las especies, en particular, es la única quinona en la ramificación temprana de filos bacterianos y de arqueas. La MK entonces parece representar el tipo ancestral de quinonas en sistemas bioenergéticos (Schoepp-Cothenet y cols., 2008).

## **1.2 Complejos respiratorios**

Los complejos I y II catalizan la transferencia de electrones a la quinona a partir de dos donadores electrónicos diferentes: el NADH (para el complejo I) y el succinato (para el complejo II). El complejo III transporta electrones desde la quinona reducida al citocromo *c*, y el complejo IV completa la secuencia transfiriendo electrones desde el citocromo al oxígeno (Nelson y Cox, 2009). Cada uno de estos complejos contiene grupos prostéticos redox que se encargan de la óxido reducción y tienen por tanto,

potenciales redox específicos (Nicholls y Ferguson, 2002; Nelson y Cox, 2009) (Figura 2).

Los complejos respiratorios mitocondriales se denominan por la molécula que oxidan y la que reducen como: el complejo I ó NADH deshidrogenasa (NADH: quinona oxidoreductasa); el complejo II ó succinato deshidrogenasa (succinato: quinona oxidoreductasa); el complejo III ó complejo  $bc_1$  (quinol: citocromo c oxidoreductasa) y el complejo IV ó citocromo c oxidasa (Nicholls y Ferguson, 2002; Nelson y Cox, 2009).

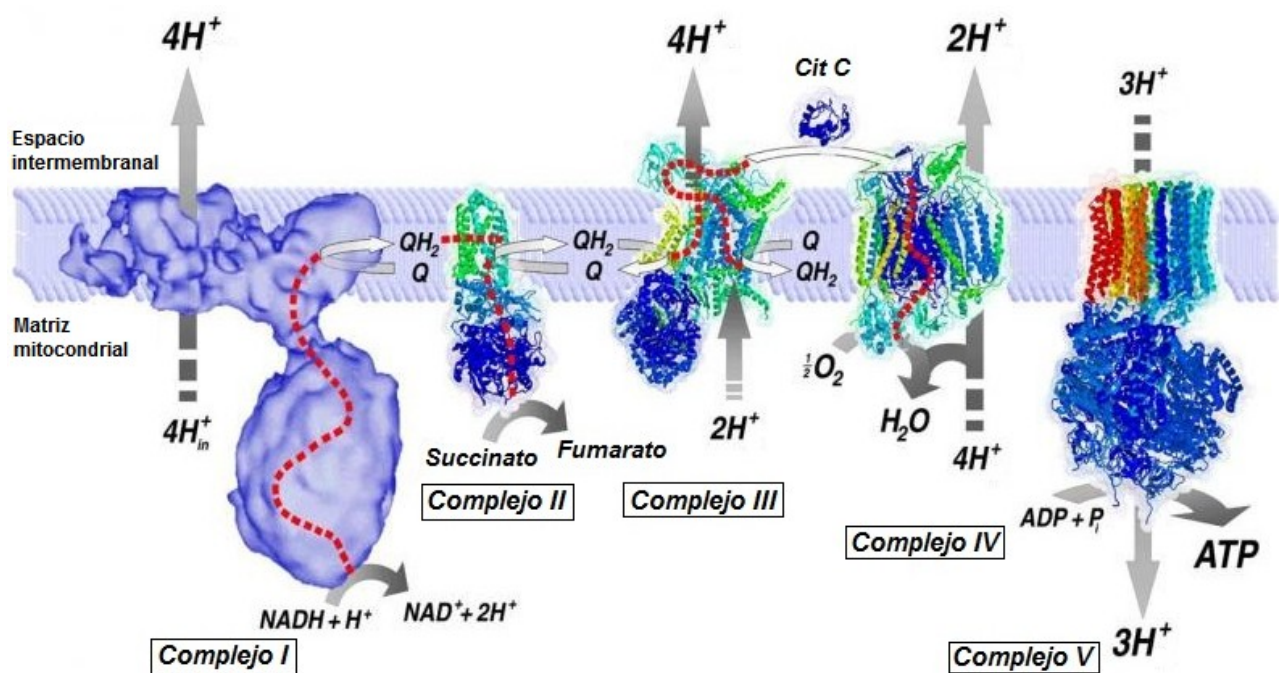


Figura 2. Cadena respiratoria mitocondrial con los cuatro complejos respiratorios, se muestra el flujo de electrones y el gradiente de protones generado el cual es aprovechado por la ATPsintasa (o también llamado complejo V) para la formación de ATP. Tomada de [www.neurowika.es/content/caracteristicas-de-la-cadena-respiratoria](http://www.neurowika.es/content/caracteristicas-de-la-cadena-respiratoria)

### 1.3 Cadenas respiratorias bacterianas

Existen muchas similitudes en las cadenas respiratorias de bacterias, mitocondrias y sistemas fotosintéticos aunque hay diferencias en detalles (Haddock y Jones, 1977). Una característica general es la composición relativamente simple de las enzimas en procariontes en comparación a las enzimas eucariontes, mientras que sus características funcionales y espectrales son muy similares (de Vrij y cols., 1987). La flexibilidad respiratoria (vías alternas) de las mitocondrias de mamíferos es pobre. Hay una cierta flexibilidad a nivel de entrada de los electrones, pero ninguna a nivel de la salida, donde

la citocromo oxidasa  $aa_3$  provee el único medio de reducción de oxígeno. En el caso de las mitocondrias de plantas, se encuentra un grado ligeramente más grande de flexibilidad respiratoria con una serie de NADH deshidrogenasas alternas y dos oxidasas terminales. Esta flexibilidad respiratoria ofrece a las mitocondrias de las plantas la capacidad para contribuir a otros procesos además de a la generación de ATP. Por ejemplo, la transferencia de electrones de la NADH deshidrogenasa alterna a una oxidasa alterna no está acoplada a la generación de una fuerza protón motriz y en su lugar sirve para la liberación de energía en forma de calor. Hay también una cierta flexibilidad respiratoria en las mitocondrias de levadura, hongos filamentosos y protozoarios primitivos pero entre las bacterias y arqueas se encuentra la flexibilidad respiratoria más extrema (Richardson, 2000).

En las bacterias y arqueas existe un rango diverso de aceptores de electrones. Esta diversidad respiratoria puede ser encontrada entre psicrófilos (organismos capaces de vivir por debajo de los  $5^{\circ}\text{C}$ ), mesófilos (organismos cuya temperatura óptima está entre los  $15$  y  $35^{\circ}\text{C}$ ) e hipertermófilos (organismos capaces de vivir hasta temperaturas de  $95^{\circ}\text{C}$ ) y contribuyen a la habilidad de los procariontes para colonizar muchos de los ambientes más hostiles micróxicos (ambientes con poco oxígeno) y anóxicos (ambientes sin oxígeno) de la tierra (Richardson, 2000).

Las bacterias frecuentemente se encuentran con cambios drásticos en su ambiente, incluyendo fluctuaciones en los niveles de oxígeno externo. Algunas células que viven anaeróbicamente y obtienen energía de la fermentación, reoxidan coenzimas transfiriendo los electrones a un metabolito endógeno (como el piruvato), en lugar de un aceptor electrónico externo (como por ejemplo el  $\text{O}_2$  en aerobiosis o como el  $\text{NO}_3^-$  o el  $\text{SO}_4^{2-}$  en condiciones anaeróbicas) (Nelson y Cox, 2009).

Estas estrategias metabólicas diferentes están también asociadas a cambios energéticos diferentes, y en consecuencia la capacidad para sintetizar ATP mediante mecanismos acoplados a dichos procesos, también es diferente. La evolución de las células que pudieron usar oxígeno como aceptor electrónico para la reoxidación del NADH y  $\text{FADH}_2$ , condujeron a una mayor capacidad para producir ATP a partir de la

oxidación de compuestos orgánicos reducidos, respecto de las fermentadoras y otros organismos que respiran de manera anaeróbica (Nelson y Cox, 2009).

La evolución de la diversidad respiratoria y la flexibilidad en los procariontes ha incrementado la habilidad de estos microorganismos para colonizar un amplio rango de ambientes de la tierra y adaptarse rápidamente a cambios dentro de su ambiente. El campo de la respiración bacteriana ofrece retos a los fisiólogos, biólogos moleculares y bioquímicos que trabajan en microbiología ambiental, biotecnológica y médica. Los sistemas por sí mismos proveen una rica fuente de material que puede ser estudiada usando espectroscopía y biología estructural para entender a mayor detalle los fundamentos de la bioenergética a nivel de una proteína individual, de un sistema de transporte de electrones integrado o de la célula entera (Richardson, 2000).

## 2. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva esporulante que vive principalmente en el suelo y está asociada a las fuentes de agua. En su hábitat natural la bacteria está expuesta a cambios en las condiciones ambientales. *B. subtilis* es el miembro mejor caracterizado de las bacterias Gram positivas (Nakano y cols., 1998), y en la actualidad es uno de los procariontes mejor conocidos, por esto es utilizada en la industria farmacéutica. Esta bacteria se ha convertido en un paradigma para la investigación de bacilos y bacterias Gram positivas en general (Bron y cols, 1998). Su genoma está secuenciado (Kunst y cols. 1997), comprende 4,224 genes que codifican para proteínas, de las cuales el 53% están presentes en una sola copia, mientras que 25% del genoma corresponde a varias familias de genes que se encuentran duplicados. *B. subtilis* tiene la capacidad de crecer aeróbica, pero también anaeróbicamente utilizando nitratos o nitritos como aceptores terminales de electrones o por fermentación (Nakano y cols., 1998). Posee una cadena respiratoria ramificada, una rama de su cadena respiratoria es análoga a la cadena respiratoria mitocondrial y contiene un complejo de citocromos  $b_6c$ , un citocromo  $c_{550}$  y una citocromo  $c$  oxidasa (David y cols., 2000). La vía alterna contiene a varias quinol oxidasas terminales (Zamboni y cols., 2003). En la tabla 1 se muestran los 78 genes correspondientes a la cadena respiratoria.

Tabla 1. Lista de genes de la cadena transportadora de electrones y la ATPsintasa de *Bacillus subtilis* utilizando la nomenclatura del genoma (Kunst y cols., 1997).

**Bioenergética de membrana (cadena de transporte de electrones y ATPsintasa)**

<i>atpA</i>	3784	ATP sintasa (subunidad $\alpha$ )
<i>atpB</i>	3787	ATP sintasa (subunidad a)
<i>atpC</i>	3781	ATP sintasa (subunidad $\epsilon$ )
<i>atpD</i>	3782	ATP sintasa (subunidad $\beta$ )
<i>atpE</i>	3786	ATP sintasa (subunidad c)
<i>atpF</i>	3786	ATP sintasa (subunidad b)
<i>atpG</i>	3783	ATP sintasa (subunidad $\gamma$ )
<i>atpH</i>	3785	ATP sintasa (subunidad $\delta$ )
<i>atpI</i>	3787	ATP sintasa (subunidad i)
<i>cccA</i>	2599	citocromo $c_{550}$
<i>cccB</i>	3625	citocromo $c_{551}$
<i>ccdA</i>	1922	requerido para el ultimo paso de la síntesis de citocromo c
<i>ctaA</i>	1558	citocromo $caa_3$ oxidasa (requerido para biosíntesis)
<i>ctaB</i>	1559	citocromo $caa_3$ oxidasa (factor de ensamblaje)
<i>ctaC</i>	1560	citocromo $caa_3$ oxidasa (subunidad II)
<i>ctaD</i>	1561	citocromo $caa_3$ oxidasa (subunidad I)
<i>ctaE</i>	1563	citocromo $caa_3$ oxidasa (subunidad III)
<i>ctaF</i>	1563	citocromo $caa_3$ oxidasa (subunidad IV)
<i>cydA</i>	3978	citocromo <i>bd</i> ubiquinol oxidasa (subunidad I)
<i>cydB</i>	3977	citocromo <i>bd</i> ubiquinol oxidasa (subunidad II)
<i>etfA</i>	2915	flavoproteína de transferencia de electrones (subunidad a)
<i>etfB</i>	2916	flavoproteína de transferencia de electrones (subunidad b)
<i>fer</i>	2409	Ferredoxina
<i>hmp</i>	1372	Flavoheemoglobina
<i>narG</i>	3829	nitrito reductasa (subunidad $\alpha$ )
<i>narH</i>	3825	nitrito reductasa (subunidad $\beta$ )
<i>narI</i>	3823	nitrito reductasa (subunidad $\gamma$ )
<i>narJ</i>	3824	nitrito reductasa (proteína J)
<i>ndhF</i>	205	NADH deshidrogenasa (subunidad 5)
<i>qcrA</i>	2364	menaquinol: citocromo c oxidoreductasa (subunidad hierro azufre)
<i>qcrB</i>	2364	menaquinol: citocromo c oxidoreductasa (subunidad citocromo b)
<i>qcrC</i>	2363	menaquinol: citocromo c oxidoreductasa (subunidad citocromo b/c)
<i>qoxA</i>	3917	citocromo $aa_3$ quinol oxidasa (subunidad II)
<i>qoxB</i>	3916	citocromo $aa_3$ quinol oxidasa (subunidad I)
<i>qoxC</i>	3914	citocromo $aa_3$ quinol oxidasa (subunidad III)
<i>qoxD</i>	3913	citocromo $aa_3$ quinol oxidasa (subunidad IV)
<i>resA</i>	2421	proteínas esenciales similares a proteínas de biogénesis de citocromo c
<i>resB</i>	2420	proteínas esenciales similares a proteínas de biogénesis de citocromo c
<i>resC</i>	2418	proteínas esenciales similares a proteínas de biogénesis de citocromo c
<i>tlp</i>	1930	probable proteína tioredoxina
<i>trxA</i>	2912	Tioredoxina
<i>trxB</i>	3573	tioredoxina reductasa
<i>ycgT</i>	352	tioredoxina reductasa
<i>ycnD</i>	439	NADPH flavín oxidoreductasa
<i>ydbP</i>	508	Tioredoxina
<i>ydeQ</i>	576	NAD(P)H oxidoreductasa
<i>ydfQ</i>	598	Tioredoxina
<i>ydgI</i>	613	NADH deshidrogenasa
<i>yfkO</i>	854	NAD(P)H flavín oxidoreductasa
<i>yfmJ</i>	818	quinona oxidoreductasa
<i>yjdK</i>	1280	factor de ensamblaje de la citocromo c oxidasa
<i>yjID</i>	1299	NADH deshidrogenasa
<i>ykuN</i>	1486	Flavodoxina

<i>ykuP</i>	1488	sulfito reductasa
<i>ykuU</i>	1492	2-cys peroxiredoxina
<i>ykvV</i>	1450	Tioredoxina
<i>yneN</i>	1929	tiol:disulfuro proteína de intercambio
<i>yojN</i>	2114	oxido nítrico reductasa
<i>yoll</i>	2267	Tioredoxina
<i>yosR</i>	2159	Tioredoxina
<i>ypdA</i>	2401	tioredoxina reductasa
<i>yqiG</i>	2516	NADH dependiente de flavín oxidoreductasa
<i>yqjM</i>	2475	NADH dependiente de flavín oxidoreductasa
<i>yrkL</i>	2708	NAD(P)H oxidoreductasa
<i>ythA</i>	3139	subunidad de citocromo <i>d</i> oxidasa
<i>ytpP</i>	3054	tioredoxina H1
<i>ytrC</i>	3117	subunidad de citocromo <i>c</i> oxidasa
<i>ytrD</i>	3116	subunidad de citocromo <i>c</i> oxidasa
<i>yufD</i>	3249	NADH deshidrogenasa (ubiquinona)
<i>yufT</i>	3246	NADH deshidrogenasa
<i>yumB</i>	3300	NADH deshidrogenasa
<i>yumC</i>	3301	tioredoxina reductasa
<i>yusE</i>	3364	Tioredoxina
<i>yutJ</i>	3308	NADH deshidrogenasa
<i>yvaB</i>	3445	NAD(P)H deshidrogenasa (quinona)
<i>ywcG</i>	3911	NADPH-flavín oxidoreductasa
<i>ywhN</i>	3840	ubiquinol-citocromo <i>c</i> reductasa
<i>ywrO</i>	3708	NAD(P)H oxidoreductasa

## 2.1 Cadena respiratoria de *B. subtilis*

En la figura 3 se muestra un esquema de la cadena respiratoria ramificada de *B. subtilis*. Las diferentes deshidrogenasas membranales como la NADH deshidrogenasa, la succinato deshidrogenasa y la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>, oxidan sustratos solubles en agua y reducen a la menaquinona (MK-7) a menaquinol en la membrana (Wachenfeldt y Hederstedt, 2002). Desde este punto los electrones pueden seguir dos rutas, hacia el complejo *b<sub>6</sub>c*, después hacia un citocromo *c<sub>550</sub>* y finalmente a una citocromo *c* oxidasa *caa<sub>3</sub>*, o tomar la vía de las quinol oxidasas compuesta de una quinol oxidasa *aa<sub>3</sub>*, una quinol oxidasa tipo *bd* y una posible quinol oxidasa tipo *bb'* (Winstedt y Wachenfeldt, 2000).



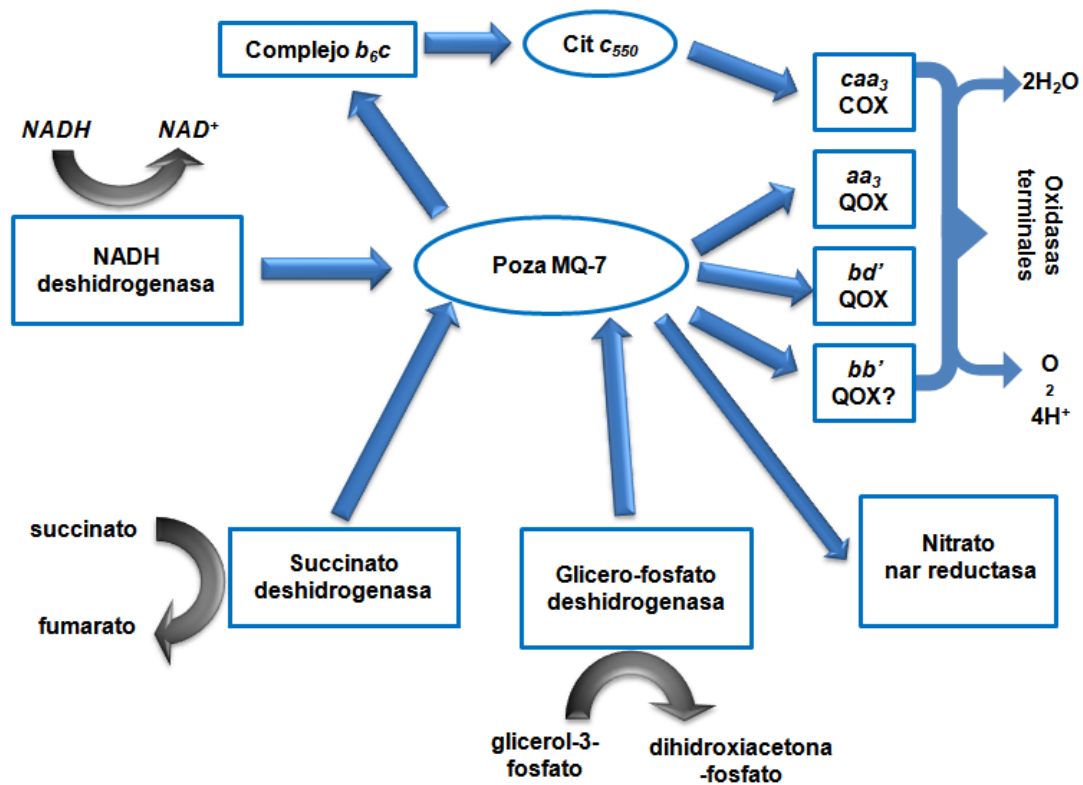


Figura 3. Esquema de la cadena respiratoria de *B. subtilis* en donde se muestran varias deshidrogenasas, la NADH deshidrogenasa, la succinato deshidrogenasa y la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, que alimentan a la poza de menaquinona-7, una vía clásica análoga a la vía respiratoria mitocondrial compuesta de complejo  $b_6c$ , un citocromo  $c_{550}$  y una citocromo c oxidasa  $caa_3$ , una vía compuesta de varias quinol oxidasas terminales tales como la quinol oxidasa  $aa_3$ , la quinol oxidasa  $bd'$  y la posible quinol oxidasa  $bb'$  y una vía anaeróbica utilizando nitratos como aceptores finales de electrones o por fermentación. Tomado de: Azarkina y cols., 1999.

En la figura 4 se muestra un posible modelo de los cuatro complejos respiratorios de *Bacillus subtilis* análogos a la cadena respiratoria mitocondrial, en donde se observa el paso de electrones desde la NADH deshidrogenasa, la succinato deshidrogenasa, la poza de MK-7, el complejo  $b_6c$ , los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$  hasta la citocromo c oxidasa  $caa_3$ .

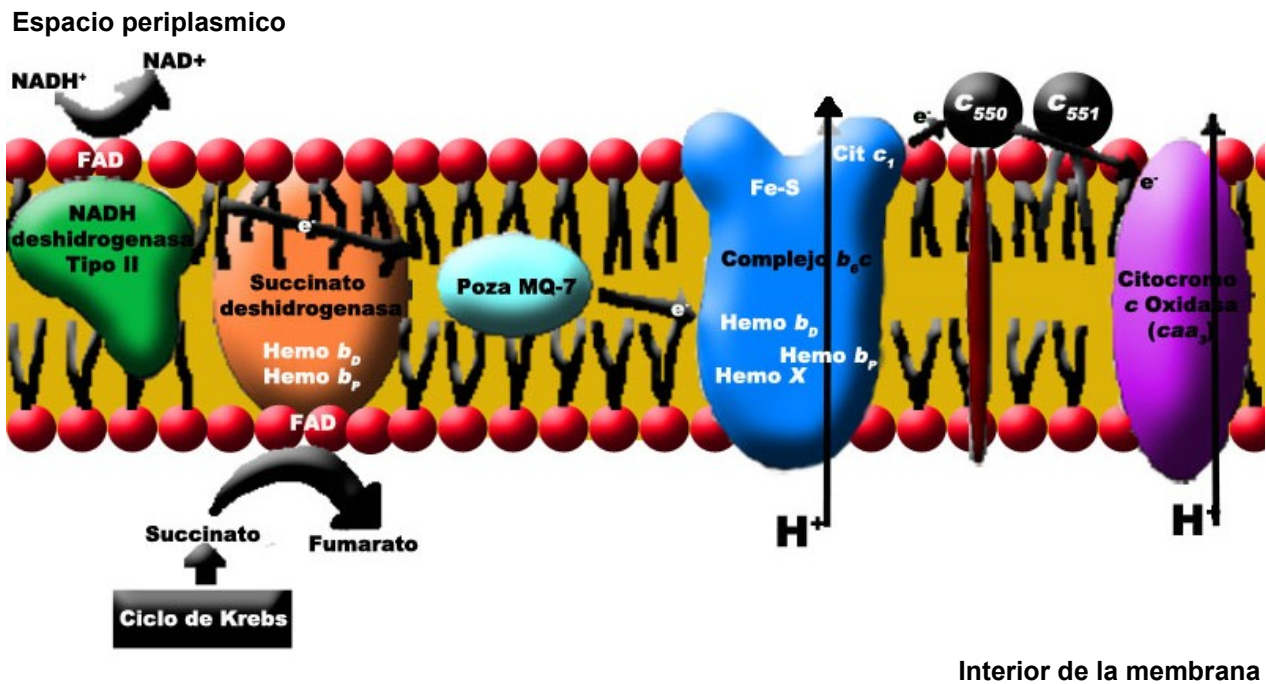


Figura 4. Modelo esquematizado de la vía respiratoria clásica de *B. subtilis*. Se muestra el paso de electrones desde la NADH deshidrogenasa, la succinato deshidrogenasa, la poza de MK-7, el complejo  $b_{6c}$ , los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$ , hasta la citocromo c oxidasa  $caa_3$ . Los complejos que bombean protones se muestran con flechas indicando el sentido del transporte.

La NADH: quinona oxidoreductasa, provee uno de los puntos de entrada para los electrones a la cadena transportadora de electrones. El NADH producido durante la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) es oxidado a NAD<sup>+</sup>. Existen dos tipos de NADH deshidrogenasas (NDH), la NDH tipo 1 contiene un flavín mononucleótido y varios grupos fierro-azufre (Fe-S) y está acoplada a la generación de una fuerza protón motriz (Gyan y cols., 2006). La NDH tipo 2 es una MK-7 reductasa consiste de un polipéptido y un Flavín adenín dinucleótido (FAD) (Nakamura y cols., 2011), y no bombea protones a través de la membrana. *B. subtilis* 168 tiene tres genes que codifican para probables NADH deshidrogenasas, *yjID*, *yumB*, y *yutJ* (Nakamura y cols., 2011), que son similares a las enzimas de *Escherchia coli*, (Sonenshein y cols, 2002). El gene *yjID* (también llamado *ndh*) codifica para una proteína de membrana reprimida anaeróbicamente y su expresión es elevada bajo condiciones aeróbicas de crecimiento. Además hay evidencia que prueba que YjID es la mayor NADH deshidrogenasa en *B. subtilis* (Gyan y cols., 2006). Una purificación en pequeña escala preparada en un gel de poliácridamida revela la presencia de una proteína de 64 kDa (Bergsma y cols., 1981). Se sabe que una gran parte de ésta proteína sobresale hacia el citoplasma (Bergsma y cols., 1982).

La Succinato:quinona oxidoreductasa, es una enzima unida a la membrana que cataliza la oxidación de succinato a fumarato en el CAT y dona equivalentes redox a la menaquinona-7 de la cadena respiratoria (Hägerhall y cols., 1992). Consta de tres subunidades: SdhA de 65kDa, que contienen el sitio activo dicarboxil y un FAD<sup>++</sup> unido covalentemente; SdhB de 24kDa posee varios grupos hierro azufre, uno de [2Fe-2S], otro de [3Fe-3S] y otro de [4Fe-4S] y SdhC de 23kDa con 5 alfa hélices transmembranales y contiene un citocromo *b<sub>558</sub>* bihémico. Las tres subunidades dan un peso molecular total de 112kDa para el complejo entero. El dímero SdhAB se ancla del lado citoplásmico y es requerido para la reducción de la menaquinona (Wachenfeldt y Hederstedt, 2002). Tiene dos hemos, uno con un potencial redox alto (+16mV) y uno bajo (-132mV), el hemo con bajo potencial (hemo b<sub>D</sub>) está localizado cerca del lado periplásmico de la membrana, mientras que el hemo con alto potencial (hemo b<sub>P</sub>) está localizado hacia el lado negativo de la membrana cerca del grupo [3Fe-4S]. Hay evidencias que sugieren que la reacción de la succinato deshidrogenasa es endergónica y requiere estar acoplada a un flujo reverso de electrones de afuera hacia adentro de la membrana celular (Kurokawa y Sakamoto, 2005).

El complejo *b<sub>6c</sub>* se menciona en un apartado más adelante.

La Citocromo *c* oxidasa es una hemo-cobre oxidasa típica, bombeadora de protones y está codificada por los genes *ctaCDEF* (Azarkina y cols., 1999). En el locus *ctaABCDEFG*, *ctaA* y *ctaB* codifican para dos enzimas requeridas para la biosíntesis del hemo A (Liu y Taber, 1998). CtaC pesa 40kDa, es la subunidad II con un grupo prostético Cu<sub>A</sub> por donde entran los electrones, CtaD de 69kDa es la subunidad I con dos hemos *a* y un Cu<sub>B</sub> como grupos prostéticos. En esta subunidad se bombean los protones fuera de la célula y se reduce el oxígeno. CtaE de 23kDa es la subunidad III y CtaF de 13kDa es la subunidad IV (Sonenshein y cols. 2002). La suma de los pesos moleculares de las subunidades da un total de 145kDa. CtaG es una proteína hidrofóbica de 34kDa con siete segmentos transmembranales alfa hélice y de función desconocida (Sonenshein y cols. 2002). La principal característica distinguible de la *caa<sub>3</sub>* es que posee un citocromo *c* fusionado a la subunidad II (Henning y cols., 1995). Con un crecimiento bien aireado en medio mínimo o rico, la citocromo *c* oxidasa *caa<sub>3</sub>* parece ser predominante (Zamboni y Sauer, 2003). La secuencia de esta subunidad tiene una extensión en el C-terminal de

aproximadamente 100 aminoácidos que contiene la secuencia conservada CXXCH, característica de un citocromo (Andrews y cols., 2005). Esta es una de las subunidades altamente conservadas encontradas en otros miembros de esta familia.

*B. subtilis* tiene al menos tres oxidasas terminales las cuales toman electrones directamente del menaquinol, antes que la vía de los citocromos. Todas crean una separación de cargas a través de la membrana, por medio de electrones y protones envueltos en la reducción del oxígeno. Estas oxidasas terminales pueden ser clasificadas como bombeadoras o no bombeadoras de protones (Lauraeus y Wikstrom, 1993). La quinol oxidasa  $aa_3$ , se expresa en medio rico en todas las fases de crecimiento (Azarkina y cols., 1999). La QOX  $aa_3$  pertenece a la superfamilia hemo-cobre y bombea protones. Está codificada por el operón *qoxABCD* y contiene cuatro subunidades (Azarkina y cols., 1999). QoxA de 36kDa codifica para una subunidad II en donde se une el menaquinol, QoxB de 74kDa es la subunidad I cuyos grupos prostéticos son un hemo *a*, un hemo  $a_3$  y un centro  $Cu_B$  en donde ocurre el bombeo de protones y la reducción del oxígeno, QoxC de 23kDa es la subunidad III y QoxD de 14kDa es la subunidad IVB, ésta contribuye al bombeo de protones (Sonenshein y cols. 2002). La quinol oxidasa tiene un PM total de 147kDa, calculado a partir del genoma.

La quinol oxidasa *bd* no bombea protones y puede ser encontrada en células de *B. subtilis* creciendo en glucosa. Es más importante su expresión en poco oxígeno y en cultivos bien aireados pero con glucosa limitada (Zamboni y Sauer, 2003). Los genes *cydAB* del operón *cydABCD* codifican para dos subunidades de la citocromo *bd* oxidasa (Azarkina y cols., 1999). CydA de 52kDa es la subunidad I con un hemo *b* de bajo spin, aquí se une el menaquinol y CydB de 38kDa es la subunidad II en la cual se encuentran un hemo  $b_{595}$  de alto spin y un hemo *d*, en esta subunidad se da la reducción del oxígeno (Sonenshein y cols. 2002) dando un peso total de 90kDa (Figura 4 y 5). La quinol oxidasa *bb'* es una posible quinol oxidasa tipo *bd*. Esta enzima no bombea protones lo cual es típico en quinol oxidasas tipo *bd* a diferencia de las oxidasas de la superfamilia hemo-cobre oxidasas. Esta enzima une monóxido de carbono (CO) muy rápido aunque más lento que la oxidasa tipo *bd* (Azarkina y cols., 1999). Los polipéptidos YthA y YthB, codificados por el grupo de genes *ythABC* de *B. subtilis*, están cercanamente relacionados a CbdA y CbdB de *B. stearothermophilus*, las cuales son las subunidades

de una oxidasa terminal tipo *bd*. Los genes *ythA* y *ythB* de *B. subtilis* por lo tanto probablemente codifiquen para una oxidasa terminal relacionada a las oxidasas tipo *bd* (Sonenshein y cols. 2002).

### 3. Complejos tipo *bc*

Los complejos de la familia *bc* son enzimas relacionadas que se desarrollaron temprano en la evolución y ahora llevan la mayoría del flujo de energía de la biósfera (Berry y cols., 2000). El complejo de citocromos *bc* representa la única enzima común en casi todas las cadenas de transferencia de electrones respiratorias y fotosintéticas. La historia evolutiva de este complejo puede esperarse que contenga información valiosa con respecto al mecanismo de la evolución de la bioenergética en general (Schütz y cols., 2000). Estos complejos son de considerable variación en cuanto al número de subunidades, pero 3 subunidades siempre están presentes: una proteína hierro-azufre, que contiene un grupo [2Fe-2S] de alto potencial redox unido a cisteínas e histidinas; un citocromo *b*, que contiene dos hemos tipo *b* de bajo spin, *b<sub>L</sub>* (bajo potencial) y *b<sub>H</sub>* (alto potencial), ambos unidos a dos residuos de histidina, y un citocromo *c* que contiene un hemo tipo *c* con unión a 2 cisteínas en el caso del *c<sub>1</sub>* (Yu y Le Brun, 1998).

Existen dos tipos de complejos *bc*, los *bc<sub>1</sub>* que se encuentran en mitocondria y bacterias y los *b<sub>6f</sub>* que se encuentran en cianobacterias, algas y plantas superiores.

#### 3.1 Complejos tipo *bc<sub>1</sub>*

El complejo citocromo *bc<sub>1</sub>* es una enzima con multisubunidades que genera una fuerza protón motriz por transferir electrones del ubiquinol al citocromo *c* soluble. La conservación de la energía en este complejo enzimático es asegurada por la oxidación de ubiquinol y la reducción de ubiquinona en los sitios activos situados en el lado opuesto de la membrana. Estructuras de alta resolución han mostrado que el complejo *bc<sub>1</sub>* es un dímero compuesto de dos copias de un citocromo *b* (Castellani y cols. 2010). El citocromo *b* del complejo *bc<sub>1</sub>* tiene aproximadamente 400 residuos de aminoácidos organizados en 8 cruces transmembranales (Yu y cols., 1995). Una proteína hierro azufre, y un citocromo *c<sub>1</sub>*, que son los únicos polipéptidos presentes en algunas enzimas bacterianas, además de las seis a ocho subunidades presentes exclusivamente en cada

monómero de los complejos eucarióticos (Castellani y cols. 2010). Las tres subunidades del complejo  $bc_1$  bacteriano así como las más complejas enzimas eucariotes con 9 a 11 subunidades, existen como estructuras diméricas (Covian y cols. 2007) (Figura 5).

### 3.2 Complejos tipo $b_6f$

El complejo citocromo  $b_6f$  es uno de los tres complejos integrales de membrana responsables del transporte de electrones y la transducción de energía en las membranas oxigénicas fotosintéticas (Yu y cols., 1995). El citocromo  $b$  del complejo  $b_6f$  se divide en dos subunidades: una de cerca de 220 residuos (el citocromo  $b_6$ ) que alberga tres hemos (2 hemos tipo  $b$  y un hemo  $c_n$ ) con cuatro cruces transmembranales similares al N-terminal del citocromo  $b$  mitocondrial y un polipéptido de cerca de 160 residuos (llamada subunidad IV) (Yu y cols., 1995), que tiene tres alfa hélices transmembranales el cual es similar a la parte C-terminal del citocromo  $b$  del complejo  $bc_1$  (Yu y Le Brun, 1998). Los dos hemos  $b_p$  y  $b_n$ , en el núcleo del complejo que está estructuralmente conservado en la evolución entre los complejos  $bc_1$  y  $b_6f$  se anclan a la segunda y cuarta hélices transmembranales del citocromo  $b$ . El hemo  $c_n$  se encuentra covalentemente unido al polipéptido citocromo  $b_6$  en el lado negativo del complejo. El hemo  $c_n$ , una molécula de clorofila  $a$  y una molécula de  $\beta$ -caroteno están presentes por monómero en el complejo  $b_6f$  (Baniulis y cols. 2008). El citocromo  $f$  del complejo  $b_6f$  es un análogo al citocromo  $c_1$  pero su secuencia de aminoácidos es diferente (Yu y cols., 1995). Se han obtenido las estructuras por rayos X de la cianobacteria termofílica *Mastigocladus laminosus* y de la alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Baniulis y cols. 2008) (Figura 5 y 6).

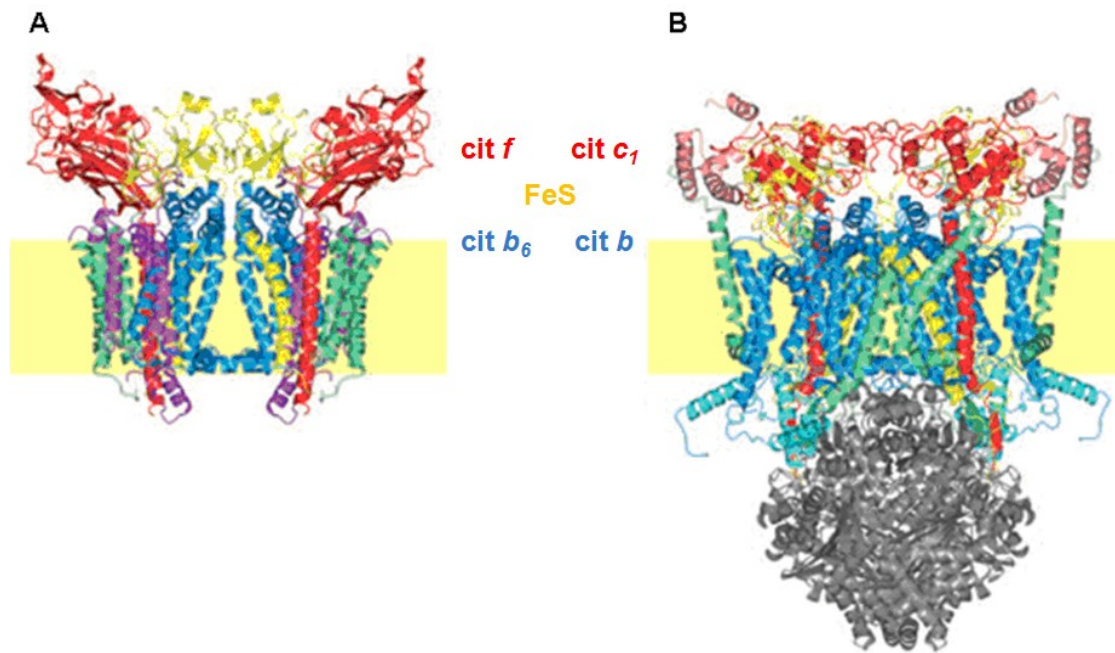


Figura 5. Comparación de las estructuras del complejo  $b_6f$  de cianobacterias (*Mastigocladus laminosus*) (A), el complejo  $bc_1$  de mitocondrias de bovino (B). Las subunidades análogas y homólogas entre complejos (citocromo *b*, citocromo *c*, proteína hierro-azufre) se muestran del mismo color (Baniulis y cols., 2008).

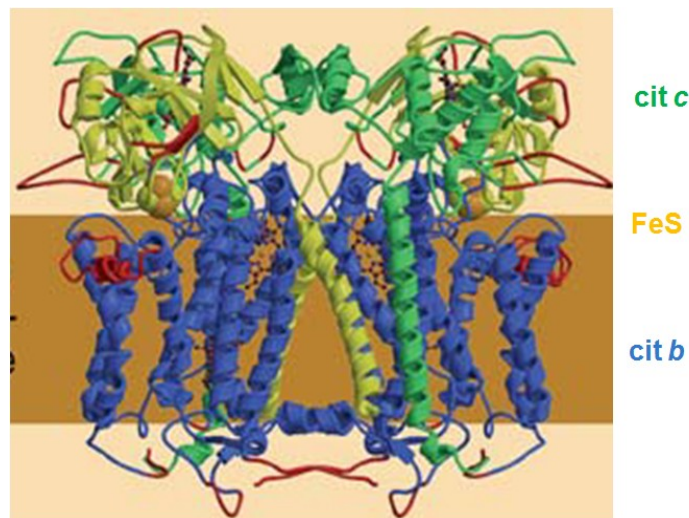


Figura 6. Complejo  $bc_1$  bacteriano de *Rhodobacter capsulatus* donde se muestran las subunidades redox con el código de color correspondiente a la figura de arriba. Tomado de: Berry y cols., 2004.

### 3.3 Complejo tipo $b_6c$ de *Bacillus subtilis*

Sus productos proteicos parecen constituir una tercera clase de complejos  $bc$  la cual tiene más similitud con el complejo  $b_6f$  que con el complejo  $bc_1$ . La subunidad QcrA es una proteína hierro-azufre de 18.7kDa de 167 residuos de aminoácidos. Muestra 21 a 34% de identidad y 43 a 55% de similitud con la de los complejos  $b_6f/bc_1$  (Yu y cols., 1995). Los 224 residuos de aminoácidos (25.4kDa) de la subunidad del citocromo *b* (QcrB) tienen una identidad de 44 a 47% y 69 a 72% de similitud a los citocromos  $b_6$  del

complejo  $b_6f$  y 33 a 40% de identidad y 59 a 68% de similitud con el citocromo  $b$  del complejo  $bc_1$  (Yu y Le Brun, 1998). Tiene cuatro alfa hélices transmembranales. Las cuatro histidinas que unen a los hemos se encuentran en dos alfa hélices, la 2 y la 4 (Schütz y cols. 2000). Estos cuatro residuos sirven como ligandos axiales a los dos hemos,  $b_H$  y  $b_L$ . El hemo  $b_L$  está localizado cerca del lado positivo de la membrana, donde el menaquinol es oxidado, mientras que el hemo  $b_H$  está cerca del lado negativo de la membrana, donde la MK-7 es reducida (Sonenshein y cols. 2002). La subunidad QcrC está muy relacionada pero es distinta a la de las familias  $bc_1$  y  $b_6f$ . Contiene 255 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular predicho de 28kDa. La región N-terminal de alrededor de 170 residuos es hidrofóbica y es similar a la subunidad IV de 17kDa del complejo citocromo  $b_6f$  (21 a 33% de identidad y 51 a 57% de similitud) y al C-terminal del citocromo  $b$  del complejo  $bc_1$  (15 a 26% de identidad y 45 a 54% de similitud). La región C-terminal (85 residuos) de QcrC contiene un citocromo  $c$  en la secuencia CXYCH que se encuentra en todos los citocromo tipo  $c$  (Yu y cols., 1995). Tiene una gran similitud al citocromo  $c_1$  o citocromo  $f$  pero se parece más al pequeño citocromo tipo  $c_{550}$  de *Bacillus* (Yu y Le Brun, 1998).

En la figura 7 a se muestra una comparación entre los complejos tipo  $bc_1$ ,  $b_6f$  y el complejo de *Bacillus subtilis* en donde se muestra el núcleo de las 3 subunidades óxidorreductoras conservado en los complejos tipo  $bc$ . En el complejo  $bc_1$  se encuentra una proteína hierro azufre, un citocromo  $b$  y un citocromo  $c$ , en el complejo  $b_6f$  se encuentra una proteína hierro azufre, un citocromo  $b$  dividido en dos polipéptidos, el primero en el que se encuentran dos hemos  $b$  y un hemo  $c_n$  covalentemente unido y en el segundo la llamada subunidad IV y un citocromo  $f$  análogo al citocromo  $c$  del complejo  $bc_1$ . Y finalmente el complejo tipo  $bc$  de *Bacillus subtilis* en donde se encuentra la proteína hierro azufre, un citocromo  $b$  donde se hallan dos hemos  $b$  y un hemo covalentemente unido, denominado hemo  $x$  y un citocromo  $c$  unido al péptido análogo de la subunidad IV del complejo fotosintético. En la figura 7 b, se muestra un posible modelo de un monómero del complejo  $b_6c$  de *Bacillus subtilis*, en donde se muestran la proteína hierro azufre, el citocromo  $b$  con los hemos  $b_h$  y  $b_l$ , el hemo  $x$  covalentemente unido, y el citocromo  $c$ .



Poca información se ha obtenido de los complejos de las quinol:citocromo *c* reductasas de bacterias gram positivas. Sólo un complejo de la bacteria termofílica *Bacillus sp.* PS3, ha sido purificado (Yu y Le Brun, 1998). Es de considerable interés evolutivo y funcional si un grupo de bacterias no fotosintéticas tales como especies de *Bacillus* contienen un complejo semejante al *b<sub>6</sub>f* (Yu y cols, 1995).

