

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



REGULACION DE LA SUCCINATO DESHIDROGENASA
DURANTE EL CRECIMIENTO Y LA ESPORULACION
DE BACILLUS CEREUS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

MARIA DEL CARMEN BENITO MERCADE

México, D. F.

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



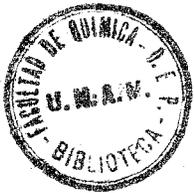
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS TESIS 1979
ARE H.C. 40
FECHA _____
PROC _____
S _____



LA PRESENTE TESIS HA SIDO DIRIGIDA
EN SU TOTALIDAD POR EL DR. EDGARDO
ESCAMILLA MARVAN, Y DESARROLLADA
EN EL INSTITUTO DE BIOLOGIA DE LA
UNAM.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: Prof. Oscar Amor Dodero.
VOCAL: Prof. Carlos del Río Estrada.
SECRETARIO: Prof. Graciela Meza Ruiz.
1er. Suplente: Prof. Jorge Soto Soria.
2o. Suplente: Prof. Biserka Sveshtarova P.

Sitio donde se desarrolló el tema:

INSTITUTO DE BIOLOGIA. Departamento de Biología Experimental.
UNAM.

Sustentante

Asesor del Tema



Ma. del Carmen Benito M.



M. en C. Graciela Meza R.

Supervisor Técnico



Dr. J. Edgardo Escamilla M.

PER ELS MEUS PARES

Amb tot al meu amor y la admiració
de sempre.

A MIS MAESTROS

Con profundo agradecimiento.

A EDGARDO ESCAMILLA

Con gran cariño por su infinita
paciencia y comprensión.

CONTENIDO.

INTRODUCCION.

I.- ESPORULACION.

Morfología de la esporulación.

Estructura de la espora bacteriana.

Inducción de la esporulación.

Cambios metabólicos y bioquímicos
asociados con la esporulación.

Regulación fisiológica de la esporulación.

Productos específicos de la esporulación.

Transformación de esporas en células
vegetativas.

II.- SUCCINATO DESHIDROGENASA.

Estructura y peso molecular.

Parámetros moleculares.

Propiedades regulatorias.

Propiedades catalíticas.

III.- CADENA RESPIRATORIA.

IV.- MATERIALES Y METODOS.

Procedimientos de cultivo y cosecha.

Rompimiento y preparación de las membranas.

Solubilización de la succinato deshidrogenasa.

Ensayos enzimáticos.

Reactivos.

V.- RESULTADOS.

Crecimiento sincrónico de B. cereus.

Actividad de la succinato deshidrogenasa durante el crecimiento vegetativo y la esporulación.

Caracterización de la succinato deshidrogenasa de las fases vegetativa y esporulante.

Solubilización de la succinato deshidrogenasa de las membranas de B. cereus.

VI.- DISCUSION.

BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION.

Durante el proceso de esporulación en las especies de Bacillus, existe una secuencia de eventos bioquímicos bien definida, que puede ser correlacionada a los cambios morfológicos. Se llevan a cabo grandes fluctuaciones en los niveles enzimáticos; algunas enzimas son inducidas, mientras otras disminuyen su actividad. La importancia del ciclo de Krebs durante la esporulación ha sido demostrada, tanto por la elevación de sus actividades enzimáticas hacia el final del crecimiento logarítmico, como por el carácter asporogénico de los mutantes deficientes en una o más de las enzimas del ciclo (1).

La succinato deshidrogenasa (SDH) es de particular interés por encontrarse asociada al ciclo de Krebs, formando fumarato, así como por su papel de enzima respiratoria, proveyendo electrones a la cadena respiratoria, y así, energía para la formación y maduración de la forespora. La oxidación del succinato está ligada a esta flavoproteína específica, cuya actividad puede ser medida como oxidasa, utilizando al oxígeno como aceptor final de electrones, o bien, como oxidorreductasa, utilizando al metasulfato de fenazina (PMS) como aceptor de electrones y al diclorofenolindofenol (DCPIP) como aceptor terminal.

La actividad de la oxidorreductasa sufre cambios considerables durante el crecimiento y la esporulación de B. cereus. Durante la fase vegetativa la enzima presenta el máximo de actividad; una vez que

se inicia la esporulación la actividad disminuye rápidamente y desaparece por completo a las tres horas de haber comenzado el proceso. Por otro lado, si el ensayo de succinato-PMS se lleva a cabo en presencia de cianuro la actividad puede detectarse en cualquier estadio.

Los efectos promovidos por el cianuro sobre la SDH de diferentes preparaciones han sido ampliamente estudiados. Se ha reportado (2a,3a) que el cianuro a elevadas concentraciones es capaz de inactivar a la SDH de corazón de ternera (preparación Keilin-Martree); Giuditta y Singer (3a) mostraron que, utilizando al PMS como aceptor de electrones, el cianuro únicamente inactivaba a la SDH unida a la membrana, pero no afectaba la actividad de la enzima soluble. Estos autores sugirieron que las preparaciones particuladas presentan dos sitios de reacción para el PMS, uno que es insensible al cianuro, como el de las preparaciones de SDH soluble, y otro que es rápidamente inactivado por el cianuro. Ambos sitios contribuyen de igual manera a la actividad de las preparaciones no tratadas. En otros trabajos, realizados por Wilson and King (4a) se demostró que las preparaciones de Keilin-Martree tratadas con cianuro carecían de la actividad de SDH; los autores concluyeron que la acción del cianuro era desestabilizar los enlaces formados entre la flavoproteína y la cadena respiratoria; esta conclusión fue confirmada por Wu y King (5a), quienes demostraron que el tratamiento con cianuro induce la resolución de la SDH de las membranas.

Con respecto a la acción del cianuro sobre la SDH de células bac

terianas se han obtenido resultados muy diferentes. Lang y cols. (6a) reportaron que el cianuro no solamente era incapaz de inactivar a la enzima, sino que además, en las membranas obtenidas de células esporulantes era necesaria la adición de cianuro para demostrar la actividad de SDH en el ensayo de succinato-PMS. Por otro lado, se encontró que la actividad de SDH de las membranas obtenidas de células vegetativas podía ser medida en ausencia de cianuro y que la inclusión de cianuro en el ensayo no modificaba significativamente su actividad. Estos resultados coinciden totalmente con los obtenidos en nuestro laboratorio y de acuerdo con ellos podemos diferenciar a las membranas de B. cereus de la fase vegetativa y de la fase esporulante por su diferente comportamiento frente al cianuro en el ensayo de succinato-PMS; mientras que las membranas esporulantes dependen de la adición de cianuro para demostrar su actividad, las membranas vegetativas son independientes de esta adición. Para explicar este efecto activador del cianuro Lang y cols. sugirieron que en las membranas vegetativas la SDH no está totalmente asociada a la cadena respiratoria y por lo tanto el PMS compete con el oxígeno por los electrones, mientras que en las membranas esporulantes la SDH está totalmente acoplada a la cadena respiratoria, por lo que es necesario bloquear a la citocromo oxidasa para obligar a los electrones a fluir en el sentido del PMS. Es bien conocida la acción del cianuro como inhibidor de la citocromo oxidasa.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que el efecto del cianuro no es debido a su acción como inhibidor de la cito-

cromo oxidasa, ya que encontramos que la concentración de cianuro necesaria para inhibirla es 40 veces mayor que la concentración de cianuro necesaria para causar la estimulación de la SDH esporulante en el ensayo de succinato-PMS. Para descartar definitivamente a la cadena respiratoria como el posible sitio de acción del cianuro probamos además otros inhibidores del transporte de electrones y ninguno de ellos mostró efecto activador sobre la enzima.

Analizamos entonces las características del cianuro para dilucidar su posible mecanismo de acción. Como el cianuro es un anión, ensayamos diferentes aniones orgánicos e inorgánicos y ninguno de ellos mostró efecto activador.

Se ha reportado que el cianuro a elevadas concentraciones es capaz de inducir la resolución de la SDH de corazón de ternera, por lo que decidimos probar el efecto de diferentes perturbadores de membrana. Encontramos que algunos detergentes son capaces de desenmascarar la actividad de la SDH de membranas esporulantes. Estos resultados sugerían que el posible efecto activador del cianuro era debido a su acción solubilizante. Sin embargo, encontramos que a las concentraciones de cianuro requeridas para la activación de la enzima no se llevaba a cabo la resolución de la misma.

Determinamos entonces algunas constantes cinéticas de la SDH tanto de membranas vegetativas como de membranas esporulantes en su forma soluble y en su forma unida a la membrana, en presencia y en ausencia de cianuro. De estos ensayos únicamente la determinación de la constan

te de Michelis para PMS mostró resultados sobresalientes. En ausencia de cianuro la SDH de membranas esporulantes muestra muy poca afinidad por el PMS, mientras que en presencia de cianuro esta afinidad aumenta considerablemente (unas 35 veces). Este cambio de afinidad promovido por el cianuro no se lleva a cabo con la SDH de membranas vegetativas, tanto en su forma soluble como en su forma particulada, y tampoco se manifiesta en la SDH esporulante una vez que ha sido disociada de las membranas, es decir, la enzima esporulante en su forma soluble pierde su dependencia por el cianuro.

Estos resultados sugieren que el efecto activador del cianuro es debido a que su sitio de acción se encuentra muy cerca de la enzima o en la oxidorreductasa misma. En la discusión de este trabajo proponemos algunas hipótesis que podrían explicar el efecto del cianuro.

CAPITULO I

ESPORULACION.

Muchas especies bacterianas de los géneros Bacillus, Clostridium y Sporosarcina tienen la capacidad, bajo condiciones determinadas, de llevar a cabo una serie de cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos que conducen a la formación de estructuras latentes, que se conocen como endosporas. Al final del crecimiento, las células vegetativas de estas bacterias se transforman en esporas a través de una secuencia ordenada de etapas morfogénicas (fenómeno conocido como esporulación). Cuando las condiciones ambientales son favorables, una célula vegetativa primaria emerge de la spora en pocos minutos (germinación).



La spora difiere genética, fisiológica y bioquímicamente de la célula vegetativa que le dió origen.

MORFOLOGIA DE LA ESPORULACION.

De acuerdo con Fitz-James y E. Young (2), al final de la fase exponencial del crecimiento, las bacterias esporulantes tienen las condiciones ambientales y la capacidad genética adecuadas para llevar a cabo la esporulación. En lugar de dividirse, cada célula producirá una spora intracelular (endospora) en un lapso aproximado de ocho a diez horas.

La secuencia de cambios morfológicos que conduce a la formación de la spora, ha sido dilucidada mediante microscopía electrónica y es similar en todas las especies de Bacillus y Clostridium. Este proceso se ha dividido en siete etapas características, representadas por números romanos (Fig.1). Las bacterias en crecimiento (etapa vegetativa) se designa como estadio 0.

El estadio I se caracteriza por la condensación de los dos núcleos de la célula vegetativa para formar un filamento axial de cromatina, parte del cual es destinado a la spora. Esta etapa es seguida por el crecimiento e invaginación de la membrana en uno de los polos de la célula, para formar el septo esporangial que delimita dos compartimientos: (a) el de la célula madre, que ocupa dos terceras partes del volumen total del esporangio, y (b) el de la forespora o prespora, que ocupa el volumen restante (estadio II); durante este evento se inicia la síntesis de un péptidoglicano para asegurar la formación del septo; una vez que éste se ha formado, el péptidoglicano es digerido y la bacteria procede al estadio III, en el cual, el crecimiento continuo de la membrana conduce al englobamiento de la prespora, formándose un protoplasto rodeado por dos membranas. El estadio IV marca el inicio de la formación y depósito de la corteza entre las dos membranas del protoplasto. La corteza es un componente específico de la spora, desaparece durante la germinación y no se encuentra en las células vegetativas. Existen algunas pruebas de que en la corteza se depositan ácido -

dipicolínico (DPA), polímeros de péptidoglicano y calcio. Este evento es seguido de la terminación de las cubiertas de proteína de la espora, la acumulación de DPA, la incorporación de calcio y la termorresistencia de la espora (V). La aparición de la espora madura dentro del esporangio representa el estadio VI. Finalmente, la espora es liberada por enzimas líticas (VII).

ESTRUCTURA DE LA ESPORA BACTERIANA.

La espora bacteriana está formada por diferentes capas (Fig.2). La capa más externa que rodea a la espora, llamada exosporio, es una capa delgada situada por afuera de la cubierta de la espora; presenta una estructura ordenada, con fragmentos hexagonales que le dan un aspecto de configuración cristalina. Por debajo del exosporio se encuentra una capa multilamelar, que está constituida por un 90% de proteína. Por debajo de esta capa se encuentra una membrana delgada que separa a la cubierta de la corteza de la espora, es un área de baja densidad electrónica que ocupa aproximadamente la mitad del volumen de la espora. La corteza se encuentra separada del citoplasma de la espora por una membrana. Las estructuras internas son similares a las de la célula vegetativa.

INDUCCION DE LA ESPORULACION.

