

81a
2a



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CONSTRUCCION Y ANALISIS DE UNA
SECUENCIA CONSENSO PARA LA SUBUNIDAD II
DE LA CITOCROMO OXIDASA BACTERIANA
caa3 Y LA BUSQUEDA DE SU GEN (ctaC) EN
Bacillus cereus.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

FERNANDO HERNANDEZ SANCHEZ



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

NOVIEMBRE DE 1994

**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 está 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
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron el pasante(s) Fernando Hernández Sánchez

con número de cuenta 8737541-3 con el Título:

CONSTRUCCION Y ANALISIS DE UNA SECUENCIA CONSENSO PARA LA
SUBUNIDAD II DE LA CITOCROMO OXIDASA BACTERIANA caa3 Y LA
BUSQUEDA DE SU GEN (ctaC) EN Bacillus cereus.

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Doctor	Raúl	Arredondo Peter	<i>Arredondo Peter R.</i>
Director de Tesis Doctor	José Edgardo	Escamilla Marván	<i>[Firma]</i>
Biólogo	Carlos Alberto	Castillo Pompeyo	<i>[Firma]</i>
Doctor	Jesús Manuel	León Cazares	<i>[Firma]</i>
Suplente M. en C.	Alejandro	Sosa Peinado	<i>[Firma]</i>
Suplente			

A mi gente:

*A la memoria de Bernardo,
ejemplo de valor y constancia insuperables*

**Este trabajo se realizó bajo la dirección del
Dr. Raúl Arredondo-Peter.**

**En el laboratorio a cargo del
Dr. José Edgardo Escamilla Marván
en el Departamento de Microbiología del
Instituto de Fisiología Celular de la UNAM**

CONTENIDO

Resumen.....	1
I. Introducción.....	2
I.1. La esporulación bacteriana.....	11
I.2. Los citocromos y la cadena de transporte de electrones.....	21
I.3. Relaciones Filogenéticas.....	24
I.4. El análisis genético.....	25
II. Objetivos.....	32
III. Materiales y Métodos.....	33
IV. Resultados.....	38
V. Discusión.....	59
VI. Referencias.....	63
Agradecimientos.....	68

RESUMEN

La esporulación bacteriana es un modelo para el estudio de la diferenciación celular a nivel bioquímico. Durante la esporogénesis se dan cambios en las formas de utilización de la energía que afectan a las enzimas que forman parte del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y a las enzimas que componen el sistema respiratorio. En *Bacillus cereus*, el sistema respiratorio presenta dos tipos comprobados de oxidasas terminales: la citocromo oxidasa aa3 y la citocromo oxidasa caa3; esta última se expresa únicamente durante la esporulación o el crecimiento en medios de cultivo no fermentables. Por tal razón, el estudio del patrón de expresión diferencial de las citocromo oxidasas en esta bacteria resulta de gran interés; sin embargo, hasta el momento se desconoce el arreglo, la secuencia y la organización transcripcional de los genes que codifican para estas enzimas en *B. cereus*.

Con el propósito de iniciar la búsqueda del gen para la subunidad II de la citocromo oxidasa (ctaC) en *B. cereus*, se construyó una secuencia consenso total para la subunidad II de las citocromo oxidasas bacterianas, COXII CS, a partir del alineamiento de las secuencias que se obtuvieron en los bancos de datos y en la literatura. Dicha secuencia se analizó mediante el uso de programas de computadora, lo que permitió la elaboración de un modelo bidimensional para la misma. Por otra parte, se detectaron las regiones más conservadas en la COXII CS y se utilizaron en el diseño de oligonucleótidos para la amplificación por PCR de un fragmento de 310 pb del gen ctaC.

I. INTRODUCCION

La diferenciación celular es un fenómeno fundamental de la vida que aún queda por entender. La biología dedica gran parte de sus esfuerzos a estudiar este fenómeno en distintos niveles de complejidad, bajo enfoques variados y utilizando para ello modelos diversos. Uno de estos modelos es la célula procariótica.

Las bacterias son capaces de cambiar su forma, su tamaño, sus componentes estructurales y, en suma, su fisiología, en respuesta a los cambios del ambiente. Cuando una célula modifica su forma y su función para dar lugar a otro tipo celular, pero conserva la misma información genética, se dice que llevó a cabo un proceso de diferenciación celular. De este modo las bacterias muestran diferenciación como parte de su ciclo de vida. La célula diferenciada puede especializarse para sobrevivir en un ambiente hostil, como es el caso de la formación de esporas (Parish, 1979).

