

03062
2ej. 9

TRANSPORTE DE ELECTRONES POR LA VIA DE NADH Y SUCCINATO
EN LA CADENA RESPIRATORIA DE Bacillus cereus

RUBEN DARIO JARAMILLO LANCHERO

TRABAJO DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (BIOQUIMICA)

DIRECTOR: JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVAN
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

MEXICO, D.F., 1989

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	pág
INTRODUCCION	1
1. CADENAS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN BACTERIA	8
1.1 QUINONAS	8
1.2 CITOCROMOS	12
2. COMPLEJOS PROTEICOS DE LA CADENA RESPIRATORIO.....	16
2.1 MEMBRANA MITOCONDRIAL	16
2.2 MEMBRANA PLASMATICA BACTERIANA	17
2.3 SUCCINATO DESHIDROGENASA-CITOCROMO <u>b</u> EN BACTERIAS	18
3. INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES	20
3.1 INHIBIDORES DEL COMPLEJO II (SUCCINATO: UBIQUINONA OXIDO- REDUCTASA)	20
3.2 INHIBIDORES DEL COMPLEJO III (FERROCITOCROMO <u>c</u> OXIDORRE- DUCTASA)	21

CONTENIDO (continuación)

4. METODOS Y MATERIALES	23
4.1 MEDIO DE CULTIVO, CONTROL DEL CRECIMIENTO Y RECOLECCION ..	23
4.2 FRACCIONAMIENTO CELULAR Y OBTENCION DE MEMBRANAS	24
4.3 ENSAYOS ENZIMATICOS	25
4.3.1 Oxidasas	25
4.3.1.1 NADH y succinato oxidasa	25
4.3.1.2 Citocromo <u>c</u> oxidasa (Ascorbato + TMPD oxidasa)	26
4.3.2 Oxidorreductasa	26
4.3.2.1 NADH: DCPIP oxidorreductasa	26
4.3.2.2 Succinato: PMS + DCPIP oxidorreductasa	27
4.4 FOTOINACTIVACION DE LA MENAQUINONA	27
4.5 ANALISIS ESPECTRAL DE LOS CITOCROMOS	28
4.6 NUTRIENTES Y REACTIVOS	29
5. RESULTADOS	30
5.1 EFECTO DEL TTFA EN LA ACTIVIDAD DE LA SUCCINATO OXIDASA ..	31
5.2 FOTOINACTIVACION DE LA MENAQUINONA Y RESTAURACION DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES EN LA CADENA RESPIRATORIA DE <u>E. cereus</u>	32

CONTENIDO (continuación)

5.3 REDUCCION DE LOS CITOCROMOS DE MEMBRANAS DE <u>B. cereus</u>	36
5.4 EFECTO DE LOS INHIBIDORES DEL COMPLEJO bc ₁	41
6. DISCUSION	45
RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFIA	51

FIGURAS

	pág
FIGURA 1. A. Posibilidades de composición y organización de los sistemas respiratorios bacterianos.	3
FIGURA 2. Estructura hemo de los citocromos	13
FIGURA 3. Efecto del TFA sobre la actividad de la succinato oxidasa (A, O) en membranas de <u>B. cereus</u> y de <u>B. phaseoli</u>	32
FIGURA 4. (A) Fotoinactivación de la menaquinona con U.V. (360 nm) y su efecto sobre las actividades respiratorias de membranas de <u>B. cereus</u>	34
FIGURA 5. (A) Espectros diferenciales (red menos oxid) a temperatura ambiente de membranas no tratadas (—) y fotoinactivadas (—) con luz U.V. (360 nm) durante 120 min	37
FIGURA 6. Espectros diferenciales (red menos oxid) a temperatura de nitrógeno líquido a pH 6.6 de membranas no tratadas (control) e irradiadas con U.V. (360 nm) por 60 min	39

FIGURAS (continuación)

FIGURA 7. Cinética de reducción de cit. <u>b</u> (560-575 nm) de membranas no irradiadas (—) y fotoinactivadas (---) con luz U.V (360 nm) duran 60 min.....	40
FIGURA 8. Efecto del HQNQD y antimicina A sobre la actividad de la NADH oxidasa (Δ, Δ) y succinato oxidasa (O, O) en membranas de <u>B. cereus</u>	42
FIGURA 9. Efecto del mixotiazol sobre la actividad de la NADH y succinato oxidasa en membranas de <u>B. cereus</u> y <u>R. phaseoli</u>	43
FIGURA 10. Esquema propuesto para el sistema respiratorio aeróbico de <u>B. cereus</u>	48

TABLAS

	pág
TABLA 1. Potenciales redox estándar de las quinonas a pH 7 relativo al electrodo de hidrógeno normal	5
TABLA 2. Longitudes de onda de los principales picos en la región α (540-650 nm).....	15
TABLA 3. Actividades respiratorias presentes en membranas de <u>E. cereus</u> crecidas en diferentes medios de cultivo ..	30

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

asc	ascorbato
ATP	adenosin trifosfato
B	Bacillus
CAAS	casaminoácidos
cit	citocromo
CO	monóxido de carbono
DCPIP	diclorofenolindofenol
DMQ	2-desmetilquinona
DMSO	dimetil sulfoxido
E'o	potencial óxido-reducción estandar
E	Escherichia
DH	deshidrogenasa
FAD	flavín adenín dinucleótido
FMN	flavín mononucleótido
G	Glucosa
HQNO	2-heptilhidroxiquinolina-N-óxido
M	Mycobacterium
MQ	menaquinona
Mr	peso molecular relativo

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO (Continuación)

mV	milivoltios
NADH	nicotinamida adenín dinucleótido reducido
nm	nanómetros
NHQNO	nonilhidroxiquinolina-N-óxido
oxid	oxidado
PMS	metasulfato de fenazina
PMSf	fenilmetilsulfonil fluoruro
Q	ubiquinona
R	Rhizobium
red	reducido
rpm	revoluciones por minuto
SDH	succinato deshidrogenasa
SDS	dodecil sulfato de sodio
TMPD	tetrametil-para-fenilen diamina
TRIS	hidroximetilaminometano
TCM	amortiguador TRIS-HCl 50 mM, cloruro de calcio 5 mM y cloruro de magnesio 5 mM.
TFA	tenoiltrifluoroacetona
U.V.	ultravioleta

RESUMEN

En el presente trabajo, se estudió el papel de la menaquinona en el transporte de los electrones que vienen del NADH y el succinato en las membranas de Bacillus cereus; además, se investigó el probable primer aceptor de la succinato deshidrogenasa (SDH); finalmente, se observó el efecto del tenoil-trifluoroacetona (TFA) y de los inhibidores del complejo bc₁ de la cadena respiratoria de mitocondria, sobre la cadena respiratoria de Bacillus cereus.

Los experimentos de irradiación con luz ultravioleta de 360 nm, reconstitución con menadiona, inhibición con TFA, antimicina, HQQND y mixotiazol, nos permiten sugerir que en Bacillus cereus, la vía de oxidación para NADH y succinato no son equivalentes en cuanto al uso de la menaquinona como mediadora en el transporte de los electrones; igualmente, los resultados favorecen la tesis de que el aceptor primario de los electrones de la SDH es un citocromo b, y probablemente exista entre ellos una conexión estructuro-funcional. Por otro lado, el sitio de acción del TFA probablemente no esté presente o se encuentre modificado en Bacillus cereus, y al parecer podría existir un complejo III diferente al de mitocondria. Por último, se sugiere que existen dos sitios de acción para el HQQND, uno de alta afinidad en la vía de oxidación de succinato, y otro de baja afinidad en la vía de la NADH oxidasa; y por lo menos un sitio de acción común para ambos succinato y NADH oxidasa con la antimicina.

SUMMARY

In this paper the role of menaquinone in electron transfer in the electrons that come from NADH and the succinate in the Bacillus cereus membranes was studied; moreover, the probable first acceptor of the succinate dehydrogenase (SDH) was investigated; finally, the effect of thenoyltrifluoroacetone (TTFA) and the inhibitors of the complex bc₁ of the respiratory chain of mitochondria over the respiratory system of Bacillus cereus was observed.

The experiments of irradiation with ultraviolet light at 360 nm, the reconstitution with menadione, the inhibition with TTFA, antimycin A, HOQNO and myxothiazol, enable us to suggest that in the Bacillus cereus the oxidation course for NADH and succinate are not equivalent as far as the use of menaquinone as a measure in the electron transfers is concerned; similarly the results favor the hypothesis that the primary acceptor of the electrons of SDH is a cytochrome b, and there probably exists between them a structural functional connection. On the other hand, the action site of TTFA is probably not present, or it is modified in Bacillus cereus, and there seems to exist a complex III, which is different from that of mitochondria. Finally, it is suggested that there exist two action sites for HOQNO: one with a high affinity in the oxidation pathway of succinate and the other of low affinity in the route of NADH, and least a common action site for both succinate and NADH oxidase with antimycin A.

INTRODUCCION

Los sistemas respiratorios bacterianos son complejos en su composición, organización y regulación genética. Es caso general, la existencia de sistemas ramificados con múltiples deshidrogenasas capaces de donar electrones directamente (sin mediación de NAD) a una o más cadenas de transporte de electrones (1). Del mismo modo, la salida de los electrones hacia el oxígeno puede estar mediada hasta por tres diferentes citocromos oxidasas (citocromos aa₃, c, y d) que pueden ser distinguidas por su afinidad al O₂ y su sensibilidad al cianuro (2 - 4).

La composición cuantitativa y cualitativa de los sistemas respiratorios bacterianos es variable aún dentro de una misma especie, no pareciendo existir relación estequiométrica entre los componentes individuales (2, 4, 5). De acuerdo con las condiciones de crecimiento: Tensión de oxígeno, naturaleza de la fuente de carbono y edad de cultivo, una misma bacteria puede variar ampliamente su composición de citocromos, quinonas y deshidrogenasas (2, 4 - 6). Tensiones elevadas de O₂ favorecen la expresión de los citocromos c y aa₃. La expresión de citocromos b, incluido el cit. o, tiende a ser elevada

independientemente de la concentración de O_2 ; sin embargo, se ha demostrado que en E. coli, existen cuando menos cuatro tipos diferentes de citocromos b que son difíciles de distinguir espectralmente y que se expresan diferencialmente de acuerdo a la tensión de O_2 (2, 3) y asociados a diversas cadenas de transporte de electrones. Es complicado entenderlos porque es difícil distinguir sus componentes individuales, su estequiometría y las distintas secuencias en las que funcionan.

En términos generales podemos agrupar a los componentes de diversos sistemas respiratorios bacterianos en tres sectores funcionales (Fig. 1A): El sector de entrada, constituido por múltiples deshidrogenasas y flavoenzimas, un sector intermedio que puede ser una vía común o formada por vías paralelas, aquí encontramos a las quinonas, centros hierro-azufre, citocromos de tipo b y c, y en ocasiones, metaloproteínas. El sector de salida puede estar constituido hasta por tres citocromo oxidasas diferentes (cits. aa₃, o y d) cuando el aceptor final es el O_2 ; en ausencia de éste, las bacterias facultativas crecidas en anaerobiosis pueden utilizar aceptores inorgánicos como el nitrato y sulfato ó aceptores orgánicos diversos. Para cada caso habrá una reductasa específica y en muchos casos un citocromo de tipo b ó c que enlaza a la reductasa terminal con los sectores previos de la cadena.

