



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PAPEL DE LA CITOCROMO *c* OXIDASA *caa*<sub>3</sub> Y LA QUINOL OXIDASA *aa*<sub>3</sub> EN LA FORMACIÓN DE  
SÚPERCOMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA DE *Bacillus subtilis***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. GERARDO IGNACIO PICÓN GARRIDO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOS MADRID**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**COMITÉ TUTOR: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN**

**INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR**

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO. SEPTIEMBRE, 2016**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PAPEL DE LA CITOCROMO *c* OXIDASA *caa*<sub>3</sub> Y LA QUINOL OXIDASA *aa*<sub>3</sub> EN LA FORMACIÓN DE  
SÚPERCOMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA DE *Bacillus subtilis***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. GERARDO IGNACIO PICÓN GARRIDO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOS MADRID**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**COMITÉ TUTOR: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO. SEPTIEMBRE, 2016**



Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de junio de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **PICON GARRIDO GERARDO IGNACIO**, con número de cuenta 303095811, con la tesis titulada "**PAPEL DE LA CITOCROMO c OXIDASA caa<sub>3</sub> Y LA QUINOL OXIDASA aa<sub>3</sub> EN LA FORMACIÓN DE SÚPERCOMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA DE *Bacillus subtilis*.**", realizada bajo la dirección de la **DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOS MADRID**:

Presidente: DRA. MARTHA OFELIA SALCEDO ÁLVAREZ  
Vocal: DR. ROBERTO VELASCO GARCÍA  
Secretario: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN  
Suplente: DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL  
Suplente: DRA. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 22 de agosto de 2016.

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

### **Agradecimientos**

- Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- A los apoyos recibidos por la beca CONACyT con número de becario 294528, apoyo al Proyecto de Investigación DGAPA-PAPIIT IN215915 y la beca COMECyT con número de registro 16BTIM0038.
- A los miembros del Comité Tutor: Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid (Tutora Principal), al Dr. Diego González Halphen y al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, por su apoyo y dirección en este trabajo.

### **A título personal**

Al Dr. Claes von Wachenfeldt por la donación de la mutante de *B. subtilis* LUW46.

Al Dr. Carlos Gómez Lojero y al M. en C. Jesús Barrera Rojas por su asesoría en la realización de los geles de 1D.

A la Srita. Lilia Judith Espinosa Sánchez, al Dr. Ernesto Armando Rodríguez Reyes y la Srita. Lilia Jiménez Solís, por su gran disposición y apoyo.

A la Srita. Georgina García Morán (Gina) por resirme y ayudarme siempre con todas mis dudas. También a todo el posgrado de la FES Iztacala.

A mi tutora, la Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid por todo el apoyo académico y a nivel personal que me brindó antes y durante la realización de este trabajo.

A la M. en C. Tecilli Cabellos Avelar por echarme la mano siempre que se podía.

A mis compañeros del laboratorio, por hacer mas llevadero un día de trabajo pesado con algún chiste o una buena platica: Tecilli, Ana😊, Ale, Dulce, Enrique, Laura, Led, Obed, Irlanda, Edisa, gracias.

A mis hermanos por darme lata.

## **Dedicatorias**

A mis padres que aunque este ha sido un periodo muy difícil, en cuestiones económicas, me han seguido apoyando como han podido y porque nunca se han rendido.

Aunque con palabras no puedo darles gracias por tanto cariño, gracias por todo lo que me han dado y enseñado.

## Indice General

Indice General .....	1
Indice de Figuras .....	5
Indice de Tablas.....	8
Lista de abreviaturas .....	10
Resumen.....	12
Abstract .....	13
Introducción .....	14
❖ Bacillus subtilis .....	14
❖ NADH deshidrogenasa .....	15
❖ Succinato deshidrogenasa.....	15
❖ Complejo b <sub>6</sub> c de B. subtilis.....	15
❖ Citocromo c oxidasa <i>caa</i> <sub>3</sub> .....	16
❖ Quinol oxidasa <i>aa</i> <sub>3</sub> .....	16
❖ Quinol oxidasa tipo <i>bd</i> .....	17
❖ Quinol oxidasa tipo “ <i>bb</i> ” .....	17
❖ Los súper complejos en la cadena respiratoria bacteriana.....	17
❖ Organismos en dónde se han encontrado súper complejos.....	18
❖ Los súper complejos en <i>B. subtilis</i> .....	18
Hipótesis.....	20
Objetivo .....	20
Materiales y métodos .....	21
❖ Curva de crecimiento de <i>B. subtilis</i> 168 y la mutante LUW46: .....	21
❖ Crecimiento de <i>B. subtilis</i> 168 y la mutante LUW46:.....	21
❖ Cosecha de cultivos de <i>B. subtilis</i> 168 y la mutante LUW46:.....	21
❖ Obtención de membranas de <i>B. subtilis</i> 168 y la mutante LUW46: .....	21
❖ Solubilización de las membranas de <i>B. subtilis</i> 168 y la mutante LUW46 con dodecil maltósido:.....	22
❖ Cromatografía de intercambio iónico del sobrenadante del solubilizado de las membranas de <i>B. subtilis</i> 168 y la mutante LUW46: .....	22
❖ Obtención de espectros de absorción de las muestras: .....	23
❖ Cuantificación de proteínas por el método de Lowry modificado para proteína de membranas: .....	23
❖ Determinación de la concentración de proteína por el método de UV:.....	24
❖ Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión): .....	24

❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS):	24
❖ Tinciones de actividad catalítica de los complejos NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, complejo tipo <i>bc</i> , citocromo oxidasa y ATPasa:	25
❖ Tinción con azul de Coomassie:	25
❖ Análisis de geles de 1D	26
❖ Tinción de geles con tetrametilbenzidina (TMBZ):	26
Organización de resultados	27
Resultados	28
❖ Curva de crecimiento de <i>B. subtilis</i> 168 y la mutante <i>B. subtilis</i> LUW46	28
❖ Crecimiento y obtención de membranas de <i>B. subtilis</i> 168 y la mutante LUW46	28
❖ Identificación y cuantificación de citocromos por medio de espectros de absorción	29
❖ Membranas de <i>B. subtilis</i> 168	29
❖ Membranas de <i>B. subtilis</i> LUW46	31
❖ Comparación de los espectros de diferenciales de absorción de las membranas de <i>B. subtilis</i> 168 y la mutante LUW46	33
❖ Análisis de las fracciones obtenidas de las cromatografías de intercambio iónico del solubilizado de las membranas con dodecil maltósido	35
❖ Perfil cromatográfico de la 168	35
❖ Perfil cromatográfico de la LUW46	36
❖ Fracción del citocromo <i>c</i> 168	37
❖ Fracción del complejo <i>b<sub>6</sub>c</i> 168	38
❖ Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión)	38
❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE)	40
❖ Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ	43
❖ Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie	43
❖ Fracción del complejo <i>b<sub>6</sub>c</i> LUW46	43
❖ Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión)	44
❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE)	46
❖ Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ	48
❖ Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie	48
❖ Comparación de las fracciones del complejo <i>b<sub>6</sub>c</i> 168 y LUW46	48
❖ Espectros diferenciales	48
❖ Geles hrCNE de 1D	48

❖ Geles SDS-PAGE de 2D .....	49
❖ Fracción del complejo $b_6c+caa_3$ 168 .....	49
❖ Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión) .....	50
❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE):.....	52
❖ Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ .....	54
❖ Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie .....	54
❖ Fracción del complejo $b_6c+caa_3$ LUW46.....	55
❖ Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión) .....	55
❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE):.....	58
❖ Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ .....	60
❖ Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie .....	60
❖ Comparación de las fracciones $b_6c+caa_3$ 168 y LUW46 .....	61
❖ Espectros diferenciales.....	61
❖ Geles hrCNE de 1D .....	61
❖ Geles SDS-PAGE de 2D .....	61
❖ Fracción de los complejos $SDH+aa_3$ 168 .....	61
❖ Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión) .....	62
❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE):.....	64
❖ Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ .....	66
❖ Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie .....	66
❖ Fracción del complejo $SDH+caa_3$ LUW46 .....	67
❖ Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión) .....	67
❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE):.....	70
❖ Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ .....	72
❖ Análisis del gel de 2D con Coomassie.....	72
❖ Comparación de las fracciones $SDH+aa_3$ de la 168 y $SDH+caa_3$ de la LUW46 .....	72
❖ Espectros diferenciales.....	72
❖ Geles hrCNE de 1D .....	73
❖ Geles SDS-PAGE de 2D .....	73
Discusión .....	75
Los súper complejos en procariontes .....	75

Características excepcionales en <i>B. subtilis</i> de su cadena respiratoria: .....	75
Diferencias entre <i>B. subtilis</i> 168 (silvestre) y la mutante LUW46 .....	76
Fracciones observadas en la cromatografía de intercambio iónico: .....	77
El súper complejo $b_6c+caa_3$ : .....	78
Los complejos respiratorios que no se asociaron: .....	82
Conclusiones: .....	84
Apéndice 1.....	85
Apéndice 2.....	86
❖ Sobrenadante 168.....	86
❖ Sobrenadante LUW46 .....	88
❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE):.....	91
❖ Sobrenadante 168.....	91
❖ Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ .....	93
❖ Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie .....	93
❖ Sobrenadante LUW46 .....	95
❖ Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ .....	97
❖ Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie .....	97
❖ Comparación de los Sobrenadantes 168 y LUW46 .....	97
❖ Geles hrCNE de 1D .....	97
❖ Geles SDS-PAGE de 2D .....	98
Referencias:.....	100

## Indice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Cadena respiratoria de <i>B. subtilis</i> . .....	<b>14</b>
<b>Figura 2.</b> Comparación del complejo $b_6c$ de <i>B. subtilis</i> con el complejo $bc_1$ y el complejo $b_6f$ o fotosintético. ....	<b>16</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema de la cadena respiratoria de <i>B. subtilis</i> y de la mutante LUW46 ( $\Delta qoxABCD::Kan$ ), carente de la quinol oxidasa $aa_3$ .....	<b>19</b>
<b>Figura 4.</b> Curva de crecimiento representativa de la 168 y la LUW46.....	<b>28</b>
<b>Figura 5.</b> A. Espectro diferencial representativo de las tres preparaciones de membranas de la 168.....	<b>29</b>
<b>Figura 6.</b> Promedio de las concentraciones relativas (nmol/mg de proteína) de los citocromos $c$ , $b$ y $a$ , de las tres preparaciones independientes de membranas de la 168.....	<b>30</b>
<b>Figura 7.</b> Cocientes de los citocromos $c:b$ , $a:c$ y $b:a$ . ....	<b>30</b>
<b>Figura 8.</b> A. Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de las tres preparaciones de membranas de la LUW46.....	<b>31</b>
<b>Figura 9.</b> Promedio de las concentraciones relativas (nmol/mg de proteína) de los citocromos $c$ , $b$ y $a$ , de las tres preparaciones independientes de membranas de la LUW46.....	<b>32</b>
<b>Figura 10.</b> Cocientes de los citocromos $c:b$ , $a:c$ y $b:a$ .....	<b>32</b>
<b>Figura 11.</b> A. Comparación de los espectros diferenciales de absorción (reducidos con ditionita menos oxidado), de la 168 y la LUW46.....	<b>33</b>
<b>Figura 12.</b> A. Comparación de los promedios de las concentraciones relativas (nmol/mg de proteína) de los citocromos $c$ , $b$ y $a$ de las membranas de la 168 y la LUW46.....	<b>34</b>
<b>Figura 13.</b> A. Comparación de los cocientes de los citocromos $c:b$ , $a:c$ y $b:a$ de los promedios de tres preparaciones independientes de membranas de la 168 y de la LUW46. ....	<b>34</b>
<b>Figura 14.</b> Perfil representativo de las cromatografías de membranas de la 168.....	<b>35</b>
<b>Figura 15.</b> Perfil representativo de las cromatografías de membranas de la LUW46 .....	<b>36</b>
<b>Figura 16.</b> Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción del citocromo $c$ 168.....	<b>37</b>
<b>Figura 17.</b> Geles hrCNE de 1D de las fracciones de las solubilizaciones y las cromatografías de las membranas de la 168 y la LUW46.....	<b>38</b>
<b>Figura 18.</b> Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción del Complejo $b_6c$ 168.....	<b>38</b>
<b>Figura 19.</b> Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida, del complejo $b_6c$ , teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de <i>B. subtilis</i> (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo $b_6c$ , C = citocromo $c$ oxidasa $caa_3$ y A = ATP sintasa). ....	<b>39</b>
<b>Figura 20.</b> Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D de la fracción del complejo $b_6c$ 168.....	<b>41</b>
<b>Figura 21.</b> Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción del Complejo $b_6c$ LUW46.....	<b>43</b>
<b>Figura 22.</b> Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4 al 13.0 % de acrilamida, del complejo $b_6c$ LUW46, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de <i>B. subtilis</i> (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo $b_6c$ , C = citocromo $c$ oxidasa $caa_3$ y A = ATP sintasa) .....	<b>44</b>
<b>Figura 23.</b> Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D de la fracción del complejo $b_6c$ LUW46.....	<b>46</b>

<b>Figura 24.</b> Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción $b_6c+caa_3$ 168.....	<b>49</b>
<b>Figura 25.</b> Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida, de la fracción $b_6c+caa_3$ 168, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de <i>B. subtilis</i> (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo $b_6c$ , C = citocromo <i>c</i> oxidasa $caa_3$ y A = ATPsintasa). .....	<b>50</b>
<b>Figura 26.</b> Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D de la fracción $b_6c+caa_3$ 168 .....	<b>52</b>
<b>Figura 27.</b> Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción $b_6c+caa_3$ LUW46 .....	<b>55</b>
<b>Figura 28.</b> Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida, de la fracción $b_6c+caa_3$ LUW46, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de <i>B. subtilis</i> (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo $b_6c$ , C = citocromo <i>c</i> oxidasa $caa_3$ y A = ATPsintasa) .....	<b>55</b>
<b>Figura 29.</b> Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D de la fracción $b_6c+caa_3$ LUW46.....	<b>58</b>
<b>Figura 30.</b> Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción $SDH+aa_3$ 168.....	<b>61</b>
<b>Figura 31.</b> Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida, de la fracción $SDH+aa_3$ 168, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de <i>B. subtilis</i> (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo $b_6c$ , C = citocromo <i>c</i> oxidasa $caa_3$ y A = ATPsintasa) .....	<b>62</b>
<b>Figura 32.</b> Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D de la fracción $SDH+aa_3$ 168 .....	<b>64</b>
<b>Figura 33.</b> Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción $SDH+caa_3$ LUW46 .....	<b>67</b>
<b>Figura 34.</b> Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida, de la fracción $SDH+caa_3$ LUW46, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de <i>B. subtilis</i> (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo $b_6c$ , C = citocromo <i>c</i> oxidasa $caa_3$ y A = ATPsintasa) .....	<b>67</b>
<b>Figura 35.</b> Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D de la fracción $SDH+caa_3$ LUW46.....	<b>70</b>
<b>Figura 36.</b> A y B. Posible conformación de menor masa molecular del súper complejo $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ . C. Acomodo del súper complejo $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ en forma de cuerda con el que puede alcanzar tamaños de hasta 1900 kDa. D. Modelo de la asociación entra la SDH, el complejo $b_6c$ y los citocromos $C_{550}$ y $C_{551}$ .....	<b>80</b>
<b>Figura 37.</b> Un mega complejo respiratorio representando la unión de dos unidades básicas compuestas por 2 complejos $b_6c$ y 4 citocromos <i>c</i> oxidasas $caa_3$ , conectadas por la $caa_3$ , formando una “cuerda respiratoria”. Imagen tomada de Sousa y colaboradores, 2013.....	<b>81</b>
<b>Figura 38.</b> Modelo esquemático de la organización de los complejos respiratorios en estructuras como “cuerdas”. Imagen tomada de Bultema y colaboradores, 2009. ....	<b>81</b>
<b>Figura 39.</b> Modelo de una asociación lineal de súper complejos de la cadena respiratoria en mitocondrias de mamífero nombrada como “cuerda respiratoria”. Imagen tomada de Wittig y colaboradores, 2006. ....	<b>82</b>
<b>Figura 40.</b> Identificación de los complejos respiratorios en un homogeneizado de corazón de pollo por tinciones de actividad histoquímica de los complejos: NDH, SDH, $bc_1$ , $caa_3$ y ATPasa, y azul de Coomassie .....	<b>85</b>
<b>Figura 41.</b> Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida, del Sobrenadante 168, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de <i>B.</i>	

<i>subtilis</i> (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo <i>b<sub>6</sub>c</i> , C = citocromo <i>c</i> oxidasa <i>caa<sub>3</sub></i> y A = ATPsintasa) .....	<b>86</b>
<b>Figura 42.</b> Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acilamida, del Sobrenadante LUW46, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de <i>B. subtilis</i> (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo <i>b<sub>6</sub>c</i> , C = citocromo <i>c</i> oxidasa <i>caa<sub>3</sub></i> y A = ATPsintasa) .....	<b>88</b>
<b>Figura 43.</b> Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D del Sobrenadante 168 .....	<b>91</b>
<b>Figura 44.</b> Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D del Sobrenadante LUW46 .....	<b>95</b>

## Indice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Coeficientes de extinción molar de los citocromos $c+c_1$ , $b$ y $a$ de la cadena respiratoria para <i>B. subtilis</i> .....	<b>23</b>
<b>Tabla 2.</b> Composición del gel concentrador al 4.0 % de acrilamida y del gel separador con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida .....	<b>24</b>
<b>Tabla 3.</b> Tiempos de duplicación en minutos, calculados en la fase exponencial de las curvas de crecimiento de la 168 y la LUW46.....	<b>28</b>
<b>Tabla 4.</b> g de bacterias por L de medio, y mg de proteína de membrana por g de bacteria, obtenidos de las 3 preparaciones de la 168 y la LUW46 .....	<b>28</b>
<b>Tabla 5.</b> Datos de los citocromos $c$ , $b$ y $a$ obtenidos de los espectros diferenciales (reducidos con Ditionita-Oxidado) de las membranas de la 168.....	<b>29</b>
<b>Tabla 6.</b> Promedios de las concentraciones relativas de citocromos (nmol/mg de proteína), desviaciones estándar (DS) y sus coeficientes de variación (CV) de los citocromos $c$ , $b$ y $a$ de las tres preparaciones de membranas de <i>B. subtilis</i> 168. ....	<b>30</b>
<b>Tabla 7.</b> Promedios de los cocientes de los citocromos $c:b$ , $a:c$ y $b:a$ , desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) de las tres preparaciones de membranas.....	<b>31</b>
<b>Tabla 8.</b> Datos de los citocromos $c$ , $b$ y $a$ obtenidos de los espectros diferenciales (reducidos con Ditionita-Oxidado) de tres preparaciones independientes de membranas de la LUW46 .....	<b>31</b>
<b>Tabla 9.</b> Promedios de las concentraciones relativas de citocromos (nmol/mg de proteína), desviaciones estándar (DS) y sus coeficientes de variación (CV) de los citocromos $c$ , $b$ y $a$ de las tres preparaciones de membranas. ....	<b>32</b>
<b>Tabla 10.</b> Promedios de los cocientes de los citocromos $c:b$ , $a:c$ y $b:a$ , desviación estándar (DS) y su coeficiente de variación (CV) de las tres preparaciones de membranas. ....	<b>33</b>
<b>Tabla 11.</b> Masas moleculares de los monómeros de los complejos respiratorios de <i>B. subtilis</i> , calculados a partir del genoma. ....	<b>38</b>
<b>Tabla 12.</b> Áreas relativas de actividad en pixeles, masas moleculares e identidades de las bandas de la fracción del complejo $b_6c$ 168, teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH, $b_6c$ , $caa_3$ y ATPasa .....	<b>40</b>
<b>Tabla 13.</b> Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (A) y con Coomassie (B) de la fracción del complejo $b_6c$ 168.....	<b>42</b>
<b>Tabla 14.</b> Áreas relativas de actividad en pixeles, masas moleculares e identidades de las bandas de la fracción del complejo $b_6c$ LUW46, teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH, $b_6c$ , $caa_3$ y ATPasa .....	<b>44</b>
<b>Tabla 15.</b> Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (A) y con Coomassie (B), de la fracción del complejo $b_6c$ LUW46.....	<b>47</b>
<b>Tabla 16.</b> Áreas relativas de actividad en pixeles, masas moleculares e identidades de las bandas de la fracción $b_6c+caa_3$ 168 teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH, $b_6c$ , $caa_3$ y ATPasa .....	<b>51</b>
<b>Tabla 17.</b> Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (A) y Coomassie (B), de la fracción $b_6c+caa_3$ 168 .....	<b>53</b>

<b>Tabla 18.</b> Áreas relativas de actividad en píxeles, masas moleculares e identidades de las bandas de la fracción $b_6c+caa_3$ LUW46, teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH, $b_6c$ , $caa_3$ y ATPasa .....	<b>56</b>
<b>Tabla 19.</b> Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (A) y Coomassie (B), de la fracción $b_6c+caa_3$ LUW46.....	<b>59</b>
<b>Tabla 20.</b> Áreas relativas de actividad en píxeles, masas moleculares e identidades de las bandas de la fracción SDH+ $aa_3$ 168, teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH, $b_6c$ , $caa_3$ y ATPasa .....	<b>62</b>
<b>Tabla 21.</b> Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (A) y con Coomassie (B), de la fracción SDH+ $aa_3$ 168 ...	<b>65</b>
<b>Tabla 22.</b> Áreas relativas de actividad en píxeles, masas moleculares e identidades de las bandas de la fracción SDH+ $caa_3$ LUW46, teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH, $b_6c$ , $caa_3$ y ATPasa .....	<b>68</b>
<b>Tabla 23.</b> Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (B) y Coomassie (B) de la fracción SDH+ $caa_3$ LUW46 ....	<b>71</b>
<b>Tabla 24.</b> Tabla resumen de la comparación de los citocromos, los complejos y los súper complejos encontrados en <i>B. subtilis</i> 168 y la LUW46.....	<b>74</b>
<b>Tabla 25.</b> Diferentes estequiometrías des los súper complejos $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ , SDH+ $b_6c+C_{550}+C_{551}$ y los complejos $b_6c$ y $caa_3$ obtenidos en el análisis de los geles de 1D .....	<b>80</b>
<b>Tabla 26.</b> Áreas relativas de actividad en píxeles, masas moleculares e identidades de las bandas del Sobrenadante 168, teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH, $b_6c$ , $caa_3$ y ATPasa .....	<b>87</b>
<b>Tabla 27.</b> Áreas relativas de actividad en píxeles, masas moleculares e identidades de las bandas del Sobrenadante LUW46, teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH, $b_6c$ , $caa_3$ y ATPasa .....	<b>89</b>
<b>Tabla 28.</b> Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (A) y Coomassie (B), del Sobrenadante 168 .....	<b>92</b>
<b>Tabla 29.</b> Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (A) y Coomassie (B), del Sobrenadante LUW46.....	<b>96</b>

## Lista de abreviaturas

168 – *Bacillus subtilis* 168

1D – Primera dimensión

2D – Segunda dimensión

AEBSF – hidrocloreuro de 4-(2-Aminoetil) benzenosulfonil fluoruro

BSA - Albúmina sérica de bovino, (siglas en inglés)

*b<sub>6c</sub>* – complejo *b<sub>6c</sub>*

BNE – Electroforesis en geles azules nativos, (siglas en inglés)

*caa<sub>3</sub>* – Citocromo *c* oxidasa *caa<sub>3</sub>*

CV – Coeficiente de variación

*C<sub>550</sub>* – Citocromo *C<sub>550</sub>*

*C<sub>551</sub>* – Citocromo *C<sub>551</sub>*

DDM – Dodecil maltósido

D. O. – Densidad óptica

DOC - Desoxicolato

DTT – Ditiotreitól

FAD – Flavín adenín dinucleótido

Fe-S – Hierro azufre

g - Gravedades

hrCNE – Electroforesis clara nativa de alta resolución, (siglas en inglés)

Kan – Kanamicina

LUW46 – *Bacillus subtilis* LUW46, (mutante)

MK-7 – Menaquinona 7

MSR – Medio súper rico

NAR – Nitrato reductasa

NDH – NADH deshidrogenasa

NDH-2 – NADH deshidrogenasa tipo II

PAGE – Electroforesis en geles de poliacrilamida, (siglas en inglés)

MMM – Marcadores de masa molecular

rpm – Revoluciones por minuto

SDH – Succinato deshidrogenasa

SDS – Dodecil sulfato de sodio, (siglas en inglés)

Sobrenadante 168 – Sobrenadante de la solubilización de las membranas de *Bacillus subtilis* 168 con 1.5 mg de DDM/mg de proteína, en presencia de 100 mM de NaCl.

Sobrenadante LUW46 – Sobrenadante de la solubilización de las membranas de *Bacillus subtilis* LUW46 con 1.5 mg de DDM/mg de proteína, en presencia de 100 mM de NaCl.

TMBZ – Tetrametilbenzidina

## Resumen

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva que posee una cadena respiratoria ramificada, en la cual se han reportado que sus complejos respiratorios se asocian en súper complejos. García y colaboradores, (2012), identificaron a los súper complejos  $b_6C+caa_3+C_{550}$  y SDH+nitrato reductasa (NAR), además de  $b_6C+caa_3+ATP$  sintasa, SDH+ $aa_3$ , y  $aa_3+ATP$  sintasa. Sousa y colaboradores (2013), confirmaron a los súper complejos  $b_6C+caa_3$  y SDH+NAR, y propusieron un mega complejo de  $b_6C+caa_3$  que contribuye a una alta eficiencia del transporte de electrones. En nuestros trabajos preliminares, se confirmaron los súper complejos  $b_6C+caa_3$  y SDH+NAR, y se obtuvieron evidencias de los súper complejos SDH+ $aa_3$  y  $b_6C+caa_3+ATP$  sintasa.

En este trabajo reportamos la comparación entre la mutante *B. subtilis* LUW46 ( $\Delta qoxABCD::Kan$ ) que carece de la quinol oxidasa  $aa_3$ , y *B. subtilis* 168 (cepa silvestre), después de solubilizar las membranas con DDM y analizarlas mediante cromatografías de intercambio iónico para exponer a los súper complejos  $b_6C+caa_3$  y SDH+NAR, y para buscar mas evidencias de los súper complejos SDH+ $aa_3$  y  $b_6C+caa_3+ATP$  sintasa.

La falta de la quinol oxidasa  $aa_3$  no afectó el crecimiento de *B. subtilis* LUW46 crecida en un medio súper rico con 3.0 % de succinato. En las membranas aisladas, encontramos que la concentración total de los citocromos tipo *a* de la mutante se redujo un 75 % comparada con la concentración de este citocromo en la cepa silvestre. Por lo tanto, dedujimos que el 25 % restante correspondió al citocromo *a* de la citocromo *c* oxidasa  $caa_3$ .

El súper complejo  $b_6C+caa_3+C_{550}+C_{551}$  fue aislado de la 168 y la LUW46 en una de las fracciones de las cromatografías. El súper complejo se analizó mediante geles hrCNE de 1D y posteriormente por geles SDS-PAGE de 2D. Encontramos que este súper complejo es muy estable y difícil de disociar. El súper complejo tuvo una masa molecular de entre 400 a 1900 kDa en la 168 y en la LUW46. Los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  se mantuvieron fuertemente asociados al súper complejo, por tanto parecen ser importantes en la estabilidad del súper complejo. Sin embargo una fracción de la cromatografía donde se obtuvo solamente a un citocromo tipo *c*, fue obtenida solamente en la 168. La falta de la  $aa_3$  en la mutante causó que el súper complejo  $b_6C+caa_3+C_{550}+C_{551}$ , se mantuviera más fuertemente asociado en la LUW46 en comparación con la 168 como se pudo observar en el análisis de los geles de 1D. También identificamos bandas de mayor masa molecular, en las tinciones de actividad de los geles de 1D, correspondientes al súper complejo  $b_6C+caa_3+C_{550}+C_{551}$  en comparación con la 168. Por tanto proponemos al menos ocho diferentes estequiometrías para el súper complejo. Con estos resultados concluimos que en ausencia de la  $aa_3$ , el  $b_6C$  y la  $caa_3$  son suficientes para soportar el crecimiento, la generación de la fuerza proton motriz, y que las quinol oxidasas tipo *bd* y *bb'* pudieran tomar parte en la cadena transportadora de electrones. En nuestras manos, la SDH no se asoció con la quinol oxidasa  $aa_3$ , pero si la encontramos relacionada con el complejo  $b_6C$  y los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$ . La NDH tipo 2 no formar asociaciones con algún otro de los complejos respiratorios.

## Abstract

*Bacillus subtilis* is a Gram positive bacterium with a branched respiratory chain, in which their respiratory complexes associate in supercomplexes. García et al, (2012), identified the supercomplex  $b_6c+caa_3+c_{550}$ , SDH+nitrate reductase (NAR),  $b_6c+caa_3$ +ATP synthase, SDH+ $aa_3$  and  $aa_3$ +ATP synthase supercomplexes. Sousa et al (2013), confirmed the  $b_6c+caa_3$  and SDH+NAR supercomplex and proposed a  $b_6c+caa_3$  megacomplex that distributes electrons with high efficiency. In our preliminary works, using ion exchange chromatography, supercomplexes  $b_6c+caa_3$  and SDH+NAR were confirmed, and more evidence of the supercomplexes SDH+ $aa_3$  and  $b_6c+caa_3$ +ATP synthase were obtained.

Here we report the comparison between the *B. subtilis* mutant LUW46 ( $\Delta qoxABCD::Kan$ ) that lacks of the quinol oxidase  $aa_3$ , and the wild type *B. subtilis* 168, after membrane solubilization with DDM, and analyzed by ion exchange chromatography to expose the supercomplexes  $b_6c+caa_3+c_{550}$  and SDH+NAR, and to confirm the existence of the supercomplexes SDH+ $aa_3$  and  $b_6c+caa_3$ +ATP synthase.

The lack of quinol oxidase  $aa_3$  did not affect to the *B. subtilis* LUW46 growth in super rich medium with 3.0 % succinate. In the membranes, we found that the total concentration of type *a* cytochromes was reduced 75% in the mutant when compared to the WT 168. Therefore we deduced that the 25% remaining corresponds to the cytochrome *a* of the oxidase  $caa_3$ .

The supercomplex  $b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$  was isolated in one of the fractions from the ion exchange chromatography. The supercomplex was analyzed by in-gel activity staining in hrCNE 1D gels and subsequently by SDS-PAGE 2D gels. We found that this supercomplex is very stable and difficult to dissociate. The supercomplex had a molecular mass between 400-1900 kDa in the 168 and the LUW46. The  $c_{550}$  and  $c_{551}$  cytochromes were strongly associated in the supercomplex so they seem to play an essential part in the stability of the supercomplex. Moreover, a fraction containing only *c*-type cytochromes was obtained in 168, while it was missing in the mutant. Lack of  $aa_3$  a tightly associated  $b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$  supercomplex in LUW46 compared to the 168. We found higher molecular mass bands of the  $b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$  supercomplex in the mutant, compared to 168 by in-gel catalytic staining in hrCNE. We propose at least eight different stoichiometries for this supercomplex. In the absence of the  $aa_3$  the  $caa_3$  and  $b_6c$  act as a supercomplex and are enough to support growth, generating the proton gradient. Even quinol oxidases  $bd'$  and  $bb'$  could take part in the electron transport chain. The SDH complex was not found associated with the quinol oxidase  $aa_3$  as had been assumed with our previous results, but is related to the complex  $b_6c$  and the  $c_{550}$  and  $c_{551}$  cytochromes. The NDH-2 does not form associations with any of the other respiratory complexes.

## Introducción

### ❖ *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva en forma de bastón, formadora de esporas (Winstedt y Wachenfeldt, 2000), no patógena, y comúnmente encontrada en el suelo. Esta bacteria ha sido intensamente estudiada por su importancia comercial en la producción de enzimas (tales como amilasas y proteasas) y químicos utilizados en la industria (Kunst y cols., 1997).

*B. subtilis* puede crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, por fermentación o utilizando nitrato como aceptor terminal de electrones (Sousa y cols., 2013). Esta flexibilidad le permite hacer frente a las variaciones de oxígeno y de nutrientes en su ambiente (Winstedt y cols., 1998). Su cadena respiratoria ramificada se encuentra en la membrana citoplasmática (Wachenfeldt y Hederstendt. 2002). Las diferentes deshidrogenasas membranales como la NADH deshidrogenasa (NDH-2), la succinato deshidrogenasa (SDH) y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, reducen menaquinona (MK-7) a menaquinol, concomitantemente a la oxidación de sus sustratos (Wachenfeldt y Hederstendt. 2002). El paso final en la vía, la reducción del dióxigeno a dos moléculas de agua con cuatro electrones (Winstedt y Wachenfeldt, 2000), es catalizado por la transferencia de electrones desde el menaquinol al oxígeno por el complejo  $b_6c$  ( $b_6c$ ), el citocromo  $c_{550}$  ( $c_{550}$ ) y la citocromo  $c$  oxidasa  $caa_3$  ( $caa_3$ ). Por otro lado, el menaquinol también puede ser oxidado directamente por diferentes oxidasas terminales: quinol oxidasa  $aa_3$  ( $aa_3$ ), quinol oxidasa  $bd$  ( $bd$ ) o quinol oxidasa  $bb'$  ( $bb'$ ) (Figura 1). Una característica peculiar de esta bacteria es la ausencia de un citocromo tipo  $c$  soluble. De hecho *B. subtilis* contiene dos distintos citocromos tipo  $c$  anclados a la membrana citoplasmática: el  $c_{550}$  con un máximo de absorción en 550 nm de longitud de onda y que tiene un segmento transmembranal en el N terminal, y un citocromo  $c_{551}$  con un máximo de absorción en 551 nm de longitud de onda, anclado a la membrana por un diacil glicerol (Sousa y cols., 2013).

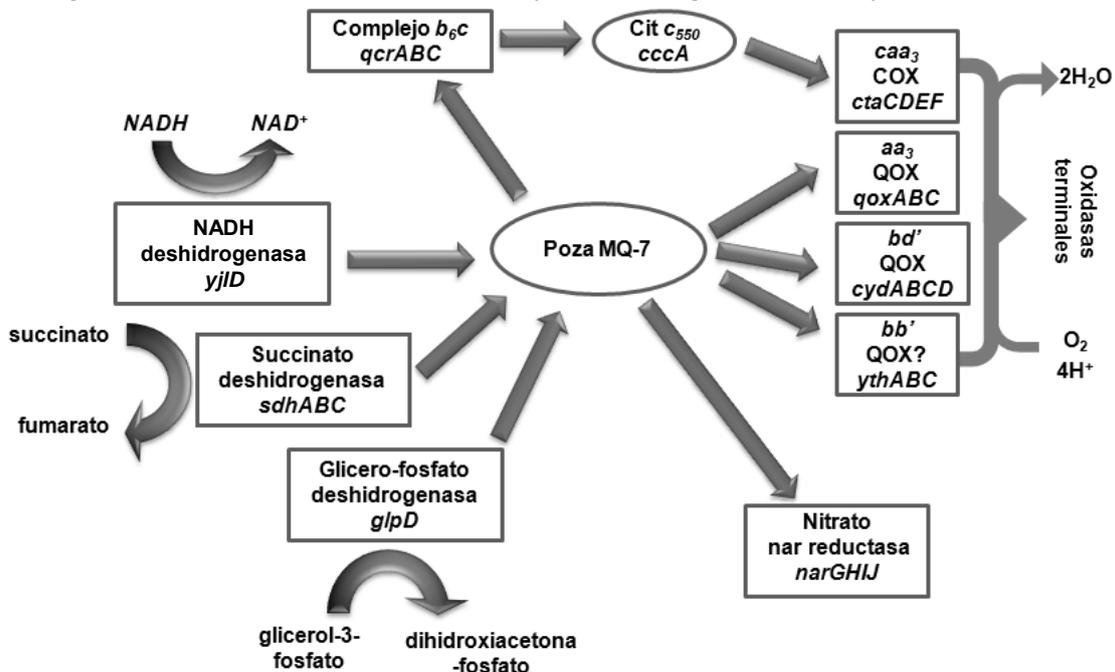


Figura 1. Cadena respiratoria de *B. subtilis*. Al menos tres diferentes deshidrogenasas como la NDH-2, la SDH y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa reducen a la poza de MK-7. Los electrones pueden ser transferidos al oxígeno a

través del complejo *b<sub>6c</sub>*, el *c<sub>550</sub>* y la *caa<sub>3</sub>*, o por las quinol oxidasas: *aa<sub>3</sub>*, *bd* o *bb'*. *B. subtilis* también puede crecer por fermentación o utilizar nitrato como aceptor final de electrones. Imagen tomada y modificada de Azarkina (1999).

#### ❖ NADH deshidrogenasa

En un estudio realizado del genoma de *B. subtilis* se encontraron tres NADH deshidrogenasas (NDH) putativas (YjID, YumB, y YutJ), las cuales tienen una identidad significativa con la NDH-2 de *E. coli* (27.56 %, 21.94 % y 23.0 % respectivamente, los alineamientos se realizaron en el servidor [www.uniprot.org/](http://www.uniprot.org/)). YjID (también llamada Ndh) se reportó como una proteína asociada a la membrana y cuya expresión se reprime anaeróticamente (Gyan y cols., 2006, Marino y cols., 2000). Gyan y colaboradores en el 2006 presentaron evidencias de que la YjID es la NDH principal de *B. subtilis*. Esto coincide con el hallazgo de que la NDH de *B. subtilis* no es sensible a rotenona o piericidina, que inhiben selectivamente a las NDH que bombean protones (Schnorpfel y cols., 2001).

La NDH-2 de *B. subtilis* es una proteína parcialmente embebida en la membrana con una masa molecular aparente de 64 kDa (Bergsma y cols., 1981) y de 41.79 kDa calculados a partir del genoma (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>). Contiene flavín adenín dinucleótido (FAD), no contiene centros hierro-azufre (Fe-S) (Gyan y cols., 2006) y no bombea protones (Nakamura y cols., 2011).

#### ❖ Succinato deshidrogenasa

La SDH es una enzima unida a la membrana que cataliza la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y dona equivalentes reductores a la MK-7. Consta de tres subunidades, cuyas masas moleculares, obtenidas desde el genoma (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) son: SdhA de 65 kDa, que tiene el sitio activo dicarboxil y un FAD<sup>++</sup> unido covalentemente; SdhB de 24 kDa, que posee los grupos hierro azufre [2Fe-2S], [3Fe-3S] y [4Fe-4S], y SdhC de 23 kDa, que es un citocromo *b<sub>558</sub>* con dos hemos *b* que tienen picos  $\alpha$  a 558 y 553 nm de longitud de onda. Las tres subunidades dan una masa molecular total de 112 kDa para el monómero del complejo. Hägerhäll y colaboradores en 1992, reportaron una masa molecular de 120 kDa obtenida a partir del complejo purificado. El dímero SdhAB es extrínseco de la membrana y está anclado al lado citoplásmico de la membrana por SdhC (Hägerhäll y cols. 1992), donde se lleva a cabo la reducción de la menaquinona (Wachenfeld y Hederstedt, 2002). La SDH también puede funcionar como fumarato deshidrogenasa operando en dirección reversa, recibiendo electrones de la NDH-2 y contribuyendo a la generación de un gradiente de protones (Schnorpfel y cols., 2001).

#### ❖ Complejo *b<sub>6c</sub>* de *B. subtilis*

El complejo tipo *b<sub>6c</sub>* de *B. subtilis* tiene una composición inusual, sus subunidades parecen constituir una tercera clase de complejos *bc*, ya que comparte características tanto respiratorias como fotosintéticas a pesar de no ser una bacteria fotosintética (Yu y Le Brun, 1998). Está formado por QcrA que es una proteína hierro-azufre tipo Rieske de 18.7 kDa (Yu y cols., 1995). QcrB de 25.4 kDa que es un citocromo *b* con un máximo de absorción a 564 nm de longitud de onda, en el que se encuentra un hemo *b<sub>L</sub>* cerca del lado positivo de la membrana (donde el menaquinol es oxidado) y un hemo *b<sub>H</sub>* cerca del lado negativo de la membrana (donde la menaquinona es reducida). Además tiene un hemo denominado *x*, covalentemente unido por un enlace tioéter (Sonenshein y cols., 2002). La subunidad QcrC de 28 kDa posee una región N

terminal de alrededor de 170 residuos de aminoácidos que es similar a la subunidad IV de 17 kDa del complejo  $b_{6f}$ . La región C terminal contiene un citocromo  $c$  que absorbe a 554 nm de longitud de onda, identificado por la secuencia consenso CXXCH encontrada en todos los citocromos tipo  $c$  (Yu y cols., 1995), y que es similar al citocromo  $c_{550}$  de *B. subtilis* (Yu y Le Brun, 1998) (Figura 2). La suma de sus subunidades dan una masa molecular total de 72.1 kDa para el monómero.