Una espora es una estructura de resistencia que asegura a varios géneros de bacterias su permanencia en el ambiente. Se conocen estructuras de resistencia en todos los reinos, y en particular las esporas se han encontrado en algunos de ellos (Strickberger 1990). Hay ocho géneros de bacterias que presentan esporas, entre ellos los más conocidos son *Bacillus*, *Clostridium* y *Sporosarcina* (Parish 1979).

Las endosporas bacterianas son formas resistentes que no se dividen soportan la desecación, pHs extremos, temperaturas elevadas y otras condiciones adversas.

Ahora bien, la esporulación bacteriana es, sin lugar a dudas, un fenómeno de diferenciación celular, y como tal es un buen modelo para el estudio de la misma. En este sentido, y al tomar en cuenta el principio de la unidad de los seres vivos de Kluver y Van Niel (Kluver y Van Niel, 1956) se puede pensar que los procesos morfogenéticos que se estudien con este modelo se pueden extrapolar a los organismos más complejos.

Halvorson en 1962 enunció que: "La esporulación bacteriana provee un sistema modelo microbiano para el estudio de la diferenciación a nivel bioquímico" (revisado en Parish, 1979).

Durante la esporulación bacteriana suceden cambios morfofisiológicos muy importantes, que van acompañados por cambios en la expresión de los genes. Actualmente se han logrado describir algunos de los procesos que permiten la expresión diferencial de la información genética (Chambliss 1979).

De entre los cambios que se presentan durante la esporogénesis, destacan los referentes a las formas de utilización de la energía, que tienen que ver en

particular con las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Carls y Hanson, 1971), con la utilización de caminos aerobios y anaerobios, y con la composición de las enzimas de la cadena respiratoria (Escamilla et al, 1985).

La fosforilación oxidativa es el proceso en el cual se sintetiza ATP con la energía derivada de la transferencia de electrones desde el NADH o el FADH₂ hacia el oxígeno molecular mediante una serie de acarreadores que en su conjunto reciben el nombre de cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria. El NADH y el FADH₂ son las moléculas donadoras de electrones que se forman en el ciclo de Krebs, que es la vía final para la oxidación de las moléculas combustibles en la célula, como son los diversos carbohidratos.

Los sistemas respiratorios bacterianos son considerablemente más complejos que los mitocondriales, pues en los primeros, la cadena de transporte de electrones se ramifica en diferentes oxidasas terminales; en cambio, la mitocondria posee una cadena lineal (Santana et al, 1992). Entre las múltiples oxidasas terminales que presentan las bacterias se encuentran las de los tipos: aa3, caa3, d y o, las cuales difieren en su afinidad por el oxígeno y su sensibilidad al cianuro (Escamilla, 1987). Por otro lado, las cadenas respiratorias bacterianas pueden utilizar un gran número de aceptores alternos además del oxígeno, como son el nitrato, nitrito, sulfato y fumarato; mientras que en la mitocondria el aceptor final es el oxígeno.

Dicha complejidad se puede relacionar con la capacidad de las bacterias para responder a la disponibilidad de las fuentes de energía; de esta manera, no se puede hablar de un sistema único, pues existen variaciones en la composición, organización y regulación en cada especie. Además los genes responsables de los componentes redox o enzimáticos de estos sistemas pueden ser constitutivos o estar sujetos a inducción y represión de acuerdo a las condiciones ambientales. Por ejemplo, *Escherichia coli* presenta dos tipos alternativos de citocromo oxidasa: la del tipo *o* que es la enzima predominante cuando la concentración de oxígeno en el medio es alta; y la del tipo *d* que se presenta en condiciones microaerófilas (Cotter et al, 1990).

Los componentes de los sistemas respiratorios bacterianos son esencialmente del mismo tipo que los presentes en las mitocondrias: los acarreadores son flavoproteínas, proteínas ferrosulfuradas, quinonas, citocromos y citocromo oxidasas terminales (Harold, 1986), aunque es común que el número de subunidades que componen a las enzimas respiratorias bacterianas sea menor que en las mitocondriales.

Las enzimas de la cadena de transporte de electrones se anclan a la membrana plasmática de las células procarióticas. Su papel no solo consiste en la transferencia

de electrones desde los sustratos oxidables hasta el O_2 , sino también en la generación de una fuerza protonmótrix que es necesaria para la síntesis de ATP.