Las bacterias contienen varios tipos de quinonas liposolubles (Fig. 1B); sin embargo, las más frecuentes son las ubiquinonas derivadas

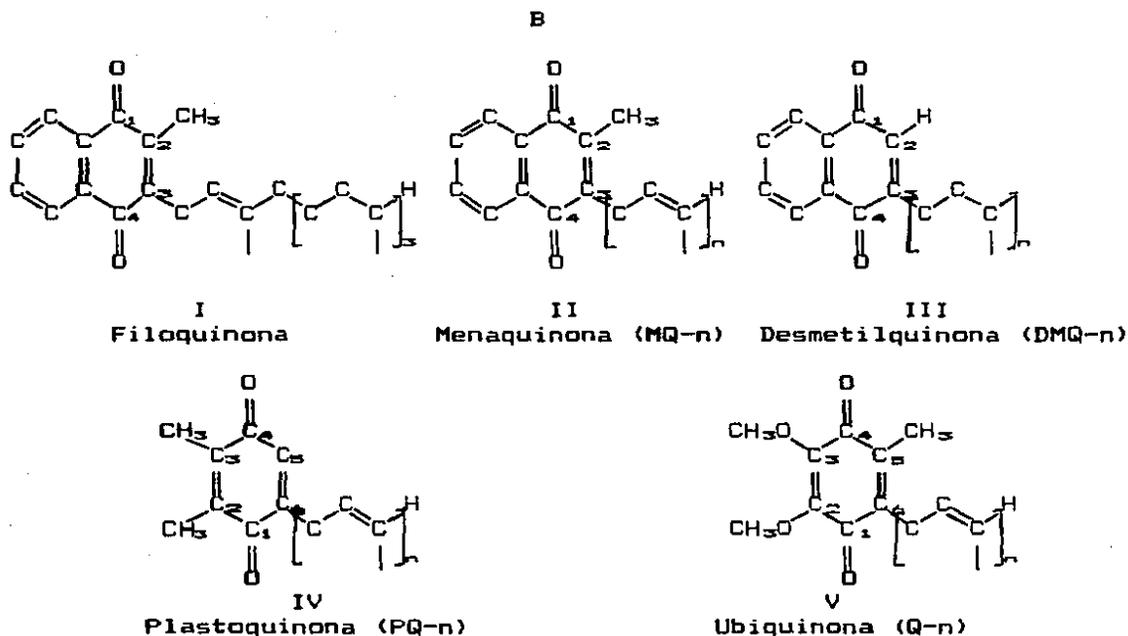
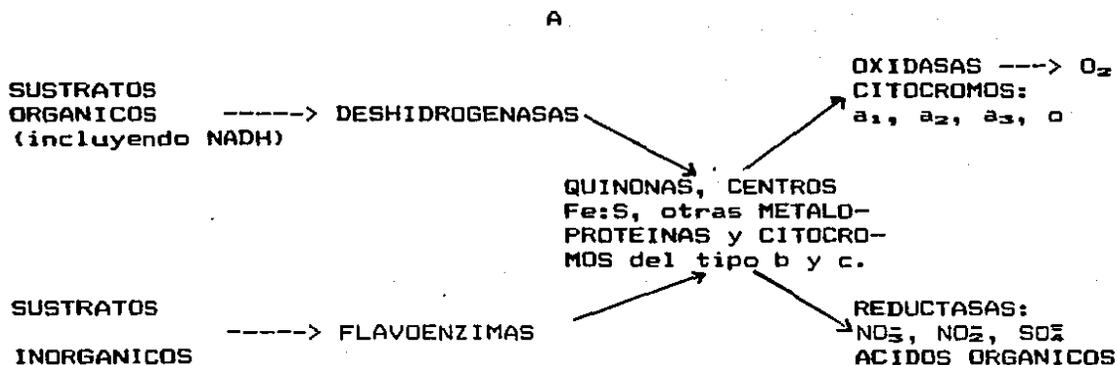


FIGURA 1. A. Posibilidades de composición y organización de los sistemas respiratorios bacterianos. Esquema de acuerdo a N.S. Gel'man. (7). B. Estructura de (I) filoquinona, (II) menaquinona, (III) desmetilquinona, (IV) plastoquinona y (V) ubiquinona (8).

del 2-3 dimetoxi-5-metilbenzoquinona en las cuales un derivado poliisoprenoide ocupa la posición 6. Por otro lado, tenemos a las menaquinonas (Vitamina K₂) derivadas directamente de la menadiona (Vit. K₃), a la cual se le adiciona una cadena isoprenoide en la posición tres del anillo de naftoquinona. Las quinonas bacterianas Q, MQ, y DMQ tienen una función análoga a la ubiquinona (CoQ) en la mitocondria, funcionando como transportadores móviles de electrones y H⁺ dentro del plano de la membrana citoplasmática, entre el sector de deshidrogenasas y citocromos de tipo b₂; su papel como transportadores de electrones ha sido probado por diversos grupos de investigación (9, 10, 11). Las cadenas respiratorias bacterianas poseen Q, MQ, DMQ o combinaciones de ellas.

Las bacterias Gram-positivas casi siempre sintetizan MQ y su radical poliisoprenoide va de n=7 a n=18 (8). En el género Bacillus (12) fundamentalmente se halla la MQ-7; sin embargo, E. thurengiensis produce MQ-8 en adición a MQ-7 (12). La mayor parte de las bacterias Gram-negativas aeróbicas estudiadas (8), tienen exclusivamente Q-4 a Q-10; mientras que, las anaeróbicas facultativas sintetizan mezclas de Q, MQ y DMQ; por ejemplo, en E. coli, a baja tensión de O₂ se incrementa el nivel de MQ-8 y se reduce la cantidad de Q-8 (7). La coexistencia de varias quinonas en las bacterias que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae (Escherichia, Klebsiella y Proteus) sugiere que tengan una función diferencial (6, 8) debido a sus muy distintos potenciales redox (Tabla 1).

Tabla I. Potenciales redox estándar de las quinonas a pH 7.0 relativo al electrodo de hidrógeno normal.

Quinona	E'º (mV)	Referencia
MQ	-74	13
DMQ	+36	14
Q	+112	13

Los valores de potencial redox enlistados en la tabla anterior predicen que las tres quinonas podrían funcionar como aceptores de la NADH-deshidrogenasa ($E'º \text{ NADH/NAD} = -340 \text{ mV}$), y de hecho así ha sido probado para los casos estudiados (15). Experimentos con mutantes deficientes en quinona (10, 16), o membranas irradiadas a 360 nm para destruir la quinona endógena (11, 15, 17), han demostrado que la oxidación de NADH puede ser reestablecida por cualquiera de las tres quinonas, independientemente de la naturaleza de la quinona endógena destruida por U. V. o eliminada por mutación.

Del mismo modo, los potenciales redox de las quinonas (tabla I) sugieren que Q y DMQ pero no MQ, pueden servir como mediadores en la oxidación de succinato por O_2 ó nitrato (15). El planteamiento es consistente con la observación de que en preparaciones de membranas bacterianas depletadas de quinonas por luz ultravioleta (360 nm) o mediante extracción con pentano, la oxidación de succinato pudo ser reactivada por Q ó DMQ, pero no por MQ; estos experimentos han sido realizados en bacterias que poseen Q o MQ como quinonas endógenas

(múltiples autores citados por Kröger, en 16). Los resultados con ciertas bacterias Gram-positivas que solo sintetizan MQ muestran que la oxidación de succinato no está mediada por MQ (16, 18, 19).

En apoyo de lo anterior hay que señalar que el par succinato/fumarato tiene un potencial redox $E^{\circ} = +30$ mV; por otro lado, el grupo de Konings (20) reportó que el complejo de succinato deshidrogenasa-cit. b tiene un potencial $E^{\circ} = +65$ mV. De acuerdo a los potenciales anteriores, las quinonas de tipo Q y DMQ podrían actuar eficientemente como aceptores de electrones en la oxidación del succinato y del mismo modo se juzga difícil la participación de MQ en la misma vía ya que su potencial $E^{\circ} = -74$ mV está muy lejos de los potenciales del par succinato/fumarato ($E^{\circ} = +30$ mV) y del complejo succinato deshidrogenasa-cit. b ($E^{\circ} = +65$ mV).

SISTEMA RESPIRATORIO DE Bacillus cereus.

Desde hace tiempo nuestro laboratorio está comprometido en el estudio de la composición, organización y regulación del sistema respiratorio de B. cereus (4, 11, 21). Los resultados obtenidos revelan que esta bacteria Gram-positiva tiene un sistema respiratorio complejo formado por dos deshidrogenasas: NADH-DH y succinato-DH, una menaquinona (MQ-7), cuando menos dos tipos de citocromos b: b₅₅₈ y b₅₆₂, un cit. b₅₅₀ y tres oxidasas terminales: cito. a₃₃, o y d. Experimentos realizados por Escamilla y Benito (11) revelaron que la oxidación de NADH era totalmente eliminada por irradiación a 360 nm, lo que demostró la participación obligada de la MQ en el transporte de electrones

a partir de NADH. En esa misma oportunidad se demostró que la oxidación de succinato era parcialmente eliminada solo después de largas exposiciones a la luz ultravioleta. Se demostró que después de la irradiación, la oxidación de NADH fue restaurada de manera completa, por la adición de menadiona a las membranas fotoinactivadas, pero no se hicieron más experimentos tendientes a dilucidar las diferencias el comportamiento cinético de las dos vías de oxidación frente a la luz ultravioleta, ni sobre la capacidad de menadiona para restaurar la respiración en ambos casos.

A la luz de los antecedentes descritos en páginas anteriores juzgamos interesante llevar a cabo un estudio en E. cereus tendientes a esclarecer las diferencias en las vías de transporte de electrones para NADH y succinato, especialmente en lo referente a la participación de la MQ en la secuencia de transportadores de electrones utilizada por una u otra vía, para acceder a la cadena de citocromos intermedios y terminales. Como estrategia experimental central, decidimos estudiar los efectos de la luz ultravioleta (360 nm) sobre la cinética de transporte a partir de NADH y succinato, la reconstitución con análogos de MQ, especialmente menadiona. Paralelamente juzgamos convenientemente estudiar, en las dos vías, la cinética de inhibición con inhibidores características del complejo II: Antimicina A, HQNO y mixothiazol (citas y descripciones más adelante); y características de la succinato deshidrogenasa en su lado reductor (TTFA); por tanto, los inhibidores competitivos de la SDH como el malonato, oxaloacetato, pirofosfato, entre otros, no son incluidos en el presente estudio.

1. CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN BACTERIAS

1.1 QUINONAS

La participación de las quinonas Q, MQ y DMQ, en el transporte de electrones en bacterias, ha sido demostrada mediante tres estrategias experimentales: Extracción de la quinona con n-pentano, destrucción de la quinona con luz ultravioleta cercana a (360 nm) y eliminación de la quinona por mutación. Cualesquiera que sea la estrategia utilizada, se ha comprobado la función por medio de experimentos de reconstitución con análogos como la menadiona ó con quinonas fisiológicas. A continuación comento algunos casos descritos en la literatura que me parece antecedentes importantes al presente trabajo.

Se ha demostrado que la luz U. V. (360 nm) destruye a la MQ-9 en membranas de Mycobacterium phlei (18) y las membranas fotoinactivadas pierden la capacidad para oxidar NADH ó succinato. La actividad con NADH se restauró al agregar la quinona endógena de análogos relacionados. Por otro lado, la actividad de succinato oxidasa no pudo ser reestablecida por nafto ó benzoquinonas por lo que se sugiere que en esta vía podría existir un segundo componente fotoinactivable e

indispensable para la oxidación del succinato.

En Bacillus brevis (22) que contiene MQ-7, la fotoinactivación ó la extracción de la quinona con n-pentano causó la pérdida de la actividad con el NADH (no se dieron datos para succinato) y los experimentos de reconstitución con la quinona natural, fracasaron. En este sentido, el grupo de Konings (10) demostró más tarde, en B. subtilis, que la reconstitución con quinonas naturales exige de condiciones experimentales muy especiales para lograr la integración de la quinona natural a la membrana.

La fotoinactivación de membranas de Aerobacter aerogenes (17) destruye la Q-B con la pérdida consecuente de la capacidad para oxidar NADH ó succinato, actividad que se recupera casi totalmente, al reconstituir con Q-B u otros análogos. Es interesante hacer notar que en esta bacteria donde Q-B es la quinona natural, a diferencia de M. phlei donde la quinona es MQ-9 (18), la actividad con succinato es reversible a la fotoinactivación y se reestaura al reconstituir el sistema con la quinona Q-B.

Por experimentos de extracción y reincorporación (n-pentano) de la MQ-7 en Bacillus megaterium (9), se ha demostrado que esta naftoquinona media el transporte de electrones con α -glicerofosfato, malato ó NADH hacia el oxígeno ó fumarato como aceptores terminales. La misma técnica aplicada a Azotobacter vinelandii (23) ha demostrado que una benzoquinona Q-B es un intermediario obligado en la oxidación del NADH, el NADPH, el hidrógeno, el malato y también el succinato.

Nuevamente, aquí tenemos otro par de bacterias donde en una se demuestra la participación de una benzoquinona (Q-8, A. vinelandii) en la oxidación del succinato y otra, conteniendo naftoquinona (MQ-7, B. megaterium) donde su participación no es clara.

En el caso de mutantes deficientes en quinonas, se ha demostrado que el mutante aro-D de Bacillus subtilis, casi diferente en la síntesis de su naftoquinona endógena MQ-7 presenta actividades respiratorias, muy disminuidas, para NADH y succinato. La reconstitución de este mutante con menadiona (precursor directo de MQ-7) produjo la restauración de la actividad con NADH pero no, con el succinato (16).

La evidencia experimental acumulada sugiere que en bacterias (15) al igual que en mitocondria (24), las benzoquinonas Q-n y CoQ-n actúan como aceptores naturales de electrones en la vía de oxidación del NADH y el succinato y este papel fisiológico está de acuerdo con los potenciales redox anotados en la tabla I. Por otro lado, se puede afirmar que las naftoquinonas MQ-n bacterianas participan en la oxidación del NADH y otros sustratos como malato, α -glicerofosfato, hidrógeno y NADPH; todos ellos con potenciales redox muy electronegativos. Del mismo modo, no se ha podido demostrar que las naftoquinonas bacterianas actúen como aceptor obligado en la oxidación del succinato. Tanto el par succinato/fumarato, como los complejos caracterizados de succinato deshidrogenasa, tienen potenciales redox muy electropositivos que hacen difícil la utilización de naftoquinona como aceptores de electrones (Tabla I).