De acuerdo con lo reportado por V.Vinter (2), la esporulación no

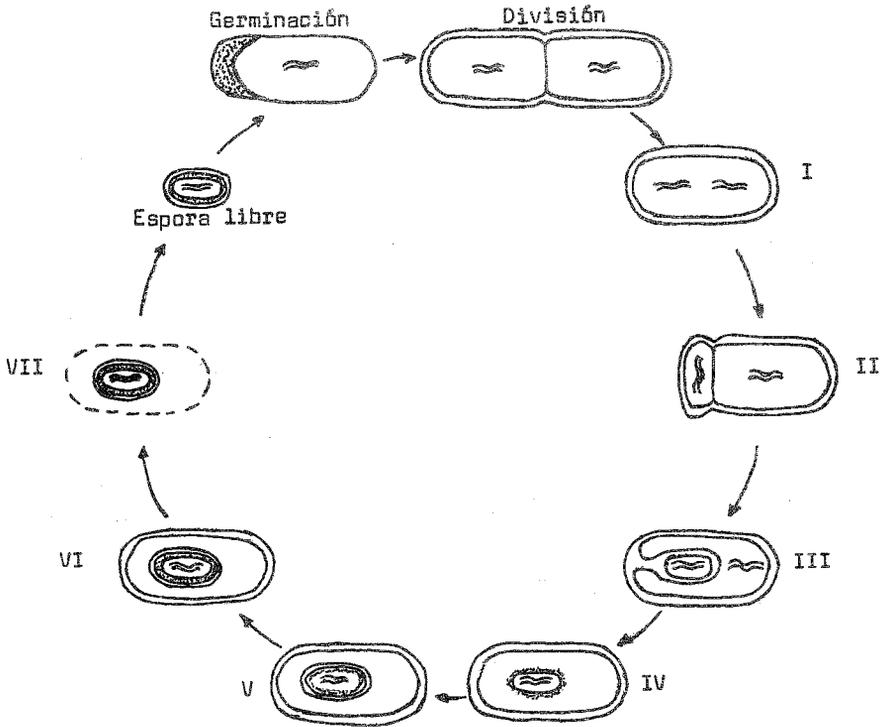


Fig. 1. Ciclo vital de una bacteria esporulante y estadios morfológicos.

es un evento obligado en el ciclo de desarrollo de las bacterias esporulantes, sino que es el resultado de las condiciones ambientales. La formación de la espora normalmente se inicia una vez que se detiene el crecimiento exponencial por agotamiento de los nutrientes de rápida utilización en el medio.

La inducción de la esporulación puede llevarse a cabo por dos caminos:

1) Macro ciclo.- Cuando las células esporulan después de una serie de divisiones celulares.

2) Micro ciclo.- Cuando la esporulación ocurre en la célula primaria, es decir, en la célula originada de la germinación de la espora, sin pasar por el estadio de división celular.

Existen condiciones óptimas de esporogénesis para cada especie, que involucran diferentes factores como pH, aereación, temperatura, nutrientes y cationes presentes en el medio. En medio líquido la esporulación generalmente se inicia por el agotamiento de las fuentes de carbono y de nitrógeno, y algunas veces por el agotamiento del fosfato. Se utilizan dos métodos para inducir la esporulación: (1) el método por agotamiento, en el cual las bacterias crecen en el medio, utilizan los nutrientes esenciales y después esporulan. La eficiencia de la esporulación y el grado de sincronía obtenidos dependen del medio utilizado. (2) El segundo, es el método por reemplazo, en el cual las bacterias que están creciendo exponencialmente en un medio rico son -

transferidas a un medio pobre. Este método proporciona un punto más claro de la iniciación de la esporulación y una mejor sincronía.

La forma como influyen en el metabolismo de la célula vegetativa -- los factores antes mencionados no ha sido totalmente dilucidada, pero -- pueden hacerse algunas generalizaciones: la esporogénesis está fuertemente influida por la presencia de fuentes de carbono y de nitrógeno aprovechables; la presencia de compuestos de nitrógeno metabolizables generalmente reprime la esporulación, y en combinación con la glucosa, esta represión es más efectiva. En general, las fuentes de carbono que -- son rápidamente metabolizables favorecen el crecimiento vegetativo, -- mientras que aquellas que son metabolizadas más lentamente favorecen -- la esporulación.

CAMBIOS METABOLICOS Y BIOQUIMICOS ASOCIADOS CON LA ESPORULACION.

El patrón metabólico de la célula va cambiando a medida que las -- fuentes de carbono y de energía del medio se van agotando. Durante el -- crecimiento vegetativo en presencia de glucosa, el pH del medio disminuye drásticamente (hasta valores de 5.3 a 5.5) por acumulación de los -- productos metabólicos intermedarios, principalmente ácidos orgánicos -- como pirúvico, láctico y acético. Esta disminución en el pH coincide -- con la iniciación de la esporulación y, con ésta, la utilización de los ácidos orgánicos, lo que conduce a una elevación del pH. Sin embargo, el cambio en el pH del medio no es indispensable para la esporulación,

ya que los organismos que crecen en extracto de levadura o en glutamato no llevan a cabo este cambio en el pH y esporulan normalmente. La actividad de algunas enzimas vegetativas disminuye (isocitrato deshidrogenasa, lisina descarboxilasa, etc.), mientras que la actividad de otras aumenta (enzimas del ciclo de Krebs, proteasas, enzimas líticas de la pared, etc.). Además, se induce la síntesis de nuevas enzimas necesarias para la formación de esporas. Los trabajos realizados por Halvorson y Murrell (2) señalan que los cambios enzimáticos que tienen lugar durante la esporulación pueden ser tanto cualitativos como cuantitativos (Fig.3). Durante la etapa vegetativa las células contienen las enzimas necesarias para un crecimiento normal. Al tiempo t_0 , se inicia la esporulación; las proteasas, los sistemas de antibióticos y de lisis de la pared se inducen (círculos abiertos), mientras que muchas enzimas de la célula vegetativa disminuyen su actividad. Este decremento puede ser de dos tipos: el primero aparentemente involucra la inactivación de enzimas (triángulos cerrados) como lisina descarboxilasa, isocitrato deshidrogenasa, treonina deshidratasa y fosfofructocinasa (PFK). El segundo tipo incluye las enzimas que disminuyen su actividad lentamente o permanecen constantes durante la esporulación (triángulos abiertos).

En los tiempos t_1 a t_4 , muchas otras enzimas aparecen en las células esporulantes. La fase temprana (t_1 a t_2) incluye algunas enzimas del ciclo de Krebs y enzimas que oxidan ácidos. La fase tardía t_3 a t_4

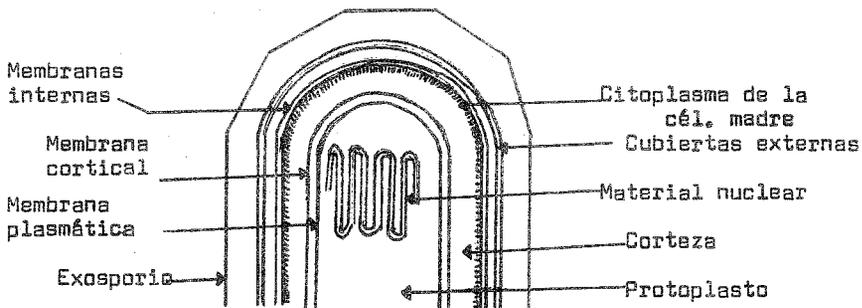


Fig. 2. Diagrama que muestra la ultraestructura de una espora bacteriana típica.

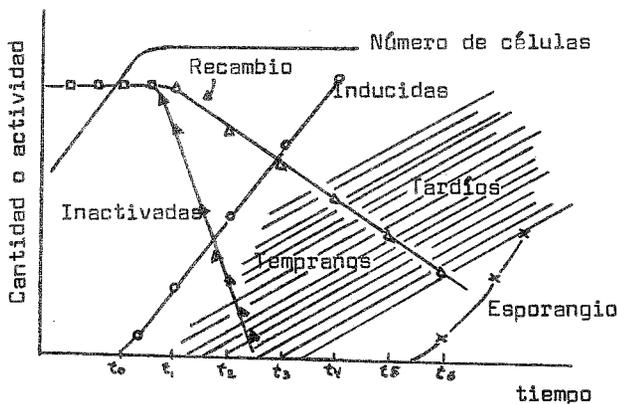


Fig. 3. Cambios en los niveles enzimáticos durante la esporulación.

incluye muchas de las enzimas responsables de la síntesis de los componentes de la espora, como DPA. Finalmente aparece el esporangio, seis horas después de que cesa el crecimiento.

Las actividades bioquímicas que aparecen durante la esporulación pueden ser necesarias y específicas para el proceso, o pueden no serlo. Estas actividades pueden dividirse en las siguientes categorías:

1) Aparición de componentes que no se encuentran durante el crecimiento, sino que solo se encuentran en las células esporulantes y que, aparentemente, son necesarias para la formación de la espora, por ejemplo el péptidoglicano de la corteza y las proteínas de la cubierta de la espora.

2) Cambios en las funciones vegetativas que son necesarios para la esporulación. Un ejemplo podría ser el incremento en la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs: en las células vegetativas de algunas especies de Bacillus, que crecen en un medio con glucosa, las enzimas de este ciclo están reprimidas y, por lo tanto, no son funcionales. La activación (desrepresión) de estas enzimas es indispensable para que se lleve a cabo la esporulación; esto indica que la esporulación requiere de la energía e intermediarios del ciclo de Krebs para la síntesis de los componentes específicos de la espora; una vez sintetizada la espora, ésta ya no requiere del funcionamiento del ciclo, lo que se demuestra liberando la espora del esporangio; las enzimas del ciclo permanecen en el esporangio y no se incorporan a la espora.

- 3) Efectos laterales inducidos por la secuencia primaria de eventos durante la esporulación, pero que no intervienen directamente en el proceso, por ejemplo, el incremento de las proteasas durante los estadios tempranos de la esporulación.
- 4) Cambios producidos por la disminución de los nutrientes, condición en la que se induce la esporulación, pero que no están conectados con ésta, por ejemplo, el incremento en la actividad de alfa-amilasa y de arginasa.
- 5) La aparición de componentes que pueden ser requeridos durante la germinación de la spora madura, pero que no intervienen en la formación de la misma, por ejemplo, la aparición de alanina deshidrogenasas.

El estudio de mutantes (2), ha sido muy útil en la clasificación de estos eventos, en cualquiera de las categorías mencionadas. Las mutaciones en los eventos no necesarios no afectan la esporulación; las mutaciones en los eventos necesarios sí la afectan y, las mutaciones en los eventos específicos de la esporulación no afectan el crecimiento vegetativo.

REGULACION FISIOLOGICA DE LA ESPORULACION.

Durante la esporulación bacteriana el metabolismo cambia drásticamente. El crecimiento se detiene; en general aumenta el racambio, y el flujo de los compuestos de carbono cambia en todos los casos. Por ejemplo, la fuente de carbono, glucosa, se termina al final del crecimiento

y las células cambian su metabolismo de glucólisis-biosíntesis a gluconeogénesis y oxidación de ácidos. Es probable que el nivel de ATP sea bajo durante la esporulación, por lo que, energéticamente, las células pueden considerarse al margen de la inanición.

Los mecanismos involucrados en la regulación de la esporulación son, principalmente, la represión de la síntesis de enzimas, la inducción y represión por catabolitos y la inhibición por retroalimentación.

1. Represión.- La represión de la síntesis de enzimas es de gran utilidad a la economía de la célula. La represión puede evitar la síntesis de enzimas que no se requieren, y de esta manera, aliviar los requerimientos energéticos de la célula.

2. Inducción y represión por catabolitos.- Para que exista represión por catabolitos se requiere una acumulación de los mismos a partir de glucosa y, además, una concentración elevada de moléculas de alta energía. El uso de este mecanismo de control coincide con los datos que se tienen del control de la esporulación (2). De esta forma, cuando se agotan los nutrientes del medio, el control por represión por catabolitos cesa y las enzimas específicas de la esporulación pueden ser inducidas.

3. Inhibición por retroalimentación.- Se sabe que la poza de algunos metabolitos aumenta después que ha finalizado el crecimiento, pero las razones de esto no han sido dilucidadas. El crecimiento se detiene por el agotamiento de los nutrientes y esto debería redundar en la dis

minución de la poza. Sin embargo, se sabe que las hidrolasas se incrementan en este momento, por lo que se cree que la poza aumenta como respuesta a un incremento en el recambio de los polímeros celulares. Esto podría tener el siguiente efecto: el incremento en la concentración celular de aminoácidos y nucleótidos para reprimir la formación de enzimas biosintéticas e inhibir, por tanto, la síntesis subsecuente de sus productos finales por retroalimentación, permitiría a la célula construir la espora utilizando las enzimas inducidas necesarias además de las enzimas no inhibidas ya existentes en la célula en crecimiento. El principal beneficio de la célula esporulante sería un eficiente uso de la energía total de la célula.