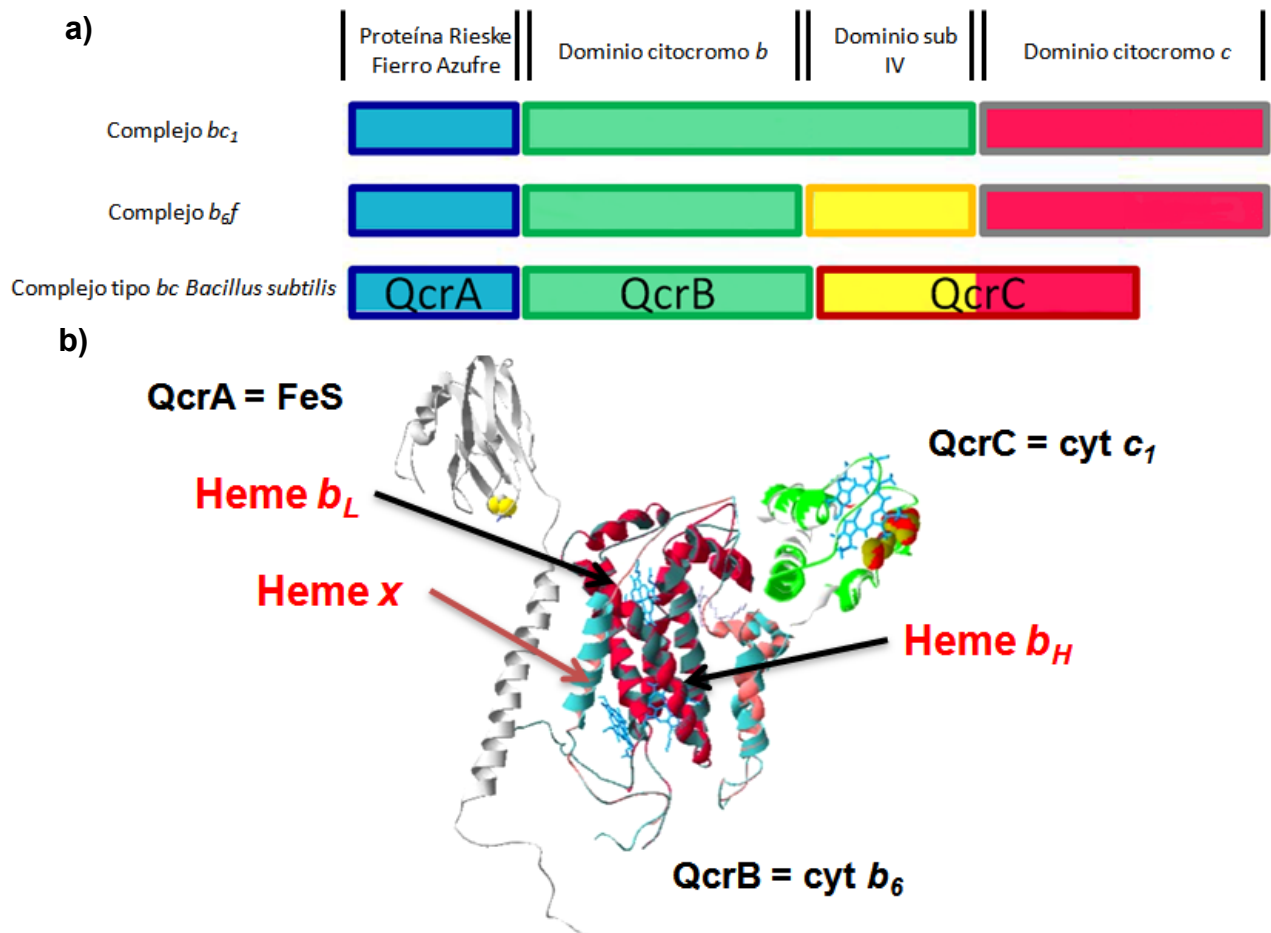


Figura 7. A. comparación de las subunidades redox (proteína fierro azufre, citocromo *b*, citocromo *c* y subunidad IV en el caso del complejo *b<sub>6</sub>f*) de los complejos, *bc<sub>1</sub>*, *b<sub>6</sub>f* y *b<sub>6</sub>c* de *B. subtilis* tomado de (Yu y cols, 1995). B. posible estructura del monómero del complejo *b<sub>6</sub>c* de *B. subtilis* en donde se muestran sus subunidades redox, QcrA, QcrB y QcrC además de los dos hemo *b* y su hemo *x* unido covalentemente.

#### 4. Utilización de detergentes para aislar proteínas de membrana

Las proteínas de membrana representan el 20-30% del total de las proteínas en todas las especies y más del 60% de estas son objetivos farmacéuticos. Sin embargo, hasta hoy, sólo el 1% han sido caracterizadas estructuralmente y comprometidas seriamente para el diseño de drogas. Varios factores dificultan el estudio estructural de las proteínas membranales. Por lo general no se expresan abundantemente en las

células y son difíciles para su sobreexpresión, especialmente las proteínas eucarióticas. El principal cuello de botella para su cristalización se debe a su inestabilidad fuera de la bicapa lipídica. Para ser purificadas necesitan ser extraídas por detergentes, para formar complejos micelares donde el empaquetamiento puede perderse, permitiendo el desdoblamiento y la pérdida de la actividad de las proteínas. La formación de micelas con detergente es muy bien conocida por su capacidad de reducir los contactos proteína-proteína para aislarlas y posteriormente tener la posibilidad de cristalizarlas (Matar-Merheb y cols., 2011).

En la última década, nuestro entendimiento de la estructura y función de las proteínas membranales ha tenido un avance muy significativo, y gracias a esto su caracterización detallada puede ser aprovechada experimentalmente en muchos campos. Los detergentes han jugado papeles significativos en estos esfuerzos, y han servido como herramientas para aislar, solubilizar, y manipular proteínas de membrana para subsecuentes caracterizaciones bioquímicas y físicas. Muchos de los métodos exitosos para reconstituir y cristalizar proteínas de membrana se basan en la conducta de los detergentes. Su comportamiento en solución y en la presencia de proteínas puede limitar su uso con técnicas experimentales específicas. Por lo tanto, la elección del detergente y las condiciones experimentales, puede tener un enorme impacto en si una técnica puede ser aplicada con éxito a una proteína membranal específica. Aunque muchos nuevos detergentes están disponibles ahora para usarse con proteínas de membrana, un claro entendimiento de los detergentes y de la estructura de las micelas y los complejos detergente-proteína es crucial para los bioquímicos (Garavito y Ferguson-Miller, 2001).

En solución acuosa los detergentes son moléculas de superficie activa que se autoasocian y unen a la superficie hidrofóbica en una manera dependiente de la concentración. El carácter anfipático de los detergentes es evidente en su estructura, la cual consiste de una cabeza con un grupo polar (o cargado) y una cola hidrofóbica (Garavito y Ferguson-Miller, 2001). En contraste a las moléculas puramente polares o no polares, las moléculas anfipáticas exhiben propiedades únicas en agua. Sus grupos polares forman uniones de hidrógeno con moléculas de agua, mientras que las cadenas de hidrocarburos se agregan debido a las interacciones hidrofóbicas (Bhairi, 2001).

Muchos detergentes caen en una de las tres categorías, dependiendo del tipo del grupo: iónico (catiónico o aniónico), no iónico o bipolar. El comportamiento de un detergente específico depende del carácter y estereoquímica de su cabeza del grupo y cola (Garavito y Ferguson-Miller, 2001).

Los detergentes se auto asocian en formas estructurales llamadas micelas. A un amplio umbral de concentraciones de monómeros llamado concentración micelar crítica (CMC), la auto asociación ocurre y se forman micelas. Idealmente, la concentración de monómeros de detergente se mantiene constante por encima de la CMC a medida que más detergente es añadido a la solución; sólo la concentración de micelas aumenta. Cuando la concentración excede la CMC, se convierte en un detergente capaz de solubilizar moléculas hidrofóbicas y anfipáticas, tales como lípidos, en micelas mixtas o agregados micelares. Por otra parte, la solubilización completa y estable de muchas proteínas integrales de membrana generalmente ocurre por encima de la CMC, cuando el detergente se asocia con la superficie hidrofóbica de las proteínas de membrana para crear un complejo proteína detergente soluble en agua (PDCs) (Garavito y Ferguson-Miller, 2001).

Los detergentes solubilizan proteínas de membrana al unirse a las partes hidrófobas de las proteínas. Las proteínas se incorporan a estas micelas vía interacciones hidrofóbicas. Las regiones hidrofóbicas de las proteínas de membrana, normalmente embebidas en la bicapa lipídica, son ahora rodeadas por la capa de moléculas de detergente y las porciones hidrofílicas son expuestas al medio acuoso. Esto mantiene a las proteínas membranales en solución. Si se remueve completamente el detergente podría resultar en la agregación de las proteínas debido a que las regiones hidrofóbicas de estas moléculas quedan al descubierto, pudiendo causar su precipitación (Bhairi, 2001).

## 5. Purificación de los complejos *bc*

Los complejos *bc*<sub>1</sub> han sido aislados de una vasta variedad de fuentes, tales como mitocondrias de vertebrados y levaduras, plantas, tripanosomátidos y bacterias (Montoya y cols., 1999; Yu y Le Brun, 1998). El primer protocolo para la purificación de los

complejos  $bc_1$  involucra el fraccionamiento con detergentes de sales biliares (como el sulfato de amonio ó el colato de sodio, etc.). Este proceso comienza con una centrifugación del solubilizado de las membranas en la que la citocromo oxidasa se queda en la pastilla y los complejos I, II y III son selectivamente extraídos. Separar al complejo III del I y del II requiere de múltiples pasos de fraccionamiento (Berry y cols., 2000).

Entre los detergentes utilizados para purificar proteínas de membranas, el detergente sintético no iónico, dodecil maltósido (DDM), ha probado ser un agente eficiente para purificar una multitud de transductores de energía membranales, y parece ser adecuado para la extracción y el fraccionamiento de una variedad de complejos proteínicos membranales. El DDM ha sido usado para aislar a la citocromo c oxidasa, la rodopsina y los centros de reacción fotosintéticos altamente activos y estables (Ljungdahl y cols., 1987). Debido a que los detergentes no iónicos contienen una cabeza con un grupo hidrofílico no cargado, que consiste de grupos glicosídicos, son más adecuados para interrumpir interacciones lípido-lípido y lípido-proteína. Por lo tanto, estos son considerados no desnaturizantes y son ampliamente usados en el aislamiento de proteínas de membrana en sus formas biológicamente activas (Bhairi, 2001). También se ha utilizado en pruebas de extracción y mantenimiento de proteínas de membrana mostrando buenos resultados con este detergente (Tulumello y Deber, 2012).

## Antecedentes

En 1995 Yu y colaboradores identificaron al operón *qcrABC*, de *Bacillus subtilis* que codifica para una quinona: citocromo *c* reductasa y que es distinto a los complejos *bc<sub>1</sub>* y *b<sub>6f</sub>*. Yu y Le Brun en 1998 realizaron estudios sobre las subunidades del complejo *bc* de *Bacillus subtilis*, encontrando que no pertenecen a los complejos tipo *bc<sub>1</sub>* ni *b<sub>6f</sub>*, por tener características de un complejo fotosintético, aunque la bacteria no es fotosintética.

## Antecedentes directos

En 1985, Berry y Trumpower obtuvieron un supercomplejo activo formado por los complejos tipo *bc<sub>1</sub>* y citocromo *c* oxidasa de *Paracoccus denitrificans* utilizando DDM y cromatografías con las resina Dietilaminoetil (DEAE) -Celulosa, DEAE-Sefarosa y una columna de hidroxilapatita. En 1987 Ljungdahl y colaboradores purificaron los complejos *bc<sub>1</sub>* de *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* MT1131, de mitocondria de corazón de bovino y de levadura. Este fue el primer reporte de una metodología de purificación del complejo *bc<sub>1</sub>* activo de diferentes especies. Se utilizó el detergente dodecil maltósido y dos cromatografías de intercambio iónico (DEAE-Biogel y DEAE-Sefarosa CL-6B). En 1988 Kutoh y Sone purificaron el complejo quinol:citocromo *c* óxido-reductasa de la bacteria gram-positiva y termofílica *Bacillus PS3* utilizando el detergente Tritón X-100 y dos cromatografías con las resinas DEAE-celulosa y DEAE-Toyopearl. En el 2011 Yoshiki y Sakamoto aislaron un complejo tipo *bc<sub>1</sub>* de la arquea aerobia obligada *Aeropyrum pernix* utilizando también DDM en presencia de 0.3M NaCl.

En nuestro laboratorio, hemos solubilizado las membranas aisladas de *B. subtilis* con el detergente DDM, en una proporción de 0.6, 0.8 y 1.5mg DDM/mg de proteína, y utilizando una cromatografía de intercambio iónico con la resina DEAE-Biogel A (Bio-Rad). Hemos logrado aislar una fracción enriquecida del complejo *b<sub>6c</sub>*, con mayor actividad con respecto al solubilizado. También se aisló al complejo II y su actividad aumentó con respecto al solubilizado.

## Hipótesis

Si se solubilizan las membranas aisladas de *Bacillus subtilis* con el detergente DDM, los complejos respiratorios permanecerán activos y podrán aislarse al pasar el sobrenadante del solubilizado a través de una cromatografía de intercambio iónico. Después de obtener el sobrenadante del solubilizado y cargarlo a una cromatografía con las resinas DEAE-Biogel A y DEAE-Toyopearl obtendremos al complejo  $b_6c$  puro para posteriormente estudiar los complejos que se purifiquen en esta cromatografía.

## Objetivo general

Obtener una fracción enriquecida del complejo  $b_6c$  de *B. subtilis* utilizando diferentes proporciones de DDM/g proteína y también, en algunos casos, fuerza iónica.

## Objetivos particulares

- Analizar la solubilidad de las membranas de *Bacillus subtilis* con el detergente dodecil maltósido (DDM), en diferentes proporciones de detergente/proteína, para obtener una fracción del sobrenadante donde se extraiga más del 80% del complejo  $b_6c$  de *B. subtilis*.
- Obtener la pastilla y el sobrenadante del solubilizado al centrifugar y analizar por espectro de absorción, geles de poliacrilamida y medición de las actividades enzimáticas, la presencia de los complejos respiratorios.
- Utilizar este sobrenadante para aislar al complejo  $b_6c$  por medio de cromatografías con diferentes resinas de intercambio iónico.
- Analizar la composición de los complejos respiratorios de cada fracción obtenida, en la cromatografía por espectro de absorción, geles de poliacrilamida, medición de la actividad de los complejos respiratorios y electroforesis nativa.

## Materiales y métodos

### **1. Crecimiento de las células de *B. subtilis*:**

*Bacillus subtilis* 168 se adquirió del *Bacillus* Genetic Stock Center (Ohio State University). Se inocularon 3.5ml de medio súper rico (MSR) (2.5% Bacto-triptona, 2% extracto de levadura, 0.3%  $K_2HPO_4$  y 3% succinato de sodio a pH 7.5) suplementado con una solución de micronutrientes, 300ul/Lt (2.2%  $MnCl_2$ , 0.5%  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5%  $H_3BO_3$ , 0.016%  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.025%  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.46%  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  y 0.5% (v/v)  $H_2SO_4$  concentrado) con una asada de células de *Bacillus subtilis* de una caja con LB placa y se dejaron crecer a 37°C toda la noche (ON) a 200rpm. Después este inoculó se vertió en un matraz de 2.5L que contenía 1L de MSR y se incubó por 23hrs, a 37°C con un movimiento en orbital de 200rpm (Henning y cols., 1995).

### **2. Cosecha de cultivos saturados de *B. subtilis*:**

A las 23hrs se midió la densidad óptica (D.O.) del medio a 600nm, en la cual el valor óptimo fue de 0.4 de absorbancia o superior. Después el medio se centrifugó 20min a 5000rpm en la centrifuga Sorvall Evolution RC con el rotor GSA. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100mM de amortiguador de fosfatos pH 6.6 y se centrifugó en el rotor SS-34 10min a 8000rpm. Se decantó el sobrenadante, se pesaron los gramos de células obtenidos y la pastilla se guardó a -20°C (Konings y Freese, 1972).

### **3. Obtención de membranas:**

Se obtuvieron las membranas por el método de lisis celular usando 70g de bacterias en amortiguador de 50mM fosfatos de potasio pH 8 y se añadió 0.1-0.15mM de 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF), como inhibidor de proteasas. Se agregó 0.3g/L de lisozima, 10mg/L de DNAsa y 10mg/L de RNAsa y se incubaron 15min a 37°C a 140rpm. Después se les puso 10mM final de  $MgSO_4$  y una mezcla de inhibidores de proteasas (250mM  $\epsilon$ -aminocaproico, 2mM EDTA) incubando 37°C 2min y se agregó  $MgSO_4$  a una concentración final de 20mM. Se centrifugaron a 5000rpm 20min con el rotor GSA, se juntaron los sobrenadantes y se volvieron a centrifugar por 42min a 11,000rpm en el rotor GSA. El sobrenadante se decantó y se resuspendieron las membranas con 0.1M amortiguador de fosfatos de potasio pH 6.6;

después se centrifugaron de nuevo durante 15min a 15,000rpm en el rotor SS-34. La pastilla se resuspendió en el volumen mínimo con el mismo amortiguador de fosfatos y se agregó Glicerol 1:1, 1mM AEBSF e inhibidores de proteasas (marca Roche) (2ml por cada 50ml), las membranas se guardaron a -20°C (Hagerhall y cols., 1992; Hederstedt, 1986).

#### **4. Solubilización con DDM/g proteína:**

Se tomaron 500mg de proteína de membrana y se diluyeron en amortiguador B3 (50mM Tris HCl pH 8 a 4°C, 1mM MgSO<sub>4</sub>), para lavarlas y eliminar el glicerol. Se centrifugaron a 13,000 rpm a 4°C durante 30min. Pasado este tiempo se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con el volumen mínimo necesario con amortiguador B3; terminado este paso se diluyó a un volumen final para tener una concentración de 10 mg/ml de proteína con 50mM final de Tris pH 7.4, 1mM final de MgSO<sub>4</sub> (B3), cocktail de inhibidores de proteasas (Roche), 1mM final de AEBSF, 1.5mg DDM/mg proteína (Stock DDM 200µg/µl) y 100mM final de NaCl (Ljungdahl y cols., 1987). Lo anterior se colocó en agitación durante 1hr a 4° C. En cada paso de la purificación se tomó 1ml de muestra y se le agregó glicerol 1:1 e inhibidores de proteasas (1mM final de AEBSF, e inhibidores de proteasas marca Roche) a -20°C. La muestra se centrifugó a 45,000 rpm una hora a 4° C con un rotor T875 y se colectó el sobrenadante sin la capa blanca de lípidos, midiéndose el volumen y agregando inhibidores de proteasas (1mM final de AEBSF, e inhibidores marca Roche) esperando la segunda solubilización. La pastilla se resuspendió en B3 y se le agregaron inhibidores de proteasas, después se le hizo una cuantificación de proteínas (Lowry y cols., 1951; modificado por Markwell en 1978 para proteína de membrana) y se analizó por medio de espectros de absorción. Se guardó una muestra de la pastilla del mismo modo que el solubilizado y el sobrenadante. Se realizó una segunda solubilización con los pasos anteriores. Los dos sobrenadantes obtenidos se juntaron, se dializaron y se aplicaron a la columna. Los sobrenadantes y pastillas (de ambas solubilizaciones) se analizaron junto con las fracciones obtenidas de la cromatografía.



## **5. Diálisis de la muestra:**

Los sobrenadantes del solubilizado se dializaron a 4° C durante toda la noche utilizando una membrana para diálisis Spectra/por de 3,500 contra un 100 volúmenes del sobrenadante de amortiguador B3, manteniendo una agitación constante. Esto para que el NaCl utilizado en la solubilización de las membranas no interfiriera con las cargas de las proteínas a la hora de cargarlas en la cromatografía.

## **6. Cromatografía de intercambio iónico:**

Se equilibró la resina DEAE-Biogel A de BioRad con 10 volúmenes de amortiguador B3 más 0.1mg/ml de DDM. Una vez cargada la muestra, se realizó un lavado con amortiguador B3 con 10mM de NaCl, 2 volúmenes de columna, con amortiguador B3 con 40mM de NaCl, 3 volúmenes de columna, con amortiguador B3 con 100mM de NaCl, 3 volúmenes de columna, un gradiente de amortiguador B3 con 100 a 500mM de NaCl, 3 volúmenes de columna y un lavado más con amortiguador B3 con 500mM de NaCl, 1 volumen de columna. Al finalizar se hizo un perfil de absorción de las fracciones tomando la absorbancia a 280 y 415nm de cada fracción y se colectaron aquellas cuyos picos de absorbancia fueron altos (absorbancia mayor a 0.01) así como coincidentes. Se agregaron inhibidores de proteasas y DDM a 0.1mg/ml (al total a concentrar); se concentró cada fracción al mínimo volumen posible en centricones (Millipore) de 15ml, centrifugando a 3500rpm y añadiendo al final glicerol en proporción 1:1, 0.15mM AEBSF y la mezcla de inhibidores de proteasas.

Se realizó una segunda cromatografía con la resina DEAE-Toyopearl de Tosoh para algunas fracciones de la primera cromatografía. Se equilibró la columna con 10 volúmenes de columna de amortiguador B3 más 0.1mg/ml de DDM. Ya cargada la muestra se realizó un lavado con amortiguador B<sub>3</sub> con 10mM de NaCl, 2 volúmenes de columna, amortiguador B3 con 40mM de NaCl, 3 volúmenes de columna, amortiguador B3 con 100mM de NaCl, 2 volúmenes de columna, un gradiente con amortiguador B3 de 100 a 500mM de NaCl, 6 volúmenes de columna y un lavado con amortiguador B3 con 500mM NaCl. Se hizo un perfil de absorción de las fracciones tomando la absorbancia a 280 y 415nm de cada fracción, colectando aquellas cuyos picos de absorbancia fueron los más altos así como coincidentes. Se agregaron inhibidores de proteasas y DDM a 0.1mg/ml (al total a concentrar) y se concentró cada fracción al mínimo volumen posible

en centricones (Millipore) de 15ml, centrifugando a 3500rpm y añadiendo al final glicerol 1:1, 0.15mM AEBSF y mezcla de inhibidores de proteasas (Kutoh y Sone, 1988).

## 7. Obtención de espectros de absorción:

Los espectros de absorción se obtuvieron para las membranas, el solubilizado, el sobrenadante, la pastilla y las fracciones de las cromatografías, utilizando un espectrofotómetro DW2 Aminco con modernización de OLIS, para observar e identificar a los citocromos característicos de cada complejo respiratorio y para conocer qué complejo o complejos se encontraron en cada muestra y para determinar su concentración. Se corrió una línea base de 400 a 650nm con amortiguador 0.1M de fosfatos de potasio pH 6.6 para las membranas o amortiguador B3 para las fracciones obtenidas de la solubilización y de las cromatografías. Se corrió un espectro primero para las muestras oxidadas. Se utilizaron ascorbato y ditionita, ambos son donadores de electrones que se utilizaron para reducir a los complejos respiratorios. El ascorbato es un reductor más débil que la ditionita. A la muestra se le agregaron unos cuantos granos de ascorbato y se corrió un espectro de 400 a 650nm y después se agregó ditionita y se corrió el espectro en el mismo rango de longitudes de onda. Se obtuvo un espectro diferencial de los espectros reducidos menos los oxidados y después se hizo un diferencial entre el reducido con ascorbato menos oxidado, menos el reducido con ditionita menos oxidado. Para identificar a los citocromos se usaron las siguientes longitudes de onda coeficientes de extinción molar: (Tabla 2).

Tabla 2. Coeficientes de extinción molar de los citocromos  $c+c_1$ ,  $b$  y  $a$  de la cadena respiratoria para *Bacillus subtilis* (de Vrij y cols., 1987).

	Longitud de onda (nm)	Coefficiente de extinción ( $\epsilon$ )
<b>Citocromo c</b>	550	19.1mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
<b>Citocromo b</b>	560	20mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
<b>Citocromo a</b>	600	16.5mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>

## 8. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry:

Para este método colorimétrico se construyó una curva patrón con cantidades crecientes albúmina sérica de bovino (ASB) (0-20 $\mu$ g) usando la concentración de 100 $\mu$ g/ml. La curva, así como las muestras problema se hicieron por duplicado. Se preparó una solución A fresca (20g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4g/L NaOH<sub>4</sub>, 2g/L NaK tartrato de sodio-

potasio y 1% SDS) la cual se mezcló con la solución B (4% CuSO y agua bidestilada) en una proporción 99 A: 1 B. Se hizo una dilución de la muestra problema 1:100 en agua y se pusieron cantidades crecientes en diferentes tubos. Se añadió agua hasta 200µl a todos los tubos. Se agregó la solución A+B a todos los tubos, se mezclaron y se incubaron durante 10 minutos. Después se les añadió el reactivo de Follin (dilución 1:1 en agua), se mezclaron y se incubaron treinta minutos. Se leyeron las absorbancias de los tubos en el espectro a 750nm. La concentración de la muestra se determinó por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón (Lowry y cols., 1951; Markwell y cols., 1978).

### **9. Geles de poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Litio (LiDS):**

Se corrieron electroforesis en geles de poliacrilamida con 10% LiDS, (19.7cm de alto por 16cm ancho, por 2mm de grosor). Para el amortiguador superior se usó un stock de electroforesis (0.9% de Tris y 5.76% de glicina) y agua. Para el amortiguador inferior se utilizó el mismo stock además de 1mM final de EDTA y 0.1% de LiDS. El gel de separación se preparó al 14% de acrilamida y 0.45% de Bis acrilamida con una solución conteniendo 400mM de Tris pH 8.8, 0.1% de LiDS, 0.03% de persulfato de amonio y 1% de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED). El gel condensador se preparó al 5% de acrilamida y 0.16% de Bis acrilamida conteniendo además 146.2mM de Tris pH 6.8, 0.1% de LiDS, 0.03% de persulfato de amonio y 1.12% de TEMED. Las muestras se trataron utilizando una mezcla digestora con 12% glicerol, 62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 1mM AEBSF y 2ml por cada 50ml de muestra de inhibidores de la marca Roche. Se utilizaron marcadores de peso molecular de la marca Promega (no teñidos), con un rango de 200 a 7kDa. Los geles se corrieron a 50V, 600mA, 250W 3hrs y después a 140V, 250W, 19hrs a 4° C. Para los geles de la cromatografía con DEAE-Biogel A se tomaron en cuenta los nmoles de citocromos necesarios para que estos se pudieran observar en la tinción con TMBZ tomando en cuenta siempre al citocromo en menor concentración, por esto la cantidad de proteína varió en cada fracción mientras que para los geles de las cromatografías con DEAE-Toyopearl se cargó una cantidad similar de proteína en cada fracción, pero cuidando que la concentración de citocromo c no disminuyera de la mínima concentración para poder observarse en la tinción.

#### **10. Geles claros nativos de alta resolución (primera dimensión):**

Se corrieron electroforesis en geles claros nativos de alta resolución (16cm de alto por 16cm de ancho, por 1.5mm de grosor). Se utilizó un amortiguador superior a pH 7 (50mM de Tricina, 15mM de Bis-Tis, 0.02% de DDM y 0.05% deoxicolato) y un amortiguador inferior a pH 7 (15mM de Bis-Tris). El gel separador se preparó con un gradiente del 4% de acrilamida, 0.12% Bis acrilamida al 13% de acrilamida, 0.4% bis acrilamida por separado. La mezcla con 4% de acrilamida además contenía amortiguador con 8.35mM final de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, 2.506mM final de Bis-Tris, 0.03% final de TEMED y 0.03% final persulfato de amonio, y la mezcla con acrilamida al 13% contenía además amortiguador con 15.918mM final de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, 4.775mM final de Bis-Tris, 0.03% final de TEMED y 0.03% final persulfato de amonio. El gel condensador se preparó al 4% de acrilamida, 0.12% Bis acrilamida y amortiguador con 50mM ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, 15mM Bis-Tris, 0.066% final de TEMED y 0.053% final de persulfato de amonio. A las muestras se les agregó rojo de Ponceau S para tener un frente durante la electroforesis y 1mM AEBSF. Se utilizaron los marcadores de peso molecular preteñidos marca Nippon Genetics con un rango de 170 a 15kDa. El gel se cargó a 4° C y se corrió a 100V, 20mA, 250W por 90min y después a 500V, 20mA, 250W por 180min (Wittig y cols 2007).

#### **11. Geles de segunda dimensión de poli(acrilamida) en condiciones desnaturalizantes (SDS):**

Los geles de primera dimensión se retiraron de las placas y se cortaron en tiras correspondiendo a cada carril del gel. Se incubaron a temperatura ambiente y en agitación durante una hora en el amortiguador de segunda dimensión (2.5% dodecil sulfato de sodio, 10% glicerol, 62.5mM Trizma base y 10mM Ditiotreitól (DTT)). Las tiras se secaron sobre de las placas de vidrio de 10 a 20min y después se prepararon los geles de segunda dimensión con un gel condensador al 4% de acrilamida, 0.13% Bis acrilamida, 745.033mM final de Tris pH 8.45 del amortiguador, 0.3% SDS, 0.066% final de TEMED y 0.066% final de persulfato de amonio. El gel separador se preparó al 14% de acrilamida, 0.4% Bis acrilamida, 996.346mM final de Tris pH 8.45, 0.3% SDS, 79.5% final de glicerol, 0.033% final de TEMED y 0.033% final de persulfato de amonio. Se utilizaron los marcadores de peso molecular preteñidos marca Nippon Genetics con un rango 175 a 15kDa. Se corrieron a 45V durante tres horas y después a 120V durante 12hrs (Schägger y cols. 1994).

## **12. Tinción de geles con tetrametil bencidina (TMBZ):**

Se preparó una solución fresca de 6.3mM TMBZ en metanol y se mezclaron tres partes de bencidina-metanol con 7 partes de 0.25M acetato de sodio pH 5.0. Los geles se sumergieron en esta mezcla en agitación y en obscuridad de 1 a 2hrs. Pasado este tiempo se les agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta una concentración final de 30mM. La tinción es visible a los 3min y se incrementa hasta los 30min. Los geles se pusieron en una mezcla de 3 partes de isopropanol y 7 partes de 0.25M acetato de sodio a pH 5.0, con la cual se lavaron 2 veces para eliminar los residuos de bencidina (Thomas y cols., 1976). Se utilizaron 0.2nmoles de citocromo c de caballo mezclado con los marcadores de peso molecular como control positivo para esta tinción. Se escanearon después de la tinción en un escáner HP Scanjet 4070 Photosmart.

## **13. Tinción con azul de Coomasie:**

Se preparó la solución de azul de Coomasie con metanol al 50%, ácido acético al 10% y azul brillante de Coomasie R al 0.25%. Los geles se sumergieron en esta solución durante toda la noche. Después se revelaron con una solución desteñidora (metanol al 15%, ácido acético al 10% y agua). Se escanearon en un escáner HP Scanjet 4070 Photosmart (Laemmli, 1970).

## **14. Tinción con nitrato de plata:**

Los geles se fijaron durante 20min con solución fijadora (50% metanol y 5% ácido acético), después se lavaron 3 veces con agua bidestilada por 20min y se incubaron en solución sensibilizadora (0.02% tiosulfato de sodio) durante 2min. Se lavaron nuevamente con agua bidestilada 2 veces, durante 1min. Se agregó la solución de nitrato de plata (0.1% nitrato de plata) y se incubaron por 1hr a 4°C en agitación constante. Se volvieron a lavar con agua bidestilada 2 veces, durante 1min. Se añadió la solución reveladora (2% carbonato de sodio y 0.04% formaldehído). Se agitó hasta que la intensidad fue la deseada y se sumergieron en la solución de paro (5% ácido acético) ([http://msf.ucdavis.edu/silverstaining\\_protocols.html](http://msf.ucdavis.edu/silverstaining_protocols.html)). Se le tomó una foto con el fotodocumentador Biotop Biosens SC-645 Gel Documentation System.

### 15. Medición de actividades enzimáticas:

Se realizaron ensayos enzimáticos para la medición de la actividad de los complejos respiratorios NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, complejo  $b_6c$  y citocromo  $c$  oxidasa  $caa_3$  en el espectrofotómetro de doble haz (Aminco, modernización de OLIS). El ensayo I para los complejos succinato deshidrogenasa, complejo  $b_6c$  y citocromo  $c$  oxidasa  $caa_3$ , se hizo a 2 longitudes de onda en modo dual (550 y 540nm) observando la óxidorreducción del citocromo  $c$  y el ensayo II para los complejos NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa, en modo dual (600 y 750nm) en el cual se midió la reducción del DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol). En el ensayo I se utilizó un amortiguador de actividad (50mM Fosfatos de potasio pH 7, 250mM sacarosa, 0.2mM EDTA pH 8 y 0.01% Tween-20). Las membranas se diluyeron previamente en una relación de 1:3 volúmenes con amortiguador de actividad y se incubaron en hielo durante media hora. Los reactivos del ensayo fueron (en orden de adición): 10 $\mu$ M de citocromo  $c$  reducido, 0.3mg de proteína de muestra, 8 $\mu$ M de rotenona, 1mM de KCN, 5mM succinato de Na, 30 $\mu$ M de citocromo  $c$  oxidado, 2mM de TTFA, 2mM de EDTA, 200 $\mu$ M de DBH<sub>2</sub> y 1 $\mu$ M de Antimicina. Para el ensayo II se utilizó el buffer de actividad con azida de Na. El orden de adición de los reactivos y su concentración final fue 0.3mg de muestra 1mM KCN, 40 $\mu$ M DCPIP, 50 $\mu$ M NADH, 8 $\mu$ M rotenona, 40 $\mu$ M DCPIP, 5mM succinato de Na, 1mM PMS, 4mM TTFA, 40 $\mu$ M DCPIP (opcional) y 80 $\mu$ M DQ. El coeficiente de extinción utilizado para el citocromo  $c$  fue de 19.1mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> y el de DCPIP de 22mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Estos se utilizaron para calcular la velocidad de cada una de las enzimas utilizando la pendiente que se obtiene después de cada adición (Benit y cols., 2006).

### 16. Medición del consumo de oxígeno por el método de oximetría:

Se utilizó el equipo unidad de control del electrodo CB1-D3 y la cámara de oxígeno del electrodo DW1 de la marca Hansatech. Se realizaron 2 ensayos diferentes. Para el primer ensayo las membranas de *B. subtilis* y las fracciones de las cromatografías se incubaron media hora diluidas a una relación 1:3 en amortiguador de actividad sin azida de sodio (250mM de sacarosa, 50mM de fosfatos de potasio pH 7, 0.1% Tween-20, 1mM de NaN<sub>3</sub>) a 4°C. El ensayo se realizó a temperatura ambiente. Se comenzó el ensayo agregando el amortiguador, después la muestra, después se agregó 200 $\mu$ M de DBH<sub>2</sub>, 1mM de azida de sodio y 5mM de NaCN con un cálculo de 253.4nmol O<sub>2</sub> en 1ml como volumen final.

Para el segundo ensayo las muestras se incubaron 10min con una dilución 1:3 en amortiguador con 25mM de fosfatos de sodio pH 7 a 4° C. Se comenzó el ensayo agregando el amortiguador, después la muestra, 20mM succinato de sodio pH 7, 200μM DBH<sub>2</sub>, 5mM ascorbato (preparado en 25mM fosfatos de sodio pH 7), 5μM Tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD), 10mM azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) y 5mM NaCN (Assempour y cols. 1998).

## Resultados

### 1. Crecimiento de las células de *Bacillus subtilis*:

Al crecer a *B. subtilis* en MSR suplementado con 3% de succinato en condiciones bien aireadas se obtuvo un rendimiento promedio de 12.9g de células por litro. Por 75g de células utilizadas se obtuvieron 47.5ml de membranas por medio de lisis celular a una concentración de proteína de 13.67mg/ml. En la siguiente tabla se muestran los datos de la extracción de las membranas a partir de 75g de bacterias (Tabla 3).

Tabla 3. Datos representativos de la extracción de membranas realizada.

	<b>Cantidad de células utilizadas</b>	<b>Vol. De membranas</b>	<b>Concentración de proteínas</b>	<b>Proteína total</b>	<b>nmoles de citocromos totales en 47.5ml de membranas</b>
<b>Membranas</b>	75g	50ml	13.67mg/ml	649.37mg	
Citocromo <i>c</i>					1267.48nmoles
Citocromo <i>b</i>					1075.93nmoles
Citocromo <i>a</i>					587.63nmoles

### 2. Espectros de absorción de membranas.

En la figura 8 se observa el espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado) de las membranas de *B. subtilis*, en el que se obtuvieron los siguientes picos de absorción. Un pico alrededor de 552nm para el citocromo *c*, un pico alrededor de los 560nm para el citocromo *b* y un pico alrededor de los 602nm para el citocromo *a*, en la tabla 4 se muestra la concentración de citocromos *c*, *b*, y *a* obtenidos del espectro.

Se observó que la concentración de citocromo *b* y *c* es muy similar, mientras que la del citocromo *a* es casi la mitad de ambos.



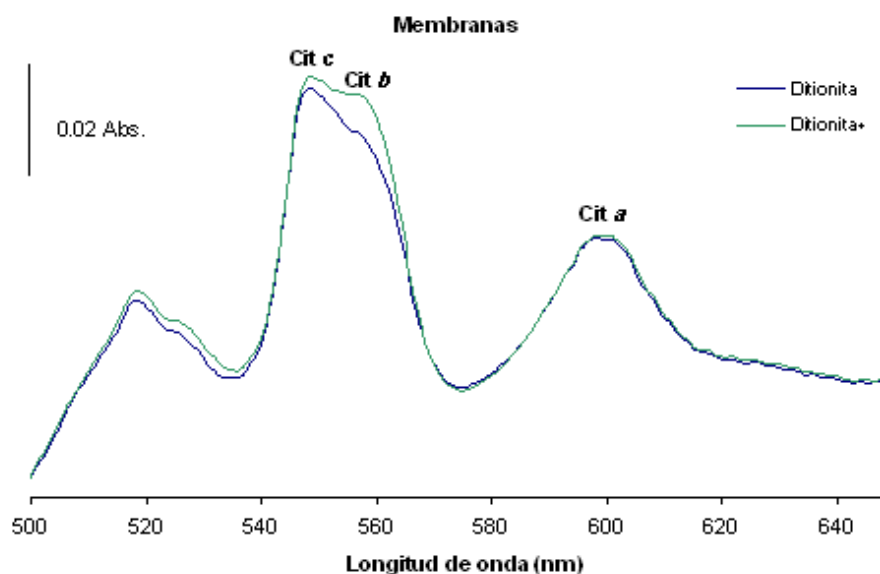


Figura 8. Espectros diferenciales de absorción (reducido con ditionita menos oxidado) de las membranas extraídas de células de *B. subtilis* crecidas con 3% de succinato. Se utilizaron 3mg de proteína de membrana para el espectro. La absorbancia se muestra del lado izquierdo con un intervalo de 0.02 unidades de Absorbancia. En la línea azul se muestra el diferencial reducido con ditionita menos oxidado y en verde un segundo diferencial reducido con ditionita menos oxidado cuando se agregó más ditionita. Cit c, b y a señalan los picos característicos a 550, 560 y 600nm, respectivamente.

Tabla 4. Relación de citocromos en concentración absoluta ( $\mu\text{M}$ ) y concentración relativa (nmoles/mg prot.) de membranas de *B. subtilis* crecidas en MSR con 3% de succinato utilizando los datos de la figura 8.

	$\mu\text{M}$	nmoles/mg proteína.	Proporción por cit c
<b>Citocromo c</b>	28.189	2.061	
<b>Citocromo b</b>	27.007	1.975	0.96
<b>Citocromo a</b>	12.895	0.943	0.45

### 3. Solubilización de membranas con diferentes proporciones de DDM/mg de proteína de membrana. Análisis por espectros diferenciales de absorción de las fracciones obtenidas de la solubilización.

Se realizaron varias solubilizaciones con diferentes relaciones detergente: proteína: 0.6, 0.8, 1.5, 6 y 10mg DDM/mg de proteína, para encontrar la relación con la que se consiguiera la mayor cantidad de citocromo b en el sobrenadante, después de centrifugar cada solubilizado. Se tomó en cuenta este citocromo por haber dos hemis b del complejo  $b_6c$ , por tanto serían diagnósticos de la presencia del complejo  $b_6c$  en el sobrenadante del solubilizado.

En los sobrenadantes de todas las solubilizaciones se obtuvieron espectros diferenciales (reducidos con ditionita menos oxidados) muy parecidos al espectro de las

membranas, observándose picos para citocromos *c* alrededor de 550nm, *b* alrededor de 560nm y citocromos *a* alrededor de 600nm en todos los casos (Figura 9).

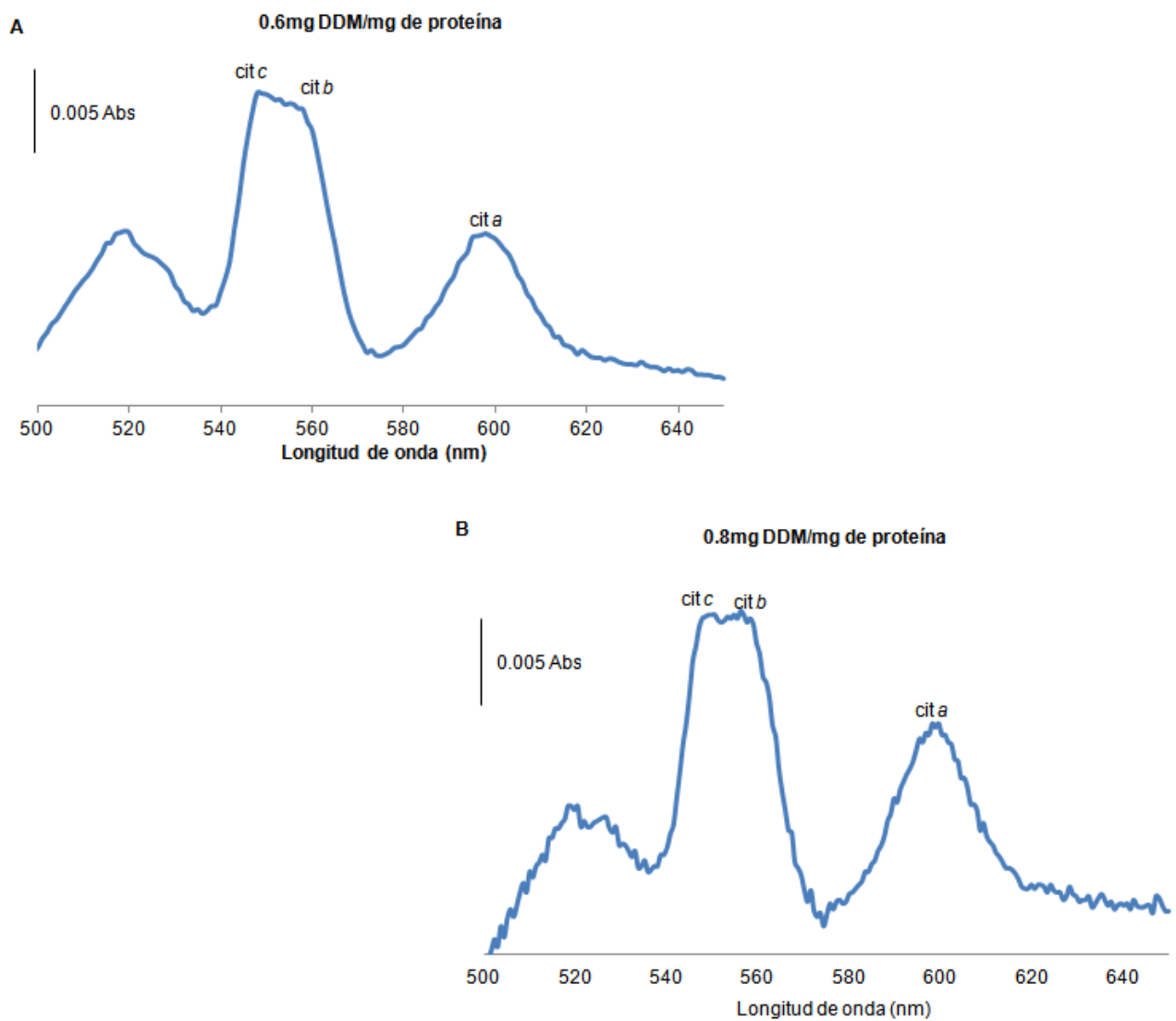
En la tabla 5 se muestra el análisis de las solubilizaciones realizadas en base a las concentraciones de citocromos utilizando los espectros de absorción de la figura 9. Las concentraciones de citocromos *b* extraídos en el sobrenadante y en la pastilla se representaron en porcentajes tomando al solubilizado como el 100%. Con 0.6mg DDM/mg de proteína se recuperó el 55.1% del total del citocromo *b*, con 0.8mg DDM/mg de proteína disminuyó al 37.92% y con 1.5mg DDM/mg de proteína se obtuvo 67.07% siendo el mayor porcentaje de recuperación de todas las relaciones. Después de 6mg DDM/mg de proteína, el porcentaje de citocromo *b* comenzó a decrecer hasta un 17.84% y un 16% con 10mg DDM/mg de proteína. En la tabla 5 se observan también diferentes volúmenes para las solubilizaciones porque se realizaron varias pruebas en un principio con volúmenes pequeños y después se aumentaron para obtener mayor cantidad de proteína para los experimentos.

La mejor relación detergente: proteína fue de 1.5mg de DDM/mg de proteína, al extraer la mayor cantidad de citocromo *b* con un 67.07% en el sobrenadante del solubilizado y una concentración de proteína de 2.63mg/ml.

Tomando en cuenta la concentración micelar crítica del DDM la cual es de 0.17mM (0.009% w/v) en agua se realizaron cálculos para conocer si en las diferentes relaciones de detergente proteína utilizadas en este trabajo se rebasó la CMC en los cuales se observó que las relaciones de 0.6 y 0.8mg DDM/mg de proteína se encontraron por debajo de la CMC con concentraciones de 0.012 y 0.016mM de DDM mientras que las relaciones de 1.5, 6 y 10mg DDM/mg de proteína sobrepasaron la CMC con concentraciones de 0.294, 1.176 y 1.961mM, estas dos últimas sobrepasándolo por mucho.