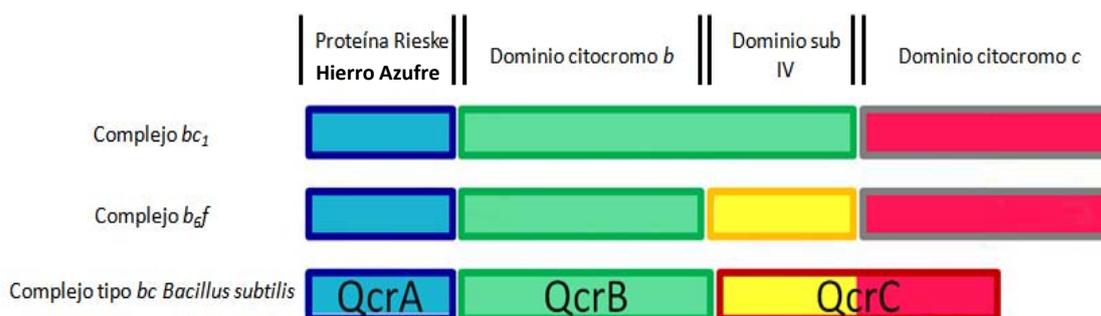


Figura 2. Comparación del complejo  $b_{6c}$  de *B. subtilis* con el complejo  $bc_1$  y el complejo  $b_{6f}$  o fotosintético.

#### ❖ Citocromo $c$ oxidasa $caa_3$

La  $caa_3$  reduce al oxígeno que formará parte de la molécula de agua, utilizando electrones donados por el citocromo  $c$  (Saraste y cols., 1991). Los picos  $\alpha$  de máxima absorción de sus citocromos están localizados a 551 y a 605 nm de longitud de onda, correspondientes a un citocromo  $c$  y a un citocromo  $a$  respectivamente (Santana y cols., 1992). Esta oxidasa es miembro de la súper familia de las hemo cobre oxididasas terminales (Winstedt y cols., 1998). Está codificada por los genes *ctaCDEF* (Azarkina y cols., 1999). En el operon *ctaABCDEFG*, *ctaA* y *B* codifican para dos enzimas requeridas para la biosíntesis del hemo A (Liu y Taber, 1998). CtaC es la subunidad II de 40 kDa la cual tiene un centro  $Cu_A$ , y un citocromo tipo  $c$  (Saraste y cols., 1991 y Sonenshein y cols., 2002). CtaD de 69 kDa, es la subunidad I y contiene los hemos  $a$ ,  $a_3$  y el centro  $Cu_B$  como grupos prostéticos. En esta subunidad se bombean protones fuera de la célula y se reduce el oxígeno. La subunidad I y II forman un núcleo funcional, los electrones del citocromo  $c$  de la subunidad II son transferidos vía el hemo  $a$  y el centro  $Cu_A$  al centro binuclear formado por el hemo  $a_3$  y el centro  $Cu_B$ , y de aquí al oxígeno. CtaE de 23 kDa es la subunidad III, CtaF de 13 kDa es la subunidad IV (Sonenshein y cols., 2002) y CtaG es una proteína hidrofóbica de 34 kDa, las tres de función desconocida. La suma de las subunidades dan una masa molecular de 145 kDa para el monómero del complejo, calculado a partir del genoma (Sonenshein y cols., 2002, <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>).

#### ❖ Quinol oxidasa $aa_3$

La quinol oxidasa  $aa_3$  pertenece a la súper familia de las hemo-cobre oxididasas bombeadoras de protones (Azarkina y cols., 1999). Su pico  $\alpha$  de máxima de absorción está localizado a 600 nm correspondiente a un citocromo  $a$  (Santana y cols., 1992). Cuatro genes estructurales, *qoxABCD*, son requeridos para su expresión (Winstedt y Wachenfeldt, 2000). QoxB de 74 kDa es la subunidad I, denominada citocromo  $a_3$ , con un hemo  $a$ , un hemo  $a_3$  y el centro  $Cu_B$  donde ocurre el bombeo de protones y la reducción de oxígeno. QoxA de 36 kDa es la subunidad II a la que se une el menaquinol, y a diferencia de la  $caa_3$  no contiene un centro  $Cu_A$  (Santana y cols., 1992 y Sonenshein y cols., 2002). QoxC, de 23 kDa es la subunidad III y puede estar involucrada en el ensamblaje del complejo. QoxD de 14 kDa es la subunidad IV y contribuye al bombeo de

protones (Sonenshein y cols., 2002). La masa molecular total del monómero de la enzima es de 147 kDa calculado a partir del genoma (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>).

#### ❖ **Quinol oxidasa tipo *bd***

La quinol oxidasa *bd* pertenece a un grupo no relacionado con las hemo-cobre oxidasas. No bombea protones ni contiene cobre. Su expresión requiere de los genes *cydA* y *cydB*: *CydA* de 52 kDa, es la subunidad I con un hemo *b* de bajo espín, aquí se une el menaquinol; *CydB* de 38 kDa, es la subunidad II en la cual se encuentra un hemo *b<sub>595</sub>* de alto espín y un hemo *d*, en esta subunidad se reduce el oxígeno (Sonenshein y cols., 2002). La masa molecular total para el monómero del complejo es de 90 kDa calculado a partir del genoma (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>). Dos genes adicionales, *cydC* y *cydD* posiblemente codifican para un transportador de tipo ABC unido a la membrana (Winstedt y Wachenfeldt, 2000). Se ha propuesto que la función de este transportador es la exportación de los hemos hacia el periplasma y que estas proteínas transportadoras *CydCD* están involucradas en algunos pasos post secretorios en la vía de ensamblaje de proteínas secretadas y dominios extracelulares de enzimas unidas a la membrana, posiblemente por alguna función de *CydCD* en mantener el balance redox periplásmico (Jünemann, 1997).

Los picos  $\alpha$  de los citocromos de esta oxidasa están presentes a 626 nm de longitud de onda para un hemo *d* que parece estar directamente involucrado en la unión del oxígeno, a 558 nm para un hemo *b* de bajo espín, y a 595 nm que es un hemo *b* de alto espín (Winstedt y cols., 1998 y Jünemann, 1997).

Las quinol oxidasas *bd* presentan una baja sensibilidad al cianuro. Esta baja sensibilidad, con cantidades mM necesarias para su inhibición, es también observada con azida de sodio (Jünemann, 1997).

En algunas bacterias se piensa que las quinol oxidasas *bd* sirven como oxidasas de alta afinidad para soportar procesos que requieren energía bajo microaerobiosis y para proteger a los procesos anaeróbicos de ser inhibidos por el oxígeno (Jünemann, 1997).

#### ❖ **Quinol oxidasa tipo “*bb*”**

Los genes *ythA* y *ythB* están relacionados con las proteínas *CbdA* y *CbdB* de *Bacillus stearothermophilus*, los cuales constituyen una oxidasa terminal de tipo *bd*. *ythA* y *ythB* podrían codificar para una oxidasa terminal relacionada a las oxidas tipo *bd* (Winstedt y Wachenfeldt, 2000). La masa molecular de las subunidades *YthA* y *YthB* es de 48.49 y 38.68 kDa respectivamente, dando una masa molecular de 87.17 kDa calculada a partir del genoma, para el monómero de la enzima (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>).

#### ❖ **Los súper complejos en la cadena respiratoria bacteriana**

La organización de los complejos de la cadena respiratoria en estructuras supramoleculares llamadas súper complejos ha sido reportada en eucariontes (Genova y Lenaz., 2014), y procariontes (Magalon y cols., 2012). Se ha propuesto que estos súper complejos mejoran la transferencia de electrones por la canalización de sustratos, por ejemplo de quinona/quinol entre el complejo I y III en mitocondrias, lo que ya ha sido probado experimentalmente (Nübel y cols., 2009). Los súper complejos también ayudan a regular la producción de especies reactivas

de oxígeno (Díaz y cols., 2012), a estabilizar los complejos individuales (Acín-Pérez y cols., 2004), a influir en la ultraestructura de la membrana interna mitocondrial (Davies y cols., 2011) y a ampliar la capacidad de inserción de proteínas de la membrana interna mitocondrial (Sousa y cols., 2013).

#### ❖ Organismos en dónde se han encontrado súper complejos

Los súper complejos han sido reportados en mitocondrias de plantas (súper complejo I+III<sub>2</sub> en *Zea mays*, Peters y cols., 2008), hongos (súper complejos III<sub>2</sub>+IV y III<sub>2</sub>+IV<sub>2</sub> en *Saccharomyces cerevisiae*, Heinemeyer y cols., 2007) y animales (súper complejos I+III<sub>2</sub> y I+III<sub>2</sub>+IV en bovino, Schäfer y cols., 2006). También se han obtenido dímeros de la ATPsintasa en mitocondrias de hongos (*S. cerevisiae*, Arnold y cols., 1998), plantas (papa, Bultema y cols., 2009) y mamíferos (bovino y rata, Strauss y cols., 2008), sin embargo, hasta la fecha, no hay evidencia de una asociación de esta enzima con otro complejo de la cadena respiratoria (Sousa y cols., 2013). Se han detectado también, súper complejos en eubacterias Gram positivas, Gram negativas y en arqueas (Niebisch y Bott. 2003). A continuación se mencionan algunos ejemplos:

En *Bacillus* PS3 el complejo *bc*<sub>1</sub> y la citocromo oxidasa *aa*<sub>3</sub> pueden ser obtenidos como un súper complejo si las membranas de la bacteria son solubilizadas con colato, desoxicolato más LiCl y después estas membranas tratadas son solubilizadas con MEGA 9 y cargadas a una cromatografía DEAE-Toyopearl. El súper complejo muestra actividad de quinol oxidasa y una masa molecular de 380 kDa que es razonable si se habla de una asociación 1:1 entre el complejo *bc*<sub>1</sub> y la citocromo oxidasa *aa*<sub>3</sub>, sugiriendo que el súper complejo no es un artificio experimental producto de una orientación al azar, sino una unidad funcional *in vivo* asociada en la orientación correcta (Sone y cols., 1987).

En la bacteria Gram positiva *Corynebacterium glutamicum*, se encontró que el segundo hemo del citocromo *c*<sub>1</sub> del complejo *bc*<sub>1</sub> se hace cargo de la función de un citocromo *c* independiente de la transferencia de electrones a la citocromo oxidasa *aa*<sub>3</sub>. Tal función podría requerir un contacto íntimo entre el citocromo *c*<sub>1</sub> y el Cu<sub>A</sub>, sitio de entrada de los electrones en la subunidad II de la citocromo oxidasa *aa*<sub>3</sub>, indicando que el complejo *bc*<sub>1</sub> y la citocromo oxidasa *aa*<sub>3</sub> están formando un súper complejo (Niebisch y Bott. 2003).

En la bacteria Gram negativa *Paracoccus denitrificans*, el complejo I es muy frágil al ser purificado después de solubilizarlo con detergentes, mientras que el súper complejo I+III+IV es muy estable. Esto se pudo observar al utilizar mutantes carentes del complejo III o IV, en donde la actividad del complejo I fue más baja ya que se redujo su estabilidad, en comparación con el complejo de *P. denitrificans* silvestre. Además, los intentos por aislar al complejo de las mutantes carentes del complejo III o IV llevaron a la pérdida total de la actividad del complejo I (Nübel y cols., 2009).

#### ❖ Los súper complejos en *B. subtilis*

En el 2012 García y colaboradores reportaron un súper complejo formado por la *caa*<sub>3</sub>, el complejo *b<sub>6</sub>c* y el *C<sub>550</sub>* (*b<sub>6</sub>c+caa<sub>3</sub>+C<sub>550</sub>*) y succinato deshidrogenasa más nitrato reductasa (SDH+NAR) y evidencias de la presencia de los súper complejos *b<sub>6</sub>c+caa<sub>3</sub>+ATP*sintasa, SDH+*aa*<sub>3</sub> y *aa*<sub>3</sub>+ATP)sintasa, utilizando análisis de gels de poliacrilamida claros nativos de alta resolución

(hrCNE) y geles azules nativos (BNE) analizados posteriormente por geles de SDS de segunda dimensión (2D-SDS-PAGE) y por espectrometría de masas.

Sousa y colaboradores en el 2013 confirmaron los súper complejos  $b_6c+caa_3$  y SDH+NAR propuestos por García y colaboradores en el 2012. Además propusieron evidencia para una nueva oligomerización del súper complejo  $b_6c+caa_3$  mediante actividades en geles azules nativos (BNE) y lo corroboraron por análisis de espectrometría de masas.

En resultados preliminares en nuestro laboratorio, realizando cromatografías de intercambio iónico y análisis de segunda dimensión de geles hrCNE, se confirmó la presencia de los súper complejos  $b_6c+caa_3$  y SDH+NAR en *B. subtilis*. Con estos resultados se concluyó que las asociaciones de los súper complejos son estables aun después de la solubilización de las membranas con el detergente dodecil maltósido (DDM), en presencia de 100 mM de NaCl y después de una cromatografía. También se obtuvieron evidencias de otros súper complejos: SDH+ $aa_3$  y  $b_6c+caa_3$ +ATP sintasa.

Para este trabajo se utilizó a la mutante de *B. subtilis* LUW46 ( $\Delta qoxABCD::Kan$ ) carente de la quinol oxidasa  $aa_3$  (Winstedt y Wachenfeldt, 2000) donada amablemente por el Dr. Claes von Wachendfeldt de la Universidad de Lund, Suecia. Debido a que el complejo  $b_6c$ , la citocromo *c* oxidasa  $caa_3$  y la quinol oxidasa  $aa_3$  son los únicos tres complejos que translocan protones a través de la membrana citoplásmica, supusimos que al eliminar a la quinol oxidasa  $aa_3$ , sabríamos si existe el súper complejo  $b_6c+caa_3$ +ATP sintasa al forzar su formación, si hay una asociación SDH+ $aa_3$  y si la SDH es afectada por la falta de la  $aa_3$ , así como la posible presencia de otros súper complejos (Figura 3).

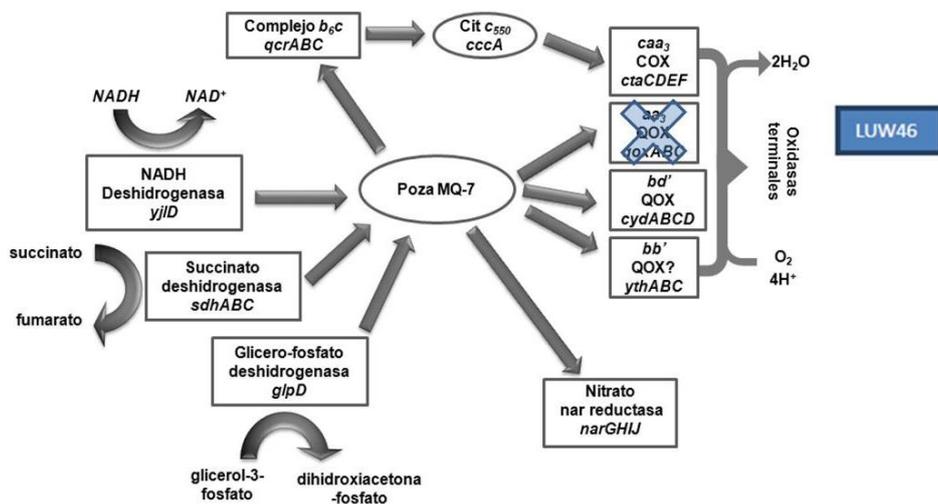


Figura 3. Esquema de la cadena respiratoria de *B. subtilis* y de la mutante LUW46 ( $\Delta qoxABCD::Kan$ ), carente de la quinol oxidasa  $aa_3$ .

**Hipótesis**

Si se utiliza a *B. subtilis* LUW46 ( $\Delta qoxABCD::Kan$ ) carente de la quinol oxidasa  $aa_3$ , entonces se forzará la formación del súper complejo  $b_6c+caa_3+c_{550}$ , y además se podrían exponer otros súper complejos aún no reportados.

**Objetivo**

Analizar el efecto de la ausencia de la quinol oxidasa  $aa_3$  en *B. subtilis* LUW46 ( $\Delta qoxABCD::Kan$ ), tanto en la actividad, estabilidad como el ensamblaje de los súper complejos  $b_6c+caa_3$  y SDH+NAR, y confirmar o descartar la existencia de los súper complejos  $b_6c+caa_3$ +ATPsintasa y SDH+ $aa_3$ , así como otros súper complejos que se hagan más evidentes por la carencia de la quinol oxidasa  $aa_3$ .

## **Materiales y métodos**

### **❖ Curva de crecimiento de *B. subtilis* 168 y la mutante LUW46:**

*B. subtilis* 168 (168) se adquirió del *Bacillus* Genetic Stock Center (Ohio State University) y la mutante *B. subtilis* LUW46  $\Delta qoxABCD::kan$  (LUW46) (carente de quinol oxidasa tipo  $aa_3$ ) fue donada amablemente por el Dr. Claes von Wachendfeldt de la Universidad de Lund, Suecia.

Se realizaron curvas de crecimiento durante 23.5 h para las cepas 168 y la LUW46, en medio súper rico (MSR) (2.5 % Bacto-triptona, 2.0 % extracto de levadura, 0.3 %  $K_2HPO_4$ ), adicionado con 3.0 % de succinato y 300  $\mu$ L/L de solución de micronutrientes (2.2 %  $MnCl_2$ , 0.5 %  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5 %  $H_3BO_3$ , 0.016 %  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.025 %  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.46 %  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  y 0.5 % (v/v)  $H_2SO_4$  concentrado) (Henning y cols., 1995). Las cepas se sembraron en cajas frescas de medio LB agar y se crecieron durante toda la noche a 37°C. En el caso de la mutante LUW46, la caja contenía kanamicina a una concentración final de 5  $\mu$ g/mL.

Se prepararon inóculos de 3.5 mL de medio MSR suplementado con 3.0 % de succinato, 300  $\mu$ L/L de micronutrientes y 2.5  $\mu$ g/mL de kanamicina (en el caso de la LUW46). Se incubaron toda la noche a 37°C y en agitación a 200 rpm. A los inóculos se les midió la densidad óptica a 600 nm (D. O. 600) y se realizaron los cálculos para saber cuántos mL del inóculo se tenían que vaciar en matraces de 500 mL con 100 mL de medio MSR ya preparado y con 2.5  $\mu$ g/mL de kanamicina (en el caso de la LUW46). La curva de crecimiento se comenzó con una D. O. 600 de 0.01-0.05 de absorbancia. A los medios inoculados se les midió la D. O. 600 (absorbancia inicial) y se incubaron a 37°C y en agitación a 200 rpm.

Cada hora se tomaron 600  $\mu$ L de los matraces y se midieron a una D. O. 600 durante 8 h y una última medición a 23.5 h. Los datos obtenidos se graficaron como tiempo contra D. O. 600 en escala de logaritmo base 10. Estas curvas de crecimiento se realizaron dos veces.

### **❖ Crecimiento de *B. subtilis* 168 y la mutante LUW46:**

Para el crecimiento de la 168 y la LUW46 se repitió el procedimiento mencionado arriba creciendo a las bacterias durante 23 h, a 37°C agitando a 200 rpm (Henning y cols., 1995).

### **❖ Cosecha de cultivos de *B. subtilis* 168 y la mutante LUW46:**

A las 23 h se midió la D. O. 600 del medio tomando 100  $\mu$ L del cultivo y 900  $\mu$ L de MSR, en la cual el valor óptimo fue de 4.0 de absorbancia o superior. Después el medio se centrifugó 20 min a 4324 x g (5000 rpm) en una centrífuga Sorvall Evolution RC con el rotor GSA. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en un amortiguador de 100 mM de fosfatos de potasio pH 6.6 y se centrifugó en el rotor SS-34 de la centrífuga Sorvall Evolution RC por 10 min a 8243 x g. El sobrenadante nuevamente se decantó, la pastilla se pesó y se guardó a -20°C (Konings y Freese, 1972).

### **❖ Obtención de membranas de *B. subtilis* 168 y la mutante LUW46:**

Las membranas se obtuvieron por el método de lisis celular usando 30 g de peso húmedo de bacterias almacenadas a -20°C, por vez (este proceso se realizó varias veces). Las células se resuspendieron en amortiguador de 50 mM fosfatos de potasio pH 8.0 y se añadió 0.1-0.15 mM de hidrocloreuro de 4-(2-Aminoetil) benzenosulfonil fluoruro (AEBSF), como inhibidor de proteasas. Después se les agregó 0.3 g/L de lisozima, 10 mg/L de DNasa y 10 mg/L de RNasa y

se incubaron durante 15 min a 37°C con una velocidad de agitación de 140 rpm. Posteriormente se les puso 10 mM final de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) y 10 mL de una mezcla de inhibidores de proteasas (250 de mM ε-aminocapróico y 2 mM de EDTA), por cada 500 mL, incubando a 37°C por 2 min y se les agregó MgSO<sub>4</sub> a una concentración final de 20 mM. Lo siguiente se realizó a 4°C. Las membranas se centrifugaron a 4340 x g (5000 rpm) por 20 min con el rotor GSA. Los sobrenadantes se juntaron y se volvieron a centrifugar por 42 min a 21006 x g (11000 rpm) en el rotor GSA. El sobrenadante se decantó y las membranas se resuspendieron con 100 mM amortiguador de fosfatos de potasio pH 6.6; después se centrifugaron durante 15 min a 28980 x g (15000 rpm) en el rotor SS-34. La pastilla se resuspendió en el volumen mínimo con el mismo amortiguador de fosfatos de potasio, se midió el volumen y se agregó glicerol en una proporción 1:1, 1 mM final de AEBSF y mezcla de inhibidores de proteasas. Las membranas se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C (Hagerhall y cols., 1992 y Hederstedt, 1986).

❖ **Solubilización de las membranas de *B. subtilis* 168 y la mutante LUW46 con dodecil maltósido:**

Se tomaron 500 mg de proteína de membrana de células de *B. subtilis* 168 y la LUW46 y se diluyeron en amortiguador B<sub>3</sub> (50 mM Tris HCl pH 8.0 a 4°C y 1 mM MgSO<sub>4</sub>), para lavarlas y eliminar el glicerol. Se centrifugaron a 21767 x g (13000 rpm) en el rotor SS-34 a 4°C durante 30 min. Pasado este tiempo se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en el volumen mínimo necesario con amortiguador B<sub>3</sub>. Terminado este paso la pastilla se diluyó a una concentración de 10 mg/mL de proteína con B<sub>3</sub>, y se le agregó la mezcla de inhibidores de proteasas (250 mM ε-aminocapróico, 2 mM EDTA), 10 mL por cada 500 mL, 1 mM final de AEBSF, coctel de inhibidores de Sigma en pastilla (No. de catálogo S8830-20TAB) 10X (2.5mL por cada 50 mL), 1.5mg DDM/mg proteína (a partir de una solución madre de 200µg/µl) y 100 mM final de NaCl (Ljungdahl y cols., 1987). Lo anterior se colocó en agitación durante 1 h a 4° C. La muestra se centrifugó a 204120 x g (45000 rpm) por 1 h a 4° C con el rotor Sorvall T875 en una centrifuga Sorvall Ultra Pro 80. El sobrenadante se colectó sin la capa blanca de lípidos, se midió el volumen final y se agregaron los inhibidores de proteasas (1 mM final de AEBSF y la mezcla de inhibidores). El sobrenadante se dializó toda la noche a 4°C utilizando una membrana para diálisis Spectra/por de 3,500 de abertura de peso molecular con 100 volúmenes de B<sub>3</sub> con respecto al sobrenadante, manteniendo una agitación constante. Al día siguiente, el dializado se sacó de la membrana y se cargó a la columna.

❖ **Cromatografía de intercambio iónico del sobrenadante del solubilizado de las membranas de *B. subtilis* 168 y la mutante LUW46:**

La resina DEAE-Biogel A de BioRad se empaquetó en la columna y se montó en una bomba ECONO GRADIENT PUMP de BioRad y se equilibró con 10 volúmenes de amortiguador B<sub>3</sub> más 0.1mg/mL de DDM. Una vez cargada la muestra, se realizó un lavado de 10 mL con amortiguador B<sub>3</sub> seguido de: 2 volúmenes de columna de B<sub>3</sub> más 10 mM de NaCl, 3 volúmenes de columna de B<sub>3</sub> más 40 mM de NaCl, 2 volúmenes de columna de B<sub>3</sub> más 100 mM de NaCl, un gradiente de 6 volúmenes de columna de B<sub>3</sub> más 100 a 500 mM de NaCl, y un 1 volumen de columna más con B<sub>3</sub> más 500 mM de NaCl. Al finalizar se hizo un perfil de absorción de la cromatografía midiendo los tubos a 280 y 415nm, para proteína y citocromo, respectivamente que fueron colectados con un BioLogic Biofrac Fraction Collector de Bio Rad. La velocidad del colector fue de 0.6 mL/min en el día y a 0.3 mL/min para poder ajustarse durante la noche. El volumen de los tubos fue de

8 mL. A las fracciones con mayor absorbancia se les hicieron espectros diferenciales reducidos con ditionita menos oxidados. Las fracciones similares se juntaron y se les agregaron inhibidores de proteasas (0.1 mM de AEBSF y mezcla de inhibidores) y 0.1 mg/mL de DDM. Las fracciones se concentraron al volumen mínimo posible en centricones Millipore Amicon Ultra de 10 MWCO de celulosa regenerada, de 15 mL, centrifugándolos a 1715 x g (3500 rpm) en una centrifuga HERMLE Z 383 K a 4°C con el rotor 220.78 V02. A las muestras ya concentradas se les añadió glicerol en una proporción 1:1, 1 mM de AEBSF y la mezcla de inhibidores de proteasas (Kutoh y Sone, 1988).

❖ **Obtención de espectros de absorción de las muestras:**

Los espectros de absorción se obtuvieron para las membranas, el solubilizado, el sobrenadante, y las fracciones de las cromatografías, utilizando un espectrofotómetro DW2 Aminco con modernización de OLIS. Se corrió una línea base de 400 a 650 nm con amortiguador 100 mM de fosfatos de potasio pH 6.6 para las membranas y amortiguador B<sub>3</sub> para las fracciones obtenidas de la solubilización y de las cromatografías. Se corrió un primer espectro para las muestras oxidadas y después se utilizó ditionita para el espectro reducido. Posteriormente se obtuvo el espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado). Para identificar y cuantificar a los citocromos se usaron las longitudes de onda y coeficientes de extinción molar de la Tabla 1. Después se obtuvo la concentración relativa de nmoles/mg de proteína de los citocromos *c*, *b* y *a*, y sus cocientes estequiométricos para saber cuántos citocromos *c* por *b*, *a* por *c* y *b* por *a* tuvo cada preparación. A continuación se sacaron los promedios de las concentraciones relativas y los cocientes de los citocromos de las 3 preparaciones, se graficaron y se calcularon las desviaciones estándar. Además se calculó el coeficiente de variación (CV), para convertir las desviaciones estándar en porcentajes para una mejor interpretación del grado de variabilidad que la desviación estándar típica.

Tabla 1. Coeficientes de extinción molar de los citocromos *c*, *b* y *a* de la cadena respiratoria para *B. subtilis* (de Vrij y cols., 1987).

	Longitud de onda (nm)	Coefficiente de extinción (ε) mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
Citocromo <i>c</i>	550	19.10
Citocromo <i>b</i>	560	20.00
Citocromo <i>a</i>	600	16.50

❖ **Cuantificación de proteínas por el método de Lowry modificado para proteína de membranas:**

Se construyó una curva patrón con cantidades crecientes de albúmina sérica de bovino (ASB) de 0-20 µg. 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, 2g/L NaK tartrato de sodio-potasio y 1.0 % SDS) que se mezcló con la solución B (4.0 % CuSO<sub>4</sub> y agua bidestilada) en una proporción 99 A: 1 B. Se hizo una dilución en agua de la muestra problema 1:100 (o como lo requirió cada muestra) y se pusieron cantidades crecientes en diferentes tubos. Se añadió agua hasta un volumen máximo de 200 µl a todos los tubos. Se agregó 1 mL de la solución A+B a todos los tubos, se mezclaron y se incubaron durante 10 minutos. Después se les añadió el reactivo de Follin-Ciocalteau (dilución 1:1 en agua), se mezclaron y se incubaron treinta minutos. Las absorbancias de los tubos se leyeron en un espectrofotómetro de la marca Biomate Thermo a 750nm. La concentración de la

muestra se determinó por interpolación de los valores de absorbancia frente a los mg de proteína de cada tubo en la curva patrón (Lowry y cols., 1951 y Markwell y cols., 1978).

❖ **Determinación de la concentración de proteína por el método de UV:**

Se tomaron 10 µL de membranas y se disolvieron en 990 µL de una solución 0.6 % de SDS en agua bidestilada. La mezcla se agitó y se leyó en un espectrofotómetro BioMate Thermo a 280 nm. Para los cálculos se consideró que una absorbancia de 0.12 correspondía a 10 mg de proteína/mL (Glick y Pon, 1995).

❖ **Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión):**

Se corrieron electroforesis en geles claros nativos de alta resolución (16 cm de alto por 16 cm de ancho, por 1.5 mm de grosor). Se utilizó un amortiguador superior, a pH 7.0 (50 mM de Tricina, 7.5 mM de Imidazol, 0.01 % de DDM y 0.05 % Desoxicolato) y un amortiguador inferior, a pH 7.0 (25 mM de Imidazol) (Wittig y cols., 2007). El gel se preparó como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Composición del gel concentrador al 4.0 % de acrilamida y del gel separador con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida.

	Gel Condensador 4%	Gel separador 4%	Gel separador 13%
<b>Acrilamida 48%-bis acrilamida 1.5%</b>	0.83 ml	1.03 ml	2.87 ml
<b>Amortiguador del gel 3X</b>	2.99 ml	4.12 ml	3.53 ml
<b>Glicerol 79.5%</b>	-	-	2.63 ml
<b>Agua</b>	6.11 ml	7.24 ml	1.56 ml
<b>TEMED</b>	6.00 µl	4.00 µl	4.00 µl
<b>Persulfato de amonio 10%</b>	48.5 µl	40.00 µl	40.00 µl

Volúmenes para un gel de 16 cm de largo por 16 cm de ancho y con un grosor de 1.5 mm.

Se cargaron 100 µg de proteína de cada fracción y se les agregó 0.01 % de rojo de Ponceau S para tener un frente durante la electroforesis, 0.1 mM de AEBSF, 1 µL de coctel de inhibidores de Sigma 10X por cada 10 µL de muestra y glicerol a una concentración final del 16.66 %.

Un homogeneizado de corazón de pollo se solubilizó con 0.08 mg de DDM/mg de proteína por 5 min, se centrifugó a 195149 x g (44000 rpm) en el rotor T875 y al sobrenadante obtenido se le calculó la concentración de proteína por el método de UV. Después a este sobrenadante se le agregó 0.01 % de rojo de Ponceau S, 0.1 mM de AEBSF, 1 µL de coctel de inhibidores de Sigma 10X por cada 10 µL de muestra, glicerol a una concentración final del 16.66 % cargándose en cada carril 150 µg de proteína. Este homogeneizado se utilizó como marcador de masa molecular. El gel se cargó a 4° C y se corrió a 4 mA durante 5 h y después a 8 mA por 12 h (Wittig y cols., 2010).

❖ **Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (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 1 h en el amortiguador de 2D (2.5 % dodecil sulfato de sodio, 10.0 % glicerol, 62.5 mM de Trizma base y 10 mM Ditiotreitolo (DTT)). Las tiras se secaron sobre de las placas de vidrio de 10 a 20 min y después se prepararon los geles de segunda dimensión con un gel condensador al 4.0 % de acrilamida, 0.13 % bis acrilamida, 745.03 mM 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

14.0 % de acrilamida, 0.4 % bis acrilamida, 996.34 mM 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 masa molecular preteñidos marca Nippon Genetics con un rango 175 a 15 kDa. Se corrieron a 45 V durante tres horas y después a 120 V durante 12 h (Schägger y cols. 1994).

❖ **Tinciones de actividad catalítica de los complejos NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, complejo tipo *bc*, citocromo oxidasa y ATPasa:**

Las tinciones de actividad catalítica fueron realizadas en los geles claros nativos de alta resolución (hrCNE). Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

Para la tinción de la NADH deshidrogenasa, se cortó la tira del gel deseada y se incubó en un amortiguador 5 mM de Tris HCl pH 7.4 con 0.14 mM de NADH y 25 mg de NTB/10 mL del amortiguador, de 10 a 15 min en agitación constante y en oscuridad. Pasado el tiempo se retiró el amortiguador y la tira se puso en una solución fijadora (metanol 50.0 % y ácido acético al 10.0 %).

Para la succinato deshidrogenasa, la tira del gel se incubó en amortiguador 5 mM de Tris HCl pH 7.4 con 20 mM de succinato de sodio pH 7.5, 0.2 mM de PMS disuelto en DMSO y 25 mg de NTB/10 mL del amortiguador, de 20 a 30 min en agitación constante y en oscuridad. Pasado el tiempo se retiró el amortiguador y la tira se puso en una solución fijadora (metanol 50.0 % y ácido acético al 10.0 %).

Para la tinción del complejo *b<sub>6</sub>c*, la tira de interés se incubó en amortiguador de 50 mM de fosfatos de sodio pH 7.2 con 5 mg de diaminobenzidina/10 mL del amortiguador. La tira se incubó de 1 a 2 h en agitación constante y en oscuridad. Pasado este tiempo la tira se puso en solución fijadora (metanol 50.0 % y ácido acético al 10.0 %).

Para la tinción de la citocromo oxidasa, la tira de interés se incubó en amortiguador de 50 mM de fosfatos de sodio pH 7.2 con 5 mg de diaminobenzidina/10 mL del amortiguador más 50 µM final de citocromo *c* de caballo de Sigma (No. de catálogo C2506). La tira se incubó de 1 a 2 h en agitación constante y en oscuridad. Pasado este tiempo la tira se puso en solución fijadora (metanol 50.0 % y ácido acético al 10.0 %).

Para la tinción de la ATPasa, la tira de interés se preincubó en amortiguador con 35 mM de Tris y 270 mM de glicina, por 2 h. Una vez preincubada la tira, se retira el amortiguador y se pone en amortiguador de análisis con 35 mM de Tris, 270 mM de glicina, 14 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0.2 % final de Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y 8 mM de ATP durante 1 día en agitación constante y en oscuridad. Para detener la reacción, la tira se puso en metanol al 50 % durante 30 min (Wittig y cols., 2007).

❖ **Tinción con azul de Coomassie:**

Se preparó la solución de azul de Coomassie con metanol al 50 %, ácido acético al 7.0 % y azul brillante de Coomassie R al 0.2 %. Los geles se sumergieron en esta solución durante 1 h. Después se revelaron con una solución de metanol al 50.0 % por 30 min y posteriormente con una solución desteñidora (etanol al 25.0 %, ácido acético al 7.0 %) hasta quitar el fondo azul del gel (Laemmli, 1970).

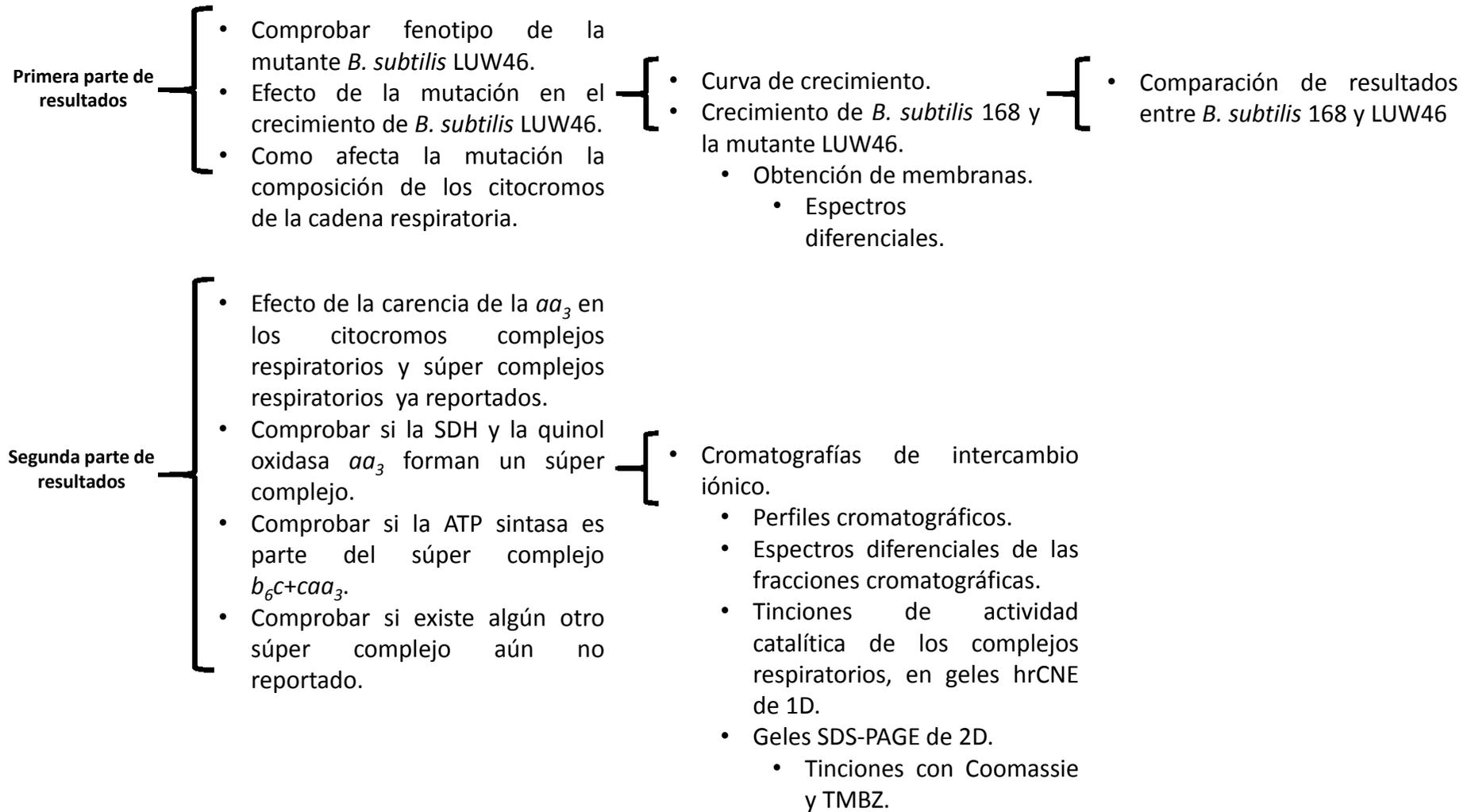
#### ❖ **Análisis de geles de 1D**

Los geles se realizaron por triplicado y fueron analizados mediante densitometrías con el programa ImageJ (Schneider y cols., 2012, <http://imagej.nih.gov/ij/>). Se calculó el área bajo cada pico utilizando pixeles como unidades. También se calculó la masa molecular de cada banda utilizando como marcadores al homogeneizado de corazón de pollo. Las masas moleculares de los complejos del homogeneizado de corazón de pollo fueron tomados de Wittig y colaboradores, 2010. Después de obtener las áreas de actividad y las masas moleculares de todos los geles con sus repeticiones, se tomaron en cuenta aquellas bandas que aparecieron como mínimo en dos de las tres repeticiones. Cada una de las fracciones se analizó individualmente. Se asignó una línea para cada banda de actividad identificada con las letras N (NDH), S (SDH), B (*b<sub>6</sub>c*), C (*caa<sub>3</sub>*) y A (ATPasa) según la tinción. Estas bandas se numeraron de arriba hacia abajo en orden de aparición, donde el número 1 correspondió a la banda de mayor masa molecular en el carril. Si una banda coincidió con la actividad de otro complejo respiratorio también se le puso la letra de ese complejo. Del lado derecho se puso la fracción teñida con azul de Coomassie con líneas correspondientes a las bandas obtenidas en los geles teñidos para la actividad de los complejos respiratorios.