Las enzimas alostéricas tienen además otras ventajas durante la esporulación. La actividad basal de muchas de las enzimas del metabolismo de carbohidratos es afectada por metabolitos que no son estrictamente los productos finales, pero que reflejan el estado energético de la célula. Un ejemplo de este tipo es la PFK, que es inhibida por el ATP. La regulación de la glucólisis y la gluconeogénesis depende de las reacciones que producen energía. Los bacilos que esporulan en un medio mínimo pueden llevar a cabo un control alostérico específico que permite la síntesis de aminoazúcares (para la corteza) en las células que se en encuentran en inanición.

Se ha encontrado, además, otro tipo de inhibición que no es debida al fenómeno de retroalimentación. Algunas enzimas biosintéticas disminu

ven drásticamente su actividad cuando los metabolitos siguen el reverso de la vía. Este fenómeno se ha observado únicamente en levaduras y bacilos. La PFK es una de estas enzimas estudiadas. Durante el crecimiento en presencia de glucosa se requiere de PFK, que se encuentra en su forma activa y puede ser inhibida por ATP. La glucólisis se lleva a cabo a la velocidad que requiere la célula, y el control de la vía es similar al de cualquier otra célula. Sin embargo, al inicio de la esporulación la actividad de la PFK disminuye varias veces y esto ocurre simultáneamente a la disminución de ATP de la poza celular. Esto sugiere que la actividad de PFK se pierde por otro mecanismo diferente al de retroalimentación, y a una velocidad mucho mayor que la esperada por el recambio de proteínas. Una hipótesis de trabajo podría ser la transición alostérica controlada por un metabolito, que podría fluctuar como respuesta a las necesidades del metabolismo esporulante.

Más adelante se verá que la enzima que estudiamos en esta tesis, la succinato deshidrogenasa, parece obedecer a un mecanismo de regulación de este tipo.

Los mecanismos mencionados son suficientes para proveer el control fisiológico necesario para la esporulación, pero pueden existir otros.

PRODUCTOS ESPECIFICOS DE LA ESPORULACION.

Algunos productos cambian cuantitativamente durante la esporulación y otros aparecen de novo. Solamente se mencionarán algunos produc

tos que están relacionados a los mecanismos de control.

Antibióticos.- Algunas especies de bacilos producen antibióticos - que son liberados al medio después de que finaliza el crecimiento. Se - han encontrado tres antibióticos en los filtrados crudos de cultivos es porulantes de B. subtilis, considerándose la posibilidad de que una de estas sustancias se requiera para iniciar la esporulación.

Acido dipicolínico.- El DPA no se encuentra en las célula vegetati vas de los bacilos, pero constituye del 5 al 15% del peso seco de la es pora. La síntesis de este componente ocurre tardíamente durante la espo rulación. Se han obtenido mutantes que carecen de DPA, capaces de for- mar esporas termorresistentes, pero incapaces de retener su estado de - latencia; su germinación es defectuosa, por lo que se cree que el DPA - se requiere para este proceso.

Factores.- Se ha encontrado un factor llamado "esporogénico" en -- los cultivos de B. cereus, que está presente en la fracción no proteíni ca. Se cree que esta sustancia endógena específica tiene actividad de tipo hormonal. Este factor se ha ensayado con células destinadas a li- sarse; después de la adición del factor esporogénico, se evita la lisis y se lleva a cabo la esporulación. Sin embargo, este factor esporogéni- co no juega un papel primario en los cultivos que esporulan normalmente y es posible que esta actividad sea secundaria.

En la Fig.4, se representa la secuencia de eventos que se llevan a cabo durante la esporulación de bacilos aerobios.

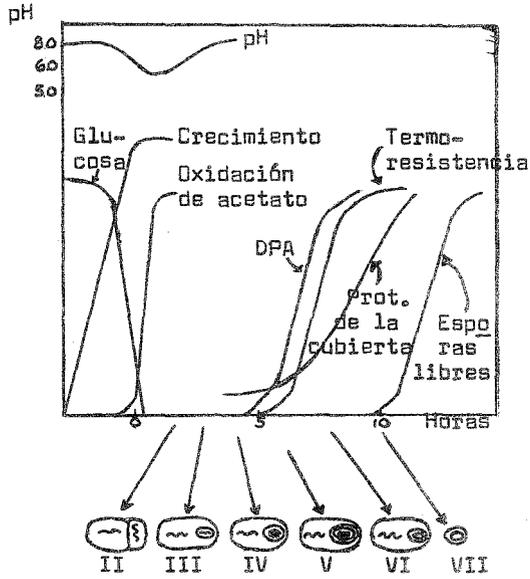


Fig. 4. Secuencia de eventos durante la esporulación de bacilos aerobios.

TRANSFORMACION DE ESPORAS EN CELULAS VEGETATIVAS.

Una espora puede permanecer en estado de latencia durante mucho tiempo y, en condiciones adecuadas, es capaz de transformarse nuevamente en una célula vegetativa. Este proceso se lleva a cabo en tres etapas:

1. Activación.- Capacita a la espora a germinar cuando las condiciones ambientales son favorables. Es un proceso reversible que puede efectuarse por tratamiento con agentes reductores o por exposición a pH bajos.

2. Germinación.- Es un proceso irreversible que conduce a la pérdida de todas las características típicas de la espora; se lleva a cabo en pocos minutos, una vez que las esporas han sido activadas. Se acompaña del hinchamiento y ruptura de la cubierta de la espora, con la consecuente pérdida de la resistencia a temperatura y solventes, de la refractilidad, de la liberación de los componentes de la espora y de un incremento en la actividad metabólica. El proceso global es degradativo, y no se llevan a cabo la síntesis de proteínas ni de ácidos nucleicos, por lo que las enzimas involucradas en este proceso ya se encuentran listas en la espora.

3. Expansión.- La germinación es seguida por un período de gran actividad biosintética, llamado expansión, en el cual son sintetizadas las proteínas y las estructuras típicas de la célula vegetativa, que transforman a la espora en una nueva célula vegetativa.

CAPITULO II

SUCCINATO DESHIDROGENASA.

La succinato deshidrogenasa (SDH) ha sido obtenida de diferentes fuentes: corazón de cerdo o de ternera, bacilos, algas y levaduras, entre otras, pero las más estudiadas, de donde se ha obtenido la mayor información acerca de su estructura y propiedades, son las preparaciones de SDH de corazón de cerdo o de ternera (preparaciones Keilin-Har tree). Los datos que se presentan a continuación provienen principalmente de estudios realizados en estas preparaciones, y que fueron recopilados por Singer y cols. en una magnífica revisión (1a).

ESTRUCTURA Y PESO MOLECULAR.

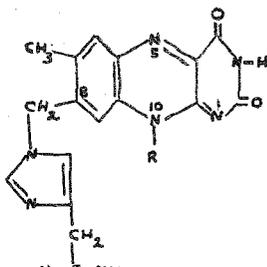
a) Composición.— La SDH es una flavoproteína. Sus constituyentes no proteínicos son hierro no hémico, azufre y una flavina unida covalentemente a la cadena polipeptídica. Existen ocho átomos gramo de hierro no hémico y de azufre por mol de flavina covalentemente unida.

b) Subunidades.— La SDH puede separarse en dos subunidades catalíticamente inactivas, mediante congelamiento y descongelamiento en presencia de tricloroacetato de sodio y por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Una subunidad tiene un peso molecular de 70,000 y flavina-hierro-azufre en una relación molar 1:4:4. La segunda subunidad contiene hierro y azufre, pero no contiene flavina, y su peso molecular es de 27,000 a 30,000 aproximadamente. Como la flavina se

encuentra en la subunidad de 70,000, es obvio que este componente de la enzima es esencial para la actividad catalítica, pero no se ha de mostrado si el sitio de unión al sustrato se encuentra también en es ta subunidad. Las posibles funciones de la subunidad más pequeña son la presencia del sitio de unión al sustrato, el transporte de elec-- trones a la coenzima Q (CoQ), una función compatible con su alto con-- tenido de hierro-azufre, y la regulación.

c) Peso Molecular.- Se han reportado diferentes pesos molecula-- res para la enzima, que varían en un rango de 97,000 a 200,000. Es-- tos datos se han analizado y se ha llegado a la conclusión de que la enzima se asocia en dímeros; la enzima monomérica, que contiene una subunidad de peso molecular 70,000 y una de 30,000, se encuentra en equilibrio dinámico con un dímero, y a medida que la concentración -- de enzima aumenta, el equilibrio se desplaza hacia la formación del dímero.

d) Estructura de la flavina covalentemente unida.- La digestión de la enzima altamente purificada, con tripsina y quimiotripsina, li bera a la flavina en forma de péptidos de flavina. Este péptido está unido al anillo de isoxaloxazina del FAD en la posición 8; el aminoá-- cido inmediatamente unido al grupo alfa-metilo es la histidina.



PARAMETROS MOLECULARES.

Reacción con cianuro.-- En 1951 se reportó que las preparaciones de SDH incubadas con cianuro se inactivaban gradualmente. Posteriormente se investigó este efecto con gran detalle. Los resultados encontrados fueron: (1) en las preparaciones solubles, el cianuro no causaba inactivación, aunque la enzima incorporaba cianuro; (2) en las preparaciones particuladas, la reacción con colorantes, que probablemente no interactuaban directamente con la flavoproteína (azul de metileno), era abolida completamente por el cianuro, pero solamente el 50% de la actividad de la succinato:PMS óxidorreductasa era sensible a cianuro; además de la pérdida de actividad (medida como V_{max}), el cianuro aumentaba la K_m para el aceptor de electrones (PMS), mientras que la K_m para succinato no cambiaba; (4) la velocidad de inactivación de la deshidrogenasa era pH dependiente.

Estas observaciones se interpretaron como cambios conformacionales lentos, a consecuencia de la combinación del cianuro con un grupo oxidado de la enzima, cambios que conducen inicialmente a una pérdida reversible de la afinidad por los colorantes y eventualmente a una pérdida de la actividad. Se pensó que la alteración conformacional involucra regiones de la molécula relacionadas al transporte de electrones a ciertos colorantes y a la cadena respiratoria, y no al sitio de unión con el sustrato.

Otra posibilidad era que el componente de la enzima que se une al

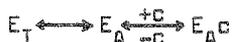
cianuro y que inicia el proceso de inactivación es el hierro no hémico. Esta idea se fundamentó en los efectos solubilizantes del cianuro; las preparaciones particuladas contienen uniones de Fe-S, y la mitad de la actividad succinato:PMS es sensible al cianuro. Con estos datos se ha especulado sobre la existencia de dos sitios de reacción para PMS en la enzima, uno de los cuales se destruye por el tratamiento con cianuro de la enzima particulada, mientras que en la soluble no es funcional.

PROPIEDADES REGULATORIAS.

a) Activación por sustratos y por inhibidores competitivos.- Se ha reportado que la actividad de las preparaciones purificadas de la enzima soluble es mayor en buffer de fosfatos que en otros buffers; este efecto activador de los fosfatos puede ser debido a su capacidad para combinarse con el sitio de unión del sustrato, ya que los sustratos (succinato y fumarato) y los inhibidores competitivos activan de una manera similar a la enzima. Mientras menor sea el valor de la constante de Michaelis (K_m) o de la constante de inhibición (K_I) para un sustrato (excepto fumarato) o para un inhibidor, más eficiente será su efecto como activador; a concentración infinita de cada activador se observa el mismo grado de activación. La activación sigue una cinética de primer orden con energía de activación muy elevada (33 a 36 -- Kcal/mol) lo que sugiere un cambio conformacional en la enzima, que --

probablemente involucre a los centros de Fe-S de la misma.

Se ha demostrado que la activación es reversible si se elimina al agente activador. Se ha postulado un equilibrio libre entre la enzima desactivada (E_I) y su forma activada (E_A), la cual es estabilizada por el activador (c).



Como la concentración de succinato "in situ", en los diferentes estados metabólicos no es lo suficientemente grande para producir cambios en el estado de activación de la enzima, se desconoce aún como operaría este tipo de control.

b) Activación por coenzima Q reducida. - Se ha demostrado que las propiedades cinéticas de la SDH dependen de la presencia de CoQ normal en las preparaciones particuladas. Este hecho sugiere que la CoQ modula de alguna manera la actividad de la SDH.

La CoQ reducida ($CoQH_2$) induce la activación de la enzima. La adición de NADH a las preparaciones particuladas que contienen la enzima desactivada en un 80 a 90% induce su activación gradual. Sin embargo, si se suprime la CoQ a las membranas tratadas con NADH, no ocurre activación de SDH; la activación se induce nuevamente si se restaura la CoQ original. La $CoQH_2$ protege a la SDH de la inactivación por cianuro; lo mismo sucede con el succinato y otros reductores no específicos de la enzima. También se ha encontrado que la CoQ oxidada no induce la activación. De acuerdo con estos resultados, se ha postulado que el NADH

sirve únicamente para reducir a la CoQ endógena. La quinona tiene, por lo tanto, dos funciones: (1) actúa como aceptor o donador de electrones y (2) actúa como un regulador de la SDH.

Si la activación por el NADH procede obligatoriamente por la vía de CoQ reducida, cabe esperarse que en la mitocondria, cualquier metabolito capaz de reducir a la CoQ pueda activar también a la SDH, y, en efecto, esto es lo que ocurre.