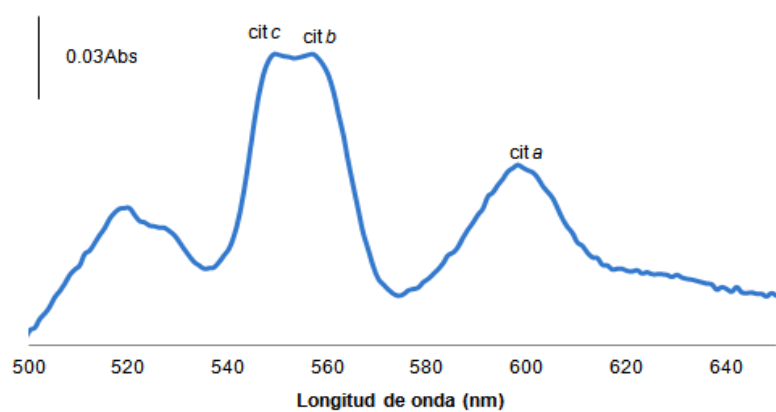
Se repitió la solubilización de las membranas con 1.5mg de DDM/mg de proteína pero ahora en presencia de NaCl para mejorar la separación del complejo *b<sub>6</sub>c* y la

citocromo *c* oxidasa porque se ha reportado que se obtienen juntos en los diferentes pasos de la purificación del complejo tipo *bc*. Con el NaCl se obtuvo el 80% del citocromo *b* en el sobrenadante (Tabla 5).



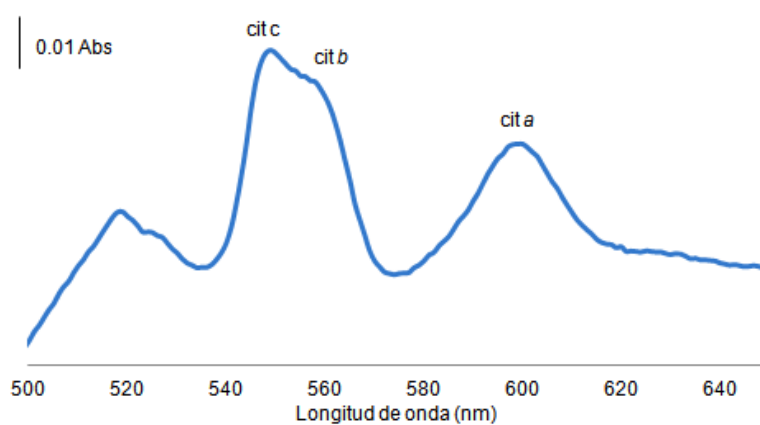
C

1.5mg DDM/mg de proteína



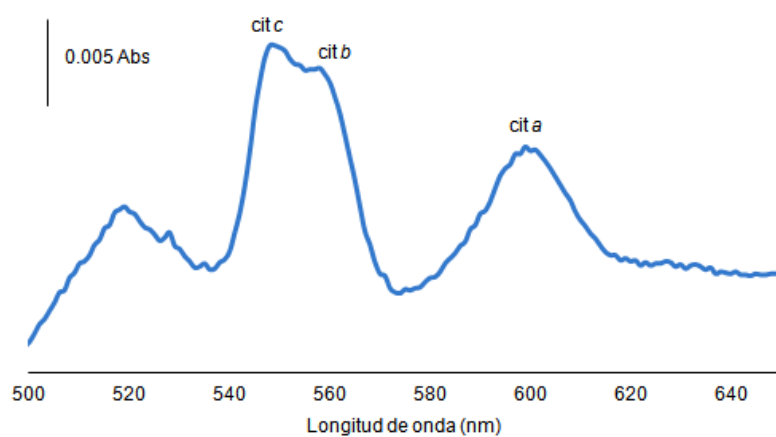
D

1.5mg DDM/mg de proteína + 0.1M de NaCl



E

6mg DDM/mg de proteína



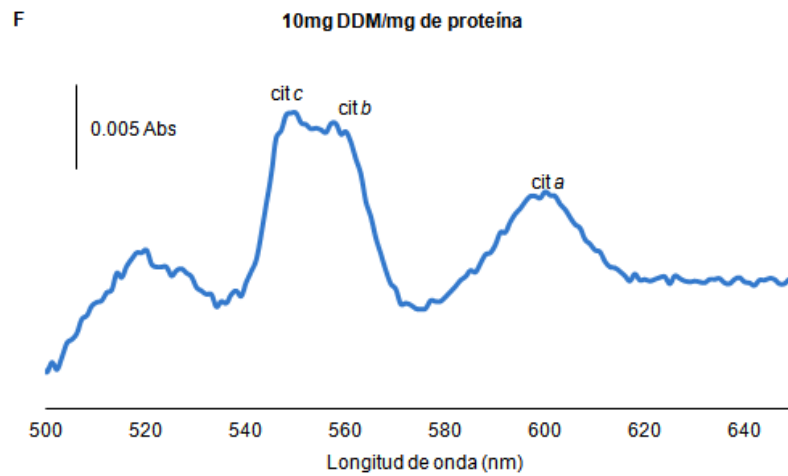


Figura 9. Espectros diferenciales de absorción (reducidos con ditionita menos oxidados) de los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación de las diferentes solubilizaciones, que se realizaron con las relaciones de DDM que se indican. Entre paréntesis se indica la cantidad de muestra utilizada para el espectro de absorción. A. 0.6mg de DDM/mg de proteína (0.5mg de proteína). B. 0.8mg de DDM/mg de proteína (0.5mg de proteína). C. 1.5mg de DDM/mg de proteína (0.37 mg de proteína). D. 1.5mg de DDM/mg de proteína mas 0.1M de NaCl (0.4mg de proteína). E. 6mg de DDM/mg de proteína (0.263mg de proteína). F. 10mg de DDM/mg de proteína (0.2mg de proteína).

Tabla 5. Porcentaje de recuperación del citocromo *b* con respecto a los sobrenadantes y pastillas obtenidos de cada solubilizado con diferentes relaciones: detergente proteína. El complejo *b<sub>6c</sub>* tiene un citocromo con un grupo hemo *b<sub>i</sub>*, un grupo hemo *b<sub>h</sub>*, un grupo hemo denominado hemo *x* y un citocromo *c* con un grupo hemo *c* unido covalentemente. Por esto se decidió utilizar la solubilización con la cual se extrajera mayor cantidad de citocromo *b* lo que indicaría mayor cantidad de complejo *b<sub>6c</sub>*.

Volumen de muestra	uM			nmol totales			% de recuperación de citocromo <i>b</i> con respecto al solubilizado
	Citocromo <i>a</i>	Citocromo <i>b</i>	Citocromo <i>c</i>	Citocromo <i>a</i>	Citocromo <i>b</i>	Citocromo <i>c</i>	
<b>0.6mg DDM/mg de proteína</b>							
Solubilizado 26.5	8.03	12.6	12.3	212	335.2	326.7	100
Sobrenadante 25ml	4.03	7.4	6.973	100	185	172.5	55.1
Pastilla 3.3ml	18.121	27.1	32.052	59.73	89.43	105.6	26.6
<b>0.8mg DDM/mg de proteína</b>							
Solubilizado 5ml	3.8	7.15	5.45	18.5	35.5	27.085	100
Sobrenadante 4ml	3.815	7.15	7.55	15.26	28.6	30.2	37.92
Pastilla 0.7ml	19.3	31.9	31	13.51	22.33	21.7	29.612
<b>1.5mg DDM/mg de proteína</b>							
Solubilizado 25ml	6.3	11.4	11.3	150	286.2	282.7	100
Sobrenadante 24ml	4.93	8.95	8.34	96	192	192	67.07
Pastilla 1ml	22.594	41.2	49.43	22	41.2	49	14.3
<b>1.5mg DDM/mg de proteína con NaCl</b>							
Solubilizado 50ml	3.545	6.48	7.657	177.25	324	382.89	100
Sobrenadante 47ml	3.709	5.49	6.521	174.323	258.03	306.489	80.046
Pastilla 3ml	9.309	17.14	21.305	27.927	51.42	63.915	16.692
<b>6mg DDM/mg de proteína</b>							
Solubilizado 5ml	27.48	6.12	6.63	135	30.6	33.15	100
Sobrenadante 1.012ml	3.181	5.45	5.71	3.137	5.464	5.768	17.84
Pastilla 0.7ml	2.587	5.145	8.178	1.75	3.57	5.67	11.66
<b>10mg DDM/mg de proteína</b>							
Solubilizado 5ml	3.33	6.7	7.28	15	33.5	36	100
Sobrenadante 1.031ml	2.575	5.25	5.763	2.57	5.361	5.876	16
Pastilla 0.356ml	4.2	9.485	11.568	1.495	3.346	3.916	9.97

#### 4. Cromatografía de intercambio iónico con la resina DEAE-Biogel A.

El sobrenadante de la doble solubilización con 1.5mg DDM/mg de proteína más 0.1M de NaCl con la que se extrajo una mayor concentración de citocromo *b* y una buena cantidad de proteína, se dializó para eliminar el NaCl para que la unión a la resina fuera eficiente (Figura 10 a). Se obtuvo un perfil de la cromatografía con la absorción a 280nm para proteína y a 415nm para los citocromos de cada fracción colectada (Figura 10 b). Del perfil se eligieron los tubos cuya absorbancia fue mayor para ambas longitudes de onda (Figura 11). Los picos más grandes se obtuvieron a las concentraciones de 10, 100, 321.2 (55.3% del gradiente) y 355.3mM de NaCl (63.8% del gradiente) (Tabla 6). También se pudo apreciar en el perfil que la mayoría del citocromo salió en el lavado de 100mM, mientras que la mayoría de la proteína salió durante el gradiente, a concentraciones mayores de 300mM de NaCl.

A los tubos de cada pico se les hicieron espectros de absorción para conocer los tipos de citocromos resueltos, se concentraron las fracciones correspondientes a los tubos y se obtuvieron 6 fracciones en total con espectros distintos. Para la fracción I se concentraron del tubo 9 al 18, para la fracción II se concentraron del tubo 109 al 111, para la fracción III se concentró el tubo 112, para la fracción IV se concentraron del tubo 113 al 140, para la fracción V se concentraron del tubo 146 al 152 y para la fracción VI se concentraron del tubo 153 al 169.

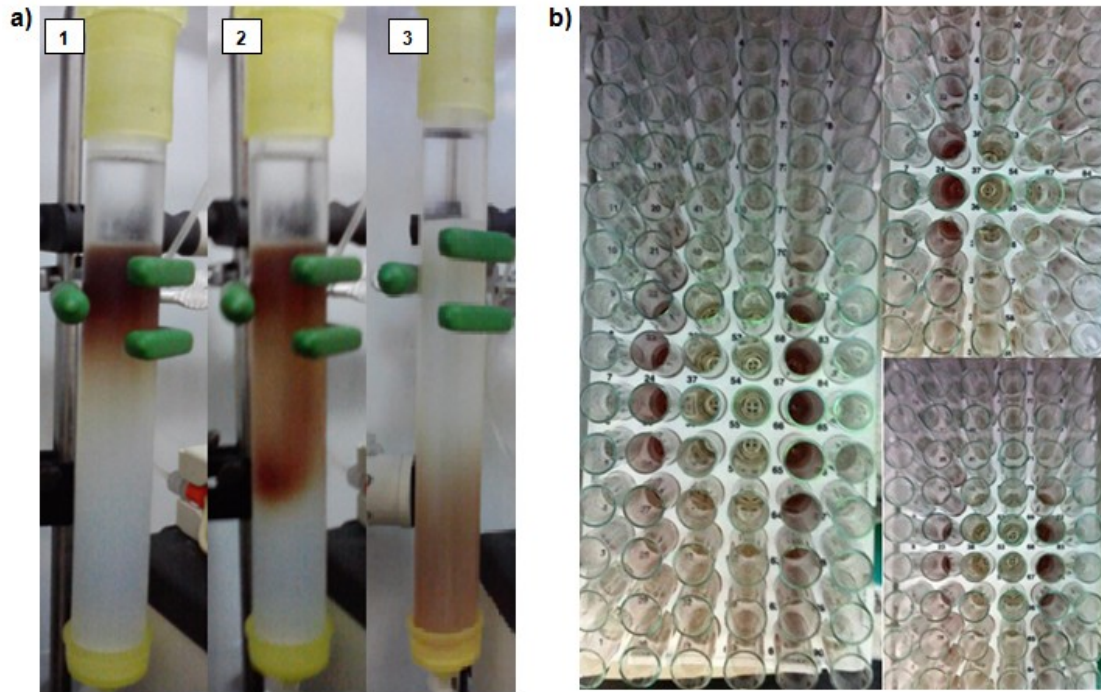


Figura 10. a) Sobrenadante de la solubilización con 1.5mg DDM/mg de proteína corriendo a través de la resina de intercambio iónico DEAE-Biogel A. 1. El sobrenadante se observa en la parte superior de la columna, con los lavados de 10, 40 y 100mM de NaCl. 2. Muestra corriendo con el lavado de 100mM de NaCl. 3. Muestra corriendo con el gradiente de 100 a 500mM de NaCl y el último lavado con 500mM de NaCl. En todos los lavados se utilizó el amortiguador B3. b) Fracciones obtenidas de la cromatografía (DEAE-Biogel A). Se observaron diferentes patrones de colores en las fracciones que se fueron obteniendo.

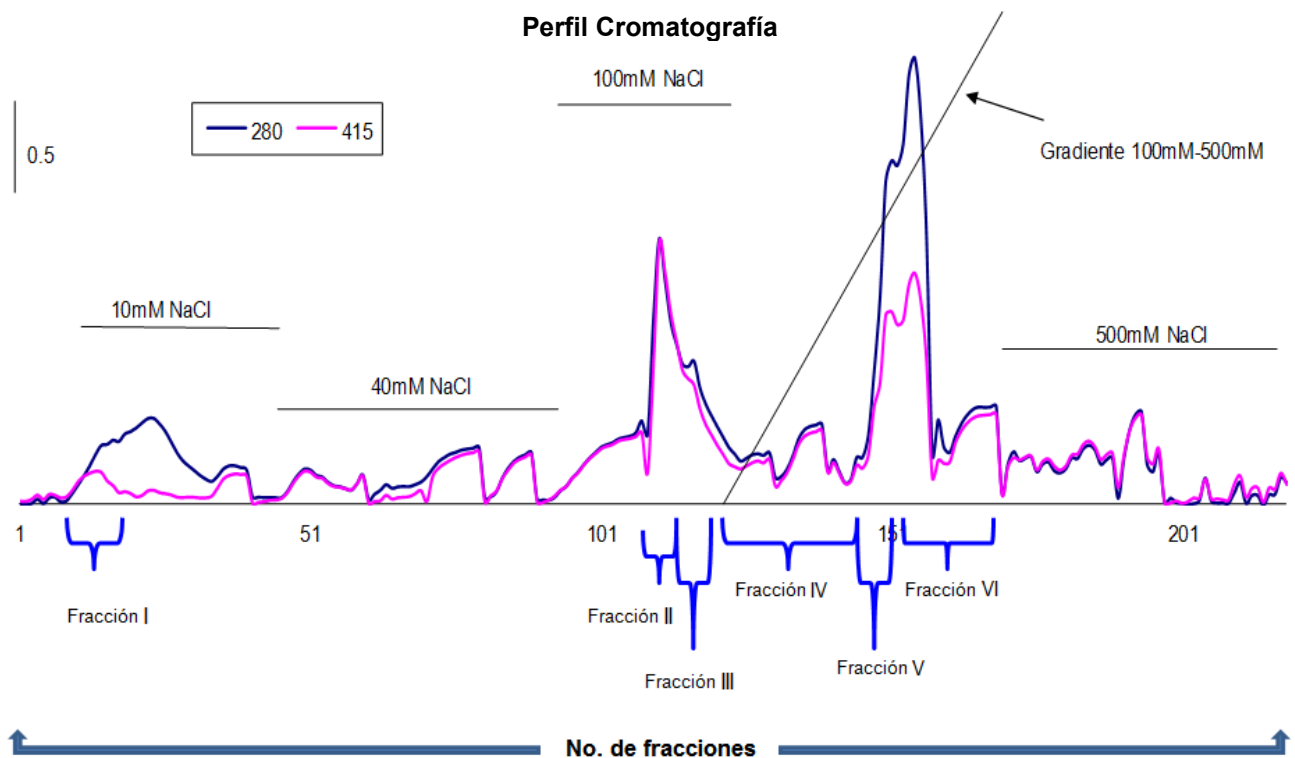


Figura 11. Perfil de absorción (280 y 415nm) de la cromatografía de intercambio iónico con la resina DEAE-Biogel A en donde se muestran los lavados con las diferentes concentraciones de NaCl: 10, 40, 100 y 500mM y un gradiente de 100 a 500mM de NaCl. Debajo del perfil se muestran por medio de llaves los tubos que se juntaron y concentraron resultando en 6 fracciones.



Tabla 6. Porcentaje del gradiente y concentración de NaCl de la cromatografía DEAE-Biogel A en la que se obtuvo cada fracción concentrada.

	% de NaCl	mM NaCl
<b>DEAE-Biogel</b>		
<b>Fracción I</b>		10
<b>Fracción II</b>		100
<b>Fracción III</b>		100
<b>Fracción IV</b>	29.78	219.14
<b>Fracción V</b>	55.318	321.27
<b>Fracción VI</b>	63.829	355.31

#### 4.1 Análisis de las fracciones obtenidas de la cromatografía

Cada fracción obtenida de esta columna se analizó por espectros diferenciales de absorción, geles de poliacrilamida con LiDS y actividad de los complejos respiratorios, sólo la fracción II fue analizada por geles claros nativos de alta resolución (1D) analizados después por 2D SDS-PAGE para conocer qué complejos se separaron en cada fracción.

Para tener una idea de cuál fracción fue la más enriquecida para cada complejo, se muestran los datos de las actividades por complejo tomando como 100% de actividad a las membranas de *B. subtilis* y a los sobrenadantes de las dos solubilizaciones consecutivas (Figura 12). Para el ensayo I (complejo  $b_6c$  y citocromo  $c$  oxidasa  $caa_3$ ) se utilizaron 0.2mg de proteína y para el ensayo II (NADH DH y SDH) se utilizaron 0.3mg de proteína. En la tabla 7 se muestran los valores de las actividades para cada complejo en cada fracción y en la tabla 8 el enriquecimiento de la actividad de los cuatro complejos respiratorios asignando a la actividad de las membranas de *B. subtilis* y los sobrenadantes un valor de uno. En estas tablas se muestra el enriquecimiento de la actividad enzimática de los complejos a través de los pasos de la purificación del complejo  $b_6c$ . Más adelante se presenta el análisis que se hizo para cada fracción obtenida. Para la NADH DH la mayor actividad se presentó en la fracción IV con un enriquecimiento de la actividad de 2.41 con respecto a las membranas y con un enriquecimiento de 1.05 comparados con la actividad del los sobrenadantes, seguida por la fracción II con un enriquecimiento de 1.26 con respecto a las membranas y un valor de 0.55 respecto a los sobrenadantes. Para la succinato deshidrogenasa las fracciones con mayor actividad fueron la 5 y la 6, con un enriquecimiento en la actividad de 172.88 y 154.97, respectivamente, respecto a las membranas, y un enriquecimiento en la actividad

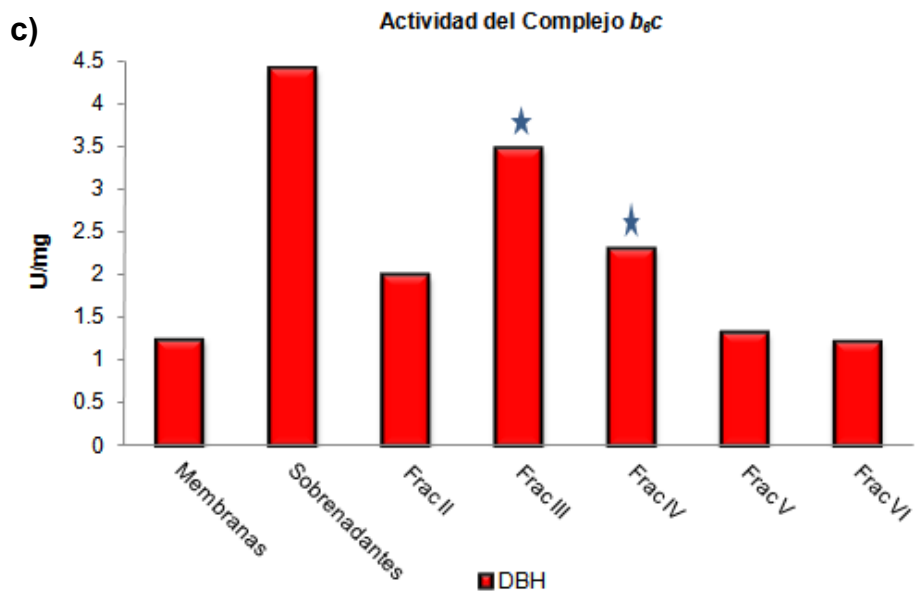
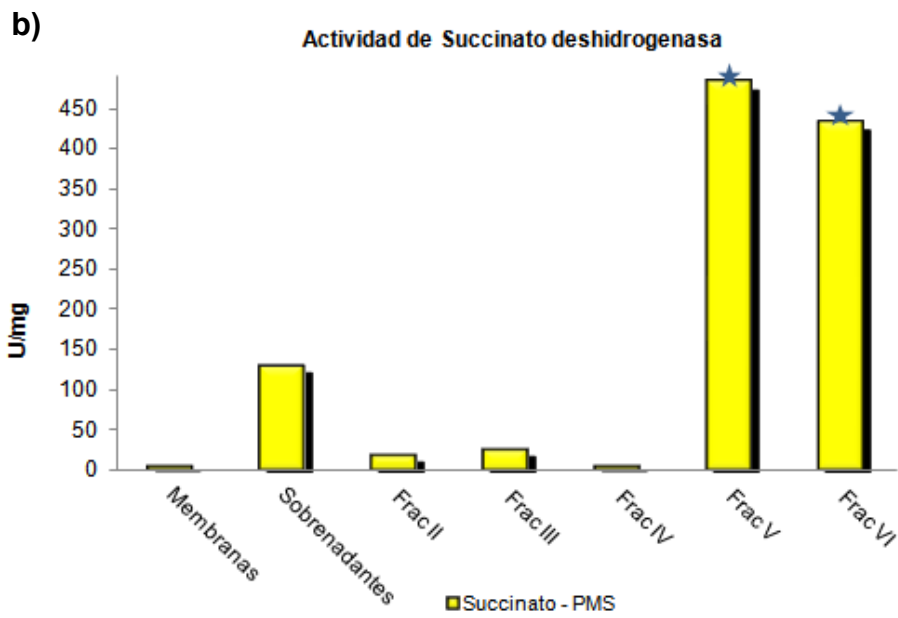
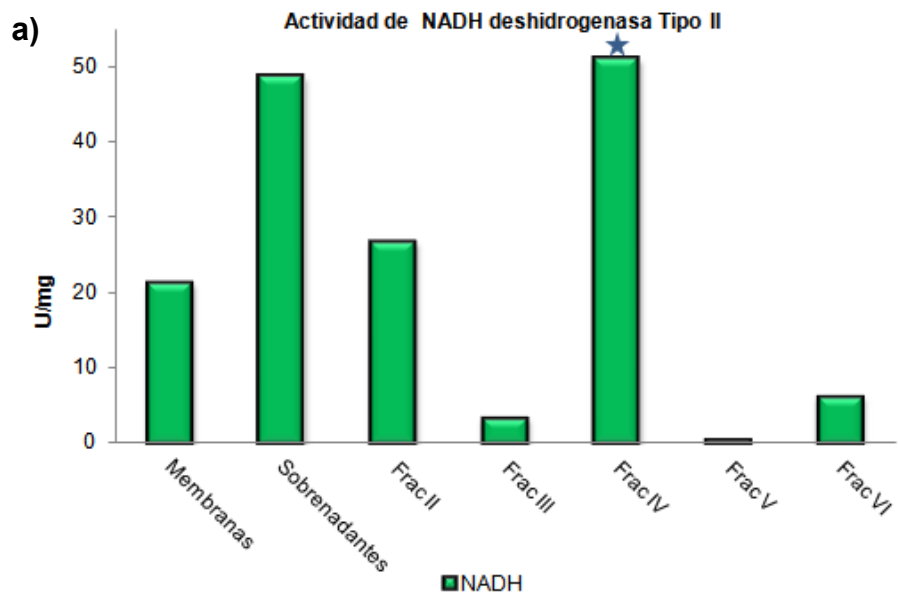
de 3.76 y 3.37 respectivamente, con respecto a los sobrenadantes. Para el complejo  $b_6c$  las fracciones con mayor actividad fueron la 3, con un enriquecimiento en la actividad de 2.81 respectivamente a las membranas y un valor de 0.79 con respecto a los sobrenadantes, seguida de la 4 con 1.85 con respecto a las membranas y 0.52 con respecto a los sobrenadantes. Finalmente para la citocromo c oxidasa  $caa_3$  las fracciones con mayor actividad fueron la fracción IV, con un valor bajo, de 0.25 con respecto a las membranas y 0.22 con respecto a los sobrenadantes, y la 5, con un valor de 0.22 y un enriquecimiento en la actividad de 1.15 respectivamente, pero cabe señalar que la mayor actividad de la citocromo c oxidasa  $caa_3$  permaneció en las membranas como se muestra en la figura 12 d, lo que indicó que no se extrajo por completo aun después de las dos solubilizaciones consecutivas ya que una gran cantidad de proteína permaneció en las pastillas y se observó que en los espectros diferenciales de éstas aún se pudieron apreciar picos para citocromo a.

Tabla 7. Valores de las actividades enzimáticas de cada uno de los complejos respiratorios de *B. subtilis* en las fracciones obtenidas de la cromatografía con DEAE-Biogel A. (U= nmoles DCPIP ó cit c (reducido ú oxidado)  $\text{min}^{-1}$ ).

	NADH Deshidrogenasa	Succinato Deshidrogenasa	Complejo $b_6c$	Citocromo c oxidasa $caa_3$
	U/mg			
Membranas	21.13	2.78	1.23	20.35
Sobrenadantes	48.51	127.97	4.39	3.83
Fracción II	26.64	16.35	1.98	0.19
Fracción III	3.20	23.26	3.46	1.37
Fracción IV	50.88	3.01	2.29	5.04
Fracción V	0.29	480.98	1.31	4.38
Fracción VI	6.13	431.16	1.20	0.60

Tabla 8. Valores de recuperación de la actividad enzimática de cada uno de los complejos respiratorios comparados contra la actividad de cada complejo obtenido con las membranas y los sobrenadantes por separado, asignándoles un valor de 1. Sólo se tomaron los valores mayores a 1 como enriquecimiento. Los valores en donde se observó un mayor enriquecimiento en cada fracción se muestran en rojo. A=con respecto a las membranas. B=con respecto a los sobrenadantes.

	NADH Deshidrogenasa		Succinato Deshidrogenasa		Complejo $b_6c$		Citocromo c oxidasa $caa_3$	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Membranas	1		1		1		1	
Sobrenadantes	2.30	1	46.00	1	3.55	1	0.19	1
Fracción II	1.26	0.55	5.88	0.13	1.60	0.45	0.01	0.05
Fracción III	0.15	0.07	8.36	0.18	2.81	0.79	0.07	0.36
Fracción IV	2.41	1.05	1.08	0.02	1.85	0.52	0.25	1.32
Fracción V	0.01	0.01	172.88	3.76	1.06	0.30	0.22	1.15
Fracción VI	0.29	0.13	154.97	3.37	0.98	0.27	0.03	0.16



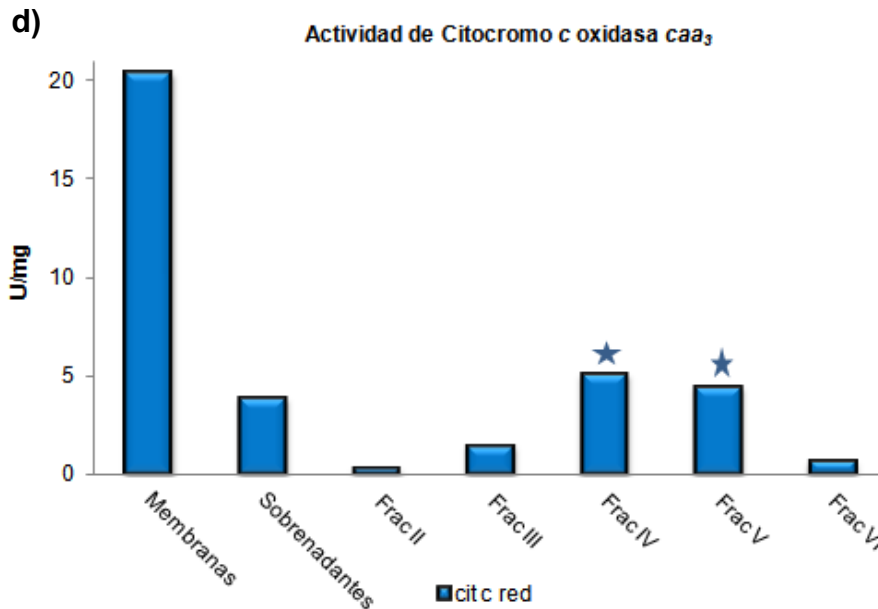


Figura 12. Actividad enzimática de los cuatro complejos respiratorios de *Bacillus subtilis* en las fracciones de la cromatografía en columna con la resina DEAE-Biogel A. (U= nmoles DCPIP o cit c (reducido ú oxidado)  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). a). NADH deshidrogenasa. b). Succinato deshidrogenasa. c). Complejo  $b_6c$ . d). Citocromo c oxidasa  $caa_3$ . Las estrellas (★) indican a las fracciones que presentaron la mayor actividad para cada complejo.

#### 4.2 Fracción I:

En el diferencial reducido con ascorbato menos oxidado (asc-oxi) se observó un citocromo c a 551nm por su pico de absorción característico cercano a los 550nm, en el diferencial reducido con ditionita menos oxidado (dit-oxi) se observó nuevamente un citocromo c por su pico de absorción a 550nm, y en el diferencial de los dos primeros, (dit-oxi) menos (asc-oxi) se observó un hombro perteneciente a un citocromo b por su pico de absorción a 560nm (Figura 13 a).

En la tabla 9 se muestran las concentraciones absolutas ( $\mu\text{M}$ ) y las concentraciones relativas (nmoles/mg de proteína) de los citocromos a, b y c correspondientes de cada espectro de las fracciones de la cromatografía tomando en cuenta al diferencial (dit-oxi). Estos datos fueron utilizados tanto en los geles de poliacrilamida, en la tinción con TMBZ, como en los ensayos de oximetría, para poder calcular la concentración adecuada de citocromos c y a. El diferencial con ascorbato se hizo para identificar a los citocromos c. Se observó que la mayor concentración absoluta de los citocromo c y b se encontró en la fracción V, y la mayor concentración absoluta de citocromo a se encontró en la fracción V. Para los nmoles/mg de proteína, para los citocromo c y b, la mayor concentración la tuvo la fracción III, y para el citocromo a la mayor concentración la tuvo la fracción V. En la tabla 10 se muestran los cocientes de relación entre los citocromos b por c, y a por c, en la cual se mostró que el mayor

cociente de relación entre *b* por *c* se encontró en las fracciones 2 y 6 y la fracción VI mostró el mayor cociente *a* por *c*. Estos datos se utilizaron para la ubicación de las posibles asociaciones entre los complejos respiratorios por sus citocromos.

En la fracción I se encontró una concentración absoluta de 2.58 $\mu$ M y una concentración relativa de 0.53nmoles/mg de proteína para los citocromos *c* mientras que no se detectaron citocromos *b* ni *a* (Tabla 10).

Tabla 9. Concentraciones absoluta ( $\mu$ M) y concentración relativa (nmol/mg proteína) de citocromos *c*, *b* y *a* de las fracciones de la cromatografía de intercambio iónico con la resina DEAE-Biogel A. Dit. Ditionita. Oxi. Oxidado. n.d. no detectado.

	Diferencial (Dit-Oxi)			Diferencial (Dit-Oxi)	
	$\mu$ M	nmoles/mg prot.		$\mu$ M	nmoles/mg prot.
<b>Membranas</b>			<b>Fracción III</b>		
<b>Citocromo c</b>	26.69	1.95	<b>Citocromo c</b>	28.68	5.18
<b>Citocromo b</b>	22.65	1.65	<b>Citocromo b</b>	24.82	4.82
<b>Citocromo a</b>	12.38	0.9	<b>Citocromo a</b>	0.15	0.029
<b>Sobrenadantes</b>			<b>Fracción IV</b>		
<b>Citocromo c</b>	7.11	2.71	<b>Citocromo c</b>	45.34	4.98
<b>Citocromo b</b>	6.37	2.43	<b>Citocromo b</b>	36.45	4
<b>Citocromo a</b>	3.87	1.47	<b>Citocromo a</b>	11.78	1.29
<b>Fracción I</b>			<b>Fracción V</b>		
<b>Citocromo c</b>	2.58	0.53	<b>Citocromo c</b>	83.68	3.07
<b>Citocromo b</b>	n.d.	n.d.	<b>Citocromo b</b>	75.5	2.77
<b>Citocromo a</b>	n.d.	n.d.	<b>Citocromo a</b>	78.48	2.88
<b>Fracción II</b>			<b>Fracción VI</b>		
<b>Citocromo c</b>	14.31	2.22	<b>Citocromo c</b>	29.15	1.96
<b>Citocromo b</b>	13.98	2.17	<b>Citocromo b</b>	28.75	1.94
<b>Citocromo a</b>	n.d.	n.d.	<b>Citocromo a</b>	38.36	2.59

Tabla 10. Cocientes entre los citocromos *b:c* y *a:c*.

	Cociente <i>b:c</i>	Cociente <i>a:c</i>
	(Dit-Oxi)	
<b>Sobrenadantes</b>	0.9	0.54
<b>Fracción I</b>	0	0
<b>Fracción II</b>	0.98	0
<b>Fracción III</b>	0.93	0.006
<b>Fracción IV</b>	0.8	0.26
<b>Fracción V</b>	0.9	0.94

En los geles de poliacrilamida al 14% con LiDS el valor mínimo para poder observar a los diferentes citocromos fue de 0.15nmoles en cada carril (Tabla 11). Para la tinción con TMBZ, la banda coloreada de verde se identificó como CtaC de la *caa<sub>3</sub>* por su peso molecular aparente de 38.4kDa la cual contiene un citocromo *c*. En la tinción con azul de Coomasie se identificaron bandas con pesos moleculares cercanos a CtaD, CtaC, CtaE y CtaF de la *caa<sub>3</sub>* aunque en el espectro no se obtuvo un pico para algún citocromo *a* lo que indicó que la citocromo *c* oxidasa no estuvo completa en esta fracción. También se identificó a NarH y NarJ de la nitrato reductasa, a QoxA de la quinol oxidasa *aa<sub>3</sub>* y a SdhA y SdhB de la SDH. No se pudieron realizar ensayos enzimáticos por lo que no se hizo una mayor caracterización. En esta fracción se cargaron 0.15nmoles de citocromo *c* y 292.32µg de proteína en el carril (Figura 13 b).

Tabla 11. nmoles y µg de citocromos y proteína utilizados en los geles LiDS-PAGE para cada una de las fracciones obtenidas de la columna DEAE-Biogel A. Tomando en cuenta siempre al citocromo en menor concentración para cargar 0.15nmoles de cada uno como mínimo en el gel para poder observarlo en la tinción con TMBZ. El n.d. en algunas de las casillas significan que no se obtuvo un pico para ese citocromo en los espectros diferenciales de absorción. n.i.= no detectado.

	nmoles por carril			µg de proteína
	citocromo <i>c</i>	citocromo <i>b</i>	citocromo <i>a</i>	
<b>Fracción I</b>	0.15	n.i.	n.i.	292.32
<b>Fracción II</b>	0.15	0.15	n.i.	69.14
<b>Fracción III</b>	0.16	0.15	0.00091	31.12
<b>Fracción IV</b>	0.58	0.46	0.15	116.73
<b>Fracción V</b>	0.15	0.15	0.15	52.11
<b>Fracción VI</b>	0.15	0.14	0.17	65.89

Cabe hacer notar que para los siguientes experimentos no se incluyó a la fracción I debido a que se obtuvo muy poca proteína en la cromatografía. Esta se ocupó para cuantificación de proteínas, espectros y geles de poliacrilamida con LiDS.

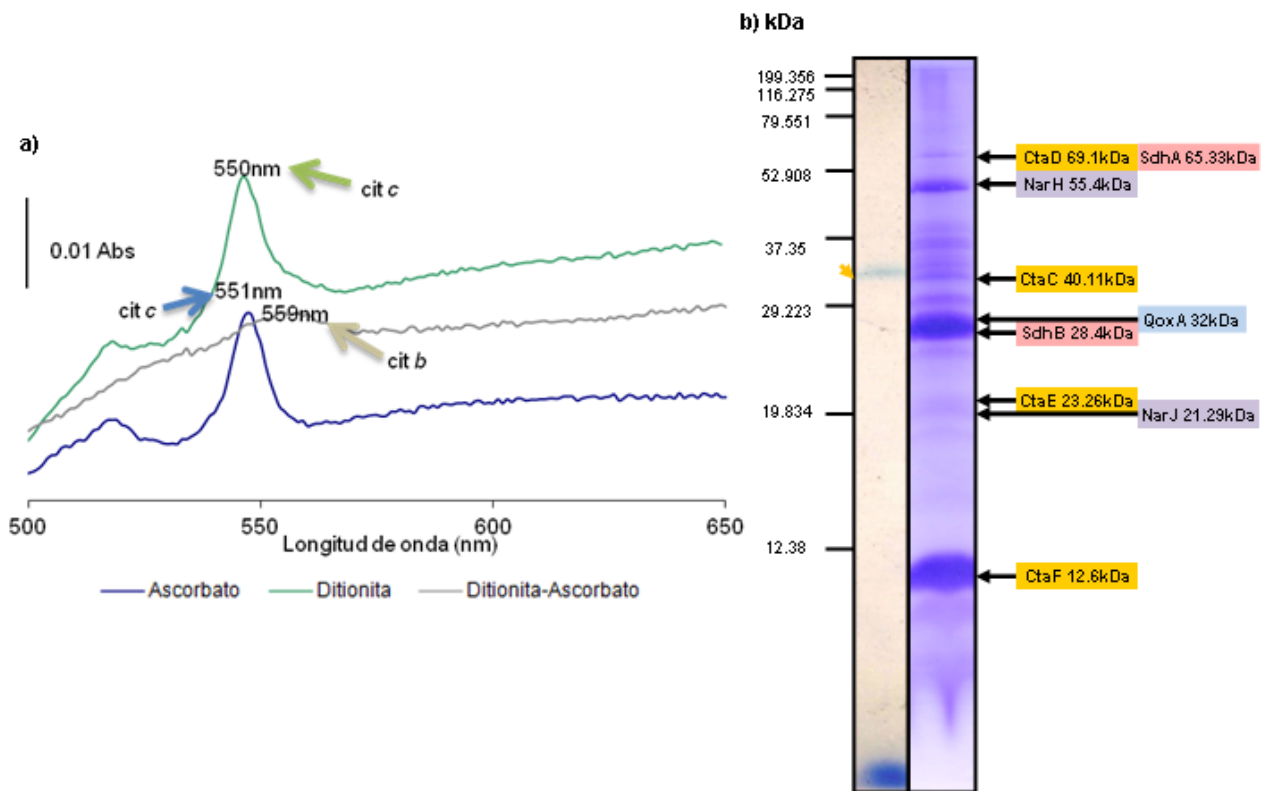


Figura 13. Análisis de la fracción I de la cromatografía con DEAE-Biogel A. a) Espectros diferenciales de absorción en donde se muestran los diferenciales de absorción (asc-oxi), (dit-oxi) y (dit-oxi) menos (asc-oxi) con una interpretación de los posibles citocromos de los complejos respiratorios por la longitud de onda en la que aparecen. b) Geles de poliacrilamida al 14% con LiDS. En el costado izquierdo del gel se encuentran los marcadores de peso molecular. El gel del lado izquierdo se tiñó con TMBZ para detección de hemos covalentemente unidos y el gel del lado derecho fue teñido con Azul de Coomassie para todas las proteínas. En el costado derecho se muestran las posibles subunidades de los complejos respiratorios identificadas por su peso molecular aparente. Se utilizaron 292.32 $\mu$ g de proteína y 0.15nmoles de citocromo c para el carril.

### 4.3 Fracción II:

En el diferencial (asc-oxi) se observó un citocromo c (550nm), en el diferencial (dit-oxi) un citocromo c (551nm) y un citocromo b (562nm), valor cercano al pico de absorción característico del citocromo b del complejo  $b_6c$ . También se observó un pequeño pico que correspondió al citocromo a (605nm) de la citocromo oxidasa  $caa_3$  por su pico de absorción y en el diferencial (dit-oxi) menos (asc-oxi) de los dos anteriores se distinguió un pico de absorción de un citocromo b (562nm) cercano al del complejo  $b_6c$  (Figura 14 a). El citocromo c tuvo una concentración absoluta de 14.31 $\mu$ M y una concentración relativa de 2.22nmoles/mg de proteína, el citocromo b presentó una concentración absoluta de 13.98 $\mu$ M y una concentración relativa de 2.17nmoles/mg de proteína y no se detectaron citocromos a y se encontró un cociente de relación de citocromos b por c de 0.98 (Tabla 9 y 10).

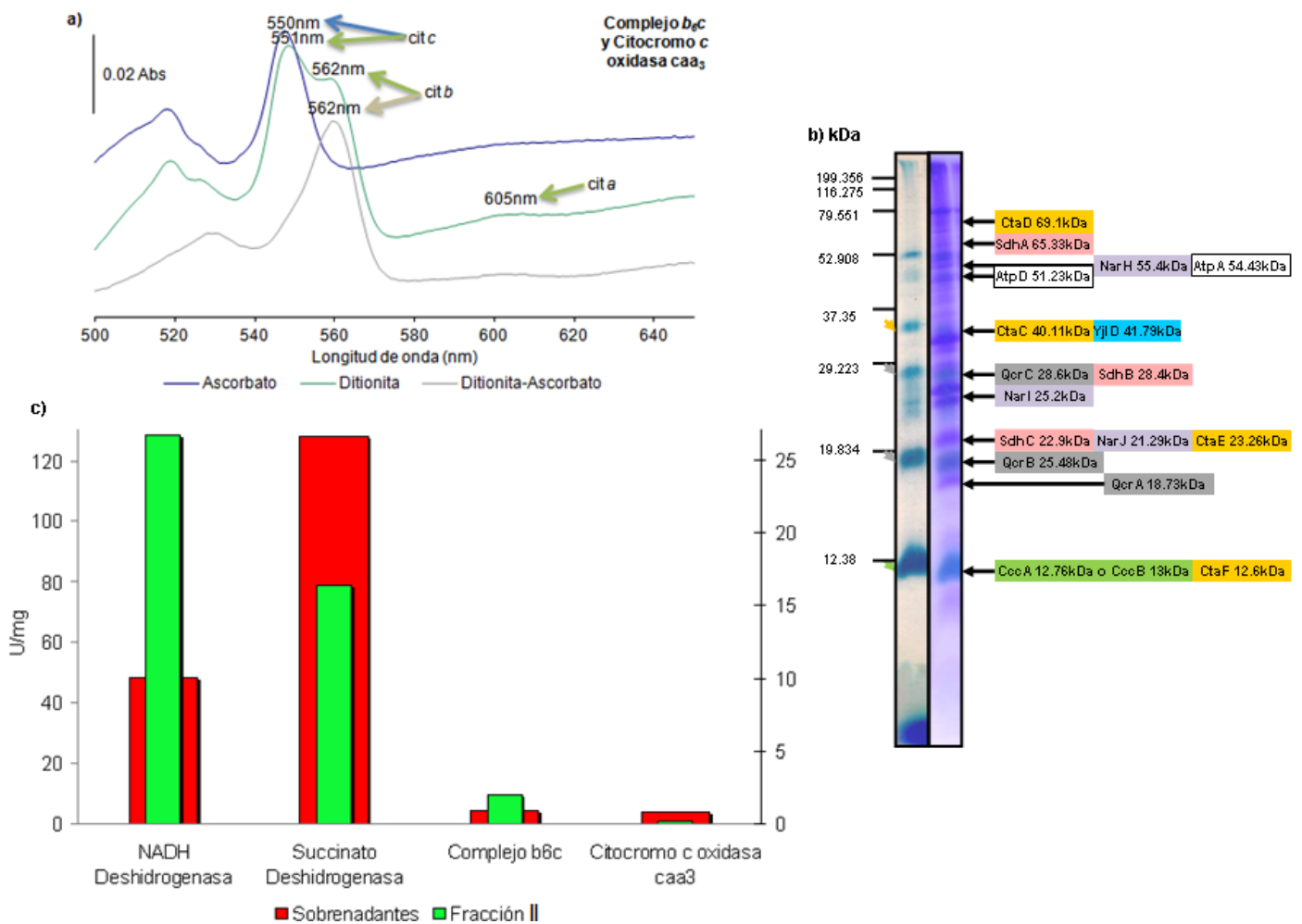
En los geles con LiDS, teñidos con TMBZ, se identificaron bandas atribuibles a CtaC de la *caa3*, a QcrC y a QcrB del *b6c* y también se observó una banda para un citocromo *c550* (CccA) o *c551* (CccB). Algunas de las bandas de alto y bajo peso molecular no se pudieron identificar, debido a que no correspondieron con el peso de alguna proteína con hemos covalentemente unidos. En la tinción con azul de Coomasie se identificaron las subunidades NarH, NarI y NarJ de la Nitrato reductasa, AtpA y AtpD de la ATPsintasa, CtaC, CtaD, CtaE y CtaF de la *caa3*, QcrC, QcrB y QcrA del *b6c*, los citocromos *c550* y *c551*, la subunidad YjID de la NADH DH y SdhA, SdhB y SdhC de la SDH. Aquí se cargaron al gel 0.15nmoles de citocromo *c*, 0.15nmoles de citocromo *b* y 69.14 $\mu$ g de proteína (Tabla 11) (Figura 14 b).