Contrastando con lo anterior, la situación es diferente cuando hablamos de la participación de las naftoquinonas en sistemas respiratorios que utilizan al fumarato como un aceptor terminal de electrones (algunas bacterias facultativas); por ejemplo, en Vibrio succinogenes (15) que utiliza el fumarato como aceptor terminal y acumula el succinato como producto final reducido, la MQ sirve como intermediario entre el complejo de formato reductasa-cit. b ($E'o = -200$ mV) y el complejo de cit. b-fumarato reductasa ($E'o = -20$ mV). Así, se ve que la MQ con su potencial redox, $E'o = -74$ mV, resulta el aceptor/donador de electrones mas adecuado para funcionar entre los complejos de la formato red.-cit. b (-200 mV) y la fumarato red.-cit. b (-20 mV). Experimentos en V. succinogenes (15) han demostrado que la reducción del fumarato a partir del formato, en membranas fotoinactivadas y restauradas por MQ ($E'o = -74$ mV), DMQ ($E'o = +36$ mV); pero en cambio, la Q ($E'o = +112$ mV) ya no es funcional en la reconstitución.

EL complejo fumarato reductasa (25) unida a la membrana citoplásmica, tiene tres subunidades diferentes (M_r 79000, M_r 31000 y M_r 25000) se encuentra inegablemente emparentada con el complejo de la succinato deshidrogenasa: Su estructura oligomérica, secuencia de aminoácidos, grupos prostéticos y un cit. b, así lo aseguran; sin embargo, catalizan sentidos contrarios de una misma reacción y de acuerdo a esto parecen haber seleccionado la quinona mas adecuada a su sentido de catálisis: Q ó DMQ en la oxidación de succinato, ó MQ y DMQ en la reducción de fumarato.

1.2 CITOCROMOS

Los citocromos tienen un papel central en la transducción de la energía biológica en organismos eucariontes y procariontes. Son hemoproteínas especializadas, donde el grupo hemo es un compuesto tetrapirrólico, formando una porfirina, que contiene en su centro un átomo de hierro (figura 2), éste último transporta un electrón y su estado oscila entre el reducido (Fe^{+2}) y el oxidado (Fe^{+3}). Las sustituciones en el C-2, C-4, C-5 y C-8 originan diferentes propiedades de absorbanza y de potencial de óxido-reducción estándar de los citocromos (26).

De una manera general existen cuatro clases de citocromos:

1. Citocromo a. Contenido en la citocromo oxidasa aa₃, en la cual el grupo hemo posee un éter cíclico sustituido y un formilo.
2. Citocromo b. Comprende formas múltiples de citocromos b no autooxidables; cit. oxidasa a, cit. P-450 y P-460, en donde el protohemo es igual al que se encuentra en la hemoglobina y mioglobina.
3. Citocromo c. En este grupo se incluyen los citocromos c, c₁, c₂, c₃, c₄, etc; su grupo hemo está unido covalentemente a la proteína via enlaces tioéter entre el C-2 y C-4 y la cadena lateral de los residuos de cisteína en la proteína.
4. Citocromo d. Esta clasificada como una cit. oxidasa d (cit. a₂), caracterizándose porque en el hemo la doble ligadura entre las posiciones siete y ocho está saturada con hidrógeno.

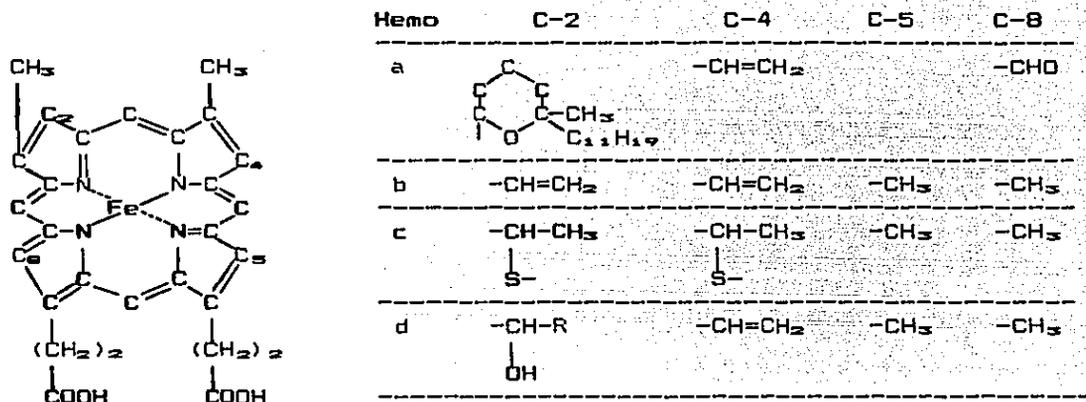


FIGURA 2. Estructura hemo de los citocromos.

En general, el espectro diferencial (red menos oxid) de cualquier cit. manifiesta tres bandas principales de absorción en la región visible del espectro electromagnético, esto es, la región α (540 - 650 nm), la β (510 - 535 nm) y la de Soret (410 - 460 nm). Las principales excepciones son los citocromos a, los cuales no muestran una banda β significativa, y los citocromos d, que dan una señal muy débil en el Soret. Las bandas de absorción α son las más adecuadas para estudiar los citocromos ya que resultan bien separados los máximos de de cada uno. La región Soret es de gran sensibilidad, pero de menor resolución y confusa por la absorbancia de flavinas y las intensas bandas de U.V. cercana, de los nucleótidos de nicotinamida. Los máximos en β están normalmente comprimidos en una región de longitud de onda estrecha, son complejas y de magnitudes pequeñas (26).

La técnica de espectrofotometría diferencial (red menos oxid) suministra información sobre la identidad de los citocromos presentes, su concentración y su estado de óxido-reducción en células enteras, membranas, y en preparaciones solubilizadas y purificadas de los citocromos por un método adecuado. La tabla 2 presenta una guía para las longitudes de onda de los espectros en la región α en varias bacterias a temperatura ambiente y de nitrógeno líquido, en algunos casos complementados con el tratamiento matemático de derivadas superiores; además, el análisis espectral de los citocromos aa₃, a, b, c, d y o fueron realizados en condiciones diferenciales de red menos oxid; mientras, el cit.a₃ fué de reducido + CO menos reducido; finalmente, las bacterias crecieron en presencia de oxígeno y fueron cosechadas en fase exponencial o estacionaria.

Tabla 2. Longitudes de onda de los principales picos en la región (540-650)

CITOCROMOS	MAXIMO DE LONGITUDES DE ONDA (nm)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. phlei</i>	<i>Thermophilic bacterium PS3</i>
aa ₃	601(20)*	602(11)		601(27)	603(28)
a ₃	592(20)	592(11)**		590(27)	593(29)
a ₁			590(30)		
b	558(31) 559,554(20)	555(11)	556,558, 562(3)	S559,563,N563 S563(32)	554,561(28)
c	550,554(20)	548(11)	548,551.5(30)	551,553(32)	547,552(28)
d		630(11)	624(3)		
o	556(20)	562(11)	555(3)	567(27)	557(28)

* El número entre paréntesis indica la referencia

**Membranas de células esporulantes

2. COMPLEJOS PROTEICOS DE LA CADENA RESPIRATORIA

Las membranas están compuestas de una manera general de diferentes enzimas, proteínas y lípidos. En cuanto a las proteínas, hay biomembranas con una sola especie de proteína tal como la bacteriorodopsina en Halobacterium halobium y otras biomembranas que contienen proteínas que realizan diferentes funciones, entre estas tenemos: Biosintéticas, transportadoras y bioenergéticas.

2.1 MEMBRANA MITOCONDRIAL

El sistema de la cadena respiratoria en eucariontes se encuentra en la membrana interna mitocondrial; funcionalmente, está compuesto de cinco complejos enzimáticos-lipídicos (24):

Complejo I (NADH: ubiquinona óxidorreductasa), que contiene aproximadamente 25 polipéptidos diferentes, un FMN y centros de Fe-S;

complejo II (succinato: ubiquinona óxidorreductasa), compuesto de cuatro polipéptidos, un FAD, centros de Fe-S y un cit.b₅₆₀;

complejo III (ferrocitocromo c óxidorreductasa), tiene de 9 a 10 polipéptidos, centros de Fe-S, cit.b₅₆₂, cit.b₅₆₄ y un cit.c₁;

complejo IV (ferrocitocromo c: oxígeno óxidorreductasa), formado por

8 polipéptidos, hemos a y a₂ Cu_A y Cu_B complejo V (ATP sintasa), contiene de 12 a 14 polipéptidos, nucleótidos de adenina y Mg^{+2} .

2.2 MEMBRANA PLASMÁTICA BACTERIANA

Los sistemas respiratorios bacterianos son más complicados que el de mitocondria y se ha demostrado en bacterias la existencia de los complejos I, II, III, V y de un grupo de hemoproteínas distintas estructuralmente denominadas citocromo oxidasas, con función análoga al complejo IV de mitocondria.

La NADH DH de E. coli (33) ha sido la más ampliamente estudiada en bacterias, tiene un M_r de 47 Kdaltones, un FAD, al parecer no tiene centros de Fe-S no hemo; por otro lado, en E. subtilis se ha encontrado una subunidad de M_r de 64000 de poca hidrofobicidad y con un FAD (34). El complejo bc₁ se ha purificado en tres bacterias (35, 36, 37) y se ha sugerido su existencia en E. subtilis (20).

Las oxidasas terminales de diferentes poblaciones de bacterias (2, 5) poseen propiedades funcionales similares a las de mitocondrias; su aislamiento ha demostrado una composición polipeptídica mucho más sencilla; Anraku (5) las divide en dos grupos dependiendo del donador directo de electrones: Citocromo c oxidasa (clase I) y quinol oxidasa (clase II). En E. coli (3) en condiciones aeróbicas la citocromo oxidasa c (b₅₅₈) forma un complejo con cit.b₅₄₂; mientras, el

cit.d₂₃₂ está estructural y funcionalmente unido al cit.b₅₅₀.

2.3 SUCCINATO DESHIDROGENASA-CITOCROMO b EN BACTERIAS

La succinato deshidrogenasa (SDH; EC 1.3.99.1.) [succinato:(aceptor) óxido-reductasa] es una flavoenzima de Fe-S, que cataliza la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo del ácido tricarboxílico y dona equivalentes reductores a la cadena respiratoria. Ha sido estudiada en eucariontes y procariontes (38); la SDH de bacterias (39 - 46) muestra una composición similar a la SDH de mitocondria. Tiene dos subunidades no idénticas: una flavo-proteína de Fe-S (Fp) que tiene un M_r de 60000 a 79000 con el grupo prostético de flavina unido covalentemente a B α -N(3) His, y una proteína de Fe-S (Ip) de M_r 25000 a 31000.

La SDH puede ser liberada de la membrana en presencia de un detergente en forma de complejo con uno o dos polipéptidos pequeños; en la mayoría de las bacterias uno de los polipéptidos pequeños ha demostrado ser un tipo de cit.b(41, 42, 45 - 47). En la bacteria gram-positiva aeróbica B. subtilis, el cit.b₅₅₀ es una proteína transmembranal que une a la SDH a la superficie interna de la membrana citoplásmica (48, 49). El complejo SDH-cit.b₅₅₀ es análogo al complejo mitocondrial (24), pero difiere de este en que el cit. bacterial es reducido rápidamente en membranas así como también en el complejo aislado (47), de donde se infiere que el cit.b₅₅₀ es el aceptor primario de los electrones después de la oxidación de succinato. Konings y cola-

boradores (20) han informado que el complejo SDH-cit.b₅₅₈ en E. subtilis tiene un $E_m = +65\text{mV}$, lo cual hace pensar que la MQ-7 (-74mV) no pueda funcionar como el aceptor inmediato, en la posible sequencia operacional de los componentes de la cadena respiratoria.

Para E. coli (41, 50) y Micrococcus luteus (42) hay evidencias de que la SDH se encuentra unida a la membrana citoplásmica por dos polipéptidos hidrofóbicos, uno de los cuales ha sido caracterizado para ambas bacterias como cit.b₅₅₄. Por otro lado, se ha investigado para la SDH de Rhodospirillum rubrum (40) y de Rhodopseudomonas sphaeroides (43) las subunidades Fp e Ip y al parecer, no están asociadas con un cit.b.

3. INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES

Para la investigación de las vías y mecanismos del transporte de los electrones y de la fosforilación oxidativa en eucariontes y procariotes, los inhibidores son un instrumento muy útil; por ello se describen a continuación.

3.1 INHIBIDORES DEL COMPLEJO II (SUCCINATO: UBIQUINONA OXIDOREDUCTASA)

Las carboxanilidas y el TTFA son potentes inhibidores de la oxidación de succinato y bloquean la transferencia de electrones entre el centro S-3 de la SDH y la quinona, sin afectar la reducción de S-3 por succinato, pero si la actividad de la succinato-Q reductasa (24, 38, 51, 52).

En un estudio comparativo Jurtschuk y colaboradores (51) demostraron que 2.9 µg de TTFA/mg de proteína inhiben el 50% de la actividad succinato oxidasa de mitocondria de riñon de res y se necesita para este mismo porcentaje de inhibición 2220 µg de TTFA/mg proteína en Azotobacter vinelandii.