La actividad de la SDH disminuye en presencia de desacoplantes como el dinitrofenol, con la correspondiente acumulación de succinato; este efecto es debido a que la coenzima Q va siendo oxidada a medida que se adiciona el desacoplante.

c) Activación por ATP. - Los resultados presentados anteriormente sugieren que, en la mitocondria, la actividad de la SDH está regulada por la relación $CoQ_{10}/CoQ_{10}H_2$, que a su vez está determinada por la relación NAD/NADH y el potencial de fosfatos. Es posible que el ATP generado también juegue un papel importante en la determinación de la fracción de deshidrogenasa que se encuentra activada en un momento dado. Se ha reportado que el ATP aumenta la velocidad de oxidación del succinato, y originalmente se pensó que este efecto era debido a la remoción del oxalacetato (que inhibe a la enzima), o bien, a la reducción de CoQ. Posteriormente se demostró que la activación por ATP no se debía a ninguno de estos efectos.

La activación de la SDH por los sustratos ligados a NAD vía CoQ reducida y la activación por ATP son aditivas en determinadas condiciones, lo que demuestra que estos dos moduladores actúan independientemente, sin embargo, su acción combinada es necesaria para proveer a la enzima de un control compatible con los requerimientos fisiológicos. El ATP no induce la activación de la deshidrogenasa en las preparaciones solubles.

d) Activación por pH y aniones. - Se ha reportado que en las preparaciones solubles y particuladas de SDH la enzima se activa espontáneamente a medida que se disminuye el pH. El grado de activación depende del pH y de la composición iónica del medio. A pH 5.5 la enzima se activa en un 41% (con respecto a la actividad máxima obtenida con succinato como activador), y en un 80% si se adiciona al medio NaCl 0.1 M. La SDH es desactivada si se aumenta el pH; a pH 7.5 la actividad de la enzima es de 10%.

El punto de máxima activación se obtiene a pH 6.3 a 6.6 a 30°C. Esto sugiere que la ionización del grupo histidil es la que gobierna la activación reversible por el pH (pero no el grupo histidil covalentemente unido a FAD, ya que éste tiene un pKa de 4.5).

Los cationes monovalentes, Na⁺, K⁺, Tris⁺, no afectan la actividad de la enzima. Se observa activación por SO₄⁼ y por aniones monovalentes, en el siguiente orden de efectividad: ClO₄⁻, formato, NO₃⁻, -

I^- , Br^- y Cl^- . Acetato, CN^- y F^- no muestran efecto. Los experimentos realizados en este campo conducen a pensar que los aniones monovalentes en presencia de succinato, llevan a cabo una alteración conformacional de manera que las propiedades regulatorias de la enzima cambian.

e) Desactivación.- La SDH activada por sustratos, inhibidores competitivos, CoQ reducida o ATP se desactiva espontáneamente si se remueve al activador. Sin embargo, también se ha encontrado, en las mitocondrias y en las partículas submitocondriales, que una vez que la activación alcanza cierto nivel, la desactivación se inicia aún cuando el activador está presente. Esto sugiere que además de moduladores positivos existen también moduladores negativos para la enzima.

Después de la activación a pH 6.0, la deshidrogenasa es desactivada rápidamente por concentraciones muy pequeñas (25 micromolar) de succinato, fumarato, L y D-malato. Se ha demostrado que la desactivación se lleva a cabo por la formación de oxalacetato y no por la acción de los ácidos dicarboxílicos como moduladores negativos. La formación de oxalacetato es proporcional a la pérdida de la actividad; cuando se forma una mol de oxalacetato por mol de flavina, la SDH se desactiva en un 80 a 90%.

f) Relación del oxalacetato al proceso de activación.- En las preparaciones solubles y particuladas de SDH se ha encontrado que la enzi-

ma contiene oxalacetato fuertemente unido, ya que éste no se separa durante la precipitación y la exclusión en gel. El Br^- es capaz de liberar todo el oxalacetato unido a la enzima soluble, con el correspondiente incremento en su actividad.

Al activar a la enzima con diferentes concentraciones de Br^- la velocidad de activación es dos veces mayor que la velocidad de disociación del oxalacetato de la proteína. La liberación del oxalacetato unido a la enzima mediante la adición de Br^- , requiere de incubación prolongada y está caracterizada por una energía de activación muy alta -- (18.1 Kcal/mol), que es la misma energía que requiere la enzima para su activación. Esta elevada energía de activación sugiere que se necesita un cambio conformacional antes de la liberación del oxalacetato, por lo tanto, el proceso no puede ser considerado como un mero desplazamiento del inhibidor.

g) Control fisiológico de la SDH. -- Al considerar los estados de transición de la SDH, de activada a desactivada, surge la siguiente pregunta: ¿son estos cambios capaces de regular la actividad del ciclo de Krebs? De los numerosos estudios realizados se ha llegado a la conclusión de que esto no sucede, la enzima no regula al ciclo. Por otro lado, la SDH regulada por el estado metabólico de la mitocondria puede fluctuar su actividad en un rango de 5 a 10 veces.

Además, se ha encontrado que los sustratos de varias flavoprotef-

nas ligadas a la cadena respiratoria (NADH, succinato, colina, alfa-glicerofosfato) se interfieren mutuamente durante su oxidación, de manera que en el momento en que el sistema de transporte de electrones se orienta hacia cualquier flavoproteína éste se encontrará en forma reducida en un momento dado, siendo incapaz de captar electrones de otras flavoproteínas.

Considerando lo anterior, es obvio que la actividad no controlada de la SDH podría restringir la reoxidación del NAD, ya que existe un flujo suficiente de succinato para mantener a la deshidrogenasa reducida durante mucho tiempo. Como la oxidación de una mol de succinato produce únicamente dos moles de ATP, mientras que la oxidación de NADH produce tres mole de ATP, la máxima velocidad de síntesis de ATP requerirá de alguna restricción en la actividad de la SDH para permitir la máxima oxidación del NADH; idealmente, esta restricción para la SDH no debe ser tan grande como para que limite la velocidad del ciclo de Krebs.

El mecanismo de regulación que se ha propuesto es el siguiente: cuando la relación ATP/ADP es baja, se requiere la síntesis de ATP, y la SDH será desactivada, debido a la baja concentración de ATP y de CoQ reducida. Esto permite incrementar la oxidación del NADH, y, durante esta fase, el succinato se acumula (lo que ha sido demostrado experimentalmente). Cuando la relación ATP/ADP aumenta, la SDH puede ser activada por el succinato, por la elevada relación de CoQH_2/CoQ y

por el ATP, lo que conduce a una disminución del succinato acumulado.

Para que esta hipótesis sea plausible, se requiere que existan gtras fuentes de succinato además de la oxidación de alfa-cetoglutarato, de otro modo, la oxidación del alfa-cetoglutarato ligada a NAD podría limitar el flujo de succinato. Se sabe que se forman cantidades considerables de succinato a partir de la oxidación de ácidos grasos con número impar de carbonos, de aminoácidos con cadenas ramificadas y de metionina, por la vía del metil-malonil CoA.

Esta hipótesis fisiológica, para los múltiples mecanismos de la regulación de la SDH, no es la única posible y no es adaptable a todas las situaciones metabólicas. Existe evidencia de que las condiciones ideales para la máxima actividad de la SDH en las mitocondrias --son también aquellas en las cuales el flujo de electrones es a la inversa, en las que la SDH desempeña un papel fundamental. Este proceso está involucrado en la elongación de la cadena de ácidos grasos y en el consecuente almacenamiento de equivalentes reductores en la mitocondria de corazón.

Sin embargo, esta hipótesis parece ser adecuada, y, si es correcta, podría significar la modulación de la SDH actuando en conjunto --con el control respiratorio, que es de gran importancia en la regulación de la conservación de energía en la mitocondria.

Este punto de vista del control de la SDH en la mitocondria no -considera las observaciones recientes sobre la presencia de oxalaceta

to unido a la enzima, en las preparaciones particuladas y en las solubles. No se ha demostrado que los reguladores de la SDH (CoQH_2 , succinato, ATP) liberen oxalacetato de la enzima, por lo que no existe evidencia que sugiera que la rápida activación-desactivación de la enzima involucra al oxalacetato. Aun cuando se demostrara posteriormente que la activación de la deshidrogenasa mediada por la CoQH_2 involucra la reducción del oxalacetato unido, a malato, esto no afectaría el significado regulatorio del fenómeno, sino que proveería un mecanismo químico para el proceso.

PROPIEDADES CATALITICAS.

Especificidad y constantes cinéticas.- La SDH es altamente específica en sus requerimientos para aceptores de electrones. Las preparaciones purificadas son oxidadas a velocidades apreciables solamente por el metasulfato de fenazina, el etosulfato de fenazina y el ferricianuro. La velocidad de oxidación del succinato es idéntica para estos tres oxidantes a concentración infinita (V_{max}). La CoQ , el oxidante fisiológico en las preparaciones particuladas, no reacciona con ninguna preparación soluble, probablemente debido a que su interacción requiere de la presencia de lípidos específicos que son removidos durante la solubilización. La acción de la enzima es fácilmente reversible y la enzima puede aceptar electrones para la reducción de fumarato a partir de diversos donadores de electrones, de los cuales, el FMNH_2 es

CAPITULO III

CADENA RESPIRATORIA.

La succinato deshidrogenasa juega un doble papel en el metabolismo celular: (1) interviene en las reacciones del ciclo de Krebs, oxidando al succinato para transformarlo en fumarato, y (2) provee de electrones a la cadena respiratoria para la obtención de energía.

En este capítulo se revisará brevemente el mecanismo de transferencia de electrones.

Las células obtienen la mayor parte de su energía a través de la reacción de los sustratos con el oxígeno molecular. La forma en la cual la energía se vuelve disponible es mediante la producción de ATP por fosforilación de ADP. Para obtener el máximo rendimiento de ATP, la transferencia de electrones, desde los sustratos hasta el oxígeno, se divide en varios pasos, de modo que por lo menos dos (y mas a menudo tres) fosforilaciones distintas pueden ocurrir por cada par de electrones transferidos. Estos pasos implican una sucesión de portadores de electrones, compuestos que pueden ser reducidos por aceptación de electrones del portador precedente y pueden de nuevo oxidarse, por transferencia de electrones al portador siguiente.

La secuencia de las reacciones de transferencia de electrones en la cadena respiratoria, desde el NADH hasta el oxígeno molecular, se muestra en la figura (5)

Los electrones son transferidos por agentes oxidantes cada vez --

el más comúnmente utilizado.

Además del succinato, también pueden ser oxidados otros substratos, como el metilsuccinato, el etilsuccinato, clorosuccinato, D y L-malato y el monofluorosuccinato. De estos compuestos, el último es el único oxidado relativamente rápido (45% de la velocidad con succinato a V_{max}); la velocidad de oxidación del D y L-malato es muy difícil de medir, debido a la rápida formación del complejo enzima-oxalacetato.

La K_m para succinato ha sido determinada en diferentes laboratorios. Los datos reportados varían en un rango de 0.3 a 1.3 mM a 38°C y de 0.06 a 1.3 mM a 22-25°C. El número de recambio de la enzima, expresado por mol de flavina covalentemente unida (actividad del centro catalítico) es de $18.000 \pm 1,000$ a 38°C, pH 7.6, en mitocondria de co razón, de cerebro y de levadura aeróbica.

Inhibidores.- En orden de efectividad, los inhibidores competitivos más utilizados son: oxalacetato, malonato, pirofosfato, fumarato; recientemente se han estudiado el di, el tri y el perfluorosuccinato.

Los componentes férricos de la enzima reaccionan muy lentamente con los agentes quelantes de hierro, a menos que la enzima sea expuesta previamente a agentes que causan cambios conformacionales (urea, -hidrosulfito, mercuriales).