Se midió la actividad enzimática específica para cuatro de los complejos respiratorios en todas las fracciones y se comparó contra el valor de la actividad con respecto a las membranas y el valor de la actividad obtenido en los sobrenadantes de las dos solubilizaciones consecutivas de las membranas, a los que se les asignó un valor máximo de 1. Para esta fracción la NADH DH presentó un incremento en la actividad de 1.26 con relación a las membranas mientras que con respecto a los sobrenadantes no se presentó un incremento en la actividad (26.64nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). La SDH presentó un incremento en la actividad de 5.88 veces con respecto a las membranas pero no se incrementó con respecto a los sobrenadantes (16.35nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). Después el *b6c* tuvo un incremento de actividad de 1.6 veces con respecto a las membranas pero no se incrementó a los sobrenadantes (1.98nmoles de cit *c* reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). Y finalmente la citocromo *c* oxidasa *caa3* mostró un valor bajo de actividad con respecto a las membranas, mientras que con respecto a los sobrenadantes igualmente se presentó un valor bajo (0.19nmoles de cit *c* reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). Este dato reforzó la ausencia de un pico a 605nm (del citocromo *a*) en los espectros de absorción (Tabla 7 y 8) (Figura 14 c).

Para continuar con el análisis de esta fracción, se realizó un gel claro nativo de alta resolución de primera dimensión (1D) donde se cargaron 200 $\mu$ g de proteína el cual se analizó después por segunda dimensión (2D) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). En el gel de 1D se encontraron principalmente 7 bandas y se nombraron de la A a la G. En la tinción con TMBZ del gel de 2D en la línea B se encontraron 5 bandas con



tinción positiva, una banda con un peso molecular aparente de 67.25KDa que no se pudo identificar, una banda correspondiente a CtaC de la *caa3*, una banda para QcrC y QcrB del complejo *b6c* y una banda para un citocromo *c550* o *c551*. En la tinción con azul de Coomassie para la banda A se identificaron por sus pesos moleculares a las subunidades NarG, NarH, NarI y NarJ, de la nitrato reductasa, a SdhA, SdhB y SdhC de la SDH, a AtpA de la ATPsintasa, a YjID de la NADH DH, a CtaC de la *caa3*, a QcrB del *b6c* y a los citocromos *c550* y *c551* lo que indicó que en esta banda se encontraron todos los complejos respiratorios asociados. En la línea B, se identificaron además de los citocromos a NarG, NarH, NarI y NarJ, a SdhA, SdhB y SdhC, a AtpA, a YjID. En esta banda en la tinción con TMBZ se obtuvo la mayor señal para el *b6c*, la *caa3* y los citocromos *c550* y *c551* mostrando una posible asociación. En la banda C se identificaron a las subunidades AtpA y a SdhB. En las líneas D, E, F y G sólo se encontraron pequeñas proteínas o subunidades que se separaron de los complejos por encontrarse cercanos al término del gradiente (13%) (Figura 14 d y e). Esta segunda dimensión permitió un análisis más detallado del contenido de complejos en la fracción II.



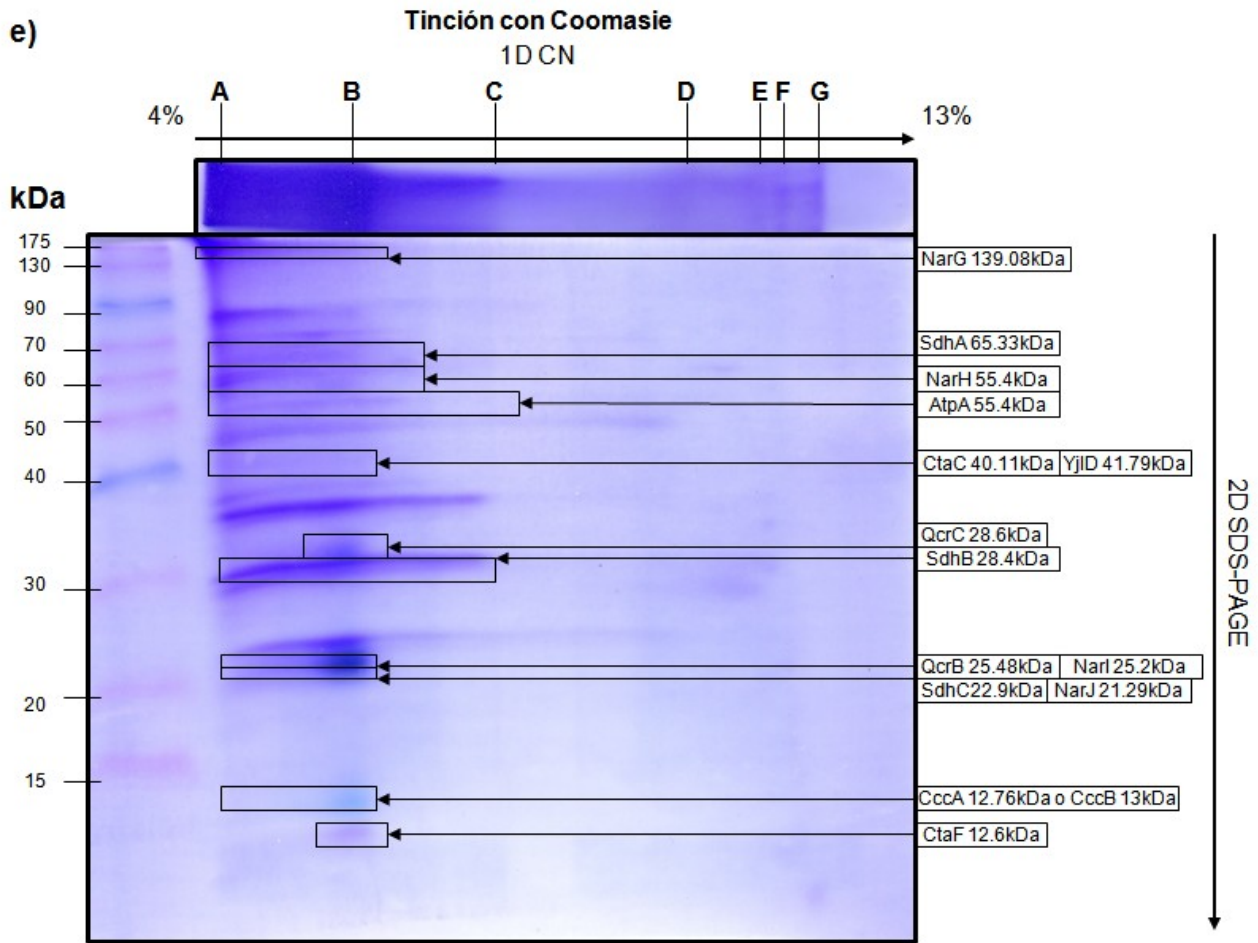
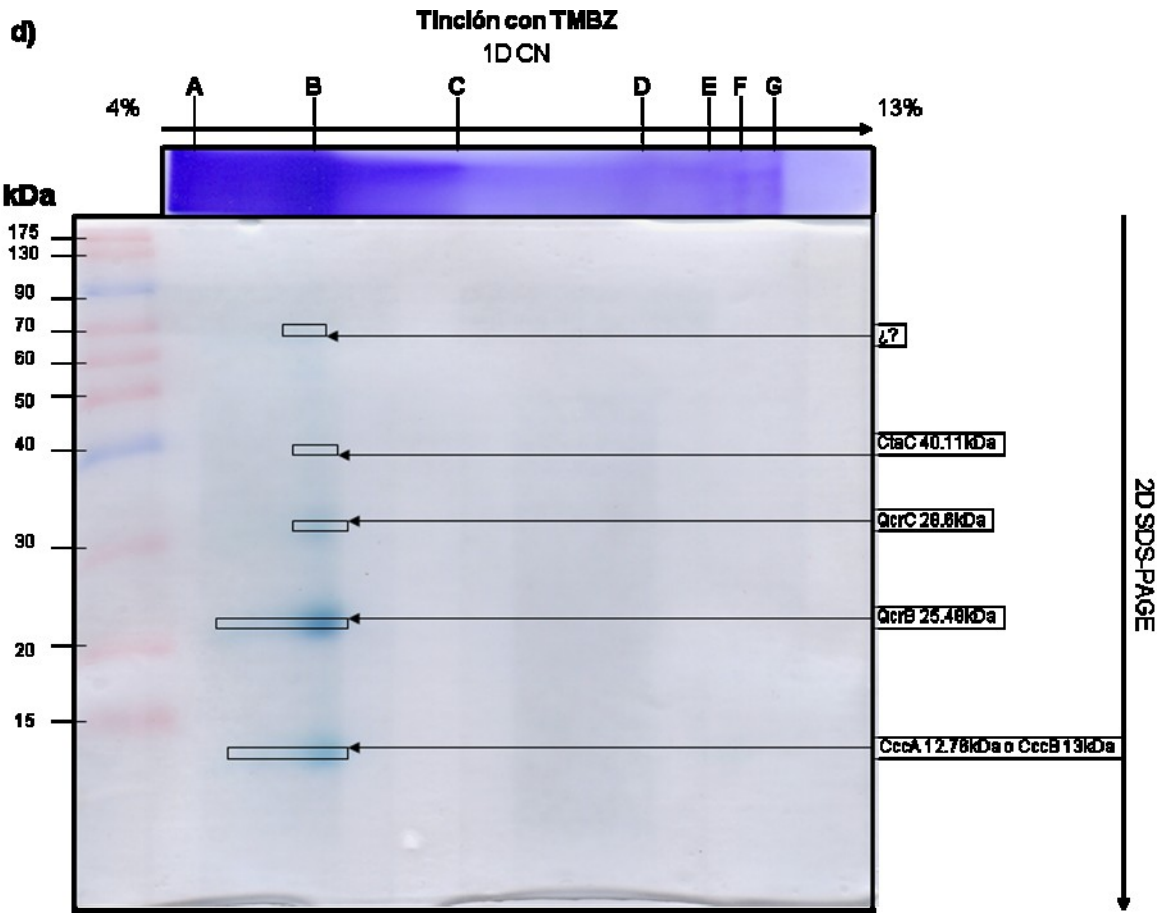


Figura 14. Análisis de la fracción II de la cromatografía con DEAE-Biogel A. a) Espectros diferenciales de absorción (asc-oxi), (dit-oxi) y (dit-oxi) menos (asc-oxi) con una interpretación de los posibles citocromos de los complejos respiratorios por la longitud de onda en la que aparecen. b) Geles de poliacrilamida al 14% con LiDS. En el costado izquierdo del gel se encuentran los marcadores de peso molecular. El gel del lado izquierdo se tiñó con TMBZ para detección de hemos covalentemente unidos y el gel del lado derecho fue teñido con Azul de Coomasie para todas las proteínas. En el costado derecho se muestra la posible identidad de las subunidades de los complejos respiratorios identificadas por su peso molecular aparente. Se utilizaron 69.15 $\mu$ g de proteína, 0.15nmoles de citocromo *c* y 0.15nmoles de citocromo *b* para este carril. c) Actividades enzimáticas específicas de cuatro de los complejos respiratorios en las que se compararon con la actividad obtenida para los sobrenadantes de la solubilización (eje izquierdo) contra la fracción II (eje derecho). Se utilizaron 0.2mg de proteína para el ensayo I y 0.3mg de proteína para el ensayo II. (U= nmoles DCPIP reducidos  $\text{min}^{-1}$  ó nmoles de cit *c* (reducido ú oxidado)  $\text{min}^{-1}$ ). Geles claros nativos de alta resolución (1D) donde se marcaron con líneas las bandas encontradas y el análisis por 2D SDS-PAGE. d) Tinción con TMBZ y e) tinción con azul de Coomasie. Arriba se muestra el carril del gel claro nativo de alta resolución. En el costado izquierdo se muestran los marcadores de pesos moleculares y en el costado derecho las proteínas que se identificaron por su peso molecular aparente. Se cargaron 200 $\mu$ g de proteína en el carril del gel de 1D.

#### 4.4 Fracción III:

En primer lugar se obtuvieron los espectros diferenciales de la fracción. En el diferencial (asc-oxi) se observó un citocromo *c* (551nm) por su pico de absorción. En el diferencial (dit-oxi) se observaron un citocromo *c* (por su pico a 551nm) y un citocromo *b* (pico a 562nm). Los citocromos pueden ser del complejo tipo *b<sub>6</sub>c* por sus picos de absorción cercanos a los picos característicos de este complejo. Finalmente, se identificó el citocromo *a* (606nm) de la oxidasa *caa<sub>3</sub>*. Al igual que en la fracción II se encontró una cantidad muy pequeña de este citocromo. En el diferencial (dit-oxi) menos (asc-oxi) se observó un citocromo *b* (pico en 564nm) atribuible al del complejo *b<sub>6</sub>c* nuevamente por el pico de absorción característico de su citocromo *b* (564nm) (Figura 15 a). Aquí se encontró para el citocromo *c* una concentración absoluta de 28.68 $\mu$ M y una concentración relativa de 5.18nmoles/mg de proteína, para el citocromo *b* se tuvo una concentración absoluta de 24.82 $\mu$ M y una concentración relativa de 4.82nmoles/mg de proteína y para el citocromo *a* se tuvo una concentración absoluta de 0.15 $\mu$ M y una concentración relativa de 0.029nmoles/mg de proteína y se encontró un cociente de relación de citocromos *b* por *c* 0.93 y de citocromos *a* por *c* de 0.006 (Tabla 9 y 10).

En cuanto a la electroforesis con LiDS, la tinción con TMBZ mostró las mismas subunidades de la fracción II. Se presentó un barrido de bandas positivas entre QcrC y QcrB lo que supondría mayor cantidad de complejo *b<sub>6</sub>c* que en la fracción anterior. Nuevamente se observaron bandas con tinción positiva de alto peso molecular que no se lograron identificar. En la tinción con azul de Coomasie se identificaron además a CtaD, CtaC, CtaE y CtaF de la *caa<sub>3</sub>*, a SdhA, SdhB y SdhC de la SDH, a NarH, NarI y NarJ de la nitrato reductasa, a AtpA y AtpD de la ATPsintasa, a YjID de la NADH DH, a QcrC,

QcrB y QcrA del  $b_6c$ , y a CccA y CccB de los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$ . El patrón de bandas fue muy parecido entre ésta y la fracción anterior con la diferencia en que la intensidad de la banda sobre SdhC aumentó, incluso aunque en esta fracción se cargaron 31.12 $\mu$ g de proteína contra 69.15 $\mu$ g de proteína de la fracción II. Aunque la cantidad de proteína fue menor en esta fracción se vio una disminución muy clara en la banda de SdhC en Coomasie en comparación con las otras bandas, esto indicó que existen otras proteínas con un peso molecular cercano a SdhC las cuales disminuyeron en esta fracción. Para esta fracción se cargaron 0.16nmoles de citocromo *c*, 0.15 del *b*, 0.00091 del *a* y 31.12 $\mu$ g de proteína (Tabla 11) (Figura 15 b).

Esta fracción mostró un valor pequeño en la actividad de la NADH DH (3.2nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) cercano al de las membranas y de los sobrenadantes. La SDH mostró un enriquecimiento en la actividad de 8.36, más enriquecida que las membranas pero no se incrementó con respecto los sobrenadantes (23.26nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). El complejo  $b_6c$  mostró un incremento en la actividad de 2.81 veces con respecto a las membranas y un valor de actividad cercano al de los sobrenadantes (3.46nmoles de cit *c* reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). Finalmente para la citocromo *c* oxidasa  $caa_3$  se no obtuvo un aumento en el valor de la actividad con respecto a las membranas y ni con respecto a los sobrenadantes (1.37nmoles de cit *c* oxidado  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) (tabla 7 y 8) (Figura 15 c).

Con los datos anteriores se puede concluir que esta fracción contiene a los complejos SDH (en mayor cantidad), el  $b_6c$  y la NADH DH.

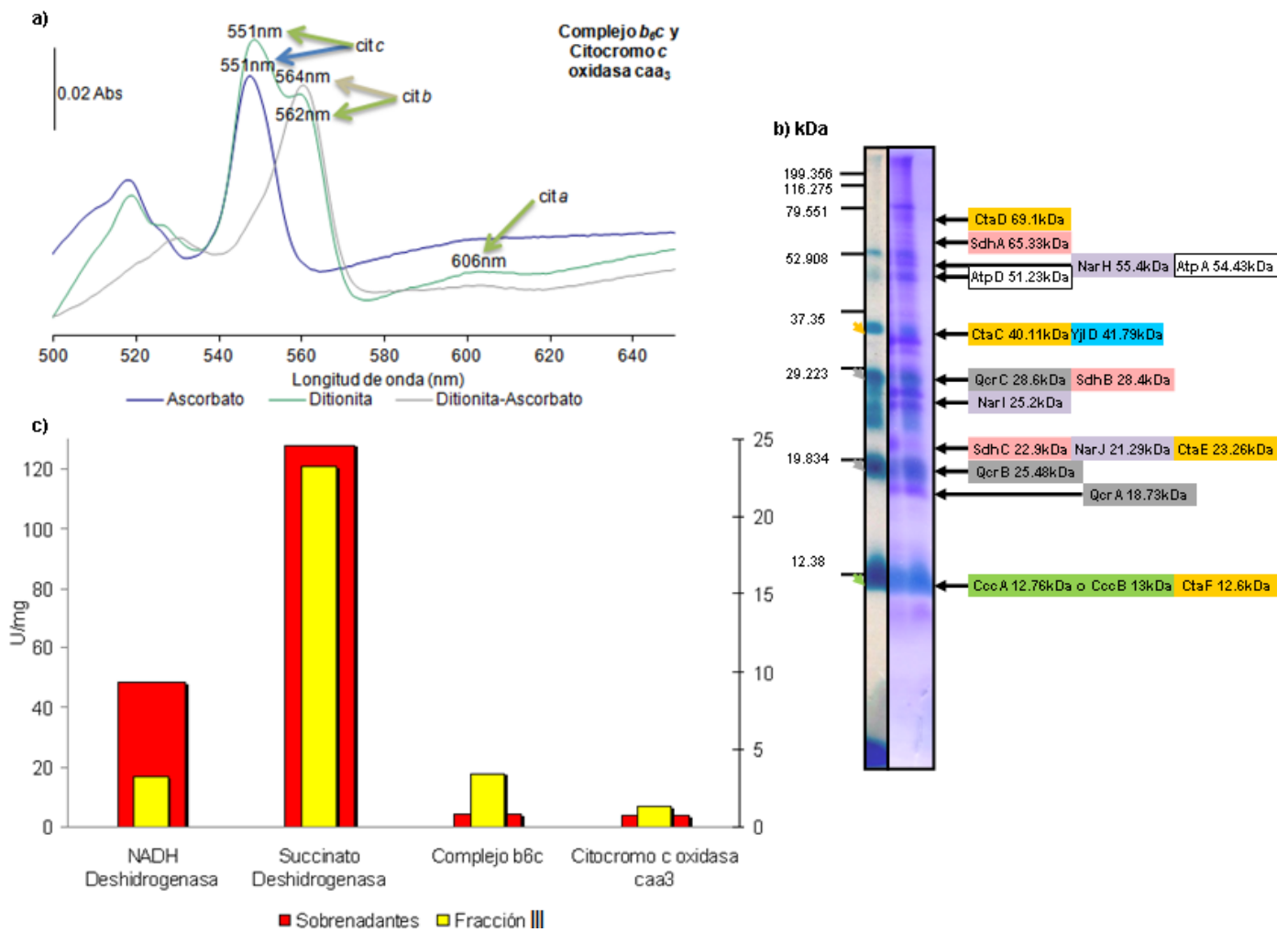


Figura 15. Análisis de la fracción III obtenida de la cromatografía con DEAE-Biogel A. a) Espectros diferenciales de absorción (asc-oxi), (dit-oxi) y (dit-oxi) menos (asc-oxi) con una interpretación de los posibles citocromos de los complejos respiratorios por la longitud de onda en la que aparecen. b) Geles de poliacrilamida al 14% con LiDS. En el costado izquierdo del gel se encuentran los marcadores de peso molecular. El gel del lado izquierdo se tiñó con TMBZ para detección de hemos covalentemente unidos y el gel del lado derecho fue teñido con Azul de Coomassie para todas las proteínas. En el costado derecho se muestra la posible identidad de las subunidades de los complejos respiratorios identificadas por su peso molecular aparente. Se utilizaron 31.12µg de proteína, 0.16nmoles de citocromo c, 0.15nmoles de citocromo b y 0.00091nmoles de citocromo a para este carril. c) Actividades enzimáticas específicas de cuatro de los complejos respiratorios en las que se compararon con la actividad obtenida para los sobrenadantes de la solubilización (eje izquierdo) contra la fracción III (eje derecho). Se utilizaron 0.2mg de proteína para el ensayo I y 0.3mg de proteína para el ensayo II. (U= nmoles DCPIP reducidos  $\text{min}^{-1}$  ó nmoles de cit c (reducido u oxidado)  $\text{min}^{-1}$ ).

#### 4.5 Fracción IV:

En el espectro diferencial (asc-oxi) se observaron dos picos: un citocromo c (pico en 550nm) y un citocromo a (605nm) los cuales correspondieron a la citocromo c oxidasa  $caa_3$  por sus picos de absorción a 550nm para su citocromo c y a 605nm para un citocromo a. En el diferencial (dit-oxi), se obtuvo un citocromo c (551nm), un citocromo b (561nm) y un citocromo a (604nm), cercanos a los citocromos del complejo  $b_6c$  y la  $caa_3$  juntos, y en el diferencial (dit-oxi) menos (asc-oxi) se observó un citocromo b (563nm) y un citocromo a (605nm), los cuales coincidieron con el citocromo b del complejo tipo  $b_6c$

y el citocromo *a* de la citocromo *c* oxidasa *caa*<sub>3</sub> (Figura 16 a). Aquí se obtuvo para el citocromo *c* una concentración absoluta de 45.34μM y una concentración relativa de 4.98nmoles/mg de proteína, para el citocromo *b* se obtuvo una concentración absoluta de 36.45μM y una concentración relativa de 4nmoles/mg de proteína y para el citocromo *a* se obtuvo una concentración absoluta de 11.78μM y una concentración relativa de 1.29nmoles/mg de proteína y se encontró un cociente de relación de citocromos *b* por *c* de 0.8 y de *a* por *c* de 0.26 (Tabla 9 y 10).

En el análisis por geles de PAGE-LiDS, con la tinción con TMBZ se identificó a las subunidades CtaC, QcrC, QcrB, SdhC, CccB y CccA y nuevamente se observaron bandas que no se pudieron identificar por su masa molecular aparente al no coincidir con alguna de las proteínas con hemos covalentemente unidos. En la tinción con azul de Coomassie para el mismo gel se identificaron a las proteínas CtaD, CtaC, CtaE y CtaF, a NarH, NarI y NarJ, a AtpA y AtpD, a YjID, a QcrC, QcrB y QcrA, a CccA y CccB y a SdhC, SdhB y SdhA por su masa molecular aparente, con la diferencia en que aparecieron nuevas bandas, una arriba de CtaD y las otras dos bandas entre QcrA y los CccA y CccB, estas últimas tres bandas fueron más evidentes para esta fracción ya que, por ejemplo, no se observaron en la fracción I aunque se cargaron 292.32μg de proteína, más del doble que en esta fracción. Aquí se cargaron 0.58nmoles del citocromo *c*, 0.46 del *b*, 0.15 del *a* y 116.73μg de proteína (Tabla 11) (Figura 16 b).

Esta fracción presentó un incremento de actividad de la NADH DH de 2.41 con respecto a las membranas pero no se incrementó con respecto a los sobrenadantes (50.88nmoles DCPIP reducido min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína). La SDH presentó un incremento de la actividad de 1.08 veces con respecto a las membranas pero no se incrementó con respecto a los sobrenadantes (3.01nmoles DCPIP reducido min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) lo que coincidió nuevamente con las intensidades de las bandas en los geles. El complejo *b*<sub>6</sub>*c* tuvo un incremento de la actividad de 1.85 veces con respecto a las membranas pero la actividad no se incrementó con respecto a los sobrenadantes (2.29nmoles de cit *c* reducido min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína). Finalmente la actividad de la citocromo *c* oxidasa *caa*<sub>3</sub> no se incrementó con respecto a las membranas pero si mostró un pequeño incremento de 1.32 veces con respecto a la actividad de los sobrenadantes (5.04nmoles de cit *c* oxidado min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) (Tabla 7 y 8) (Figura 16 c).

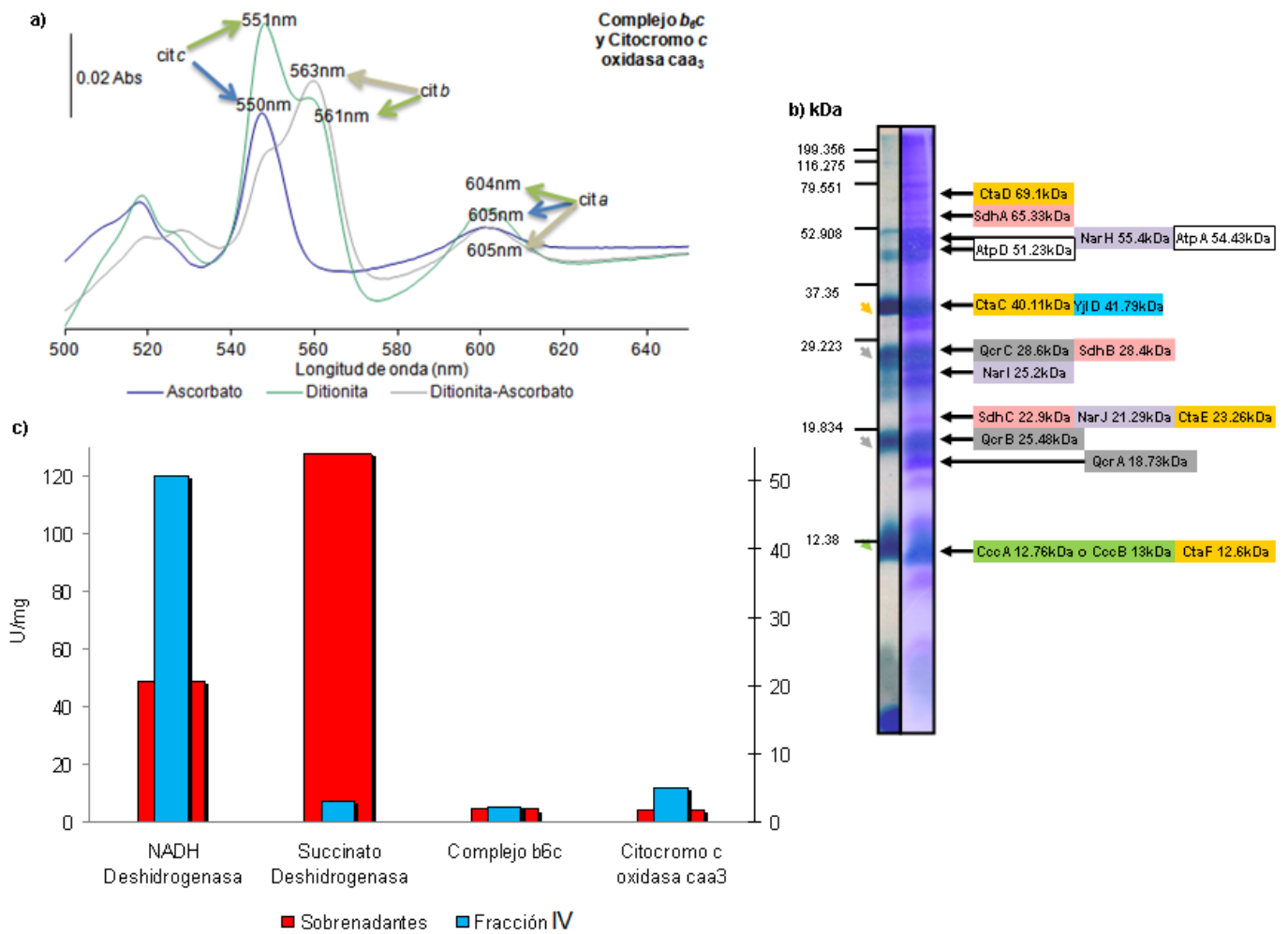


Figura 16. Análisis de la fracción IV obtenida de la cromatografía con DEAE-Biogel A. a) Espectros diferenciales de absorción (asc-oxi), (dit-oxi) y (dit-oxi) menos (asc-oxi) con una interpretación de los posibles citocromos de los complejos respiratorios por la longitud de onda en la que aparecen. b) Geles de poliacrilamida al 14% con LiDS. En el costado izquierdo del gel se encuentran los marcadores de peso molecular. El gel del lado izquierdo se tiñó con TMBZ para detección de hemos covalentemente unidos y el gel del lado derecho fue teñido con Azul de Coomassie para todas las proteínas. En el costado derecho se muestra la posible identidad de las subunidades de los complejos respiratorios identificadas por su peso molecular aparente. Se utilizaron 116.73 $\mu$ g de proteína, 0.58nmoles de citocromo *c*, 0.46nmoles de citocromo *b* y 0.15nmoles de citocromo *a* para este carril. c) Actividades enzimáticas específicas de cuatro de los complejos respiratorios en las que se compararon con la actividad obtenida para los sobrenadantes de la solubilización (eje izquierdo) contra la fracción IV (eje derecho). Se utilizaron 0.2mg de proteína para el ensayo I y 0.3mg de proteína para el ensayo II. (U= nmoles DCPIP reducidos  $\text{min}^{-1}$  ó nmoles de cit *c* (reducido u oxidado)  $\text{min}^{-1}$ ).

#### 4.6 Fracción V:

En el espectro de esta fracción se apreciaron, con el diferencial (asc-oxi), un citocromo *c* (551nm) y un citocromo *a* (603nm) cercano al citocromo *a* de una quinol oxidasa  $aa_3$ . En el diferencial (dit-oxi), se observó el citocromo *b* (557nm) de la SDH y el citocromo *a* (602nm) de la quinol oxidasa  $aa_3$  y para el diferencial (dit-oxi) menos (asc-oxi), un citocromo *b* (560nm) cercano al pico de absorción del citocromo *b* de la SDH y un citocromo *a* (602nm) de la quinol oxidasa  $aa_3$  por sus picos de absorción (Figura 17

a). Aquí se obtuvo para el citocromo *c* una concentración absoluta de 83.68 $\mu$ M y una concentración relativa de 3.07nmoles/mg de proteína, para el citocromo *b* una concentración absoluta de 75.5 $\mu$ M y una concentración relativa de 2.77nmoles/mg de proteína y para el citocromo *a* una concentración absoluta de 78.48 $\mu$ M y una concentración relativa de 2.88nmoles/mg de proteína y un cociente de relación de citocromos *b* por *c* de 0.9 y de citocromos *a* por *c* de 0.94 (Tabla 9 y 10).

En el gel de PAGE-LiDS teñido con TMBZ se identificaron a las subunidades CtaC, QcrC, QcrB, SdhC, CccB y CccA por su masa molecular aparente y nuevamente se observaron bandas que no se pudieron identificar. En la tinción con Coomassie del mismo gel, se identificaron a las subunidades CtaC, CtaE, CtaD y CtaF, a QcrC, QcrB y QcrA, a SdhA, SdhB y SdhC, a NarH y NarJ, a AtpA y AtpD, a YjID, a CccA y CccB y por último se encontraron nuevas bandas que correspondieron a QoxA, QoxB y QoxC de la quinol oxidasa *aa*<sub>3</sub> las cuales coincidieron con el nuevo pico encontrado en el espectro diferencial. En este carril se cargaron 0.15nmoles de citocromo *c*, 0.15nmoles de *b*, 0.15nmoles de *a* y 52.11 $\mu$ g de proteína (Tabla 11) (Figura 17 b).

La fracción V para la NADH DH no tuvo un incremento con respecto al valor en las membranas ni con respecto a los sobrenadantes (0.28nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). La SDH tuvo un aumento de actividad de 172.88 veces con respecto a las membranas y de 3.76 veces con respecto a los sobrenadantes (480.98nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). El complejo *b*<sub>6c</sub> tuvo un incremento de la actividad de 1.06 veces con respecto a las membranas pero no se incrementó con respecto a los sobrenadantes (1.31nmoles de cit *c* reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). La citocromo *c* oxidasa *caa*<sub>3</sub> no mostró un incremento en la actividad con respecto a las membranas pero si un pequeño incremento de 1.15 veces con respecto a los sobrenadantes (4.38nmoles de cit *c* oxidado  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). A partir de esta fracción la actividad del *b*<sub>6c</sub> y *caa*<sub>3</sub> comenzó a disminuir en las fracciones 5 y 6 comparadas con la actividad de las fracciones 2, 3 y 4. Se pudo observar que en la NADH DH principalmente la actividad decreció enormemente en estas últimas dos fracciones (Tabla 7 y 8) (Figura 17 c).



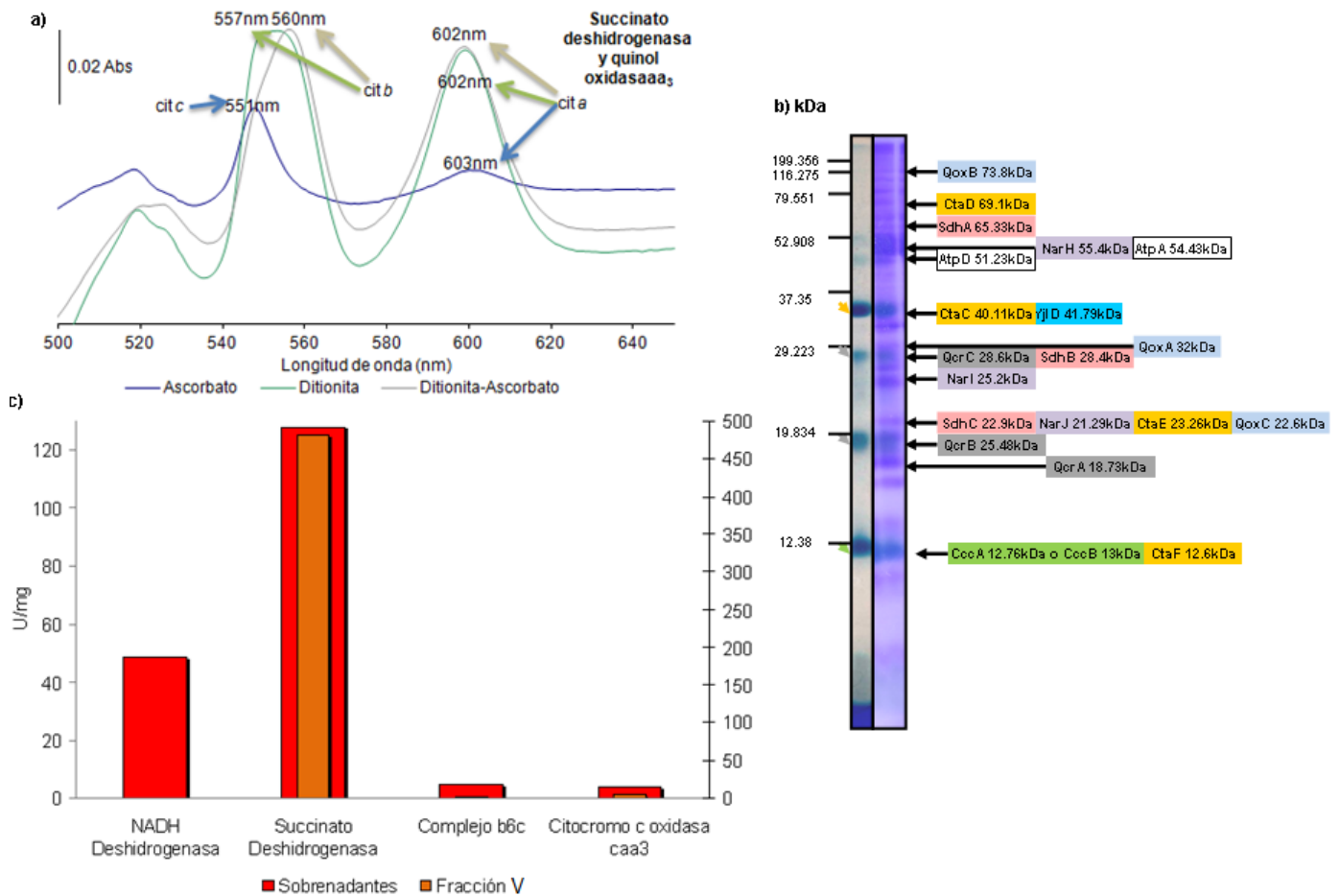


Figura 17. Análisis de la fracción V obtenida de la cromatografía con DEAE-Biogel A. a) Espectros diferenciales de absorción (asc-oxi), (dit-oxi) y (dit-oxi) menos (asc-oxi) con una interpretación de los posibles citocromos de los complejos respiratorios por la longitud de onda en la que aparecen. b) Geles de poliacrilamida al 14% con LiDS. En el costado izquierdo del gel se encuentran los marcadores de peso molecular. El gel del lado izquierdo se tiñó con TMBZ para detección de hemos covalentemente unidos y el gel del lado derecho fue teñido con Azul de Coomassie para todas las proteínas. En el costado derecho se muestra la posible identidad de las subunidades de los complejos respiratorios identificadas por su peso molecular aparente. Se utilizaron 52.11µg de proteína, 0.15nmoles de citocromo c, 0.15nmoles de citocromo b y 0.15nmoles de citocromo a para este carril c) Actividades enzimáticas específicas de cuatro de los complejos respiratorios en las que se compararon con la actividad obtenida para los sobrenadantes de la solubilización (eje izquierdo) contra la fracción V (eje derecho). Se utilizaron 0.2mg de proteína para el ensayo I y 0.3mg de proteína para el ensayo II. (U= nmoles DCPIP reducidos  $\text{min}^{-1}$  ó nmoles de cit c (reducido u oxidado)  $\text{min}^{-1}$ ).

#### 4.7 Fracción VI:

Finalmente en el diferencial (asc-oxi) de la fracción VI se observó un citocromo c (550nm) y un citocromo a (603nm) de la quinol oxidasa  $aa_3$ . En el diferencial (dit-oxi) se observó un citocromo b (558nm) para la SDH y un citocromo a (602nm) de la quinol oxidasa  $aa_3$  y en el diferencial (dit-oxi) menos (asc-oxi) se observó un citocromo b (559nm) de la SDH y un citocromo a (601nm) de la quinol oxidasa  $aa_3$  (Figura 18 a). Aquí se obtuvo una concentración absoluta para el citocromo c de 29.15µM y una concentración relativa de 1.96nmoles/mg de proteína, para el citocromo b se obtuvo una concentración absoluta de 28.75µM y una relativa de 1.94nmoles/mg de proteína y para el citocromo a una concentración absoluta de 38.36µM y una relativa de 2.59nmoles/mg

de proteína y se encontró un cociente de relación de citocromos *b* por *c* de 0.99 y de citocromos *a* por *c* de 1.32 (Tabla 9 y 10).

En el gel de PAGE-LiDS teñido con TMBZ se identificaron a las subunidades CtaC, QcrC, QcrB, SdhC, CccA y CccB pero con menor intensidad que en las fracciones 1 a 5. Para este mismo carril con Coomasie se identificaron a las subunidades AtpA y AtpD, a YjlD, a NarH y NarJ, a SdhA, SdhB y SdhC, a CtaC, CtaE, a QcrC, QcrB y QcrA, a CccA y CccB y a QoxA, QoxB y QoxC. El número de bandas fue similar a la fracción V pero con menor intensidad aunque se cargó 65.89 $\mu$ g de proteína y en la fracción anterior 52.11 $\mu$ g de proteína. En esta fracción se cargaron 0.15nmoles de citocromo *c*, 0.14 de *b*, 1.91 de *a* y 65.89 $\mu$ g de proteína (Tabla 11) (Figura 18 b).

Esta fracción tuvo un valor bajo de la actividad para la NADH DH respecto a las membranas y con respecto a los sobrenadantes (6.13nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). La SDH presentó un incremento notable en la actividad de 154.97 veces con respecto a las membranas, aunque sólo un incremento de 3.37 con respecto a los sobrenadantes (431.16nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). El complejo tipo *b*<sub>6</sub>*c* tuvo un valor cercano al obtenido con las membranas pero menor respecto a los sobrenadantes (1.2nmoles de cit *c* reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). Finalmente la citocromo *c* oxidasa *caa*<sub>3</sub> la cual no tuvo un incremento en la actividad con respecto a las membranas ni con respecto a los sobrenadantes (0.59nmoles de cit *c* oxidado  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). Esto indicó que tanto el complejo *b*<sub>6</sub>*c* como la *caa*<sub>3</sub> se obtuvieron en proporción menor en esta fracción (Tabla 7 y 8) (Figura 18 c).

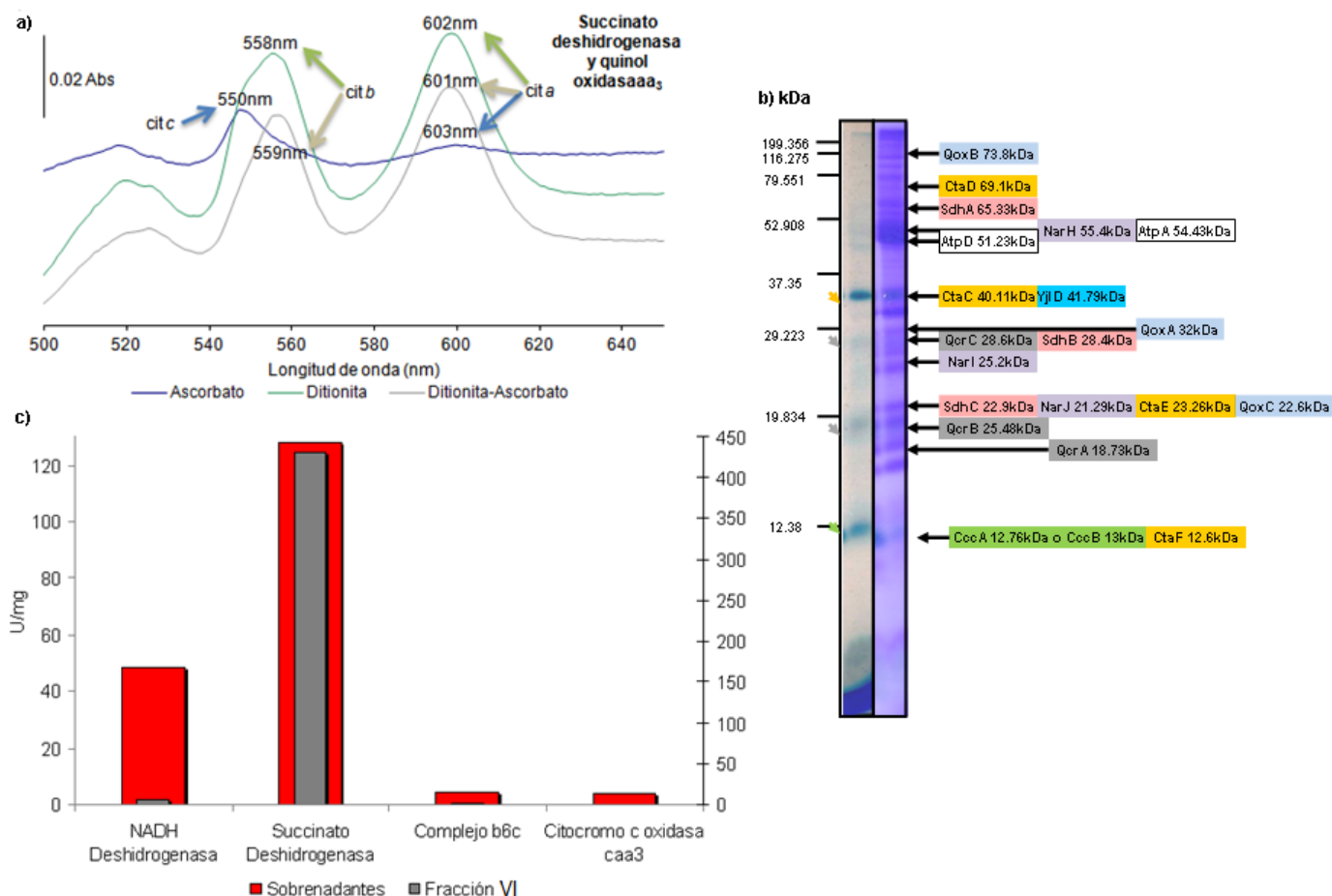


Figura 18. Análisis de la fracción VI obtenida de la cromatografía con DEAE-Biogel A. a) Espectros diferenciales de absorción (asc-oxi), (dit-oxi) y (dit-oxi) menos (asc-oxi) con una interpretación de los posibles citocromos de los complejos respiratorios por la longitud de onda en la que aparecen. b) Geles de poliacrilamida al 14% con LiDS. En el costado izquierdo del gel se encuentran los marcadores de peso molecular. El gel del lado izquierdo se tiñó con TMBZ para detección de hemos covalentemente unidos y el gel del lado derecho fue teñido con Azul de Coomassie para todas las proteínas. En el costado derecho se muestra la posible identidad de las subunidades de los complejos respiratorios identificadas por su peso molecular aparente. Se utilizaron 65.89 $\mu$ g de proteína, 0.15nmoles de citocromo c, 0.14nmoles de citocromo b y 1.91nmoles de citocromo a para este carril. c) Actividades enzimáticas específicas de cuatro de los complejos respiratorios en las que se compararon con la actividad obtenida para los sobrenadantes de la solubilización (eje izquierdo) contra la fracción VI (eje derecho). Se utilizaron 0.2mg de proteína para el ensayo I y 0.3mg de proteína para el ensayo II. (U= nmoles DCPIP reducidos  $\text{min}^{-1}$  ó nmoles de cit c (reducido ú oxidado)  $\text{min}^{-1}$ ).