#### ❖ **Tinción de geles con tetrametilbenzidina (TMBZ):**

Se preparó una solución fresca de 6.3 mM de TMBZ en metanol y se mezclaron tres partes de bencidina-metanol con 7 partes de 250 mM de acetato de sodio pH 5.0. Los geles se sumergieron en esta mezcla en agitación y en obscuridad de 1 a 2 h. Pasado este tiempo se les agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final de 30 mM. La tinción fue visible a los 3 min y se incrementó hasta los 30 min. Los geles se pusieron en una mezcla de 3 partes de isopropanol y 7 partes de 250 mM 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 0.2 nmoles de citocromo c de caballo mezclado con los marcadores de masa molecular como control positivo para esta tinción.

## Organización de resultados



## Resultados

### ❖ Curva de crecimiento de *B. subtilis* 168 y la mutante *B. subtilis* LUW46

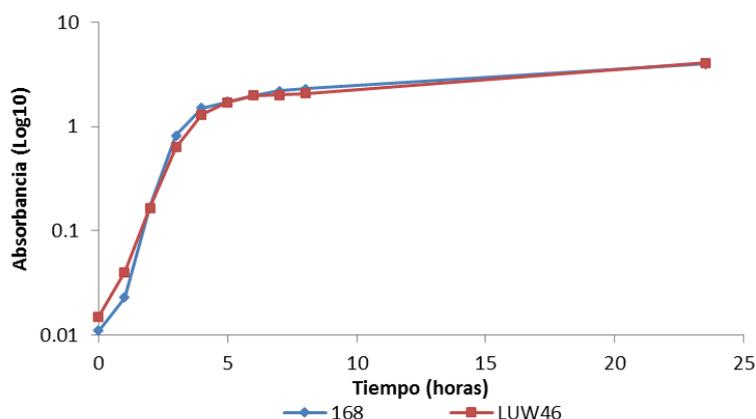


Figura 4. Curva de crecimiento representativa de la 168 y la LUW46 hasta las 23.5 h en MSR adicionado con 3.0 % de succinato y con 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kanamicina (en el caso de la LUW46).

Tabla 3. Tiempos de duplicación en minutos, calculados en la fase exponencial de las curvas de crecimiento de la 168 y la LUW46 por duplicado (Figura 4). En la última columna se muestra el promedio de ambas repeticiones con sus desviaciones estándar (DS).

	Tiempo de duplicación (Minutos)		Promedios y Desviaciones estándar
	Primera preparación	Segunda preparación	
<i>B. subtilis</i> 168	18.0	12.0	15.0 (DS 4.2)
<i>B. subtilis</i> LUW46	24.0	23.4	23.7 (DS 0.4)

En la figura 4 se muestran las curvas de crecimiento representativas de *B. subtilis* 168 (a partir de este momento será abreviada como la 168) y la mutante *B. subtilis* LUW46 (nombrada simplemente LUW46). La fase exponencial de crecimiento terminó a las 4 h tanto en la 168 como en la LUW46. En la tabla 3 se muestran los valores de los tiempos de duplicación calculados en la fase exponencial, donde la 168 tuvo un valor menor que la mutante, por tanto la 168 creció más rápido en esta fase. A las 23.5 h la LUW46 alcanzó la misma densidad óptica que la 168, lo que indicó que la mutación no afectó el crecimiento de la bacteria durante la fase estacionaria. Las curvas de crecimiento se realizaron por duplicado.

### ❖ Crecimiento y obtención de membranas de *B. subtilis* 168 y la mutante LUW46

Tabla 4. g de bacterias por L de medio, y mg de proteína de membrana por g de bacteria, obtenidos de las 3 preparaciones de la 168 y la LUW46 en este trabajo. En la parte inferior de la tabla se muestran los promedios y desviaciones estándar de los datos (DS).

Cepa	Preparación	g de bacteria /L de medio	mg de proteína de membrana/g de bacteria
<i>B. subtilis</i> 168	1	12.9	8.6
	2	13.5	8.8
	3	12.7	6.7
<i>B. subtilis</i> LUW46	1	11.7	7.0
	2	10.5	15.0
	3	10.6	15.4
<i>B. subtilis</i> 168	Promedios y Desviaciones estandar	13.05 (DS 0.3)	8.03 (DS 1.1)
<i>B. subtilis</i> LUW46	Promedios y Desviaciones estandar	10.98 (DS 0.6)	12.47 (DS 4.7)

El crecimiento de las bacterias y la obtención de membranas de la 168 y la LUW46 se hicieron por triplicado, los resultados se muestran en la tabla 4. Para la 168 se obtuvo un crecimiento

promedio de g de bacteria/L de medio mayor al de la LUW46, pero la LUW46 presentó un valor mayor de mg/g de bacteria.

- ❖ **Identificación y cuantificación de citocromos por medio de espectros de absorción**
- ❖ **Membranas de *B. subtilis* 168**

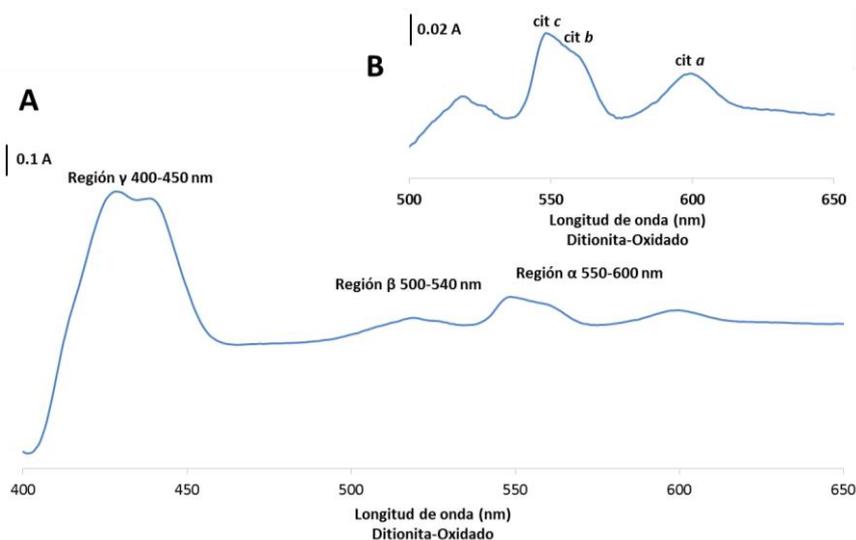


Figura 5. A. Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado) representativo de las tres preparaciones de membranas de la 168, en un rango de 400 a 650 nm de longitud de onda, en el cual se observan los picos gama, beta y alfa. B. Amplificación del espectro en el rango de 500 a 650 nm de longitud de onda, donde se identificaron citocromos tipo *c* a 551 nm, citocromos tipo *b* a 560 nm y citocromos tipo *a* cercanos a los 600 nm. A. absorbancia.

Tabla 5. Datos de los citocromos *c*, *b* y *a* obtenidos de los espectros diferenciales (reducidos con Ditionita-Oxidado) de las membranas de la 168: longitud de onda característica, concentración relativa (nmol por mg de proteína), y cocientes de las estequiometrías de los citocromos *c:b*, *a:c* y *b:a*, calculados a partir de las concentraciones relativas.

	Pico (Longitud de onda, nm)			nmol/mg de proteína			Cocientes de los citocromos		
	cit <i>c</i>	cit <i>b</i>	cit <i>a</i>	cit <i>c</i>	cit <i>b</i>	cit <i>a</i>	<i>c:b</i>	<i>a:c</i>	<i>b:a</i>
<b><i>B. subtilis</i> 168 (1)</b>	551	560	600	1.9	1.4	0.8	1.3	0.4	1.6
<b><i>B. subtilis</i> 168 (2)</b>	551	560	601	1.2	1.0	0.6	1.2	0.4	1.7
<b><i>B. subtilis</i> 168 (3)</b>	551	561	601	1.5	1.3	0.6	1.1	0.4	2.0

Los espectros diferenciales fueron obtenidos de la resta de los espectros reducidos con ditionita menos oxidados, realizados para las tres preparaciones individuales de las membranas de la 168. En la figura 5A se muestra el espectro representativo de las membranas aisladas, que tuvieron los mismos picos de longitudes de onda tanto en la región gama (400-450 nm de longitud de onda), beta (500-540 nm de longitud de onda) como alfa (550-600 nm de longitud de onda). En la figura 5B se amplificó el espectro diferencial en el rango de 500 a 650 nm de longitud de onda, para apreciar mejor los picos alfa de cada citocromo. Los picos identificados se muestran en la tabla 5: a 551 nm un máximo para citocromos tipo *c*, a 560 nm un máximo para citocromos tipo *b* y a 600 nm un máximo para citocromos tipo *a*.

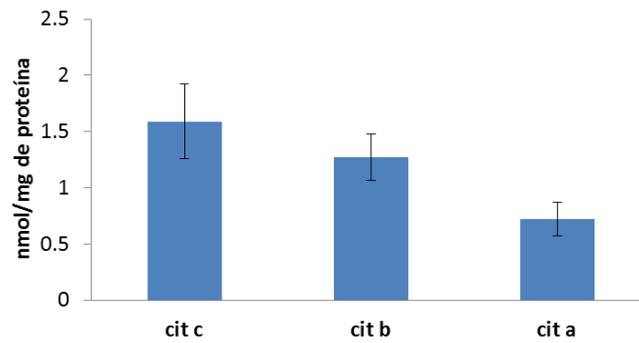


Figura 6. Promedio de las concentraciones relativas (nmol/mg de proteína) de los citocromos *c*, *b* y *a*, de las tres preparaciones independientes de membranas de la 168 con sus respectivas desviaciones estándar (los valores de las desviaciones se muestran en la tabla 6).

Tabla 6. Promedios de las concentraciones relativas de citocromos (nmol/mg de proteína), desviaciones estándar (DS) y sus coeficientes de variación (CV) de los citocromos *c*, *b* y *a* de las tres preparaciones de membranas de *B. subtilis* 168.

	<i>B. subtilis</i> 168		
	cit <i>c</i>	cit <i>b</i>	cit <i>a</i>
nmol/mg de proteína	1.5	1.2	0.7
CV (%)	20.6	16.1	21.0
DS	0.3	0.2	0.1

Para conocer las abundancias de citocromos se graficaron los promedios de las concentraciones relativas para los citocromos *c*, *b* y *a*, de las tres preparaciones de membranas, obteniendo su desviación estándar y el coeficiente de variación (que expresa a la desviación estándar como porcentaje). Entre mayor sea el valor del coeficiente de variación, mayor será la heterogeneidad de los datos (Figura 6).

Tanto en la figura 6 como en la tabla 6 se muestra que los citocromos *c* tuvieron la mayor concentración relativa, seguidos de los citocromos *b* y después por los citocromos *a*. Esta tendencia se mantuvo en cada repetición con coeficientes de variación menores al 22.0 %, indicando poca variación entre las tres preparaciones.

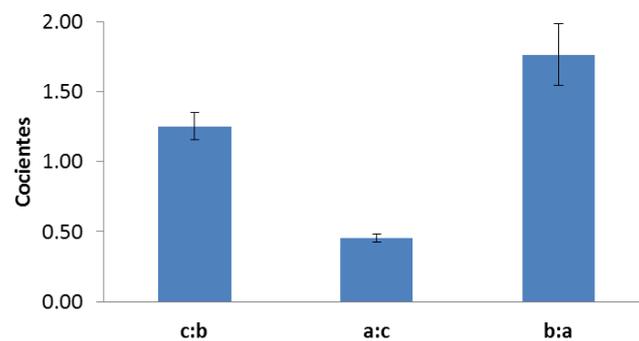


Figura 7. Cocientes de los citocromos *c:b*, *a:c* y *b:a*. Promedios de tres preparaciones independientes de membranas de la 168 con sus desviaciones estándar (valores mostrados en la tabla 7).

Tabla 7. Promedios de los cocientes de los citocromos *c:b*, *a:c* y *b:a*, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) de las tres preparaciones de membranas.

<i>B. subtilis</i> 168			
	<i>c:b</i>	<i>a:c</i>	<i>b:a</i>
<b>Cocientes</b>	1.2	0.4	1.7
<b>CV (%)</b>	7.7	5.9	12.3
<b>DS</b>	0.09	0.02	0.2

En la figura 7 se graficaron los promedios de los cocientes de los citocromos *c:b*, *a:c* y *b:a* de las tres preparaciones de membranas. Las relaciones entre las concentraciones relativas de citocromos, se mantuvieron similares en las tres preparaciones. Como se muestra en la tabla 7, los coeficientes de variación fueron menores al 13.0 % indicando desviaciones estándar pequeñas.

#### ❖ Membranas de *B. subtilis* LUW46

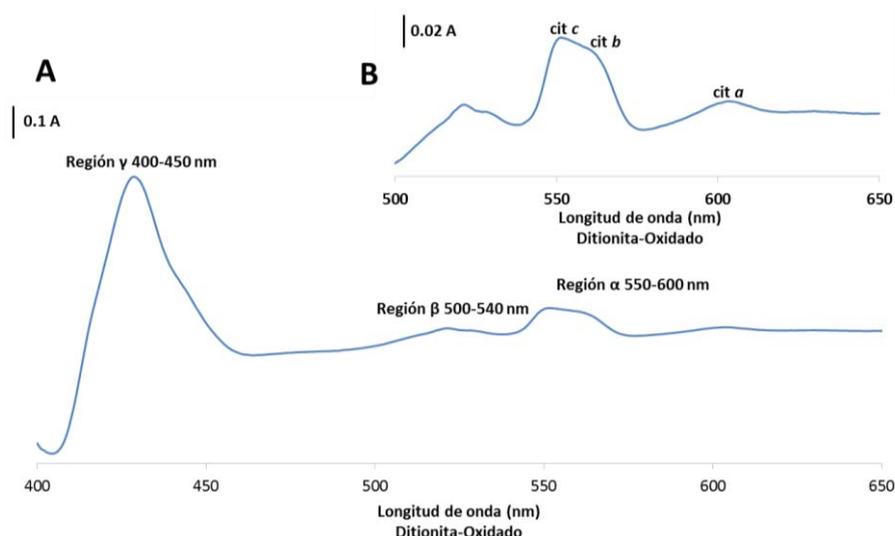


Figura 8. A. Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de las tres preparaciones de membranas de la LUW46, en un rango de 400 a 650 nm de longitud de onda, en el cual se observan los picos gama, beta y alfa que fueron iguales para las tres preparaciones. B. Amplificación de 500 a 650 nm de longitud de onda, del espectro diferencial donde se identificaron a 551 nm, citocromos tipo *c*, a 560 nm, citocromos tipo *b* y a 603 nm, citocromos tipo *a*, corroborando el fenotipo de esta mutante carente de la *aa<sub>3</sub>*. A. absorbancia.

Tabla 8. Datos de los citocromos *c*, *b* y *a* obtenidos de los espectros diferenciales (reducidos con Ditionita-Oxidado) de tres preparaciones independientes de membranas de la LUW46: longitud de onda característica, concentración relativa (nmol por mg de proteína), y cocientes de los citocromos *c:b*, *a:c* y *b:a*, calculados a partir de las concentraciones relativas de cada citocromo.

	Pico (Longitud de onda, nm)			nmol/mg de proteína			Cocientes de los citocromos		
	cit <i>c</i>	cit <i>b</i>	cit <i>a</i>	cit <i>c</i>	cit <i>b</i>	cit <i>a</i>	<i>c:b</i>	<i>a:c</i>	<i>b:a</i>
<b><i>B. subtilis</i> LUW46 (1)</b>	551	560	603	1.5	1.3	0.2	1.1	0.1	6.6
<b><i>B. subtilis</i> LUW46 (2)</b>	551	560	604	1.04	0.9	0.2	1.1	0.1	4.5
<b><i>B. subtilis</i> LUW46 (3)</b>	551	560	604	0.8	0.7	0.1	1.1	0.1	5.0

Al igual que para la 168, se obtuvieron espectros diferenciales de absorción, en un rango de 400 a 650 nm de longitud de onda, de las tres preparaciones de membranas de la LUW46 como se muestra en la figura 8A. Tanto en la región de los picos gama, beta como alfa se identificaron los

mismos citocromos para las tres preparaciones. En la figura 8B se hizo una amplificación del espectro, en el rango de 500 a 650 nm de longitud de onda, donde se identificaron los siguientes máximos de absorción (Tabla 8) a 551 nm de longitud de onda, un máximo para citocromos tipo *c*, a 560 nm un máximo para citocromos *b* y un máximo a 605 nm para citocromos tipo *a*, éste último que corresponde al citocromo *a* de la *caa<sub>3</sub>* confirmando la carencia de la *aa<sub>3</sub>* en ésta mutante.

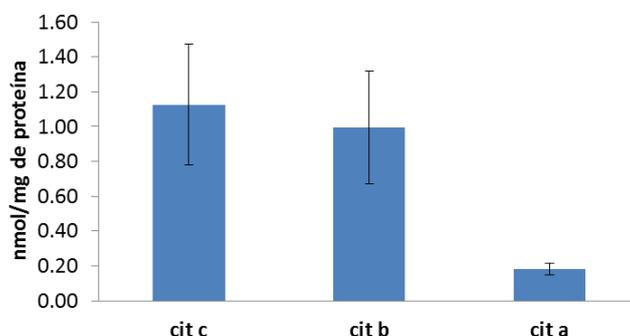


Figura 9. Promedio de las concentraciones relativas (nmol/mg de proteína) de los citocromos *c*, *b* y *a*, de las tres preparaciones independientes de membranas de la LUW46 con sus respectivas desviaciones estándar (los valores de las desviaciones se muestran en la tabla 9).

Tabla 9. Promedios de las concentraciones relativas de citocromos (nmol/mg de proteína), desviaciones estándar (DS) y sus coeficientes de variación (CV) de los citocromos *c*, *b* y *a* de las tres preparaciones de membranas.

	<i>B. subtilis</i> LUW46		
	cit <i>c</i>	cit <i>b</i>	cit <i>a</i>
nmol/mg de proteína	1.1	0.9	0.1
CV (%)	30.9	32.3	18.3
DS	0.3	0.3	0.03

En cuanto a abundancia de citocromos, en la figura 9 se presenta la gráfica de los promedios de las concentraciones relativas de los citocromos *c*, *b* y *a*, de las tres preparaciones de membranas de la LUW46. En la figura 9 y en la tabla 9 se muestra que los citocromos *c* tuvieron la mayor concentración relativa, seguidos de los citocromos *b* y después por los citocromos *a*. Esta disposición se mantuvo en cada repetición de la preparación de membranas de la LUW46, con CV de las desviaciones estándar menores al 31 %.

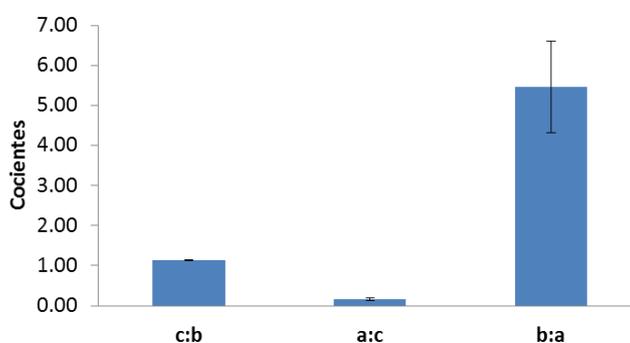


Figura 10. Cocientes de los citocromos *c:b*, *a:c* y *b:a*. Promedio de tres preparaciones independientes de membranas de la LUW46 con sus desviaciones estándar (valores mostrados en la tabla 10).

Tabla 10. Promedios de los cocientes de los citocromos  $c:b$ ,  $a:c$  y  $b:a$ , desviación estándar (DS) y su coeficiente de variación (CV) de las tres preparaciones de membranas.

	<i>B. subtilis</i> LUW46		
	$c:b$	$a:c$	$b:a$
<b>Cocientes</b>	1.1	0.1	5.4
<b>CV (%)</b>	1.3	18.3	21.06
<b>DS</b>	0.01	0.03	1.1

De igual manera, en la figura 10 se graficaron los promedios de los cocientes de los citocromos  $c:b$ ,  $a:c$  y  $b:a$  de las tres preparaciones de membranas. Las relaciones entre las concentraciones relativas de citocromos se mantuvieron semejantes en las tres preparaciones. En la tabla 10 se muestran los coeficientes de variación de las desviaciones estándar que fueron menores al 22.0 %, por lo que los datos presentaron pocas variaciones entre cada repetición.

❖ **Comparación de los espectros de diferenciales de absorción de las membranas de *B. subtilis* 168 y la mutante LUW46**

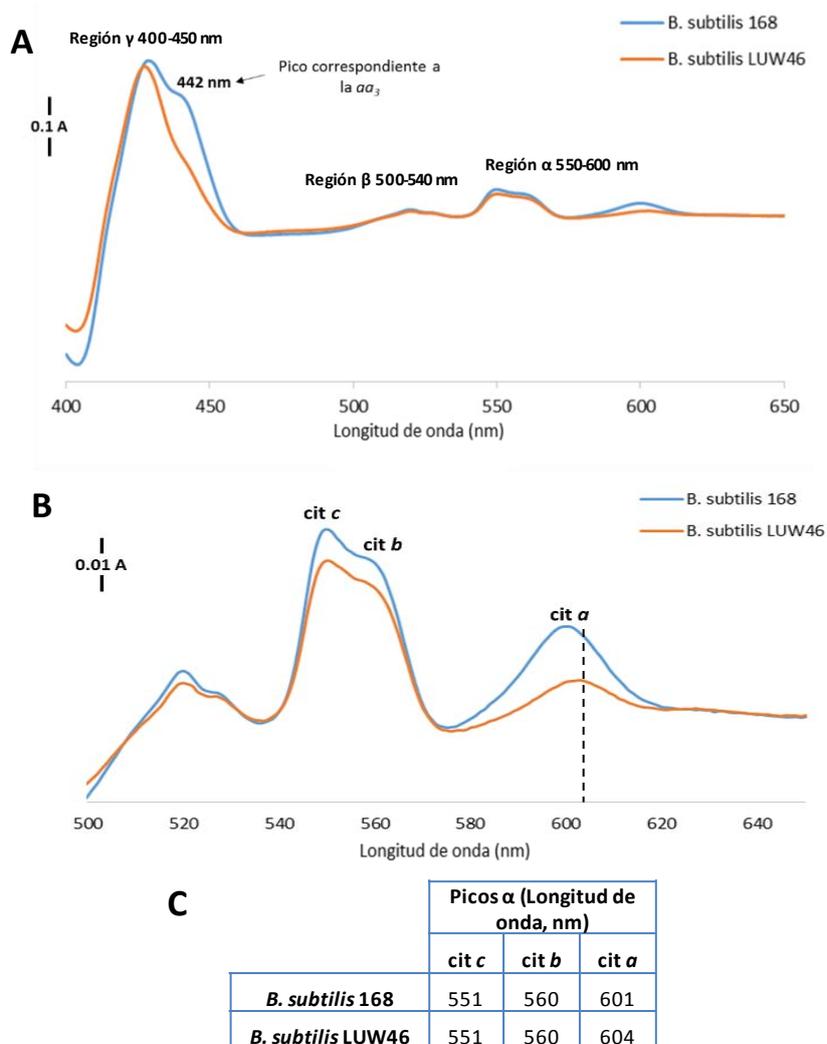


Figura 11. A. Comparación de los espectros diferenciales de absorción (reducidos con ditionita menos oxidado), de la 168 y la LUW46, en el rango de 400 a 650 nm de longitud de onda. Se aprecia una marcada disminución del pico gama a 422 nm, en la LUW46 en comparación con la 168. B. Amplificación de los espectros de 500 a 650 nm de longitud de onda, donde hubo una disminución y corrimiento del máximo para el citocromo  $\alpha$  de la LUW46 hacia los 605 nm

correspondiente a la *caa*<sub>3</sub>. C. Comparación de las longitudes de onda de los citocromos *c*, *b* y *a* de la 168 y la LUW46. A. absorbancia.

En la figura 11A se compararon los espectros diferenciales de las membranas de la 168 y la LUW46, lo que nos permitió apreciar una diferencia entre los picos gama. En la LUW46, el máximo a 422 nm de longitud de onda, disminuyó en un 53.36 % del delta de absorbancia en comparación con la 168. En la figura 11B se amplificó el espectro en un rango de 500 a 650 nm de longitud de onda, para apreciar mejor la diferencia entre los picos alfa de los citocromos *c*, *b* y *a*. Los citocromos *a* de la LUW46 presentaron una disminución del 75.0 % en comparación con la 168, y un corrimiento hacia los 605 nm correspondientes al citocromo *a* de la *caa*<sub>3</sub>, como se muestra en la figura 11B y 11C.

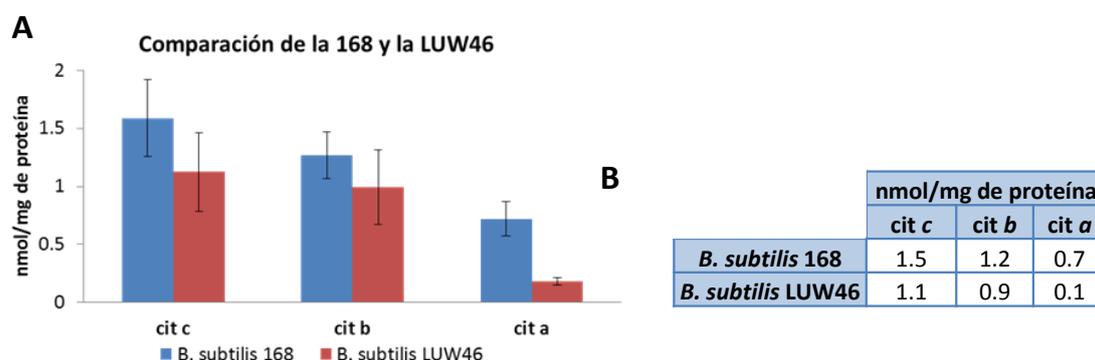


Figura 12. A. Comparación de los promedios de las concentraciones relativas (nmol/mg de proteína) de los citocromos *c*, *b* y *a* de las membranas de la 168 y la LUW46. B. Tabla de los promedios de las concentraciones relativas de los citocromos.

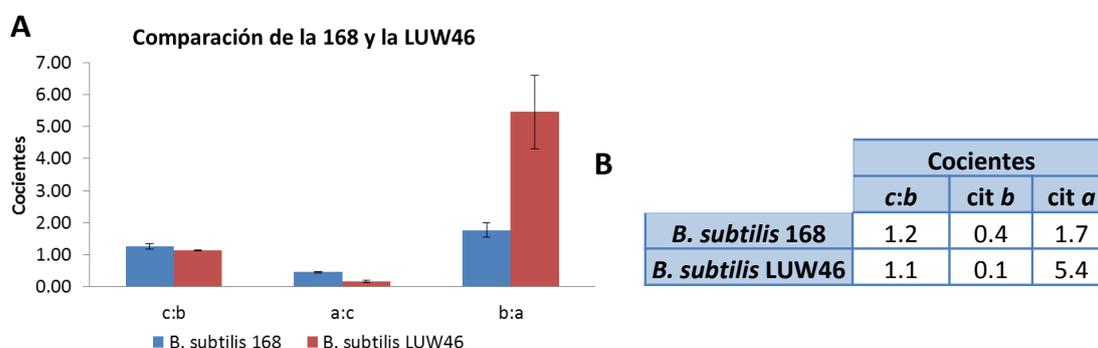


Figura 13. A. Comparación de los cocientes de los citocromos *c:b*, *a:c* y *b:a* de los promedios de tres preparaciones independientes de membranas de la 168 y de la LUW46. B. Tabla de los promedios de los cocientes de los citocromos.

Por otro lado, en la figura 12 se compararon las concentraciones relativas de los citocromos *c*, *b* y *a*. Los citocromos *c* y *b* de la LUW46 tuvieron una disminución de la concentración relativa del 28.9 y 22.0 % respectivamente, mientras que los citocromos *a* tuvieron una disminución del 75.0 % en comparación con la 168. Esta disminución del citocromo *a* se apreció mejor al comparar los cocientes *a:c* y *b:a* de las tres preparaciones de membranas como se muestra en la figura 13.

- ❖ Análisis de las fracciones obtenidas de las cromatografías de intercambio iónico del solubilizado de las membranas con dodecil maltósido
- ❖ Perfil cromatográfico de la 168

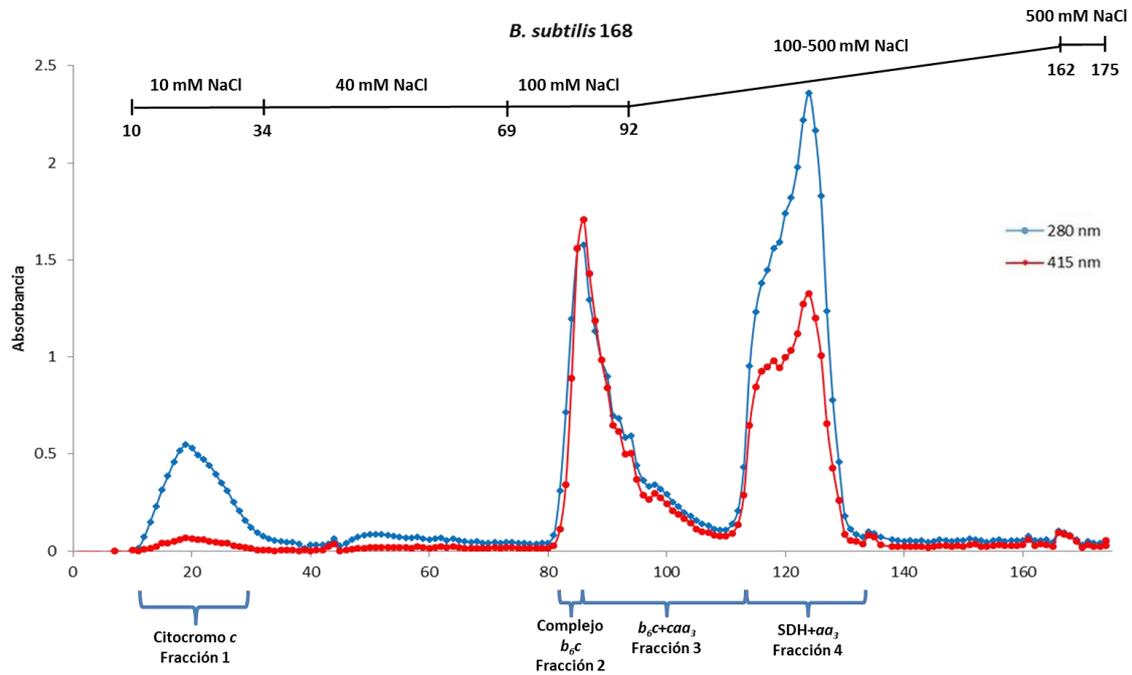


Figura 14. Perfil representativo de las cromatografías de membranas de la 168 solubilizadas con 1.5 mg de DDM por mg de proteína, medido a 280 y 415 nm para absorbancia de proteína y citocromos, respectivamente. En la parte superior del perfil se muestran los diferentes lavados con 10, 40, 100 mM de NaCl, el gradiente de 100 a 500 mM de NaCl y un último lavado de 500 mM de NaCl. También se indica el número de tubo en el que comenzó y terminó cada lavado. En la parte inferior del perfil se muestran las fracciones ya concentradas y la identidad asignada a cada fracción.

En la figura 14 se muestra un perfil representativo de las cromatografías de tres preparaciones independientes de membranas de la 168, solubilizadas con 1.5 mg de DDM por mg de proteína. Los tres perfiles cromatográficos se compararon, mostrando el mismo patrón de máximos de absorción, y además obtenidos en concentraciones similares de NaCl.

## ❖ Perfil cromatográfico de la LUW46

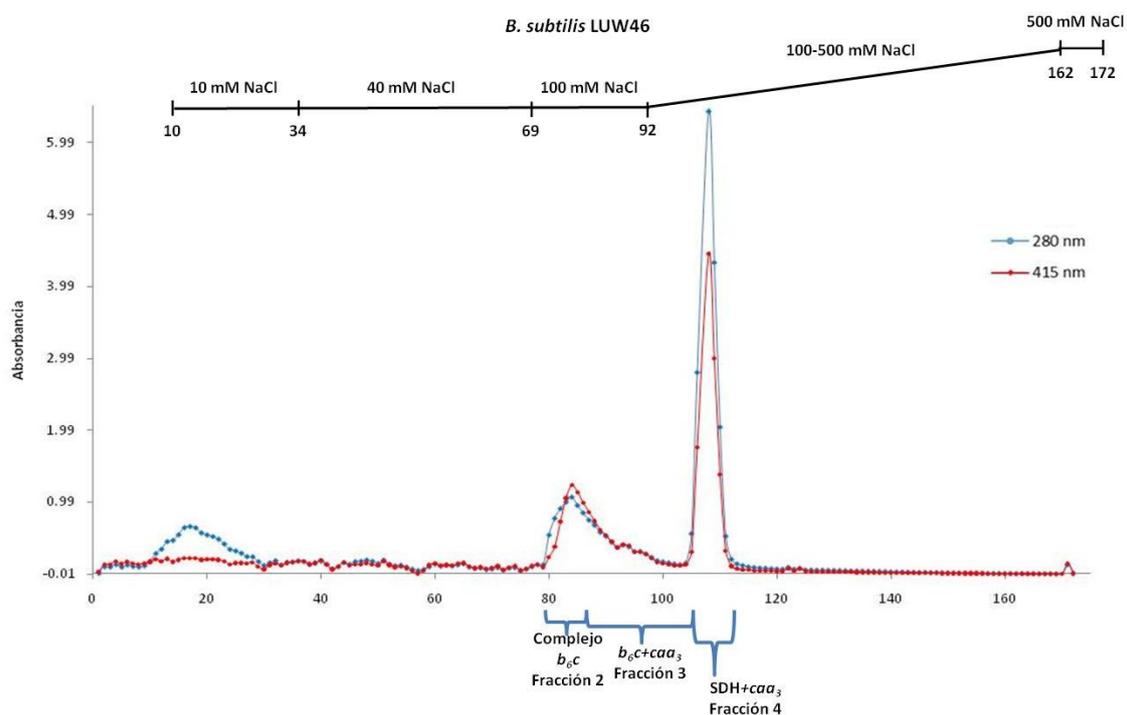


Figura 15. Perfil representativo de las cromatografías de membranas de la LUW46 solubilizadas con 1.5 mg de DDM por mg de proteína, medido a 280 y 415 nm para absorbancia de proteína y citocromos, respectivamente. En la parte superior se muestran los diferentes lavados con 10, 40, 100 mM de NaCl, el gradiente de 100 a 500 mM de NaCl y un último lavado de 500 mM de NaCl. También se indica el número de tubo en el que comenzó y terminó cada lavado. En la parte inferior del perfil se muestran las fracciones ya concentradas y la identidad asignada a cada fracción.

La figura 15 muestra el perfil representativo de las cromatografías de las tres preparaciones independientes de membranas de la LUW46, realizadas en las mismas condiciones que las de la 168. Se compararon los tres perfiles cromatográficos, los máximos de absorción tuvieron un patrón similar y fueron obtenidos en concentraciones similares de NaCl.

Después de realizar espectros de absorción de todos los tubos correspondientes a los picos de los perfiles cromatográficos, separarlos y concentrarlos, se obtuvieron cuatro fracciones finales para las cromatografías de la 168 y tres fracciones para las cromatografías de la LUW46. Estas fracciones se denominaron Citocromo *c* 168, Complejo *b<sub>6</sub>c* 168, *b<sub>6</sub>c+caa<sub>3</sub>* 168 y SDH+*aa<sub>3</sub>* 168 para *B. subtilis* 168 y Complejo *b<sub>6</sub>c* LUW46, *b<sub>6</sub>c+caa<sub>3</sub>* LUW46 y SDH+*aa<sub>3</sub>* LUW46 para *B. subtilis* LUW46. Se utilizaron espectros diferenciales de absorción de cada fracción para esta designación.

A continuación se analizaron cada una de las fracciones obtenidas en las tres repeticiones de la cromatografía de la 168 y se compararon con sus fracciones equivalentes de las tres repeticiones de la cromatografía de la LUW46.

❖ **Fracción del citocromo c 168**

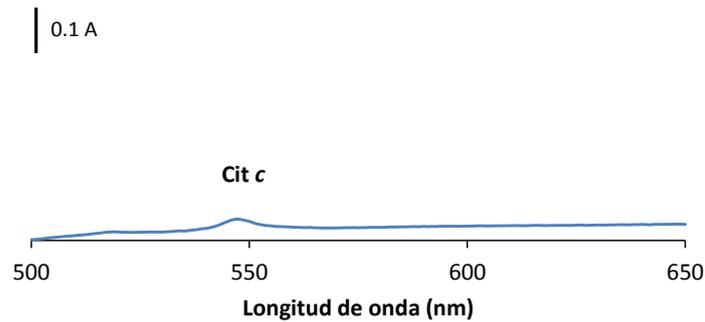


Figura 16. Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción del citocromo c 168 identificado por el pico alfa del citocromo c. Esta fracción fue obtenida en las tres cromatografías de la 168. A. absorbancia.

La figura 16 es el espectro diferencial representativo (reducido con ditionita menos oxidado) de la primera fracción de las cromatografías de la 168, a una concentración de 10 mM de NaCl, donde se identificó un citocromo c por su máximo de absorción. Los picos alfa de los citocromos c en las fracciones equivalentes de las tres cromatografías fueron prácticamente los mismos, pero sus concentraciones relativas variaron entre repeticiones (Tabla suplementaria 1). La fracción del Citocromo c 168 no tuvo una fracción equivalente en las cromatografías de la LUW46, y ya que se obtuvo poca cantidad de esta fracción (400  $\mu$ L) y con poca concentración de citocromos c (de 0.7 nmol/mg de proteína, que fue el 20 % de la concentración en comparación con las demás fracciones) solo se le realizaron espectros de absorción y no se utilizó para análisis posteriores.

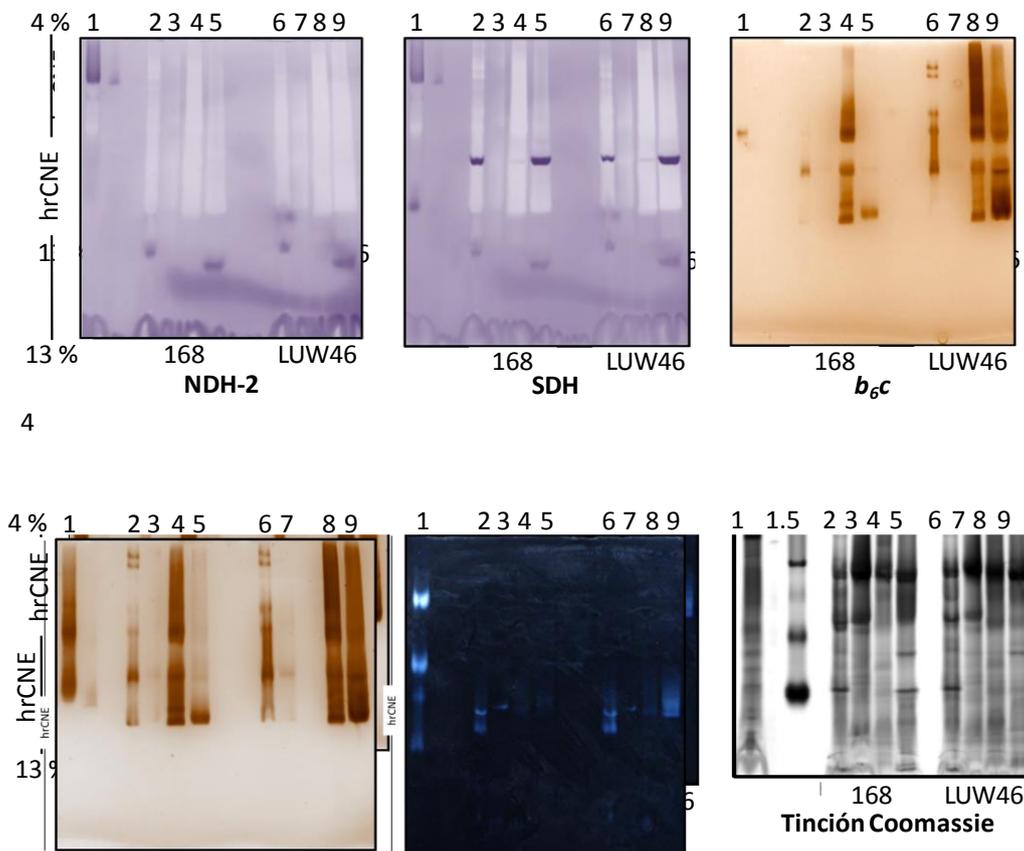


Figura 17. Geles hrCNE de 1D de las fracciones de las solubilizaciones y las cromatografías de las membranas de la 168 y la LUW46, cargados con 100 µg de proteína y teñidos para la actividad histoquímica de 5 de los complejos de la cadena respiratoria de *B. subtilis*, (NDH-2, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa) y para proteína con azul de Coomassie. 1. Marcadores de masa molecular de pollo. 1.5. Marcadores de masa molecular (proteínas solubles). 2. Sobrenadante 168. 3. Fracción  $b_6c$  168. 4. Fracción  $b_6c+caa_3$  168. 5. Fracción SDH+ $aa_3$  168. 6. Sobrenadante LUW46. 7. Fracción  $b_6c$  LUW46. 8. Fracción  $b_6c+caa_3$  LUW46. 9. Fracción SDH+ $caa_3$  LUW46.