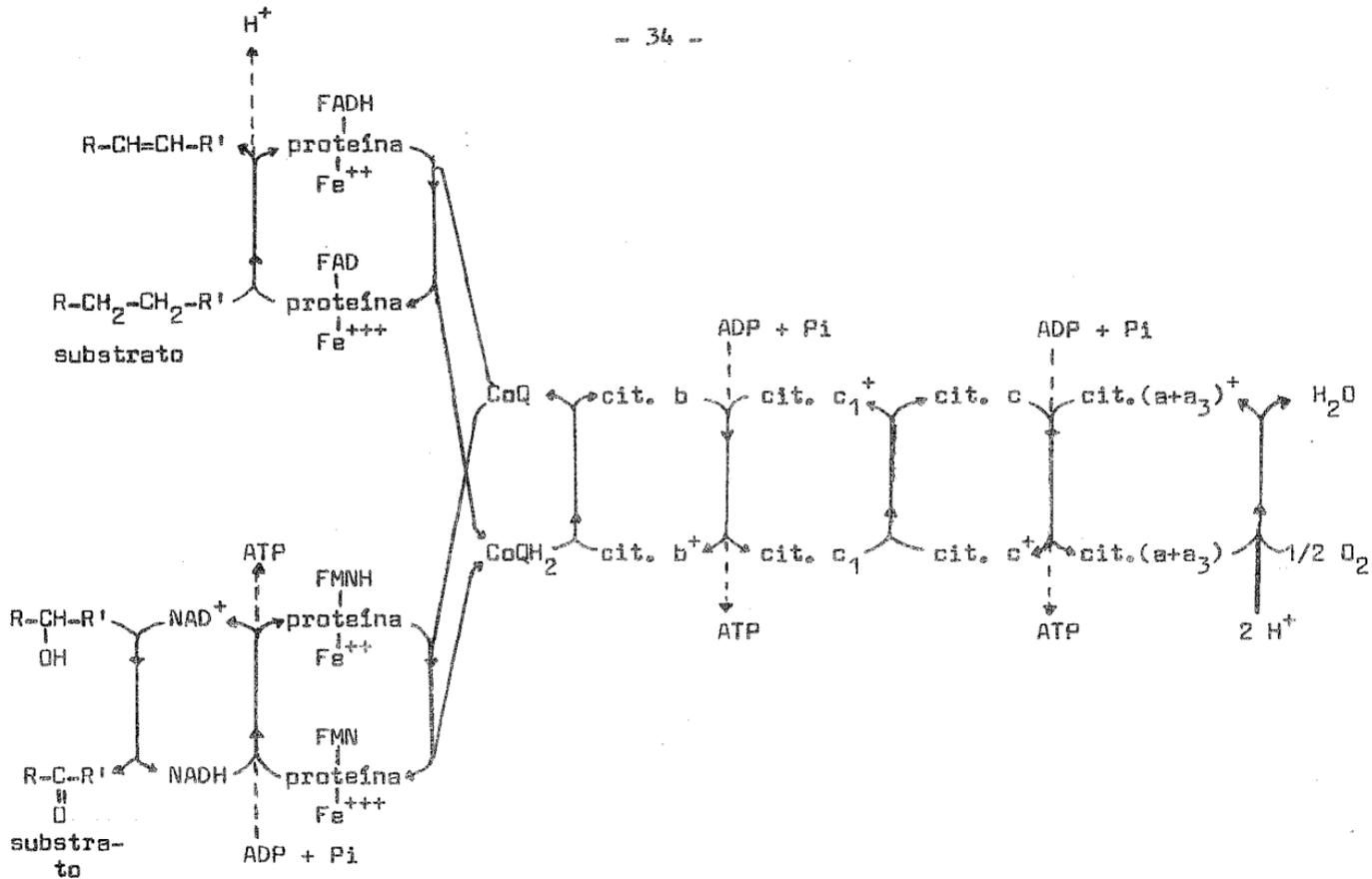


Fig. 5. La cadena de transporte electrónico de mitocondrias; se indican también las reacciones asociadas con fosforilación.

más fuertes de sustrato a oxígeno, es decir, portadores sucesivos tienen potenciales de electrones crecientemente más positivos. Los portadores iniciales son derivados de las vitaminas nicotinato y riboflavina. Los portadores posteriores son proteínas de hemina, los citocromos, con estructuras modificadas a fin de hacer del grupo hemina un oxidante crecientemente más potente.

Los electrones provenientes de diferentes sustratos se colectan en forma de NADH mediante la acción de deshidrogenasas ligadas a NAD. Estos electrones entran a la cadena respiratoria a través de la flavoproteína NADH deshidrogenasa. Por otro lado, otros sustratos respiratorios son oxidados mediante deshidrogenasas ligadas a flavina, como la SDH y la acil-CoA deshidrogenasa, que introducen los electrones a la cadena respiratoria a través de la CoQ. El resto de los portadores electrónicos después de la CoQ son todos citocromos. La reacción final de transferencia de electrones involucra al citocromo ($a+a_3$), que reacciona directamente con el oxígeno molecular.

El transporte de electrones puede ser bloqueado en diferentes sitios de la cadena respiratoria por diversas sustancias conocidas como inhibidores respiratorios, ejemplos de estas sustancias son el cianuro, la antimicina, la rotenona. El efecto neto de estos inhibidores es que cesa la transferencia de electrones al oxígeno, dando lugar a que los portadores de electrones anteriores al sitio de acción del inhibidor se acumulen en estado reducido, cesando así la generación de ATP.

De estos inhibidores, el cianuro es de particular interés en nuestro trabajo, ya que su adición es indispensable para detectar la actividad de la SDH en los diferentes estadios de la esporulación. El cianuro actúa bloqueando la reacción terminal de la cadena respiratoria, es decir, impide la transferencia de electrones desde el citocromo $a+a_3$ al oxígeno molecular, probablemente porque se combina con el ión cuproso de la citocromo oxidasa parcialmente reducida, obligando al resto de los elementos de la cadena a permanecer en estado reducido.

Finalmente, el transporte de electrones se lleva a cabo en la membrana interna de las mitocondrias en los organismos eucarióticos, mientras que en los organismos procarionticos, que carecen de mitocondrias, el transporte electrónico se lleva a cabo en la membrana celular.

CAPITULO IV

MATERIALES Y METODOS.

a) PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO Y COSECHA.

Se utilizó una cepa de Bacillus cereus, aislada por Andreoli y cols. (7a). El crecimiento sincrónico y la esporulación del bacilo se llevó a cabo en medio G modificado, utilizando la técnica de cultivo activo (8a).

Composición del medio G modificado.- 0.1% de extracto de levadura, 0.1% de sacarosa (azúcar de cocina refinada), 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5% K_2HPO_4 , 0.02% MgSO_4 , 0.005% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.0025% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0005% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.00005% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00002% $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.0005% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Los componentes se disuelven en agua bidestilada hasta el volumen deseado. Se preparan 10 l de medio para el biofermentador, que se esterilizan a 121°C y 18-24 libras de presión durante 40 minutos. Se preparan 0.5 l de medio para transferencias y se distribuyen de la siguiente manera: 300 ml en un matraz erlenmeyer de 2 l, y los 200 ml restantes - en cuatro matraces erlenmeyer de 250 ml con 50 ml cada uno. Los matraces de transferencia se esterilizan 15 minutos a 121°C y 18-24 lbs. de presión.

Técnica de cultivo activo para la obtención del crecimiento sincrónico.- La cepa de B. cereus se mantiene en tubos con agar nutriente inclinado en refrigeración. Para activar al bacilo se incuba uno de estos tubos a 37°C , 12 horas. Con la cepa activada se inocula el primer matraz de transferencia con 50 ml de medio, que se incuba en agitación a 300 rpm

y a 30°C durante 4 a 5 horas, después de lo cual se transfiere 1 ml del cultivo a un segundo matraz de transferencia conteniendo 50 ml de medio, el cual se incuba en las condiciones anteriores. De la misma forma se realizan dos transferencias más de 1:50 ml cada tres horas y una cuarta transferencia de 5:300 ml en el matraz erlenmeyer de 2 l que se mantiene en las mismas condiciones de agitación y temperatura durante tres horas. Finalmente se inocula al biofermentador que contiene 10 l de medio (Modelo Magnaferm New Brunswick Scientific Co, Inc.) con 150 ml del último cultivo. La temperatura se mantiene a 30°C, la agitación a 150 rpm y el flujo de aire a 4-6 litros por minuto.

El crecimiento en el biofermentador se sigue espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 540 nm (en un espectrofotómetro Pye - Unicam SP-1800) y midiendo el pH a intervalos de 15 minutos.

Las células se colectan mediante una centrifuga de flujo continuo (Sharples, modelo T-1) durante la fase exponencial (A_{540} 1.25) o a los tiempos indicados de esporulación. El paquete celular se lava tres veces con buffer Tris-HCl 0.2 M, pH 7.6 adicionado de $CaCl_2$ y $MgCl_2$ 50 mM (buffer TCM).

b) ROMPIMIENTO Y PREPARACION DE LAS MEMBRANAS.

Se resuspenden 20 g (peso húmedo) de células en 100 ml de buffer TCM y se rompen a 30,000 Psi y 4°C en un fraccionador Ribe Cell (Ivan Sorvall, Inc. Conn. U.S.A.) según Andreoli y cols. (7a). El homogenado

obtenido se incuba con Desoxirribonucleasa I durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitación, para eliminar la viscosidad producida por el DNA liberado. Las células completas se eliminan por centrifugación a 1,500 x g durante 5 minutos y las membranas se recuperan por -- centrifugación a 140,000 x g durante dos horas. El paquete de membra-- nas se lava tres veces con buffer TCM. Estas membranas pueden almace-- narse en nitrógeno líquido durante varias semanas sin pérdida aprecia-- ble de actividad de SDH.

c) SOLUBILIZACION DE LA SUCCINATO DESHIDROGENASA.

Utilizamos diferentes agentes para la solubilización de la SDH:

- 1) Un agente caotrópico, el NaClO_4 , que es un perturbador de proteínas.
- 2) Un detergente iónico, el desoxicolato de sodio.
- 3) Un detergente no iónico, el Srij 36-T.* (Ver sección de Reactivos).

La solubilización con NaClO_4 se lleva a cabo resuspendiendo las - membranas (aproximadamente 12 mg/ml de proteína de membranas) en buffer de glicil-glicina 0.1M, pH 7.4. Se adiciona NaClO_4 desde una concentra-- ción 8.0M hasta concentración final de 0.35M en atmósfera de nitrógeno. La preparación se incub₂ durante 20 minutos en hielo y atmósfera de N_2 y posteriormente se centrifuga a 140,000 x g durante una hora. Se sepa-- ra el sobrenadante y se adiciona succinato de sodio hasta concentración final de 10 mM y ditiotreit₂ol hasta concentración final de 5 mM. El pre-- cipitado se resuspende en el 40% del volumen original en buffer de gli-

cil-glicina 0.1 M y pH 7.4, se adiciona NaClO_4 8.0 M hasta concentración final de 0.85 M en atmósfera de N_2 . Se incuba en hielo durante 20 minutos en presencia de nitrógeno y se centrifuga a 140,000 x g durante tres horas. El sobrenadante se adiciona con succinato y ditiotreitól a las concentraciones antes mencionadas.

La solubilización de la SDH con Brij 36-T se lleva a cabo mediante la incubación de las membranas en buffer TCM y en presencia del detergente al 0.3%. Esta suspensión es sonicada durante 15 minutos y después incubada a 4°C durante una hora. Posteriormente se centrifuga la preparación a 140,000 x g durante dos horas y se separan las fracciones.

La solubilización de la enzima con el desoxicolato de sodio (DOC) se realiza de la misma forma que con el Brij 36-T, pero utilizando una concentración mayor, 0.75%.

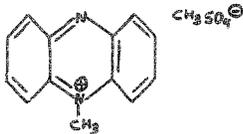
d) ENSAYOS ENZIMATICOS.

1) Succinato:DCPIP oxidorreductasa.- El ensayo se realiza en celdillas de 3 ml y a una temperatura de 30°C, de acuerdo con Lang y cols. (6a). La mezcla de ensayo consiste en succinato disódico 20 mM, buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 8.0, agua bidestilada hasta volumen final de 3.0 ml, membranas (aproximadamente 0.4 mg de proteína de membranas), metasulfato de fenazina (PMS) 1.1 mM y diclorofenolindofenol (DCPIP) 0.08 mM. La mezcla de ensayo se preincuba durante tres minutos

antes de adicionar el PMS y el DCPIP. La reducción del DCPIP se sigue espectrofotométricamente a 600 nm (espectrofotómetro Pye Unicam SP--1800). La actividad se expresa como micromoles de DCPIP reducidos por mg de proteína por hora. Después de registrar la actividad durante 1 a 2 minutos se adiciona cianuro de potasio a concentración final de 0.1 mM. La actividad dependiente de cianuro se cuantifica por el cambio -- producido en la pendiente después de la adición del mismo.

Con el objeto de aclarar el fundamento de este ensayo, a continua ción se representan las estructuras y las principales características del PMS y del DCPIP.

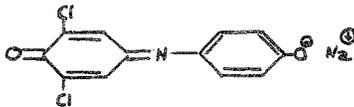
Metasulfato de fenazina (PMS)



(forma oxidada)

Es un aceptor de electrones y un a carreador de los mismos. En forma oxidada es amarillo y en forma redu cida es leuco.

Diclorofenolindofenol (DCPIP)



(forma oxidada)

Es un aceptor de electrones; en su forma oxidada es azul a pH neutro y rosa a pH ácido; en su forma redu cida es leuco.

Las constantes cinéticas de la SDH se determinaron realizando el -- mismo ensayo, pero variando la concentración de los reactivos, o el pH -- del buffer, dependiendo de la constante que se deseaba cuantificar:

i) pH óptimo.- Los buffers utilizados fueron: buffer de fosfatos de potasio 50 mM en un rango de pH de 6.0 a 8.0 y buffer de Tris-HCl 50 mM en un rango de pH de 7.2 a 9.0.

ii) Km para succinato.- Se utilizó succinato disódico en un rango de concentraciones de 0.1 a 5.0 mM.

iii) Km para KCN.- Se utilizó cianuro de potasio en un rango de concentraciones de 0.001 a 5.0 mM.

iv) Km para PMS.- Se utilizó PMS en un rango de concentraciones de 0.005 a 20.0 mM.