## 5. Cromatografía de la fracción IV (DEAE-Biogel A) en una columna DEAE-Toyopearl

Desde este punto se nombró a la fracción IV de la columna DEAE-Biogel A como fracción IVA. Se escogió a la fracción IVA para recromatografiar en una columna con la resina DEAE-Toyopearl la cual tiene un tamaño de poro menor y una capacidad iónica mayor que la DEAE-Biogel A con la idea de resolver mejor al complejo  $b_6c$ . Se escogió esta fracción para obtener más fracciones similares a la fracción II y 3, por ser la que tuvo la mayor actividad del complejo  $b_6c$  después de la fracción III y poca actividad de la SDH. La muestra se trató como en la cromatografía pasada para después cargarla a esta cromatografía, de la cual se obtuvieron dos picos en el perfil de absorción (Figura 19). Se

hicieron espectros diferenciales de los tubos de interés y se juntaron y se concentraron aquellos cuyos espectros fueron semejantes. Para la fracción I se concentraron del tubo 55 al 58, para la fracción II del tubo 59 al 78 y para la fracción III del tubo 81 al 106. Se obtuvieron 3 fracciones. En la tabla 12 se muestra la concentración de NaCl en la que se obtuvo cada fracción y en qué porcentaje del gradiente si es que cayó dentro de este.

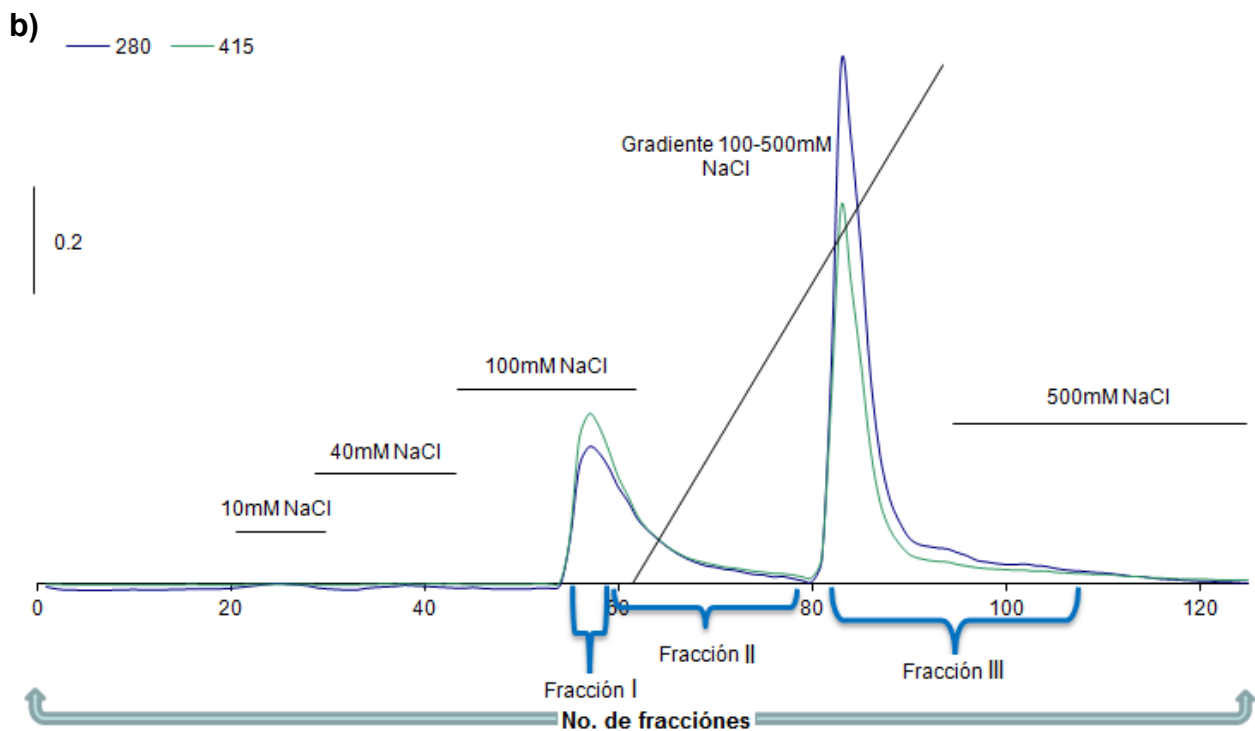


Figura 19. Perfil de absorción (280 y 415) de la cromatografía de intercambio iónico con la resina DEAE-Toyopearl de la fracción IVA en donde se muestran los lavados con las diferentes concentraciones de NaCl y el número de fracciones obtenidas. Se realizaron lavados con 10, 40, 100 y 500mM y un gradiente de 100 a 500mM de NaCl. Debajo del perfil se muestran por medio de llaves los tubos que se juntaron y concentraron resultando en 3 fracciones.

Tabla 12. Porcentaje del gradiente y concentración de NaCl de la cromatografía DEAE-Toyopearl en la que se obtuvo cada fracción.

	% de NaCl	mM NaCl
<b>DEAE-Toyopearl</b>		
<b>Fracción IVA</b>		
<b>Fracción I</b>		100
<b>Fracción II</b>		100
<b>Fracción III</b>	68.75	362.5

## 5.1 Análisis de las fracciones obtenidas de la cromatografía con DEAE-Toyopearl

Todas las fracciones fueron analizadas por medio de espectros de absorción, electroforesis en PAGE-LiDS, actividad de complejos respiratorios, ensayos de oximetría y geles de 1D analizados después por geles 2D SDS-PAGE.

## 5.2 Fracción I:

En el diferencial (asc-oxi) se observó un citocromo *c* (550nm). En el diferencial (dit-oxi) se observó un citocromo *c* (551nm) y un citocromo *a* (605nm) correspondiente al citocromo de la *caa<sub>3</sub>* por sus picos de absorción. En el diferencial (dit-oxi) menos (asc-oxi) se observó un citocromo *b* (563nm) del *b<sub>6c</sub>* y el citocromo *a* (605nm) de la *caa<sub>3</sub>* corroborando nuevamente que en esta fracción se obtuvo al complejo *b<sub>6c</sub>* acompañado de otros citocromos *c* y un pico muy pequeño para la citocromo *c* oxidasa *caa<sub>3</sub>*, (Figura 20 a).

En la tabla 13 se muestran las concentraciones absolutas ( $\mu\text{M}$ ) y concentraciones relativas (nmoles/mg proteína) de los citocromos en cada una de las fracciones obtenidas de la cromatografía. La mayor concentración  $\mu\text{M}$  de los citocromo *c* y *b* se encontró en la fracción II y la mayor concentración  $\mu\text{M}$  para el citocromo *a* en la fracción III. Para la concentración en nmoles/mg de proteína de la mayoría de los citocromos *c* y *b* se encontraron en la fracción I y la mayor concentración relativa para el citocromo *a* la tuvo la fracción III. Para el cociente de relación, la fracción con mayor cantidad de citocromos *b* por *c* fue la fracción I, y para el cociente de relación *a* por *c* fue la fracción III (Tabla 14).

En esta fracción se encontró una concentración absoluta para el citocromo *c* de  $8.48\mu\text{M}$  y una concentración relativa de  $5.56\text{nmoles/mg}$  proteína, para el citocromo *b* se obtuvo una concentración absoluta de  $5.38\mu\text{M}$  y una concentración relativa de  $3.53\text{nmoles/mg}$  proteína y para el citocromo *a* se obtuvo una concentración absoluta de  $0.29\mu\text{M}$  y una concentración relativa de  $0.19\text{nmoles/mg}$  proteína y se encontró un cociente de relación de citocromos *b* por *c* de 0.64 y de citocromos *a* por *c* de 0.03 (Tabla 13 y14).

Tabla 13. Concentraciones absoluta ( $\mu\text{M}$ ) y concentración relativa (nmol/mg proteína) de citocromos *c*, *b* y *a* de las fracciones de la cromatografía de intercambio iónico con la resina DEAE-Toyopearl. Asc. Dit. Ditionita. Oxi. Oxidado. n.d. no detectado.

	Diferencial (Dit-Oxi)	
	$\mu\text{M}$	nmol/mg prot.
<b>Fracción I</b>		
<b>Citocromo c</b>	8.48	5.56
<b>Citocromo b</b>	5.38	3.53
<b>Citocromo a</b>	0.29	0.19
<b>Fracción II</b>		
<b>Citocromo c</b>	54.31	4.81
<b>Citocromo b</b>	17.79	1.58
<b>Citocromo a</b>	9.55	0.85
<b>Fracción III</b>		
<b>Citocromo c</b>	49.65	3.91
<b>Citocromo b</b>	15.89	1.25
<b>Citocromo a</b>	11.08	0.87

Tabla 14. Cocientes entre los citocromos *b:c* y *a:c*.

	Cociente <i>b:c</i>	Cociente <i>a:c</i>
	(Dit-Oxi)	
<b>Fracción I</b>	0.64	0.03
<b>Fracción II</b>	0.33	0.18
<b>Fracción III</b>	0.32	0.22

En estos geles con LiDS se cargó la misma cantidad de proteína para cada fracción pero cuidando que la cantidad de citocromos *c* fuera igual o mayor a 0.15nmol por carril para poder observarlos sin problema en la tinción con TMBZ. En el gel con LiDS teñido con TMBZ se observó una banda muy tenue para CtaC en comparación con las bandas QcrC, QcrB y una banda muy intensa para los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$ . En la tinción con azul de Coomassie se pudieron identificar a las subunidades AtpD, YjID, CtaC, QcrC, QcrB, QcrA, a NarI, NarJ y a los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$ . En esta fracción se cargaron 0.41nmol de citocromo *c*, 0.26nmol de *b*, 0.014nmol de *a* y 75 $\mu\text{g}$  de proteína (Tabla 15) (Figura 20 b).

Tabla 15. nmol y  $\mu\text{g}$  de citocromos utilizados en los geles LiDS-PAGE para cada una de las fracciones obtenidas de la columna DEAE-Toyopearl de la fracción IVA. Se cargó la misma cantidad de proteína para todas las fracciones sin que la concentración de nmol de citocromos *c* disminuyera de 0.15nmol.

	nmol por carril			$\mu\text{g}$ de proteína
	citocromo <i>c</i>	citocromo <i>b</i>	citocromo <i>a</i>	
<b>Fracción I</b>	0.41	0.26	0.014	75
<b>Fracción II</b>	0.36	0.11	0.063	75
<b>Fracción III</b>	0.29	0.09	0.065	75

Para las actividades de las fracciones de las cromatografías con DEAE-Toyopearl se utilizaron 0.1mg de proteína para cada ensayo, exceptuando la fracción I de la fracción IVA, en la cual se utilizaron 0.05mg de proteína por haberse obtenido poca muestra en la columna. Esta fracción tuvo un enriquecimiento en la actividad del complejo  $b_6c$  de 6.46 veces con respecto a las membranas y de 3.49 con respecto a la fracción IVA (1.2nmoles de cit  $c$  reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) y no se detectó actividad para la  $caa_3$  (Tabla 16 y 17) (Figura 20 c). Para esta fracción sólo se realizaron actividades para el  $b_6c$  y la  $caa_3$  por haberse obtenido poca muestra en la columna. Para las otras dos fracciones se decidió hacer el ensayo para la NADH DH y la SDH para determinar si efectivamente la NADH DH permaneció en alguna de las fracciones con el  $b_6c$  o la  $caa_3$ .

Tabla 16. Valores de las actividades enzimáticas de cada uno de los complejos respiratorios de *B. subtilis* en las fracciones obtenidas de la cromatografía con DEAE-Toyopearl. (U= nmoles DCPIP ó cit  $c$  (reducido ú oxidado)  $\text{min}^{-1}$ ). n.d.= no detectado.

	NADH Deshidrogenasa	Succinato Deshidrogenasa	Complejo $b_6c$	Citocromo $c$ oxidasa $caa_3$
U/mg				
Membranas	21.13	2.78	1.23	20.35
Fracción IVA	50.88	3.01	2.29	5.04
Fracción I	n.d.	n.d.	7.97	0
Fracción II	3.13	0	2.08	2.86
Fracción III	0.99	0	4.44	0.66

Tabla 17. Valores de recuperación de la actividad enzimática de cada uno de los complejos respiratorios comparados contra la actividad de cada complejo obtenido con las membranas y la fracción IVA por separado, asignándoles un valor de 1. Los valores más altos de las fracciones en donde se encontró un enriquecimiento de la actividad enzimática se muestran en rojo. n.d.=no detectado. A= con respecto a las membranas. B= con respecto a la fracción IVA.

	NADH Deshidrogenasa		Succinato Deshidrogenasa		Complejo $b_6c$		Citocromo $c$ oxidasa $caa_3$	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Membranas	1		1		1		1	
Fracción IVA	2.41	1	1.08	1	1.85	1	0.25	1
Fracción I	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.46	3.49	n.d.	n.d.
Fracción II	0.15	0.06	n.d.	n.d.	1.69	0.91	0.14	0.57
Fracción III	0.05	0.02	n.d.	n.d.	3.59	1.94	0.03	0.13

Se realizaron pruebas de consumo de oxígeno utilizando como referencia a las membranas de *B. subtilis*. Para las muestras se utilizó la concentración del citocromo  $a$  para saber qué cantidad de muestra se debía adicionar. Estas pruebas se realizaron para saber si en cada fracción se obtuvo algún supercomplejo entre alguno de los cuatro

complejos respiratorios y alguna oxidasa terminal como la *caa*<sub>3</sub> o la *aa*<sub>3</sub>. Para las pruebas de consumo de oxígeno en el caso de las membranas se utilizaron diferentes cantidades de proteína hasta que se encontró una cantidad suficiente para observar una pendiente adecuada y así utilizarla como referencia, la cual fue de 0.5mg de proteína ya que no se pudo cargar la misma cantidad que en las fracciones por tratarse de membranas completas y no se podía observar ninguna pendiente. En el caso de las fracciones también se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de citocromo *a* para obtener una pendiente visible. En las membranas al agregar el DBH<sub>2</sub> (14.06nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) se comenzó a observar una pendiente o valor de consumo de oxígeno. Al agregar el NaN<sub>3</sub> incluso se observó un aumento en el valor de consumo de oxígeno (14.7nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) y al agregar NaCN la pendiente disminuyó como se esperaba (9.10nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína). Estos valores se tomaron como el 100% de la actividad del consumo de oxígeno obtenido con las membranas aisladas. Con los inhibidores de las oxidasas terminales el consumo de oxígeno disminuyó, aunque no se inhibió del todo. En la fracción I no se observó consumo de oxígeno (Tabla 18) (Figura 20 d).

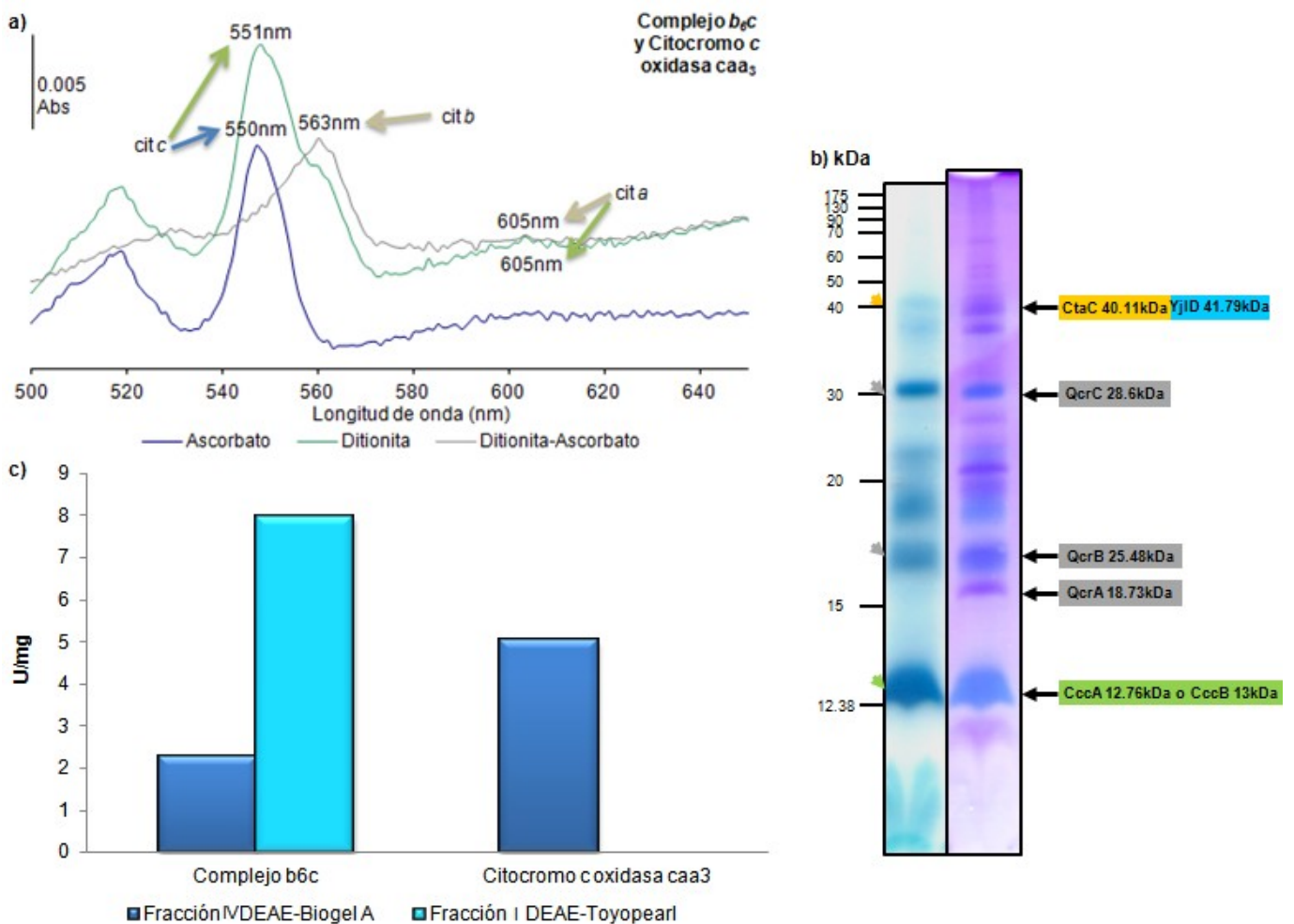
Tabla 18. Cantidades de proteína y concentraciones de citocromo *a* utilizados en los ensayos de oximetría para las fracciones de la cromatografía de DEAE-Toyopearl. Aquí se muestra la velocidad de consumo de oxígeno (nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) para cada fracción. Además valores porcentuales la velocidad de consumo de oxígeno con respecto a las membranas aisladas. n.d.=no detectada.

	mg de proteína	nM de citocromo <i>a</i>	Valor de la pendiente			Valor de la pendiente en %		
			DBH <sub>2</sub>	NaN <sub>3</sub>	NaCN	DBH <sub>2</sub>	NaN <sub>3</sub>	NaCN
<b>Membranas</b>	0.5	990	14.06	14.70	9.10	100	100	100
<b>Fracción I</b>	0.02	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	0.05	200	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Fracción II</b>	0.06	100	60.9	73.99	135.92	433.21	503.49	1494
	0.12	200	77.1	37.84	45.3	548.19	257.49	498
<b>Fracción III</b>	0.08	100	n.d.	50.25	73.28	n.d.	341.94	805.6
	0.16	200	56.7	17.49	48.39	402.91	119.02	532

Se realizaron gels claros nativos de alta resolución (1D) que se analizaron después por 2D SDS-PAGE porque se sospechó que en estas fracciones había un supercomplejo entre el *b*<sub>6c</sub>, la *caa*<sub>3</sub> y los citocromos *c*<sub>550</sub> y *c*<sub>551</sub> y otro entre la SDH y la *aa*<sub>3</sub>. Aquí sólo se realizó una tinción con plata por haberse obtenido poca muestra en la cromatografía. En el gel de 1D se pudieron identificar 6 bandas nombradas de la A a la F. Para la banda A de más alto peso molecular por estar más cerca del 4% en el gradiente



se identificaron en el gel de 2D teñido con plata por sus pesos moleculares aparentes a QcrC, QcrB y a QcrA así como para los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$ . También se logró identificar a CtaD y CtaC con muy poca señal en el gel de 2D reforzando que en esta fracción como se mostró en los espectros no había un citocromo *a* para la  $caa_3$ , tampoco tuvo actividad enzimática y no se observó consumo de oxígeno. También se identificó a YjID, NarH y a AtpA. En la línea B se identificó a NarH, AtpA, YjID y a CtaE también con poca señal en la tinción. En la línea C se observó una línea continua de pequeñas proteínas, de las cuales se lograron identificar a YjID, NarH, AtpA. En la línea D sólo se encontraron proteínas de bajo peso molecular de las cuales se identificaron a YjID. En las bandas E y F se observaron sólo proteínas de bajo peso molecular. (Figura 20 e). La principal diferencia que se observó entre estos gels y los de la fracción II con DEAE-Biogel A (Figura 14 e) es que en la 1D los complejos migraron una mayor distancia por lo que es posible que en estas fracciones se rompieron las asociaciones entre complejos y por tanto corrieron hacia pesos moleculares menores.



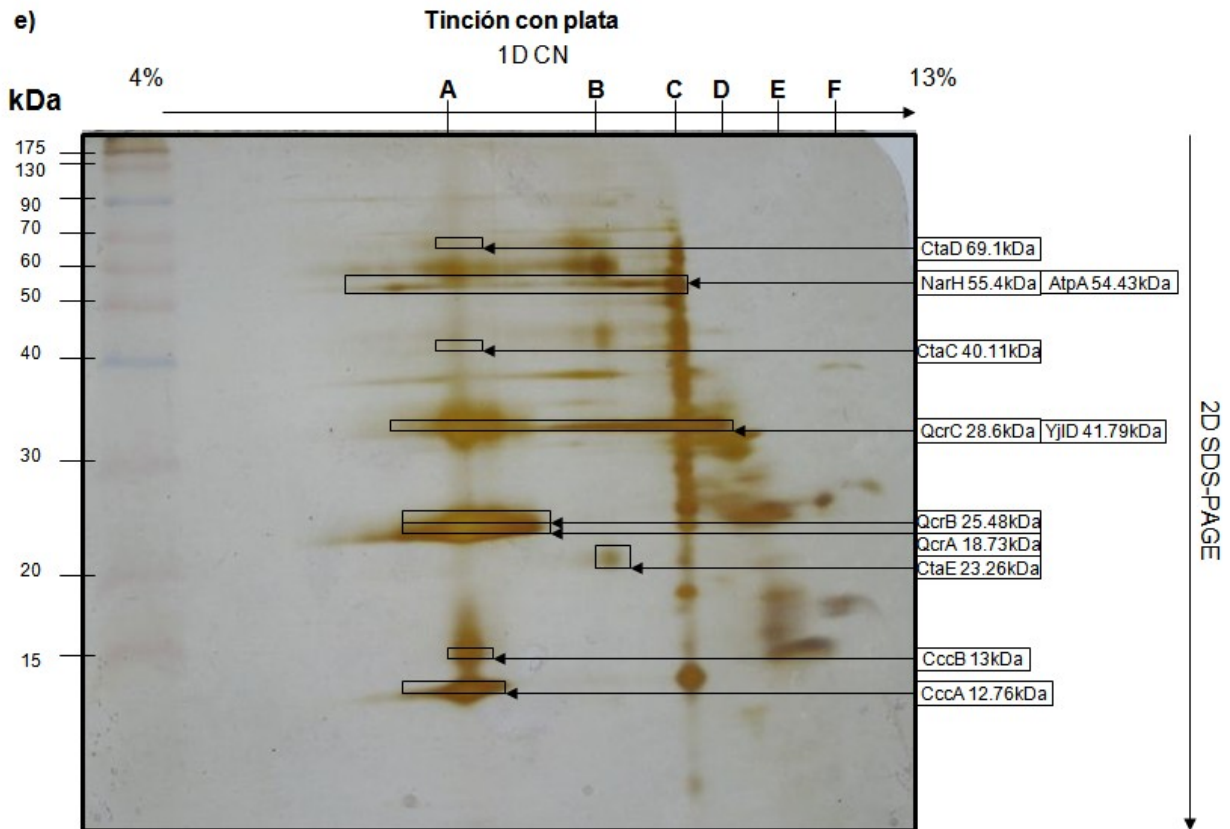
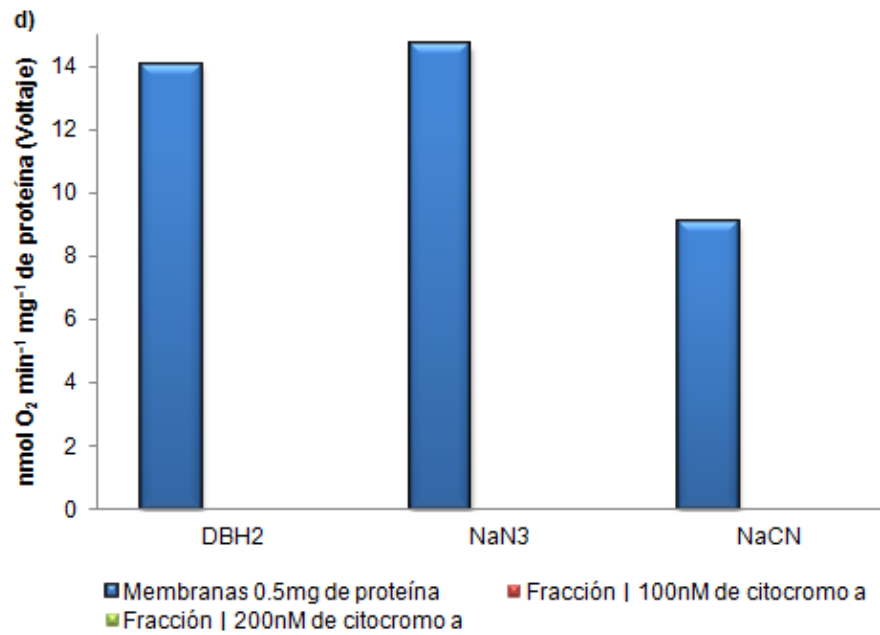


Figura 20. Análisis de la fracción I de la cromatografía con DEAE-Toyopearl. a) Espectros diferenciales de absorción (asc-oxi), (dit-oxi) y (dit-oxi) menos (asc-oxi) con una interpretación de los posibles citocromos de los complejos respiratorios por la longitud de onda en la que aparecen. b) Gels de poliacrilamida al 14% con LiDS. En el costado izquierdo del gel se encuentran los marcadores de peso molecular. El gel del lado izquierdo se tiñó con TMBZ para detección de hemos covalentemente unidos y el gel del lado derecho se teñió con Azul de Coomasie para todas las proteínas. En el costado derecho se muestra la posible identidad de las subunidades de los complejos respiratorios identificadas por su peso molecular aparente. Se utilizaron 75µg de proteína, 0.41nmoles de citocromo c, 0.26nmoles de citocromo b y 0.014nmoles de citocromo a para este carril. c) Actividades enzimáticas específicas del complejo *b<sub>6</sub>c* y de la citocromo c oxidasa *caa<sub>3</sub>* en las que se compararon con la actividad obtenida para la fracción IVA (eje izquierdo) contra las fracciones obtenidas con DEAE-Toyopearl (eje derecho). Se utilizaron 0.05mg de proteína para la fracción I y 0.1mg de proteína para los demás ensayos de las fracciones 2 y 3. (U= nmoles de cit c (reducido ú oxidado) min<sup>-1</sup>). Se utilizaron 0.05mg de proteína para el ensayo. d) Análisis de consumo de oxígeno por oximetría de

las fracciones obtenidas utilizando DBH<sub>2</sub> como donador de electrones y NaN<sub>3</sub> y NaCN como inhibidores de las oxidasas terminales de la cadena respiratoria. e) Gel claro nativo de alta resolución (1D) y el análisis por 2D SDS-PAGE teñido con nitrato de plata en los cuales se cargaron 100µg de proteína. Arriba se muestra el carril del gel claro nativo de alta resolución con las bandas identificadas y marcadas con una línea y una letra. En el costado izquierdo del gel se muestran los marcadores de pesos moleculares. En la parte superior el gradiente de poliacrilamida utilizado. En el costado derecho las proteínas que se identificaron por su peso molecular aparente.

### 5.3 Fracción II:

En el diferencial para esta fracción (asc-oxi) se observó un citocromo *c* (550nm) y un citocromo *a* (604nm) que se acerca mucho al citocromo *a* de la *caa*<sub>3</sub>. En el diferencial (dit-oxi) se observó un citocromo *c* (551nm) y un citocromo *a* (606nm) cercano al de la *caa*<sub>3</sub>. En el diferencial (dit-oxi) menos (asc-oxi) se pudo apreciar un citocromo *b* (562nm) cercano al del *b*<sub>6c</sub> por su pico de absorción y un citocromo *a* (608nm) (Figura 21 a). Aquí se encontró para el citocromo *c* una concentración absoluta de 54.31µM y una concentración relativa de 5.56nmoles/mg proteína, para el citocromo *b* se encontró una concentración absoluta de 17.79µM y una concentración relativa de 1.58nmoles/mg proteína y para el citocromo *a* se encontró una concentración absoluta de 9.55µM y una concentración relativa de 0.85nmoles/mg proteína y se encontró un cociente de relación de citocromos *b* por *c* de 0.33 y de citocromos *a* por *c* de 0.18 (Tabla 13 y 14).

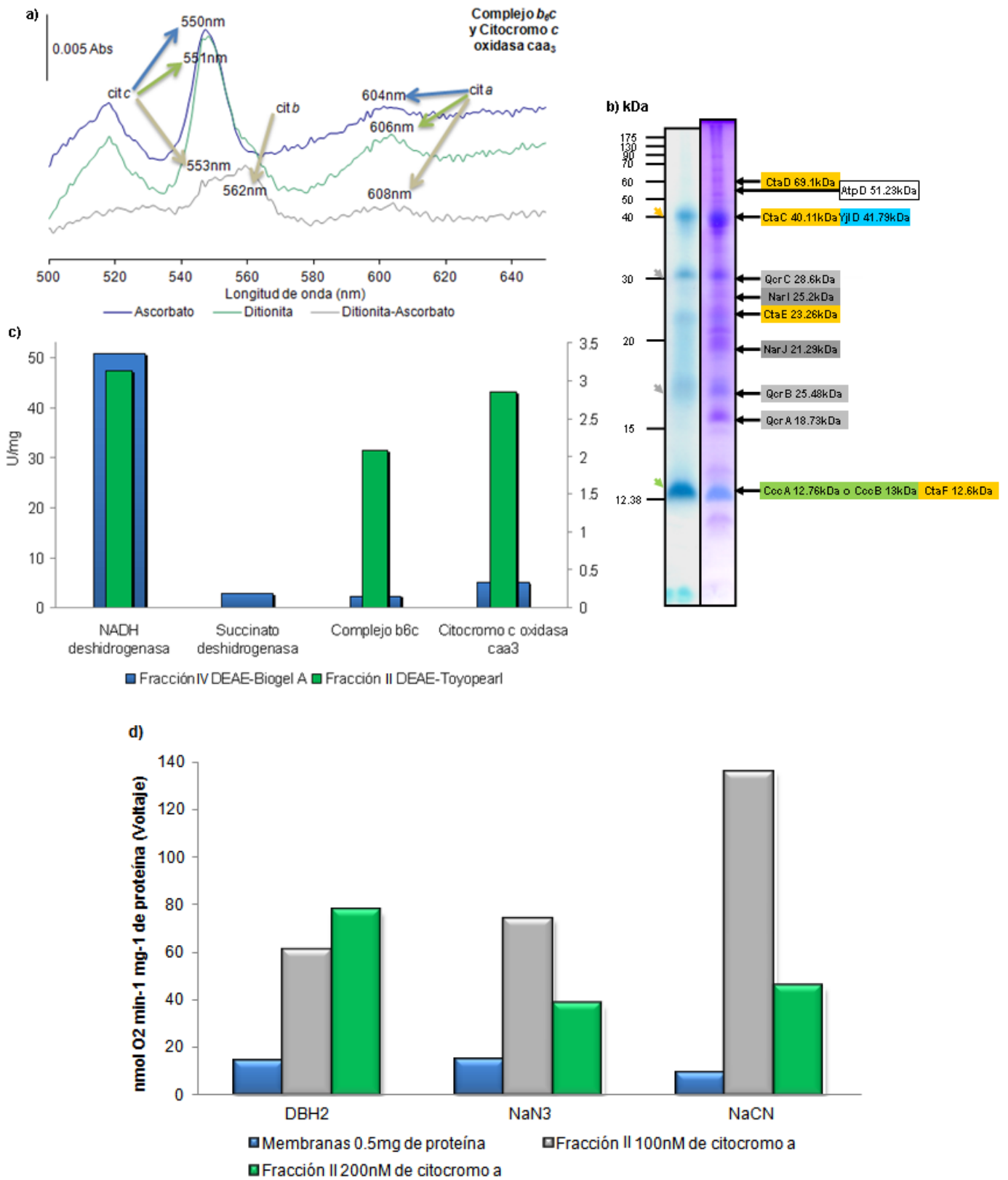
En el gel con LiDS teñido con TMBZ se observó una banda para CtaC, QcrC, QcrB, *c*<sub>550</sub> y *c*<sub>551</sub>. En la tinción con Coomasie del mismo gel se pudieron identificar a CtaD, CtaC, CtaE, CtaF, QcrC, QcrB, QcrA, YjID, AtpD, NarI, NarJ, *c*<sub>550</sub> y *c*<sub>551</sub>. En este gel se observó la presencia de una banda con tinción positiva sobre QcrB y debajo de QcrA. Se cargó una concentración de 0.36nmoles de citocromo *c*, 0.11nmoles de *b*, 0.063nmoles de *a* y 75µg de proteína (Tabla 15) (Figura 21 b).

En esta fracción se midieron las actividades de cuatro de los complejos respiratorios y se encontró un valor bajo de la actividad para la NADH DH con respecto a las membranas y con respecto a la fracción IVA (3.13nmoles DCPIP reducido min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína). No se detectó actividad de la SDH en la fracción lo que reafirmó lo encontrado en los espectros de absorción y en los geles con LiDS. Para el *b*<sub>6c</sub> se obtuvo un incremento en la actividad de 1.69 veces con respecto a las membranas y un valor bajo de actividad con respecto a la fracción IVA (2.08nmoles de cit *c* reducido min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína). También se obtuvo un valor bajo en la actividad de de citocromo *c* oxidasa

con respecto a las membranas y con respecto a la fracción IVA para la *caa*<sub>3</sub> (2.86nmoles de cit c oxidado min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) la cual fue la más alta para esta cromatografía (Tabla 16 y 17) (Figura 21 c).

En las pruebas de consumo de oxígeno se observó un incremento en la actividad del consumo de oxígeno al agregar el DBH<sub>2</sub> que fue del 433.21% con respecto a las membranas (60.9nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) con 100nM de citocromo *a* y un incremento de la actividad del 548.19% con respecto a la actividad de las membranas (77.1nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) con 200nM de citocromo *a*. Después se agregó NaN<sub>3</sub> y se obtuvo un incremento en la actividad del 503.49% (73.99nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) con 100nM y 257.49% (37.84nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) con 200nM con respecto a la actividad de las membranas. Finalmente se le agregó NaCN y se obtuvieron un incremento del 1494% (135.92nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) con 100nM y 498% (45.2nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) con 200nM con respecto a las membranas. El consumo no se inhibió con cianuro incluso parecía aumentar la velocidad con 100nM de citocromo *a*. Esta fracción mostró mayor actividad de consumo de oxígeno que las membranas. (Tabla 18) (Figura 21 d).

Esta fracción también se analizó utilizando un gel claro nativo de alta resolución (1D) el cual se analizó a su vez por 2D SDS-PAGE. En el gel de 1D se identificaron tres bandas principales nombradas de la A a la C. En la tinción con TMBZ del gel de 2D solamente en la banda A se obtuvo señal para esta tinción. Se observó a una banda que no correspondió al peso de alguna proteína con un hemo covalentemente unido de alrededor de 61kDa, también se encontraron bandas correspondientes a CtaC de la *caa*<sub>3</sub>, QcrC y QcrC del *b*<sub>6c</sub> y a *c*<sub>551</sub> (Figura 21 e). En la tinción con Coomassie en la banda A se pudieron identificar a CtaD, CtaC, CtaE, CtaF, a AtpD de la ATPsintasa, a YjID de la NADH DH, a NarI de la nitrato reductasa, QcrC, QcrB, QcrA y a *c*<sub>551</sub>. En la banda B se identificaron a CtaD, AtpD, YjID y NarI. En la banda C, la banda de menor peso molecular de las tres, se identificaron a CtaD, YjID, NarI y NarJ (Figura 21 f).



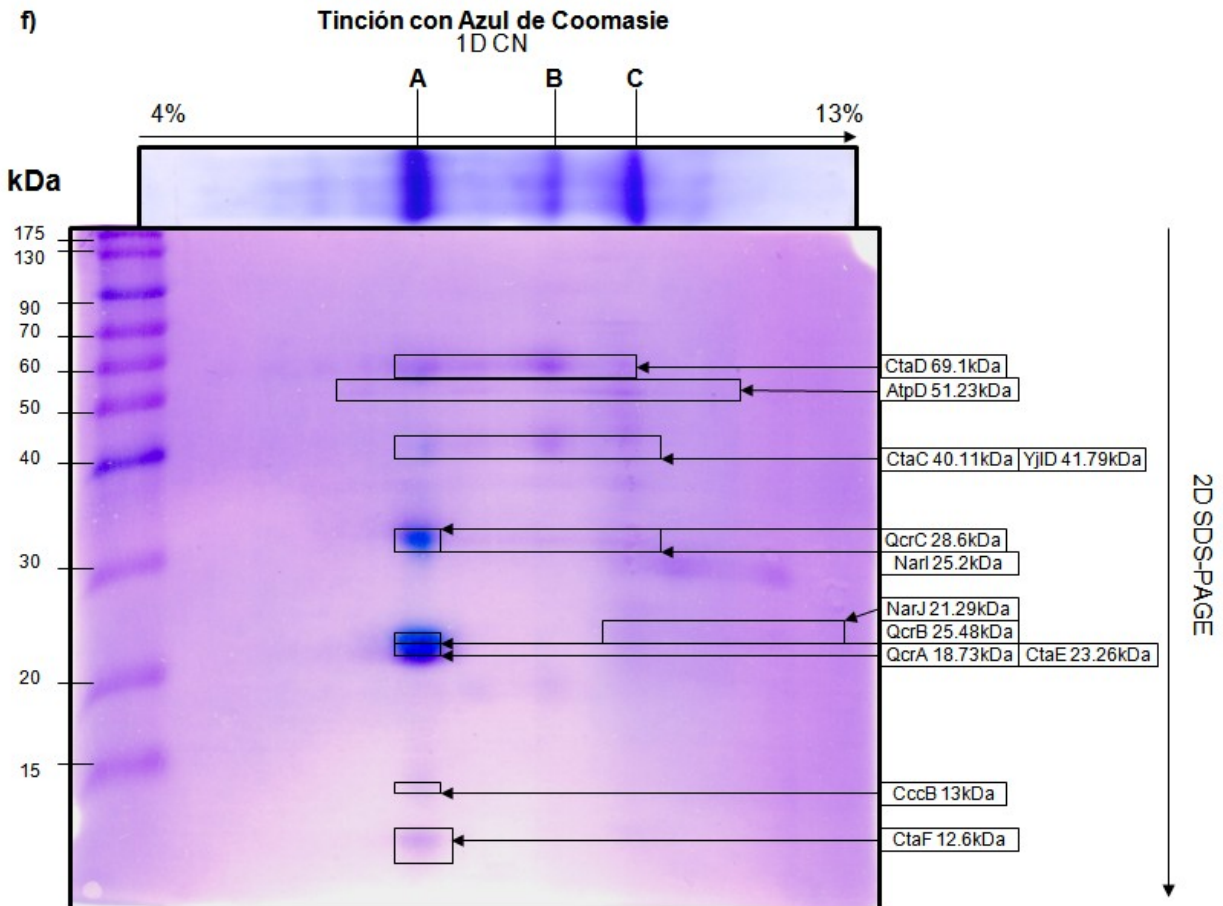
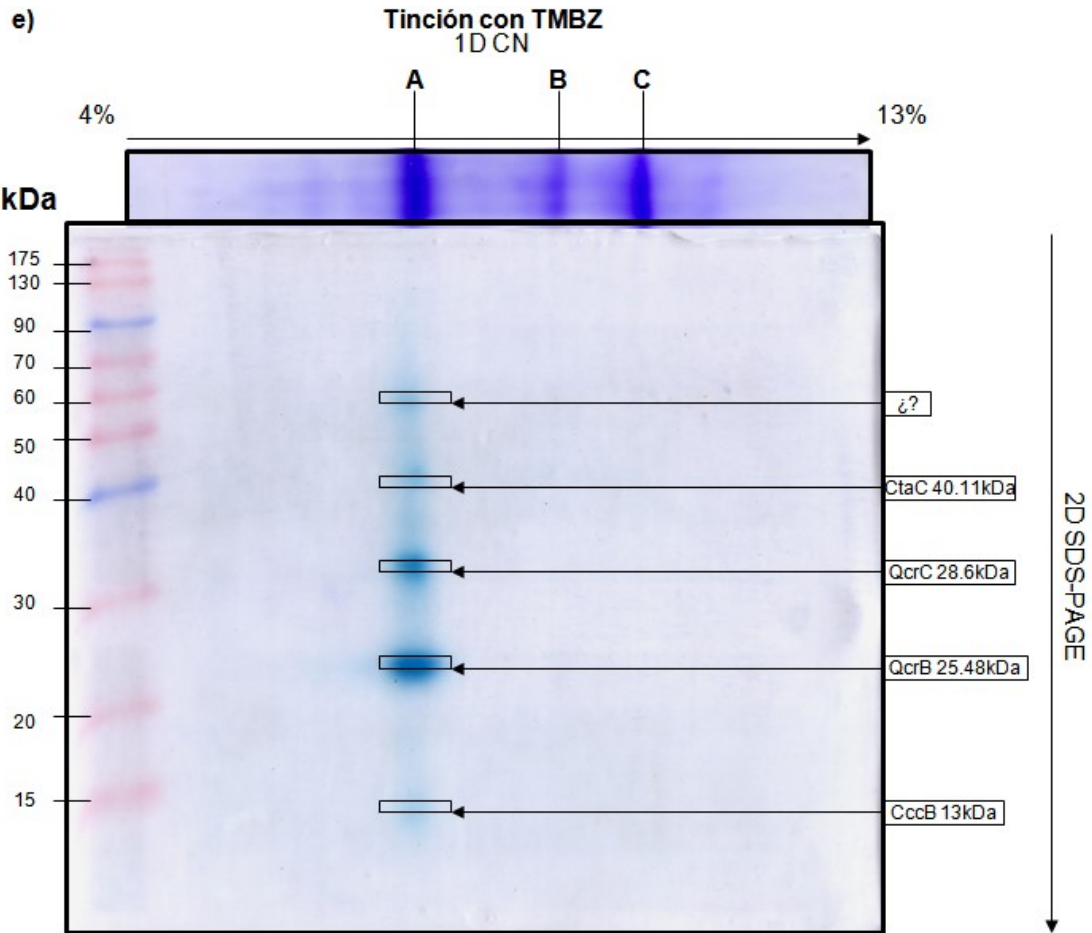


Figura 21. Análisis de la fracción II de la cromatografía con DEAE-Toyopearl. a) Espectros diferenciales de absorción (asc-oxi), (dit-oxi) y (dit-oxi) menos (asc-oxi) con una interpretación de los posibles citocromos de los complejos respiratorios por la longitud de onda en la que aparecen. b) Geles de poliacrilamida al 14% con LiDS. En el costado izquierdo del gel se encuentran los marcadores de peso molecular. El gel del lado izquierdo se tiñó con TMBZ para detección hemos covalentemente unidos y el gel del lado derecho fue teñido con Azul de Coomasie para todas las proteínas. En el costado derecho se indica la posible identidad de las subunidades de los complejos respiratorios identificadas por su peso molecular aparente. Se utilizaron 75µg de proteína, 0.36nmoles de citocromo *c*, 0.11nmoles de citocromo *b* y 0.063nmoles de citocromo *a* para este carril. c) Actividades enzimáticas específicas de cuatro de los complejos respiratorios en la que se comparó la fracción IVA (eje izquierdo) contra las tres fracciones obtenidas con DEAE-Toyopearl (eje derecho). Se utilizaron 0.1mg de proteína para los ensayos. (U= nmoles DCPIP reducidos min<sup>-1</sup> o nmoles de cit *c* (reducido u oxidado) min<sup>-1</sup>). d) Análisis de consumo de oxígeno por oximetría de las fracciones obtenidas utilizando DBH<sub>2</sub> como donador de electrones y NaN<sub>3</sub> y NaCN como inhibidores de las oxidasas terminales de la cadena respiratoria. Geles claros nativos de alta resolución (1D) y el análisis por 2D SDS-PAGE de la fracción II. d) tinción con TMBZ y e) tinción con azul de Coomasie en los cuales se cargaron 200µg de proteína. En el costado izquierdo se muestran los marcadores de peso molecular. Arriba se muestra el carril del gel claro nativo de alta resolución con las bandas identificadas y marcadas con una línea y una letra y en el costado derecho las proteínas que se identificaron por su peso molecular aparente.