La figura 17 muestra los geles hrCNE de 1D, de las fracciones obtenidas de las cromatografías de la 168 y la LUW46, teñidas para la actividad histoquímica de los complejos de la cadena respiratoria y con azul de Coomassie. En el apéndice 1 se muestran los geles teñidos para las diferentes actividades de los complejos de un homogeneizado de corazón de pollo que se utilizaron como marcadores de masa molecular. Para saber qué bandas de proteína se mantuvieron en las fracciones de las cromatografías, se utilizaron como referencia los sobrenadantes de la solubilización de las membranas 168 y LUW46 (marcados como Sobrenadante 168 y Sobrenadante LUW46 en las figuras), que se muestran en el apéndice 2.

#### ❖ Fracción del complejo $b_6c$ 168

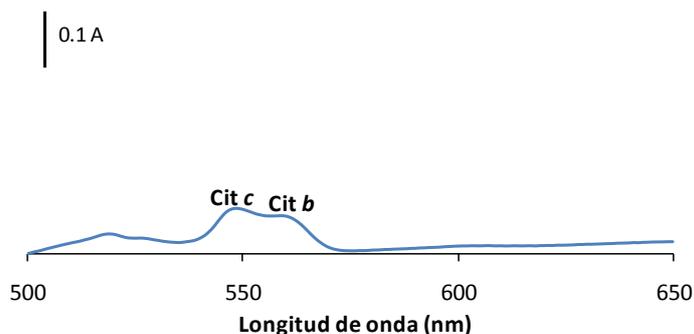


Figura 18. Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción del Complejo  $b_6c$  168 identificado por los picos alfa del citocromo  $c$  y del citocromo  $b$ . Esta fracción fue obtenida en las tres cromatografías de la 168. A. absorbancia.

La figura 18 presenta el espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado) de la segunda fracción obtenida en las cromatografías de la 168 que se obtuvo con 100 mM de NaCl, donde se identificaron picos de los citocromos  $c$  y  $b$  del complejo  $b_6c$ . Las concentraciones de NaCl y los máximos de absorción obtenidos en los espectros diferenciales, fueron prácticamente los mismos en las fracciones de las tres cromatografías de la 168.

#### ❖ Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión)

Tabla 11. Masas moleculares de los monómeros de los complejos respiratorios de *B. subtilis*, calculados a partir del genoma.

Monómeros de los complejos	
Masas moleculares (kDa)	
NDH-2	41.79
SDH	112.00
$b_6c$	72.10
$caa_3$	145.00
ATPasa	500.00

Para comenzar con el análisis de los geles hrCNE de 1D de los sobrenadantes, en la tabla 11 se muestran las masas de los monómeros de los complejos respiratorios de *B. subtilis*, calculados a partir del genoma. En el caso de los complejos respiratorios con varias subunidades, se sumaron los pesos de estas subunidades. Aunque en el caso del complejo  $b_6c$  se esperan encontrar monómeros del complejo, ya que esta es su forma funcional.

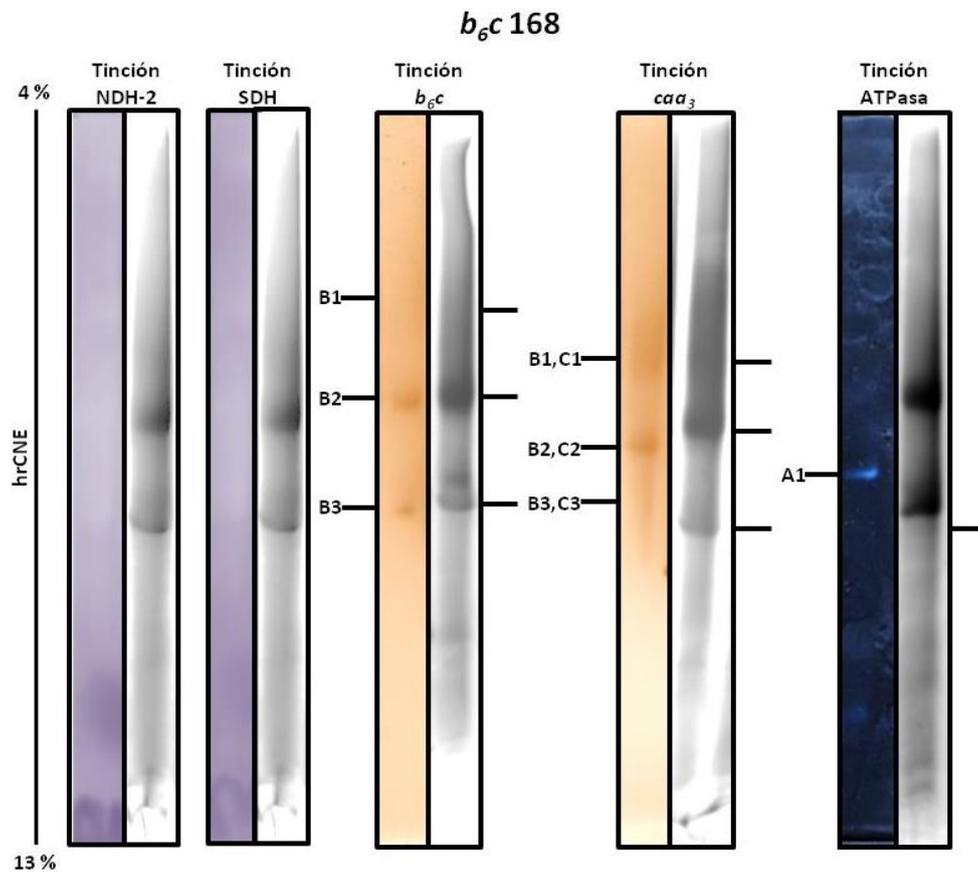


Figura 19. Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida del complejo  $b_6c$ , con 100  $\mu$ g de proteína, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de *B. subtilis* (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo  $b_6c$ , C = citocromo c oxidasa  $caa_3$  y A = ATP sintasa). Cada banda se nombró con la primera letra del nombre del complejo respiratorio según la tinción y un número en orden descendente. El número 1 corresponde a la banda de mayor masa molecular. Al lado derecho de cada carril de actividad se muestra un carril de la misma fracción, teñido con azul de Coomassie. En aquellas bandas donde se obtuvo actividad para más de un complejo, se les puso al lado la letra numerada correspondiente a la banda del complejo con el que coincidieron.

Tabla 12. Áreas relativas de actividad en pixeles, masas moleculares e identidades de las bandas, teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa. Cada banda se nombró con la primer letra del complejo de la tinción en cuestión, y se le asignó un número de arriba hacia abajo por su masa molecular.

Complejo $b_6c$ 168			
Banda	Área (Pixeles)	Masa molecular kDa	Estequiometrías propuestas
<b><math>b_6c</math></b>			
B1	16313.2	430.0	$2b_6c+2caa_3+C_{550}+C_{551}$
B2	29223.8	260.0	$2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ $4b_6c+C_{550}+C_{551}$
B3	16560.9	121.0	$2b_6c$
<b><math>caa_3</math></b>			
B1,C1	8551.9	411.0	$2b_6c+2caa_3+C_{550}+C_{551}$
B2,C2	30999.8	231.0	$2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ $4b_6c+C_{550}+C_{551}$
B3,C3	20223.0	108.5	$caa_3$
<b>ATPasa</b>			
A1	3759.2	98.5	$\alpha$ y $\beta$

En la figura 19 se muestra el análisis de los geles de 1D de la fracción del complejo  $b_6c$  168, teñidos para la actividad de: NDH, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa, y con Coomassie. Para esta fracción se obtuvo únicamente actividad de los complejos  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa (Tabla 12).

Para la actividad del complejo  $b_6c$ , se obtuvieron las bandas B1, B2 y B3. La banda B1 fue cercana en masa a un pentámero del complejo. La banda B2 con la mayor área relativa, fue cercana en masa a la de  $4b_6c$ . La banda B3 tuvo una masa cercana a la del dímero del  $b_6c$ . También cabe la posibilidad de que se mantuvieran pequeñas cantidades del súper complejo  $b_6c+caa_3$  en la estequiometría  $2b_6c+2caa_3+C_{550}+C_{551}$  en la banda B1, y en la banda B2 una combinación del súper complejo  $2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  y una conformación del  $b_6c$  y los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  en  $4b_6c+C_{550}+C_{551}$ .

Para la tinción de la  $caa_3$  se obtuvieron las bandas C1, C2 y C3 que coincidieron con las bandas de la tinción del complejo  $b_6c$ , por lo que si se mantiene una asociación entre el  $b_6c$  y la  $caa_3$ . Además la banda C2 tuvo la mayor área relativa, lo mismo que la banda B2. C3 también podría corresponder en masa molecular a un monómero de la  $caa_3$ .

Con respecto a la ATPasa se obtuvo la banda A1 correspondiente a la suma de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ .

#### ❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE)

Para un análisis más a fondo de los complejos respiratorios y sus asociaciones, se realizaron geles SDS-PAGE de 2D de los geles hrCNE de 1D de las fracciones de las cromatografías de *B. subtilis* 168 y LUW46. Todos los geles de 1D se cargaron con 100  $\mu$ g de proteína para tener alrededor de 0.08 nmol de citocromos tipo c en cada carril y poder tener una buena señal de las bandas en la tinción con TMBZ. Los sobrenadantes 168 y LUW46 se utilizaron como referencias para poder identificar las bandas de las diferentes subunidades de los complejos en las fracciones de las cromatografías (Apéndice 2).

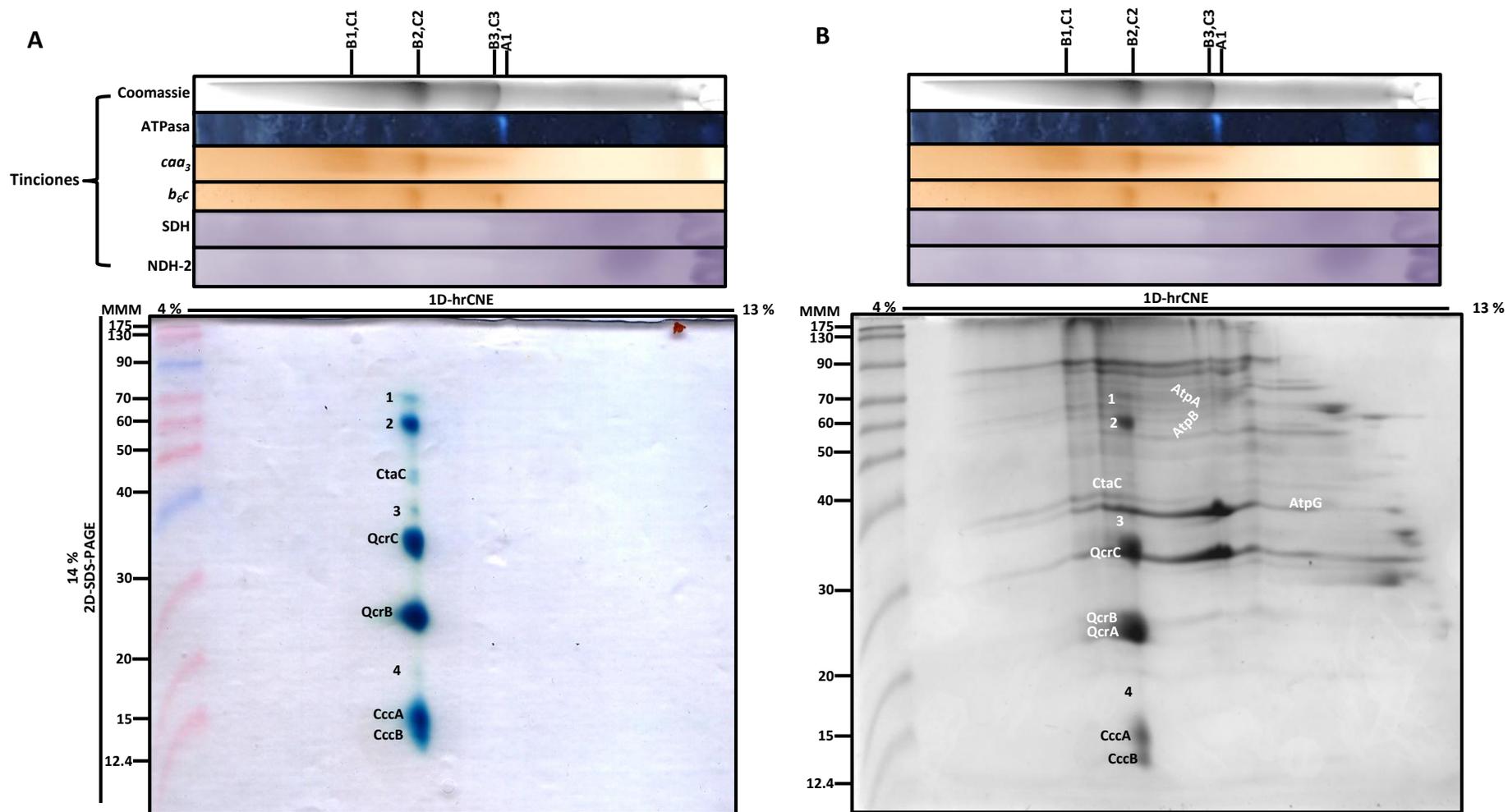


Figura 20. Análisis de 2D de los gels hrCNE de 1D de la fracción del complejo *b<sub>6c</sub>* 168, previamente teñidos para la actividad de los complejos NDH (N), SDH (S), *b<sub>6c</sub>* (B), *caa<sub>3</sub>* (C) y ATPasa (A), por medio de gels SDS-PAGE al 14.0 % de acrilamida. En la parte superior se acomodaron los gels de actividad de 1D, y un carril teñido con azul de Coomassie. En la parte inferior se muestra el gel de 2D teñido con TMBZ (A) para hemos covalentemente unidos y con Coomassie (B), con los marcadores de masa molecular (MMM) del lado izquierdo, para identificar las diferentes

subunidades de los complejos respiratorios. En la tabla 13 se muestran las masas moleculares y las áreas de cada subunidad identificada. Se tomaron como referencia los geles de 2D de García y colaboradores, 2012.

Tabla 13. Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (A) y con Coomassie (B) de la fracción del complejo  $b_6c$  168. En la parte superior de la tabla se indican los complejos identificados por sus actividades en geles de 1D. A continuación se enlistan las proteínas que se identificaron por su masa molecular en el gel de 2D, se muestra su nombre, su masa molecular obtenida a partir del genoma y en el gel (a/b) y su área (en pixeles).

Complejo $b_6c$ 168 (TMBZ)				Complejo $b_6c$ 168 (Coomassie)					
B2,C2 ( $b_6c,caa_3$ )				B2,C2 ( $b_6c,caa_3$ )			A1 ( $b_6c,caa_3$ )		
Masa molecular: 231.0 kDa				Masa molecular: 231.0 kDa			Masa molecular: 98.5 kDa		
respiratorio	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
	1	-/70	1275.7	1	-/71	3773.6	AtpA	54.4/68	1856.4
	2	-/62	4106.2	2	-/64	5889.8	AtpB	51.2/65	901.8
	CtaC	40.1/48	526.7	CtaC	40.1/47	352.4			
	3	-/41	527.6	3	-/37	8943.8			
	QcrC	28.6/36	7254.3	QcrC	28.6/35	17185.7			
	QcrB	25.4/25	9611.3	QcrB	25.4/26	10512.6			
	4	-/19	109.9	QcrA	18.7/24	20251.9			
	CccA	12.4/15	7268.1	4	-/18	63.4			
	CccB	11.9/14	3222.2	CccA	12.4/15	13384.9			
				CccB	11.9/14	8213.8			

-		
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
AtpG	31.5/44	482.6

Subunidades del complejo respiratorio	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
	AtpG	31.5/44	482.6

a. Masas moleculares (kDa) calculadas a partir del genoma.

b. Masas moleculares (kDa) obtenidas en el gel de 2D.

#### ❖ Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ

Se realizó el análisis del gel de 2D, de la fracción del complejo  $b_6c$  168 teñido con TMBZ, como se muestra en la figura 20A y en la tabla 13A.

En la banda B2,C2 (gel de 1D), con actividad para los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$ , se obtuvieron las siguientes bandas: 1, 2, 3 y 4, que no correspondieron a ninguna banda de los complejos respiratorios. Se identificó también a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. Al complejo  $b_6c$  por las subunidades QcrC y QcrB. A los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$  respectivamente, por las proteínas CccA y CccB. Al ser ésta una fracción del complejo  $b_6c$  parcialmente pura, se obtuvo un área relativa en pixeles de la banda de la CtaC, menor al 10.0 % en comparación con las áreas relativas de las subunidades QcrC y QcrB del complejo  $b_6c$ .

#### ❖ Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie

En el análisis del gel de 2D teñido con azul de Coomassie (Figura 20B y Tabla 13B), además de las bandas obtenidas con TMBZ también se identificó a la subunidad QcrA del complejo  $b_6c$  en la línea B2,C2 (1D). En la línea A1 (del gel de 1D), con actividad para la ATPasa, se identificaron las subunidades AtpA y AtpB de la ATPasa. También se identificó la subunidad AtpG, de la ATPasa, fuera de alguna de las bandas de actividad de los geles de 1D.

Igualmente que en la tinción con TMBZ, la subunidad CtaC de la  $caa_3$  tuvo un área relativa menor del 5.0 % comparado con las subunidades del complejo  $b_6c$ .

#### ❖ Fracción del complejo $b_6c$ LUW46

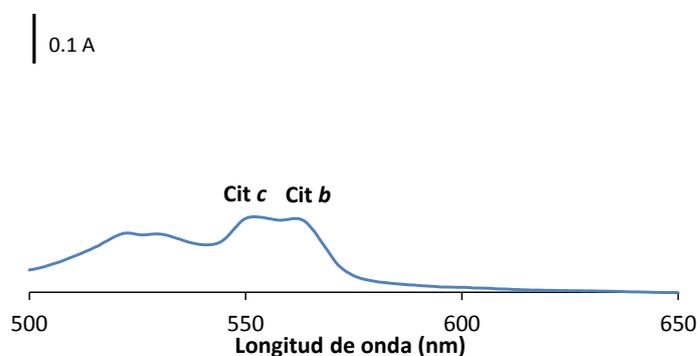


Figura 21. Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción del Complejo  $b_6c$  LUW46 identificado por los pico alfa del citocromo  $c$  y del citocromo  $b$ . Esta fracción fue obtenida en las tres cromatografías de la 168. A. absorbancia.

La figura 21 contiene el espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado) de la primera fracción obtenida en la cromatografía de la LUW46, a una concentración de 100 mM de NaCl, donde se identificaron citocromos  $c$  y  $b$  correspondientes al complejo  $b_6c$ . Solamente en la primera cromatografía de las tres preparaciones no se obtuvo una fracción con el complejo  $b_6c$  aislado, probablemente debido a que la resina ya estaba bastante usada y razón por la cual se usó una nueva para la segunda cromatografía.

❖ Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión)

*b<sub>6</sub>c* LUW46

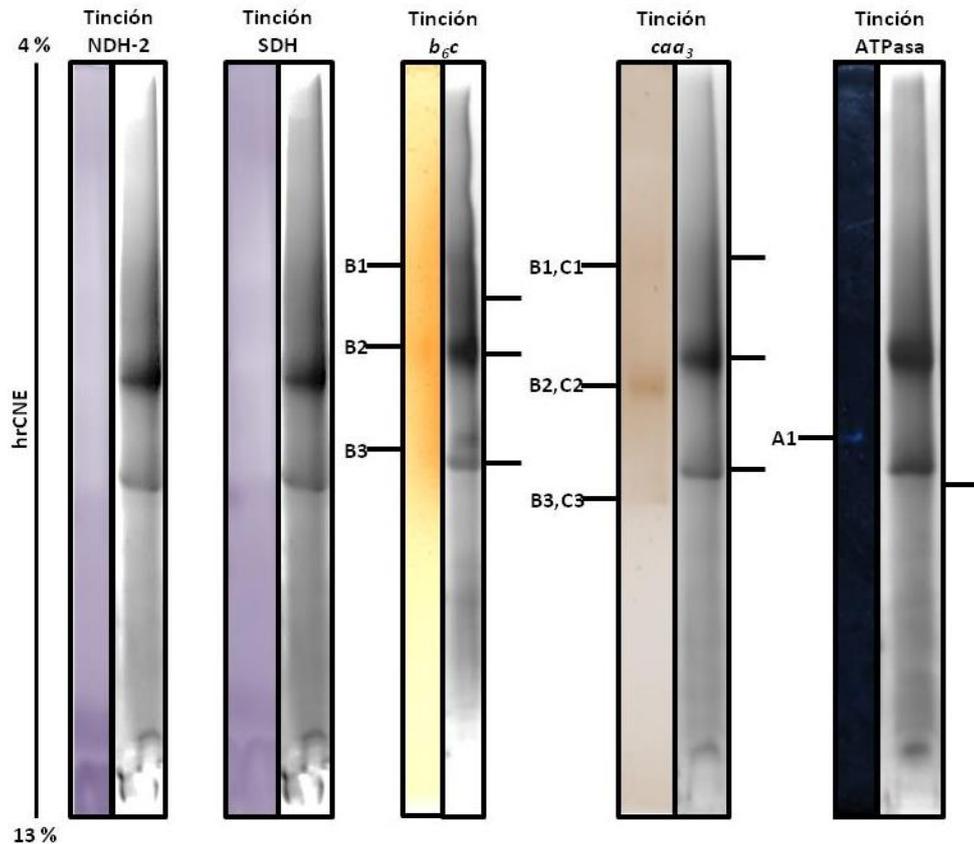


Figura 22. Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4 al 13.0 % de acrilamida del complejo *b<sub>6</sub>c* LUW46, con 100 µg de proteína, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de *B. subtilis* (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo *b<sub>6</sub>c*, C = citocromo c oxidasa *caa<sub>3</sub>* y A = ATPsintasa). Cada banda se nombró con la primera letra del nombre del complejo respiratorio según la tinción y un número en orden descendente. El número 1 corresponde a la banda de mayor masa molecular. Al lado derecho de cada carril de actividad se muestra un carril de la misma fracción, teñido con azul de Coomassie. En aquellas bandas donde se obtuvo actividad para más de un complejo, se les puso al lado la letra numerada correspondiente a la banda del complejo con el que coincidieron.

Tabla 14. Áreas relativas de actividad en pixeles, masas moleculares e identidades de las bandas teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH, *b<sub>6</sub>c*, *caa<sub>3</sub>* y ATPasa. Cada banda se nombró con la primer letra del complejo de la tinción en cuestión, y se le asignó un número de arriba hacia abajo por su peso molecular.

Complejo <i>b<sub>6</sub>c</i> LUW46			
Banda	Área (Pixeles)	Masa molecular kDa	Estequiometrías propuestas
<i>b<sub>6</sub>c</i>			
B1	3245.9	430.5	$2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$
B2	8807.7	263.5	$2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B3	789.9	141.0	$2b_6c$
<i>caa<sub>3</sub></i>			
B1,C1	16530.6	423.5	$2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$
B2,C2	16367.7	245.5	$2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B3,C3	17714.7	111.0	<i>caa<sub>3</sub></i>
ATPasa			
A1	2085.7	101.0	α y β

En la figura 22 se muestran los carriles del complejo  $b_6c$  LUW46, teñidos para la actividad de: NDH, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa. Para esta fracción se obtuvo actividad para los complejos  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa (Tabla 14).

En la tinción del complejo  $b_6c$ , se obtuvieron tres bandas. La banda B1 tuvo una masa cercana a un hexámero del  $b_6c$ . La banda B2 se acercó en masa a  $4b_6c$ . La banda B3 correspondió en masa a un dímero del complejo  $b_6c$ . Cabe la posibilidad de que el  $b_6c$  se encuentre dentro del súper complejo  $b_6c+caa_3$  en pequeñas cantidades en las bandas B1 y B2 además del dímero del complejo en B3.

Para la  $caa_3$  también se obtuvieron tres bandas. La banda C1, C2, y C3, que coincidieron con las bandas obtenidas en la tinción del complejo  $b_6c$ , por lo que la banda C1 corresponde en masa a  $2b_6c+2caa_3+C_{550}+C_{551}$ , la banda C2 a una combinación de  $2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  y  $4b_6c+C_{550}+C_{551}$ , y la banda C3, por su masa molecular, podría tratarse también de un monómero del complejo  $caa_3$ . Esta banda presentó una mayor área de actividad en comparación con la banda B3 correspondiente al dímero del  $b_6c$ , con la que coincidió.

Para la tinción de la ATPasa solamente se obtuvo la banda A1 que correspondió a la suma de las masas de una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ .

❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE):

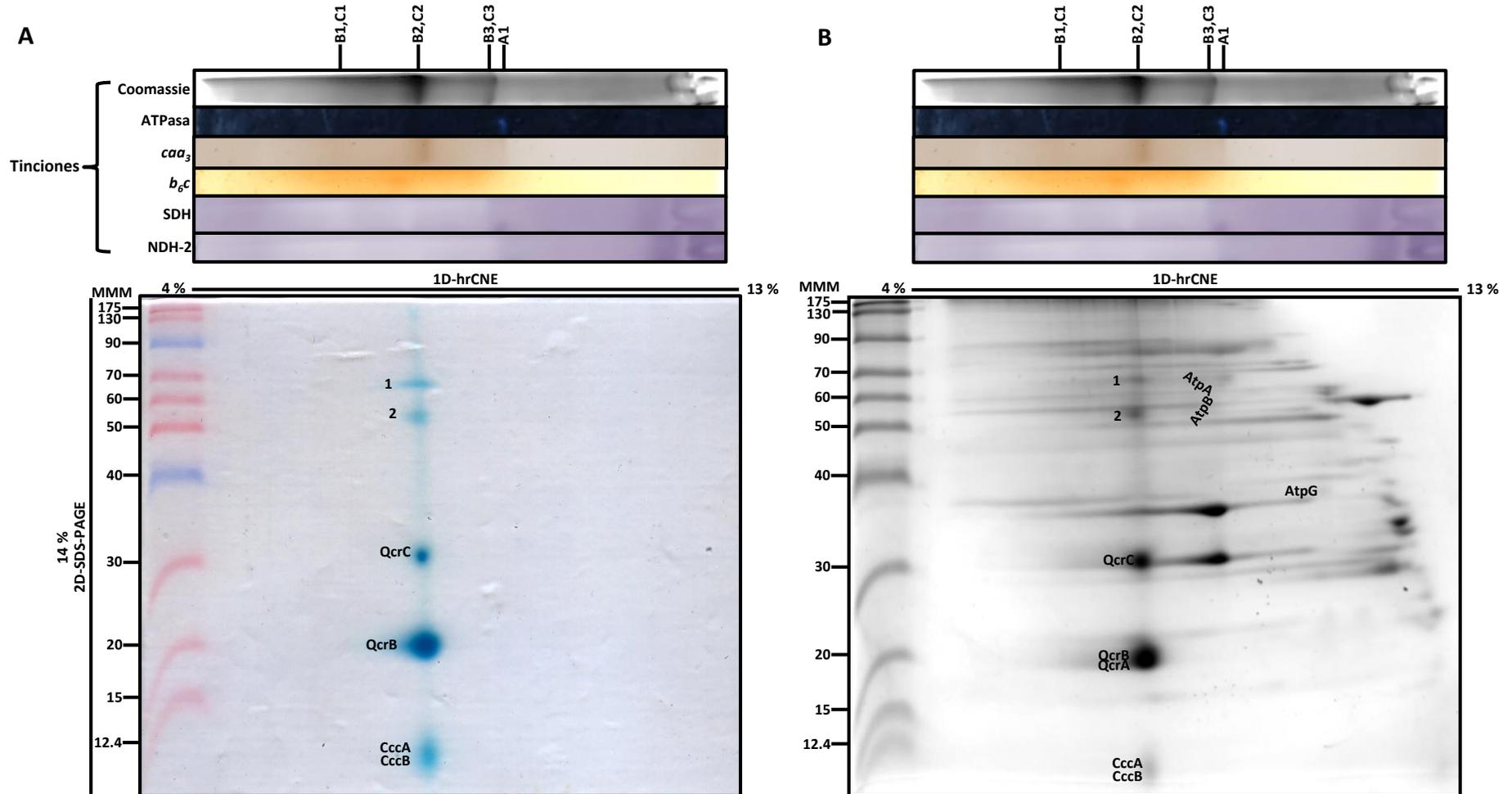


Figura 23. Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D de la fracción del complejo *b*<sub>6</sub>*c* LUW46, previamente teñidos para la actividad de los complejos NDH (N), SDH (S), *b*<sub>6</sub>*c* (B), *caa*<sub>3</sub> (C) y ATPasa (A), por medio de geles SDS-PAGE al 14.0 % de acrilamida. En la parte superior se acomodaron los geles de actividad de 1D, y un carril teñido con azul de Coomassie. En la parte inferior se muestra el gel de 2D teñido con TMBZ para hemos covalentemente unidos (A) y con Coomassie (B), con los marcadores de masa molecular (MMM) del lado izquierdo, para identificar las diferentes



#### ❖ **Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ**

En la figura 23A y en la tabla 15A, se muestra el análisis del gel de 2D del complejo  $b_6c$  LUW46 teñido con TMBZ.

En la banda B2,C2 (gel de 1D), con actividad para los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$ , se obtuvieron las bandas 1 y 2, que no correspondieron a ninguna subunidad de los complejos respiratorios. Se identificó al complejo  $b_6c$  por las subunidades QcrC y QcrB. Por último a los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  por las proteínas CccA y CccB.

Al ser una fracción parcialmente pura del complejo  $b_6c$ , no se encontró prácticamente ninguna banda para la CtaC de la  $caa_3$ , pero los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  se mantuvieron unidos al complejo  $b_6c$ .

#### ❖ **Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie**

En la figura 23B y en la tabla 15B se muestra el análisis de los geles de 2D de la fracción del complejo  $b_6c$  LUW46 teñido con azul de Coomassie.

En la banda B2,C2 (1D) con actividad para los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$ , se obtuvieron las bandas 1 y 2 que no correspondieron a ninguna de las subunidades de los complejos respiratorios. Se identificó al complejo  $b_6c$  por las subunidades QcrC, QcrB y QcrA. También se identificaron a los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  por las proteínas CccA y CccB.

En la Banda A1 (1D) con actividad para la ATPasa, se identificaron a las subunidades AtpA y AtpB.

También se identificó a la subunidad AtpG de la ATPsintasa fuera de cualquier banda de actividad en el gel de 1D.

#### ❖ **Comparación de las fracciones del complejo $b_6c$ 168 y LUW46**

##### ❖ **Espectros diferenciales**

Tanto la fracción del Complejo  $b_6c$  168 como el Complejo  $b_6c$  LUW46, eluyeron a una concentración de 100 mM de NaCl en las cromatografías. Además los picos alfa de los citocromos  $c$  y  $b$  fueron los mismos para ambas fracciones.

##### ❖ **Geles hrCNE de 1D**

Tanto en la fracción del complejo  $b_6c$  168 como en la fracción  $b_6c$  LUW46, se obtuvo actividad para  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa. Para los complejos  $b_6c$  y la  $caa_3$ , se obtuvieron tres bandas similares en masa molecular y por tanto en composición en ambas fracciones, pero las bandas tuvieron una menor área de actividad en la fracción  $b_6c$  LUW46 en comparación con el  $b_6c$  168.

A pesar de que en los espectros diferenciales de estas fracciones, prácticamente se obtuvieron picos para citocromos  $c$  y citocromos  $b$  correspondientes al complejo  $b_6c$  y no se obtuvo un pico para un citocromo  $a$  correspondiente al de la citocromo  $c$  oxidasa, al parecer es muy difícil separar al complejo  $b_6c$  de la  $caa_3$  y los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  manteniéndose una asociación muy fuerte en el súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ , puesto que aún en la fracción parcialmente pura del  $b_6c$  se encontró actividad de la  $caa_3$  aunque posiblemente en esta fracción predomine la forma del tetrámero y el dímero del complejo  $b_6c$ . Otra posibilidad es que la tinción del complejo

$b_6c$  no sea específica y también esté tiñendo a la  $caa_3$ . Los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$  se mantuvieron unidos al complejo  $b_6c$  aun en su forma parcialmente pura.

#### ❖ Geles SDS-PAGE de 2D

Al comparar los complejos  $b_6c$  parcialmente puros de la 168 y la LUW46, el patrón de bandas fue similar, pero el área relativa de las bandas de las subunidades del  $b_6c$  y los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$  fueron menores en la LUW46. Al parecer hay una menor cantidad del complejo  $b_6c$  solo en la mutante en comparación con la 168. Además, no se encontró a la CtaC de la  $caa_3$  en la LUW46 mientras que en la 168 si se obtuvo una pequeña banda y las bandas 3 Y 4.

#### ❖ Fracción del complejo $b_6c+caa_3$ 168

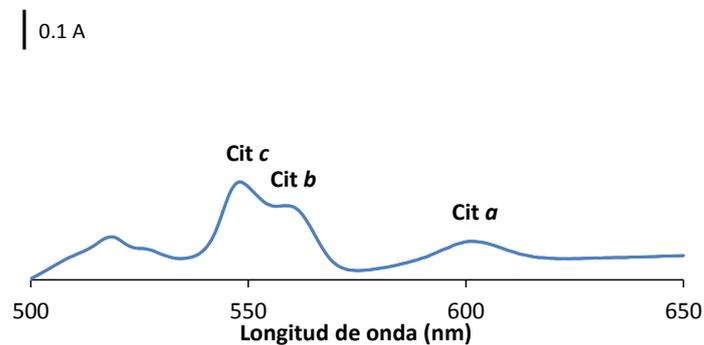


Figura 24. Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción  $b_6c+caa_3$  168 identificada por los picos alfa de los citocromos  $c$ ,  $b$  y  $a$ . Esta fracción fue obtenida en las tres cromatografías de la 168. A. absorbancia.

La figura 24 muestra el espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado) de la tercer fracción obtenida en las cromatografías de la 168, de 100 a 227.6 mM de NaCl. En este espectro de absorción se identificaron citocromos  $c$ ,  $b$  y  $a$  correspondientes a los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$ , dándonos indicios del súper complejo  $b_6c+caa_3$ .

❖ Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión)

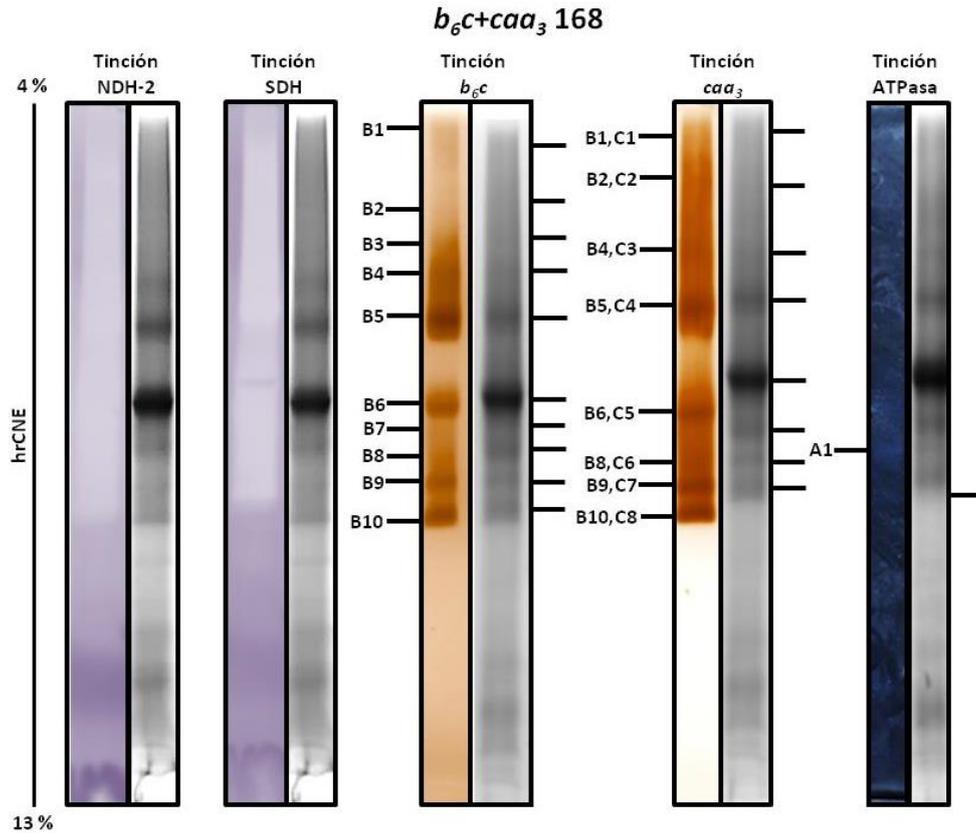


Figura 25. Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida de la fracción *b<sub>6</sub>c+caa<sub>3</sub> 168*, con 100 µg de proteína, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de *B. subtilis* (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo *b<sub>6</sub>c*, C = citocromo c oxidasa *caa<sub>3</sub>* y A = ATPsintasa). Cada banda se nombró con la primera letra del nombre del complejo respiratorio según la tinción y un número en orden descendente. El número 1 corresponde a la banda de mayor masa molecular. Al lado derecho de cada carril de actividad se muestra un carril de la misma fracción, teñido con azul de Coomassie. En aquellas bandas donde se obtuvo actividad para más de un complejo, se les puso al lado la letra numerada correspondiente a la banda del complejo con el que coincidieron.

Tabla 16. Áreas relativas de actividad en pixeles, masas moleculares e identidades de las bandas teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa. Cada banda se nombró con la primer letra del complejo de la tinción en cuestión, y se le asignó un número de arriba hacia abajo por su peso molecular.

Fracción $b_6c+caa_3$ , 168			
Banda	Área (Pixeles)	Masa molecular kDa	Estequiometrías propuestas
<b><math>b_6c</math></b>			
B1	3170.2	1473.0	$8b_6c+5caa_3+4c_{550}+4c_{551}$
B2	555.6	949.5	$6b_6c+3caa_3+3c_{550}+3c_{551}$
B3	5378.3	730.0	$4b_6c+3caa_3+2c_{550}+2c_{551}$
B4	2547.0	512.0	$4b_6c+2caa_3+2c_{550}+2c_{551}$
B5	26031.3	421.0	$2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$
B6	14493.4	261.5	$2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B7	2555.3	181.0	$2b_6c$
B8	8031.6	155.0	$2b_6c$
B9	8671.4	132.0	$2b_6c$
B10	13938.4	107.0	$2b_6c$
<b><math>caa_3</math></b>			
B1,C1	6381.4	1335.0	$8b_6c+5caa_3+4c_{550}+4c_{551}$
B2,C2	12442.6	918.0	$6b_6c+3caa_3+3c_{550}+3c_{551}$
B4,C3	5049.4	571.5	$4b_6c+2caa_3+2c_{550}+2c_{551}$
B5,C4	41049.2	423.0	$2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$
B6,C5	37230.2	301.0	$2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B8,C6	13108.8	178.5	$caa_3$
B9,C7	21203.5	143.5	$caa_3$
B10,C8	25941.3	114.0	$caa_3$
<b>ATPasa</b>			
A1	100.5	127.0	$\alpha$ y $\beta$

En la figura 25 se muestran los carriles de la fracción  $b_6c+caa_3$  168, teñidos para la actividad de: NDH, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa. Para esta fracción se obtuvo actividad para los complejos  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa (Tabla 16).