La cadena de transporte de electrones consiste básicamente de tres complejos enzimáticos: La NADH-Q reductasa, la citocromo reductasa y la citocromo oxidasa. La principal fuente de electrones de la cadena es el NADH; ya que dona un par de electrones al grupo prostético FMN (flavin mononucleótido) de la NADH-Q reductasa, el cual a su vez los hace pasar por una serie de sitios Fe-S de la misma enzima. De esta forma los electrones se transportan hacia la quinona (Q), un acarreador de electrones no protéico, que es móvil dentro de la membrana. La forma reducida de este intermediario QH_2 se llama quinol. En este punto los electrones también pueden provenir del $FADH_2$, el cual se produce por la oxidación del succinato a fumarato, por la enzima succinato deshidrogenasa, que es parte del complejo succinato Q reductasa. Este complejo también está presente en la membrana interna de la mitocondria.

Los electrones fluyen desde el quinol hacia el citocromo c a través de la citocromo reductasa, proceso que también está acoplado a la translocación de protones. La citocromo reductasa es una enzima que contiene tres subunidades, dos de las cuales son citocromos. Las subunidades son: el citocromo b, el citocromo c₁ y una ferrosulfoproteína (Fe-S), que juntos conforman la unidad funcional mínima de la enzima, además de otras cadenas polipeptídicas accesorias que no participan en la catalisis, pero que son importantes para el arreglo y estabilidad del complejo. El QH_2 cede uno de sus electrones a la Fe-S del complejo, que a su vez lo cede al citocromo c libre. En esta transferencia el ubiquinol queda en forma de semiquinona, es decir, con un solo electrón (QH_1). El citocromo b de la enzima se encarga de formar una molécula de ubiquinol a partir de dos semiquinonas, lo cual completa el ciclo (figura 1).

El último de los complejos enzimáticos es el de la citocromo oxidasa, que cataliza la transferencia de electrones del citocromo c libre hacia el oxígeno, y es además, el último punto acoplado a la expulsión de protones. Los electrones del citocromo c pasan a la citocromo oxidasa aa₃ donde el O_2 se reduce hacia dos moléculas de H_2O .

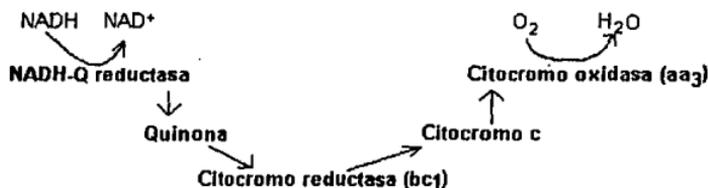
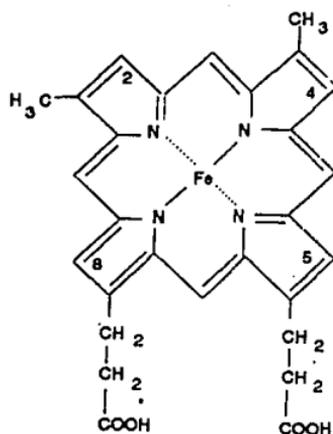


Figura 1. Ejemplo de la cadena de transporte de electrones en bacterias aerobias. Las flechas indican el flujo de los electrones.

Las enzimas terminales de la cadena respiratoria, se han dividido recientemente en dos grupos principales con base en su reductor inmediato: las de la clase I, donde el donador de electrones es el citocromo *g*, se denominan citocromo *g* oxidasas, y las de la clase II, cuyos donadores de electrones son quinoles, se llaman quinol oxidasas (Anraku, 1988). Estas últimas se presentan solo en bacterias.

Los citocromos son hemoproteínas propias de la cadena respiratoria. Las hemoproteínas presentan como grupo prostético un anillo de protoporfirina con un átomo de hierro (FeII) que oscila entre el estado reducido, Fe³⁺, y el estado oxidado, Fe²⁺. Con base en los sustituyentes de las posiciones: C₂, C₄, C₅ Y C₈ del anillo de porfirina, los grupos hemo se clasifican en varios tipos: hemo A que contiene un grupo hidroxietil farnesil en la posición C₂ y un grupo formil en la C₈; hemo B que contiene un grupo vinil en C₂ y un metil en C₈; hemo C, o mesohemo, que está unido de manera covalente a la proteína a través de puentes tioeter con las cadenas laterales de los residuos de cisteína en la proteína; y hemo D, que es una dihidroporfirina (Jones, 1985). El hemo O es esencialmente un hemo B en el que el grupo vinil en C₂ se sustituye por una cadena hidroxietil farnesil, lo que indica que el hemo O es solo un intermediario en la síntesis del hemo B (Svensson et al, 1993).