El cit. b del complejo II de mitocondria (24) está compuesto por dos

polipéptidos de M_r 15500 (C_{II-3}) y 13500 (C_{II-4}) y al parecer desempeñan un papel indispensable en el sitio de acción del TTFA. Se ha reportado (52) que al resolver los componentes del complejo II, SDH y los dos polipéptidos C_{II-3} y C_{II-4} , desaparece la actividad Q reductasa sensible a TTFA; sin embargo, cuando estos dos polipéptidos se combinan con la SDH, se restaura, la actividad Q reductasa sensible a TTFA, de donde se sugiere que los dos polipéptidos son necesarios para la unión específica del inhibidor. Finalmente, en bacterias ha sido muy escaso el estudio del sitio y mecanismo del TTFA.

3.2 INHIBIDORES DEL COMPLEJO III (FERROCITOCROMO c OXIDORREDUCTASA)

La información obtenida de la utilización de inhibidores en mitocondria es extensa, en particular los que actúan en el nivel del complejo bc_1 y están clasificados en tres grupos, de acuerdo con su sitio de acción (54). Los del grupo I, inhiben la oxidación de QH_2 en dos niveles al mismo tiempo (centros de Fe-S y la reducción de $cit. b_1$): mixotiazol, estrobilurinas y andemansinas. El grupo II, inhibe la reoxidación de los centros de Fe-S y de hidroxiquinonas. Finalmente, los inhibidores de la reducción de Q (oxidación del centro b_n): antimicina, funiculosina, HQNQO y NQNO. El gen mitocondrial para el $cit. c$ del complejo III ha sido clonado de la célula L mutante de ratón, con una resistencia aumentada a HQNQO y a otros inhibidores (54).

En bacterias no hay un estudio detallado sobre los sitios y mecanismos de acción de los inhibidores del complejo III. En *M. phlei* el NHQNO

inhibe la oxidación de succinato en un 98% y la de NADH en un 60% (18) y por estudios de cinética de reducción (32) se sugiere para la vía de succinato un cit. b₅₅₈ sensible a NHQNO. En B. megaterium (9) se ha postulado que el punto de acción del HOQNO está localizado entre la MQ y el cit. b₁, cuando se utiliza como sustratos el NADH, malato y glicerol-1-fosfato.

En membranas de B. cereus el HOQNO inhibe en mucho mayor potencia a la succinato oxidasa que a la NADH oxidasa (55). En B. subtilis el HOQNO y la antimicina A afectan fuertemente la oxidación de NADH (56); el espectro diferencial cuando se utiliza succinato, revela que el HOQNO bloquea el transporte de electrones al cit. a₃ y muy probablemente al cit. c (47).

En Proteus rettgeri (6) el HOQNO inhibe la respiración con NADH, succinato y formato en un sitio común, localizado entre la Q y cit. b₁. En células de Paracoccus denitrificans (57) la antimicina inhibe entre dos citocromos b y cit c₁. El transporte de electrones de formato a fumarato en V. succinogenes (58) es inhibido entre un cit. b (-200 mV) y MQ. El Bacteroides ruminicola (59) y Bacteroides fragilis (60) tienen sitios de inhibición diferentes para HOQNO, entre NADH y un cit. b (vía menor), y entre MQ y un cit. b, respectivamente.

En las bacterias fotosintéticas Rhodospseudomonas sphaeroides (61 - 63) y Rhodospseudomonas capsulata (64, 65) se ha avanzado mucho más en el estudio del sitio y mecanismo de acción de los inhibidores del complejo bc₁ mitocondrial que en el resto de microorganismos.

4. METODOS Y MATERIALES

Para el presente estudio, se utilizó una cepa silvestre de Bacillus cereus aislada y caracterizada por Andreoli y colaboradores (66).

4.1 MEDIO DE CULTIVO, CONTROL DEL CRECIMIENTO Y RECOLECCION

Para el crecimiento, se utilizó el medio de casaminoácidos (CAAS) descrito por Sterlini y Maldelstam (67), el cual carece de fuente de carbono fermentable y tiene la siguiente composición:

hidrolizado de caseína (casaminoácidos libres de vitamina), 0.4%

L-glutámico, 0.3%

DL-alanina, 0.2%

Asparagina, 0.1%

KH_2PO_4 , 0.14%

MgSO_4 , 0,02%

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.005%

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0025%

$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0005%

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00005%

$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00002%

ZnSO₄.7H₂O, 0.0005%

El cultivo aeróbico se realizó en un biofermentador con capacidad para 25 litros, construido por el Centro de Instrumentos de la UNAM.

Las condiciones de cultivo fueron: 30°C, 250 rpm y un flujo de aire burbujeado a través del medio de 8 a 12 litros/minuto. Para iniciar el cultivo, se utilizó un inóculo de 0.1 partes del volumen contenido en el biofermentador. El inóculo se prepara de acuerdo con la técnica de cultivo activo de Collier (68), consistente en hacer por lo menos cinco transferencias (1/50) seriadas en fase logarítmica media, (intervalos de tres horas) esta técnica se siguió con el objeto de homogeneizar y sincronizar el crecimiento. El crecimiento se siguió espectrofotométricamente a 540 nm, y el grado de sincronía se determinó por microscopía de contraste de fases.

Las células en fase estacionaria se colectaron por centrifugación en una centrifuga Sharples (modelo T-1) de flujo continuo. El paquete celular se lavó cada vez por tres veces con 100 ml de amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 7.4 en presencia de MgCl₂ 5mM y CaCl₂ 5 mM (amortiguador TCM), mediante centrifugación a 5000 rpm por 10 min. a 4°C utilizando una centrifuga Sorvall RC-5B. Las células fueron fraccionadas inmediatamente o almacenadas a -70°C.

4.2 FRACCIONAMIENTO CELULAR Y OBTENCION DE MEMBRANAS

Las células se resuspendieron en el amortiguador de TCM (un gr/ml) en

presencia de PMS-f y se rompieron en el Dyno-Mill tipo KDL con perlas de vidrio de 0.1 a 0.2 mm de diámetro. Las células enteras fueron eliminadas por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min.; el sobrenadante obtenido se centrifugó a 40000 rpm por 30 min. con el fin de sedimentar las membranas, las cuales fueron lavadas cada vez por tres veces con 60 ml de amortiguador de TCM bajo las mismas condiciones; finalmente, las membranas fueron utilizadas inmediatamente ó almacenadas a -70°C . La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry (69).

4.3 ENSAYOS ENZIMATICOS

4.3.1 Oxidasas

Las actividades basales se midieron por el método polarográfico, utilizando un oxímetro Yellow Spring modelo 53. El medio de reacción en un volumen final de 2.2 ml contenía fosfato de potasio 100 mM pH 7.4 para los ensayos de NADH y succinato oxidasa y con un pH 6.8 para Ascorbato-TMPD oxidasa y un 1.0 mg. de proteína membranal; estos ensayos se realizaron a temperatura de 30°C y las actividades se expresan como nAtO_2 consumidos por min. por mg. de proteína ($\text{nAtO}_2/\text{min}/\text{mg prot}$).

4.3.1.1 NADH y succinato oxidasa

La reacción de NADH oxidasa se inicia con la adición del sustrato

NADH a concentración final de 0.5 mM al medio de reacción. Para medir la succinato oxidasa, a la mezcla de reacción (fosfato de potasio 100 mM pH 7.4 + membranas) se le agrega 15 μ l de succinato 0.6 M, se incuba durante cinco min y se inicia a la reacción con succinato 0.6 M a una concentración final de 40 mM.

4.3.1.2 Citocromo c oxidasa (Ascorbato + TMPD oxidasa)

La actividad se midió utilizando una mezcla de TMPD 8 mM y ascorbato de sodio 0.8 M pH 7, como el sistema que transfiere directamente los electrones al citocromo c. A la actividad resultante se le resta el pequeño consumo de oxígeno que ocurre en ausencia de membranas, debido a la auto-oxidación de los sustratos.

4.3.2 Oxidorreductasa

Las actividades de las oxidorreductasa presentes en las membranas celulares se determinaron por un método espectrofotométrico a temperatura ambiente. Se utilizó el DCPIP (azul) que cambia a leuco cuando ocurre la reacción de oxido-reducción. Estos ensayos se realizan de acuerdo con lo descrito por Lang y colaboradores (70); la reducción del DCPIP se siguió a 600 nm, con un coeficiente de extinción molar (C.E.M.) de 21 (mM. cm)⁻¹ para un volumen total de un ml. La actividad se expresa en nmoles de DCPIP reducidos por min por mg de proteína.

4.3.2.1 NADH: DCPIP oxidorreductasa

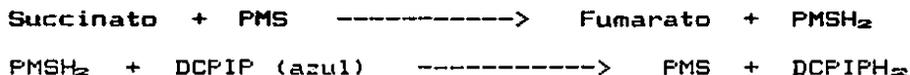
La reacción enzimática es la siguiente:



La mezcla de reacción contenía fosfato de potasio 94 mM a pH 7.4, KCN 0.1 mM, DCPIP 0.08 mM, NADH 0.2 mM y se inició la reacción con la adición de las membranas (0.1 mg proteína).

4.3.2.2 Succinato: PMS + DCPIP oxidorreductasa

La reacción enzimática es la siguiente:



La mezcla de reacción contenía fosfato de potasio 87 mM a pH 7.4, KCN 1 mM, succinato 42 mM, membranas (0.1 mg proteína), se preincubó durante cinco min y se inició la reacción con PMS 0.975 mM y DCPIP 0.08 mM.

Los inhibidores respiratorios se prepararon de la siguiente manera: KCN en amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7.4; antimicina A y HQNO en DMSO y el mixotiazol en etanol absoluto; las cantidades de solventes utilizados no tuvieron efecto sobre la actividad de las enzimas respiratorias.

4.4 FOTOINACTIVACION DE LA MENAQUINONA

La menaquinona endógena de B. cereus, se destruyó por medio de luz U.V. de 360 nm., para este propósito, 10 ml de membranas (10 mg pro-

teína) se depositaron en una caja de Petri abierta, colocada sobre hielo y bajo una lámpara UVSL-25 (Long wave) a la distancia de 11 cm. De la suspensión se toman muestras a diferentes tiempos de irradiación, cuantificándose la actividad de oxidorreductasas y oxidasas remanentes.

Las membranas inactivadas por irradiación fueron reconstituidas con 2-metil-1,4-naftoquinona (menadiona). La menadiona fué disuelta en etanol absoluto y las cantidades agregadas de alcohol no tuvieron efecto sobre la actividad de las enzimas respiratoria.

4.5 ANALISIS ESPECTRAL DE LOS CITOCROMOS

Los espectros diferenciales de los citocromos se determinaron en un espectrofotómetro Aminco DW 2a. Para los espectros a temperatura ambiente, se utilizaron celdas de vidrio de 1.0 cm de paso de luz. Las preparaciones fueron hechas en glicerol al 50%, para evitar la sedimentación; mientras que los espectros a temperatura de nitrógeno líquido (77°K) se realizaron en celdas de 2 mm de paso. Las preparaciones contenían glicerol al 30%, para evitar la cristalización. Para la obtención de los espectros en equilibrio de flujo (steady state) las preparaciones se congelaron justo después de añadir y mezclar (vortex) los sustratos. La oxidación total de las membranas en la celda de referencia se logró mediante la adición de unos cristales de persulfato de amonio y su reducción total se obtuvo con unos cristales de hidrosulfito de sodio. Los sustratos empleados fueron NADH

2.5 mM, succinato 30 mM o ascorbato 10 mM + TMPD 0.1 mM. La cinética de reducción de los citocromos se realizó en una celda de vidrio de 1.0 cm de paso de luz y con glicerol al 50%; las concentraciones finales de los sustratos fueron iguales a las citadas anteriormente.

4.6 NUTRIENTES Y REACTIVOS

Los nutrientes utilizados en la preparación del medio de cultivo fueron de marca Bioxon. La tris base, los inhibidores de la cadena respiratoria y los donadores de electrones de Sigma Chemical Co. Para todos los demás casos se utilizó indistintamente marca Baker o Merck en su correspondiente grado de "reactivo analizado"

5. RESULTADOS

Con el propósito de comparar las actividades respiratorias, se creció a B. cereus en condiciones aeróbicas en distintos medios de cultivo. Las actividades de las oxidasas y deshidrogenasas de membranas de células crecidas en medio CAAS (Tabla 3) mostraron niveles más elevados que en medio G modificado (21). Por consiguiente se utilizó para el

TABLA 3. Actividades respiratorias presentes en membranas de B. cereus crecidas en diferentes medios de cultivo.

Enzimas	Actividad Especifica*	
	Medio CAAS	Medio G
Oxidorreductasas		
NADH: DCIP	150	55
Succinato: PMS-DCPIP	350	86
Oxidasas		
NADH	50	20
Succinato	25	7.5
Ascorbato-TMPD	38	17

* Oxidorreductasas: nmoles de DCPIP reducido/minuto/mg de proteína.

* Oxidasas: nAtO₂ consumido/minuto/mg de proteína.

resto de los experimentos membranas de células de B. cereus crecidas en medio CAAS hasta la fase estacionaria; es decir, alrededor de seis horas después de haberse iniciado el crecimiento en el biofermentador.