En la tinción del complejo  $b_6c$  se obtuvieron las bandas B1 a B10. La banda B6 correspondió en masa molecular a un tetrámero del complejo. Las bandas 7 a 10 podrían corresponder a la banda del dímero del complejo  $b_6c$ . La mayor área de actividad se concentró entre las bandas de 421 a 107 kDa.

Al teñir esta fracción para la actividad de la  $caa_3$ , se obtuvieron las bandas C1 a C8. Estas bandas de proteína obtenidas, tuvieron masas moleculares muy cercanas a los del complejo  $b_6c$  (con las excepciones de las bandas B3 y B7), por lo que las bandas C1 a C4 corresponderían a diferentes estequiometrías del súper complejo  $b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ . La banda C5, por su masa molecular, además del súper complejo  $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ , también podría corresponder a  $4b_6c+c_{550}+c_{551}$ . Las mayores áreas de actividad se obtuvieron entre los 423 a 114 kDa, el mismo rango que en la tinción del complejo  $b_6c$ . Las bandas C6 a C8 también podrían ser un monómero de la  $caa_3$ .

Para la ATPasa, nuevamente se obtuvo la banda A1, correspondiente a la suma de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ .

❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE):

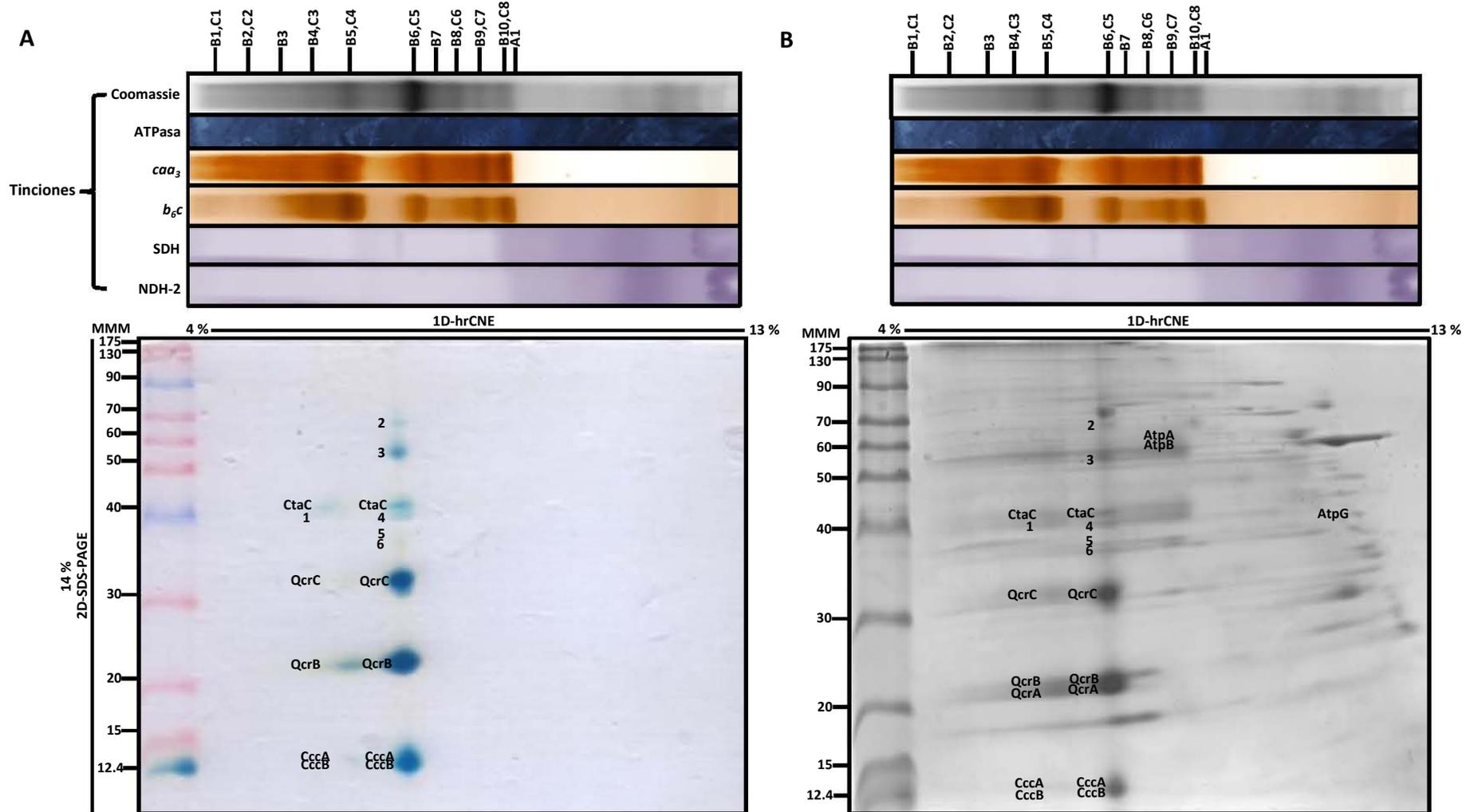


Figura 26. Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D de la fracción *b6c+caa3* 168, previamente teñidos para la actividad de los complejos NDH (N), SDH (S), *b6c* (B), *caa3* (C) y ATPasa (A), por medio de geles SDS-PAGE al 14.0 % de acrilamida. En la parte superior se acomodaron los geles de actividad de 1D, y un carril teñido con azul de Coomassie. En la parte inferior se muestra el gel de 2D

teñido con TMBZ para hemos covalentemente unidos (A) y con Coomassie (B), con los marcadores de masa molecular (MMM) del lado izquierdo, para identificar las diferentes subunidades de los complejos respiratorios que contienen citocromos. En la tabla 17 se muestran las masas moleculares y las áreas de cada subunidad identificada. Se tomaron como referencia los geles de 2D de García y colaboradores, 2012.

Tabla 17. Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (A) y Coomassie (B), de la fracción  $b_6c+caa_3$  168. En la parte superior de la tabla se indican los complejos identificados por sus actividades en geles de 1D. A continuación se enlistan las proteínas que se identificaron por su masa molecular en el gel de 2D, se muestra su nombre, su masa molecular obtenida a partir del genoma y en el gel (a/b) y su área (en pixeles).

<b><math>b_6c+caa_3</math> 168 (TMBZ)</b>					
<b>B5,C4 (<math>b_6c,caa_3</math>)</b>			<b>B6,C5 (<math>b_6c,caa_3</math>)</b>		
Masa molecular: 423.0 kDa			Masa molecular: 301.0 kDa		
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
CtaC	40.1/45	679.5	2	-/68	250.7
	-/43	116.3	3	-/58	1416.2
QcrC	28.6/32	720.9	CtaC	40.1/45	1077.2
QcrB	25.4/21	2177.7	4	-/43	319.7
QcrA	12.4/14	176.0	5	-/40	76.0
CccB	11.9/13	509.1	6	-/38	88.6
			QcrC	28.6/32	4808.6
			QcrB	25.4/21	6407.8
			CccA	12.4/14	1006.0
			CccB	11.9/13	4748.6

<b>B</b>					
<b><math>b_6c+caa_3</math> 168 (Coomassie)</b>					
<b>B5,C4 (<math>b_6c,caa_3</math>)</b>			<b>B6,C5 (<math>b_6c,caa_3</math>)</b>		
Masa molecular: 423.0 kDa			Masa molecular: 301.0 kDa		
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
CtaC	40.1/45	5326.4	2	-/69	2898.4
1	-/44	3831.1	3	-/59	3956.8
QcrC	28.6/32	6591.1	CtaC	40.1/46	6138.7
QcrB	25.4/21	9813.9	4	-/44	5291.5
QcrA	18.7/21	9604.0	5	-/40	2287.8
CccA	12.4/14	1157.6	6	-/39	4490.5
CccB	11.9/13	1049.6	QcrC	28.6/32	28541.8
			QcrB	25.4/22	20608.4
			QcrA	18.7/21	17267.0
			CccA	12.4/13	12980.4
			CccB	11.9/13	9800.7

<b>A1 (ATPasa)</b>					
Masa molecular: 127.0 kDa					
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
AtpA	54.4/65	1481.3	AtpG	31.5/46	1651.5
AtpB	51.2/64	1954.3			

- Masas moleculares (kDa) calculadas a partir del genoma.
- Masas moleculares (kDa) obtenidas en el gel de 2D.

#### ❖ **Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ**

En la figura 26A y en la tabla 17A, se muestra el análisis del gel de 2D de la fracción  $b_6C+caa_3$  168 teñido con TMBZ.

En la banda B5,C4 (gel de 1D) con actividad para los complejos  $b_6C$  y  $caa_3$ , se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. También se obtuvo la banda 1 que no correspondió a ninguna subunidad de los complejos respiratorios. Se identificó al complejo  $b_6C$  por las subunidades QcrC y QcrB. Finalmente a los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  por las proteínas CccA y CccB.

En la banda B6,C5 (gel de 1D) con actividad para los complejos  $b_6C$  y  $caa_3$ , se obtuvieron las bandas 2, 3, 4, 5 y 6, que no correspondieron a ninguna subunidad de alguno de los complejos respiratorios. Se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. También al complejo  $b_6C$  por las subunidades QcrC y QcrB. Por último se identificaron los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  por las proteínas CccA y CccB.

#### ❖ **Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie**

En la figura 26B y en la tabla 17B se muestra el análisis del gel de la fracción  $b_6C+caa_3$  168, teñido con azul de Coomassie.

En la banda B5,C4 (1D) con actividad para los complejos  $b_6C$  y  $caa_3$ , se identificó a la  $caa_3$  por la proteína CtaC. Se obtuvo la banda 1, que no correspondió con ninguna subunidad de los complejos respiratorios. También se identificó al complejo  $b_6C$  por las subunidades QcrC, QcrB y QcrA. Por último a los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  por las proteínas CccA y CccB respectivamente.

En la banda B6,C5 (1D) con actividad para los complejos  $b_6C$  y  $caa_3$ , se obtuvieron las bandas 2, 3, 4, 5 y 6 de identidad desconocida. Se identificaron las subunidades del complejo  $b_6C$ , QcrC, QcrB y QcrA. Por último a los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  por las proteínas CccA y CccB, respectivamente.

En la banda A1 (1D), se identificaron las subunidades AtpA y AtpB de la ATPasa.

En una de las bandas del gel de 1D, que no coincidió con las tinciones de actividad de los complejos, se identificó la subunidad AtpG de la ATPasa.

❖ Fracción del complejo  $b_6c+caa_3$  LUW46

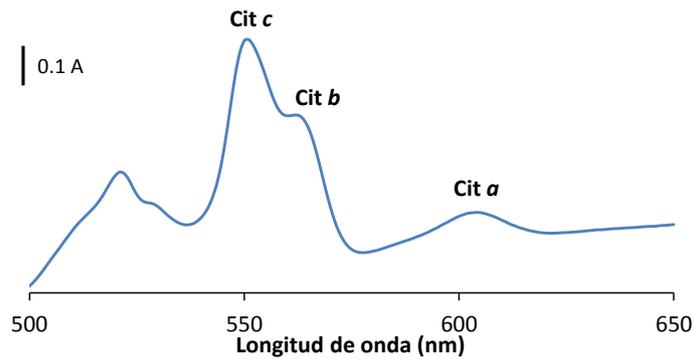


Figura 27. Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción  $b_6c+caa_3$  LUW46 identificada por los picos alfa de los citocromos  $c$ ,  $b$  y  $a$ . Esta fracción fue obtenida en las tres cromatografías de la 168. A. absorbancia.

La figura 27 muestra el espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), que se obtuvo a una concentración de 100 a 219 mM de NaCl, y se identificaron citocromos  $c$ ,  $b$  y  $a$ , correspondientes a los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$  en las tres cromatografías de la LUW46, por lo que inferimos que en esta fracción se obtuvo al súper complejo  $b_6c+caa_3$ .

❖ Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión)

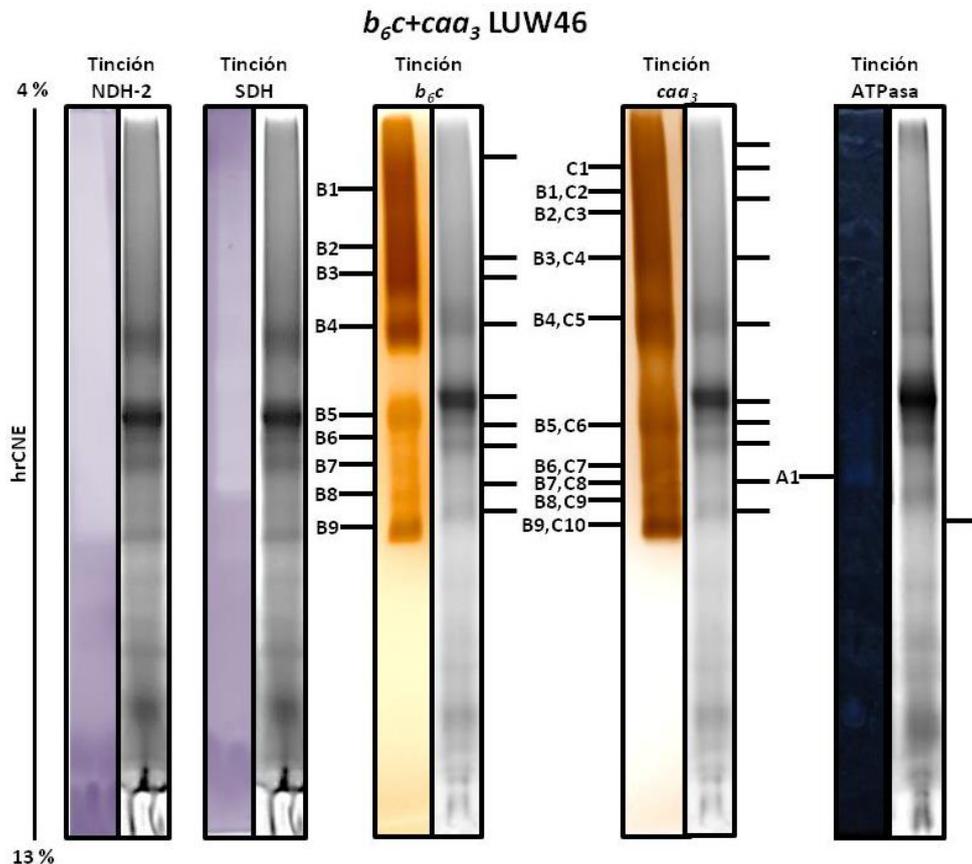


Figura 28. Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida de la fracción  $b_6c+caa_3$  LUW46, con 100  $\mu$ g de proteína, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de *B. subtilis* (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo  $b_6c$ , C = citocromo  $c$  oxidasa  $caa_3$  y

A = ATPsintasa). Cada banda se nombró con la primera letra del nombre del complejo respiratorio según la tinción y un número en orden descendente. El número 1 corresponde a la banda de mayor masa molecular. Al lado derecho de cada carril de actividad se muestra un carril de la misma fracción, teñido con azul de Coomassie. En aquellas bandas donde se obtuvo actividad para más de un complejo, se les puso al lado la letra numerada correspondiente a la banda del complejo con el que coincidieron.

Tabla 18. Áreas relativas de actividad en pixeles, masas moleculares e identidades de las bandas teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa. Cada banda se nombró con la primer letra del complejo de la tinción en cuestión, y se le asignó un número de arriba hacia abajo por su masa molecular.

Fracción $b_6c+caa_3$ LUW46			
Banda	Área (Pixeles)	Masa molecular kDa	Estequiometrías propuestas
<b><math>b_6c</math></b>			
B1	31323.3	1346.0	$8b_6c+5caa_3+4c_{550}+4c_{551}$
B2	13568.8	1046.0	$6b_6c+3caa_3+3c_{550}+3c_{551}$
B3	14630.2	554.5	$4b_6c+2caa_3+2c_{550}+2c_{551}$
B4	24129.6	432.6	$2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$
B5	45385.9	242.5	$2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B6	2474.1	183.5	$2b_6c$
B7	4401.7	161.0	$2b_6c$
B8	6056.6	122.2	$2b_6c$
B9	17948.9	104.5	$2b_6c$
<b><math>caa_3</math></b>			
C1	19543.3	1437.0	$10b_6c+5caa_3+5c_{550}+5c_{551}$
B1,C2	10508.1	1220.5	$8b_6c+4caa_3+4c_{550}+4c_{551}$
B2,C3	9576.9	786.0	$6b_6c+3caa_3+3c_{550}+3c_{551}$
B3,B4	30915.7	678.0	$4b_6c+2caa_3+2c_{550}+2c_{551}$
B4,C5	34986.5	429.0	$2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$
B5,C6	10615.5	226.0	$2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B6,C7	12712.1	180.3	$caa_3$
B7,C8	5506.6	164.3	$caa_3$
B8,C9	8575.4	129.6	$caa_3$
B9,C10	17977.2	104.6	$caa_3$
<b>ATPasa</b>			
A1	200.7	106.0	$\alpha$ y $\beta$

En la figura 28 se muestran los carriles del gel de la fracción  $b_6c+caa_3$  LUW46, teñidos para la actividad de: NDH, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa. En esta fracción se detectó actividad para el complejo  $b_6c$ , la  $caa_3$  y la ATPasa (Tabla 18).

Para el complejo  $b_6c$  se obtuvieron las bandas B1 a B9, de las cuales la banda B5 podría corresponder con un tetrámero del complejo y las bandas B6 a B9 podrían corresponder en masa molecular al dímero del  $b_6c$ . En cuanto a la actividad, la mayor área se obtuvo en el rango de los 1346 a 242.5 kDa, y en la banda de 104.5 kDa.

Para el complejo  $caa_3$ , se obtuvieron las bandas C1 a C10, de las cuales la banda C1 no correspondió con la actividad del  $b_6c$  pero podría tratarse de la estequiometría del súper complejo  $10b_6c+5caa_3+5c_{550}+5c_{551}$ , que no tuvo la cantidad de proteína suficiente para ser detectado en la tinción. Las bandas C2 a C5 correspondieron con la actividad del complejo  $b_6c$ , y por su masa molecular se les asignaron a diferentes estequiometrías del súper complejo como se muestra en la tabla 18. Las bandas C7 a C10 también coincidieron con lo que podría ser el monómero de la  $caa_3$ . En cuanto a la actividad, las mayores áreas se obtuvieron en el rango de

1437 a 180.3 kDa, y en la banda de 104.6 kDa. Este rango fue similar al obtenido en la tinción del *b<sub>6</sub>C*.

Para la tinción de la ATPasa, nuevamente se obtuvo una sola banda A1 correspondiente a la suma de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ATPasa.

❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE):

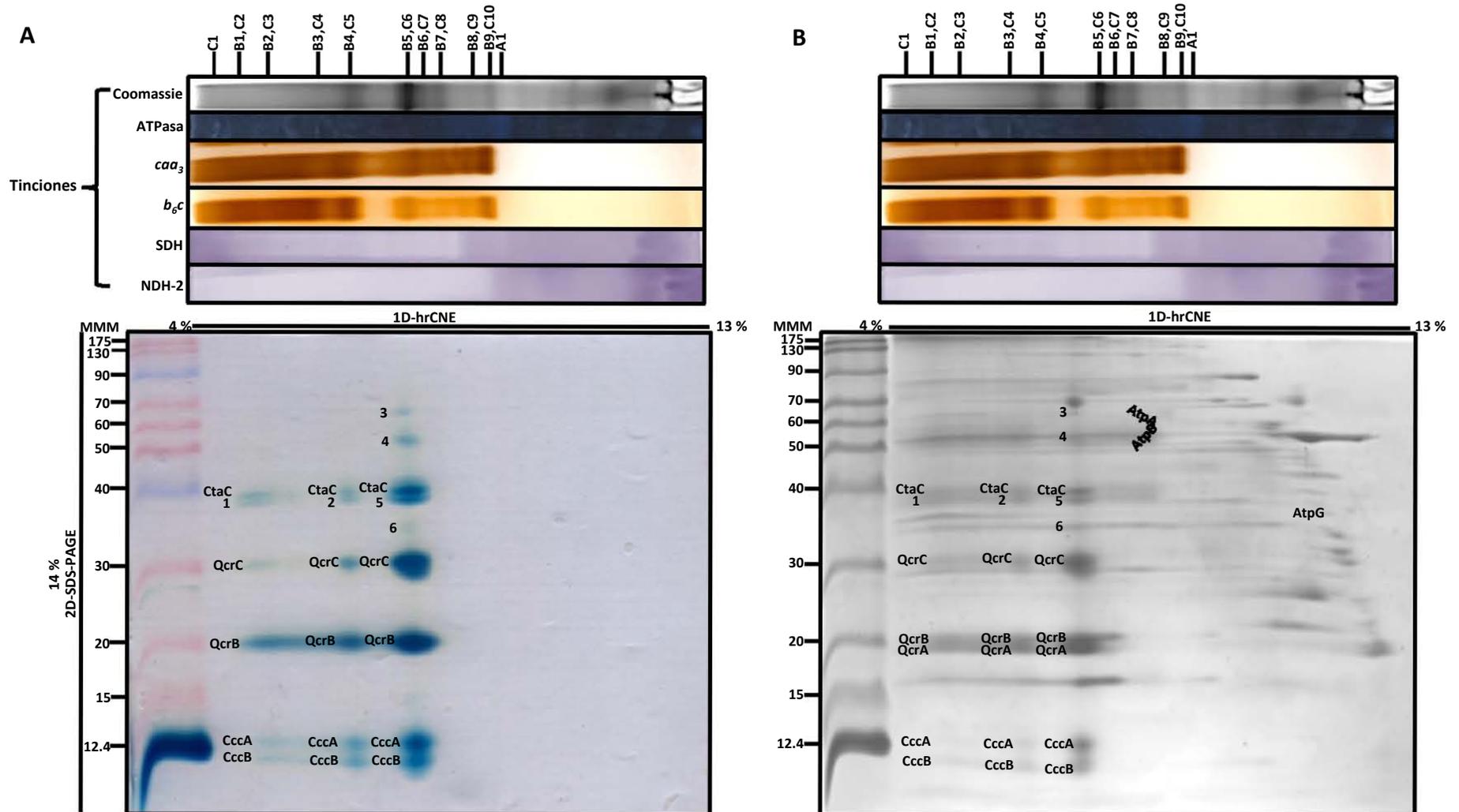


Figura 29. Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D de la fracción  $b_6c+caa_3$  LUW46, previamente teñidos para la actividad de los complejos NDH (N), SDH (S),  $b_6c$  (B),  $caa_3$  (C) y ATPasa (A), por

medio de geles SDS-PAGE al 14.0 % de acrilamida. En la parte superior se acomodaron los geles de actividad de 1D, y un carril teñido con azul de Coomassie. En la parte inferior se muestra el gel de 2D teñido con TMBZ para hemos covalentemente unidos (A) y con Coomassie (B), con los marcadores de masa molecular (MMM) del lado izquierdo, para identificar las diferentes subunidades de los complejos respiratorios que contienen citocromos. En la tabla 19 se muestran las masas moleculares y las áreas de cada subunidad identificada. Se tomaron como referencia los geles de 2D de García y colaboradores, 2012.

Tabla 19. Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (A) y Coomassie (B), de la fracción  $b_6c+caa_3$  LUW46. En la parte superior de la tabla se indican los complejos identificados por sus actividades en geles de 1D. A continuación se enlistan las proteínas que se identificaron por su masa molecular en el gel de 2D, se muestra su nombre, su masa molecular obtenida a partir del genoma y en el gel (a/b) y su área (en pixeles). La tabla se dividió en secciones por ser demasiado grande.

$b_6c+caa_3$ LUW46 (TMBZ)					
B1,C2 ( $b_6c,caa_3$ ) Masa molecular: 1220.5 kDa			B4,C5 ( $b_6c,caa_3$ ) Masa molecular: 429.0 kDa		
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
CtaC	40.1/43	540.6	CtaC	40.1/44	384.2
1	-/42	350.1	2	-/42	276.2
QcrC	28.6/30	479.8	QcrC	28.6/31	959.6
QcrB	25.4/20	2233.9	QcrB	25.4/20	3811.7
CccA	12.4/12	570.1	CccA	12.4/12	1482.8
CccB	11.9/11	437.8	CccB	11.9/11	1008.3

$b_6c+caa_3$ LUW46 (Coomassie)					
B1,C2 ( $b_6c,caa_3$ ) Masa molecular: 1220.5 kDa			B4,C5 ( $b_6c,caa_3$ ) Masa molecular: 429.0 kDa		
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
CtaC	40.1/43	1378.8	CtaC	40.1/43	1245.4
1	-/41	1088.0	2	-/42	1003.1
QcrC	28.6/30	1248.7	QcrC	28.6/30	1518.7
QcrB	25.4/20	1517.3	QcrB	25.4/20	2329.6
QcrA	18.7/19	1629.4	QcrA	18.7/19	2402.6
CccA	12.4/12	202.5	CccA	12.4/12	613.8
CccB	11.9/11	442.3	CccB	11.9/11	754.6

B5,C6 ( $b_6c,caa_3$ ) Masa molecular: 226.0 kDa			A1 (ATPasa) Masa molecular: 106.0 kDa		
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
3	-/64	265.9	AtpA	54.4/62	134.0
4	-/58	1163.4	AtpB	51.2/60	306.1
CtaC	40.1/43	1537.1			
5	-/42	1078.3			
6	-/36	729.7			
QcrC	28.6/30	5646.0			
QcrB	25.4/20	3543.1			
QcrA	18.7/19	3331.8			
CccA	12.4/12	2781.5			
CccB	11.9/11	2009.6			

-		
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
AtpG	31.5/39	273.7

Subunidades del complejo respiratorio		
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
AtpG	31.5/39	273.7

- Masas moleculares (kDa) calculadas a partir del genoma.
- Masas moleculares (kDa) obtenidas en el gel de 2D.

#### ❖ **Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ**

En la figura 29A y en la tabla 19A se muestra el análisis del gel de 2D de la fracción  $b_{6C}+caa_3$  LUW46 teñido con TMBZ.

En la banda B1,C2 (1D) con actividad para los complejos  $b_{6C}$  y  $caa_3$ , se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. Se obtuvo la banda 1 que no correspondió con ninguna subunidad de los complejos respiratorios. También se identificó al complejo  $b_{6C}$  por las subunidades QcrC y QcrB. Por último a los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  por las proteínas CccA y CccB.

En la banda B4,C5 (1D) con actividad de los complejos  $b_{6C}$  y  $caa_3$ , se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. Se obtuvo la banda 2 que no coincidió con ninguna de las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria. Se identificó al complejo  $b_{6C}$  por las subunidades QcrC y QcrB. Finalmente a los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  por las proteínas CccA y CccB.

En la banda B5,C6 (1D) con actividad para los complejos  $b_{6C}$  y  $caa_3$ , se obtuvieron las bandas 3 a 6 de identidad desconocida. Se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. También se identificó al complejo  $b_{6C}$  por las subunidades QcrC y QcrB. En la parte inferior del gel se identificaron a los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  por las proteínas CccA y CccB respectivamente.

#### ❖ **Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie**

En la figura 29B y la tabla 19B se analizó el gel de la fracción  $b_{6C}+caa_3$  LUW46 teñido con azul de Coomassie.

En la banda B1,C2 (1D) con actividad para los complejos  $b_{6C}$  y  $caa_3$ , se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. Se obtuvo la banda 1 de identidad desconocida. Se identificó al complejo  $b_{6C}$  por las subunidades QcrC, QcrB y QcrA. Por último se identificaron a los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  por las proteínas CccA y CccB.

En la banda B4,C5 (1D) con actividad para los complejos  $b_{6C}$  y  $caa_3$ , se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. Se obtuvo a la banda 2 de identidad desconocida. También se identificó al complejo  $b_{6C}$  por las subunidades QcrC, QcrB y QcrA. Por último se identificaron los citocromos  $C_{550}$  y del  $C_{551}$  por las proteínas CccA y CccB.

En la banda B5,C6 (1D) con actividades para los complejos  $b_{6C}$  y  $caa_3$ , se obtuvieron las bandas 3 a 6 de identidad desconocida. Se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. También se identificó al complejo  $b_{6C}$  por las subunidades QcrC, QcrB y QcrA, y a los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  por las proteínas CccA y CccB respectivamente.

En la banda A1 (1D) con actividad para la ATPasa, se identificaron las subunidades AtpA y AtpB de la ATPasa.

También se identificó a la subunidad AtpG en una de las bandas de baja masa molecular del gel de 1D que no tuvieron actividad para alguno de los complejos respiratorios en el gel de 1D.

### ❖ Comparación de las fracciones $b_6c+caa_3$ 168 y LUW46

#### ❖ Espectros diferenciales

Tanto la fracción  $b_6c+caa_3$  168 como  $b_6c+caa_3$  LUW46, se obtuvieron a un rango de concentración de NaCl similares en las cromatografías, 100 a 227.6 mM y 100 a 219 mM de NaCl respectivamente. Además los picos alfa de los citocromos  $c$ ,  $b$  y  $a$  fueron prácticamente los mismos para ambas fracciones.

#### ❖ Geles hrcNE de 1D

Al comparar las áreas de actividad de las dos fracciones, la fracción del  $b_6c+caa_3$  LUW46 tuvo mayor área de actividad en el rango de entre 1400 a 240 kDa, mientras que en  $b_6c+caa_3$  168 se obtuvo en el rango de 430 a 110 kDa, tanto para la tinción del complejo  $b_6c$  como para la  $caa_3$ , indicándonos que al producir una mayor cantidad del súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  y en estequiometrías mayores, la bacteria puede compensar la falta de la  $aa_3$  en la LUW46.

#### ❖ Geles SDS-PAGE de 2D

En ambas fracciones, los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  son parte del súper complejo  $b_6c+caa_3$ .

En el análisis de los geles 2D, la principal diferencia entre estas dos fracciones fue que para la fracción  $b_6c+caa_3$  LUW46, la concentración de citocromos en la banda de alrededor de 1220 kDa del gel de 1D, fue la suficiente como para poder observar con TMBZ las subunidades de la  $caa_3$ , el  $b_6c$  y los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  (Figura 29A). Mientras, en la banda equivalente en masa molecular en el gel de 1D de la fracción  $b_6c+caa_3$  168, no se obtuvo señal para alguna de estas subunidades (Figura 26A). Por lo que en la mutante LUW46 la falta de la quinol oxidasa  $aa_3$  es compensada por los súper complejos  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  en estequiometrías mayores, confirmando lo observado en el análisis de los geles de 1D.

#### ❖ Fracción de los complejos SDH+ $aa_3$ 168

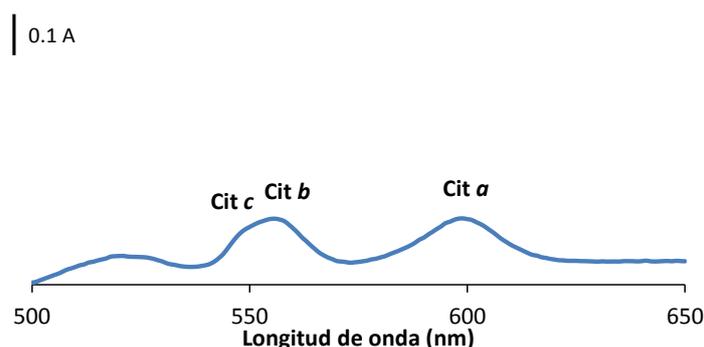


Figura 30. Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción SDH+ $aa_3$  168 identificada por los picos alfa de los citocromos  $c$ ,  $b$  y  $a$ . Esta fracción fue obtenida en las tres cromatografías de la 168. A. absorbancia.

La figura 30, contiene el espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado) de la fracción obtenida entre 230.7 y 474.4 mM de NaCl, donde se identificaron citocromos correspondientes a los complejos SDH+ $aa_3$ . Los picos alfa de los citocromos  $c$ ,  $b$  y  $a$ , en las fracciones equivalentes de las tres cromatografías fueron prácticamente los mismos, pero sus concentraciones relativas variaron entre repeticiones (Tabla suplementaria 1).

❖ Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión)

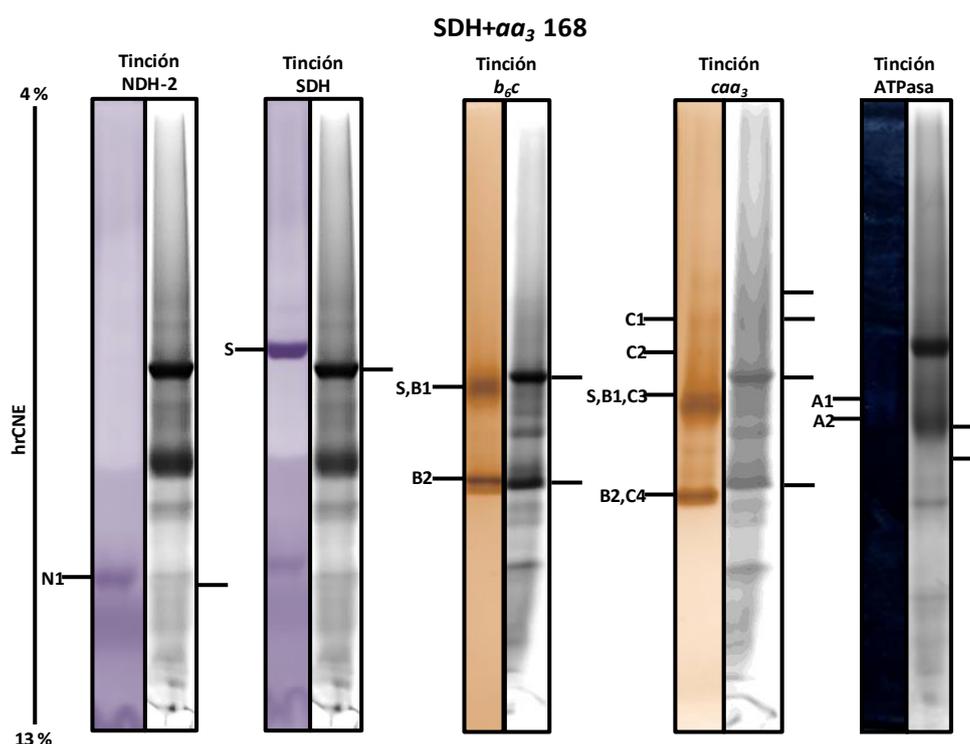


Figura 31. Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida de la fracción SDH+ $aa_3$  168, con 100  $\mu$ g de proteína, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de *B. subtilis* (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo  $b_6c$ , C = citocromo c oxidasa  $caa_3$  y A = ATPsintasa). Cada banda se nombró con la primera letra del nombre del complejo respiratorio según la tinción y un número en orden descendente. El número 1 corresponde a la banda de mayor masa molecular. Al lado derecho de cada carril de actividad se muestra un carril de la misma fracción, teñido con azul de Coomassie. En aquellas bandas donde se obtuvo actividad para más de un complejo, se les puso al lado la letra numerada correspondiente a la banda del complejo con el que coincidieron.

Tabla 20. Áreas relativas de actividad en pixeles, masas moleculares e identidades de las bandas teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa. Cada banda se nombró con la primer letra del complejo de la tinción en cuestión, y se le asignó un número de arriba hacia abajo por su peso molecular.

SDH+ $aa_3$ 168			
Banda	Área (Pixeles)	Masa molecular kDa	Estequiometrías propuestas
<b>NDH-2</b>			
N	9145.7	37.5	Monómero
<b>SDH</b>			
S	14020.5	249.3	Dímero
<b><math>b_6c</math></b>			
S,B1	1582.2	252.5	SDH+2 $b_6c$ + $c_{550}$ + $c_{551}$ $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ , $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B2	16555.6	99.0	$2b_6c$
<b><math>caa_3</math></b>			
C1	2306.7	445.5	$4b_6c+2caa_3+2c_{550}+2c_{551}$
C2	1389.4	386.5	$2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$
S,B1,C3	7046.4	245.0	SDH+2 $b_6c$ + $c_{550}$ + $c_{551}$ $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ , $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B2,C4	41878.8	114.0	$caa_3$
<b>ATPasa</b>			
A1	210.0	128.5	$\alpha$ y $\beta$
A2	85.5	117.0	$\alpha$ y $\beta$

En la figura 31 y en la tabla 20 se muestra el análisis de los carriles de la fracción SDH+ $aa_3$  168, teñidos para la actividad de: NDH, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa.

En esta fracción se obtuvo la banda N1, con una masa molecular cercana al monómero del complejo de 41.7 kDa. Este complejo no se asoció con algún otro complejo respiratorio.

En la tinción de la SDH, se obtuvo una banda de actividad nombrada como S, con una masa molecular cercana a un dímero de la SDH o un monómero del complejo asociado con alguna otra proteína.

Para la tinción del complejo  $b_6c$  se obtuvieron dos bandas, B1 que coincidió con la banda de actividad de la SDH pudiendo ser SDH+ $2b_6c+C_{550}+C_{551}$ ,  $2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ ,  $4b_6c+C_{550}+C_{551}$  o una combinación de los tres, por su masa molecular. La banda B2 correspondió en masa molecular a un dímero del complejo  $b_6c$ . Llama mucho la atención haber encontrado actividad del  $b_6c$  en esta fracción donde se pensaba que solo contenía a los complejos SDH y  $aa_3$ .

Con respecto a la tinción de la  $caa_3$ , se obtuvieron cuatro bandas C1 y C2, que solamente tuvieron actividad para la  $caa_3$ , siendo posiblemente los súper complejos  $4b_6c+2caa_3+2C_{550}+2C_{551}$  y  $2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ , por su masa molecular pero la cantidad de proteína no fue la suficiente para ser detectados en la tinción del complejo  $b_6c$ . La banda C3 coincidió con la actividad de la SDH y del complejo  $b_6c$  pudiendo ser SDH+ $2b_6c+C_{550}+C_{551}$ ,  $2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ ,  $4b_6c+C_{550}+C_{551}$  o una mezcla de estos tres. La banda C4 correspondió con la banda para el dímero del  $b_6c$  o con el monómero de la  $caa_3$ . La mayor actividad se mantuvo en las bandas C3 y C4.

En el caso de la ATPasa se obtuvo la banda A1, correspondiente en masa molecular a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ATPasa, y la banda A2 con una masa similar a la banda anterior.

❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE):

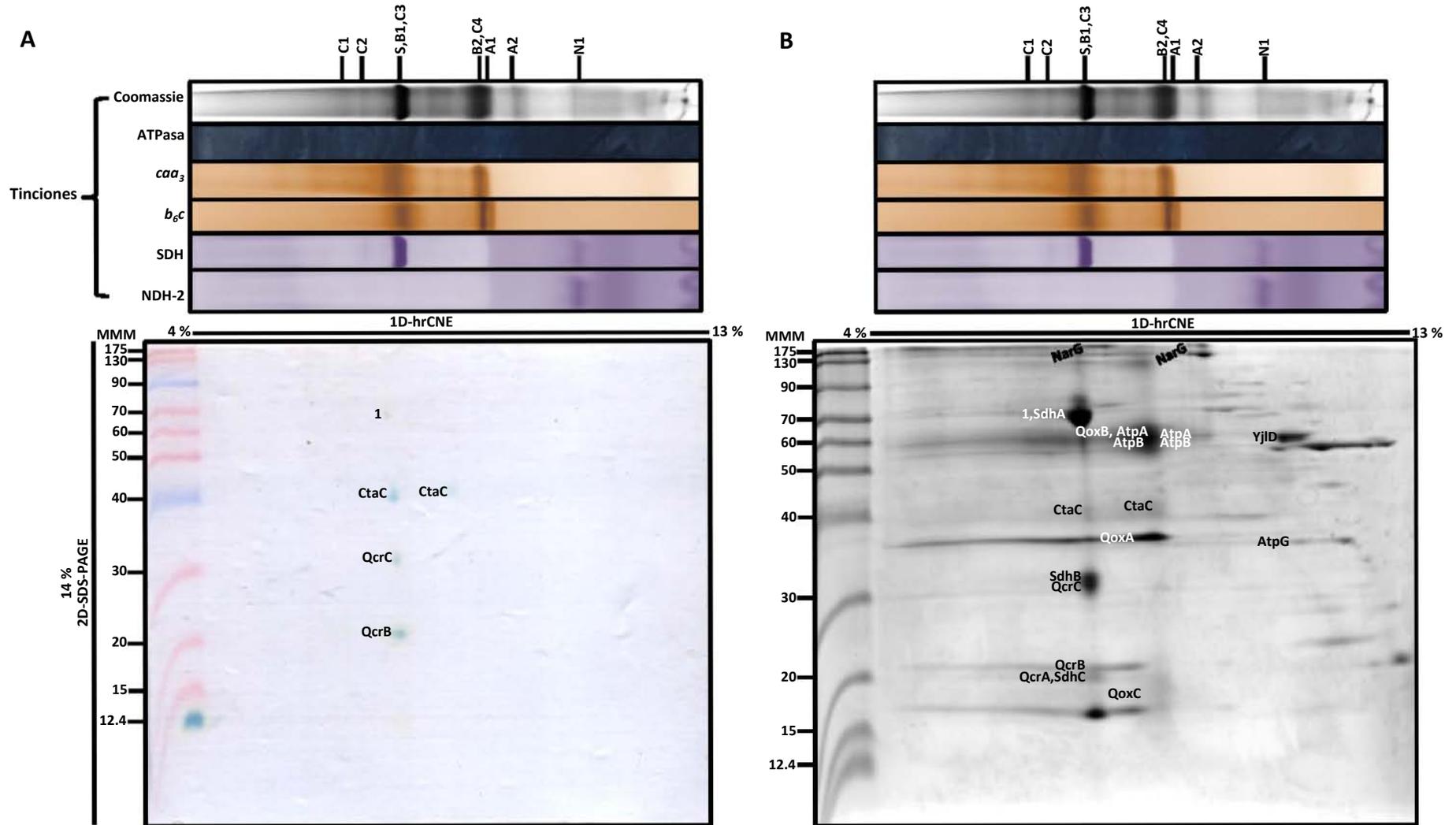


Figura 32. Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D de la fracción SDH+*aa3* 168, previamente teñidos para la actividad de los complejos NDH (N), SDH (S), *b6c* (B), *cca3* (C) y ATPase (A), por medio

de geles SDS-PAGE al 14.0 % de acrilamida. En la parte superior se acomodaron los geles de actividad de 1D, y un carril teñido con azul de Coomassie. En la parte inferior se muestra el gel de 2D teñido con TMBZ para hemos covalentemente unidos (A) y con Coomassie (B), con los marcadores de masa molecular (MMM) del lado izquierdo, para identificar las diferentes subunidades de los complejos respiratorios que contienen citocromos. En la tabla 21 se muestran las masas moleculares y las áreas de cada subunidad identificada. Se tomaron como referencia los geles de 2D de García y colaboradores, 2012.

Tabla 21. Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (A) y con Coomassie (B), de la fracción SDH+aa<sub>3</sub> 168. En la parte superior de la tabla se indican los complejos identificados por sus actividades en geles de 1D. A continuación se enlistan las proteínas que se identificaron por su masa molecular en el gel de 2D, se muestra su nombre, su masa molecular obtenida a partir del genoma y en el gel (a/b) y su área (en pixeles).

<b><i>b<sub>6</sub>c+caa<sub>3</sub></i> LUW46 (TMBZ)</b>					
<b>B1,C2 (<i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i>)</b> Masa molecular: 1220.5 kDa			<b>B4,C5 (<i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i>)</b> Masa molecular: 429.0 kDa		
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
CtaC	40.1/43	540.6	CtaC	40.1/44	384.2
1	-/42	350.1	2	-/42	276.2
QcrC	28.6/30	479.8	QcrC	28.6/31	959.6
QcrB	25.4/20	2233.9	QcrB	25.4/20	3811.7
CccA	12.4/12	570.1	CccA	12.4/12	1482.8
CccB	11.9/11	437.8	CccB	11.9/11	1008.3

<b>B</b>	<b><i>b<sub>6</sub>c+caa<sub>3</sub></i> LUW46 (Coomassie)</b>					
	<b>B1,C2 (<i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i>)</b> Masa molecular: 1220.5 kDa			<b>B4,C5 (<i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i>)</b> Masa molecular: 429.0 kDa		
	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
	CtaC	40.1/43	1378.8	CtaC	40.1/43	1245.4
1	-/41	1088.0	2	-/42	1003.1	
QcrC	28.6/30	1248.7	QcrC	28.6/30	1518.7	
QcrB	25.4/20	1517.3	QcrB	25.4/20	2329.6	
QcrA	18.7/19	1629.4	QcrA	18.7/19	2402.6	
CccA	12.4/12	202.5	CccA	12.4/12	613.8	
CccB	11.9/11	442.3	CccB	11.9/11	754.6	

<b>Subunidades del complejo respiratorio</b>	<b>B5,C6 (<i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i>)</b> Masa molecular: 226.0 kDa			<b>A1 (ATPasa)</b> Masa molecular: 106.0 kDa		
	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
	3	-/64	265.9	AtpA	54.4/62	134.0
	4	-/58	1163.4	AtpB	51.2/60	306.1
CtaC	40.1/43	1537.1				
5	-/42	1078.3				
6	-/36	729.7				
QcrC	28.6/30	5646.0				
QcrB	25.4/20	3543.1				
QcrA	18.7/19	3331.8				
CccA	12.4/12	2781.5				
CccB	11.9/11	2009.6				

<b>Subunidades del complejo respiratorio</b>	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
	AtpG	31.5/39	273.7

- a. Masas moleculares (kDa) calculadas a partir del genoma.  
 b. Masas moleculares (kDa) obtenidas en el gel de 2D.

#### ❖ **Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ**

En la figura 32A y la tabla 21A se muestra el análisis del gel teñido con TMBZ de la fracción SDH+ $aa_3$  168.

En la banda S,B1,C3 (1D) con actividad para los complejos SDH,  $b_6c$  y  $caa_3$ , se obtuvo la banda 1 de identidad desconocida. Se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. También se identificó al complejo  $b_6c$  por las subunidades QcrC y QcrB.

En la banda B2,C4,A1 (1D) con actividad para los complejo  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa, se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC.

#### ❖ **Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie**

El análisis del gel de 2D de la fracción SDH+ $aa_3$  168, teñido con azul de Coomassie se muestra en la figura 32B y la tabla 21B.

En la banda S,B1,C3 (1D) con actividad par los complejos SDH,  $b_6c$  y  $caa_3$ , se identificó a la SDH por las subunidades SdhA, SdhB y SdhC. Se obtuvo la banda 1, a la cual no se le pudo asignar identidad por su masa molecular. Se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. Por último se identificó al complejo  $b_6c$  por las subunidades QcrC, QcrB y QcrA.

Se identificó a NarG, de la NAR, en una de las bandas del gel de 1D sin actividad para uno de los complejos de la cadena respiratoria.

En la banda B2,C4 (1D) con actividad para los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$ , se identificó a la quinol oxidasa  $aa_3$  por las subunidades QoxB, QoxA y QoxC. Por último se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC.

En la banda A1 (1D) con actividad para la ATPasa, se identificaron las subunidades AtpA y AtpB.

En la banda A2 (1D) con actividad de la ATPasa, se identificó a NarG de la NAR, y a AtpA y AtpB.

En la banda N1 (1D) con actividad de NDH, se identificó a la NDH por la proteína YjID y a AtpG.

❖ **Fracción del complejo SDH+*caa*<sub>3</sub> LUW46**

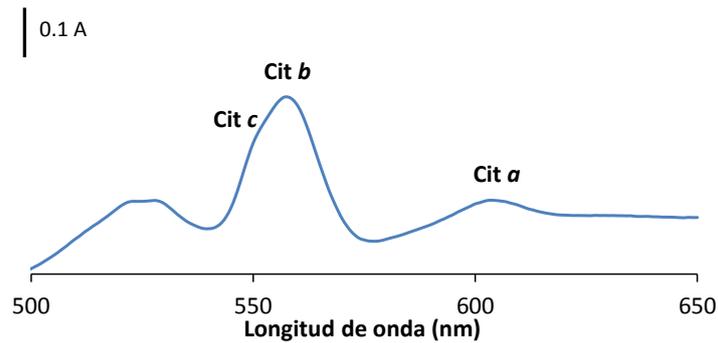


Figura 33. Espectro diferencial (reducido con ditionita menos oxidado), representativo de la fracción SDH+*caa*<sub>3</sub> LUW46 identificada por los picos alfa de los citocromos *c*, *b* y *a*. Esta fracción fue obtenida en las tres cromatografías de la LUW46. A. absorbancia.

Por último, la figura 33 contiene el espectro diferencial de la fracción que se obtuvo a una concentración de 190.1 a 266.6 mM de NaCl, donde se identificaron citocromos *c*, *b* y *a* reportados para los de los complejos SDH y *caa*<sub>3</sub>. Los picos alfa de los citocromos *c*, *b* y *a*, en las fracciones equivalentes de las tres cromatografías fueron prácticamente los mismos, pero sus concentraciones relativas variaron entre repeticiones.

❖ **Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (primera dimensión)**

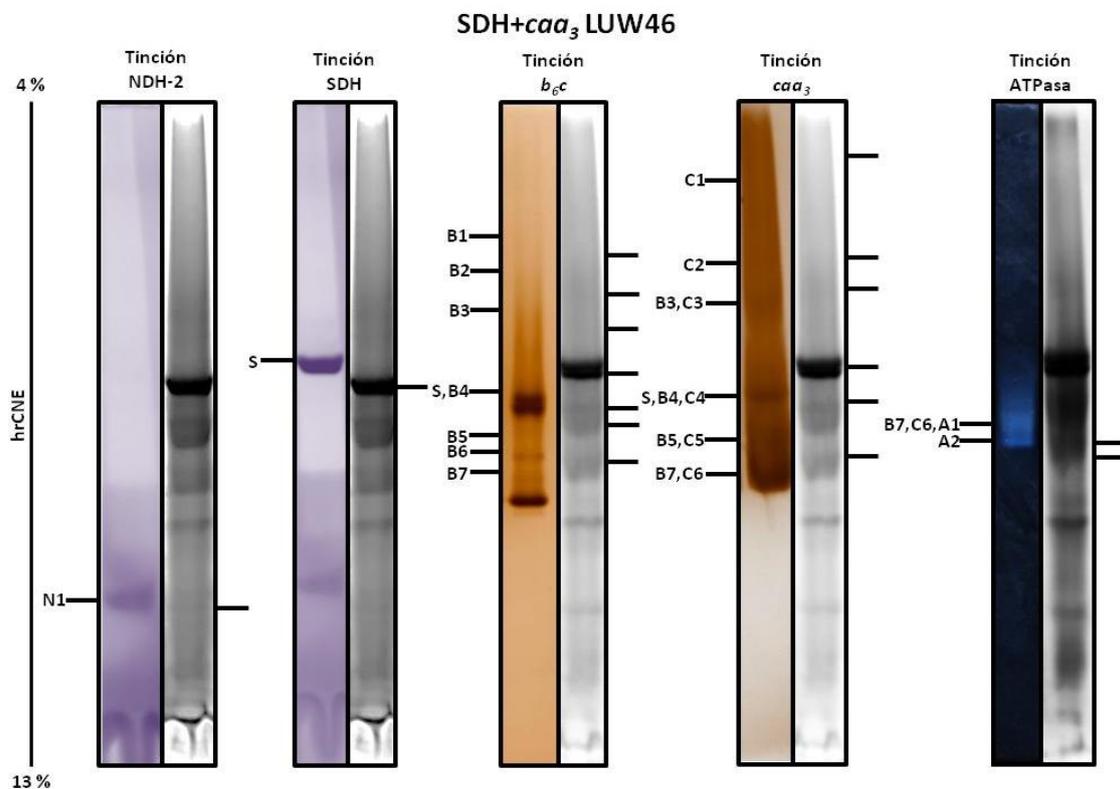


Figura 34. Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida de la fracción SDH+*caa*<sub>3</sub> LUW46, con 100 µg de proteína, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de *B. subtilis* (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo *b*<sub>6</sub>*c*, C = citocromo *c* oxidasa *caa*<sub>3</sub> y A = ATPsintasa). Cada banda se nombró con la primera letra del nombre del complejo respiratorio según la tinción y un número en orden descendente. El número 1 corresponde a la banda de mayor masa molecular. Al lado derecho

de cada carril de actividad se muestra un carril de la misma fracción, teñido con azul de Coomassie. En aquellas bandas donde se obtuvo actividad para más de un complejo, se les puso al lado la letra numerada correspondiente a la banda del complejo con el que coincidieron.

Tabla 22. Áreas relativas de actividad en pixeles, masas moleculares e identidades de las bandas teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa. Cada banda se nombró con la primer letra del complejo de la tinción en cuestión, y se le asignó un número de arriba hacia abajo por su peso molecular.

SDH+ $caa_3$ LUW46			
Banda	Actividad (Pixeles)	Masa molecular kDa	Estequiometrías propuestas
<b>NDH-2</b>			
N1	8401.6	38.0	Monómero
<b>SDH</b>			
S	15439.5	232.0	Dímero
<b><math>b_6c</math></b>			
B1	3149.2	578.5	$4b_6c+2caa_3+2c_{550}+2c_{551}$
B2	7581.3	438.5	$2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$
B3	1535.5	306.0	$2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$
S,B4	14071.7	213.0	SDH+ $2b_6c+c_{550}+c_{551}$ , $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ , $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B5	934.4	171.5	$2b_6c$
B6	2989.3	145.5	$2b_6c$
B7	40222.0	114.5	$2b_6c$
<b><math>caa_3</math></b>			
C1	2760.2	1241.0	$8b_6c+4caa_3+4c_{550}+4c_{551}$
C2	10711.1	505.5	$2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$
B3,C3	22527.6	409.0	$2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$
S,B4,C4	16402.0	236.0	SDH+ $2b_6c+c_{550}+c_{551}$ , $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ , $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B5,C5	30419.4	195.5	$caa_3$
B7,C6	52670.2	114.0	$caa_3$
<b>ATPasa</b>			
B7,C6,A1	2773.3	145.5	$2b_6c$ , $caa_3$ , $\alpha$ y $\beta$
A2	536.3	117.5	$\alpha$ y $\beta$

En la figura 34 y en la tabla 22 se muestra el análisis de los carriles de la fracción SDH+ $caa_3$  LUW46, teñidos para la actividad de: NDH, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa.

En la tinción de la NDH se obtuvo la banda, N1, correspondiente en masa molecular a un monómero del complejo. Éste complejo no se asoció a otro complejo respiratorio.

Para la tinción de la SDH, se obtuvo una banda de actividad correspondiente en masa molecular a un dímero del complejo o en asociación con alguna otra proteína.

Para la tinción del complejo  $b_6c$ , se obtuvieron las bandas B1 a B7. La banda B4 coincidió con la actividad de la SDH y las bandas B5 a B7 con el dímero del complejo  $b_6c$ . En las bandas B4 y B7 se obtuvo la mayor área de actividad.

En la tinción de la  $caa_3$ , se obtuvieron las bandas C1 a C6, de las cuales C1 y C2, no coincidieron con ninguna banda en la tinción del complejo  $b_6c$ , siendo las posibles estequiometrías de los súper complejos  $8b_6c+4caa_3+4c_{550}+4c_{551}$  y  $2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$ . La banda C3 que coincidió con la tinción del complejo  $b_6c$ , correspondió con la estequiometría  $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$  del súper complejo. La banda C4 coincidió con la actividad de la SDH y el  $b_6c$  pudiéndose tratar de SDH+ $2b_6c+c_{550}+c_{551}$ ,  $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ ,  $4b_6c+c_{550}+c_{551}$  o una mezcla de todos estos, por lo que la interacción de la SDH con el  $b_6c$  es muy probable. Además las bandas C5 y C6 podrían ser un

dímero del  $b_6c$  o un monómero de la  $caa_3$ . La mayor área de actividad se obtuvo en el rango de 409 a 114 kDa.

Para la ATPasa se obtuvieron dos bandas, la banda A1 correspondiente en masa molecular a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , más una  $\alpha$  o una  $\beta$  adicional, y coincidió con la actividad del  $b_6c$  y la  $caa_3$ . La banda A2 correspondió a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ATPasa.

❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE):

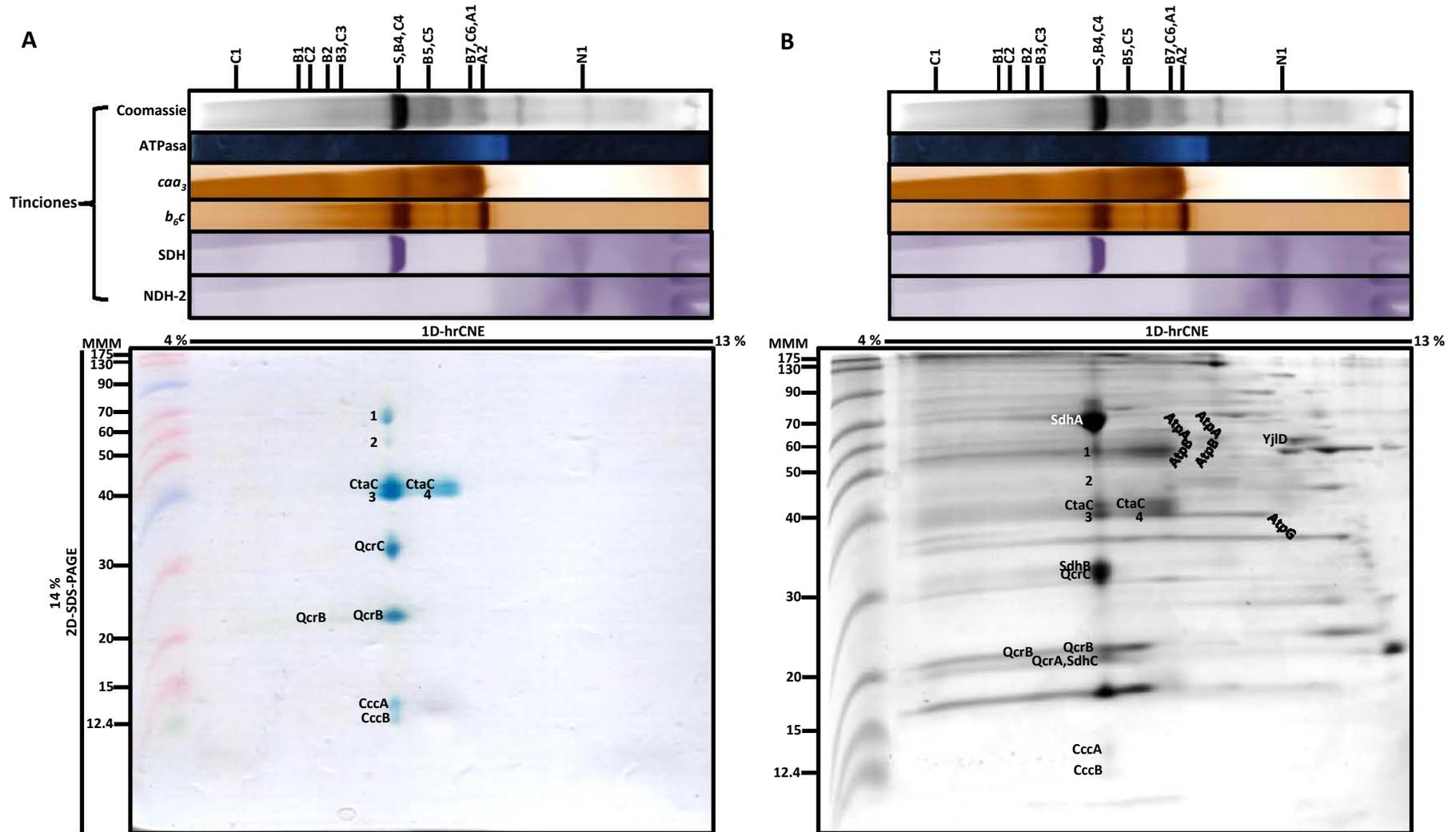


Figura 35. Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D de la fracción SDH+*caa*<sub>3</sub> LUW46, previamente teñidos para la actividad de los complejos NDH (N), SDH (S), *b*<sub>6</sub>*c* (B), *caa*<sub>3</sub> (C) y ATPasa (A), por

medio de geles SDS-PAGE al 14.0 % de acrilamida. En la parte superior se acomodaron los geles de actividad de 1D, y un carril teñido con azul de Coomassie. En la parte inferior se muestra el gel de 2D teñido con TMBZ para hemos covalentemente unidos (A) y con Coomassie (B), con los marcadores de masa molecular (MMM) del lado izquierdo, para identificar las diferentes subunidades de los complejos respiratorios que contienen citocromos. En la tabla 23 se muestran las masas moleculares y las áreas de cada subunidad identificada. Se tomaron como referencia los geles de 2D de García y colaboradores, 2012.

Tabla 23. Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (B) y Coomassie (B) de la fracción SDH+*caa*<sub>3</sub> LUW46. En la parte superior de la tabla se indican los complejos identificados por sus actividades en geles de 1D. A continuación se enlistan las proteínas que se identificaron por su masa molecular en el gel de 2D, se muestra su nombre, su masa molecular obtenida a partir del genoma y en el gel (a/b) y su área (en pixeles). La tabla se dividió en secciones por ser demasiado grande.

SDH+ <i>caa</i> <sub>3</sub> LUW46 (TMBZ)						
B3,C3 ( <i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i> ) Masa molecular: 409.0 kDa			S,B4,C4 (SDH, <i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i> ) Masa molecular: 236.0 kDa			
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	
QcrB	25.4/22	1090.1	1	1/67	1809.0	
			2	2/59	270.0	
			CtaC	40.1/46	5143.2	
			3?	?/44	3406.6	
			QcrC	28.6/33	4368.4	
			QcrB	25.4/22	5143.7	
			CccA	12.4/14	1982.4	
			CccB	11.9/13	1162.8	

B7,C6,A1 ( <i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i> ,ATPasa) Masa molecular: 145.5 kDa			
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	
CtaC	40.1/46	2995.7	
4	4/45	2045.1	

SDH+ <i>caa</i> <sub>3</sub> LUW46 (Coomassie)					
B3,C3 ( <i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i> ) Masa molecular: 409.0 kDa			S,B4,C4 (SDH, <i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i> ) Masa molecular: 236.0 kDa		
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
QcrB	25.4/22	6712.0	SdhA	65.3/72	22027.8
			1	1/61	8319.8
			2	2/53	852.6
			CtaC	40.1/46	6145.6
			3	3/45	9603.0
			SdhB	28.4/33	18707.2
			QcrC	28.6/32	6463.8
			QcrB	25.4/23	11758.9
			QcrA,SdhC	18.7,22.9/22	9757.1
			CccA	12.4/14	2847.5
			CccB	11.9/12	2329.8

B7,C6,A1 ( <i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i> ,ATPasa) Masa molecular: 145.5 kDa			A2 (ATPasa) Masa molecular: 117.5 kDa		
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
AtpA	54.4/65	2021.6	AtpA	54.4/65	2021.6
AtpB	51.2/61	971.8	AtpB	51.2/61	971.8
CtaC	40.1/47	8248.9			
4	4/45	9481.7			

N1 (NDH) Masa molecular: 38.0 kDa		
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)
YjID	41.9/65	5970.3
AtpG	31.5/40	5119.0

- a. Masas moleculares (kDa) calculadas a partir del genoma.  
 b. Masas moleculares (kDa) obtenidas en el gel de 2D.

#### ❖ **Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ**

En la figura 35A y la tabla 23A, se muestra el análisis del gel de 2D teñido con TMBZ de la fracción SDH+*caa*<sub>3</sub> LUW46.

En la banda B3,C3 (1D) con actividad de los complejos *b*<sub>6</sub>*c* y *caa*<sub>3</sub>, se identificó al complejo *b*<sub>6</sub>*c* por la subunidad QcrB.

En la banda S,B4,C4 (1D) con actividad para los complejos SDH, *b*<sub>6</sub>*c* y *caa*<sub>3</sub>, se obtuvieron las bandas 1, 2 y 3, de identidad desconocida. Se identificó a la *caa*<sub>3</sub> por la subunidad CtaC. Se identificó al complejo *b*<sub>6</sub>*c* por las subunidades QcrC y QcrB. Por último a los citocromos *c*<sub>550</sub> y *c*<sub>551</sub> por las proteínas CccA y CccB.

En la banda B7,C6 (1D) con actividad de los complejos *b*<sub>6</sub>*c* y *caa*<sub>3</sub>, se identificó a la *caa*<sub>3</sub> por la subunidad CtaC y la banda 4 de identidad desconocida.

#### ❖ **Análisis del gel de 2D con Coomassie**

En la figura 35B y en la tabla 23B se muestra el análisis del gel de 2D de la fracción SDH+*caa*<sub>3</sub> LUW46.

En la banda B3,C3 (1D) con actividad para los complejos *b*<sub>6</sub>*c* y *caa*<sub>3</sub>, se identificó al complejo *b*<sub>6</sub>*c* por la subunidad QcrB.

En la banda S,B4,C4 (1D) con actividad de los complejos SDH, *b*<sub>6</sub>*c* y *caa*<sub>3</sub>, se identificó a la SDH por las subunidades SdhA, SdhB y SdhC. Se obtuvieron las bandas 1, 2 y 3 de identidad desconocida. Se identificó a la *caa*<sub>3</sub> con la subunidad CtaC. También se identificó al complejo *b*<sub>6</sub>*c* por las subunidades QcrC, QcrB y QcrA. Por último a los citocromos *c*<sub>550</sub> y *c*<sub>551</sub> por las proteínas CccA y CccB respectivamente.

En la banda B7,C6,A1 (1D) con actividad para los complejos *b*<sub>6</sub>*c*, *caa*<sub>3</sub> y ATPasa, se identificaron las proteínas AtpA y AtpB. Se identificó a la *caa*<sub>3</sub> por la subunidad CtaC. Por último se obtuvo la banda 4 de identidad desconocida.

En la banda A2 (1D) con actividad de la ATPasa, se identificaron las proteínas AtpA y AtpB.

En la banda N1 (1D) con actividad de la NDH, se identificó a la NDH por la proteína YjID y la proteína AtpG de la ATPasa.

#### ❖ **Comparación de las fracciones SDH+*aa*<sub>3</sub> de la 168 y SDH+*caa*<sub>3</sub> de la LUW46**

##### ❖ **Espectros diferenciales**

La fracción SDH+*caa*<sub>3</sub> LUW46, donde se identificó a la SDH en la mutante, se obtuvo a un rango de concentración de NaCl menor (190.12-266.60 mM), en comparación con la fracción SDH+*aa*<sub>3</sub> 168 de la 168 (230.7-474.4 mM).

#### ❖ Geles hrCNE de 1D

Para ambas fracciones se obtuvo una banda correspondiente a un monómero de la NDH-2 pero en asociación con alguno de los otros complejos respiratorios. Al parecer es liberada de la cromatografía con una alta concentración de NaCl.

Por las actividades en geles de 1D, se observó que en esta fracción no solo se obtuvo a la SDH y a la  $aa_3$ , sino también al complejo  $b_6c$  y a la  $caa_3$ .

En la tinción del complejo  $b_6c$  y de la  $caa_3$  de la SDH+ $caa_3$  LUW46 se obtuvo un mayor número de bandas en comparación con SDH+ $aa_3$  168, mostrándonos estequiometrías del súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  de mayor tamaño en la mutante, al parecer compensado la falta de la quinol oxidasa  $aa_3$ .

En la tinción de la  $caa_3$ , la banda con la mayor área correspondió a la del monómero de la  $caa_3$ , en ambos casos.

Por la masa molecular la SDH parece estar formando un dímero del complejo o estar asociada con  $2b_6c+C_{550}+C_{551}$ , junto con otras estequiometrías como  $4b_6c+C_{550}+C_{551}$  y  $2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ , en la misma banda de alrededor de 260 kDa, tanto en la fracción SDH+ $aa_3$  168 como la SDH+ $caa_3$  LUW46.

Por último, en la tinción de la ATPasa en la fracción SDH+ $caa_3$  LUW46, una de las bandas asignadas a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  mas una  $\alpha$  o una  $\beta$  adicional, también coincidió con la actividad del  $b_6c$  y la  $caa_3$ .

#### ❖ Geles SDS-PAGE de 2D

Al revisar las tinciones de TMBZ, se observó un notorio aumento en la intensidad de las subunidades del complejo  $b_6c$ ,  $caa_3$  y los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$ , de la fracción SDH+ $caa_3$  LUW46, en comparación con SDH+ $aa_3$  168. Además se obtuvieron las bandas 2, 3, 4 y los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$ , mientras que en la fracción SDH+ $aa_3$  168, no.

Nuevamente se obtuvo la mayor intensidad de las subunidades del complejo  $b_6c$ ,  $caa_3$  y los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$ , como en todas las fracciones, en la banda de alrededor de 260 kDa, por lo que parece que la mayor cantidad de estos complejos y citocromos se encuentra formando las siguientes asociaciones y estequiometrías: SDH+ $2b_6c+C_{550}+C_{551}$ ,  $2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  y  $4b_6c+C_{550}+C_{551}$ . Todo esto porque las subunidades de estos complejos se encuentran migrando en una misma banda.

En la 168 la asociación SDH+ $2b_6c+C_{550}+C_{551}$  ya se encontraba, pero se hizo más evidente, o se pudo haber expresado más en la mutante LUW46, como se puede observar por la intensidad de las subunidades en la tinción con TMBZ en los geles de 2D. Por esto la concentración de NaCl necesaria para obtener la fracción con SDH disminuyó en la mutante.

En la tinción con azul de Coomassie, en la fracción SDH+ $caa_3$  LUW46, no se identificaron las bandas correspondientes a la quinol oxidasa  $aa_3$  como era de esperarse.

Al parecer la SDH no está formando un súper complejo con la  $aa_3$  ya que sus subunidades no migran en una misma banda del gel de 1D.

Tabla 24. Tabla resumen de la comparación de los citocromos, los complejos y los súper complejos encontrados en *B. subtilis* 168 y la LUW46.

<b>Citocromos, Complejos y Súper complejos</b>	<b><i>B. subtilis</i> 168</b>	<b><i>B. subtilis</i> LUW46</b>
Citocromo <i>c</i>	√	-
NDH-2	√	√
Diferentes estequiometrías de SDH+ $b_6c+c_{550}+c_{551}$	√	√
Diferentes estequiometrías de $b_6c$	√	√
Diferentes estequiometrías de $b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$	√	√
Citocromo <i>c</i> oxidasa $caa_3$	√	√
Quinol oxidasa $aa_3$	√	-
Subunidades $\alpha$ y $\beta$ de la ATP sintasa	√	√

## Discusión

### Los súper complejos en procariontes

En la membrana celular de los organismos procariontes, coexisten varias enzimas de la cadena respiratoria, tanto alimentadoras como aceptoras terminales de electrones. A diferencia de las cadenas respiratorias mitocondriales, las cadenas bacterianas poseen ramificaciones (Richardson, 2000). Estas ramificaciones pueden ser una ventaja para incrementar la flexibilidad y la habilidad para hacer frente con rapidez a los cambios ambientales. *B. subtilis* tiene cuatro oxidasas terminales, de las cuales la citocromo *c* oxidasa *caa*<sub>3</sub> y la quinol oxidasa *aa*<sub>3</sub> están presentes en condiciones de crecimiento aeróbicas, mientras que la quinol oxidasa *bd* y la quinol oxidasa *bb'* se presentan en condiciones de poco oxígeno (Azarkina cols., 1999). Se ha debatido por mucho tiempo si estos complejos interactúan al azar (en un modelo fluido) o si se encuentran asociados en los súper complejos. Estas asociaciones supramoleculares de los sistemas respiratorios parecen ser una característica evolutivamente conservada (Magalon y cols., 2012). Por ejemplo en *E. coli* se han identificado varios súper complejos: uno, compuesto por la NDH tipo 1 y la tipo 2, otro, compuesto por dos quinol:oxígeno reductasas, la citocromo *bo*<sub>3</sub> oxidasa y la *bdI* oxidasa junto con la formato deshidrogenasa (FdoGHI), y un tercero, compuesto por la succinato deshidrogenasa (SDH)+citocromo *bdII* oxidasa (Sousa y cols., 2011 y Sousa y cols., 2012). Los súper complejos reportados en bacterias tienen similitud con aquellos reportados en mitocondrias. En ambos casos se ha reportado a los súper complejos III+IV y I+III+IV, donde el complejo III es uno de los complejos membranales más representativos dentro de los súper complejos, ya que éste se encuentra en todos los dominios de la vida. En bacterias se han reportado súper complejos que en esencia cumplen la misma función que los mencionados anteriormente, por ejemplo en *Mycobacterium smegmatis* y *Corynebacterium glutamicum* donde la subunidad *c*<sub>1</sub> del complejo *bc*<sub>1</sub> clásico alberga dos citocromos tipo *c* en lugar de uno (complejo *bcc*) (Megehee y cols., 2006 y Niebisch y Bott, 2003). La consecuencia funcional es que estas cadenas respiratorias no requieren un citocromo *c* móvil para la transferencia de electrones entre el citocromo *c*<sub>1</sub> y el centro Cu<sub>A</sub> de la citocromo *aa*<sub>3</sub>. Otro ejemplo es el súper complejo de *Aquifex aeolicus* entre un complejo *bc*<sub>1</sub> y una citocromo oxidasa tipo *ba*<sub>3</sub> la cual tiene la propiedad de reducir/oxidar tanto al citocromo *c* como al ubiquinol. Finalmente en *Bradyrhizobium japonicum* fue reportada una asociación funcional entre el complejo *bc*<sub>1</sub> y la citocromo *c* oxidasa tipo *cbb*<sub>3</sub> (Magalon y cols., 2012).

### Características excepcionales en *B. subtilis* de su cadena respiratoria:

En este trabajo *B. subtilis* ha sido utilizada como modelo experimental por ser una bacteria con la cual ya se han realizado trabajos previos acerca de la formación de súper complejos en su cadena respiratoria, tanto por nosotros, como por otros investigadores (García y cols., 2012 y Sousa y cols., 2013). El complejo *b<sub>6</sub>c* de *B. subtilis* posee particularidades excepcionales, QcrB de 25.4 kDa es un citocromo *b* en el que se encuentra dos hemo tipo *b*, tiene además un hemo denominado *x*, covalentemente unido por un enlace tioéter (Sonenshein y cols., 2002). La subunidad QcrC de 28 kDa posee una región N terminal de alrededor de 170 residuos de aminoácidos que es similar a la subunidad IV de 17 kDa del complejo *b<sub>6</sub>f*. La región C terminal contiene un citocromo *c*, identificado por la secuencia consenso CXXCH encontrada en todos los citocromos tipo *c* (Yu y cols., 1995), que es similar al citocromo *c*<sub>550</sub> de *Bacillus* (Yu y Le Brun, 1998). Estas características parecen hacer del complejo *b<sub>6</sub>c* una tercera clase de complejos *bc*,

por compartir características tanto de complejos respiratorios como fotosintéticos, a pesar de no ser una bacteria fotosintética (Yu y Le Brun, 1998).

En la cadena respiratoria de *B. subtilis*, los complejos  $b_6c$ , citocromo  $c$  oxidasa  $caa_3$  y quinol oxidasa  $aa_3$  son los tres complejos que translocan protones a través de la membrana citoplásmica. García y colaboradores en el 2012, identificaron a los súper complejos  $b_6c+caa_3+C_{550}$  y SDH+NAR utilizando análisis de geles de poliacrilamida hrCNE y geles BNE, analizados posteriormente por geles de SDS de segunda dimensión 2D-SDS-PAGE y por espectrometría de masas. Así mismo, en las condiciones experimentales reportadas identificaron a los súper complejos  $b_6c+caa_3$ +ATPsintasa, SDH+ $aa_3$  y  $aa_3$ +ATPsintasa. Considerando estas últimas asociaciones, se pensó que eliminando a la  $aa_3$ , se podría forzar la formación del súper complejo  $b_6c+caa_3$ +ATPsintasa y por otro lado afectar a la SDH (si es que existe una asociación SDH+ $aa_3$ ) u otros súper complejos.

#### **Diferencias entre *B. subtilis* 168 (silvestre) y la mutante LUW46**

En este trabajo se utilizó la mutante de *B. subtilis* LUW46 carente de la quinol oxidasa  $aa_3$  por la interrupción de  $qoxABCD$  con un casete de kanamicina. Santana y colaboradores (1992), reportaron que al utilizar una mutante de *B. subtilis* carente de la  $aa_3$ , el crecimiento es considerablemente menor que el de la cepa silvestre, utilizando diferentes fuentes de carbono como succinato, lactato o citrato, sin embargo, ellos crecieron a la bacteria en medio LB y no mencionan el tiempo ni la fase de crecimiento en que obtuvieron estas observaciones.

Al realizar nosotros las curvas de crecimiento, la mutante LUW46 creció un poco más lentamente, mostrando un tiempo de duplicación mayor a la 168 en la fase exponencial (23.7 y 15 minutos respectivamente, ver tabla 3). Al final de la curva de crecimiento (23.5 h), la mutante alcanzó la misma densidad óptica que la cepa 168 lo que indicó que la carencia de la quinol oxidasa  $aa_3$  no afectó el crecimiento de la bacteria durante la fase estacionaria. En cuanto a la cantidad de bacterias y de membranas obtenidas, se obtuvo un promedio de 13.05 g de bacteria de la 168 /L de medio y para la mutante LUW46 un promedio de 10.98 g/L. Mientras que el promedio de proteína membranal (expresado en mg por g de bacteria) de la 168 fue de 8.03 mg/g y de la LUW46 de 12.47 mg/g. En general, observamos que para la LUW46 se obtuvo un menor número de células pero mayor cantidad de proteína de membrana (Tabla 4). Al comparar los espectros diferenciales de absorción de las membranas de la 168 y la LUW46 (Figura 11A), nos llamó la atención que la concentración de los citocromos  $a$  de la LUW46 disminuyó 75.0 % en comparación con los citocromos  $a$  de la 168 (Figura 12). Además, el máximo de absorción tuvo un corrimiento hacia los 605 nm correspondientes al citocromo  $a$  de la  $caa_3$ , lo que va de acuerdo con la pérdida de la  $aa_3$  (Figuras 11B y 11C). Se concluyó que el 75.0 % de la absorbancia correspondió a la quinol oxidasa  $aa_3$  y el 25.0 % a la citocromo  $c$  oxidasa  $caa_3$ . Este dato es un indicio de que la  $caa_3$  y el  $b_6c$  fueron suficientes para generar el gradiente protón motriz y mantener el crecimiento de la bacteria en un medio con 3.0 % de succinato. Aunque las quinol oxidasas tipo  $bd'$  y  $bb'$  pudieron tomar parte en el crecimiento de la bacteria, en nuestro análisis espectrofotométrico no encontramos evidencias de la presencia de estas oxidasas. Zamboni y Sauer (2003), reportaron que durante el crecimiento exponencial de *B. subtilis* bajo condiciones bien aireadas en medio mínimo o en medio rico, la quinol oxidasa  $aa_3$  parece ser la predominante, esto coincidió con lo que nosotros observamos. Ellos mencionaron que cualquier

quinol oxidasa, por sí sola, es capaz de sostener el crecimiento de *Bacillus*, pero la citocromo *c* oxidasa no puede hacer esto. Por esta razón, es probable que en el caso de la LUW46 que carece de la quinol  $aa_3$ , las otras quinol oxidasas ( $bb'$  y  $bd'$ ) hayan mantenido la fase de crecimiento exponencial. Winstedt y Wachenfeldt en el 2000, mencionan que ninguna de las oxidasas terminales de *B. subtilis* por sí mismas, son esenciales para el crecimiento aeróbico. Nosotros observamos que la falta de la quinol oxidasa  $aa_3$  en la mutante no alteró el crecimiento de la bacteria y la cadena respiratoria tuvo concentraciones de citocromos *c*, *b* cercanas a la de la 168, (73.3 % del citocromo *c* y 75.0 % del citocromo *b* en la LUW46 con respecto a la 168) (Figura 12).