La determinación de proteínas se llevó a cabo utilizando el método de Lowry (8a). Este método utiliza iones de Cu^{++} en medio ligeramente alcalino, con los cuales las proteínas forman complejos coloreados, de composición desconocida, entre el ion Cu^{++} y los grupos carbonilo de los enlaces peptídicos.

e) REACTIVOS.

La Desoxirribonucleasa I, el PMS, el citocromo C y el Tris-hidroxi metil-amino-metano se obtuvieron de la casa Sigma Chemical Co; el DCPIP y el KCN se obtuvieron de la casa Baker; el desoxicolato de sodio y el perclorato de sodio de la casa Merck. Los demás reactivos utilizados son de grado reactivo. El material de cristalería fue de la casa Pyrex. Nota: Brij 36-T es el nombre comercial de este detergente no iónico, el cual es un derivado de alcoholes polioxietilénicos.

RESULTADOS.

1. CRECIMIENTO SINCRONICO DE BACILLUS CERUS.

En la figura (6) se representa una gráfica típica del crecimiento y la esporulación de B. cereus. El tiempo t_0 indica la iniciación de la esporulación, la cual se lleva a cabo a los 30 minutos posteriores al pH mínimo del cultivo. Los estadios subsecuentes de esporulación t_1 , t_2 , t_3 , etc. se obtienen a los 60, 120, 180, etc. minutos después de haberse detectado t_0 y pueden seguirse mediante la observación en el microscopio de contraste de fases.

2. ACTIVIDAD DE LA SDH DURANTE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO Y LA ESPORULACION.

La figura (7) muestra el comportamiento de la SDH durante el crecimiento y la esporulación de B. cereus. Durante la fase vegetativa la enzima presenta el máximo de actividad; una vez que se inicia la esporulación la actividad disminuye rápidamente, de manera que hacia el tiempo t_3 la actividad de SDH no es demostrable. Sin embargo, si se adiciona cianuro a la mezcla de ensayo la actividad puede demostrarse en cualquier estadio; se observa además un segundo incremento en la actividad, que puede estar relacionado a la síntesis de la membrana externa de la forespora. De acuerdo con esto, las membranas vegetativas y esporulantes pueden diferenciarse entre sí por su comportamiento --

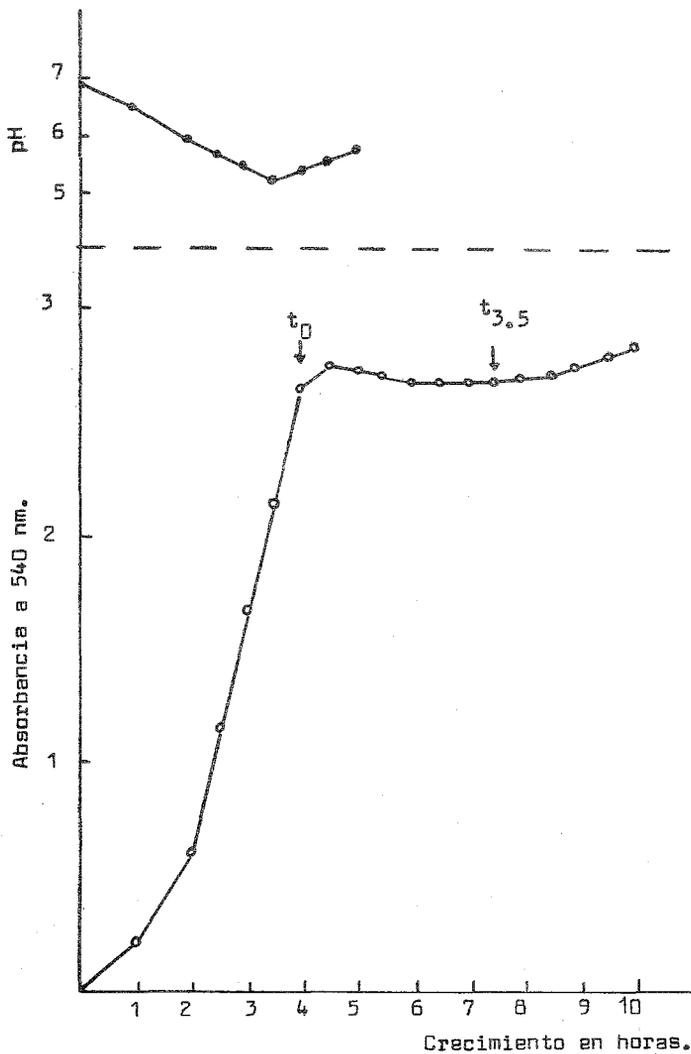


Fig. 6. Curva de crecimiento de B. cereus en medio G modificado.

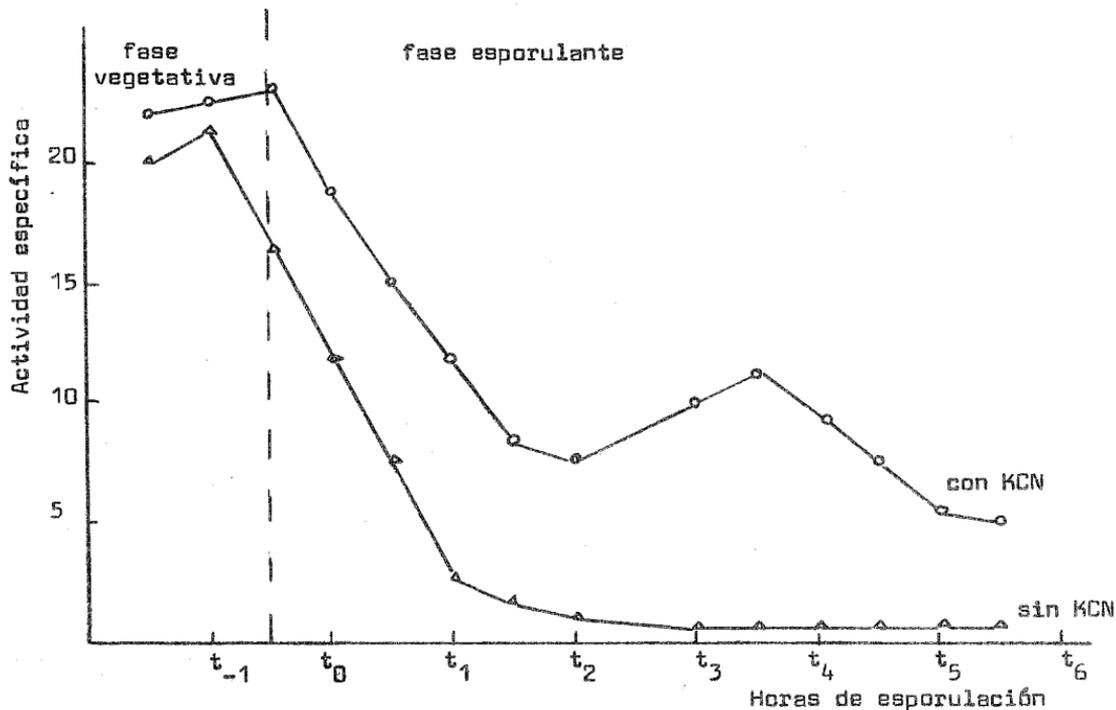


Fig. 7. Succinato:DCPIP-PMS oxidorreductasa en membranas totales de B. cereus durante las fases vegetativa y esporulante.

Los puntos graficados se obtuvieron del promedio de 10 experimentos.

frente al cianuro en el ensayo de succinato-PMS: mientras que las esporulantes son dependientes de cianuro, es decir, requieren la adición de cianuro para desenmascarar la actividad, las vegetativas son independientes de cianuro, la adición de cianuro no modifica significativamente la actividad de estas membranas.

El cianuro es un buen inhibidor de la cadena respiratoria, lo que sugiere que su efecto activador sobre las membranas esporulantes podría ser debido a la inhibición de la citocromo oxidasa; esto obligaría a los electrones a fluir a través del PMS (fig. 8). Para confirmar esta idea, decidimos comparar las concentraciones de cianuro necesarias para inhibir a la citocromo oxidasa y las concentraciones de cianuro necesarias para causar la estimulación de la SDH en el ensayo del PMS.

En la fig. (9) se observa el efecto de la concentración de cianuro sobre la SDH a diferentes estadios del crecimiento y la esporulación. Es evidente que las membranas vegetativas no son estimuladas significativamente a ninguna de estas concentraciones, mientras que las membranas $t_{.5}$ y $t_{1.5}$ (esporulantes jóvenes) se activan totalmente a concentraciones sumamente bajas de cianuro. La dependencia del cianuro aumenta con el tiempo de esporulación.

Por otro lado, las concentraciones de cianuro necesarias para inhibir a la citocromo oxidasa se encuentran por encima de 0.1 mM, lo que se observa en la Tabla I; esto demuestra que las concentraciones -

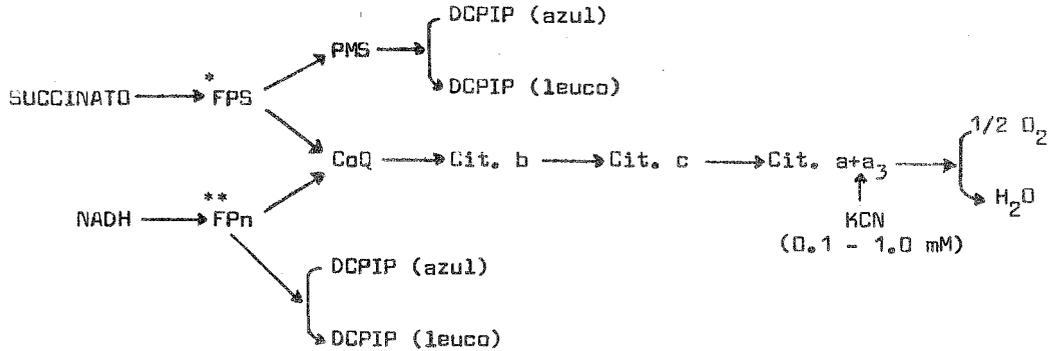


Fig. 8. Cadena respiratoria de *Bacillus cereus*. También se muestran los sitios de acción de los aceptores artificiales de electrones y el sitio de inhibición del cianuro de potasio.

*FPS = flavoproteína que deshidrogena al succinato (SDH).
**FPn = flavoproteínas que deshidrogenan al NADH.

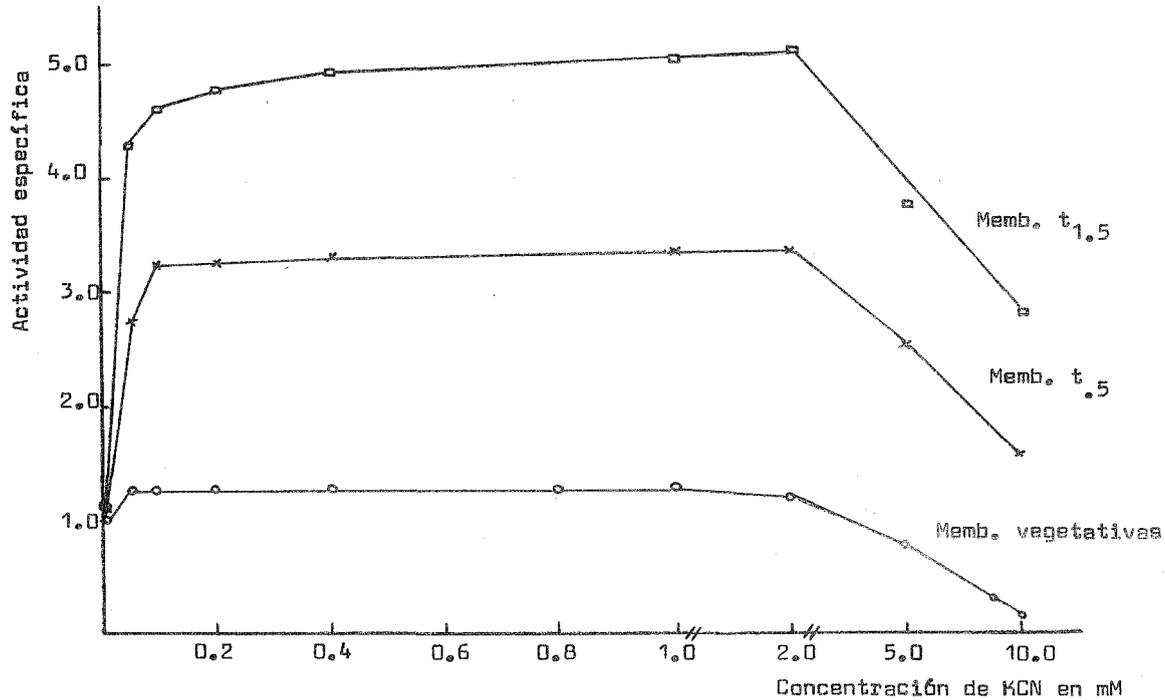


Fig. 9. Efecto de la concentración de KCN sobre la actividad de succinato:DCPIP-PMS aceptor durante las etapas vegetativa y esporulante de B. cereus.

de cianuro necesarias para estimular a la SDH en el ensayo de PMS no son capaces de bloquear la cadena de transporte de electrones, lo que sugiere que el sitio de acción del cianuro no es la citocromo oxidasa. Este hecho se confirma por la alta afinidad que presenta la SDH por el cianuro; las figuras (10 y 11) muestran que la Km aparente para cianuro es 2.7 micromolar, una concentración aproximadamente 40 veces menor que la requerida para bloquear la cadena de transporte de electrones.