5.1 EFECTO DEL TFA EN LA ACTIVIDAD DE LA SUCCINATO OXIDASA

Para profundizar en la secuencia de transferencia de electrones, los inhibidores son un instrumento muy importante; por consiguiente, se decidió comparar el efecto del TFA sobre la oxidación de succinato en las membranas de B. cereus y Rhizobium phaseoli. La figura 3 muestra una gran sensibilidad de la succinato oxidasa en R. phaseoli, y se observa que se inhibe el 50% de la actividad con 3.9 µg de TFA/mg de proteína y se inactiva totalmente con una concentración 10 veces mayor; mientras en B. cereus, el TFA no tuvo efecto sobre la actividad de la succinato oxidasa. Como era de esperarse, el TFA, tampoco tuvo efecto sobre la actividad de Succinato Deshidrogenasa en B. cereus.

Se ha sugerido que los dos polipéptidos del cit.b del complejo II de la cadena respiratoria de mitocondria, desempeñan un papel indispensable en el sitio de acción del TFA (52); ya que este inhibidor bloquea la transferencia de electrones entre el centro S-3 de la SDH y la Q; es decir, afecta la actividad succinato-Q reductasa. La actividad succinato-Q reductasa (71, 72) se recomienda medirla directamente en el complejo II purificado de la cadena respiratoria, porque así se evita cualquier posible artefacto en los experimentos.

El experimento anterior, sugiere que probablemente el sitio de este inhibidor no esté presente o se encuentre modificado en B. cereus; sin embargo, en R. phaseoli posiblemente el sitio de acción del TTFA sea semejante al de mitocondria.

5.2 FOTOINACTIVACION DE LA MENAQUINDONA Y RESTAURACION DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES EN LA CADENA RESPIRATORIA DE B. cereus

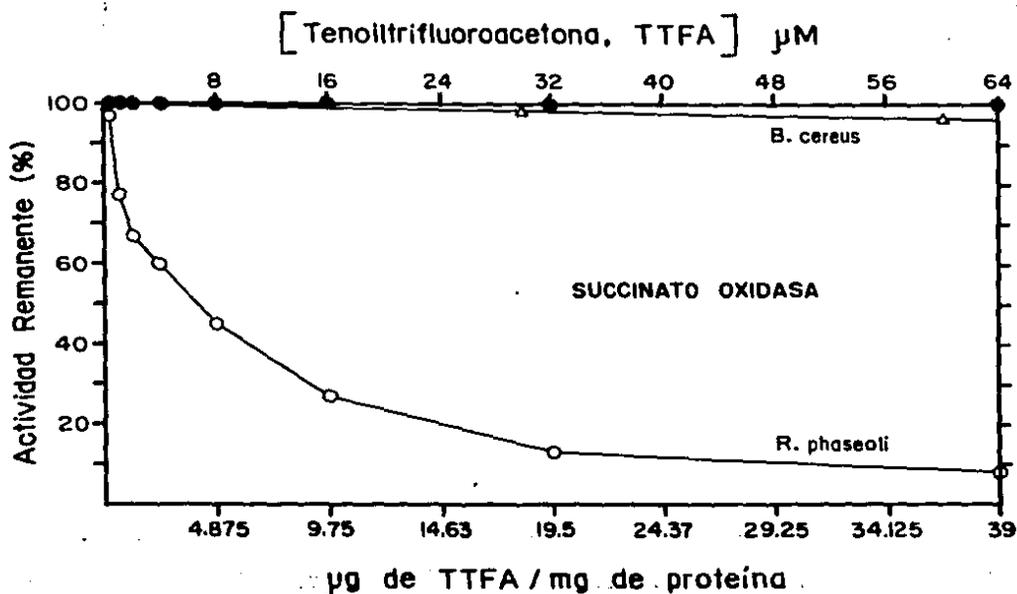


FIGURA 3. Efecto del TTFA sobre la actividad de la succinato oxidasa (, O) en membranas de B. cereus y de R. phaseoli. La actividad de la SDH está representada por los círculos cerrados. La actividad específica se expresa como % de la actividad remanente con respecto al control sin TTFA. Las actividades basales para B. cereus fueron similares a las registradas en la tabla 3. La actividad de la succinato oxidasa para R. phaseoli fue de 165.

El resultado del experimento precedente estaba indicando la posible existencia de una vía no MQ-7 para el sitio del TTFA, en la oxidación de succinato por B. cereus lo cual podría confirmarse por la inactivación selectiva de la quinona endógena y la posterior reincorporación de análogos de MQ. Al irradiar las membranas con luz U.V. cercana (360 nm) se inactivó un 50% en la oxidación de NADH (Figura 4A) en los primeros 15 min de exposición; mientras, que la actividad de la succinato oxidasa no fue afectada en ese tiempo. La actividad de la NADH oxidasa se inactivó totalmente después de 60 min de irradiación, en tanto que un 63% de la actividad original de la succinato oxidasa sobrevivió al mismo tiempo de irradiación. Las actividades enzimáticas de ascorbato-TMPD oxidasa, NADH DH y SDH no fueron afectadas, lo que parece asegurar que el tratamiento con U. V. inactivó específicamente a la quinona.

El transporte de electrones con NADH como sustrato en membranas foto-inactivadas de B. cereus pudo ser reconstituido por la adición de menadiona, un análogo de la MQ. Al agregar menadiona bisulfito en concentraciones crecientes (Figura 4B) a membranas irradiadas, se incrementa la velocidad de oxidación de NADH hasta 11 veces con respecto a la actividad remanente después de la irradiación; correspondiendo esta actividad específica a la de las membranas sin irradiar. La velocidad de oxidación de succinato en presencia de menadiona bisulfito aumenta hasta en 1.33 veces, alcanzando la actividad original a la irradiación.

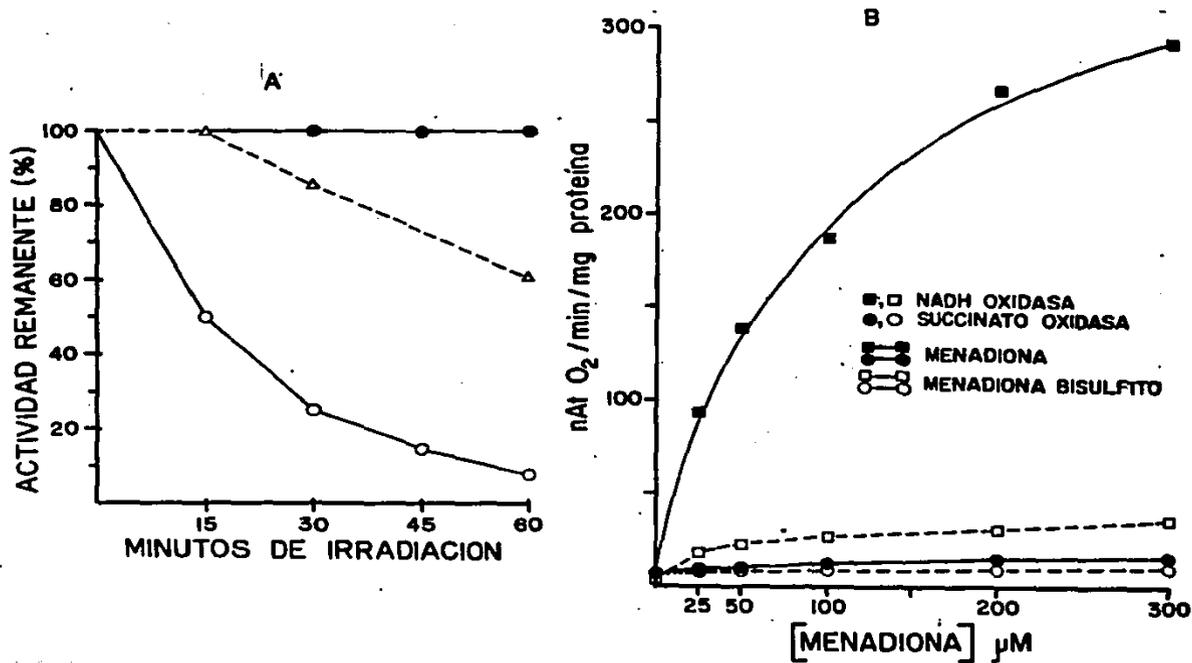


Figura 4. (A) Fotoinactivación de la menaquinona por U.V. (360 nm) y su efecto sobre las actividades respiratorias de membranas de *B. cereus*. Las muestras fueron removidas al tiempo indicado y ensayadas para NADH oxidasa (○), succinato (△), y para ascorbato-TMPD oxidasa, NADH, DH y SDH que están representadas por los círculos cerrados. Las actividades específicas se expresan como % de la actividad remanente con respecto a las membranas no tratadas, (B) Efecto de dos diferentes menadiones sobre la velocidad de oxidación de NADH y succinato en membranas irradiadas con U.V. (360 nm). Las actividades basales fueron similares a las registradas en la Tabla 3. Los experimentos se realizaron como se describen en materiales y métodos.

Cuando a las membranas fotoinactivadas se le suministró menadiona soluble en etanol (Figura 4B) hasta niveles de saturación, la actividad de la NADH oxidasa se estimuló alrededor de 67 veces y, con respecto a las membranas sin irradiar, fue de 6.7 veces. El efecto sobre la actividad de la succinato oxidasa fue hasta de 2.3 veces y un incremento de 1.5 veces comparada a la actividad basal.

Estos experimentos se realizaron con actividades específicas parecidas a las registradas en la Tabla 3, y se obtuvieron resultados de oxidasas que son semejante a los de la Figura 4, Además, es necesario señalar que la reactivación se realizó a pH 6.6 donde la auto-oxidación de la menadiona reducida (menadiol) es baja (21).

Los resultados anteriores permiten llegar las siguientes conclusiones:

1. Al irradiar con luz U.V. (360 nm) a las membranas de E. cereus se afecta específicamente a la quinona endógena, esto se demuestra porque las actividades de ascorbato-TMPD oxidasa, NADH DH y SDH no sufren cambio alguno en el tiempo de exposición; no así, la NADH oxidasa que muestra una disminución del 90% en membranas irradiadas y que es reconstituida por menadiona.
2. En consecuencia, es posible pensar que la MQ-7 es un intermediario obligado para la transferencia de los electrones en la oxidación de NADH; y sin embargo, para la oxidación de succinato no parece ser determinante.

3. La sugerencia de una vía para oxidación de NADH que necesita la MQ-7 y otro camino para la oxidación de succinato que depende parcialmente de ella, requiere proponer un aceptor diferente de la MQ-7 como primer aceptor de los electrones que salen de la SDH, por lo que se hizo imprescindible un análisis más detallado de la reducción de los citocromos, en particular los de tipo b.

5.3. REDUCCION DE LOS CITOCROMOS DE MEMBRANAS DE B. cereus

Se realizaron los espectros diferenciales (red menos oxid) de membranas no irradiadas e irradiadas utilizando NADH y succinato como sustratos, con la meta de registrar la reducción individual de cada cit. y así profundizar en el objetivo propuesto. En la Figura 5A se observa en las membranas no irradiadas en presencia de NADH, muy poca reducción del cit. b₅₆₀ y del resto de citocromos en los primeros cinco min.; enseguida, al alcanzarse la anaerobiosis, aumenta rápidamente la reducción de todos los citocromos; por otro lado, en las membranas irradiadas, el NADH practicamente no causa reducción de los citocromos. En las membranas no irradiadas como en las irradiadas en presencia de succinato (Figura 5B), se observó una reducción inmediata de cit. b₅₆₀ que se mantiene constante en el tiempo. Con succinato el nivel de reducción de cit. b₅₆₀ es más elevado en los primeros cinco min, con respecto a la reducción de éste cit. cuando se utiliza NADH como sustrato.