#### **Fraciones observadas en la cromatografía de intercambio iónico:**

García y colaboradores en el 2012, solubilizaron membranas de *B. subtilis* con 4 mg de digitonina, mientras que en el presente trabajo se solubilizaron con 1.5 mg de DDM por mg de proteína en presencia de 100 mM de NaCl. Posteriormente, el solubilizado se cargó en cromatografías de intercambio iónico y las fracciones obtenidas se analizaron por medio de electroforesis nativas. A pesar de que el detergente DDM es más agresivo que la digitonina (Ljungdahl y cols., 1987), se logró identificar el súper complejo  $b_6C+caa_3+C_{550}+C_{551}$ , e indicios de la asociación SDH+ $b_6C+C_{550}+C_{551}$ . Los demás súper complejos que reportaron García y colaboradores, no pudieron ser identificados en estas condiciones, por lo que concluimos que el súper complejo  $b_6C+caa_3+C_{550}+C_{551}$  es muy estable y difícil de disociar, en comparación con las demás asociaciones.

Sousa y colaboradores en el 2013 confirmaron los súper complejos  $b_6C+caa_3$  y SDH+NAR propuestos por García y colaboradores en el 2012, pero reportaron que la SDH se encontraba en forma de dímero en asociación con la nitrato reductasa (NAR). Cabe hacer notar, que Sousa y colaboradores en el 2013 crecieron a la bacteria en medio LB, que al igual que el medio MSR contiene cantidades relativamente altas de nitrato (no menos del 10.0 %), en ambos reportes mencionan que el súper complejo 2SDH+NAR tiene un papel importante en mantener viable a la cadena respiratoria bajo estas condiciones. Este resultado mostró la gran capacidad de adaptación que posee *B. subtilis*, por lo que es posible una asociación diferente entre complejos respiratorios utilizando medios de crecimiento diferentes. Ljungdahl y colaboradores (1987), mencionan que incluso dentro de cada especie los parámetros óptimos de detergente para la purificación de algún complejo pueden variar con los diferentes medios de crecimiento. En nuestro caso al utilizar un medio rico con 3.0 % de succinato, se esperaba un aumento en la expresión de la SDH, y por ende observamos asociaciones de la SDH con el  $b_6C$  y los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$ .

En la cromatografía de la 168 se obtuvo una fracción durante el lavado de 10 mM de NaCl, que posteriormente se identificó como un citocromo tipo *c* (posiblemente los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$ ). En la LUW46 no se obtuvo una fracción similar, este dato nos indicó que en la mutante los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  se mantienen más fuertemente asociados al súper complejo  $b_6C+caa_3+C_{550}+C_{551}$ , por lo que se pensó que estos citocromos podrían ser parte esencial del súper complejo. Después, esta idea fue confirmada en los geles de 2D, donde se observó a los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  integrados en las bandas de los súper complejos  $b_6C+caa_3$  revelados por la tinción de TMBZ.

El rango de concentración de NaCl necesaria para separar a la SDH de la resina, para la mutante fue 43.0 % menor (190.1-266.6 mM), que para la 168 (230.7-474.4 mM). Como se observó en los geles de 1D y 2D, la SDH se encontró asociada al complejo  $b_6c$ , y en la mutante LUW46 esta asociación se volvió más evidente. Posiblemente la falta de la  $aa_3$  obligó a la SDH a interactuar más con el  $b_6c$ , disminuyendo la exposición de sus cargas negativas, por lo que se obtuvo a concentraciones de NaCl menores a las de la 168. Este dato (la fuerza iónica necesaria para obtener a la SDH) se reprodujo en las tres repeticiones de las cromatografías. En el análisis de 2D correspondiente a la fracción SDH+ $caa_3$  LUW46 (Figura 35), la tinción con TMBZ fue más intensa para las bandas de las subunidades del  $b_6c$  y la  $caa_3$  en comparación con las subunidades de la fracción SDH+ $aa_3$  168 (Figura 32). Para SDH+ $caa_3$  LUW46, CtaC aumentó su área en un 84.2 %, en comparación con SDH+ $aa_3$  168; QcrC en un 83.8 % y QcrB en un 67.6 %, además en la 168 no se obtuvieron los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  a pesar de que se cargaron 100  $\mu$ g de proteína en los geles para ambas muestras, con lo que se pensó aumentar la posibilidad de observar estas dos proteínas.

Las subunidades de la quinol oxidasa  $aa_3$  se identificaron al comparar los geles de 2D SDS-PAGE teñidos con Coomassie obtenidos de los sobrenadantes de las solubilizaciones de las dos membranas. Las bandas que desaparecieron en la mutante tuvieron una masa molecular cercana a la predicha por medio del genoma (ver tablas 28B y 29B). Por nuestros resultados, pensamos que la SDH no forma súper complejos con la quinol oxidasa  $aa_3$  como se había propuesto por García y colaboradores (2012), pero sí con el complejo  $b_6c$ .

Aunque las asociaciones con la SDH son nuevas para bacterias Gram positivas, ya se han reportado súper complejos con la SDH en otros organismos. Yu y colaboradores (1974) y Acín Pérez y colaboradores (2008), reportan que en mitocondrias es posible una asociación del complejo II, como un súper complejo II+III y un súper complejo II+III+IV, utilizando diferentes tipos de detergentes y obteniendo diferentes estequiometrías, ya que algunos detergentes son más suaves que otros y algunos complejos son más susceptibles a ciertos detergentes. Los mismos autores afirman que los súper complejos no son artificios experimentales obtenidos por el tipo de detergente que se utiliza en una metodología. Por otra parte, Sousa y colaboradores en el 2012 reportaron un súper complejo SDH+citocromo  $bdII$  en *E. coli*. La diferencia entre la cadena respiratoria de *E. coli* y *B. subtilis* es que la primera no tiene complejo tipo  $bc$ , sin embargo se adapta gracias a la gran variedad de componentes en su cadena respiratoria (Magalon y cols., 2012). Otro ejemplo de adaptabilidad de las bacterias es *Aquifex aeolicus*, una bacteria hipertermofílica, quimiolitotrófica y oxidadora de hidrógeno, que tiene un súper complejo azufre quinona oxidoreductasa (Sqr)+complejo  $bc_1$ +citocromo  $c$  oxidasa, siendo éste súper complejo el primero en su clase en haber sido reconocido y analizado (Prunetti y cols., 2010).

#### **El súper complejo $b_6c+caa_3$ :**

El súper complejo que se obtuvo prácticamente en todas las fracciones de las cromatografías y en una gran variedad de estequiometrías en el análisis de los geles de 1D fue el  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ . En comparación con otros organismos, el  $b_6c$  y la  $caa_3$  de *B. subtilis* son muy difíciles de separar, aún después de utilizar un detergente como el DDM, que si bien es lo suficientemente fuerte para separar los complejos en sus formas individuales, no lo es para

desnaturalizarlos ni para separarlos en sus subunidades, permitiéndoles conservar su actividad enzimática (Wittig y cols., 2007), aún después de aplicar una fuerza iónica de NaCl, que aumentó hasta 500 mM. Comparativamente, Ljungdahl y colaboradores (1987), con el uso de 0.5 a 1.5 mg de DDM por mg de proteína de membrana y cromatografías de intercambio aniónico, purificaron a los complejos tipo  $bc_1$  enzimáticamente activos de *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Saccharomyces cerevisiae* y de bovino. Berry y Trumpower (1985) aislaron al complejo  $bc_1$  y al complejo  $caa_3$  por separado, utilizando 1 mg de DDM por mg de proteína de membrana, cromatografías de intercambio iónico y una columna de hidroxapatita. Ellos utilizaron relaciones detergente proteína similares a los utilizados en este trabajo que fue de 1.5 mg de DDM por mg de proteína, sin embargo en nuestro caso, la asociación entre  $b_6c$  y la  $caa_3$  siempre se mantuvo fuerte.

La banda de 213-390 kDa con actividad de  $b_6c$  y  $caa_3$  de todos los geles de 1D, presentó siempre un área muy grande en las subunidades de los complejos en los geles de 2D teñidos con TMBZ. Para esta masa molecular se pueden proponer las siguientes estequiometrías o formas de organización de los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$  o del súper complejo  $b_6c+caa_3$ :  $4b_6c+C_{550}+C_{551}$  (213 a 260 kDa),  $2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  (242.5 a 386.5 kDa), o con la SDH como:  $SDH+2b_6c+C_{550}+C_{551}$  (242.5 kDa) (Tabla 25 y Figura 36).

Las mayores masas para el súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  se obtuvieron en el rango de 1900 a 100 kDa, y proponemos las siguientes estequiometrías basándonos en la figura 36 donde se plantea el modelo de unión de los diferentes súper complejos:  $12b_6c+6caa_3+6C_{550}+6C_{551}$  (1900 kDa),  $10b_6c+5caa_3+5C_{550}+5C_{551}$  (1437 kDa),  $8b_6c+5caa_3+4C_{550}+4C_{551}$  (1399.5 a 1346 kDa),  $8b_6c+4caa_3+4C_{550}+4C_{551}$  (1111 a 1273 kDa),  $6b_6c+3caa_3+2C_{550}+2C_{551}$  (786 a 1046 kDa),  $4b_6c+3caa_3+2C_{550}+2C_{551}$  (650 kDa),  $4b_6c+2caa_3+2C_{550}+2C_{551}$  (554.5 a 600 kDa),  $2b_6c+2caa_3+C_{550}+C_{551}$  (409 a 457 kDa),  $2b_6c$  (104 a 195 kDa) y  $caa_3$  (104 a 180 kDa) (Tabla 25). Cabe señalar que las bandas de mayor masa molecular de los súper complejos  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  observados en los geles de 1D no se pudieron observar en la tinción con TMBZ de los geles de 2D, pensamos que esto se debe a que podrían encontrarse en poca cantidad y por debajo del límite de la concentración de citocromos *c* requeridos para su detección con esta tinción, que es de 0.08 nmoles de citocromo, como ya se mencionó en la sección de materiales y métodos.

Tabla 25. Diferentes estequiometrías de los súper complejos  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ ,  $SDH+b_6c+C_{550}+C_{551}$  y los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$  obtenidos en el análisis de los gels de 1D.

	Estequiometrías	Masa Molecular (kDa)
Súper complejos	$12b_6c+6caa_3+6C_{550}+6C_{551}$	1900
	$10b_6c+5caa_3+5C_{550}+5C_{551}$	1437
	$8b_6c+5caa_3+4C_{550}+4C_{551}$	1399.5 a 1346
	$8b_6c+4caa_3+4C_{550}+4C_{551}$	1111 a 1273
	$6b_6c+3caa_3+2C_{550}+2C_{551}$	786 a 1046
	$4b_6c+3caa_3+2C_{550}+2C_{551}$	650
	$4b_6c+2caa_3+2C_{550}+2C_{551}$	554.5 a 600
	$2b_6c+2caa_3+C_{550}+C_{551}$	409 a 457
	$2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$	242.5 a 386.5
	$SDH+2b_6c+C_{550}+C_{551}$	242.5
	$4b_6c+C_{550}+C_{551}$	213 a 260
	$2b_6c$	104 a 195
	$Caa_3$	104 a 180

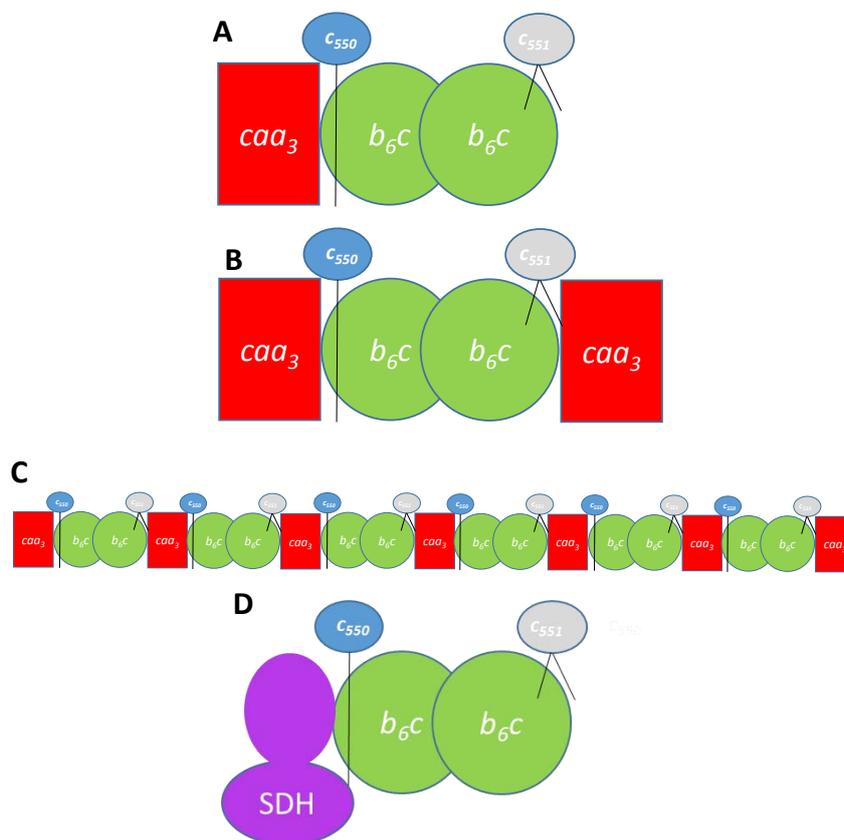


Figura 36. A y B. Posible conformación de menor masa molecular del súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ . C. Acomodo del súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  en forma de cuerda con el que puede alcanzar tamaños de hasta 1900 kDa. D. Modelo de la asociación entre la SDH, el complejo  $b_6c$  y los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$ .

Con los gels de 2D se demostró que los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  forman parte del súper complejo  $b_6c+caa_3$  y que la SDH puede estar asociada con el complejo  $b_6c$  más los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  como  $SDH+b_6c+C_{550}+C_{551}$ . Pensamos que la cadena respiratoria de *B. subtilis* puede regularse

formando estequiometrías del súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  de tamaños muy grandes compensando la carencia de la quinol oxidasa  $aa_3$  y mejorar el flujo de electrones.

Sousa y colaboradores en el 2013 mencionan la organización de los súper complejos en un mega complejo de una estructura como “cuerda” en *B. subtilis*, con bloques de estequiometrías de  $(b_6c_2+caa_3)_4$  de alrededor de 730 kDa (Figura 37). Este tipo de estructuras ya han sido propuestas en mitocondrias de plantas y mamíferos, pero Sousa y colaboradores mencionan que nunca antes habían sido sugeridas para procariontes. Por ejemplo en mitocondrias de papa se ha propuesto una estructura en forma de “cuerda” de los complejos respiratorios cuya unidad básica está compuesta por dos copias del complejo I, una copia del dímero del complejo III y dos copias del complejo IV. La asociación de estas unidades básicas es a través del complejo IV que interacciona con el complejo IV de la siguiente unidad, formando estas grandes estructuras, reportando unidades de súper complejos de alrededor de 1.2 a 3 MDa (Bultema y cols., 2009) (Figura 38). Otro ejemplo es el de Wittig y colaboradores (2006), para mitocondrias de mamífero de diferentes organismos, donde proponen una estructura llamada “cuerda respiratoria” compuesta de un súper complejo  $I_1III_2IV_4$  y un pequeño súper complejo  $III_2IV_4$  el cual puede cambiar su estequiometría según el organismo (masas moleculares no reportadas) (Figura 39). Tales asociaciones aumentan la tasa de transferencia de electrones e incrementan la estabilidad de los complejos individuales en la fosforilación oxidativa (Bultema y cols., 2009). Por lo que observamos en *B. subtilis*, es posible que la asociación del súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ , en este tipo de estructuras como cuerda se den a través de la interacción del  $b_6c$  con la  $caa_3$  (Figura 36).

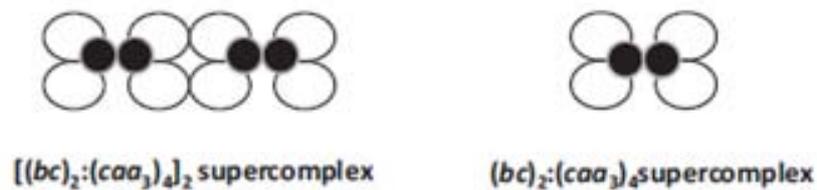


Figura 37. Un mega complejo respiratorio representando la unión de dos unidades básicas compuestas por 2 complejos  $b_6c$  y 4 citocromos  $c$  oxidasas  $caa_3$ , conectadas por la  $caa_3$ , formando una “cuerda respiratoria”. Imagen tomada de Sousa y colaboradores, 2013.

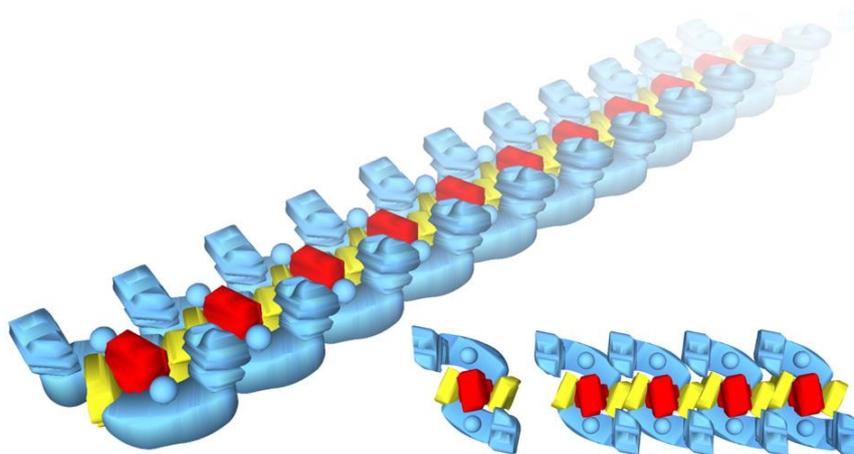


Figura 38. Modelo esquemático de la organización de los complejos respiratorios en estructuras como “cuerdas”. Imagen tomada de Bultema y colaboradores, 2009.

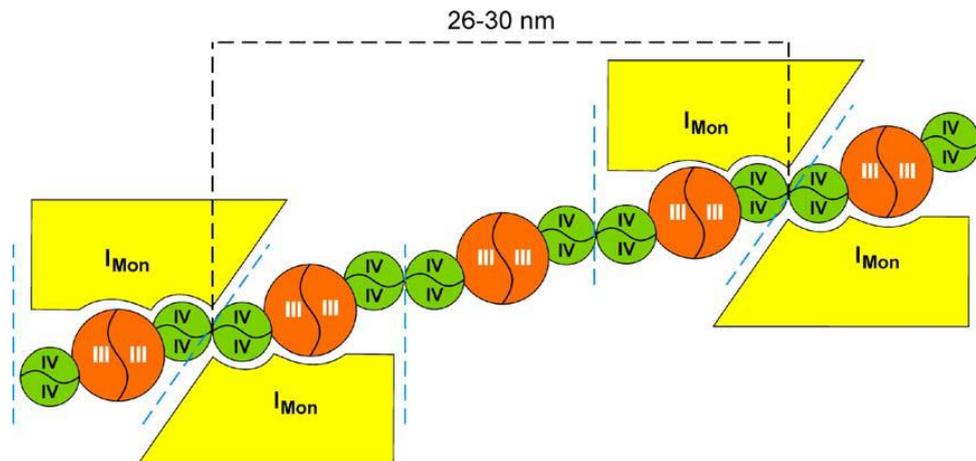


Figura 39. Modelo de una asociación lineal de súper complejos de la cadena respiratoria en mitocondrias de mamífero nombrada como "cuerda respiratoria". Imagen tomada de Wittig y colaboradores, 2006.

### **Los complejos respiratorios que no se asociaron:**

En cuanto a la NDH, con los geles de 1D quedó demostrado que no forma asociaciones con ninguno de los otros complejos respiratorios. Como en muchas otras bacterias, la participación de la NADH deshidrogenasa tipo 2 en la formación de súper complejos no se ha detectado en *B. subtilis*, ya que al parecer esta proteína no está completamente embebida en la membrana, por lo que presenta una pronunciada sensibilidad al detergente y por tanto no forma súper complejos. Por ejemplo, en el caso de la levaduras como *S. cerevisiae* que no contienen complejo I, Zhong Cui y colaboradores (2014) mencionan que se han obtenido súper complejos entre un dímero del complejo III y uno o dos complejos IV al lado del complejo III, mejorando la transferencia de electrones y disminuyendo la formación de especies reactivas de oxígeno.

Algunas de las bandas obtenidas en los geles de 2D con la tinción de TMBZ, no correspondieron en masa molecular a ninguna de las subunidades de los complejos respiratorios con hemos covalentemente unidos. Estas bandas podrían ser subunidades agregadas que migraron anómalamente en el gel y no correspondieron con alguna de las subunidades de los complejos respiratorios. Sin embargo, debido a que se obtuvo tinción con TMBZ se pueden identificar como citocromos.

En el caso de la ATP sintasa se tendrán que probar nuevas metodologías para poderla obtener de forma completa, ya que al parecer la solubilización de las membranas de *B. subtilis* con DDM en presencia de 100 mM de NaCl, las cromatografías de intercambio aniónico y los diferentes lavados de las cromatografías con NaCl (10, 40, 100, un gradiente de 100 a 500 y un último lavado de 500 mM de NaCl) fueron muy agresivos. Se podrían cambiar las condiciones de la solubilización de las membranas de las cepas 168 y LUW46, utilizando un detergente más suave que el DDM, como la digitonina, y posiblemente utilizar un gradiente de sacarosa en lugar de una cromatografía de intercambio iónico. También se podrían cambiar las condiciones de corrimiento de los geles hrCNE utilizando digitonina en el amortiguador superior en lugar de DDM (Wittig y cols., 2007). Morales Ríos y colaboradores (2010) purificaron a la ATP sintasa en vesículas de membrana de *Paracoccus denitrificans* de forma activa, mediante lisis celular y centrifugaciones diferenciales.

Una interacción física entre la *caa<sub>3</sub>* y la ATP sintasa de *B. pseudofirmus* OF4, fue reportada por Liu y colaboradores (2007), mediante la purificación de la ATP sintasa en vesículas de membranas con sulfato de amonio y gradientes de sacarosa. La purificación de la *caa<sub>3</sub>* se realizó con sulfato de amonio, DDM, columnas de hidroxapatita y cromatografías de intercambio iónico. Posteriormente, la unión de estas dos proteínas se realizó en vesículas de asolectina, para su posterior análisis por calorimetría diferencial y resonancia paramagnética de saturación de transferencia de electrones, donde encontraron que la *caa<sub>3</sub>* interactúa directamente con la ATP sintasa.

La regulación de la expresión de los complejos de la cadena respiratoria de *B. subtilis* según sus necesidades puede ser como en *E. coli*, en donde la expresión de los genes que codifican para la cadena respiratoria dependen de factores externos, tales como la disponibilidad de oxígeno o el tipo de aceptores de electrones disponibles (Sousa y cols., 2012).

Con toda esta evidencia, se podría decir que la cadena respiratoria de *B. subtilis* no se ajusta al modelo del estado fluido de la membrana ni al modelo del estado sólido, sino a una combinación de ambos. En la membrana coexisten largas cadenas o mega complejos y súper complejos de menor tamaño de diferentes complejos respiratorios, incluso de solo uno o dos tipos de éstos, según lo requiera la bacteria. Como lo mencionan Magalon y colaboradores (2012), muchos súper complejos de una amplia variedad de organismos han sido caracterizados bioquímicamente y difieren en sus estequiometrías y en su composición.

## Conclusiones:

- La mutación que eliminó a la quinol oxidasa  $aa_3$  no afectó el crecimiento de *B. subtilis* LUW46, a pesar de que es uno de los únicos tres complejos (junto con el complejo  $b_6c$  y la citocromo  $c$  oxidasa  $caa_3$ ), que contribuyen a la fuerza protón motriz.
- En fase estacionaria, el 75.0% de la concentración total de citocromo tipo  $a$  (de los espectros diferenciales de las membranas de *B. subtilis*), correspondió a la quinol oxidasa  $aa_3$ , mientras que el 25.0% a la citocromo  $c$  oxidasa  $aa_3$ .
- La  $caa_3$  y el  $b_6c$ , así como el súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  fueron suficientes para mantener el crecimiento de la bacteria, generando el gradiente de protones en ausencia de la  $aa_3$ .
- La estequiometría del súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  de mayor tamaño que se pudo observar fue de alrededor de 1900 kDa. Posiblemente este súper complejo esté formando una estructura como “cuerda” capaz de mejorar el transporte de electrones.
- *B. subtilis* tiene la capacidad de regular su cadena respiratoria para adaptarse rápidamente a los cambios en su ambiente. Por ejemplo la mutante de *B. subtilis* LUW46 aumentó la cantidad del súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  en las estequiometrías de mayor tamaño y la asociación de SDH+ $b_6c+C_{550}+C_{551}$  en comparación con la 168, para compensar la falta de la quinol oxidasa  $aa_3$ .
- El súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  es muy estable y difícil de disociar, en comparación con las demás asociaciones entre los complejos respiratorios reportadas por García y colaboradores (2012) y Sousa y colaboradores (2013).
- Los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  se mantienen fuertemente asociados dentro del súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ , por lo que estos citocromos parecen jugar una parte esencial en el súper complejo.
- La SDH no se encontró asociada a la quinol oxidasa  $aa_3$  como se había supuesto, pero sí parece estar relacionada con el complejo  $b_6c$  y los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$  (SDH+ $b_6c+C_{550}+C_{551}$ ). Esta asociación fue identificada por medio de actividades en gel de 1D y por la identificación de sus subunidades en los geles de 2D.
- El complejo  $b_6c$  siempre se encuentra acompañado de los citocromos  $C_{550}$  y  $C_{551}$ , tanto en la 168 como en la mutante LUW46, y puede estar conformado como un dímero o un tetrámero.
- Se obtuvieron al menos ocho diferentes formas del súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  con masas desde 400 hasta 1900 kDa por lo que se proponen ocho estequiometrías para estas masas.
- La citocromo  $c$  oxidasa  $caa_3$  puede encontrarse en forma de monómero con una masa molecular de 104 a 180 kDa.
- La NDH tipo 2 de *B. subtilis* no forma asociaciones con alguno de los otros complejos respiratorios.
- Se necesita una metodología de solubilización menos agresiva a la que se utilizó en éste trabajo para poder obtener a la ATP sintasa completa y poder saber si es parte de algún súper complejo.

## Apéndice 1.

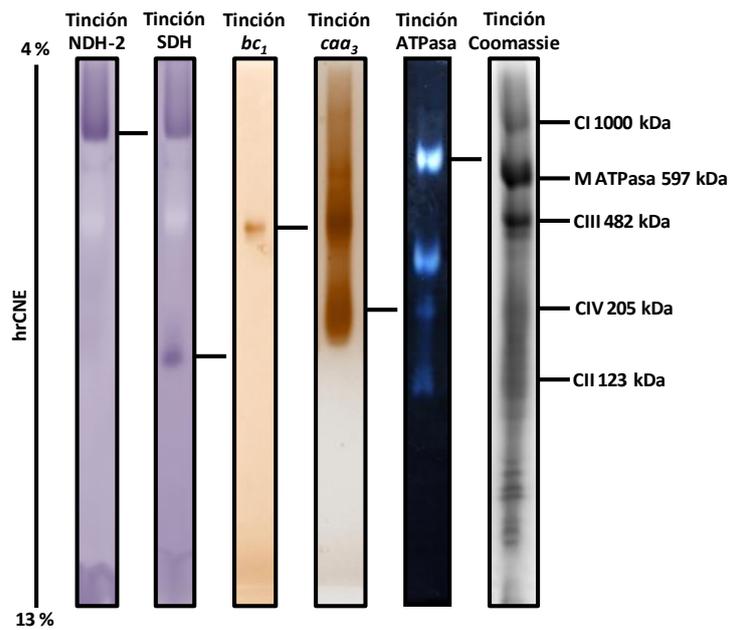


Figura 40. Identificación de los complejos respiratorios en un homogeneizado de corazón de pollo por tinciones de actividad histoquímica de los complejos: NDH, SDH,  $bc_1$ ,  $caa_3$  y ATPasa, y azul de Coomassie. Cada carril fue cargado con 150  $\mu$ g de proteína. Las masas moleculares de los complejos mitocondriales fueron tomados de (Wittig y cols., 2010) y están indicados junto al carril de Coomassie. CI: complejo I, CII: complejo II, CIII: complejo III, CIV: complejo IV, M: monómero de ATPasa.

En la figura 40 se muestran las tinciones de actividad histoquímica de los complejos NDH, SDH,  $bc_1$ ,  $caa_3$  y ATPasa de la cadena respiratoria mitocondrial, y una tinción con azul de Coomassie de geles hrCNE de 1D de un homogeneizado de corazón de pollo, que se utilizó como marcadores de masa molecular para contar con un rango de masas moleculares cercanas a las de los complejos respiratorios de *B. subtilis*, y también para corroborar la tinción de actividad de cada complejo respiratorio.

## Apéndice 2.

### ❖ Sobrenadante 168

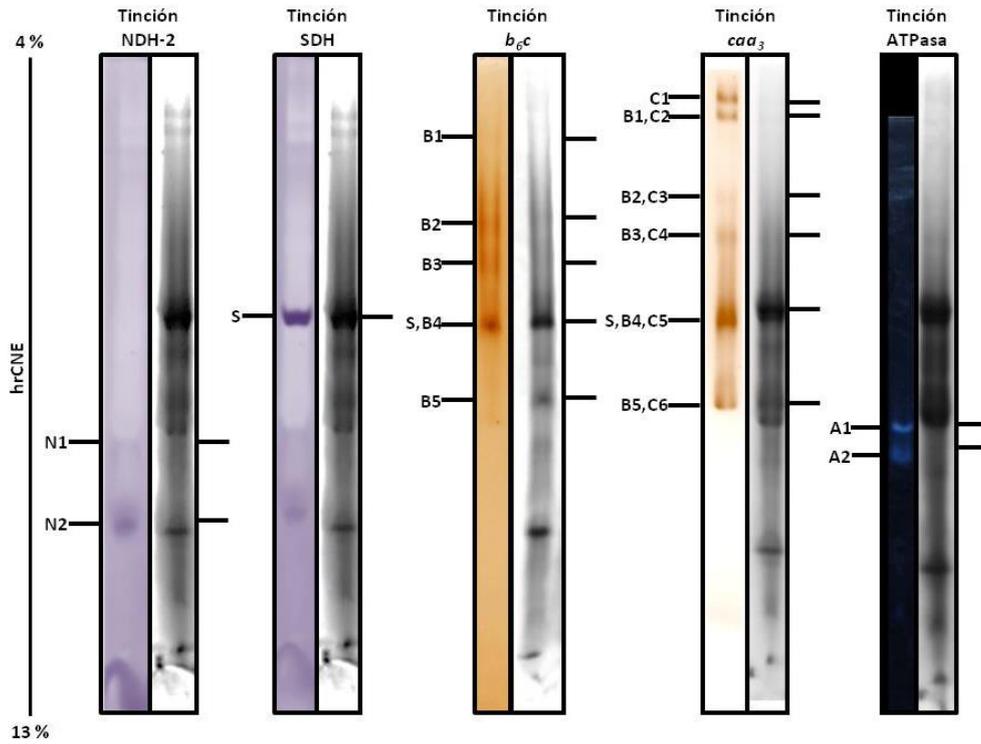


Figura 41. Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida del Sobrenadante 168, con 100  $\mu$ g de proteína, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de *B. subtilis* (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo  $b_6c$ , C = citocromo *c* oxidasa  $caa_3$  y A = ATPsintasa). Cada banda se nombró con la primera letra del nombre del complejo respiratorio según la tinción y un número en orden descendente. El número 1 corresponde a la banda de mayor masa molecular. Al lado derecho de cada carril de actividad se muestra un carril de la misma fracción, teñido con azul de Coomassie. En aquellas bandas donde se obtuvo actividad para más de un complejo, se les puso al lado la letra numerada correspondiente a la banda del complejo con el que coincidieron.

Tabla 26. Áreas relativas de actividad en pixeles, masas moleculares e identidades de las bandas teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa. Cada banda se nombró con la primer letra del complejo de la tinción en cuestión, y se le asignó un número de arriba hacia abajo por su peso molecular.

Sobrenadante 168			
Banda	Área (Pixeles)	Masa molecular kDa	Estequiometrías propuestas
<b>NDH-2</b>			
N1	3672.0	85.5	Dímero
N2	20420.2	48.5	Monómero
<b>SDH</b>			
S	13997.1	228.0	Dímero
<b><math>b_6c</math></b>			
B1	1029.2	1111.0	$8b_6c+4caa_3+4c_{550}+4c_{551}$
B2	13509.0	567.0	$4b_6c+2caa_3+2c_{550}+2c_{551}$
B3	10572.7	421.0	$2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$
S,B4	27437.2	249.50	$SDH+2b_6c+c_{550}+c_{551}$ , $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ , $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B5	815.6	137.00	$2b_6c$
<b><math>caa_3</math></b>			
C1	10262.5	1399.5	$8b_6c+5caa_3+4c_{550}+4c_{551}$
B1,C2	7179.0	1216.5	$8b_6c+4caa_3+4c_{550}+4c_{551}$
B2,C3	1518.9	581.0	$4b_6c+2caa_3+2c_{550}+2c_{551}$
B3,C4	24813.7	430.5	$2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$
S,B4,C5	10915.8	223.5	$SDH+2b_6c+c_{550}+c_{551}$ , $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ , $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B5,C6	11484.8	72.0	$caa_3$
<b>ATPasa</b>			
A1	506.5	124.0	$\alpha$ y $\beta$
A2	535.3	107.0	$\alpha$ y $\beta$

En la figura 41 se muestran las tinciones para las actividades de los complejos NDH-2, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa, del sobrenadante 168, con su respectiva tinción con Coomassie, y en la tabla 26 el análisis de estos geles, mostrando el área relativa en pixeles, la masa molecular y la identidad de cada una de las bandas.

En la tinción de la NDH-2 se obtuvieron dos bandas, N1 de alrededor de 85.5 kDa lo que indicaría que es un dímero, y N2 con una masa molecular cercana a la masa del monómero del complejo (48.5 kDa).

En la tinción de la SDH, la banda denominada S, tuvo una masa molecular de 228 kDa correspondiente a un dímero del complejo (112 kDa para el monómero).

En el caso de la tinción del complejo  $b_6c$ , se obtuvieron las bandas B1, B2, B3, B4 y B5. Las bandas B1, B2 y B3. La banda B4 coincidió con la actividad de la SDH (banda S), posiblemente formando una asociación  $SDH+2b_6c$ . La banda B5 fue la banda más pequeña en masa molecular, tuvo una masa cercana al dímero del complejo (144.2 kDa). La mayor actividad (la señal más fuerte de actividad) se obtuvo en el rango de 567 a 249.5 kDa.

Para la tinción de la  $caa_3$ , se obtuvieron las bandas C1 a C6, de las cuales la banda C1 fue la de mayor masa molecular (1399.5 kDa). Posiblemente se trate del súper complejo  $b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$  (posible estequiometría de  $8b_6c+5caa_3+4c_{550}+4c_{551}$ , por su masa molecular). Las bandas C2, C3 y C4 coincidieron con la actividad del complejo  $b_6c$ . Proponemos las diferentes estequiometrías de la asociación de estos dos complejos ( $8b_6c+4caa_3+4c_{550}+4c_{551}$ ,  $4b_6c+2caa_3+2c_{550}+2c_{551}$  y  $2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$ ). La banda C5 coincidió con la actividad de la SDH

y el complejo  $b_6c$ . Por la masa de esta banda se podrían asumir las siguientes asociaciones:  $SDH+2b_6c+C_{550}+C_{551}$ ,  $2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ ,  $4b_6c+C_{550}+C_{551}$ . La banda C6 se acercó a un monómero de la  $caa_3$  (145 kDa). En esta tinción, la mayor área de actividad se obtuvo entre las masas moleculares de 430.5 y 72 kDa, similar a las bandas con mayor actividad de la tinción del complejo  $b_6c$ , sin embargo, la banda correspondiente al monómero de la  $caa_3$  tuvo un área mayor a la del dímero del complejo  $b_6c$ .

Para la tinción de actividad de la ATPasa, solamente se obtuvieron dos bandas A1 y A2, correspondiente a la suma de las masas moleculares de una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ , y sin embargo, no se identificó ninguna banda coincidente con la masa del complejo entero tomando en cuenta todas sus subunidades (de alrededor de 500 kDa).

#### ❖ Sobrenadante LUW46

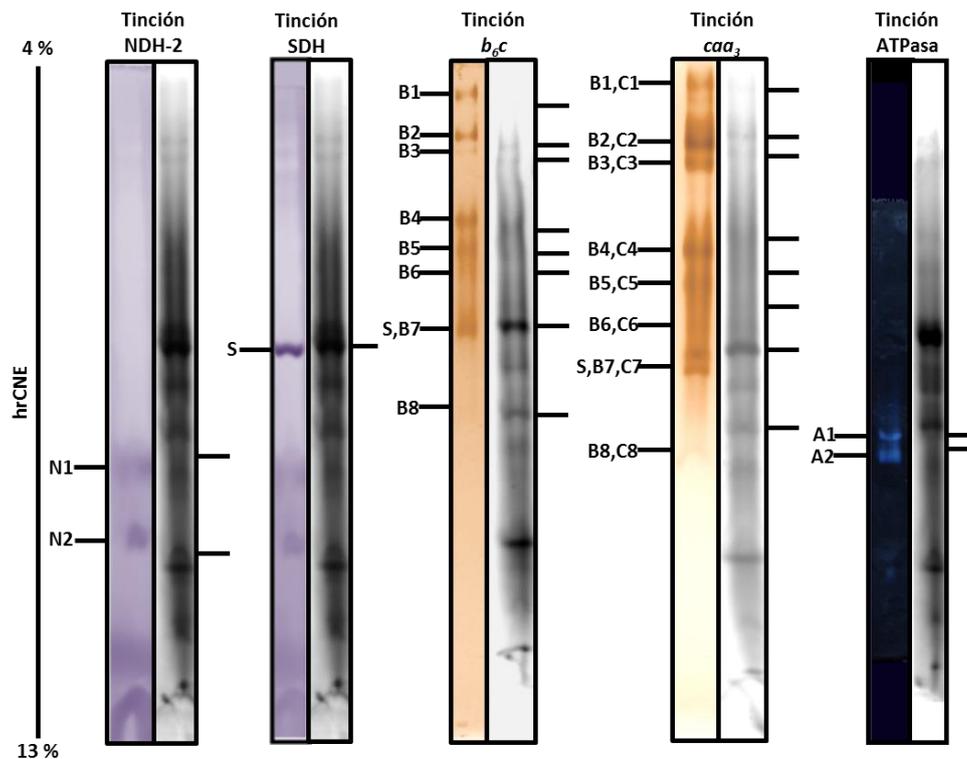


Figura 42. Carriles de los geles hrCNE de 1D, con un gradiente del 4.0 al 13.0 % de acrilamida del Sobrenadante LUW46, con 100  $\mu$ g de proteína, teñidos para las actividades de cinco de los complejos respiratorios de *B. subtilis* (N = NADH deshidrogenasa (NDH), S = succinato deshidrogenasa (SDH), B = complejo  $b_6c$ , C = citocromo c oxidasa  $caa_3$  y A = ATPsintasa). Cada banda se nombró con la primera letra del nombre del complejo respiratorio según la tinción y un número en orden descendente. El número 1 corresponde a la banda de mayor masa molecular. Al lado derecho de cada carril de actividad se muestra un carril de la misma fracción, teñido con azul de Coomassie. En aquellas bandas donde se obtuvo actividad para más de un complejo, se les puso al lado la letra numerada correspondiente a la banda del complejo con el que coincidieron.

Tabla 27. Áreas relativas de actividad en pixeles, masas moleculares e identidades de las bandas teñidas para las actividades de los complejos NDH, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa. Cada banda se nombró con la primer letra del complejo de la tinción en cuestión, y se le asignó un número de arriba hacia abajo por su peso molecular.