Para descartar totalmente a la cadena respiratoria como sitio de acción del cianuro en la estimulación de la SDH, decidimos probar otros agentes inhibidores como HOQNO, antimicina y rotenona. Los resultados se muestran en la Tabla II. Se observa que las concentraciones requeridas para inhibir a la succinato oxidasa (que utiliza oxígeno molecular como aceptor final de electrones) no son capaces de activar a la succinato:DCPIP oxidoreductasa.

Ensayamos además diversos compuestos que pudieran llevar a cabo el mismo efecto activador del cianuro, entre ellos varios aniones monovalentes a diferentes concentraciones (Tabla III); ninguno de ellos activa de manera significativa a la SDH (excepto el fluoruro, que la activa en un 25%). Los aniones polivalentes piruvato, carbonato, citrato, y los agentes caotrópicos, a concentraciones por debajo de las que inducen la solubilización de la enzima (Tabla IV) tampoco son capaces de activarla.

Por otro lado, se ha demostrado que el cianuro, a concentraciones

ADICION	ACTIVIDAD Nat O ₂ /min/mg prot.	ACTIVIDAD RELATIVA DE SUCCINATO OXIDASA.
Ninguna	9.0	1.0
KCN:		
0.01 mM	9.0	1.0
0.10 mM	8.1	0.9
1.00 mM	6.3	0.7
10.00 mM	3.8	0.42

Tabla I. Efecto de la concentración de KCN sobre la actividad de succinato-oxidasa en membranas t_{3.5} de B. cereus.

ADICION	ACTIVIDAD DE SDH:DCPIP-PMS ACEPTOR	ACTIVIDAD RELATIVA A KCN 0.1 mM
Antimicina 0.01 - 0.1 mM	0	0
*HOQNO 0.001-0.01 mM	0	0
Rotenona 0.005-0.01 mM	0	0

Tabla II. Efecto de inhibidores de cadena respiratoria sobre la actividad de succinato deshidrogenasa en membranas t_{3.5}.

*HOQNO.- 2-heptil-4-hidroxiquinolina-N-óxido; afecta los sistemas respiratorios bacterianos, inhibiendo la transferencia de electrones desde cit. b a cit. c; o bien, previniendo la reducción del citocromo b.

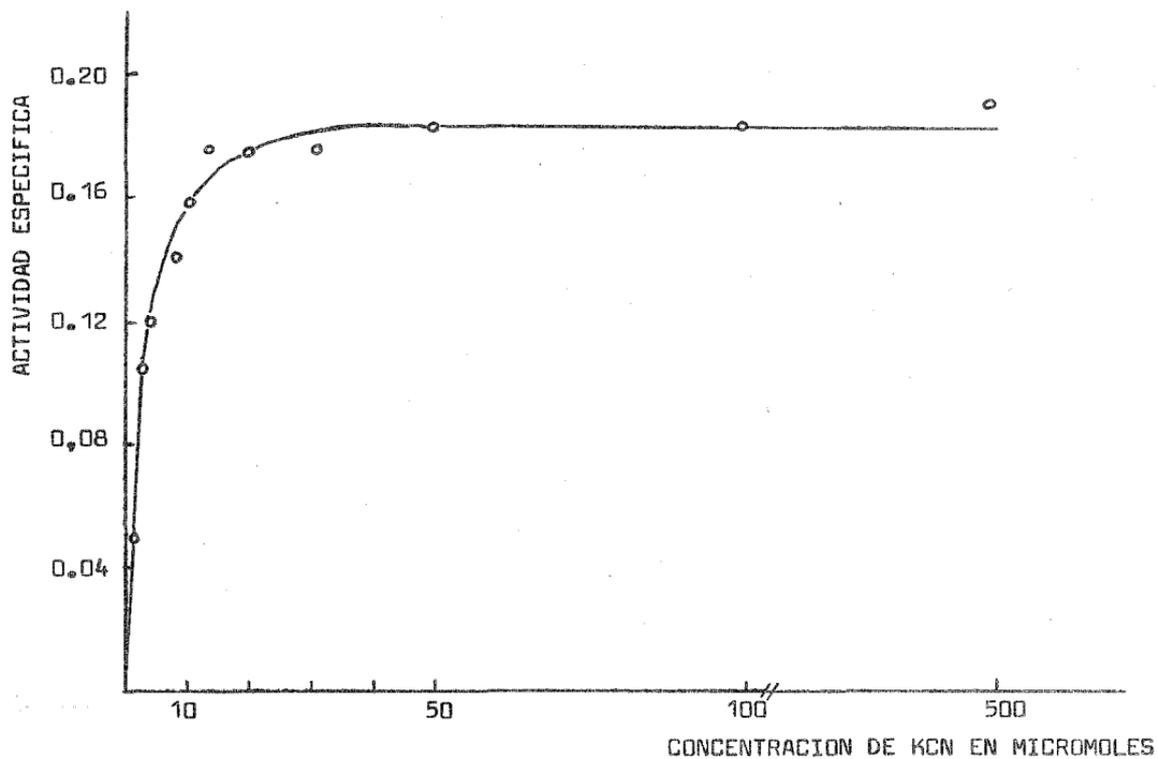


Fig. 10. Km para KCN. Membranas esporulantes (edad t_3).

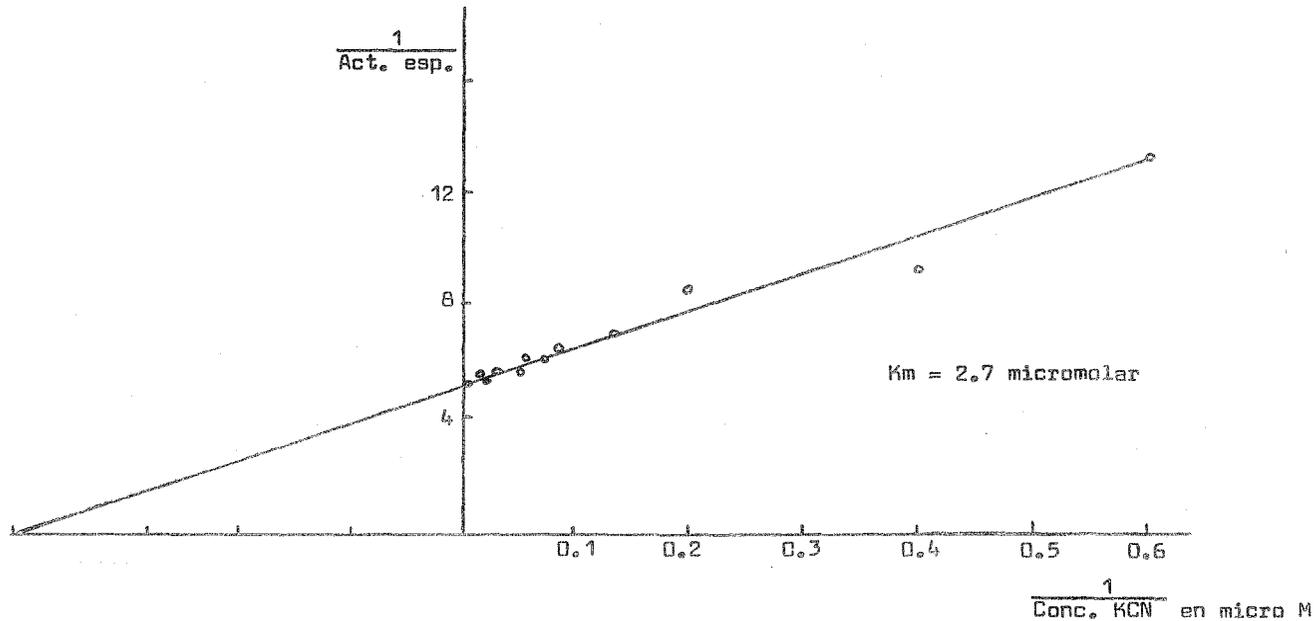


Fig. 11. Gráfica para calcular la K_m para KCN de membranas esporulantes por el método de las dobles recíprocas.

Conc. en mM	Anión	Act. de SDH	% de Activación.	Anión	Act. de SDH	% de Activación.
-	-	0.24	0	-	0.24	0
0.01	Br ⁻	0.26	7.7	F ⁻	0.32	25.0
0.05	Br ⁻	0.25	4.0	F ⁻	0.30	20.0
0.10	Br ⁻	0.27	11.1	F ⁻	0.32	25.0
0.50	Br ⁻	0.28	14.3	F ⁻	0.32	25.0
1.00	Br ⁻	0.32	25.0	F ⁻	0.35	31.4
10.00	Br ⁻	0.26	7.7	F ⁻	0.18	0
-	-	0.24	0	-	0.24	0
0.01	Cl ⁻	0.22	0	I ⁻	0.27	11.1
0.05	Cl ⁻	0.24	0	I ⁻	0.25	0
0.10	Cl ⁻	0.23	0	I ⁻	0.24	0
0.50	Cl ⁻	0.26	7.7	I ⁻	0.24	0
1.00	Cl ⁻	0.26	7.7	I ⁻	0.24	0
10.00	Cl ⁻	0.18	0	I ⁻	0.24	0
-	-	0.24	0	-	0.24	0
0.01	Nit	0.33	27.3	Ac	0.22	0
0.05	Nit	0.31	22.6	Ac	0.24	0
0.10	Nit	0.27	11.1	Ac	0.26	7.7
0.50	Nit	0.24	0	Ac	0.25	4.0
1.00	Nit	0.28	14.3	Ac	0.25	4.0
10.00	Nit	0.23	0	Ac	0.25	4.0

Tabla III. Efecto de aniones monovalentes sobre la actividad de SDH de membranas esporulantes (edad $t_{3.5}$).

Los ensayos se realizaron preincubando las membranas con el anión correspondiente (a la concentración indicada) durante 3 minutos. La adición de KCN fue necesaria en todos los casos para demostrar la actividad. Nit = nitrato; Ac = acetato.

ADICION	ACTIVIDAD DE SDH	ACTIVIDAD RELATIVA A KCN 0.1 mM
Ninguna	0	0
KCN:		
0.1 mM	0.052	1.0
1.0 mM	0.060	1.15
10.0 mM	0.030	0.57
Na ₂ CO ₃ :		
0.1 a 10 mM	0	0
Citrato:		
0.1 a 10 mM	0	0
Piruvato:		
0.1 a 10 mM	0	0
Perclorato:		
0.1 a 10 mM	0	0
Colato:		
0.1 mM	0	0
1.0 mM	0.01	0.19
10.0 mM	0.01	0.19
Brij 36-T:		
0.1 mM	0.01	0.19
1.0 mM	0.02	0.38
10.0 mM	0.03	0.57
Lauril sulfato:		
0.1 mM	0.07	0.34
1.0 mM	0.12	2.30
10.0 mM	0.18	3.46

Tabla IV. Efecto de algunos aniones polivalentes y de algunos perturbadores de membrana sobre la SDH (membranas t_{3,5}).

elevadas, es capaz de solubilizar a la SDH de las preparaciones de co-razón de ternera, por lo que se pensó que probablemente el efecto activador fuera debido a esta capacidad solubilizante. Para verificar esta idea utilizamos diferentes detergentes: lauril sulfato, colato de so-
dio y Brij 36-T. Los resultados se muestran en la Tabla IV. Es eviden-
te que los detergentes son capaces de desenmascarar la actividad de la
enzima, por lo tanto, el siguiente paso era comprobar si el cianuro, a
las concentraciones capaces de inducir la actividad de SDH, era capaz
de disociar a la enzima de las membranas esporulantes.

En la Tabla V, comparamos el efecto solubilizante ejercido por el
Brij 36-T, el cianuro y el perclorato de sodio. Los resultados muestran
claramente que las concentraciones de cianuro necesarias para la acti-
vación de la SDH en el ensayo de PMS no son capaces de solubilizar a -
la enzima como lo hace el Brij 36-T.

Por tanto, si el cianuro no actúa bloqueando a la cadena respira-
toria, ni solubilizando a la enzima, la pregunta que surge es ¿cómo --
lleva a cabo el cianuro este efecto activador? En busca de una respues-
ta decidimos determinar algunas constantes cinéticas de la SDH de las
membranas de células vegetativas y de las membranas de células esporu-
lantes, en su forma particulada (unida a las membranas) y en su forma
soluble, en presencia y en ausencia de cianuro.

Los experimentos realizados para la optimización del método de so-
lubilización de la enzima se discutirán en el punto número 4.

Tabla V. Efecto del perclorato, del Brij 36-T y del cianuro en la resolución de la SDH:DCPIP oxidorreductasa de membranas espolvulantes. (Edad $t_{3.5}$)

Preincubación	% de Actividad Relativa de SDH		
	Precipitado ^b	Sobrenadante ^a	Estimulación de SDH particulada ^c
Control	100	0	-
Perclorato de sodio 850 mM	93	0.74	0
Brij 36-T 10 mM	8.2	79.1	60
Cianuro 1.0 mM	100	0	100

^a Se resuspendieron las membranas en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, y se les adicionó perclorato, Brij 36-T o cianuro, a las concentraciones indicadas; la mezcla se incubó durante 15 minutos a 30 grados C, se enfrió en hielo y se centrifugó a 140,000 x g durante dos horas.