Para obtener una mayor sensibilidad y resolución de los espectros di-

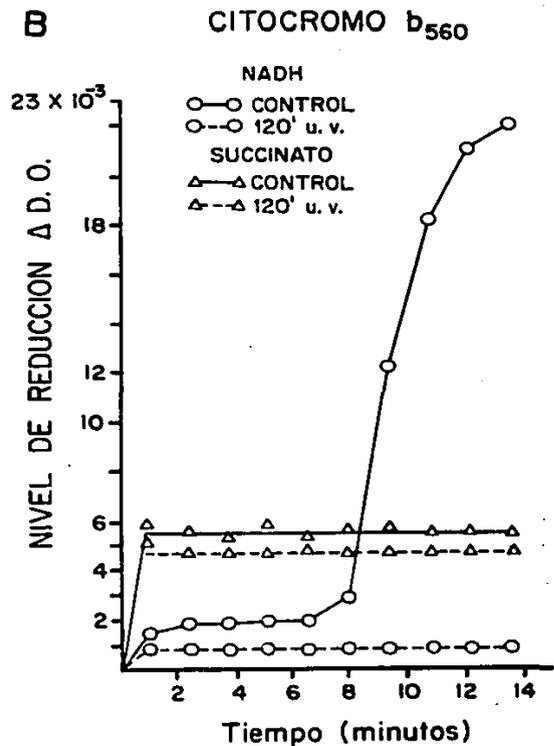
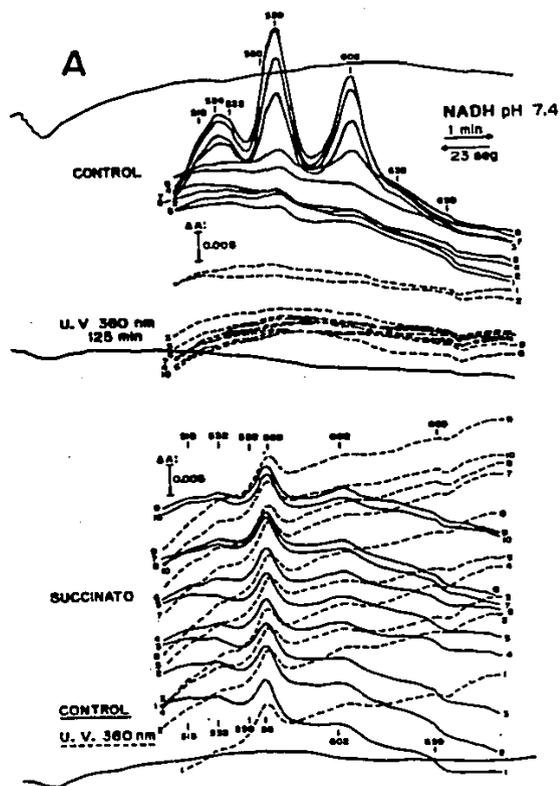


Figura 5. (A) Espectros diferenciales (red menos oxid) a temperatura ambiente de membranas no tratadas (—) y fotoinactivadas (---) con luz U.V. (360 nm) durante 120 min. El NADH y succinato fueron mezclados con las membranas (4,5 mg de proteína/ml) e inmediatamente se empezaron a registrar los espectros. Los experimentos se realizaron como se describen en materiales y métodos. (B) Se graficó el delta de reducción de cit. b_{560} a partir del tiempo de cada espectro de 5A.

ferenciales, las membranas fueron congeladas a la temperatura de nitrógeno líquido (77°K). Membranas no irradiadas e irradiadas usando NADH y succinato como sustratos, se incubaron a diferentes tiempos y se congelaron a 77°K.

La Figura 6A muestra que en presencia de succinato las membranas no irradiadas como las fotoinactivadas, mantienen los niveles de reducción aproximadamente iguales; cuando a las membranas irradiadas se le agrega menadiona 300 μ M, y se incuban por 5 min. se mantiene el mismo nivel de reducción de cit. b₅₅₇₋₅ (a temperatura ambiente corresponde al cit. b₅₄₀) y aumenta en forma ligera la reducción de cit. c₅₅₂ y de cit. a₃₃ (403).

Si ahora, a las membranas fotoinactivadas que han perdido la capacidad de oxidar NADH, se les adiciona menadiona 300 μ M (Figura 6B), entonces se observa nuevamente la reducción de todos los citocromos y a un nivel más alto. En resumen, la reducción de citocromos por NADH fué abolida después de irradiación y recuperada cuando se adicionó menadiona; en cambio, el succinato presenta altos niveles de reducción para el cit. b₅₅₇ y ésto no fué afectado por la irradiación ni por la adición de menadiona.

Debido a la compleja composición de los picos de absorción de los citocromos de tipo b y c en la región de 540 a 575 nm como se vió en los experimentos precedentes fué necesario realizarlos en modo dual (doble longitud de onda vs tiempo), con el fin de ver solamente la cinética de reducción de cit. b (560-575 nm) por NADH ó succinato.

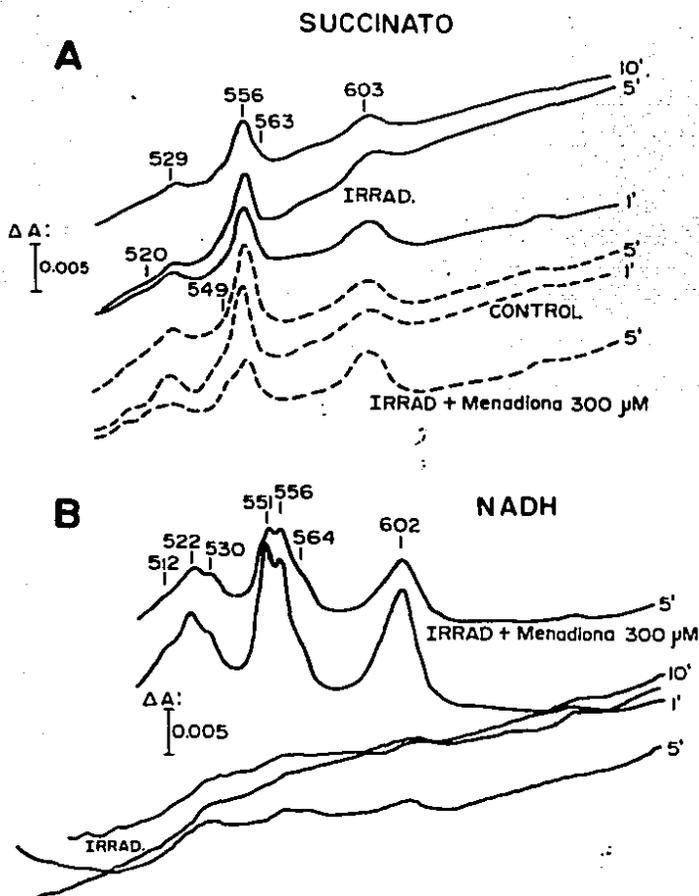


FIGURA 6. Espectros diferenciales (red menos oxid) a temperatura de nitrógeno líquido a pH 6.6 de membranas no tratadas (control) e irradiadas con luz U.V. (360 nm) por 60 min. Succinato (A) y NADH (B) se mezclaron con membranas (9 mg de proteína/ml) y fueron sumergidas en nitrógeno líquido en el tiempo indicado. Los experimentos se realizaron como se describen en materiales y métodos.

La reducción enzimática total a 560 nm fue inmediata con succinato (veáse Figura 7) tanto para membranas no irradiadas como irradiadas. Con NADH como sustrato, en membranas no irradiadas el nivel de reducción de cit. b fué de un 30% en los primeros minutos en relación con lo ocurrido con succinato; la transición a la anaerobiosis que sucede alrededor de los seis minutos; lleva a la reducción total de citocromo b que se logra después de los 11 minutos con la concentración de proteína usada. Con membranas irradiadas y NADH se reduce muy poco el cit. b y así se mantiene a lo largo del tiempo.

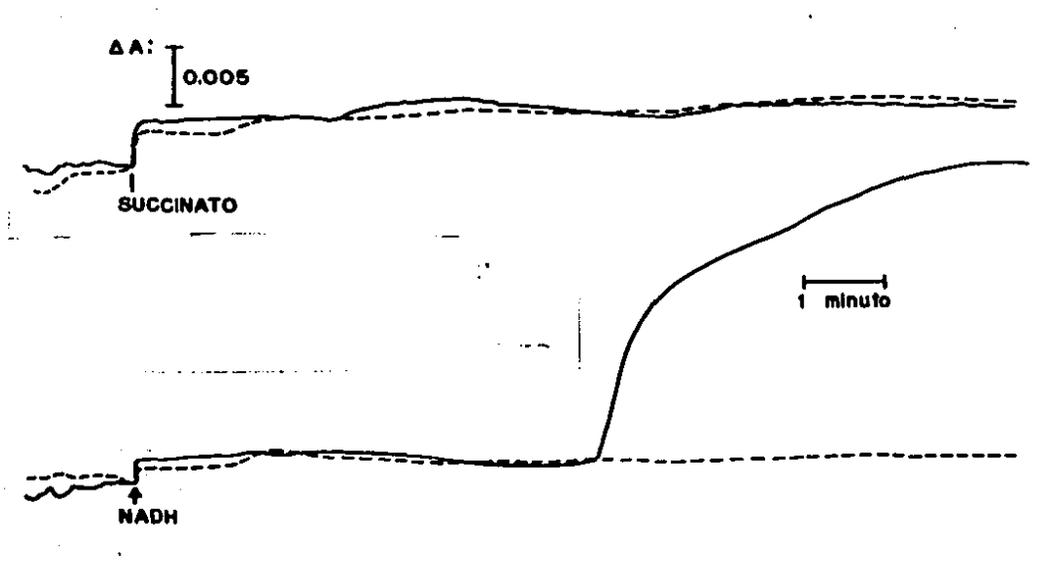


FIGURA 7. Cinética de reducción de cit. b (560-575 nm) de membranas no irradiadas (—) y fotoinactivadas (----) con luz U.V. (360 nm) durante 60 min. La mezcla de reacción fue como la descrita en materiales y métodos, con 4.5 mg proteína/ml.

Las evidencias precedentes señalan que cuando se adiciona succinato se produce la reducción inmediata y elevada de un cit. de tipo b, independientemente de si las membranas han sido fotoinactivadas o no. La menadiona no cambia los niveles de reducción para cit. b; fenómeno contrario al que sucede al añadir NADH; de donde se apoya la existencia de vías diferentes para la oxidación del NADH y el succinato, y se sugiere que un tipo de cit. b diferente sea el primer aceptor de los electrones de la SDH.

Para avanzar en el conocimiento de las dos posibles vías para la transferencia de electrones desde NADH y succinato, se decidió ver el comportamiento del sistema respiratorio en presencia de los inhibidores del complejo III de la cadena respiratoria de mitocondria.

5.4 EFECTOS DE LOS INHIBIDORES DEL COMPLEJO b_c DE MITOCONDRIA

Para iniciar el estudio de identificación de los sitios de inhibición, se decidió ver el comportamiento de la NADH y succinato oxidasa en concentraciones crecientes de HQNO, antimicina A, y mixotiazol.

En la Figura 8A se muestra que con 0.35 μ M y 4 μ M se inhibe el 50% de la oxidación de succinato y NADH, respectivamente. Por otro lado, la cinética de inhibición con antimicina A enseña que se inhibe el 50% de la actividad de NADH y succinato oxidasa con aproximadamente 25 μ M. (Fig 8B).

La Figura 9 muestra que el mixotiazol prácticamente no afecta las

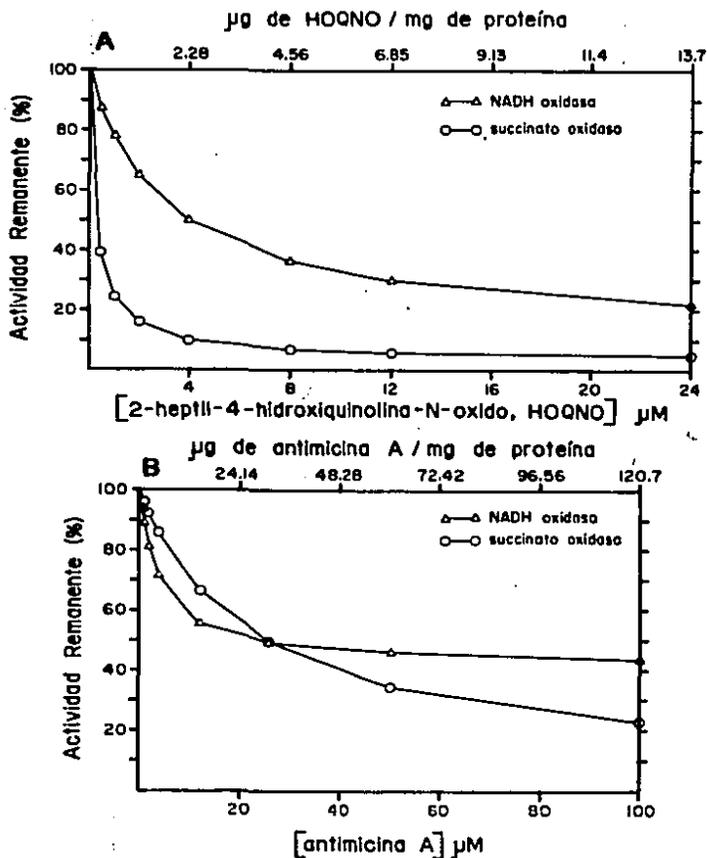


FIGURA B. Efecto del HQQNO y antimicina A sobre la actividad de la NADH oxidasa y succinato oxidasa en membranas de *B. cereus*. La actividad específica se expresa como % de la actividad remanente con respecto al control sin HQQNO o sin antimicina A. La actividad basal de la NADH oxidasa fué de 100 y de la succinato oxidasa fué de 40.

actividades de la NADH y succinato oxidasa en membranas de B. cereus hasta en concentraciones de 26.8 μg mixotiazol/mg proteína; en R. phaseoli la succinato tampoco fué afectada, pero en cambio, la oxidación de NADH se inhibe completamente con 1.07 μg mixotiazol/mg proteína.