Sobrenadante LUW46			
Banda	Área (Pixeles)	Masa molecular kDa	Estequiometrías propuestas
<b>NDH-2</b>			
N1	1965.5	98.0	Dímero
N2	12739.4	50.5	Monómero
<b>SDH</b>			
S	5209.8	248.00	Dímero
<b><math>b_6c</math></b>			
B1	4070.8	1518.5	$12b_6c+6caa_3+6c_{550}+6c_{551}$
B2	7352.7	1168.5	$8b_6c+4caa_3+4c_{550}+4c_{551}$
B3	1503.7	986.0	$6b_6c+3caa_3+3c_{550}+3c_{551}$
B4	9258.4	562.0	$4b_6c+2caa_3+2c_{550}+2c_{551}$
B5	19707.8	457.0	$2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$
B6	8955.4	396.0	$2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$
S,B7	25799.8	248.6	$SDH+2b_6c+c_{550}+c_{551}$ , $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ , $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B8	1835.7	85.0	$2b_6c$
<b><math>caa_3</math></b>			
B1,C1	5159.8	1832.0	$12b_6c+6caa_3+6c_{550}+6c_{551}$
B2,C2	5155.6	1273.5	$8b_6c+4caa_3+4c_{550}+4c_{551}$
B3,C3	2873.7	1121.5	$6b_6c+3caa_3+3c_{550}+3c_{551}$
B4,C4	5063.0	600.5	$4b_6c+2caa_3+2c_{550}+2c_{551}$
B5,C5	18135.1	452.0	$2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$
B6,C6	12548.2	348.5	$2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$
S,B7,C7	8379.2	233.0	$SDH+2b_6c+c_{550}+c_{551}$ , $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ , $4b_6c+c_{550}+c_{551}$
B8,C8	20475.2	110.5	$caa_3$
<b>ATPasa</b>			
A1	9674.5	107.5	$\alpha$ y $\beta$
A2	1078.6	107.0	$\alpha$ y $\beta$

El la figura 42 y en la tabla 27 se muestra el análisis los carriles del Sobrenadante LUW46, teñidos para las actividades de: NDH-2, SDH,  $b_6c$ ,  $caa_3$  y ATPasa, con su respectiva tinción con Coomassie.

Al teñir el gel para la NDH-2 se obtuvieron dos bandas, N2, acercándose a la masa del monómero de la NDH-2, y N1, cercana a un dímero del complejo.

En la tinción de la SDH, se obtuvo la banda S cercana en masa a un dímero del complejo, o en asociación con otro de los complejos respiratorios.

Para la tinción del complejo  $b_6c$  se obtuvieron las bandas B1 a B8. La banda B7 coincidió con la actividad de la banda S de SDH, mostrando la mayor área de actividad para esta tinción. Por la masa molecular de esta banda se pueden inferir las siguientes conformaciones de los complejos:  $SDH+2b_6c+c_{550}+c_{551}$ ,  $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ ,  $4b_6c+c_{550}+c_{551}$ . La B8 fue equivalente a la banda para el dímero del complejo  $b_6c$ , identificada en el Sobrenadante 168. La mayor actividad se concentró entre las masas moleculares 562 a 248.6 kDa.

En el caso de la tinción de la  $caa_3$ , se obtuvieron las bandas C1 a C8. Las bandas C1 a C6 coincidieron con la actividad del complejo  $b_6c$ , indicando diferentes estequiometrías del súper complejo  $b_6c+caa_3$  ( $12b_6c+6caa_3+6c_{550}+6c_{551}$ ,  $8b_6c+4caa_3+4c_{550}+4c_{551}$ ,  $6b_6c+3caa_3+3c_{550}+3c_{551}$ ,  $4b_6c+2caa_3+2c_{550}+2c_{551}$ ,  $2b_6c+2caa_3+c_{550}+c_{551}$  y  $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ ). La banda C7 coincidió con la banda de actividad de la SDH, S, y la banda B7 del complejo  $b_6c$ , posiblemente compuesta por

SDH+ $2b_6c+c_{550}+c_{551}$ ,  $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$  y  $4b_6c+c_{550}+c_{551}$ , de acuerdo con la masa molecular de la banda. La banda C8, con la mayor área de actividad, tuvo una masa cercana al monómero de la  $caa_3$ . Las áreas de actividad más altas se obtuvieron entre las masas de 452 y 110.5 kDa, un rango similar encontrado en la tinción del complejo  $b_6c$ . Al contrario de la actividad del complejo  $b_6c$ , en la cual el dímero tuvo una actividad baja, el monómero de la  $caa_3$  tuvo el área más grande.

Para la tinción de la ATPasa, se obtuvieron las bandas A1 y A2, con masas moleculares cercanas a la suma de una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ .

- ❖ Geles de segunda dimensión de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (2D SDS-PAGE):
- ❖ Sobrenadante 168

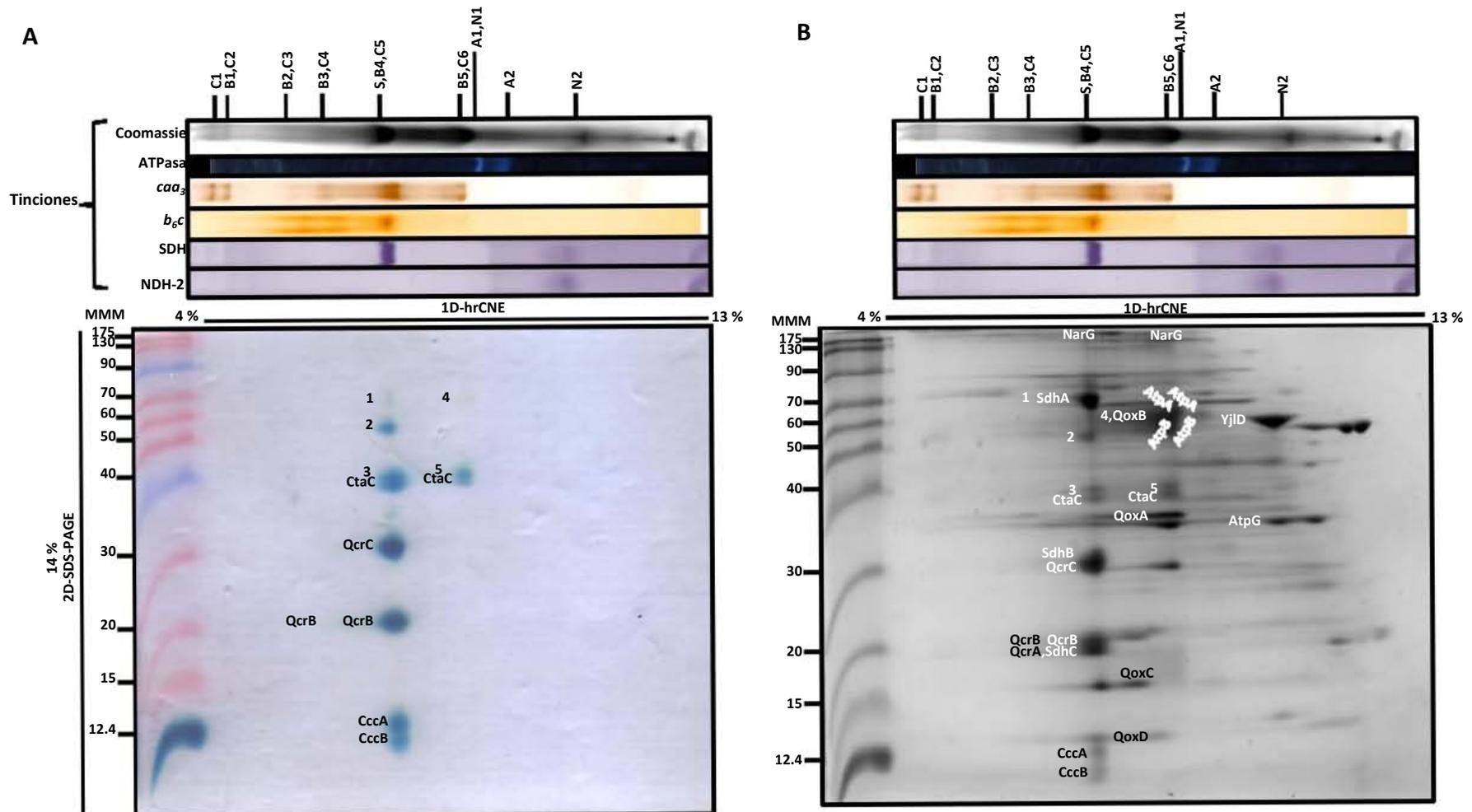


Figura 43. Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D del Sobrenadante 168, previamente teñidos para la actividad de los complejos NDH (N), SDH (S), *b6c* (B), *caa3* (C) y ATPasa (A), por medio de geles SDS-PAGE al 14.0 % de acrilamida. En la parte superior se acomodaron los geles de actividad de 1D, y un carril teñido con azul de Coomassie. En la parte inferior se muestra el gel de 2D teñido con TMBZ para hemos covalentemente unidos (A) y con Coomassie (B), con los marcadores de masa molecular (MMM) del lado izquierdo, para identificar las diferentes subunidades de



#### ❖ Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ

En la figura 43A y en la tabla 28A se muestra el análisis del gel de 2D teñido con TMBZ para el Sobrenadante 168.

En el carril de la banda B3,C4 del gel de 1D con actividades para los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$ , se obtuvo la banda correspondiente a la subunidad QcrB, del complejo  $b_6c$ .

En la banda S,B4,C5 (gel de 1D) con actividades para la SDH, el complejo  $b_6c$  y la  $caa_3$ , se identificaron las bandas 1, 2 y 3, estas bandas no correspondieron a ninguna subunidad de los complejos de la cadena respiratoria con hemos covalentemente unidos. Se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. Se identificó al complejo  $b_6c$  por las subunidades QcrC y QcrB. Por último se identificaron a los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$  por las proteínas CccA y CccB. Todas estas subunidades migraron en una misma banda. La masa molecular del súper complejo calculado a partir del genoma es de 313.5 kDa, considerando un dímero del  $b_6c$  (144.2 kDa), un monómero de la  $caa_3$  (145 kDa), un citocromo  $c_{550}$  (12.4 kDa) y un citocromo  $c_{551}$  (11.9 kDa), mientras que la banda donde se identificaron tres complejos respiratorios (bandas S,B4,C5) tuvo una masa molecular de alrededor de 223.5 kDa, acercándose a las masas de las siguientes asociaciones asignadas a esta banda en los geles de 1D:  $SDH+2b_6c+c_{550}+c_{551}$  (280.5 kDa),  $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$  (313.5),  $4b_6c+c_{550}+c_{551}$  (312.7 kDa).

En el carril de la banda B5,C6 del gel de 1D, con actividades para los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$ , se obtuvieron proteínas con las bandas 4 y 5, las cuales no se pudieron asignar a alguna de las subunidades de los complejos respiratorios. Se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. Todo esto nos indica que la banda que encontramos recurrentemente en los geles de 1D, la cual no sabíamos si asignar al dímero del  $b_6c$  o al monómero de la  $caa_3$ , es en realidad un monómero de la  $caa_3$ .

#### ❖ Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie

En la figura 43B y en la tabla 28B se muestra el análisis del gel del sobrenadante 168 teñido con azul de Coomassie.

En la banda B3,C4 (1D), con actividades para los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$ , se identificó a la subunidad QcrB del complejo  $b_6c$ .

En el carril de la banda S,B4,C5 (1D), con actividades para los complejos SDH,  $b_6c$  y  $caa_3$ , se identificaron los siguientes complejos: la SDH por las proteínas SdhA, SdhB y SdhC. La  $caa_3$  por la subunidad CtaC. El complejo  $b_6c$  por las subunidades QcrC, QcrB y QcrA. El citocromo  $c_{550}$  que corresponde a la proteína CccA y el citocromo  $c_{551}$  que corresponde a la proteína CccB. Las bandas designadas como 1, 2 y 3, no correspondieron a ninguna subunidad de los complejos respiratorios. Con esta tinción se observó que la SDH podría estar migrando junto con el complejo  $b_6c$  como  $SDH+2b_6c+c_{550}+c_{551}$ , y junto con  $4b_6c+c_{550}+c_{551}$  y el súper complejo  $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$ .

Se identificó a la subunidad NarG de la NAR, pero no coincidió con la actividad de algún complejo respiratorio.

En la banda B5,C6 (gel de 1D), con actividades para los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$ , se asignaron las masas moleculares a las bandas: 4 y 5, pero no coincidieron con la masa molecular de alguna de las subunidades de los complejos respiratorios. Se identificó en la misma banda a la quinol oxidasa  $aa_3$  por las subunidades QoxB, QoxA, QoxC y QoxD. Además de CtaC de la  $caa_3$ .

En la banda A1,N1 del gel de 1D, con actividades para la ATPasa y la NDH, se identificaron por sus masas moleculares a NarG de la NAR, AtpA y AtpB de la ATPasa. Aunque se encontró actividad de NDH en esta banda del gel de 1D, no se pudo identificar a YjID en el gel de 2D.

En la banda A2 (gel de 1D), con actividad para la ATPasa, se identificaron a las proteínas AtpA y AtpB de la ATPsintasa.

En la banda N2 (gel de 1D), con actividad para la NDH, se identificó a la NDH por la proteína YjID y AtpG de la ATPsintasa.

Con el gel de 2D pudimos corroborar a los complejos identificados en los geles de 1D teñidos por actividad y por tanto se corroboró la existencia del súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ .

❖ Sobrenadante LUW46

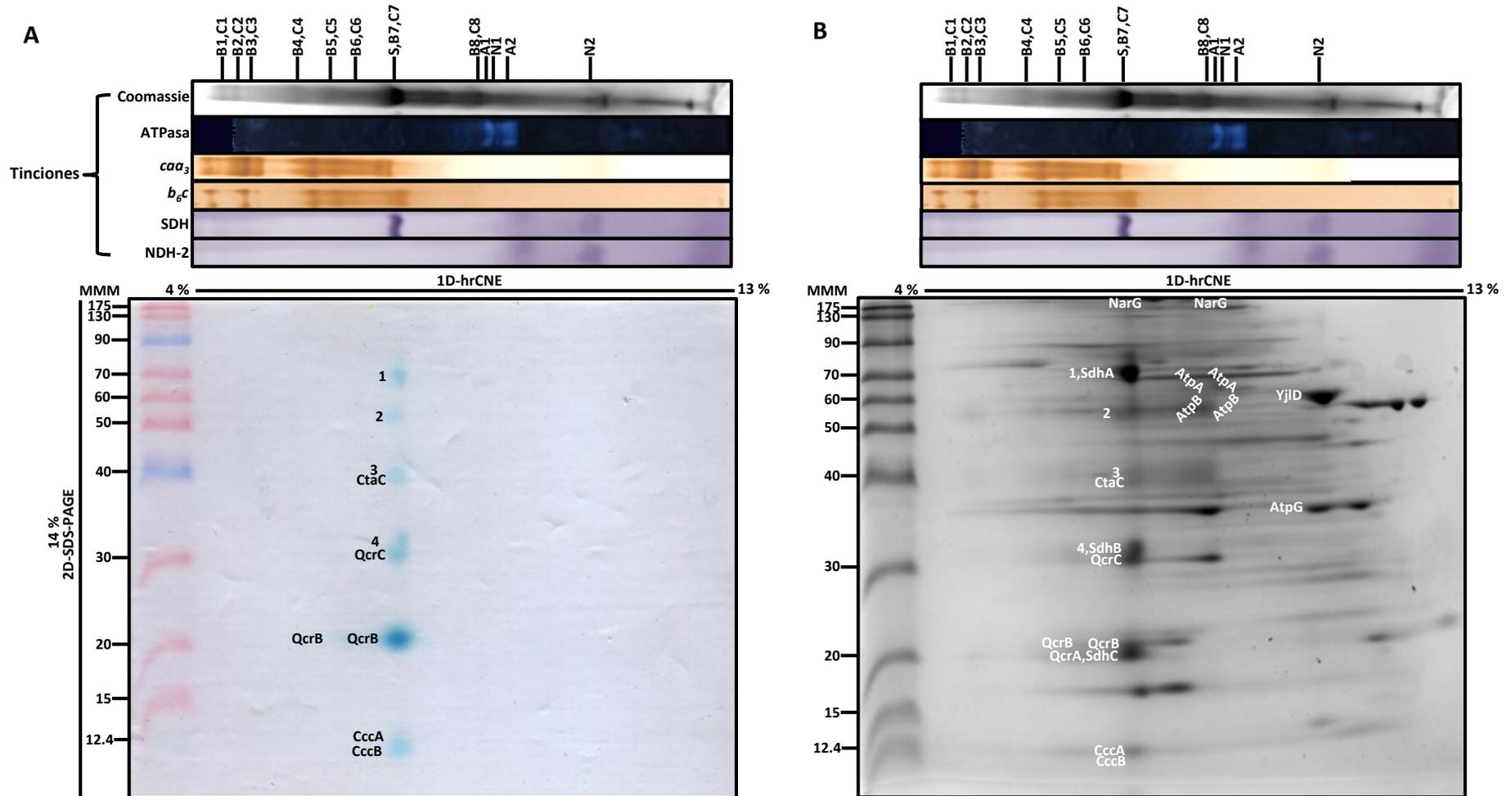


Figura 44. Análisis de 2D de los geles hrCNE de 1D del Sobrenadante LUW46, previamente teñidos para la actividad de los complejos NDH (N), SDH (S), *b<sub>6</sub>c* (B), *caa*<sub>3</sub> (C) y ATPasa (A), por medio de geles SDS-PAGE al 14.0 % de acrilamida. En la parte superior se acomodaron los geles de actividad de 1D, y un carril teñido con azul de Coomassie. En la parte inferior se muestra el gel de 2D teñido con TMbz para hemos covalentemente unidos (A) y con Coomassie, con los marcadores de masa molecular (MMM) del lado izquierdo, para identificar las diferentes subunidades de los

complejos respiratorios que contienen citocromos. En la tabla 29 se muestran las masas y las áreas de cada subunidad identificada. Se tomaron como referencia los gels de 2D de García y colaboradores, 2012.

Tabla 29. Identificación de las subunidades que componen a los complejos respiratorios por medio del gel de 2D teñido con TMBZ (A) y Coomassie (B), del Sobrenadante LUW46. En la parte superior de la tabla se indican los complejos identificados por sus actividades en gels de 1D. A continuación se enlistan las proteínas que se identificaron por su masa molecular en el gel de 2D, se muestra su nombre, su masa molecular obtenida a partir del genoma y en el gel (a/b) y su área (en pixeles).

A						B						
Sobrenadante LUW46 (TMBZ)						Sobrenadante LUW46 (Coomassie)						
B6,C6 ( <i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i> ) Masa molecular: 348.5 kDa			S,B7,C7 (SDH, <i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i> ) Masa molecular: 233.0 kDa			B6,C6 ( <i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i> ) Masa molecular: 348.5 kDa			S,B7,C7 (SDH, <i>b<sub>6</sub>c,caa<sub>3</sub></i> ) Masa molecular: 233.0 kDa			
Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	Nombre de la proteína	Masa molecular a/b (kDa)	Área (pixeles)	
Subunidades del complejo respiratorio	QcrB	25.4/20	617.7	1	-/69	663.8	QcrB	25.4/20	2410.4	1,SdhA	-,65.3/71	6239.8
				2	-/57	288.8				2	-/59	3181.1
				3	-/44	273.6				3	-/44	2395.7
				CtaC	40.1/42	212.9				CtaC	40.1/43	2310.1
				4	-/32	415.0				4,SdhB	-,28.4/31	7755.9
				QcrC	28.6/30	826.2				QcrC	28.6/30	6197.0
				QcrB	25.4/20	3565.1				QcrB	25.4/20	6736.7
				CccA	12.7/12	323.2				QcrA,SdhC	18.7,22.9/19	9591.1
				CccB	11.9/12	447.0				CccA	12.4/12	4081.7
										CccB	11.9/12	1519.1
Subunidades del complejo respiratorio										A1 (ATPasa) Masa molecular: 107.5 kDa		
Subunidades del complejo respiratorio										A2 (ATPasa) Masa molecular: 107.0 kDa		
Subunidades del complejo respiratorio										N2 (NDH) Masa molecular: 50.5 kDa		

- Masas moleculares (kDa) calculadas a partir del genoma.
- Masas moleculares (kDa) obtenidas en el gel de 2D.

#### ❖ **Análisis del gel de 2D teñido con TMBZ**

En la figura 44 y en la tabla 29A se muestra el análisis de los geles de 1D por medio del gel de 2D del Sobrenadante LUW46 teñido con TMBZ.

En la banda B6,C6 (gel de 1D) con actividad para los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$ , se identificó la subunidad QcrB del complejo  $b_6c$ .

En la banda S,B7,C7 (gel de 1D), con actividad para los complejos SDH,  $b_6c$  y  $caa_3$  se asignaron las masas moleculares a las bandas 1, 2, 3 y 4, a las cuales no se pudieron asignar a alguna de las subunidades de los complejos respiratorios. Se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. Se identificó al complejo  $b_6c$  por las subunidades QcrC y QcrB. Finalmente se identificó al citocromo  $c_{550}$  como la proteína CccA y al citocromo  $c_{551}$  como CccB.

#### ❖ **Análisis del gel de 2D teñido con Coomassie**

En la figura 44B y en la tabla 29B, se muestra el gel de 2D del Sobrenadante LUW46 teñido con azul de Coomassie.

En la banda B6,C6 (gel de 1D), con actividad para los complejos  $b_6c$  y  $caa_3$  se identificó la subunidad QcrB del complejo  $b_6c$ .

En la banda S,B7,C7 (gel de 1D), con actividad para los complejos SDH,  $b_6c$  y  $caa_3$ , se identificó a la SDH por las subunidades SdhA, SdhB y SdhC. Las bandas 1, 2, 3 y 4 no correspondieron a ninguna de las subunidades de los complejos respiratorios. Se identificó a la  $caa_3$  por la subunidad CtaC. También se identificó al complejo  $b_6c$  por las subunidades QcrC, QcrB y QcrA. Por último a los citocromos  $c_{550}$  por la proteína CccA y al citocromo  $c_{551}$  por la proteína CccB. Aquí, nuevamente la SDH se puede estar asociando con el complejo  $b_6c$  y los citocromos como  $SDH+2b_6c+c_{550}+c_{551}$ , junto con  $2b_6c+caa_3+c_{550}+c_{551}$  y  $4b_6c$ , o formando un dímero del complejo.

También se identificó a NarG de la NAR migrando fuera de cualquier banda con actividad para alguno de los complejos respiratorios.

En la banda A1 se identificaron las bandas: NarG de la NAR. También se identificaron las bandas AtpA y AtpB de la ATPasa.

En la banda A2 se identificaron las bandas AtpA y AtpB de la ATPasa.

Por último en la banda N2 se identificó a la NDH por la proteína YjID y AtpG de la ATPasa.

#### ❖ **Comparación de los Sobrenadantes 168 y LUW46**

##### ❖ **Geles hrCNE de 1D**

En ambos sobrenadantes, la NDH-2 no se asoció con ningún otro complejo respiratorio, pero si se obtuvo la banda N1 de alrededor de 100 kDa, cercana en masa molecular a un dímero del complejo. Además esta banda N1 tuvo un área de actividad mayor en el Sobrenadante 168 en comparación con el Sobrenadante LUW46.

En el caso de la SDH, podría estar formando un dímero o interactuando con el súper complejo  $b_6c+caa_3$ , tanto en la 168 como en la LUW46, lo cual aún no ha sido reportado.

En la tinción del complejo  $b_6c$  y la  $caa_3$ , en los geles del Sobrenadante LUW46, se obtuvieron tres y dos bandas más respectivamente en comparación con el Sobrenadante 168, algunas de mayor masa molecular. Para la tinción del complejo  $b_6c$ , la mayor actividad (entre 25000 y 26000 pixeles), la tuvieron las bandas con el súper complejo  $2b_6c+2caa_3+C_{550}+C_{551}$  y las posible asociación  $SDH+2b_6c+C_{550}+C_{551}$ ,  $2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ ,  $4b_6c+C_{550}+C_{551}$  para ambos sobrenadantes. Además al comparar las áreas de actividad del dímero del complejo  $b_6c$  y el monómero de la  $caa_3$ , parece ser que el complejo  $b_6c$  con 815.6 pixeles, se encuentra solo y en baja cantidad, al contrario de la  $caa_3$  que parece encontrarse de forma libre en gran proporción, con un área de 11484.8 pixeles para el monómero. La falta de la  $aa_3$ , en la LUW46 parecer ser compensada por las diferentes estequiometrías del súper complejo  $b_6c+caa_3$ , por tanto éste se expresa en mayor cantidad y en estequiometrías de mayor tamaño.

En ambos casos solamente se obtuvieron bandas correspondientes a una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$  de la ATPsintasa, y no se identificó ninguna banda correspondiente al complejo entero.

#### ❖ Geles SDS-PAGE de 2D

Tanto el citocromo  $c_{550}$  como el citocromo  $c_{551}$  son parte del súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$ , siendo esenciales para su formación.

En la banda correspondiente tanto al dímero del  $b_6c$  como al monómero de la  $caa_3$ , en los geles de 1D, se obtuvo la subunidad CtaC de la  $caa_3$  en los geles de 2D, por lo que es un monómero de la  $caa_3$ .

Al parecer en ambos sobrenadantes, la concentración de citocromo  $c$  no fue la suficiente para poder observar, en el gel de 2D, las bandas de mayor masa molecular del súper complejo  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  obtenidas en la tinción de TMBZ del gel de 1D.

En el gel de 2D del Sobrenadante 168 se obtuvieron las bandas 4, 5 y CtaC, en la tinción con TMBZ, que provienen de la banda B5,C6 del gel de 1D (Figura 43), mientras que en el Sobrenadante LUW46, en su banda equivalente, B8,C8 (Figura 44) no se obtuvieron estas proteínas, indicando que la  $caa_3$  no se obtuvo en forma de monómero en la LUW46. Además las áreas de las subunidades identificadas en la banda S,B7,C7 del Sobrenadante LUW46 teñido con TMBZ (Figura 44), en comparación con las subunidades identificadas en la banda equivalente S,B4,C5 (Figura 43), del Sobrenadante 168 tuvieron una menor área, por lo que la proteína podría encontrarse de forma más distribuida en los súper complejos  $b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  de mayor masa molecular en la mutante como ya se observó en el análisis del gel de 1D.

En los geles teñidos con azul de Coomassie se identificaron las subunidades de la SDH migrando junto con el  $b_6c$  y los citocromos  $c_{550}$  y  $c_{551}$ , por lo que este complejo podría estar formando dímeros coincidiendo en masa molecular con el súper complejo  $2b_6c+caa_3+C_{550}+C_{551}$  y  $4b_6c$ , o podría estar interactuando con el cómo  $SDH+2b_6c+C_{550}+C_{551}$ , esto se observó para ambos sobrenadantes.

Como era de esperarse, en el Sobrenadante de la LUW46 no se encontraron las subunidades de la  $aa_3$ .

Con los geles de 2D, se corroboró la identidad de los complejos teñidos por actividad en los geles de 1D.

Tabla suplementaria 1. Concentraciones relativas de citocromos identificados (expresados en nmol de citocromos *c*, *b* y *a*/mg de proteína) de cada una de las fracciones obtenidas en las 3 cromatografías.

	nmol/ mg de proteína		
	$b_6c$ LUW46(1)	$b_6c$ LUW46(2)	$b_6c$ LUW46(3)
cit <i>c</i>	x	2.94	4.08
cit <i>b</i>	x	6.00	3.14
cit <i>a</i>	x	x	0.04
	$b_6c+caa_3$ LUW46(1)	$b_6c+caa_3$ LUW46(2)	$b_6c+caa_3$ LUW46(3)
cit <i>c</i>	4.57	4.29	6.69
cit <i>b</i>	3.24	6.43	4.54
cit <i>a</i>	0.57	2.15	1.61
	SDH+ $caa_3$ LUW46(1)	SDH+ $caa_3$ LUW46(2)	SDH+ $caa_3$ LUW46(3)
cit <i>c</i>	1.08	1.41	5.95
cit <i>b</i>	3.06	2.97	5.66
cit <i>a</i>	0.37	1.06	1.96

## Referencias:

- ❖ Acín-Pérez,R., Bayona-Bafaluy,M.P., Fernández-Silva,P., Moreno-Loshuertos,R., Pérez-Martos,A., Bruno,C., Moraes,C.T. and Enríquez,J.A. 2004. Respiratory Complex III Is Required to Maintain Complex I in Mammalian Mitochondria. *Molecular Cell*. Vol. 13, 805-815, March 25, 2004.
- ❖ Acín-Pérez,R., Fernández-Silva,P., Peleato,M.L., Acisclo Perez-Martos,A. and Enríquez,J.A. 2008. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell* 32, 529–539, November 21, Elsevier Inc.
- ❖ Arnold,I., Pfeiffer,K., Neupert,W., Stuart,R.A. and Schägger. 1998. Yeast mitochondrial F1-F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *The EMBO Journal*. Vol. 17. No. 24. Pp. 7170-7178.
- ❖ Azarkina,N., Siletsky,S., Borisov,V., von,W.C., and Konstatinov,A.A. 1999. A cytochrome *bb'*-type quinol oxidase in *Bacillus subtilis* strain 168. *J. Biol. Chem.* 274, 32810-32817.
- ❖ 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.
- ❖ 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-aa3* Complexes. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 260. No. 4, Issue of February 25 pp, 2458-2467.
- ❖ Bultema,J.B., Braun,H.P., Boekema,E.J. and Kouril,R. 2009. Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787 (2009) 60–67.
- ❖ Davies,K.M., Strauss,M., Daum,B., Kief,J.H., Osiewacz,H.D., Rycovska,A. Zickermann,V., and Kühlbrandt,W. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *PNAS*. August 23, 2011. Vol. 108. no. 34. 14121–14126.
- ❖ de Vrij,W., van der Burg,B. and Konings,W.N. 1987. Spectral and potentiometric analysis of cytochromes from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 166, 589-595.
- ❖ Diaz,F., Enríquez,J.A. and Moraes,C.T. 2012. Cells Lacking Rieske Iron-Sulfur Protein Have a Reactive Oxygen Species-Associated Decrease in Respiratory Complexes I and IV. *Molecular and Cellular Biology*. p. 415-429.
- ❖ García Montes de Oca,L.Y.J., Chagolla López,A., González de la Vara,L., Cabellos Avelar,T., Gómez Lojero,C., and Gutiérrez Cirlos,E.B. 2012. The composición of the *Bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplex. *J. Bioenerg. Biomembr.*
- ❖ Genova,M.L. and Lenaz,G. 2014. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837 (2014) 427-443.
- ❖ Glick,B.S. and Pon.I.A. 1995. Isolation highly purified mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 1995; 260:213-23.
- ❖ Gyan,S., Shoochira,Y., Sarto,I., Takeuchi,M. and Sato,T. 2006. Regulatory Loop between Redox Sensing of the NADH/NAD<sup>+</sup> Ratio by Red (YdiH) and Oxidation of NADH by NADH Dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, Oct. 2006, p. 7062-7071.
- ❖ Hägerhäll,C., Aasa,R., Wachenfeldt,C.V., and Hederstedt,L. 1992. Two Hemes in *Bacillus subtilis* Succinate:Menaquinone Oxidoreductase (Complex II). *Biochemistry* 1992, 31, 7411-7421.

- ❖ Hederstedt,L. 1986. Molecular Properties, Genetics, and Biosynthesis of *Bacillus subtilis* Succinate Dehydrogenase Complex. *Methods in Enzymology*, Vol. 126.
- ❖ Heinemeyer,J., Braun,H.P. Boekema,E.J. and Kouřil,R. A structural model of the cytochrome c reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12240–12248.
- ❖ 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.
- ❖ Jin,P., Zhang,L., Yuan,P., Kang,Z., Du,G. and Chena,J. 2016. Efficient biosynthesis of polysaccharides chondroitin and heparosan by metabolically engineered *Bacillus subtilis*. *Carbohydrate Polymers* 140 (2016) 424–432.
- ❖ Jünemann,S. 1997. Cytochrome bd terminal oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1321. (1997) 107-127.
- ❖ Konings,W.N. and Freese,E. 1972. Amino Acid Transport in Membrane Vesicles of *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 247, No. 8, Issue of April 25, pp. 2408-2418. Printed in USA.
- ❖ Kunst,F. et al. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. Vol. 390. 20 November 1997.
- ❖ Kutoh,E. and Sone,N. 1988. Quinol-cytochrome c Oxidoreductase from the Thermophilic Bacterium PS3. *The Journal of Biological Chemistry*.
- ❖ Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Reprinted from *Nature*, Vol. 227, No. 5229, pp. 680-685, August 15.
- ❖ Liu,X. and Taber,H.W. 1998. Catabolite Regulation of the *Bacillus subtilis* *ctaBCDEF* Gene Cluster. *J. Bacteriol.* p. 6154-6163.
- ❖ Ljungdahl,P.O., Pennoyer,J.D., Robertson,D.E. and Trumpower,B.L. 1987. Purification of highly active cytochrome *bc<sub>1</sub>* complexes from phylogenetically diverse species by a single chromatographic procedure. *Biochimica et Biophysica 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. Department of Pharmacology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri.
- ❖ Magalon,A., Arias-Cartin,R. and Walburger,A. 2012. Supramolecular Organization in Prokaryotic Respiratory Systems. *Advances in Microbial Physiology*, Volume 61, ISSN 0065-2911.
- ❖ Marino,M., Hoffmann,T., Schmid,R., Möbitz,H. and Jahn,D. 2000. Changes in protein synthesis during the adaptation of *Bacillus subtilis* to anaerobic growth conditions. *Microbiology* (2000), 146, 97-105.
- ❖ Markwell,M.A.K., Haas,S.M., BIEBER,L.L. and Tolbert,N.E. 1987. A Modification of the Lowry Procedure to Simplify Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Sample. *Analytical Biochemistry* 87. 206-210.
- ❖ Megehee,J.A., Hosler,J.P. and Lundrigan,M.D. 2006. Evidence for a cytochrome *bcc-aa<sub>3</sub>* interaction in the respiratory chain of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*. Mar; 152(Pt 3): 823-9.
- ❖ 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.

- ❖ Niebisch,A. and Bott,M. 2003. Purification of a Cytochrome *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>* Supercomplex with Oxidase Activity from *Corynebacterium glutamicum*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 278, No. 6, Issue of February 7, pp. 4339-4346, 2003.
- ❖ Nübel,E., Wittig,I., Kerscher,S., Brandy,U. and Schägger,H. 2009. Two-dimensional native electrophoretic analysis of respiratory supercomplexes from *Yarrowia lipolytica*. Proteomics 2009, 9, 2408-2418.
- ❖ Peters,K., Dudkina,N.V., Jansch,L., Braun,H.P. and Boekema,E.J. A structural investigation of complex I and I + III<sub>2</sub> supercomplex from *Zea mays* at 11–13 Angstrom resolution: assignment of the carbonic anhydrase domain and evidence for structural heterogeneity within complex I, Biochim. Biophys. Acta 1777 (2008) 84–93.
- ❖ Prunetti,L., Infossi,P., Brugna,M., Ebel,C., Giudici-Ortoni,M.T. and Guiral,M. 2012. New Functional Sulfide Oxidase-Oxygen Reductase Supercomplex in the Membrane of the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus*. The Journal of Biological Chemistry Vol. 285, NO. 53, pp. 41815–41826.
- ❖ Richardson,D.J. 2000. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. Microbiology. 146, 551-571.
- ❖ Santana,M., Kunst,F., Hullo,M.F., Rapoport,G., Danchin,A.andGlaser,P. 1992. Molecular Cloning, Sequencing, and Physiological Characterization of the *qox* Operon from *Bacillus subtilis* Encoding the *aa<sub>3</sub>-600* Quinol Oxidase. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 267, No. 15, Issue of May 25, pp. 10225-10231, 1992. Printed in U.S. A.
- ❖ Saraste,M., Metso,T., Nakari,T., Jalli,T., Lauraeus,M. and Van Der Oost,J. 1991. The *Bacillus subtilis* cytochrome-c oxidase. Variations on a conserved protein theme. Eur. J. Biochem. 195, 517-525.
- ❖ Schäfer,E., Seelert,H., Reifschneider,N.H., Krause,F. Dencher,N.A. and Vonck,J. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes, J. Biol. Chem. 281 (2006) 15370–15375.
- ❖ Schägger,H., Cramer,W.A. and van 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 Biochemistry 217, 220-230.
- ❖ Schnorpfel,M., Janausch,I.G., Bisel,S., Kröger,A. and Uden,G. 2001. Generation of a proton potential by succinate dehydrogenase of *Bacillus subtilis* functioning as a fumarate reductase. EUR. J. Biochem. 268, 3069-3074 (2001).
- ❖ Schneider,C.A., Rasband,W.S. and Eliceiri,K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods. Vol. 9 No. 7. July 2012. 671.
- ❖ Sone,N., Sekimachi,M. and Kutoh,E. 1987. Identification and Properties of a Quinol Oxidase Super-complex Composed of a *bc<sub>1</sub>* Complex and Cytochrome Oxidase in the Thermophilic Bacterium PS3. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 262. No. 32. November 15, pp. 15386-15391. USA.
- ❖ Sonenshein,A.L., Hoch,J.A. and Losick,R. (2002). *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives From Genesto Cells. ASM RESS. Washington, D.C. 163-179 pp.
- ❖ Sousa,P.M.F., Silva,S.T.N., Hood,B.L., Charro,N., Carita,J.N., Vaz,F., Penque,D., Conrads,T.P. and Melo,A.M.P. 2011. Supramolecular organizations in the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. Biochimie 93, 418-425.

- ❖ Sousa,P.M.F, Videira,M.A.M., Bohn,A., Hood,B.L., Conrads,T.P., Goulao,L.F. and Melo,A.M.P. 2012. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*: from genes to supercomplexes. *Microbiology*. 158, 2408-2418.
- ❖ Sousa,P.M.F., Videira,M.A.M., Santos,F.A.S., Hood,B.L., Conrads,T.P., and Melo,A.M.P. 2013. The *bc:caa<sub>3</sub>* supercomplexes from the gram positive bacterium *Bacillus subtilis* respiratory chain: A megacomplex organization? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 537. 153-160.
- ❖ Strauss,M., Hofhaus,G., Schröder,R.R. and Kühlbrandt,W. 2008. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* 27:1154–1160.
- ❖ 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*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 279. No. 6, Issue of February 6, pp. 5000-5007.
- ❖ 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 Biochemistry* 75, 168-176.
- ❖ Wachenfeldt.C. and Hederstedt,L. (2002). *Bacillus subtilis* and Its closest Relatives: from Genes to Cell. Ed. By A.L. Sonenshein. *al.* ASM pres. Washington, D. C.
- ❖ Winstedt,L. and Von Wachenfeldt,C. 2000. Terminal Oxidases of *Bacillus subtilis* Strain 168: One Quinol Oxidase, Cytochrome *aa<sub>3</sub>* or Cytochrome *bd*, Is Required for Aerobic Growth. *Journal of Bacteriology*, Dec. 2000, p. 6557–6564.
- ❖ Winstedt,L., Yoshida,K., Fujits,Y. and Wachenfeldt,C.V. 1998. Cytochrome *bd* Biosynthesis in *Bacillus subtilis*: Characterization of the *cydABCD* Operon. *Journal of Bacteriology*, Dec. 1998, p. 6571-6580.
- ❖ Wittigl., Beckhaus,T., Wumaier,Z., Karas,M. and Schägger,H. 2010. Mass Estimation of Native Proteins by Blue Native Electrophoresis. *Molecular and Cellular Proteomics* 9.10.
- ❖ Wittig,I., Carozzo,R., Santorelli,F.M. and Schägger,H. 2006. Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757. 1066-1072.
- ❖ Wittig,I., Karas,M., and Schägger,H. 2007. High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Molecular and Cellular Proteomics* 6.7.
- ❖ 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.
- ❖ 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.
- ❖ 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 Microbiology Letters* 226. 121-126.
- ❖ Cui,T.Z., Conte,A., Fox,J.L., Zara,V. and Winge,D.R. 2014. Modulation of the Respiratory Supercomplexes in Yeast. *ENHANCED FORMATION OF CYTOCHROME OXIDASE INCREASES THE STABILITY AND ABUNDANCE OF RESPIRATORY SUPERCOMPLEXES*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 289. No. 9. pp. 6133-6141.

Paginas de internet:

- ❖ <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>
- ❖ <http://imagej.nih.gov/ij/>