### 5.4 Fracción III:

En el diferencial (asc-oxi) de esta fracción se observó un citocromo *c* (551nm) y un citocromo *a* (604nm), cercanos a los citocromos *c* y *a* de la *caa*<sub>3</sub> por sus picos de absorción. En el diferencial (dit-oxi) se observó un citocromo *c* (551nm), un citocromo *b* (561nm) para el del *b*<sub>6c</sub> y el citocromo *a* (605nm) de la *caa*<sub>3</sub>. En el diferencial (dit-oxi) menos (asc-oxi) se observó un citocromo *c* (552nm), el citocromo *b* (563nm) del *b*<sub>6c</sub> y el citocromo *a* (605nm) de la *caa*<sub>3</sub> (Figura 22 a). Aquí se encontró para el citocromo *c* una concentración absoluta de 49.65µM y una concentración relativa de 3.91nmoles/mg proteína, para el citocromo *b* una concentración absoluta de 15.89µM y una concentración relativa de 1.25nmoles/mg proteína y para el citocromo *a* una concentración absoluta de 11.08µM y una concentración relativa de 0.87nmoles/mg proteína y se encontró un cociente de relación de citocromos *b* por *c* de 0.32 y de citocromos *a* por *c* de 0.22 (Tabla 13 y 14).

En los geles con LiDS de poliacrilamida en la tinción con TMBZ se identificó a CtaC de la *caa*<sub>3</sub>, QcrC y QcrB del *b*<sub>6c</sub>, y a *c*<sub>550</sub> y *c*<sub>551</sub>. En la tinción con Coomasie se identificaron a las subunidades CtaD, CtaC, CtaE, CtaF, a AtpD de la ATPasa, a YjID de la NADH DH, QcrC, QcrB, QcrA, a NarI y NarJ de la nitrato reductasa, *c*<sub>550</sub> y *c*<sub>551</sub>. En esta fracción en la tinción con Coomasie se encontraron dos nuevas bandas sobre QcrB y debajo de QcrA que no se encontraron en las dos fracciones anteriores aunque se cargó la misma cantidad de proteína. En esta fracción se cargaron 0.29nmoles de citocromo *c*, 0.09nmoles de *b*, 0.65nmoles de *a* y 75µg de proteína (Tabla 15) (Figura 22 b).

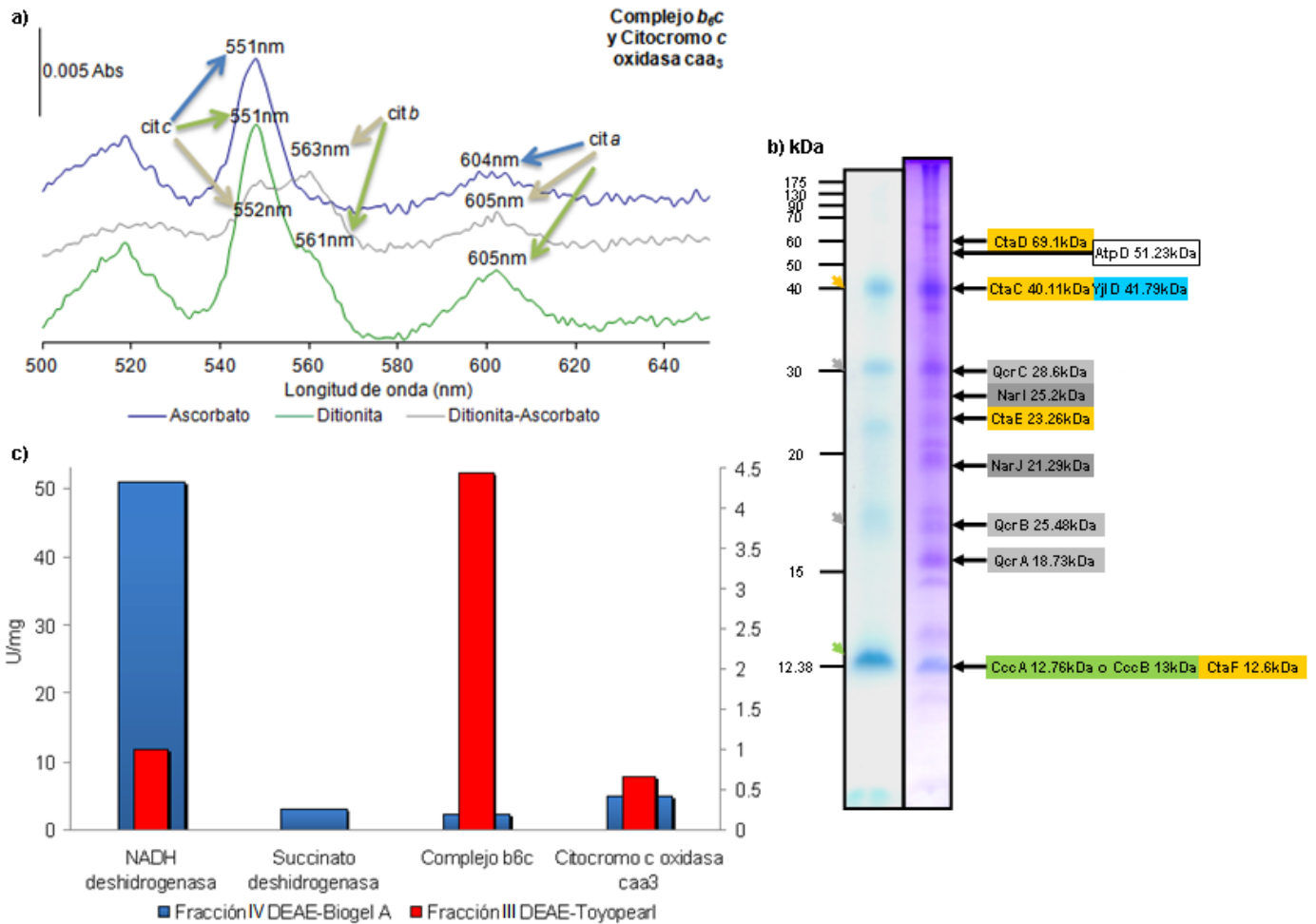
En las actividades enzimáticas de los cuatro complejos respiratorios se obtuvo un valor bajo de la actividad de NADH DH con respecto a las membranas y con respecto a los sobrenadantes (0.99nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). Para la SDH nuevamente no se detectó actividad en la fracción. Para el *b<sub>6</sub>c* se encontró un incremento en la actividad de 3.59 veces con respecto a las membranas y de 1.94 con respecto a la fracción IVA (4.43nmoles de cit c reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) y para la *caa<sub>3</sub>* un valor bajo de la actividad con respecto a las membranas y con respecto a la fracción IVA (0.66nmoles de cit c oxidado  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) (Tabla 16 y 17) (Figura 22 c).

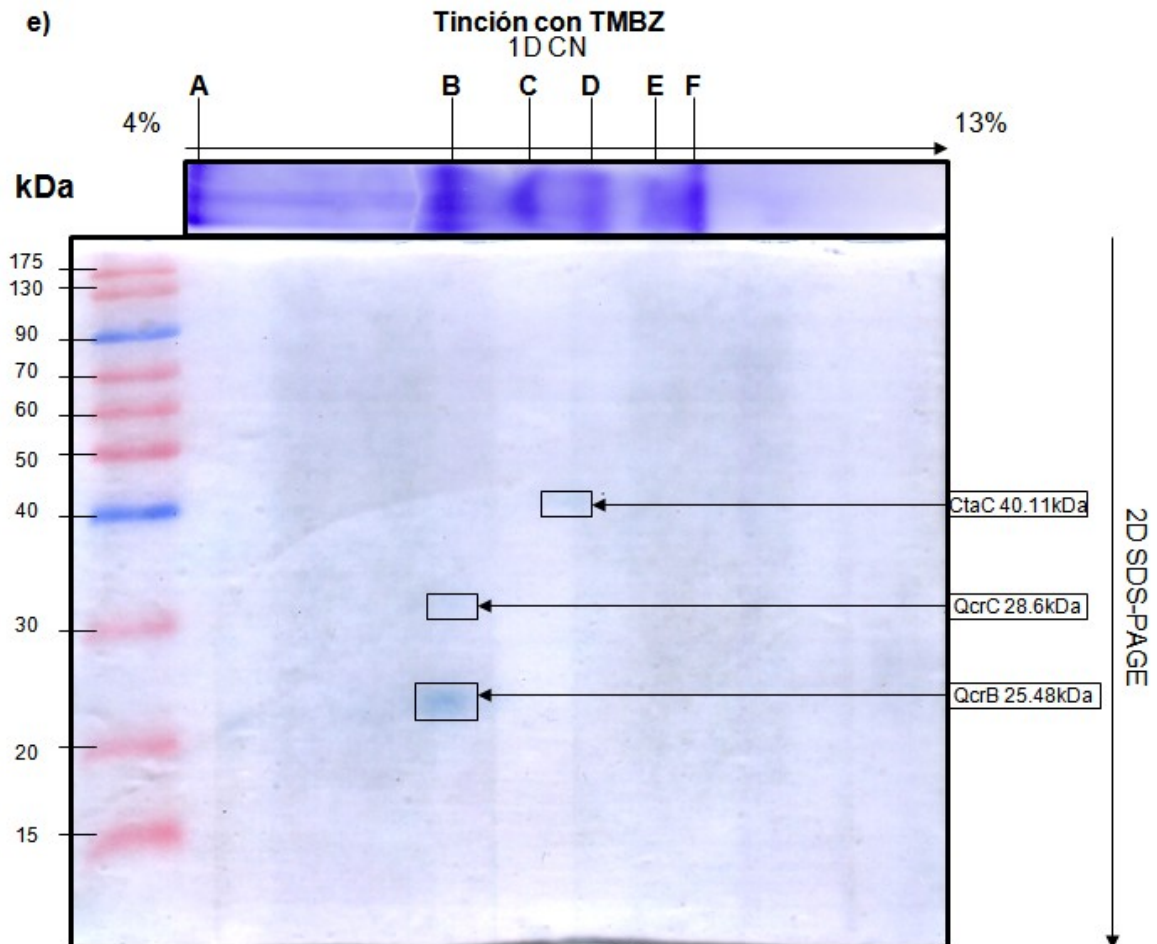
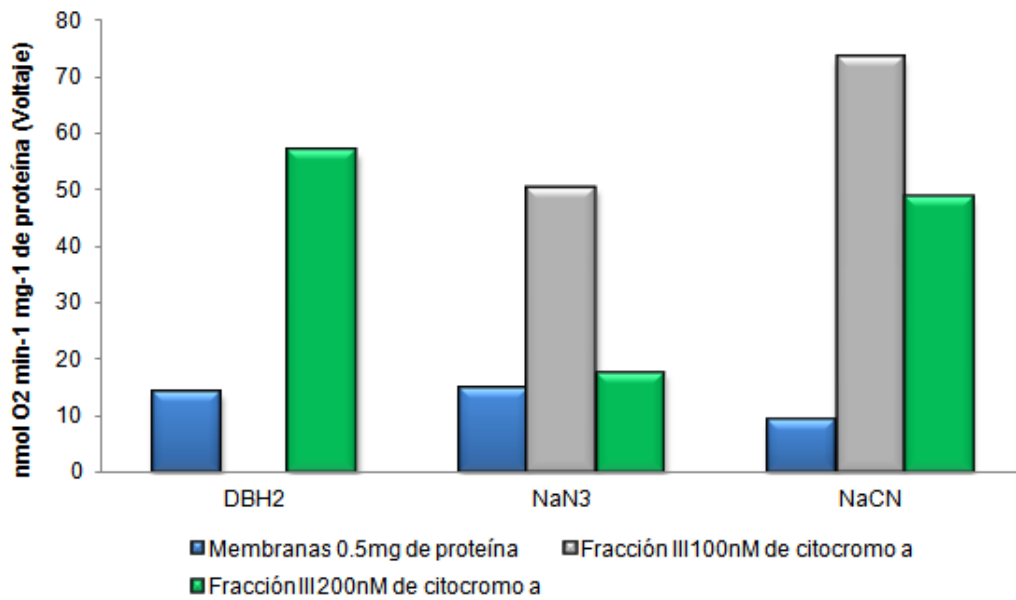
En los ensayos de oximetría para esta fracción no se detectó consumo de oxígeno con 100nM de citocromo *a* de alguna oxidasa al agregar DBH<sub>2</sub> pero al aumentar la concentración de citocromo *a* hasta 200nM la actividad se incrementó 402.91% (56.7nmoles O<sub>2</sub>  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) con respecto a las membranas. Al agregar NaN<sub>3</sub> se obtuvo un incremento de la actividad del 341.94% (50.25nmoles O<sub>2</sub>  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) con 100nM y un aumento del 119.02% (17.49nmoles O<sub>2</sub>  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) con 200nM con respecto a las membranas. Finalmente al agregar NaCN se observó un aumento en la actividad del 805.6% (73.28nmoles O<sub>2</sub>  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) con 100nM y un incremento del 532% (48.39nmoles O<sub>2</sub>  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) con 200nM con respecto a las membranas. Aquí nuevamente se observó un aumento del consumo de oxígeno al añadir NaCN indicando la presencia de otras quinol oxidasas insensibles a NaCN, además de la *caa<sub>3</sub>* (Tabla 18) (Figura 22 d).

En el análisis de la fracción por medio de un gel de 1D se identificaron seis bandas que se nombraron de la A a la F. En análisis del gel de 2D sólo se identificaron tres bandas con señal para la tinción con TMBZ, que fueron CtaC de la *caa<sub>3</sub>* en la banda C y QcrC y QcrB del *b<sub>6</sub>c* en la banda B, por sus pesos moleculares aparentes, además de que hasta ahora todas las bandas con señal para esta tinción habían corrido en la misma banda de los geles de claros nativos, pero en esta ocasión la *caa<sub>3</sub>* migró aparte, lo que podría indicar que migró sin el *b<sub>6</sub>c* (Figura 22 e). En la tinción con Coomassie se observó una banda de alto peso molecular en la 1D con gran cantidad de subunidades. Esto es de llamar la atención pues no se había observado en las otras fracciones. En la banda A se pudieron identificar a NarG y NarH de la nitrato reductasa, a AtpA de la



ATPasa y una línea de proteínas de todos los pesos moleculares. En la banda B la cual fue la que presentó la mayor intensidad se encontró a NarH, NarI, YjID de la NADH DH, QcrC, QcrB, QcrA y CtaE. En la banda C se identificó a YjID, AtpA, CtaD, CtaC y a NarH, NarI. En la banda D se identificaron a CtaD, CtaC y a NarH, NarI, YjID, AtpA. En la banda E se identificó a NarH, NarI, YjID, AtpA y CtaC. Finalmente en la banda F se identificó a NarH, NarI, YjID, AtpA y CtaC. (Figura 22 f).





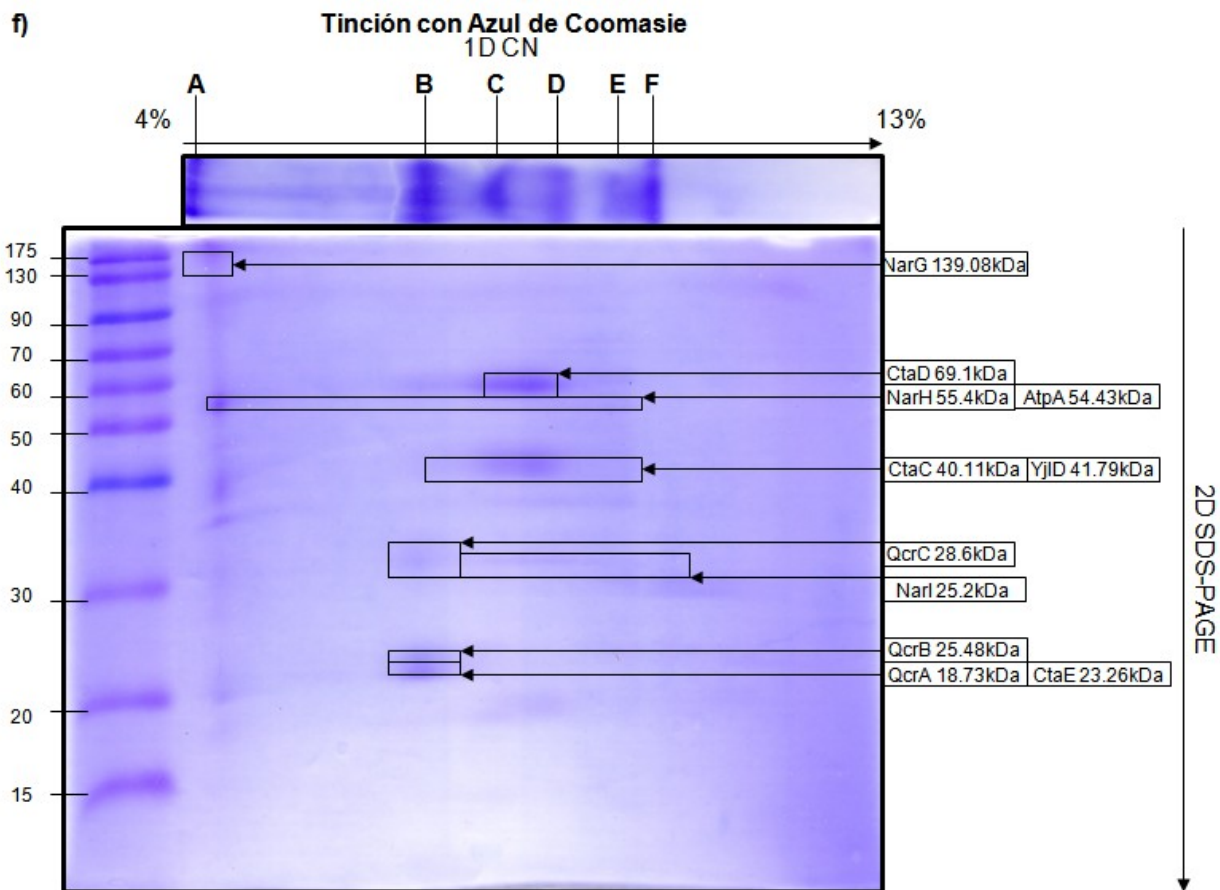


Figura 22. Análisis de la fracción III de la cromatografía con DEAE-Toyopearl. a) Espectros diferenciales de absorción (asc-oxi), (dit-oxi) y (dit-oxi) menos (asc-oxi) con una interpretación de los posibles citocromos de los complejos respiratorios por la longitud de onda en la que aparecen. b) Geles de poliacrilamida al 14% con LiDS. En el costado izquierdo del gel se encuentran los marcadores de peso molecular. El gel del lado izquierdo se tiñó con TMBZ para detección hemo covalentemente unidos y el gel del lado derecho fue teñido con Azul de Coomassie para todas las proteínas. En el costado derecho la posible identidad de las subunidades de los complejos respiratorios identificadas por su peso molecular aparente. Se utilizaron 75µg de proteína, 0.29nmoles de citocromo *c*, 0.09nmoles de citocromo *b* y 0.065nmoles de citocromo *a* para este carril. c) Actividades enzimáticas específicas de cuatro de los complejos respiratorios en las que se comparó la fracción IVA (eje izquierdo) contra las tres fracciones obtenidas con DEAE-Toyopearl (eje derecho). Se utilizaron 0.1mg de proteína para los ensayos. (U= nmoles DCPIP reducidos  $\text{min}^{-1}$  o nmoles de cit *c* (reducido ú oxidado)  $\text{min}^{-1}$ ). d) Análisis de consumo de oxígeno por oximetría de las fracciones obtenidas utilizando  $\text{DBH}_2$  como donador de electrones y  $\text{NaN}_3$  y  $\text{NaCN}$  como inhibidores de las oxidasas terminales de la cadena respiratoria. Geles claros nativos de alta resolución (1D) y el análisis por 2D SDS-PAGE. e) tinción con TMBZ y f) tinción con azul de Coomassie en los cuales se cargaron 200µg de proteína. En el costado izquierdo se muestran los pesos de los marcadores. Arriba se muestra en el carril del gel claro nativo de alta resolución con las bandas identificadas y marcadas con una línea y una letra y en el costado derecho una interpretación del gel de segunda dimensión en el que se identificaron a las subunidades por su peso molecular aparente.

## 6. Cromatografía de las fracciones V y VI (DEAE-Biogel A) en la cromatografía DEAE-Toyopearl

Desde este punto se nombró a la fracción V y VI como fracción V,VIA. Se decidió analizar a las fracciones V y VI por presentar una posible asociación entre la SDH y la  $aa_3$ . Debido a que sus espectros de absorción mostraron los mismos picos se decidió juntarlas para después recromatografiarlas en una columna con DEAE-Toyopearl en las mismas condiciones que la fracción IVA. La muestra fue tratada en las mismas

condiciones que las cromatografías pasadas. Se obtuvieron tres picos en el perfil de la cromatografía. Se decidió concentrar a cada pico por separado, para la fracción I se concentraron del tubo 94 al 99, para la fracción II se concentraron del tubo 102 al 104 y para la fracción III del tubo 105 al 107 (Figura 23). Estas fracciones se obtuvieron a concentraciones de NaCl más altas que las de la fracción IV y a una concentración parecida a las fracciones 5 y 6 (Tabla 19).

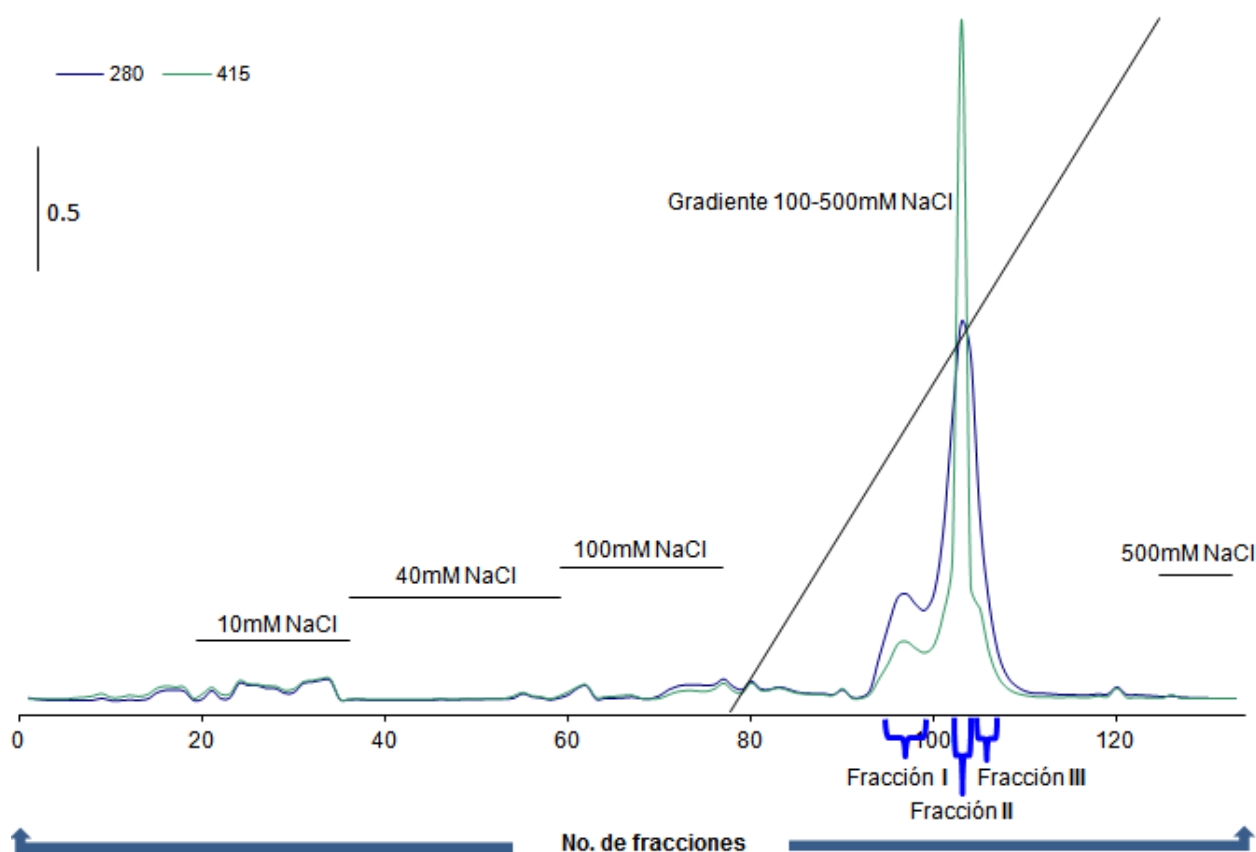


Figura 23. Perfil de absorción (280 y 415nm) de la cromatografía de intercambio iónico con la resina DEAE-Toyopearl de la fracción V,VIA en donde se muestran los tubos que abarcaron cada lavado. Se realizaron lavados con 10, 40, 100 y 500mM y un gradiente de 100 a 500mM de NaCl. Debajo del perfil se muestran por medio de llaves los tubos que se tomaron para concentrar resultando en 3 fracciones.

Tabla 19. Porcentaje del gradiente y concentración de NaCl de la cromatografía DEAE-Toyopearl en la que se obtuvo cada fracción.

	% de NaCl	mM NaCl
<b>DEAE-Toyopearl</b>		
<b>Fracción 5 y 6</b>		
1	45.59	282.35
2	58.027	332.09
3	62.172	348.67

## 6.1 Análisis de las fracciones obtenidas de la cromatografía con DEAE-Toyopearl

Todas las fracciones fueron analizadas por medio de espectros de absorción, electroforesis en PAGE-LiDS, actividad de complejos respiratorios, ensayos de oximetría y geles de 1D analizados después por geles de 2D SDS-PAGE.

### 6.2 Fracción I:

Nuevamente se realizaron espectros de absorción de las tres fracciones concentradas. En el diferencial (asc-oxi) se pudo observar un citocromo *c* (550nm). En el segundo diferencial (dit-oxi) se observó el citocromo *b* (557nm) de la SDH y el citocromo *a* (600nm) de *aa*<sub>3</sub>. En el diferencial (dit-oxi) menos (asc-oxi) se encontró nuevamente el citocromo *b* (557nm) de la SDH y un citocromo *a* (602nm) cercano al citocromo *a* de *aa*<sub>3</sub> por su pico de absorción observándose que en efecto las fracciones de la cromatografía pasada y esta contienen complejos diferentes (Figura 24 a).

En la tabla 20 se muestra que la mayor concentración de citocromo *c* se obtuvo en la fracción I seguida por la fracción II, para el citocromo *b* la mayor concentración la tuvo la fracción I, y para el citocromo *a* la fracción II. Para la concentración relativa (nmoles/mg de proteína) la mayor concentración de citocromo *c* la tuvo la fracción I, para el citocromo *b* la fracción I y para el citocromo *a* la fracción III. En la tabla 21 se observa que el mayor cociente de relación entre el citocromo *b* y el *c* lo tuvo la fracción I y la relación de citocromos *a* por *c* los tuvo la fracción III. Todos estos cálculos se hicieron para confirmar y respaldar lo que se observó en los espectros diferenciales.

Aquí se encontró para el citocromo *c* una concentración absoluta de 21.16 $\mu$ M y una concentración relativa de 2.69nmoles/mg proteína, para el citocromo *b* una concentración absoluta de 30.58 $\mu$ M y una concentración relativa de 3.89nmoles/mg proteína y para el citocromo *a* una concentración absoluta de 15.62 $\mu$ M y una concentración relativa de 1.99nmoles/mg proteína y se encontró un cociente de relación de citocromos *b* por *c* de 1.45 y de citocromos *a* por *c* de 0.74 (Tabla 20 y 21).

Tabla 20. Concentraciones absoluta ( $\mu\text{M}$ ) y concentración relativa (nmol/mg proteína) de citocromos *c*, *b* y *a* de las fracciones de la cromatografía de intercambio iónico con la resina DEAE-Toyopearl. Asc. Dit. Ditionita. Oxi. Oxidado. n.d. no determinado.

	Diferencial (Dit-Oxi)	
	$\mu\text{M}$	nmol/mg prot.
<b>Fracción I</b>		
<b>Citocromo c</b>	21.16	2.69
<b>Citocromo b</b>	30.58	3.89
<b>Citocromo a</b>	15.62	1.99
<b>Fracción II</b>		
<b>Citocromo c</b>	20.04	2.68
<b>Citocromo b</b>	16.17	2.16
<b>Citocromo a</b>	19.8	2.65
<b>Fracción III</b>		
<b>Citocromo c</b>	8.44	1.97
<b>Citocromo b</b>	8.21	1.91
<b>Citocromo a</b>	13.35	3.11

Tabla 21. Cocientes entre los citocromos *b:c* y *a:c*.

	Cociente b:c	Cociente a:c
	(Dit-Oxi)	
<b>Fracción I</b>	1.45	0.74
<b>Fracción II</b>	0.81	0.99
<b>Fracción III</b>	0.97	1.58

Para este gel con LiDS se cargó la muestra en cada carril buscando un equilibrio entre la cantidad de proteína y la concentración del citocromos *c* para que no disminuyera de 0.15nmol. En el gel de poliácridamida con LiDS teñido con TMBZ se identificaron a las subunidades CtaC de la *caa<sub>3</sub>*, *c<sub>550</sub>* y *c<sub>551</sub>* las cuales presentaron la mayor intensidad, en comparación con QcrC y QcrB del *b<sub>6c</sub>* que mostraron muy poca señal para esta tinción. Con Coomassie se pudieron identificar a QoxB, QoxA y QoxC de la *aa<sub>3</sub>*, AtpD de la ATPsintasa, YjID de la NADH DH, SdhA, SdhB y SdhC de la SDH, a CtaC, a QcrC, QcrB, QcrA, a NarG, NarI y NarJ de la nitrato reductasa, CccA y CccB (*c<sub>550</sub>* y *c<sub>551</sub>*). Al comparar esta fracción con las fracciones de la cromatografía anterior, se pudo notar claramente cómo la mayoría de las bandas para la SDH o la *aa<sub>3</sub>* que aparecen en esta fracción no aparecieron anteriormente o presentaron muy poca tinción. También se encontraron nuevas bandas debajo de CtaC y arriba de QoxB las cuales tampoco se encontraron en la cromatografía pasada. En esta fracción se cargaron 0.2nmol de citocromo *c*, 0.29nmol de *b*, 0.15nmol de *a* y 75 $\mu\text{g}$  de proteína (Tabla 22) (Figura 24 b).

Tabla 22. nmoles y  $\mu\text{g}$  de citocromos utilizados en los geles LiDS-PAGE para cada una de las fracciones obtenidas de la columna DEAE-Toyopearl de la fracción V,VIA. Se cargó la muestra buscando un equilibrio entre cantidad de proteína y la concentración citocromos c para que no disminuyera de 0.15nmoles.

	nmoles por carril			$\mu\text{g}$ de proteína
	citocromo c	citocromo b	citocromo a	
<b>Fracción I</b>	0.20	0.29	0.15	75
<b>Fracción II</b>	0.2	0.16	0.20	75
<b>Fracción III</b>	0.15	0.14	0.23	100

En los ensayos de actividades enzimáticas se encontró para la NADH DH un incremento en la actividad de 6.72 veces con respecto a las membranas y de 44.22 veces con respecto a la fracción V,VIA (141.98nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). Para la SDH se obtuvo un incremento en la actividad de 65.12 veces con respecto a las membranas pero un valor bajo de actividad con respecto a la fracción V,VIA (181.19nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) (Tabla 23 y 24) (Figura 24 c).

Tabla 23. Valores de las actividades enzimáticas de cada uno de los complejos respiratorios de *B. subtilis* en las fracciones obtenidas de la cromatografía con DEAE-Toyopearl. (U= nmoles DCPIP ó cit c (reducido ú oxidado)  $\text{min}^{-1}$ ).

	NADH Deshidrogenasa	Succinato Deshidrogenasa
	U/mg	
<b>Membranas</b>	21.13	2.78
<b>Fracción V y 6</b>	3.21	456.07
<b>Fracción I</b>	141.98	181.19
<b>Fracción II</b>	6.33	115.72
<b>Fracción III</b>	4.33	1057.90

Tabla 24. Valores de recuperación de la actividad enzimática de la NADH DH y la SDH comparados contra la actividad de cada complejo obtenido con las membranas y la fracción V,VIA por separado, asignándoles un valor de 1. Los valores más altos de las fracciones se muestran en rojo. A= con respecto a las membranas. B= con respecto a la fracción V, VIA.

	NADH Deshidrogenasa		Succinato Deshidrogenasa	
	A	B	A	B
<b>Membranas</b>	1		1	
<b>Fracción V y 6</b>	0.15	1	163.93	1
<b>Fracción I</b>	6.72	44.22	65.12	0.40
<b>Fracción II</b>	0.30	1.97	753.51	4.60
<b>Fracción III</b>	0.20	1.35	629.20	3.84

Para estas fracciones se modificó el ensayo de oximetría para la medición del oxígeno reducido por las oxidasas a través de los complejos SDH y la NADH DH. Primero se realizó una prueba con las membranas de *B. subtilis* utilizando 0.5mg de proteína y agregando uno de los reactivos por separado (Figura 24 d). Mientras que a las

fracciones, los reactivos se agregaron todos en el mismo experimento ya que al ser fracciones aisladas sólo se redujeron u oxidaron los complejos deseados, por esta razón sólo se pusieron los valores de los nmoles de oxígeno de cada fracción (Tabla 25 y 26). Se realizaron dos trazos para cada fracción, el primero en el cual se agregó al inicio únicamente succinato y el segundo trazo en el cual se agregaron al inicio NADH y succinato. En esta fracción, con succinato se obtuvo una velocidad de consumo de oxígeno de 19.15nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, con DBH<sub>2</sub> 16.78nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, con Ascorbato 120.22nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, con TMPD 85.58nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, con NaN<sub>3</sub> 2012.08nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína y con NaCN 472.64nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína. Para saber si la velocidad de consumo de oxígeno cambiaba se agregó además NADH al ensayo y se obtuvo un consumo de oxígeno de 32.42nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, con succinato 25.29nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, con DBH<sub>2</sub> 42.87nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, con ascorbato 240.85nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, con TMPD 343.02nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, con NaN<sub>3</sub> 287.82nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína y con NaCN 849.73nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína. En todas las pruebas con membranas se pudo observar que la velocidad de consumo de oxígeno aumentó al agregar NaCN y en algunos casos al agregar NaN<sub>3</sub>. En los dos ensayos que se realizaron para cada fracción, aumentó la velocidad de consumo de oxígeno cuando se agregaron el ascorbato y el TMPD los cuales son transportadores de electrones para las oxidasas terminales, pero el mayor consumo de oxígeno se dio al agregar los inhibidores lo cual ya se había observado en las fracciones de la cromatografía pasada (Figura 24 e) además al agregar NADH y después succinato el consumo de oxígeno aumentó aun mas (Figura 24 f).

Tabla 25. Cantidad de proteína y concentración de citocromos *a* de las membranas utilizados en los ensayos de oximetría. Valores de la velocidad de consumo de oxígeno (nmoles de O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) de las pruebas de oximetría realizadas con las membranas completas de *B. subtilis*.

	mg de proteína	nM de citocromo <i>a</i>
<b>Membranas</b>	0.5	450
		<b>Valor de la velocidad de consumo de oxígeno (nmoles de O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína)</b>
	Succinato	4.48
	NaN <sub>3</sub>	4.51
<b>Prueba 1</b>	NaCN	12.35
<b>Prueba 2</b>	DBH <sub>2</sub>	57.32



	NaN <sub>3</sub>	2.96
	NaCN	5.49
<b>Prueba 3</b>	Ascorbato	8.69
	TMPD	54.16
	NaN <sub>3</sub>	50.98
	NaCl	73.19
	Ascorbato	7.99
<b>Prueba 4</b>	TMPD	53.77
	NaCl	74.68
	NaN <sub>3</sub>	29.19
<b>Prueba 5</b>	cit c	5.17
	NaN <sub>3</sub>	2.27
	NaCN	7.51

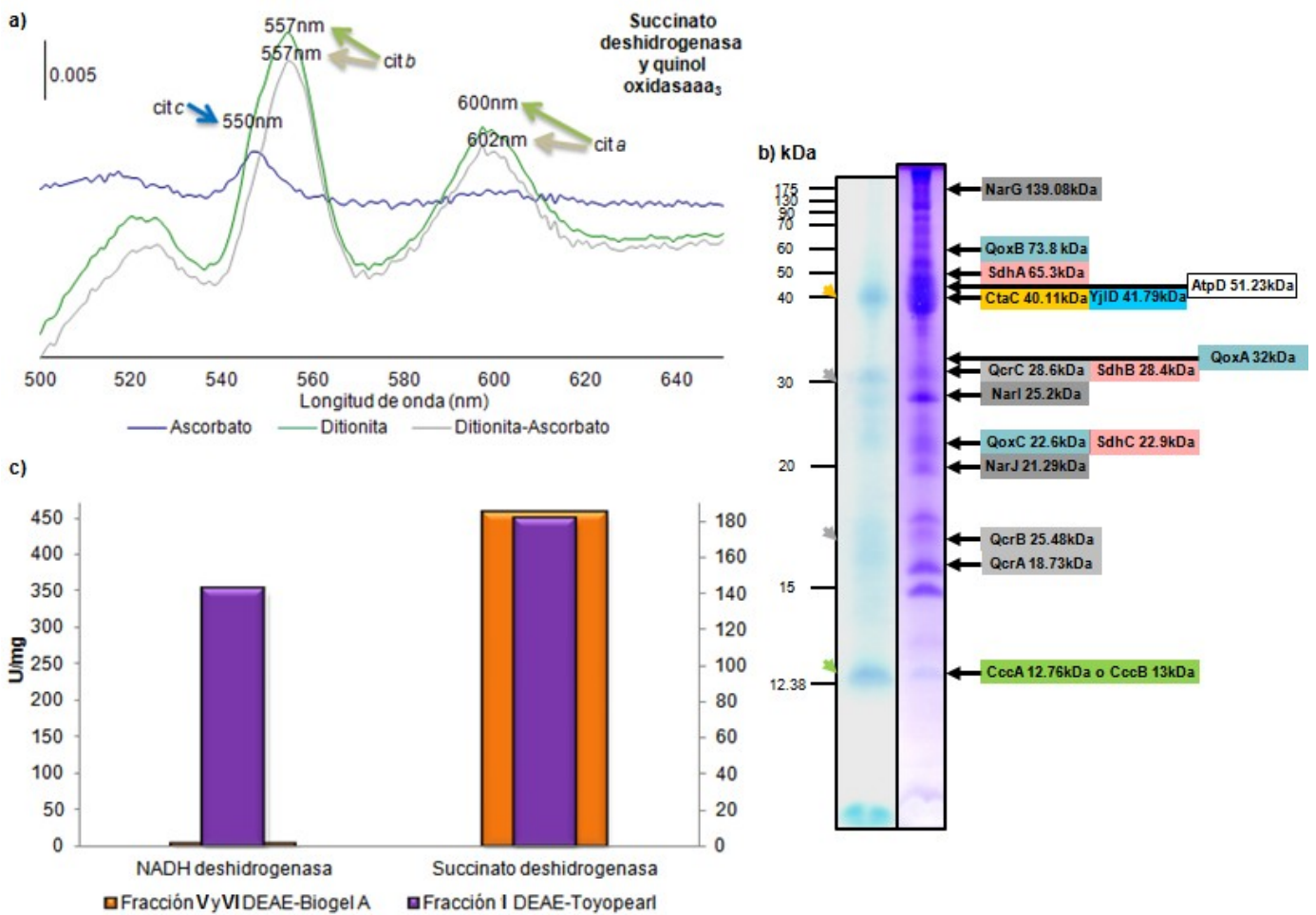
Tabla 26. Cantidades de proteína y concentraciones de citocromo a en cada una de las muestras para los ensayos de oximetría. Aquí se muestra el valor de la velocidad de consumo de oxígeno (nmoles de O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína).

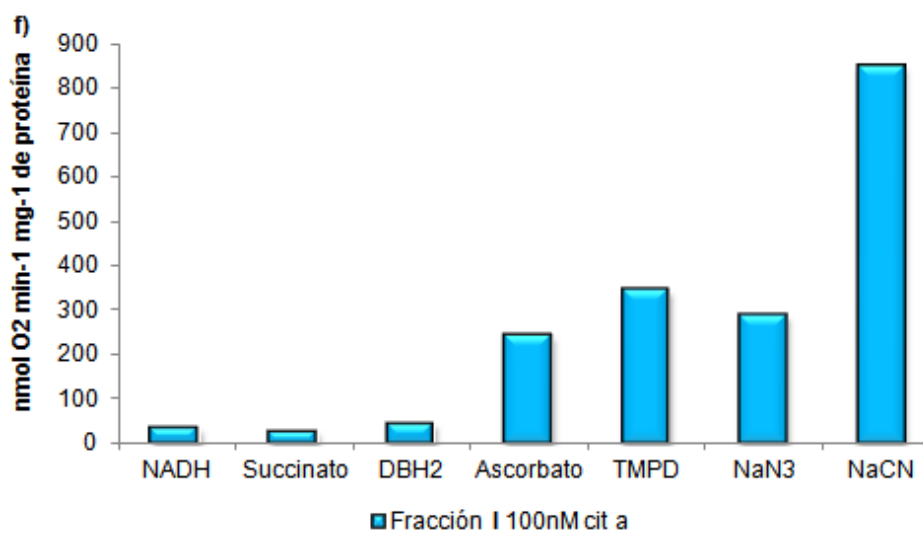
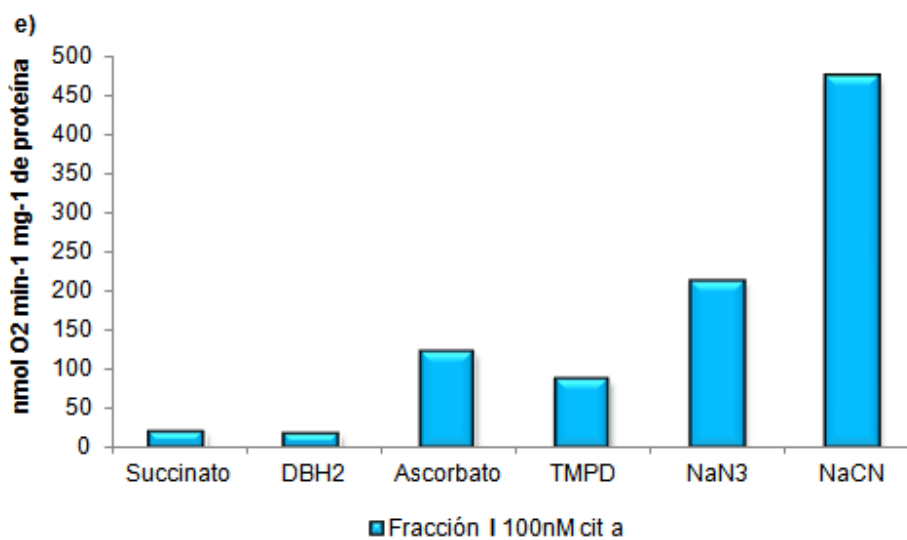
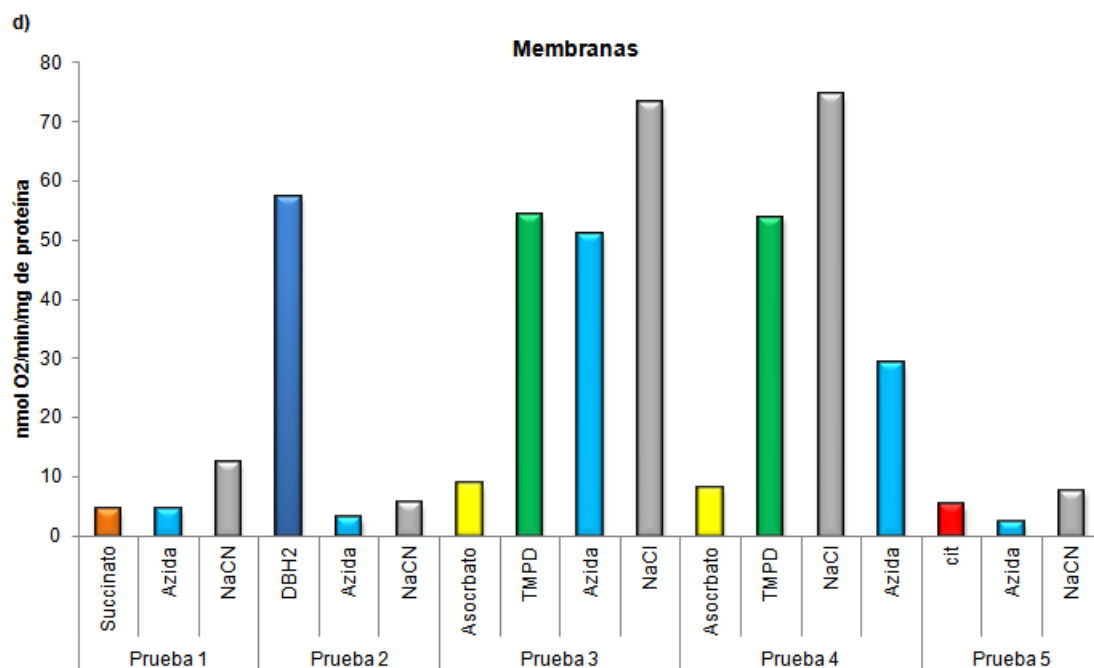
Valor de la velocidad de consumo de oxígeno								
	mg de proteína	nM de citocromo a	Succinato	DBH <sub>2</sub>	Ascorbato	TMPD	NaN <sub>3</sub>	NaCN
<b>Fracción I</b>	0.05	100	19.15	16.78	120.22	85.58	212.08	472.64
<b>Fracción II</b>	0.037	100	29.53	49.61	95.76	159.16	139.45	439.44
<b>Fracción III</b>	0.032	100	41.34	71.99	341.43	561.27	350.56	1582.08

Valor de la velocidad de consumo de oxígeno									
	mg de proteína	nM de citocromo a	NADH	Succinato	DBH <sub>2</sub>	Ascorbato	TMPD	NaN <sub>3</sub>	NaCN
<b>Fracción I</b>	0.05	100	32.42	25.29	42.87	240.85	343.02	287.82	849.73
<b>Fracción II</b>	0.037	100	54.99	22.76	49.63	269.97	361.63	504.16	959.99
<b>Fracción III</b>	0.032	100	279.24	9.80	50.26	260.16	532.45	502.54	1282.73

Para esta cromatografía las muestras también se corrieron en electroforesis en geles de 1D cargando 200µg de proteína y se analizaron después por 2D SDS-PAGE. En el carril de la 1D se identificaron 10 bandas nombradas de la A a la J. En la tinción con TMBZ se observó muy poca señal únicamente en la banda B para QcrC y QcrB además de otras tres bandas las cuales no correspondieron a los pesos de alguna proteína con hemos covalentemente unidos, por la asociación de estas subunidades con algún otro complejo a pesar de presentarse en muy poca cantidad. Esta mostró un alto peso molecular por su posición en el gradiente, cercana al 4% (Figura 24 g). Para la tinción con Coomassie en la banda A de la 1D la cual fue una banda de muy alto peso molecular, se identificaron a NarG y NarH de la nitrato reductasa, a SdhA y SdhB de la SDH, a QoxB y QoxC de la aa<sub>3</sub> y a AtpA y AtpD de la ATPasa. En la banda B se identificaron a NarG, NarH, NarI, AtpA, AtpD, SdhA, SdhB, SdhC, QoxA, QoxC, QoxB, QcrC, QcrB, y QcrA del b<sub>6c</sub> y las dos bandas que no se pudieron identificar. Esta banda presentó la mayor señal para Coomassie de todas las bandas de la 1D. En la banda C se

identificaron a NarG y NarH, SdhA, SdhC, AtpA, AtpD, QoxB, QoxC y las dos bandas indefinidas. En la banda D se identificaron a NarG, NarH, SdhA, SdhC, QoxB, QoxC, AtpA, AtpD y las dos bandas sin identificar. En la E se identificó a NarG, NarH, AtpA, AtpD. En la banda F a NarG, NarH, AtpA, AtpD y varias bandas pequeñas que no se pudieron identificar. En la banda G se identificó a NarG. En la banda H a NarG. En la banda I a NarH, NarI, AtpA y AtpD. Finalmente en la banda J se identificó a la AtpA y AtpD (Figura 24 h). Como era de esperarse, las posibles bandas para la SDH y la *aa<sub>3</sub>* se mostraron muy teñidas mientras que algunas de las bandas para el *b<sub>6</sub>c* y la *caa<sub>3</sub>* no se encontraron o presentaron muy poca señal para ambas tinciones, TMBZ y Coomassie.