^b La actividad en el precipitado se determinó en presencia de cianuro 0.1 mM. La actividad de los sobrenadantes no se modificó significativamente por la adición de cianuro.

^c La tercera columna compara el efecto activador (relativo a KCN 1.0 mM) de los dos perturbadores de membranas cuando se adicionan en el ensayo con membranas no tratadas.

3. CARACTERIZACION DE LA SDH DE LAS FASES VEGETATIVA Y ESPORULANTE.

a) pH óptimo. Las figuras (12 y 13) representan las gráficas de velocidad (medida como cambio de absorbancia a 600 nm) vs pH de la SDH de las fases vegetativa y esporulante, respectivamente, en su forma soluble y particulada. Se observa que el pH óptimo de la enzima es 8.0 para todos los casos. La adición de cianuro no modifica significativamente la actividad de la enzima vegetativa, mientras que esta adición es necesaria para demostrar la actividad de la enzima de la fase esporulante. Cabe hacer notar que la enzima soluble de la fase esporulante es independiente de la adición de cianuro, es decir, no requiere del cianuro para desenmascarar la actividad.

b) Km para succinato.- En la Tabla VI se muestran las constantes de afinidad para succinato (K_m) para las cuatro preparaciones de la enzima, que se obtuvieron por el método de Lineaweaver-Burk. No se observan diferencias significativas en estas constantes; el cianuro tampoco modifica estas constantes a ninguna concentración de succinato.

c) Km para PMS.- En la determinación de esta constante para la enzima particulada de las membranas esporulantes, la adición de cianuro modifica considerablemente el valor de la K_m (Tabla VI). En ausencia de cianuro la K_m aparente es de 4.5mM, mientras que en presencia de cianuro la K_m aparente es 0.13 mM, lo que significa que el cianuro disminuye grandemente la afinidad de la enzima esporulante por el PMS; por otro

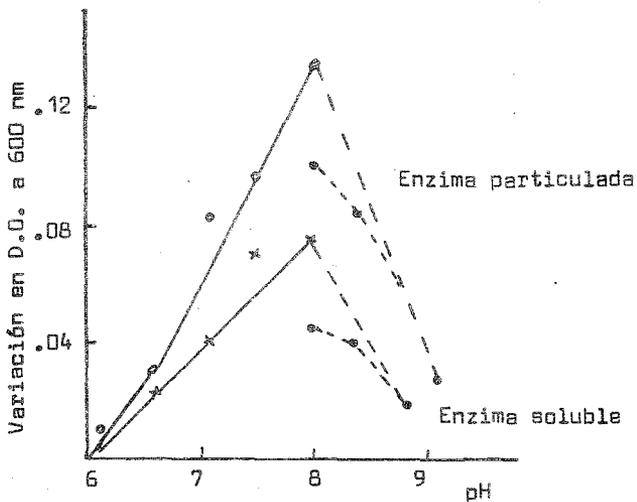


Fig. 12. Efecto del pH sobre la SDH de la fase vegetativa. (Línea continua = buffer de fosfatos, línea punteada = buffer de Tris-HCl).

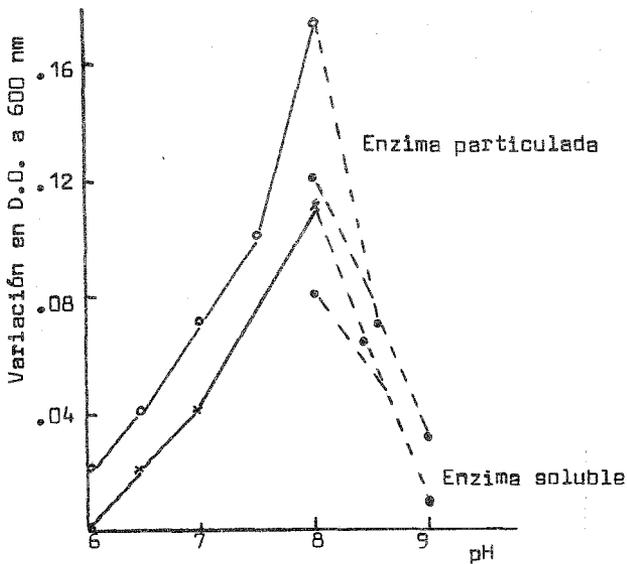


Fig. 13. Efecto del pH sobre la SDH de la fase esporulante.

lado, la Km de la enzima esporulante soluble es de 0.22 mM y no se modifica significativamente por la adición de cianuro.

4. SOLUBILIZACION DE LA SUCCINATO DESHIDROGENASA DE MEMBRANAS DE B. CEREUS.

En el presente trabajo requerimos extraer a la SDH de las membranas para determinar sus constantes cinéticas y su comportamiento frente al cianuro; por otra parte, necesitamos solubilizarla para llevar a cabo su purificación y más adelante realizar experimentos de reconstitución.

En la literatura se reportan diferentes métodos para la extracción de la SDH de corazón de ternera; con este fin se han utilizado - diferentes agentes: butanol, acetona, cianuro a elevadas concentraciones, agentes caotrópicos y detergentes iónicos, entre otros, los cuales reportan buenos resultados. En nuestro laboratorio utilizamos perclorato de sodio, que es un agente caotrópico; la metodología utilizada se detalla en el capítulo de materiales y métodos. El porcentaje de solubilización con este agente resultó ser poco satisfactorio para nuestra enzima. Los resultados se muestran en la Tabla VII. Se observa que la recuperación de la actividad en el sobrenadante es casi nula (0.66 y 0.62%); además, la actividad de la enzima en el sedimento obtenido después de la centrifugación disminuye notablemente, recuperándose únicamente el 40% de la actividad inicial, lo que sugiere que nuestra enzima es inactivada en presencia de perclorato.

Tabla VII. Efecto del perclorato de sodio sobre las membranas de B. cereus.

Preparación	Prot. total en mg	Act. esp. ^a total	% de act. recuperada
Membranas sin extraer	112.5	1445.6	100
Sobrenad. 0.35 M	0.375	9.5	0.66
Sobrenad. 0.85 M	0.875	8.9	0.62
Sedimento	104.8	578.3	40

^aAct. esp. en micromoles de DCPIP reducidos por mg prot. por hr.

Tabla VIII. Efecto de los detergentes sobre las membranas de B. cereus.

Preparación	Prot. total en mg	Act. esp. ^a total	% de act. recuperada
Membranas sin extraer	6.0	128.6	100
Sobrenad. DOC 0.75 %	0.75	22.8	13.3
Sedimento DOC 0.75 %	5.06	30.8	73.3
Sobrenad. Brij 36-I	2.75	77.1	60.0
Sedimento Brij 36-T	4.20	58.5	45.5

En vista de que los resultados con el perclorato fueron deplorables, intentamos la solubilización con desoxicolato de sodio. La Tabla VIII muestra los resultados, los cuales tampoco fueron satisfactorios, pues los porcentajes de solubilización nunca fueron superiores al 15%. La actividad de la enzima en el sedimento disminuyó también, probablemente debido a inactivación durante la manipulación.

Finalmente utilizamos un detergente no iónico, el Brij 36-T, con el cual obtuvimos buenos resultados (Tabla VIII). La enzima se disocia de las membranas en un 60%. Una vez obtenidos estos resultados decidimos optimizar el método de solubilización con este detergente. Para ello determinamos que la concentración óptima de Brij 36-T en la solubilización es de 0.3 % para 7.5 mg de proteína. Concentraciones más elevadas de detergente promueve la formación de micelas que pueden sedimentar nuevamente, regresando la enzima a las membranas. La sonicación de la mezcla de membranas con el detergente durante 15 minutos favorece grandemente la disociación; la incubación de la mezcla a 4°C durante 60 minutos también aumenta el porcentaje de solubilización. La enzima soluble se separa por centrifugación a 140,000 x g durante dos horas. En el sobrenadante se encuentra el mayor porcentaje de actividad de SDH (60 a 80 %). La enzima soluble puede almacenarse en nitrógeno líquido durante varias semanas sin pérdida apreciable de actividad.

CAPITULO VI

DISCUSION.

Hemos caracterizado dos formas fisiológicas de la succinato deshidrogenasa de B. cereus: (1) la forma vegetativa que muestra alta afinidad por el PMS y que no es afectada por la adición de cianuro, y (2) la forma esporulante, con baja afinidad por el PMS y que con la adición de cianuro revierte a la forma de alta afinidad.

Con estos resultados hemos planteado una hipótesis que podría explicar el comportamiento de nuestra enzima durante el proceso de esporulación y el posible mecanismo de acción del cianuro. Durante la fase vegetativa la enzima presenta alta afinidad por el PMS y, a medida que avanza la esporulación, la enzima sufre una transición alostérica que la hace poco afín por el PMS. Este cambio de actividad puede ser revertido por el cianuro. Aparentemente el cianuro induce un cambio conformacional en la SDH de la fase esporulante, aumentando la afinidad por el PMS al mismo nivel de la SDH de la fase vegetativa. Esto es, el cianuro revierte la transición alostérica (vegetativa-esporulante) regresando a la enzima a la conformación vegetativa que tiene alta afinidad por el PMS. Por otra parte, hemos encontrado que la enzima esporulante soluble tiene la conformación de alta afinidad por el PMS y que el cianuro no modifica esta afinidad; este hecho podría ser explicado si pensamos que durante la solubilización probablemente el detergente revierte automáticamente la conformación de la enzima a la de alta afinidad.

Desde el punto de vista de la regulación fisiológica de la SDH durante la esporulación, en este momento solo podemos especular acerca de su significado. Pensamos que la transición alostérica podría estar relacionada con el acoplamiento de la enzima al resto de la cadena respiratoria con lo cual la enzima estaría mejor adaptada para ceder los electrones a la coenzima Q. Este juicio se apoya en el hecho de que durante la fase vegetativa el funcionamiento del ciclo de Krebs y el de la cadena respiratoria no son esenciales para el crecimiento. En cambio, durante la esporulación las vías finales del metabolismo aerobio incrementan su actividad y son indispensables para completar la esporulación.

Estamos muy interesados en averiguar si la transición alostérica es debida a un cambio en el ambiente hidrofóbico de la membrana, o si la enzima en sí misma es la que sufre modificación. Por tanto, planeamos purificar la enzima de las fases vegetativa y esporulante para reconstituir la enzima solubilizada de membranas esporulantes en membranas vegetativas, cuya SDH haya sido previamente inactivada por tratamiento alcalino, y demostrar si por este mecanismo la enzima esporulante revierte a la forma vegetativa; también planeamos reconstituir la enzima vegetativa soluble en membranas esporulantes inactivadas para observar su comportamiento en estas condiciones.

En cuanto al sitio de acción del cianuro, aún no lo hemos dilucidado, pero es bien conocido que el cianuro tiene alta afinidad por los centros de Fe-S de la SDH. La SDH presenta cuatro centros de Fe-S, dos de ellos involucrados en la reacción del PMS y dos dudosos, pero es po

sible que el cianuro se una a ellos para activar a la enzima. En nue
tros próximos experimentos planeamos utilizar cianuro radiactivo para
demostrar si en efecto éste se une a nuestra enzima.

BIBLIOGRAFIA.

Libros:

J. Mandelstem and K. Mc. Quillen: Biochemistry of Bacterial Growth. Blackwell Scientific Publications. 2a. Edición.
New York, 1973.

G. W. Gould and A. Hurst: The Bacterial Spore. Academic Press.
New York, 1969.

R. E. Collier: Spores. Halvorson, H. O. eds.
Washington D.C. 1957.

A. L. Lehninger: Biochemistry. Worth Publishers. 2a. Edición.
New York, 1975.

R. W. McGilvery: Bioquímica. Interamericana.
México, D.F. 1972.

Articulos:

- 1a.- Singer, T. P., Kearney, E. B., y Kenney, W. C. Adv. in Enzimology, 37: 189-272 (1973)
- 2a.- Tsou, C. L. Biochem J., 49: 512-520 (1951)
- 3a.- Giuditta, A. y Singer, T.P. J. Biol. Chem., 234: 666-671 (1959)
- 4a.- Wilson, D. F. y King, T. E. Biochem. Biophys. Acta., 92: 173-175 (1964).
- 5a.- Wu, J. T. y King, T. E. Fed. Proc., 26: 2654-2665 (1967).
- 6a.- Lang, D. R., Felix, J. y Lundgren, D.G. J. Bacteriol., 110: 968-977 (1972)
- 7a.- Andreoli, A. J., Suehiro, S., Sakiyama, D., Takemoto, Vivanco, J., Lara, J. G. y Klute, M. J. Bacteriol., 115: 1159-1166 (1973)
- 8a.- Lowry, O. H., Rosenbrough, N.J., Farr, A. L. y Randall, R. J. J. Biol. Chem., 193: 265 (1951).