La cinética de inhibición NADH y succinato oxidasa con los tres inhibidores del complejo bc₁ sugieren las siguientes conclusiones:

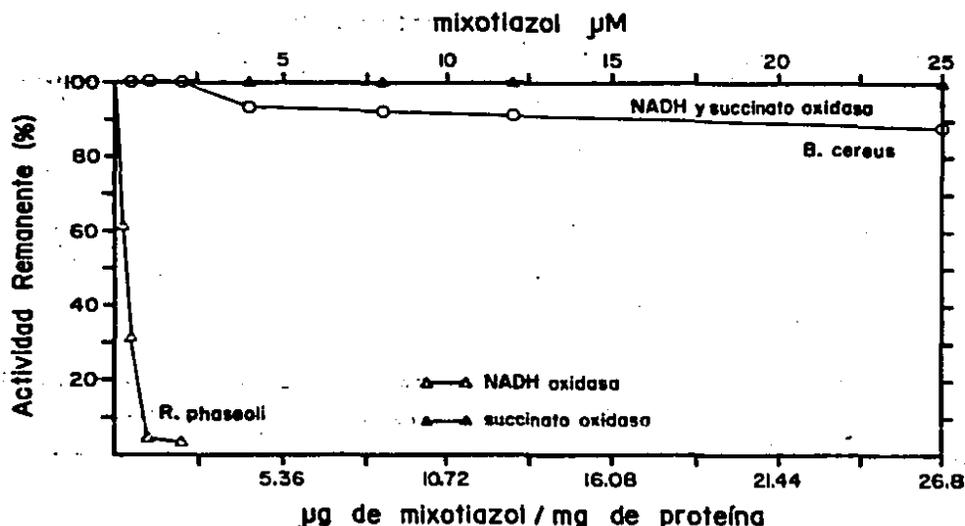


FIGURA 9. Efecto del mixotiazol sobre la actividad de la NADH y succinato oxidasa en membranas de B. cereus y R. phaseoli. La actividad específica se expresa como el % de la actividad remanente con respecto al control sin mixotiazol. La actividad basal de la NADH oxidasa fué de 145 y de 200, y de la succinato oxidasa fué de 33 y 48 para B. cereus y R. phaseoli, respectivamente.

1. Que en E. cereus existen dos sitios de inhibición para el HQNO, uno de muy alta afinidad con una I_{50} de 0.35 μM en la vía de oxidación de succinato y otro, menos sensible, con una I_{50} de 4.0 μM en la ruta de la NADH oxidasa.

2. El bloqueo del transporte de electrones en la oxidación de succinato y NADH por antimicina A, sugiere por lo menos un sitio de acción común con una I_{50} de aproximadamente 25 μM .

3. Ya que el mixotiazol bloquea dos reacciones al mismo tiempo en el complejo bc₁: La transferencia de electrones de QH_2 a la proteína Fe-S de Rieske y al cit.b₅₄₄, y el hecho de que este inhibidor (26.8 μg mixotiazol/mg proteína) no afecta la actividad de la NADH y succinato oxidasa en membranas de E. cereus, se infiere un posible complejo III diferente al de mitocondria. Por otro lado, la inhibición de la actividad de la NADH oxidasa en E. phaseoli por mixotiazol sugiere, que al parecer existe en éste un complejo III semejante al de mitocondria; sin embargo, el mixotiazol no afecta la oxidación de succinato, sugiriéndose una ruta alternativa para la transferencia de electrones a partir de éste sustrato.

6. DISCUSION

Los resultados obtenidos en la presente tesis, hacen necesario modificar el esquema inicialmente propuesto por nuestro laboratorio (11), para el transporte de electrones que provienen de la oxidación de succinato y NADH en la cadena respiratoria de B. cereus.

La irradiación con luz U.V. (360 nm) de membranas de B. cereus se ha probado que destruye la quinona endógena, y con esto practicamente se suprime la oxidación de NADH (Figura 4). La oxidación de succinato en las membranas irradiadas (Figura 4) se mantiene en un 65%, y el efecto de las dos menadionas es poco importante comparado a lo que sucede con NADH (Figura 5). Si estos resultados lo relacionamos con el potencial redox de la MQ (Tabla 1) y del par succinato/fumarato, esto sugiere que la MQ probablemente no es el aceptor primario de la SDH.

Al postular una entrada diferente para los electrones donados por SDH a la cadena respiratoria, pueden existir varias posibilidades. La primera podría ser que la SDH pasará sus electrones a un cit. b libre o intimamente asociado a la SDH, en este último caso existiría un complejo SDH-cit. b que tendría un potencial redox, adecuado para

usar a la MQ como aceptor; también, podría existir un complejo SDH-cit. b que tuviera un E'_{0} demasiado positivo, para no usar a la MQ como un aceptor y entonces requeriría un aceptor diferente, con un potencial más positivo, quizás otro citocromo.

El análisis espectral de los citocromos (Figura 6) y la cinética de reducción de cit. b (Figura 7) en presencia de succinato puso de manifiesto una reducción inmediata y total de un cit. b, inclusive superior que la cantidad de cit. b reducido por NADH en los primeros cinco minutos; el fenómeno anterior ocurrió tanto en las membranas no irradiadas como en las fotoinactivadas, lo cual sugiere la existencia de un complejo entre la SDH y un cit. b en el cual la MQ no tendría participación.

Konings y colaboradores (20) informaron que en E. subtilis el complejo SDH-cit. b tiene un $E'_{0} = +65$ mV y el primer cit. b reducido en la vía de oxidación de NADH tiene un $E'_{0} = +140$ mV; además, proponen que el complejo SDH-cit. b transfiere los electrones a la MQ-7 ($E'_{0} = -74$ mV), sin ninguna evidencia experimental que apoye esta propuesta y a pesar de la gran diferencia de potencial redox que existe entre SDH-cit. b ($E'_{0} = +65$) y a la MQ-7 ($E'_{0} = -74$). Por otro lado, en mutantes de E. subtilis deficientes en MQ (aro D), al adicionar menadiona, se restaura la actividad de la NADH oxidasa, pero no la actividad de la succinato oxidasa (16). Estos resultados son controversiales pues por un lado sugieren que la MQ-7 ó su análogo: Menadiona, participan en la oxidación de succinato y sin embargo, no explican el

porque aro D reconstituida en menadiona es incapaz de oxidar succinato.

En *B. subtilis* (73) el cit. b₅₅₈ del complejo SDH tiene un peso molecular de 22,700 y es muy diferente del cit. b₅₄₀ del complejo II de mitocondria que tiene dos polipéptidos necesarios para la actividad succinato-Q reductasa sensible a TTFA (52). Tratando de establecer una posible similitud entre el complejo SDH-cit. b₅₅₈ de *B. subtilis* y el sugerido para *B. cereus*, y aunado al hecho de que no se afecta la oxidación de succinato por TTFA (Figura 3), se sugiere que el sitio de acción de este inhibidor no está presente o se encuentra modificado en *B. cereus*.

Se ha demostrado para algunas bacterias que los sitios de acción para HQQNO y antimicina A son diferentes, situación que no sucede en el sistema respiratorio de mitocondria. La cinética de inhibición (Figura 8) sugiere diferentes sitios de acción para HQQNO y antimicina. Para el HQQNO hay dos sitios, uno de alta afinidad (0.35 μ M) en la vía de oxidación de succinato y otro mucho menos sensible (4.0 μ M) en la ruta de la NADH oxidasa. Proponemos que el sitio de alta afinidad posiblemente se encuentra cerca o en el cit. b₅₅₈ del complejo putativo de SDH-cit. b₅; y el de baja afinidad entre la MQ y el cit. b₅₅₈ o en este mismo cit. b₅. Por otro lado, al parecer para la antimicina existe un sitio común para las vías, que posiblemente sería el cit. b₅₅₈, aunque no se descarta la posibilidad de otro sitio no convergente para las dos vías.

El mixotiazol es citotóxico a células eucarióticas y por lo general no afecta el crecimiento de bacterias gram-positiva ó gram-negativa (74); esta susceptibilidad podría ser debido a las barreras de permeabilidad o por modificación química del inhibidor por la bacteria. Finalmente, tomando en cuenta que el mixotiazol tiene dos sitios de acción en el complejo bc_1 , y el hecho de que este inhibidor no afecte el transporte de electrones en las membranas de B. cereus (Figura 9), se deduce también que podría existir un complejo III en las membranas de B. cereus diferente al de mitocondria (53).

De los resultados obtenidos en esta investigación proponemos una modificación al esquema postulado para el sistema respiratorio aeróbico de B. cereus (11), el cual es mostrado en la Figura 10. Por analogía con el sistema respiratorio de B. subtilis (20) proponemos que dos vías alternativas están comprometidas en el transporte de electrones. La primera, procede a través de la NADH DH, MQ y cit. b_{558} ; la segunda, va del posible complejo estructuro-funcional SDH-cit. b_{558} al cit. b_{558} . Se hace la salvedad de que los subíndices 558 y N558 para los dos posibles citocromos b solo es una manera de diferenciarlos formalmente.

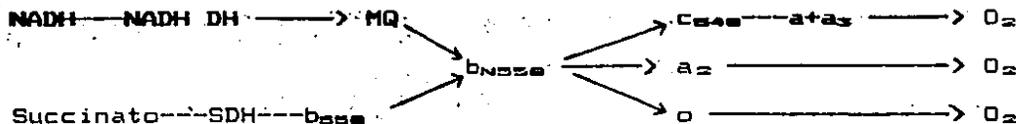


Figura 10. Esquema propuesto para el sistema respiratorio aeróbico de B. cereus.

RECOMENDACIONES

1. Para completar esta investigación sería necesaria la extracción con n-pentano de la quinona endógena (59) y la reconstitución con MQ-7 y sus análogos. Sin embargo, sería muy importante detectar espectrofotométricamente en forma directa la MQ en las membranas, para lo cual se podría utilizar el método de Podzuweit y colaboradores (75) modificado, el cual minimiza la dispersión de la luz con un incremento en la sensibilidad y rango espectral comparado a la técnica tradicional del espectro diferencial.

2. La localización exacta de los sitios de acción de los inhibidores HQNO y antimicina A requiere de un estudio combinado de espectrofotometría diferencial, barrido en modo dual de la reducción de los citocromos y la cinética de reducción de los citocromos b y c en diferentes condiciones.

3. Como se mencionó, la zona del espectro 540-570 nm es compleja y difícil de resolver en sus componentes individuales de los citocromos b y c; por otro lado, la resolución en el ensayo potenciométrico de los citocromos parece ser insuficiente para lo complejo de las cadenas respiratorias ramificadas en bacterias. El tratamiento con deri-

vadas de los espectros diferenciales a 77°K en la región de 540 a 570 nm permitiría incrementar la resolución de los citocromos presentes (30). Si a la propuesta anterior se le agrega el estudio de la integración del análisis potenciométrico con el método para la desconvolución (descomposición) de la región de 540 a 570 nm a 77°K(20) permitiría la resolución más amplia, necesaria para la distinción de los citocromos b y c en membranas de E. cereus.

4. Sería de gran ayuda para el estudio de la cadena respiratoria de E. cereus solubilizar el complejo putativo de SDH-cit.b₅₅₉ en forma activa con un detergente no iónico; por ejemplo, Triton X-100, como se ha reportado para E. subtilis (39), M. luteus (42) y M. phlei (45). El complejo SDH-cit.b₅₅₉ puede ser purificado por el procedimiento seguido en M. phlei (45) o por una estrategia de contra inmunoelectroforesis (39 y 42).

BIBLIOGRAFIA

1. Knowles, C. J. ed. 1980. Diversity of bacterial respiratory systems, vol.: I, II. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
2. Poole, R. K. 1983. Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 726: 205-243.
3. Kita, K., K. Konishi, and Y. Anraku. 1984. Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 259: 3368-3381.
4. Escamilla, J. E., R. Ramirez, I. P. Del Arrenal, G. Zarzoza, and V. Linares. 1987. Expression of cytochrome oxidases in *Bacillus cereus*: effects of oxygen tension and carbon source. *J. Gen. Microbiol.* 133:
5. Anraku, Y. 1988. Bacterial electron transport chains. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 101-132.
6. Kröger, A., V. Dadák, M. Klingenberg, and F. Diemer. 1971. On the role of quinones in bacterial electron transport. Differential roles of ubiquinone and menaquinone in *Proteus rettgeri*. *Eur. J. Biochem.* 21: 322-333.
7. Belman, N. S., M. A. Lukyanova, and D. N. Ostrouskii. 1975. The respiratory chain and its organization in the bacterial membrane, pp. 129-215. In *membranes*, vol. 6. Editores (mismos autores). Plenum press, New York.
8. Collins, M. D., and D. Jones. 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol. Rev.* 45: 316-354.
9. Kröger, A., and V. Dadák. 1969. On the role of quinones in bacterial electron transport. The respiratory system of *Bacillus megaterium*. *Eur. J. Biochem.* 11: 328-340.
10. Bergsma, J., K. E. Meihuizen, W. V. Deverren, and W. N. Konings.