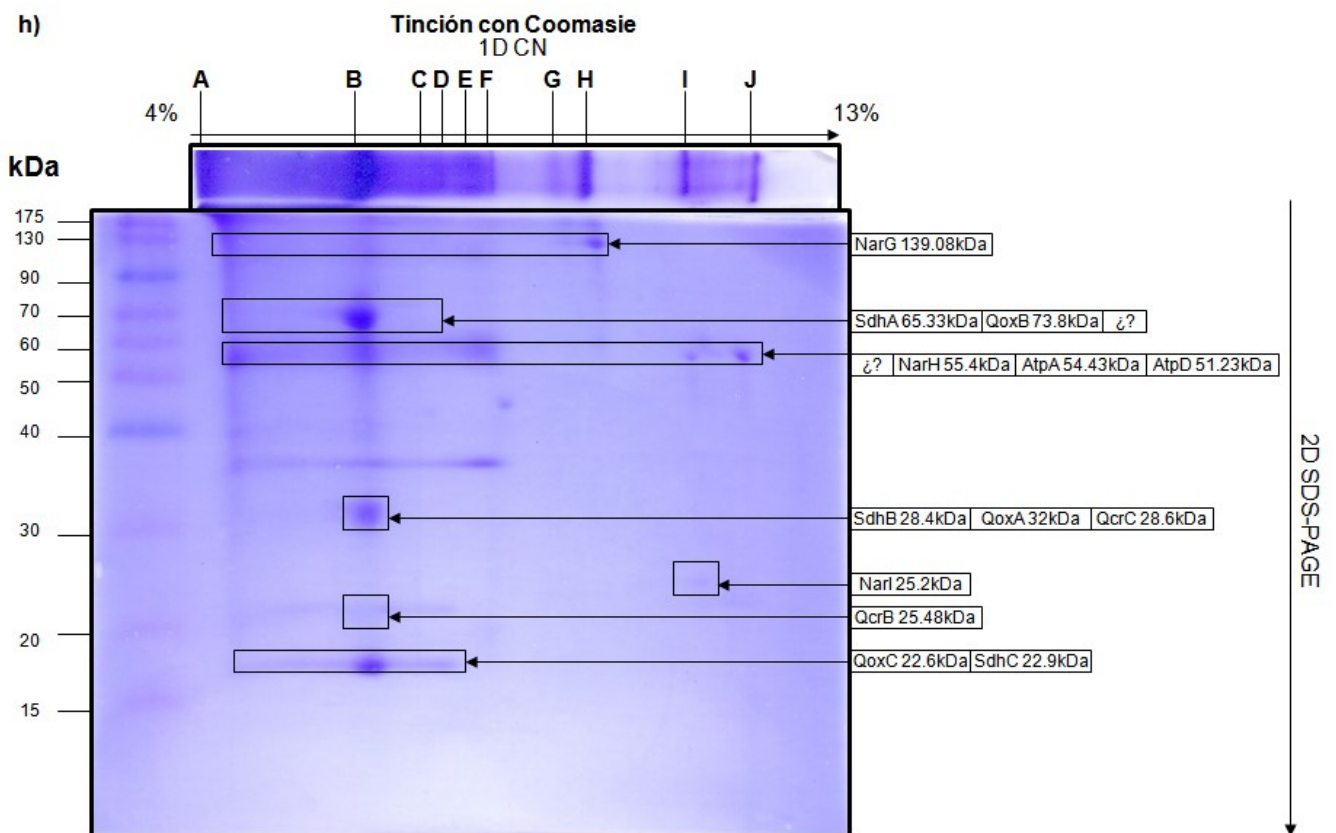
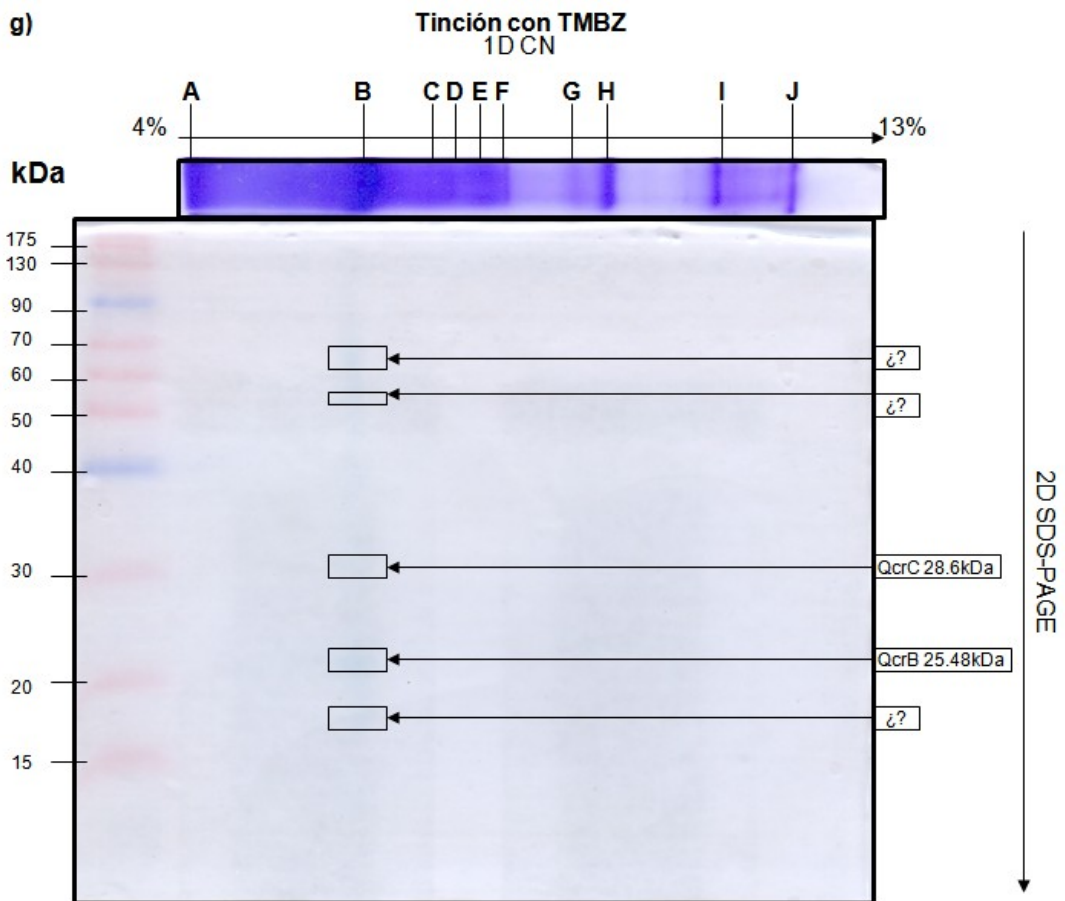


Figura 24. Análisis de la fracción I de la cromatografía con DEAE-Toyopearl. a) Espectros diferenciales de absorción (asc-oxi), (dit-oxi) y (dit-oxi) menos (asc-oxi) con una interpretación de los posibles citocromos de los complejos respiratorios por la longitud de onda en la que aparecen. b) Geles de poliacrilamida al 14% con LiDS. En el costado izquierdo del gel se encuentran los marcadores de peso molecular. El gel del lado izquierdo se tiñó con TMBZ para

detección hemos covalentemente unidos y el gel del lado derecho fue teñido con Azul de Coomasie para todas las proteínas. En el costado derecho la posible identidad de las subunidades de los complejos respiratorios identificadas por su peso molecular aparente. Se utilizaron 75µg de proteína, 0.2nmoles de citocromo *c*, 0.29nmoles de citocromo *b* y 0.15nmoles de citocromo *a* para este carril. c) Actividades enzimáticas específicas para la NADH DH y la SDH las cuales se compararon con la fracción V,VIA (ele izquierdo) contra las tres fracciones obtenidas con DEAE-Toyopearl (eje derecho). Se utilizaron 0.1mg de proteína para los ensayos. (U= nmoles DCPIP reducidos min<sup>-1</sup>). d) Membranas utilizadas como control para el análisis de consumo de oxígeno por oximetría de las fracciones obtenidas utilizando NADH y Succinato como donadores de electrones, ascorbato y TMPD como transportadores de electrones y NaN<sub>3</sub> y NaCN como inhibidores de las oxidasas terminales de la cadena respiratoria. e) y f) Medición del consumo de oxígeno de la fracción agregando todos los reactivos juntos en un sólo ensayo. Geles claros nativos de alta resolución (1D) analizadas por 2D SDS-PAGE. g) tinción con TMBZ y h) tinción con azul de Coomasie en los cuales se cargaron 200µg de proteína. En el costado izquierdo se muestran los pesos de los marcadores. Arriba se muestra el carril del gel claro nativo de alta resolución con las bandas identificadas y marcadas con una línea y una letra y en el costado derecho una interpretación del gel de segunda dimensión en el que se identificaron a las subunidades por su peso molecular aparente.

### 6.3 Fracción II:

En el diferencial (asc-oxi) se encontró un citocromo *c* (551nm) y un citocromo *a* (603nm) de la *aa*<sub>3</sub>. En el diferencial (dit-oxi) se encontró un citocromo *c* (553nm), un citocromo *b* (558nm) de la SDH, y un citocromo *a* (601nm) de la *aa*<sub>3</sub>. En el diferencial de ambos diferenciales (dit-oxi) menos (asc-oxi) se observó un citocromo *b* (558nm) de la SDH y un citocromo *a* (601nm) de la *aa*<sub>3</sub> (Figura 25 a). En esta fracción se encontró para el citocromo *c* una concentración absoluta de 20.04µM y una concentración relativa de 2.68nmoles/mg proteína, para el citocromo *b* se encontró una concentración absoluta de 16.17µM y una concentración relativa de 2.16nmoles/mg proteína y para el citocromo *a* se encontró una concentración absoluta de 19.8µM y una concentración relativa de 2.65nmoles/mg proteína y se encontró un cociente de relación de citocromos *b* por *c* de 0.81 y de 0.99 de citocromos *a* por *c* (Tabla 20 y 21).

En el gel con LiDS en la tinción con TMBZ se encontraron bandas correspondientes a las subunidades CtaC de la *caa*<sub>3</sub>, QcrC y QcrB del *b*<sub>6c</sub>, CccA o CccB (*c*<sub>550</sub> o *c*<sub>551</sub>). CtaC fue la que presentó mayor intensidad seguida de CccA o CccB mientras que QcrC y QcrB. Como se pudo observar en las tres fracciones de esta cromatografía la intensidad para esta tinción se mostró muy disminuida. Para la tinción con Coomasie se identificaron las subunidades NarG, NarI y NarJ de la nitrato reductasa, QoxB, QoxA y QoxC de la *aa*<sub>3</sub>, SdhA, SdhB y SdhC de la SDH, AtpD de la ATPasa, YjID de la NADH DH, CtaC de la *caa*<sub>3</sub>, QcrC, QcrB y QcrA del *b*<sub>6c</sub>, CccA o CccB (*c*<sub>550</sub> o *c*<sub>551</sub>). Las principales diferencias entre esta fracción y la anterior es que la banda debajo de NarG desapareció, la intensidad de las bandas CtaC y YjID disminuyeron, también desapareció la banda por encima de QoxC y SdhC y aparecieron nuevas bandas sobre y

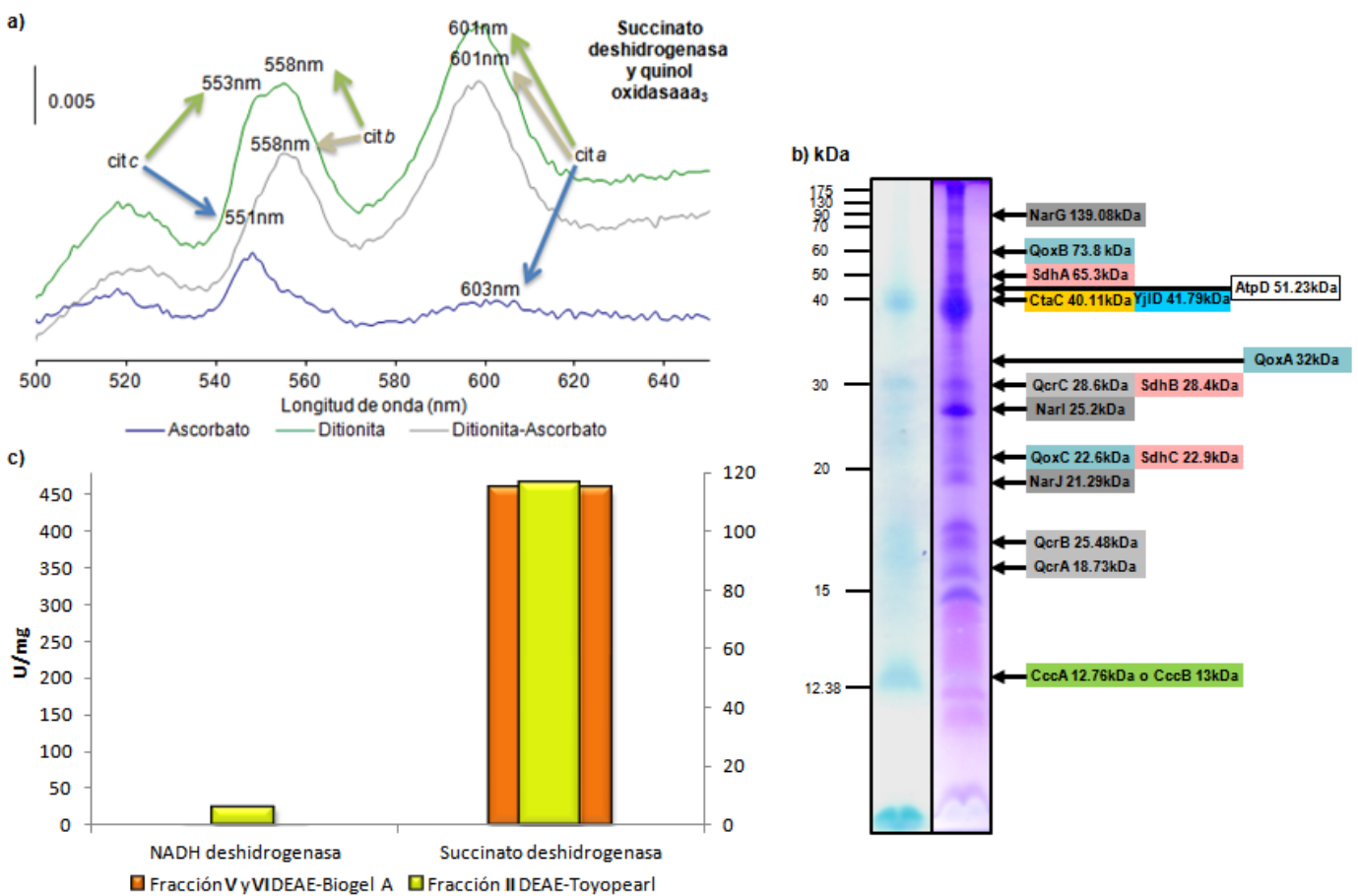
debajo de CccA o CccB. En esta fracción se cargaron 0.2nmoles de citocromo *c*, 0.16nmoles de *b*, 0.2nmoles de *a* y 75µg de proteína (Tabla 22) (Figura 25 b).

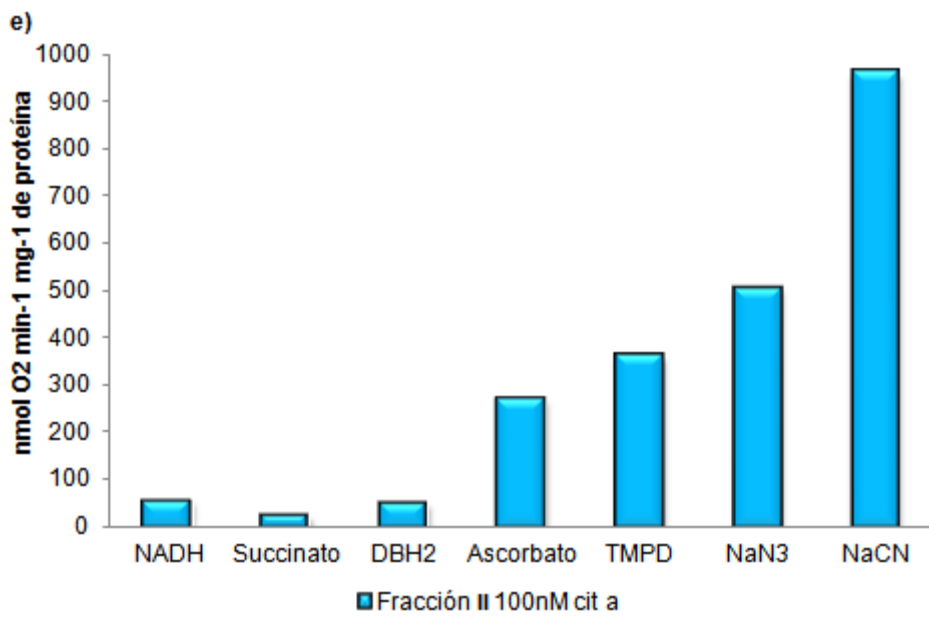
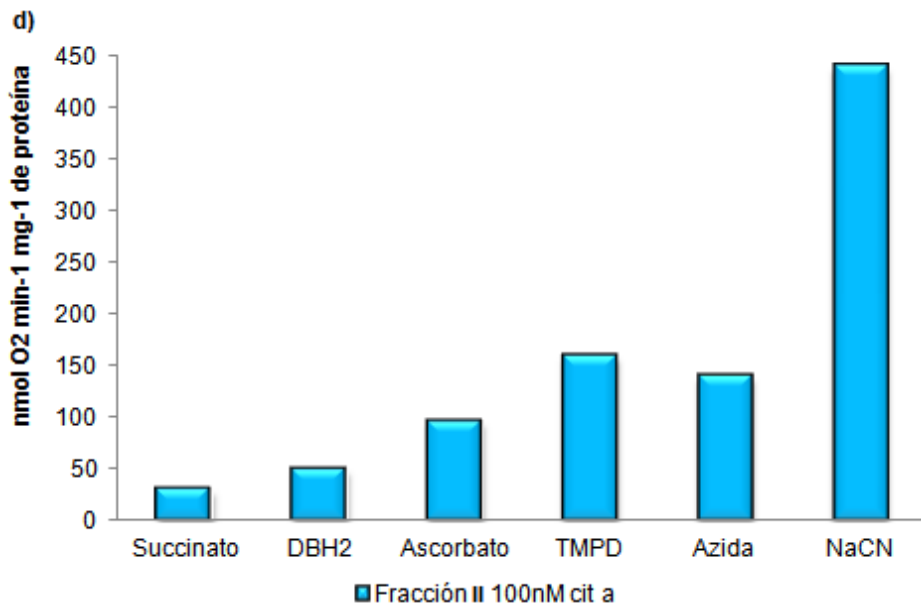
La actividad de NADH DH no mostró un enriquecimiento de la actividad respecto a las membranas pero si con respecto a la fracción V,VIA de 1.97 (6.33nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). La SDH presentó un enriquecimiento de la actividad de 753.51 veces con respecto a las membranas y de 4.6 veces respecto a la fracción V,VIA (115.72nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína), esta fue la segunda fracción con mayor actividad de SDH de las tres fracciones obtenidas en esta cromatografía (Tabla 23 y 24) (Figura 25 c).

En los ensayos de oximetría se obtuvo un consumo de oxígeno con succinato de 29.53nmoles  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con  $\text{DBH}_2$  49.61nmoles  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con ascorbato 95.76nmoles  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con TMPD 159.16nmoles  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con  $\text{NaN}_3$  139.45nmoles  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína y con NaCN 439.44nmoles  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína y para el segundo ensayo se obtuvieron con NADH una velocidad de consumo de oxígeno de 54.99nmoles  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con succinato 22.76nmoles  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con  $\text{DBH}_2$  49.63nmoles  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con ascorbato 269.97nmoles  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con TMPD 361.63nmoles  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con  $\text{NaN}_3$  504.16nmoles  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína y con NaCN 959.99nmoles  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína. Al igual que en la fracción anterior se observó una mayor velocidad de consumo de oxígeno al agregar NADH y después succinato como donadores de electrones. Al agregar los inhibidores, aunque se mostró poca actividad enzimática para NADH DH, en la oximetría se obtuvo una mayor velocidad de consumo de oxígeno (Tabla 25 y 26) (Figura 25 d y e).

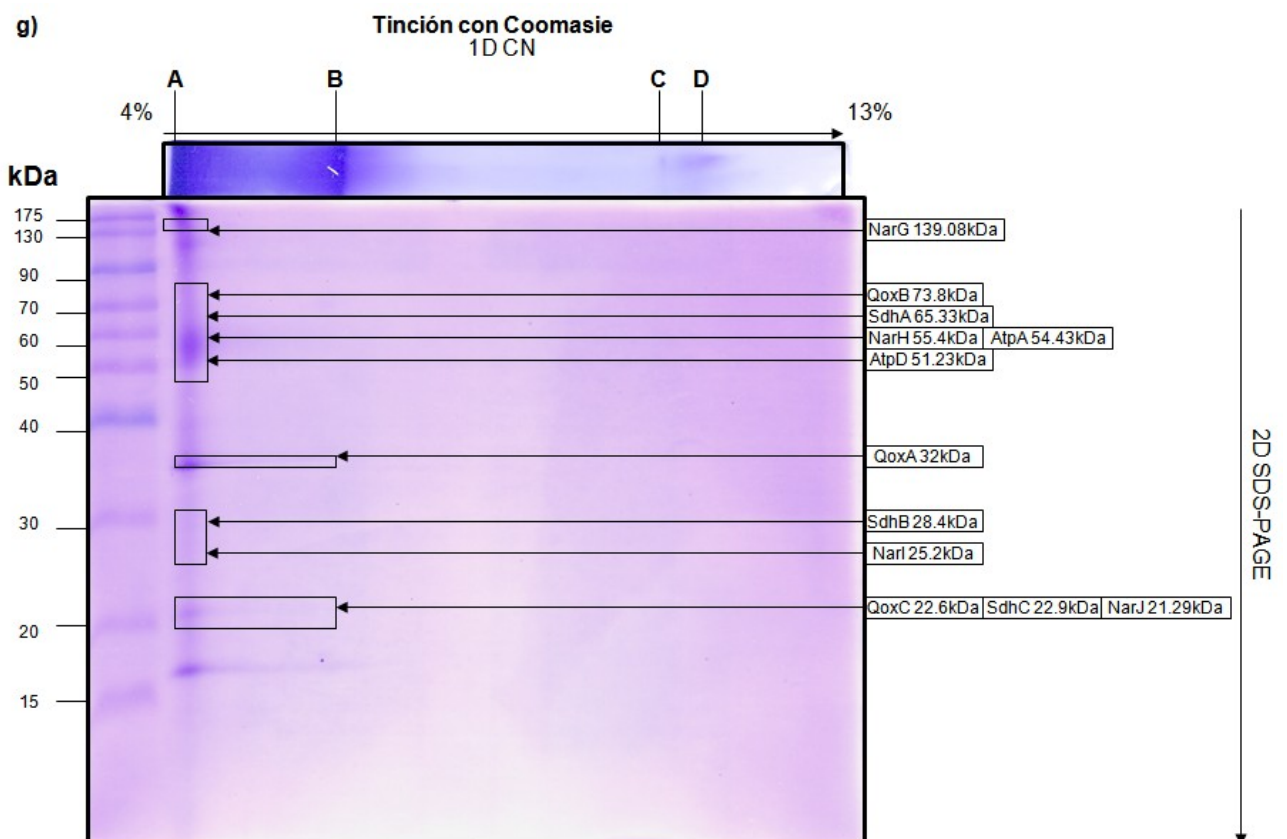
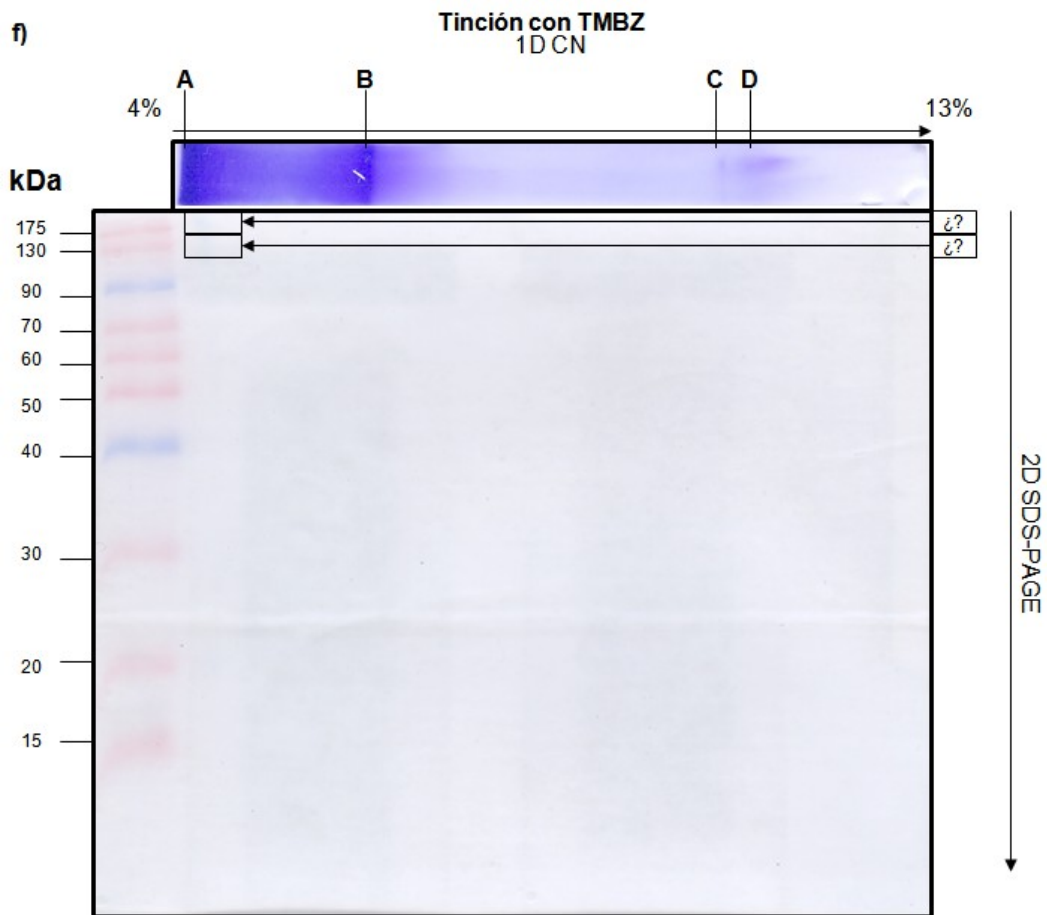
En el análisis de los geles de 1D con 200µg de proteína analizados por 2D SDS-PAGE se identificaron cuatro bandas marcadas de la A a la D. En la tinción con TMBZ del gel de 2D solamente en la banda A de la 1D la cual tuvo un alto peso molecular se encontró una señal muy debil para dos bandas que por su peso molecular muy alto no correspondieron a ninguna proteína con hemos covalentemente unidos, (Figura 25 f). Para la tinción con Coomassie, en la banda A se identificaron a NarG, NarH, NarI y a NarJ

de la nitrato reductasa, QoxB, QoxA, QoxC de la *aa<sub>3</sub>*, SdhA, SdhB, SdhC de la SDH, AtpA y AtpD de la ATPasa, todas asociadas en una misma banda. En la banda B se identificó a QoxA, QoxC, SdhC y a NarJ, además de una proteína de bajo peso molecular que no se pudo identificar. En las bandas C y D no se encontró ninguna subunidad. Al observar que el gel parecía poco teñido con el Coomassie se hizo una tinción con plata que es mucho más sensible y se encontraron las mismas bandas un poco más extendidas indicando que la mayoría de las proteínas migraron juntas en una asociación de complejos principalmente entre la SDH, la Nitrato reductasa y la *aa<sub>3</sub>* lo cual ya se había observado en la fracción anterior (Figura 25 g y g.1).









g.1)

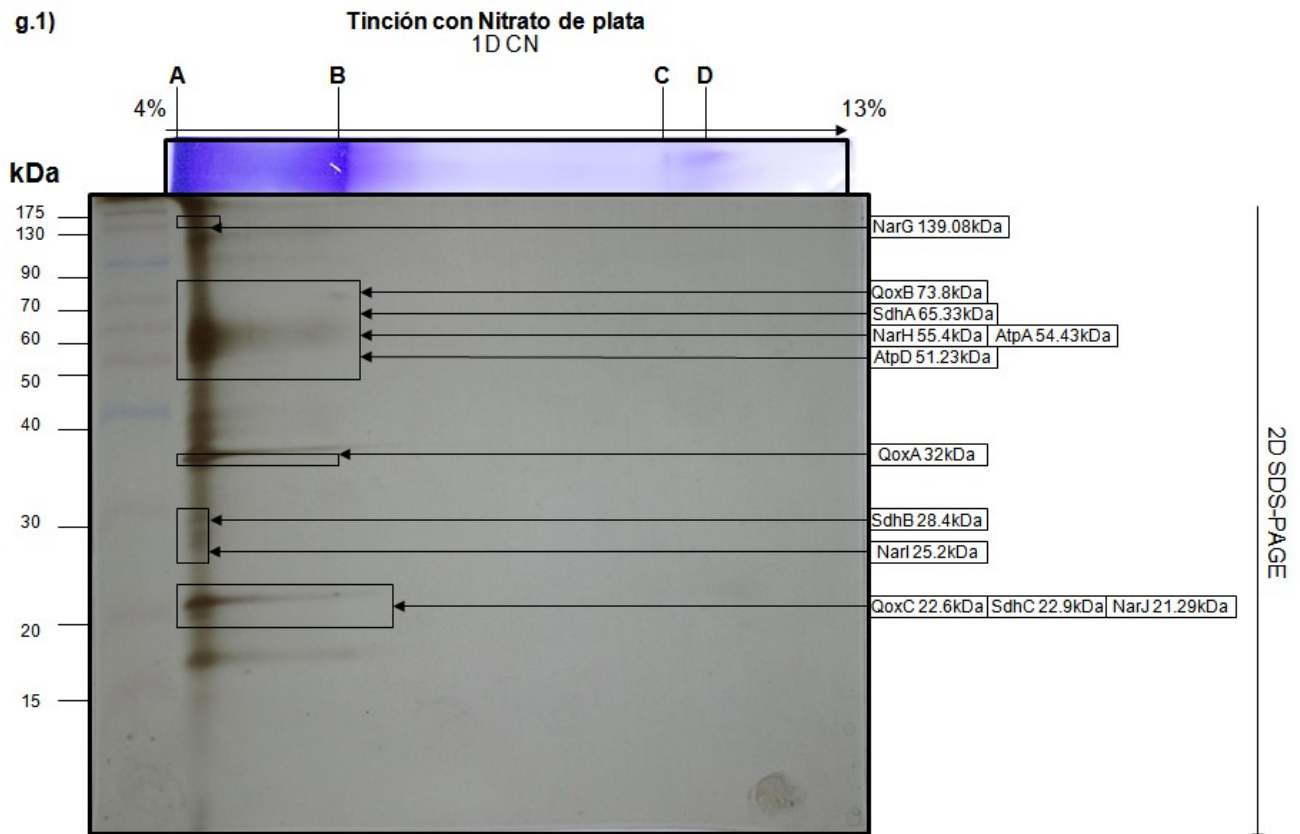


Figura 25. Análisis de la fracción II de la cromatografía con DEAE-Toyopearl. a) Espectros diferenciales de absorción (asc-oxi), (dit-oxi) y (dit-oxi) menos (asc-oxi) con una interpretación de los posibles citocromos de los complejos respiratorios por la longitud de onda en la que aparecen. B) Geles de poliacrilamida al 14% con LiDS. En el costado izquierdo del gel se encuentran los marcadores de peso molecular. El gel del lado izquierdo se tiñó con TMBZ para detección hemos covalentemente unidos y el gel del lado derecho fue teñido con Azul de Coomasie para todas las proteínas. En el costado derecho la posible identidad de las subunidades de los complejos respiratorios identificadas por su peso molecular aparente. Se utilizaron 75µg de proteína, 0.2nmoles de citocromo c, 0.16nmoles de citocromo b y 0.2nmoles de citocromo a para este carril. C) Actividades enzimáticas específicas para la NADH DH y la SDH las cuales se compararon con la fracción V,VIA (eje izquierdo) contra las tres fracciones obtenidas con DEAE-Toyopearl (eje derecho). Se utilizaron 0.1mg de proteína para los ensayos. Se utilizaron 0.1mg de proteína en los ensayos. (U= nmoles DCPIP reducidos min<sup>-1</sup>). d) y e) Medición del consumo de oxígeno de la fracción agregando todos los reactivos juntos en un sólo ensayo. Geles claros nativos de alta resolución (1D), analizadas por 2D SDS-PAGE. F) tinción con TMBZ, g) tinción con azul de Coomasie, y g.1) tinción con nitrato de plata en los cuales se cargaron 200µg de proteína. En el costado izquierdo se muestran los pesos de los marcadores. Arriba se muestra el carril del gel claro nativo de alta resolución con las bandas identificadas y marcadas con una línea y una letra y en el costado derecho una interpretación del gel de segunda dimensión en el que se identificaron a las subunidades por su peso molecular aparente.

### 6.4 Fracción III:

En el diferencial (asc-oxi) se pudo apreciar un citocromo c (552nm) y un citocromo a (603nm) de la aa<sub>3</sub>. En el segundo diferencial se encontró un citocromo b (558nm) de la SDH y un citocromo a (600nm) de la aa<sub>3</sub>. En el diferencial (dit-oxi) menos (asc-oxi) se encontró un citocromo b (559nm) con un pico de absorción muy cercano al citocromo b de la SDH y al citocromo a (600nm) de la aa<sub>3</sub> (Figura 26 a). Aquí se encontró una concentración absoluta para el citocromo c de 8.44µM y una concentración relativa de 1.97nmoles/mg proteína. para el citocromo b una concentración absoluta de 8.21µM y una concentración relativa de 1.91nmoles/mg proteína y para el citocromo a una

concentración absoluta de  $13.35\mu\text{M}$  y una concentración relativa de  $3.11\text{nmoles/mg}$  proteína y se encontró un cociente de relación de citocromos *b* por *c* de 0.97 y de 1.58 de citocromos *a* por *c* (Tabla 20 y 21)

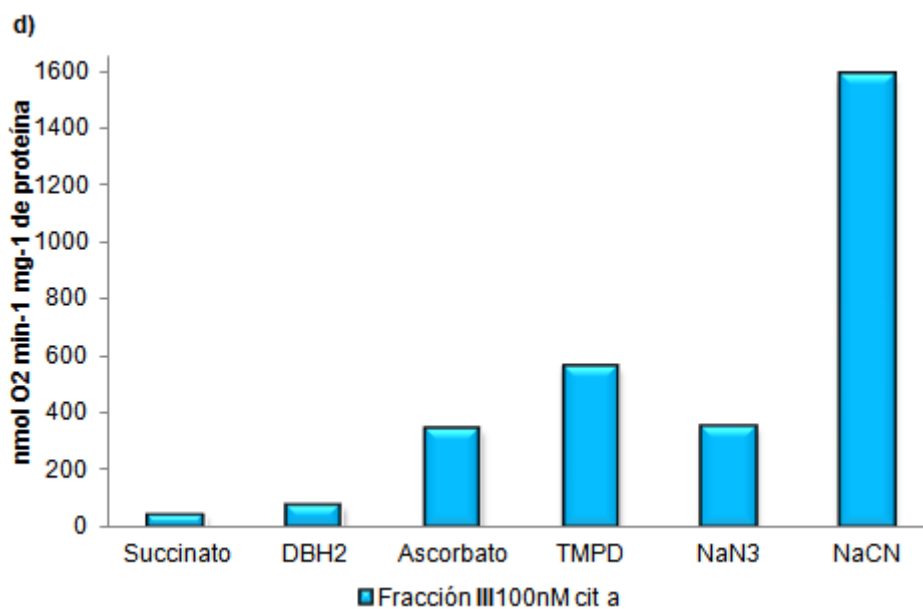
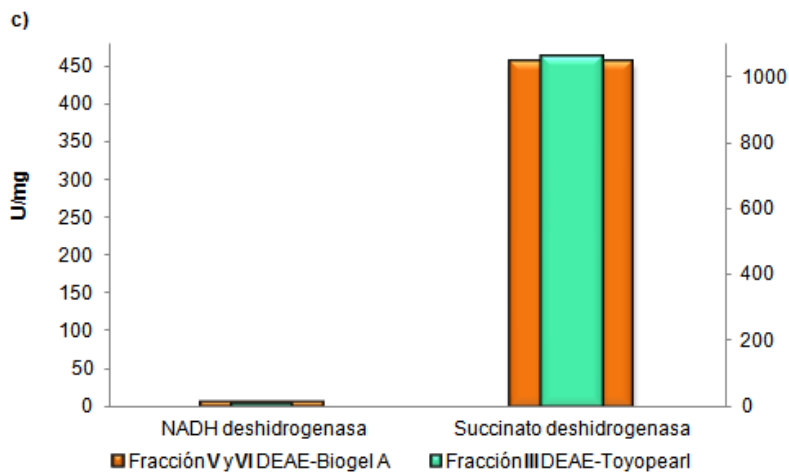
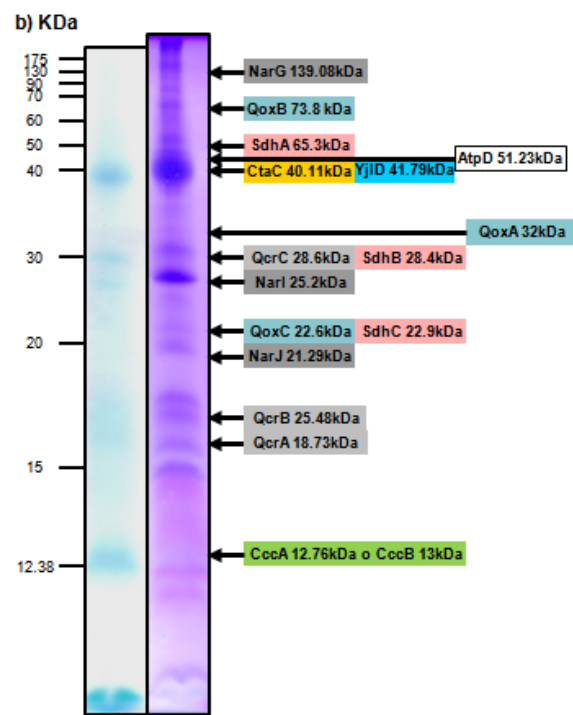
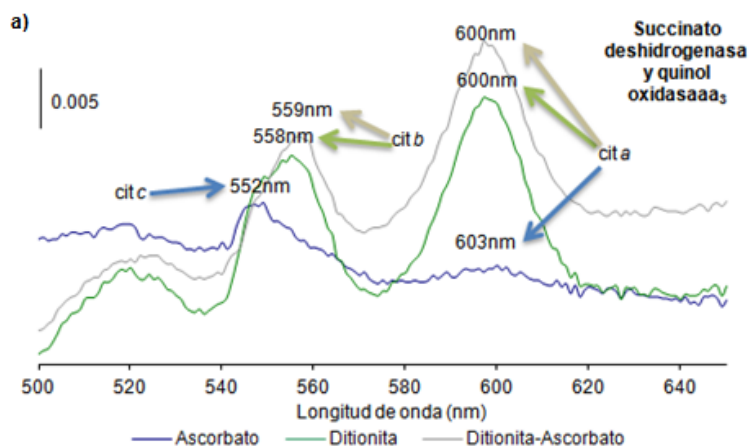
En los geles con LiDS teñidos con TMBZ se identificaron a CtaC de la *caa*<sub>3</sub> y a CccA o CccB (*c*<sub>550</sub> o *c*<sub>551</sub>) aún con suficiente señal para identificarlos y a QcrB y QcrC del *b*<sub>6</sub>*c* con muy poca señal. En la tinción con azul de Coomasie se encontraron las subunidades NarG, NarI y NarJ de la nitrato reductasa, a QoxB, QoxA y QoxC de la *aa*<sub>3</sub>, a SdhA, SdhB y SdhC de la SDH, a YjID de la NADH DH, AtpD de la ATPasa, a CtaC, QcrC, QcrB, QcrA, CccA y CccB. No hubo diferencias en la secuencia de bandas entre la fracción II y 3 sólo que la intensidad disminuyó un poco. En esta fracción se cargaron 0.15nmoles de citocromo *c*, 0.14 de *b*, 0.23 de *a* y 100 $\mu\text{g}$  de proteína (Tabla 22) (Figura 26 b).