1982. Restoration of NADH oxidation with menaquinones and menaquinone analogues in membrane vesicles from the menaquinone-deficient *Bacillus subtilis* aroD. *Eur. J. Biochem.* 125: 651-657.
11. Escamilla, J. E., and M. C. Benito. 1984. Respiratory system of vegetative and sporulating *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 160: 473-477.
 12. Hess, A., R. Holländer, and W. Mannheim. 1979. Lipoquinones of some spore-forming rods, lactic-acid bacteria and Actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* 115: 247-252.
 13. Schnorf, U. 1966. Ph.D. Thesis, Eidgen. Techn. Hochschule. Zürich, No 3871.
 14. Holländer, R. 1976. Correlation of the function of demethylmenaquinone in bacterial electron transport with its redox potential. *FEBS Lett.* 72: 98-100.
 15. Kröger, A., and G. Uden. 1985. The Function of menaquinone in bacterial electron transport. pp. 285-299. In G. Lenaz, Coenzyme Q. John Wiley & Sons Ltd., New York.
 16. Farrand, S. K., and H. W. Taber. 1973. Physiological effects of menaquinone deficiency in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 115: 1035-1044.
 17. Knook, D.L., and R. J. Planta. 1971. Restoration of electron transport in ultraviolet-irradiated membranes of *Aerobacter Aerogenes*. *FEBS Lett.* 14: 54-56.
 18. Asano, A., and A. F. Brodie. 1964. Oxidative phosphorylation in fractionated bacterial systems. XIV. Respiratory chains of *Mycobacterium phlei*. *J. Biol. Chem.* 239: 4280-4291.
 19. Sone, M. 1974. *J. Biochem.* 76: 137-145.
 20. De Vrij, W., B. van den Burg, and W. N. Konings. 1987. Spectral and potentiometric analysis of cytochromes from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 166: 589-595.
 21. Escamilla, J. E., B. Barquera, R. Ramirez, A. Garcia-Horsman, and P. Del Arrenal. 1988. Role of menaquinone in inactivation and activation of the *Bacillus cereus* forespore respiratory system. *J. Bacteriol.* 170: 5908-5912.
 22. Fynn, G. H., D. V. Thomas, and B. Seddon. 1972. On the role of menaquinone in the reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidative pathway of *Bacillus brevis*. *J. Gen. Microbiol.* 70: 271-275.

23. Kow, Y. W. 1984. Ubiquinone in hydrogeno metabolism by *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Microbiol.* 30: 1421-1423.
24. Hatefi, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 1015-1069.
25. Under, G., and A. Kröger. 1981. La function of the subunits of the fumarate reductase complex of *Vibrio succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* 120: 577-584.
26. Jones, C. W., and R. K. Poole. 1985. The analysis of cytochromes *Methods in microbiology.* 18: 285-328.
27. Revsin, B., and A. F. Brodie. 1969. Carbon monoxide-binding pigments of *Mycobacterium phlei* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 244: 3101-3104.
28. Poole, R. K., J. E. Van Wielink, B. S. Baines, W. N. M. Reijnders, I. Salmon, and L. F. Oltmann. 1983. The membrane-bound cytochromes of an aerobically grown, extremely thermophilic bacterium, PS3: characterization by spectral deconvolution coupled with potentiometric analysis. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2163-2173
29. Sone, N., and Y. Yanagita. 1982. A cytochrome aa_3 -type terminal oxidase of a thermophilic bacterium purification, properties and proton pumping. *Biochim. Biophys. Acta.* 682: 216-226.
30. Scott, R. I., and R. K. Poole. 1982. A re-examination of the cytochromes of *Escherichia coli* using fourth-order finite difference analysis: their characterization under different growth conditions and accumulation during the cell cycle. *J. Gen. Microbiol.* 128: 1685-1696.
31. Fridén, H., L. Rutberg, K. Magnusson, and L. Hederstedt. 1987. Genetic and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* mutants defective in expression and function of cytochrome b_{558} . *Eur. J. Biochem.* 168: 695-701.
32. Cohen, N. S., and A. F. Brodie. 1975. Multiple forms of Cytochrome b in *Mycobacterium phlei*: kinetics of reduction. *J. Bacteriol.* 123: 162-173.
33. Jaworowski, A., G. Mayo, D. C. Shaw, H. D. Campbell, and I. G. Young. 1981. Characterization of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* and reconstitution of NADH oxidase in *ndh* mutant membrane vesicles. *Biochemistry.* 20: 3621-3628.
34. Bergsma, J., M. B. M. Van Dongen, and W. N. Konings. 1982. Purification and characterization of NADH dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 128: 151-157.

35. Yu, L., C. A. YU. 1982. Isolation and properties of the cytochrome b-c₁ complex from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108: 1285-1292.
36. Berry, E. A., and B. L. Trumpower. 1985. Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc₁ and cytochrome c-aa₃ complex. *J. Biol. Chem.* 260: 2458-2467.
37. Krinner, M., G. Hauska, E. Hurt, and W. Lockau. 1982. A cytochrome f-b₆ complex with plastoquinol-cytochrome c oxidoreductase activity from *Anabaena variabilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 681: 110-117.
38. Hederstedt, L., and L. Rutberg. 1981. Succinate dehydrogenase -a comparative review. *Microbiol. Rev.* 45: 542-555.
39. Hederstedt, L., E. Holmgren, and L. Rutberg. 1979. Characterization of a succinate dehydrogenase complex solubilized from the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis* with the nonionic detergent Triton X-100. *J. Bacteriol.* 138: 370-376.
40. Davis, K. A., Y. Hatefi, I. P. Crawford, and H. Baltscheffsky. 1977. Purification, molecular properties, and amino acid composition of the subunits of *Rhodospirillum rubrum* succinate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 459-464.
41. Owen, P., and C. Condon. 1982. The succinate dehydrogenase of *Escherichia coli*: subunit composition of the Triton X-100 solubilized antigen. *FEMS Microbiol. Lett.* 14: 223-227.
42. Crowe, B. A., and P. Owen. 1983. Molecular properties of succinate dehydrogenase isolated from *Micrococcus luteus* (lysodeikticus). *J. Bacteriol.* 153: 1493-1501.
43. Barassi, C. A., R. G. Kranz, and R. B. Gennis. 1985. Succinate dehydrogenase in *Rhodospseudomonas sphaeroides*: subunit composition and immunocross-reactivity with other related bacteria. *J. Bacteriol.* 163: 778-782.
44. Hallberg, C., L. Hederstedt, and H. Baltscheffsky. 1985. Soluble succinate dehydrogenase from the Halophilic archaeobacterium, *Halobacterium halobium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 239: 200-205.
45. Prasad Reddy, T. L., and M. M. Weber. 1986. Solubilization, purification, and characterization of succinate dehydrogenase from membranes of *Mycobacterium phlei*. *J. Bacteriol.* 167: 1-6.
46. Samain, E., D. S. Patil, D. V. DerVartanian, G. Albagnac, and J. LeGall. 1987. Isolation of succinate dehydrogenase from *Desulfo-*

- bulbus elongatus*, a propionate oxidizing, sulfate reducing bacterium. FEBS Lett. 216: 140-144.
47. Hederstedt, L. 1980. Cytochrome b reducible by succinate in an isolated succinate dehydrogenase-cytochrome b complex from *Bacillus subtilis* membranes. J. Bacteriol. 144: 933-940.
 48. Holmögren, E., L. Hederstedt, and L. Rutberg. 1979. Role of heme in synthesis and membrane binding of succinic dehydrogenase in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 138: 377-382.
 49. Hederstedt, L., and L. Rutberg. 1983. Orientation of succinate dehydrogenase and cytochrome b_{558} in the *Bacillus subtilis* cytoplasmic membrane. J. Bacteriol. 153: 57-65.
 50. Wood, D., M. G. Darlison, R. J. Wilde, and J. R. Guest. 1984. Nucleotide sequence encoding the flavoprotein and hydrophobic subunits of the succinate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Biochem. J. 222: 519-534.
 51. Jurtshuk, P., A. K. May, L. M. Pope, and P. R. Aston. 1969. Comparative studies on succinate and terminal oxidase activity in microbial and mammalian electron-transport systems. Can. J. Microbiol. 15: 797-807.
 52. Ramsay, R. R., B. A. C. Ackrell, C. J. Coles, T. P. Singer, G. A. White, and G. D. Thorn. 1981. Reaction site of carboxanilides and of thioiltrifluoroacetone in complex II. P.N.A.S. U.S.A. 78: 825-858.
 53. Von Jagow, G., and Th. A. Link. 1986. Use of specific inhibitors on the mitochondrial bc₁ complex. Methods Enzymol. 126: 253-271.
 54. Howell, N., J. Appel, J. P. Cook, B. Howell, and W. W. Hauswirth. 1987. The molecular basis of inhibitor resistance in mammalian mitochondrial cytochrome b mutant. J. Biol. Chem. 262: 2411-2414.
 55. Feliz, J. A., and D. G. Lundgren. 1973. Electron transport system associated with membranes of *Bacillus cereus* during vegetative growth and sporulation. J. Bacteriol. 115: 552-559.
 56. Bisschop, A., J. Boonstra, H. J. Sips, and W. N. Konings. 1975. Respiratory chain linked ferricyanide reduction driven active transport in membrane vesicles from *Bacillus subtilis*. FEBS Lett. 60: 11-16.
 57. Vignais, P. M., M-F. Henry, E. Sim, and D. B. Kell. 1981. The electron transport system and hydrogenase of *Paracoccus denitrificans*. Current topics in Bioenergetics. 12: 115-140.

58. Kröger, A., and A. Innerhofer. 1976. The function of the b cytochrome in the electron transport from formate to fumarate of *Vibrio succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* 69: 497-506.
59. Mountfort, D. G., and A. M. Robertson. 1977. The role of menaquinone and b-type cytochrome in anaerobic reduction of fumarate by NADH in membrane preparations from *Bacteroides ruminicola* strain B₁₄. *J. Gen. Microbiol.* 100: 309-317.
60. Harris, M. A., and C. A. Reddy. 1977. Hydrogenase activity and the H₂-fumarate electron transport system in *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 131: 922-928.
61. Meinhardt, S. W., and A. R. Crofts. 1982. The site and mechanism of action of myxothiazol as an inhibitor of electron transfer in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *FEBS Lett.* 149: 217-222.
62. Matsuura, K., J. R. Bowyer, T. Ohnishi, and P. L. Dutton. 1983. Inhibition of electron transfer by 3-alkyl-2-hydroxy-1,4-naphthoquinones in the ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase of *Rhodospseudomonas sphaeroides* and mammalian mitochondria. Interaction with a ubiquinone-binding site and the rieske iron-sulfur cluster. *J. Biol. Chem.* 258: 1571-1579.
63. Glaser, E. G., S. W. Meinhardt, and A. R. Crofts. 1984. Reduction of cytochrome b-561 through the antimycin-sensitive site of the ubiquinol-cytochrome c₂ oxidoreductase complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *FEBS Lett.* 178: 336-342.
64. Bowyer, J. R., G. V. Tierney, and A. R. Crofts. 1979. Cytochrome c₂ reaction centre coupling in chromatophores of *Rhodospseudomonas sphaeroides* and *Rhodospseudomonas capsulata*. *FEBS Lett.* 101: 207-212.
65. Richardson, D. J., D. J. Kelly, J. B. Jackson, S. J. Ferguson, and K. Alef. 1986. Inhibitory effects of myxothiazol and 2-n-heptil-4-hydroxiquinoline-N-oxide on the auxiliary electron transport pathways of *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.* 146: 159-165.
66. Andreoli, A. J., S. Suehiro, D. Sakiyama, J. Takemoto, E. Vivanco, J.C. Lara, and M. C. Klute. 1973. Release and recovery of forespores from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 115: 1159-1166.
67. Sterlini, J. M., and J. Mandelstam. 1969. Commitment to sporulation in *Bacillus subtilis* and its relationship to development of actinomycin resistance. *Biochem. J.* 113: 29-37.
68. Collier, R. E. 1967. An approach to synchronous growth for spore formation in *Clostridium roseum*. In *Spores*. H. O. Haborson (ed).

Amer. Soc. for Microbiol., Washington, D. C. pp. 10-17.

69. Lowry, D. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
70. Lang, D. R., J. Felix, and D. G. Lundgren. 1972. Development of a membrane-bound respiratory system prior to and during sporulation in *Bacillus cereus* and its relationship to membrane structure. *J. Bacteriol.* 110: 968-977.
71. Baginsky, M. L., and Y. Hatefi. 1969. Reconstitution of succinate-Coenzyme Q reductase (Complex II) and succinate oxidase activities by a highly purified, reactivated succinate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 244: 5313-5319.
72. Hatefi, Y., and Y. M. Galante. 1980. Isolation of cytochrome b_{540} from complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) and its reconstitution with succinate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 255: 5530-5537.
73. Magnusson, K., L. Hederstedt, and L. Rutberg. 1985. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *sdh A*, the structural gene for cytochrome b_{558} of the *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase complex. *J. Bacteriol.* 162: 1180-1185.
74. Thierbach, G., and H. Reichenbach. 1981. Myxothiazol, a new antibiotic interfering with respiration. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 19: 504-507.
75. Podzimeit, H-G., and D. J. Arp. 1985. Difference spectroscopy with respiratory membranes of an H_2 -oxidizing microorganism layered between two gas-permeable, plastic foils: a procedure that allows measurements in the ultraviolet range. *Analytical Biochemistry.* 151: 487-494.