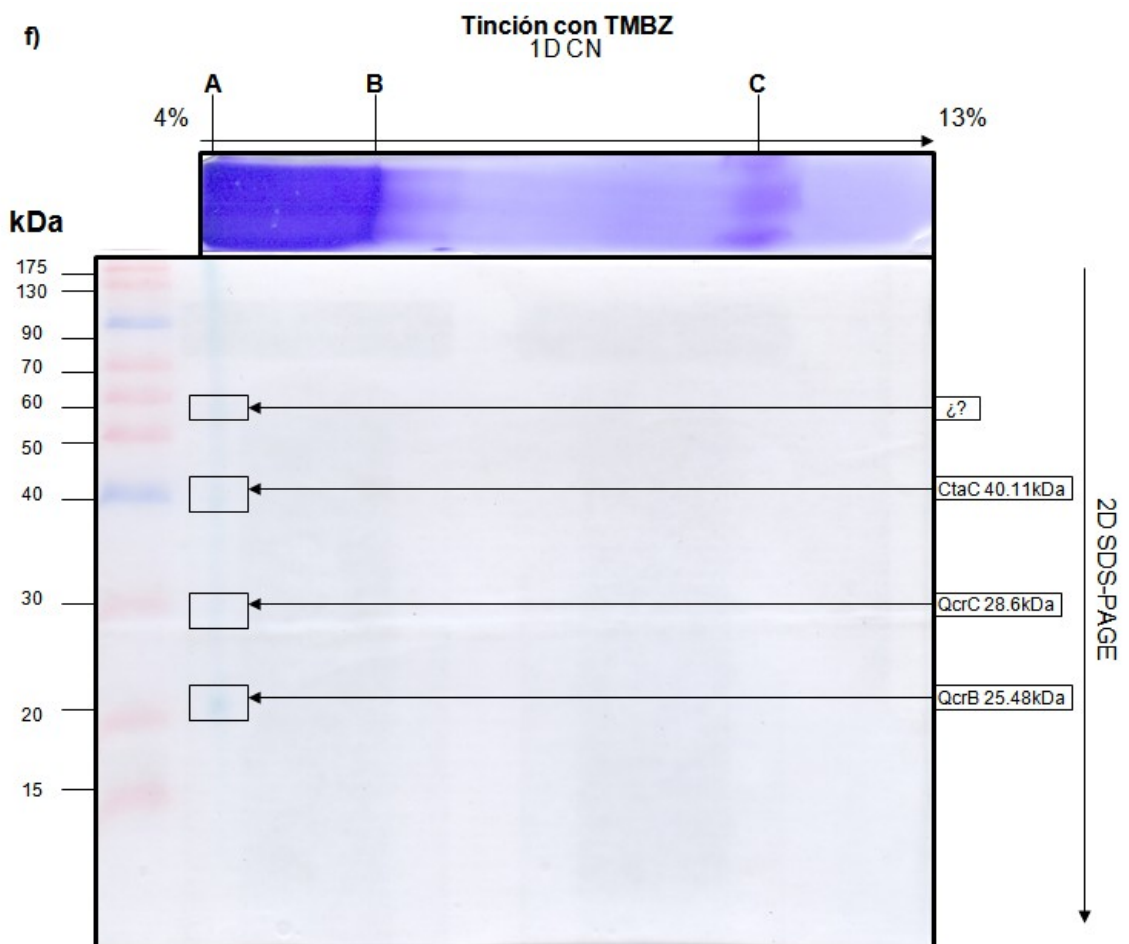
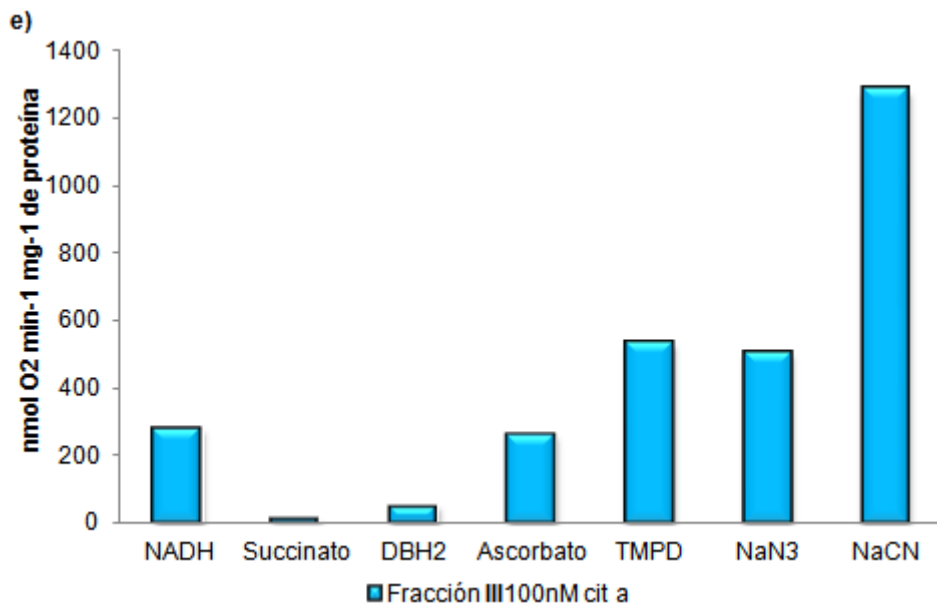
Para las actividades enzimáticas los resultados fueron muy parecidos a la fracción II. La NADH DH no presentó incremento en la actividad con respecto a las membranas pero sí un enriquecimiento pequeño de 1.35 veces con respecto a la fracción V,VIA (4.33nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). Finalmente la SDH presentó un enriquecimiento en la actividad de 629.2 veces con respecto a las membranas y de 3.84 con respecto a la fracción V,VIA (1057.9nmoles DCPIP reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) (Tabla 23 y 24) (Figura 26 C).

Para la fracción se obtuvieron los siguientes valores de las velocidades de consumo de oxígeno, para succinato  $41.34\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con DBH<sub>2</sub>  $71.99\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con ascorbato  $341.43\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con TMPD  $561.27\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con NaN<sub>3</sub>  $350.56\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína y con NaCN  $1582.08\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína. Para el segundo ensayo se obtuvieron con NADH un velocidad de consumo de oxígeno de  $279.24\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con succinato  $9.8\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con DBH<sub>2</sub>  $50.26\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con ascorbato  $260.16\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con TMPD  $532.45\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, con NaN<sub>3</sub>  $502.54\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína y con NaCN  $1282.73\text{nmoles O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de

proteína. En los ensayos de oximetría esta fue la fracción con mayor velocidad de consumo de oxígeno observándose lo mismo que en las otras fracciones que al agregar NADH además del succinato aumentaron los valores y mas aun con los inhibidores (Tabla 25 y 26) (Figura 26 d y e).

En el analisis del gel de 1D en 2D SDS-PAGE donde se identificaron 3 bandas que se nombraron de la A a la C. Para la tinción con TMBZ solamente se obtuvo señal en la banda A en la zona de 4% de acrilamida en la cual se identificó a CtaC de la *caa*<sub>3</sub>, QcrC y QcrB del *b<sub>6</sub>c* además de muchas bandas de alto peso molecular que no se lograron identificar. Todo esto indicó un gran número de asociaciones entre los complejos con hemos covalentemente unidos con diferentes complejos o subunidades (Figura 26 f). En la tinción con Coomasie en la banda A se identificaron a NarG, NarI y NarJ de la nitrato reductasa, a QoxB, QoxA y QoxC de la *aa*<sub>3</sub>, a SdhA, SdhB y SdhC de la SDH, a AtpA y AtpD de la ATPasa. En la banda B a QoxA y una proteína no identificada y en la banda C no se resolvió ninguna proteína en el gel de 2D. La secuencia de bandas fue muy parecida a la fracción anterior excepto que tuvieron mayor intensidad, también se hizo una tinción con plata para esta fracción en la cual se encontraron las mismas bandas que en la tinción con Coomasie (Figura 26 g y g.1).





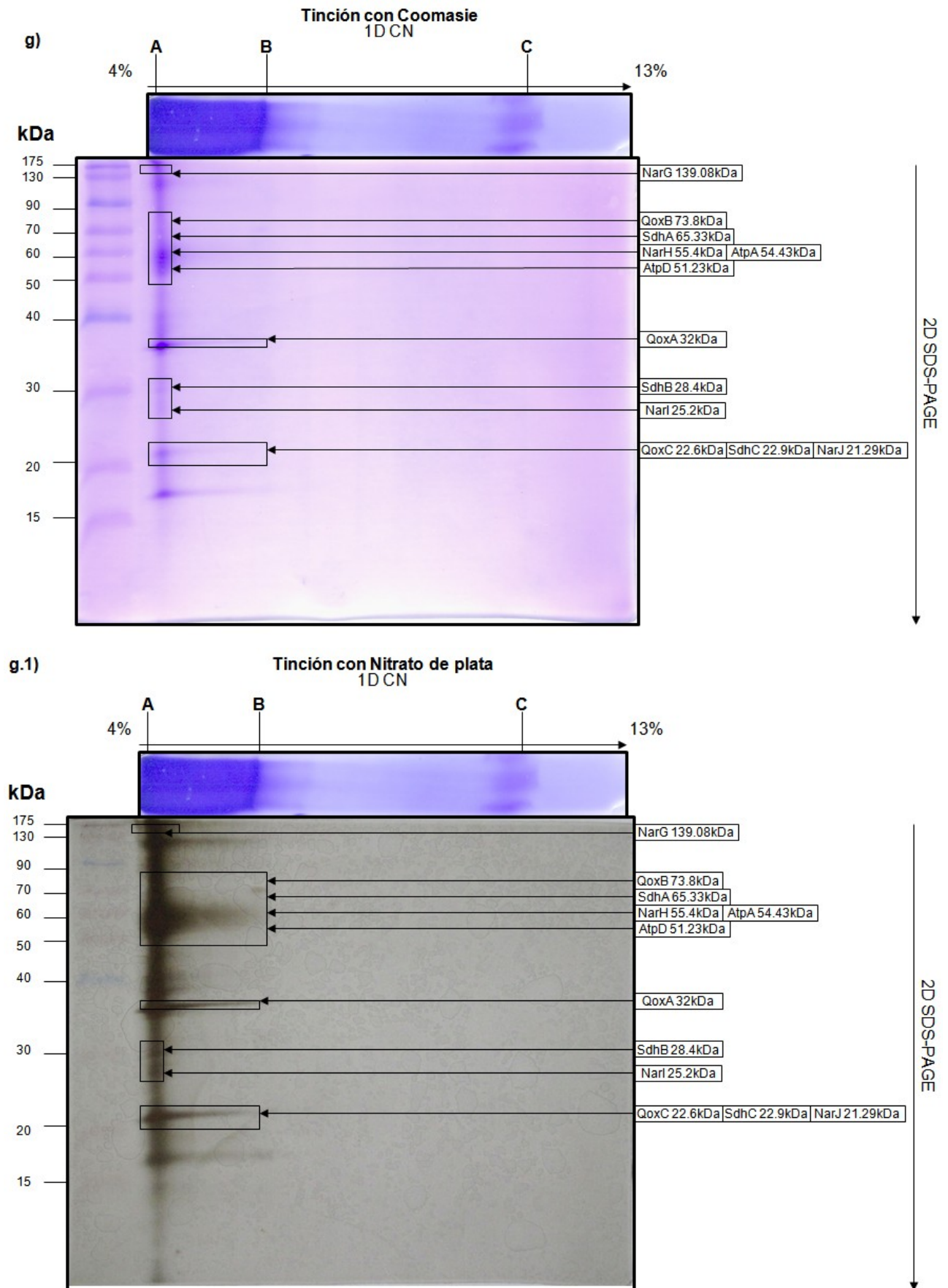


Figura 26. Análisis de la fracción III de la cromatografía con DEAE-Toyopearl. a) Espectros diferenciales de absorción (asc-oxi), (dit-oxi) y (dit-oxi) menos (asc-oxi) con una interpretación de los posibles citocromos de los complejos respiratorios por la longitud de onda en la que aparecen. B) Geles de poliacrilamida al 14% con LiDS. En el costado izquierdo del gel se encuentran los marcadores de peso molecular. El gel del lado izquierdo se tiñó con TMBZ para

detección hemos covalentemente unidos y el gel del lado derecho fue teñido con Azul de Coomasie para todas las proteínas. En el costado derecho la posible identidad de las subunidades de los complejos respiratorios identificadas por su peso molecular aparente. C) Actividades enzimáticas específicas para la NADH DH y la SDH las cuales se compararon con la fracción V,VIA (eje izquierdo) contra las tres fracciones obtenidas con DEAE-Toyopearl (eje derecho). Se utilizaron 0.1mg de proteína para los ensayos. Se utilizaron 0.1mg de proteína en el ensayo. (U= nmoles DCPIP reducidos  $\text{min}^{-1}$ ). d) y e) Medición del consumo de oxígeno de la fracción agregando todos los reactivos juntos en un sólo ensayo. Geles claros nativos de alta resolución (1D), analizadas por 2D SDS-PAGE. F) tinción con TMBZ, g) tinción con azul de Coomasie, y g.1) tinción con nitrato de plata en los cuales se cargaron 200 $\mu\text{g}$  de proteína. En el costado izquierdo se muestran los pesos de los marcadores. Arriba se muestra el carril del gel claro nativo de alta resolución con las bandas identificadas y marcadas con una línea y una letra y en el costado derecho una interpretación del gel de segunda dimensión en el que se identificaron a las subunidades por su peso molecular aparente.



## Discusión

Los complejos tipo *bc* de bacterias Gram positivas han sido poco estudiados. Sólo un complejo de la bacteria termofílica *Bacillus sp.* PS3, ha sido purificado lo que muestra la falta de investigación para estos organismos. Es de considerable interés evolutivo y funcional el que un grupo de bacterias no fotosintéticas, tales como especies de *Bacillus*, posean un complejo semejante al *b<sub>6</sub>f*, ya que tendría muchas repercusiones evolutivas.

### **1. Obtención de células, membranas y espectros diferenciales de *Bacillus subtilis***

Se obtuvo un muy buen rendimiento en cuanto a la cantidad de células crecidas en MSR suplementado con 3% de succinato (12.9g/L) de las cuales se necesitó solamente crecer 7L para poder obtener los 500mg de proteína de membrana necesarios para cargarlos en la columna.

En el diferencial reducido con ditionita menos oxidado se observaron los picos característicos para las membranas de *B. subtilis*, un pico alrededor de 550nm para el citocromo *c*, un pico alrededor de los 560nm para el citocromo *b* y un pico alrededor de los 600nm para el citocromo *a*. Una gran concentración de citocromos fue encontrada como lo reportan de Vrij y colaboradores, en 1987 (figura 8). Esto indicó que efectivamente se expresó la cadena respiratoria de *B. subtilis*. También se obtuvo una gran cantidad de citocromo *c* oxidasa *caa<sub>3</sub>* y quinol oxidasa *aa<sub>3</sub>* como lo muestran Henning y cols., 1995, ellos utilizaron este medio para lograr la máxima cantidad de estas dos enzimas y purificarlas por lo que se utilizó este medio de cultivo para obtener la máxima cantidad del complejo *b<sub>6</sub>c*. Como se observó en la concentración absoluta, la concentración relativa y el cociente de relación de los citocromos en la tabla 3, existen 0.96 citocromos *b* por cada citocromo *c*, lo que indicó además que complejos como la SDH y el *b<sub>6</sub>c* los cuales contienen citocromo *b* aumentaron y 0.46 citocromos *a* por cada *c*, la mitad de los otros dos citocromos lo que también indicó que la mayoría del flujo de la energía se llevó a través de los complejos de la cadena clásica.

## 2. Solubilización de las membranas con el detergente DDM

El detergente DDM fue ha sido muy eficaz para solubilizar complejos respiratorios con una alta actividad enzimática de acuerdo con Ljungdahl y colaboradores en 1987, se purificaron complejos tipo  $bc_1$  de mitocondrias y de cadenas respiratorias bacterianas. Se obtuvieron tanto el complejo tipo  $bc_1$  y la  $caa_3$  muy activos y en forma monoméricas en presencia del DDM y al parecer éste presenta preferencia por los complejos tipo  $bc$ . Por estas características se decidió utilizarlo para el análisis de los complejos respiratorios de *B. subtilis*, en particular el complejo  $b_6c$ . Se utilizaron diferentes relaciones de detergente para obtener las condiciones óptimas de *B. subtilis*. Existen muchas variaciones en la membrana, en parte debido a los diferentes tipos de lípidos que la componen, incluso dentro de una especie, las concentraciones de detergente empleadas para la purificación pueden variar con el medio de crecimiento. Al trabajar con las diferentes relaciones de detergente: proteína se encontró que al sobrepasar las relaciones de 6 y 10mg de DDM/mg de proteína la concentración de citocromos  $b$  (tomada como referencia para la presencia del complejo  $b_6c$ ), comenzó a decaer. Por lo tanto, esta cantidad de detergente fue excesiva. Es posible que con estas condiciones ya no se pudiera solubilizar más proteínas de membrana. Esto pudo suceder al rebasar por mucho su concentración micelar crítica (CMC). Al sobrepasar la CMC las moléculas de detergente comenzaron a unirse formando micelas. Por esto se utilizó la relación de 1.5mg DDM/mg de proteína en la cual se encontró el mayor valor para el citocromo  $b$  y el mayor porcentaje de citocromo  $b$  recuperado con respecto del solubilizado con un 67.07%. Para mejorar la solubilización se utilizó 100mM NaCl, ya que se ha reportado que facilita la separación entre la  $caa_3$  y el  $bc_1$ . Con la utilización de la sal se extrajo una cantidad mayor de citocromos  $b$ , de alrededor del 80% de citocromos  $b$  con respecto al solubilizado.

## 3. Fracciones de la cromatografía con DEAE-Biogel A

Con los diferentes lavados y el gradiente de NaCl se obtuvieron 6 fracciones. Mediante las diferentes técnicas empleadas se pudieron identificar con bastante confianza a los diferentes complejos respiratorios. En la fracción I (Figura 13) se observó solamente a una proteína con un hemo covalentemente unido, que fue identificada como el citocromo  $c$  de la  $caa_3$ . Se pudieron apreciar todas las subunidades de la  $caa_3$ , lo que indicó que en esta fracción el complejo estaba completo aunque sin hemos tipo  $a$ , por no encontrarse picos para el citocromo  $a$ , y por tanto, es posible que perdiera su actividad enzimática. También se observaron otras proteínas que no pertenecían a este complejo,

sugiriendo que las proteínas de esta fracción, pudieron adherirse débilmente a la resina y salieron con muy poca fuerza iónica.

En las fracciones 2, 3 y 4 se obtuvo la mayoría del complejo  $b_6c$ ; en las fracciones 2 y 3 a una concentración de 100mM de NaCl y en la 4 a una concentración de 219.14mM de NaCl (Figura 11). En 1987 de Vrij y colaboradores utilizaron al detergente octil  $\beta$ -D glucósido, sulfato de amonio, Tritón X-100 y una columna DEAE-Sefacel y obtuvieron picos de absorción para los citocromos  $c$  y  $b$  con absorbancias del complejo  $b_6c$  de *B. subtilis*, utilizando para la elución una fuerza iónica de 100 a 150mM de KCl. Al utilizar 250 a 300mM de KCl obtuvieron picos cercanos a los citocromos  $b$  de la SDH de *B. subtilis* con lo que se podría pensar que por su estructura, el  $b_6c$  se podría extraer directamente de la cromatografía con esta fuerza iónica. En nuestro caso, observamos que el  $b_6c$  podría estar formando una asociación con la NADH DH, la  $caa_3$  y con los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$  en un supercomplejo NADH DH- $b_6c$ - $c_{550}$ - $c_{551}$ - $caa_3$ , aunque también podría ser que la NADH DH comigre con el supercomplejo, lo que se confirmó en la siguiente cromatografía. Este tipo de supercomplejo se obtuvo en la bacteria Gram positiva termofílica *Bacillus PS3* en donde se encontró un supercomplejo quinol oxidasa formado por el complejo tipo  $bc$  y la oxidasa  $caa_3$  (Tanaka y cols., 1996). Otros ejemplos son el supercomplejo entre el  $bc_1$  y la  $aa_3$  en la bacteria Gram positiva *Corynebacterium glutamicum* (Niebisch y Bott, 2003). En la bacteria Gram negativa *Paracoccus denitrificans* se encontró un supercomplejo entre el  $bc_1$  y la citocromo  $c$  oxidasa  $aa_3$  utilizando DDM (Berry y Trumpower, 1985). Utilizando digitonina se encontró un respirasoma en membranas de *Paracoccus denitrificans* compuesto por los complejos I, III y IV (Stroh y cols., 2004). En *B. subtilis* se encontraron asociaciones entre el  $b_6c$ , el  $caa_3$  y el  $c_{550}$ , entre el  $b_6c$ , el  $caa_3$  y el  $c_{550}$  y la ATPsintasa, entre el  $b_6c$ , el  $caa_3$ , el  $c_{550}$  y el  $c_{551}$  y entre el  $caa_3$ , el  $c_{550}$  y el  $c_{551}$ , además de otros supercomplejos formados por la SDH, la nitrato reductasa (una enzima bombeadora de protones) y la  $aa_3$  (García y cols., 2012). Lo encontrado en nuestro trabajo coincide con este último reporte pues además se identificaron a las subunidades de la ATPsintasa y la nitrato reductasa en las fracciones de las cromatografías. Es posible que la respiración con nitrato podría estar acoplada al menaquinol producido por la SDH para eliminar el exceso de poder reductor (Richardson 2000) (García y cols., 2012).

En el análisis por electroforesis de las fracciones 2 a la 6 las subunidades de cada complejo fueron identificadas por los datos obtenidos en el trabajo de García y colaboradores (2012). Sin embargo, se encontraron varias bandas que no se les pudo adjudicar identidad por tratarse de fracciones de una cromatografía. De la fracción II a la 6 de la cromatografía con DEAE-Biogel A se pudieron identificar los complejos NADH DH, SDH, el  $b_6c$ , la  $caa_3$ , los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$ , además de la ATPasa y la nitrato reductasa pero al analizar a cada una de las fracciones se comenzaron a distinguir las diferentes asociaciones que existen entre los complejos respiratorios. La fracción II fue la tercera de las tres fracciones con la mayor actividad enzimática del complejo  $b_6c$ , pero también fue la fracción más limpia en el caso de los espectros diferenciales en la cual se obtuvieron picos de absorción para los citocromos  $c$  y  $b$  y un pico muy pequeño para el citocromo  $a$ . En esta fracción aunque se identificaron las subunidades de la citocromo  $c$  oxidasa  $caa_3$  en los geles de poliacrilamida, se encontró un pequeño pico de absorción para el citocromo  $a$  en los espectro diferenciales y un valor de actividad de 0.01 con respecto a las membranas la cual fue la más baja de todas las fracciones. Esto podría indicar que el hemo  $a$  se disoció del citocromo provocando que el complejo no fuera funcional. En la tinción con TMBZ para el 2D SDS PAGE del gel claro nativo de alta resolución (1D) la banda de alto peso molecular no identificada podría tratarse de la CtaC asociada con un citocromo  $c_{550}$  por su masa molecular aparente o con alguna otra subunidad de los otros complejos respiratorios (García y cols., 2012). Una asociación de la ATPsintasa con la  $caa_3$  *in vitro* se propuso en *B. pseudofirmus* (Liu y cols. 2007) y en *B. subtilis* se encontraron las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  junto con las subunidades del  $b_6c$  y la  $caa_3$ . El supercomplejo  $b_6c-cao_3$  provee los protones directamente para la síntesis de ATP (García y cols., 2012). En esta fracción existe principalmente una asociación entre la NADH DH, el complejo  $b_6c$  y los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$  como se mostró en el análisis por 2D de los geles de 1D.

Para el complejo  $b_6c$  se pudo notar el enriquecimiento de la actividad del complejo a través de las diferentes cromatografías aunque se obtuvo un valor de actividad menor que los demás complejos. Este valor puede explicarse porque el DBH<sub>2</sub> utilizado como sustrato en la reacción es una benzoquinona y no una naftoquinona como la MK-7 la cual es la quinona endógena de *B. subtilis*. Se utilizó ésta en vez de la MK-7 porque tiene la ventaja de mantenerse reducido de manera estable a diferencia de las naftoquinonas que se oxidan muy rápido (Jaramillo y cols., 2005).

En la fracción III las concentraciones de citocromos *c* y *b* fueron mayores que en la fracción II. Esta fracción se obtuvo igualmente a una fuerza iónica de 100mM de NaCl y fue la que presentó la mayor actividad para el complejo *b<sub>6</sub>c* de las 6 fracciones con un incremento de 2.81 con respecto a las membranas, casi tres veces más enriquecida que las membranas completas, sin embargo presentó mayor cantidad de citocromos *a*. Aquí se encontró una asociación principalmente entre los complejos *b<sub>6</sub>c*, la *caa<sub>3</sub>* y los citocromos *c<sub>550</sub>* y *c<sub>551</sub>*.

En la fracción IV también se obtuvo una buena actividad del *b<sub>6</sub>c* pero a diferencia de las fracciones 2 y 3 se observó una mayor concentración de *caa<sub>3</sub>*. Esta fue la segunda fracción con mayor concentración de citocromos *c* y *b* y fue la que presentó la mayor actividad para la NADH DH, la segunda más activa para el complejo *b<sub>6</sub>c* y la que tuvo la menor actividad para la SDH por esto se decidió utilizarla para pasarla por otra cromatografía para conocer si efectivamente existía una asociación entre la NADH DH, el *b<sub>6</sub>c*, la *caa<sub>3</sub>* y los citocromos *c<sub>550</sub>* y *c<sub>551</sub>* y principalmente para obtener una fracción pura para el *b<sub>6</sub>c*. Con los datos obtenidos para esta fracción se puede hablar de una asociación entre la NADH DH, el *b<sub>6</sub>c*, la *caa<sub>3</sub>*, los citocromos *c<sub>550</sub>* y *c<sub>551</sub>* y la ATPsintasa.

En las fracciones 5 y 6 se obtuvo un espectro de absorción diferente al de las fracciones anteriores y se identificaron los citocromos de la SDH y la *aa<sub>3</sub>*, las concentraciones de citocromos *b* fueron altas y las de los citocromos *a* fueron las más altas de las 6 fracciones. En la tinción con Coomassie se identificaron las subunidades correspondientes de la *aa<sub>3</sub>* las cuales no se encontraron en las demás fracciones y la actividad enzimática para la SDH fue notablemente mayor que las fracciones anteriores y que los sobrenadantes. Estas fracciones a diferencia de aquellas en las cuales se encontró enriquecido el *b<sub>6</sub>c*, se obtuvieron a una fuerza iónica de alrededor de 320 a 350mM de NaCl. Hägerhäll y colaboradores en 1992 utilizando otra metodología para la purificación de la SDH, obtuvieron a la SDH a una concentración de aproximadamente 300mM de NaCl. Los datos indican que en este caso, la SDH y la *aa<sub>3</sub>* se obtuvieron como otro súper complejo, por tanto, se decidió hacer una nueva cromatografía para intentar la separación de estos dos complejos.

#### 4. Cromatografía DEAE-Toyopearl para la Fracción IV (DEAE-Biogel A)

Al no haber obtenido una fracción lo suficientemente pura del complejo  $b_6c$  se decidió recromatografiar la fracción IV. Se escogió esta resina por presentar características parecidas a la DEAE-Biogel A pero con una fuerza iónica mayor y que permitía un pasar a partículas mas pequeñas.

En esta cromatografía nuevamente se obtuvo la fracción más pura para el  $b_6c$  a una fuerza iónica de 100mM de NaCl. En la fracción I la concentración del citocromo  $c$  fue mayor que la del  $b$  a diferencia de la cromatografía anterior y se observó una disminución considerable en la concentración del citocromo  $a$ . La tinción con TMBZ fue muy intensa para estos citocromos y en la tinción con Coomassie muchas bandas desaparecieron, quedando una fracción bastante limpia. Ya que se obtuvo poca cantidad de la muestra no se midió la actividad de la NADH DH y la SDH, pero se mostró muy enriquecida para el complejo  $b_6c$  con incremento en el valor de la actividad de 6.46 con respecto a las membranas y un aumento en el valor de la actividad de 3.49 con respecto a la fracción IVA demostrando que con este método se puede obtener este complejo con una purificación parcial elevada y buena actividad enzimática. Observando el espectro diferencial y los geles con LiSD en esta fracción disminuyó considerablemente la SDH, la ATPsintasa y la nitrato reductasa, en cambio se mantuvieron los citocromos  $c_{550}$ ,  $c_{551}$  y la NADH DH, Como lo demostraron los ensayos de oximetría, esta fracción tampoco tuvo alguna oxidasa terminal. En un análisis más detallado con el 2D SDS PAGE del gel de 1D de la muestra, se pudo notar que efectivamente el  $b_6c$  se encontró en una asociación con la NADH y los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$  y algunas subunidades en poca cantidad de la ATPsintasa y la nitrato reductasa, ta lvez separadas por la fuerza iónica aplicada en la columna. En esta fracción se encontró principalmente un supercomplejo entre la NADH DH, el  $b_6c$ , y los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$ .

La fracción II se obtuvo igualmente a una fuerza iónica de 100mM de NaCl pero se obtuvo después durante el gradiente. Se observó la presencia de los complejos  $b_6c$  y de la  $caa_3$  en el espectro de absorción indicando que el  $b_6c$  se encuentra asociado a la  $caa_3$  Además de la  $caa_3$ , se encontraron otras oxidosas terminales detectadas por la oximetría al añadir cianuro y la azida de sodio, pues el consumo de oxígeno aumentó. Pensamos que estas oxidosas podrían ser las oxidosas  $bd$  o  $bb'$  las cuales son mucho menos

sensibles a cianuro que la  $caa_3$  y la  $aa_3$  (Azarkina y cols., 1999). En el análisis de 2D SDS PAGE de gel claro nativo de alta resolución (1D) en la tinción con Coomasie se encontraron subunidades de la nitrato reductasa y de la ATPsintasa. Por lo tanto, concluimos que en esta fracción hay una asociación entre la NADH DH, el  $b_6c$ , la  $caa_3$  y los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$  así como la presencia de alguna oxidasa terminal aún no identificada.

En la fracción III el espectro fue muy parecido a la fracción anterior tanto en espectros como en geles, actividades y ensayos de consumo de oxígeno.

### **5. Cromatografía DEAE-Toyopearl para la Fracción V y 6 (DEAE-Biogel A)**

Se juntaron estas dos fracciones al tener mucha similitud y se decidió recromatografiarla, en esta fracción se identificó a la SDH y a la quinol oxidasa  $aa_3$  lo que puede hacer pensar en la existencia de una asociación entre estos complejos, la cual no se ha reportado hasta ahora.

En las tres fracciones de esta cromatografía se obtuvieron resultados muy parecidos. Se pudo identificar a los complejos SDH, la quinol oxidasa  $aa_3$  y la nitrato reductasa. Como ya se mencionó antes, la asociación entre la SDH y la nitrato reductasa ya fue reportada (García y cols., 2012). También se observó que el pico de absorción del citocromo  $c$  desapareció en el espectro de absorción de estas fracciones respaldando la idea de que se asocia solamente con el  $b_6c$  y la  $caa_3$ . Además el complejo SDH se encontró muy enriquecido. En la fracción II se observó la mayor actividad para la SDH de las tres fracciones obtenidas con un incremento en el valor de la actividad de 753.51 con respecto a las membranas y un valor de 4.6 con respecto a la fracción V,VIA y se encontraron la misma asociación entre la SDH, la  $aa_3$  y la nitrato reductasa. En la fracción III se observó el mismo caso que para las otras dos fracciones y esta fue la segunda fracción con la mayoría de la actividad de la SDH. Algo que se pudo notar es que en el análisis del gel de 2D SDS PAGE del gel de 1D de las tres fracciones, fue que el patrón de bandas de la primera fracción fue muy diferente al de las otras dos obteniéndose bandas de alto peso molecular en el gel de 1D así como su actividad enzimática fue menor, lo que podría entenderse como que las fracciones 2 y 3 se

tratasen de supercomplejos de mayor tamaño con mayor número de copias para la SDH, la  $aa_3$  y la nitrato reductasa.

Como punto final en este trabajo, se mostraron pruebas de que los complejos respiratorios de *B. subtilis* se encuentran organizados en supercomplejos funcionales, que pueden ayudar a mejorar el transporte de electrones y por esta razón con esta metodología el complejo  $b_6c$  de *B. subtilis* no se a podido extraer completamente puro. Algunos puntos para mejorar este estudio por el lado molecular que ya se están trabajando en el laboratorio son poder sobreexpresar al complejo directamente en la bacteria, otras alternativas son cambiar las condiciones de crecimiento para observar los cambios en la composición de los supercomplejos aquí encontrados, hacer análisis por espectrometría de masas de los geles de 2D SDS PAGE y del gel de 1D para confirmar la identidad de algunas de las bandas, utilizar detergentes no iónicos de nueva generación o una combinación de varios para lograr la purificación. Por otro lado sería interesante enfocarse en la purificación de algunos de los supercomplejos encontrados aquí para el estudio del  $b_6c$ , si se llegara a observar que no es posible purificarlo sólo y activo.



## Conclusiones

- Se obtuvo un buen rendimiento de células crecidas en MSR suplementado con 3% de succinato.
- El detergente DDM ha demostrado ser eficiente para solubilizar al complejo  $b_6c$  de forma activa.
- La relación de 1.5mg DDM/mg de proteína fue la mejor relación para la solubilización de las membranas de *B. subtilis*.
- Se logró obtener el 80% del citocromo b en el sobrenadante en presencia de NaCl, la cual mejoró la solubilización.
- Se logró una purificación parcial del  $b_6c$  en una fracción y con una actividad enzimática mayor a las membranas y a los sobrenadantes.
- El paso de la cromatografía DEAE-Toyopearl demostró ser eficaz en la separación de los diferentes complejos de la cadena respiratoria.
- En todas las cromatografías se obtuvo al complejo  $b_6c$  a una concentración de 100mM de NaCl.
- En todas las cromatografías se obtuvo al complejo SDH a una concentración de alrededor de 300 a 350mM de NaCl.
- Se encontraron diferentes supercomplejos:
  - $b_6c+C_{550}+C_{551}$
  - NADH DH+  $b_6c+caa_3+ C_{550}+C_{551}$
  - NADH DH+  $b_6c+ C_{550}+C_{551}$
  - SDH+Nitrato reductasa+ $aa_3$
- Si se lograra purificar completamente al complejo  $b_6c$  al ser un complejo con características de un complejo fotosintético sin serlo nos proporcionaría una enorme cantidad de información de importancia evolutiva sobre estos organismos.

## Referencias

Andrews,D., Mattatall,N.R., Arnold,D., and Hill,B.C. (2005). Expression, purification, and characterization of the CuA-cytochrome c domain from subunit II of the *Bacillus subtilis* cytochrome *caa3* complex in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 42, 227-235.

Assempour,M., Lim,D. and Hill,B.C. (1998). Electron Transfer Kinetics during the Reduction and Turnover of the Cytochrome *caa<sub>3</sub>* Complex from *Bacillus subtilis*. *J. Biochem.* 37, 9991-9998.

Azarkina,N., Siletsky,S., Borisov,V., von,W.C., Hederstedt,L., and 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. and Cramer,W.A. (2008). Structure-Function of the Cytochrome *b<sub>6</sub>f* Complex. *Photochemistry and Photobiology*, 84: 1349-1358.

Bhairi, S.M., Ph.D. (2001). A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry. CALBIOCHEM. CB0068-401.

Benit,P., Goncalves,S., Philippe,D.E., Briere,J.J., Martin,G., and Rustin,P. (2006). Three spectrophotometric assays for the measurement of the five respiratory chain complexes in minuscule biological samples. *Clin. Chim. Acta* 374, 81-86.

Bergsma,J., Strijker,R., Alkema,J.Y.E., Seijen,H.G. and Konings,W.N. (1981). NADH Dehydrogenase and NADH Oxidation in Membrane Vesicles from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 120, 599-606.

Bergsma,J., Van Dongen,M.B.M., and Konings,W.N. (1982). Purification and Characterization of NADH Dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *J. Biochem.* 128, 151-157.

Berry,E.A., Guergova-Kuras,M., Huang,L.S., and Crofts,A.R. (2000). Structure and function of cytochrome *bc* complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 1005-1075.

Berry,E.A. and Trumpower,B.L. (1985). Isolation of Ubiquinol Oxidase from *Paracoccus denitrificans* and Resolution into Cytochrome *bc<sub>1</sub>* and Cytochrome *c-aa<sub>3</sub>* Complexes. The J. Biol. Chem. Vol. 260, No. 4. pp.2458-2467.

Bron,S., Bolhuis,A., Tjalsma,H., Holsappel, S., Venema, G., and van Dijk,J.M. (1998). Protein secretion and possible roles for multiple signal peptidases for precursor processing in Bacilli. J. Biotech. 64, 3-13.

Castro,N.A., and Moreno, R. (2004). Biosíntesis del Grupo Hemo. REB 23(3): 99-106.

Castellani,M., Covian,R., Kleinschroth,T., Anderka,O., Ludwig,B. and Trumpower,B.T. (2010). Direct Demonstration of Half-of-the-sites Reactivity in the Dimeric Cytochrome *bc<sub>1</sub>* Complex. J. Biol. Chem. Vol. 285. No. 1. pp. 502-510.

Conte,L. and Zara,V. (2011). The Rieske Iron-Sulfur Protein: Import and Assembly into the Cytochrome *bc<sub>1</sub>* Complex of Yeast Mitochondria. Hindawi Publishing Corporation. Bioinorganic Chemistry and Applications. Vol. 2011. Article ID 363941, 9 pages.

Covian,R., Kleinschroth,T., Ludwig,B. and Trumpower,B.L. (2007). Asymmetric Binding of Stigmatellin to the Dimeric *Paracoccus denitrificans bc<sub>1</sub>* Complex.

David,P.S., Dutt,P.S., Wathen,B., Jia,Z., and Hill,B.C. (2000). Characterization of a structural model of membrane bound cytochrome *c-550* from *Bacillus subtilis*. Arch. Biochem. Biophys. 377, 22-30.

Delepelaire,P. and Chua,N.C. (1979). Lithium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis of thylakoid membranes at 4°C: Characterizations of two additional chlorophyll a-protein complexes. Biochem. 76. No. 1, 111-115.

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

García,L.Y., Chagolla,A., Cabellos,T. and Gutiérrez,E.B. (2012). The composition of the *Bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplexes. J. Bioenerg Biomembr. DOI 10.1007/s10863-012-9454-z.

Garavito,R.M. and Ferguson-Miller,S. (2001a). Detergents as tools in membrane biochemistry. J. Biol. Chem. 276, 32403-32406.

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

Gyan,S., Shiohira,Y., Sato,I., Takeuchi,M. and Sato,T. (2006). Regulatory Loop between Redox Sensing of the NADH/NAD<sup>+</sup> Ratio by Rex (YdiH) and Oxidation of NADH by NADH Dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*. *J. Biotech.* p. 7062-7071.

Haddock,B.A. and Jones,C.W. (1977). Bacterial respiration. *Bacteriol. Rev.* 41, 47-99.

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

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

Henning,W., Vo,L., Albanese,J., and Hill,B.C. (1995). High-yield purification of cytochrome aa<sub>3</sub> and cytochrome caa<sub>3</sub> oxidases from *Bacillus subtilis* plasma membranes. *Biochem. J.* 309 ( Pt 1), 279-283.

[http://msf.ucdavis.edu/silverstaining\\_protocols.html](http://msf.ucdavis.edu/silverstaining_protocols.html)

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.

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

Kunst,F., Ogasawara, N., Moszer,I. et. al. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* Vol 390. 249-256.

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

Kutoh,E. and Sone,N. (1988). Quinol-cytochrome c oxidoreductase from the thermophilic bacterium PS3. Purification and properties of a cytochrome bc<sub>1</sub>(b<sub>6</sub>f) complex. *J. Biol. Chem.* 263, 9020-9026.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Reprinted from Nature. 5259, pp. 680-685.

Lauraeus,M. and Wikstrom,M. (1993). The terminal quinol oxidases of *Bacillus subtilis* have different energy conservation properties. J. Biol. Chem. 268, 11470-11473.

Liu,X. and Taber,H.W. (1998). Catabolite Regulation of the *Bacillus subtilis* ctaBCDEF Gene Cluster. J. Bacteriol. p. 6154-6163.

Liu,X., Gong,X., Hicks,D.B., Krulwich,T.A., Yu,L. and Yu,C.A. (2007). Interaction between cytochrome caa3 and F1F0-ATP synthase of alkaliphilic *Bacillus Pseudofitmus* OF4 is demonstrated by saturation transfer electron paramagnetic resonance and differential scanning calorimetry assays. Biochem. 46(1):306-313.

Ljungdahl,P.O., Pennoyer,J.D., Robertson,D.E., and 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., and Randall,R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

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

Matar-Merheb,R., Rhimi,M., Leydier,A., Huche,F., Galian,C., Desuzinges-Mandon,E., Ficheux,D., Flot,D., Aghajari,N., Kahn,R., Di,P.A., Jault,J.M., Coleman,A.W., and Falson,P. (2011). Structuring detergents for extracting and stabilizing functional membrane proteins. PLoS. One. 6, e18036.

Madigan,M.T., Martinko,J.M. and Parker,J. (2006). Biología de los Microorganismos. Pearson Educación. Decima edición. Madrid. 1-1011.

Mogi,T., Saiki,K., and Anraku,Y. (1994) Biosynthesis and functional role of haem O and Haem A. Molecular Microbiology. 14(3), 391-398.

Montoya,G., Kaat,te.K., Rodgers,S., Nitschke,W., and Irmgard,S. (1999). The cytochrome bc1 complex from *Rhodovulum sulfidophilum* is a dimer with six quinones per monomer and an additional 6-kDa component. J. Biochem. 259, 709-718.

- Mooser,D., Maneg,O., MacMillan,F., Malatesta,F., Soulimane,T., and Ludwig,B. (2006). The menaquinol-oxidizing cytochrome bc complex from *Thermus thermophilus*: protein domains and subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1084-1095.
- Nakamura,K., Ikeda,S., Matsuo,T., Hirata,A., Takehara,M., Hiyama,T., Kawamura,F., Kusaka,I., Tsuchiya,T., Kuroda,T., and Yabe,I. (2011). Patch clamp analysis of the respiratory chain in *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1103-1107.
- Nakano,M.M., Zuber,P., and Sonenshein,A.L. (1998). Anaerobic regulation of *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. *J. Bacteriol.* 180, 3304-3311.
- Nelson,D.L., and Cox,M.M. (2009). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fifth Edition. W.H. Freeman. 1110pp.
- Nicholls,D.G., and Ferguson,S.J. (2002). *Bioenergetics* 3. Academic Press. London. Vol.69. No.7.
- Niebisch,A., and Bott,M. (2003). Purification of a Cytochrome *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>* Supercomplex with Quinol Oxidase Activity from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* Vol. 278, No. 6. pp. 4339-4346.
- Puustinen,A., and Wikström,M. (1991) The heme groups of cytochrome k from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biochem.* Vol. 88, pp. 6122-6126.
- Rajendran,C., Ermler,U., Ludwig,B. y Michel,H. (2010). Structure at 1.5 Å resolution of cytochrome *c<sub>552</sub>* with its flexible linker segment, a membrane-anchored protein from *Paracoccus denitrificans*. *Short Communications. Acta Cryst.* D66, 850-854.
- Richardson,D.J. (2000). Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology*, 146, 551-571.
- Schägger,H., Cramer,W.A. y von Jagow,G. (1994). Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis. *Analytical Biochem.* 220-230.
- Schoepp-Cothenet, B., Lieutaud,C., Baymann,F., Verméglio,A., Friedrich,T., Kramer,D.M. y Nitschke,W. (2008). Menaquinone as pool quinone in a purple bacterium. *PNAS.* Vol. 106. no. 21. 8549-8554.

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

Sonenshien,A.L., Hoch,J.A. and Losick,R. (2002). *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives From Genes to Cells. ASM PRESS. Washington, D. C. 163-179pp.

Stroh,A., Anderka,o., Pfeiffer,K., Yagi,T., Finel,M., Ludwig,B. and Schägger,H. (2004) Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol Chem* 279(6):5000-5007.

Tanaka,T., Inoue,M., Sakamoto,J. and Sone,N. (1996) Intra-and inter-complex cross-linking of subunits in the quinol oxidase supercomplex from thermophilic *Bacillus PS3*. *J Biochem* 119(3):482-486.

Thomas,P.E., Ryan,D. and Levin,W. (1976). An Improved Staining Procedure for the Detection of the Peroxidase Activity of Cytochrome P-450 on Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochem.* 75, 168-176.

Tulumello,D.V. and Deber,C.M. (2012). Efficiency of detergents at maintaining membrane protein structures in their biologically relevant forms. BBAMEM-80838. p8;4C.

Yu,J., Hederstedt,L., and 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. and 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.

Yoshiki,K. and Sakamoto,J. (2011). Purification and biochemical properties of a cytochrome bc complex from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. *BMC Microbiology.* 11:52.

Wachenfeldt,C and Hederstendt,L. (2002). *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: from Genes to Cells. Ed. by A. L. Sonenshein et al. ASM press. Washington, D.C.

(Winstedt,L. and Wachenfeldt,V. (2000). Terminal Oxidases of *Bacillus subtilis* Strain 168: One Quinol Oxidase, Cytochrome *aa<sub>3</sub>* or Cytochrome *bd*, Is Required for Aerobic Growth. J. Bacteriol. p6557-6564.

Wittig,I., Karas, M., and Schägger,H. (2007). High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complex. Molecular and Cellular Proteomics.

[www.neurowika.es/content/caracteristicas-de-la-cadena-respiratoria](http://www.neurowika.es/content/caracteristicas-de-la-cadena-respiratoria)

Zamboni,N. and Sauer,U. (2003). Knockout of the high-coupling cytochrome *aa<sub>3</sub>* oxidase reduces TCA cycle fluxes in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Lett. 226, 121-126.

Zamboni,R., Mouncey,N., Hohmann,H.P., and Sauer,U. (2003). Reducing maintenance metabolism by metabolic engineering of respiration improves riboflavin production by *Bacillus subtilis*. Metabolic Engineering. 5, 49-55.