Los citocromos se clasifican de acuerdo al tipo de hemo que contienen (figura 2). Los del tipo *a* presentan un hemo A, e incluyen a las citocromo oxidasas del tipo *a*₁ y *a*₃; los del tipo *b* incluyen varios citocromos *b*, a la citocromo oxidasa *g*, y a los citocromos P-450 y P-460, en los cuales hay un grupo hemo B; los citocromos del grupo *b* participan en las cadenas respiratorias aerobias y anaeróbicas; incluyendo las de bacterias metanógenas y reductoras de sulfatos, así como las de anaerobios fermentativos.



HEMO	C-2	C-4	C-5	C-8
<i>a</i>	CH ₃	-CH ₂ =CH ₂	-	-CHO
<i>b</i>	-CH=CH ₂	-CH=CH ₂	-CH ₃	-CH ₃
<i>c</i>	-CH-CH ₃ S-	-CH-CH ₃ S-	-CH ₃	-CH ₃
<i>d</i>	CH-R OH	-CH=CH ₂	-CH ₃	-CH ₃

Figura 2. Representación del grupo hemo. Los tipos de hemo en los citocromos bacterianos se definen por los sustituyentes presentes en la periferia del grupo prostético. (Tomado de Jones y Poole 1985).

En los citocromos del tipo c se encuentra un hemo C o mesohemo; el cual se une covalentemente a la proteína por medio de dos puentes tioeter en las posiciones C-2 y C-4. Este grupo incluye a los citocromos del tipo c, c2, c3, c4, c', c550, c551, y c555; Finalmente los del tipo d contienen un hemo d, dihidroporfirina, y agrupan a la citocromo oxidasa d y al citocromo cd1. Los citocromos c, son esenciales para la respiración aeróbica y para la conservación de energía que se asocia a este proceso. Encontramos citocromos c en casi todos los géneros de bacterias, con la excepción de algunas como *Pseudomonas syringae*, y *Salmonella* que al parecer transfieren los electrones directamente del sistema quinona-citocromo h hacia la citocromo oxidasa.

Bajo condiciones aeróbicas, las cadenas respiratorias de las bacterias quimioheterótrofas, quimiolitótroficas y fototróficas facultativas, contienen varios citocromos h, dos o más citocromos c y por lo menos una citocromo oxidasa.

Las citocromo oxidasas bacterianas del tipo aa₃ se relacionan estrechamente con las citocromo oxidasas mitocondriales en cuanto a su funcionamiento; éstas, y las oxidasas bacterianas que contienen hemos O, son miembros de la superfamilia de las oxidasas con un centro binuclear formado por hemo y cobre. En general las enzimas bacterianas tienen tres subunidades que son estructuralmente análogas a las tres subunidades mayores de las oxidasas mitocondriales, ambas presentan espectros reducido-oxidado característicos con picos a los 440 y 600 nm. Contienen dos grupos hemo a y a3; los cuales aunque son químicamente idénticos, tienen diferentes propiedades debido a su localización en distintos ambientes químicos de la proteína; además presentan dos o más átomos de cobre. Las enzimas mitocondriales contienen también átomos de Mg²⁺ y Zn²⁺. Al parecer ambas tipos de oxidasas, mitocondrial y bacteriana, tienen capacidad para translocar protones a través de la membrana.

Con base en el análisis comparativo de las vías metabólicas de varios grupos de bacterias, se ha concluido que las mitocondrias provienen de la subdivisión α de las bacterias púrpura fotosintéticas, al que pertenecen *Paracoccus*, *Rhodobacter* y *Rhodospseudomonas* (Jhon, 1987). A pesar de la simplicidad estructural de la citocromo oxidasa de *Paracoccus*, se le relaciona funcionalmente con la enzima mitocondrial, tanto en sus propiedades oxidativas como en la translocación de protones.

La oxidasa aa₃ se distribuye ampliamente entre todas las bacterias aeróbicas que contienen también citocromo o. La expresión de las oxidasas se regula frecuentemente por la concentración de O₂ en el medio. En varias especies cuando hay bajos niveles de O₂ la citocromo oxidasa o reemplaza a la aa₃. (Jones y Poole 1985).

A continuación se describen brevemente las características de varias citocromo oxidasas aa3 en algunas especies bacterianas.

Paracoccus denitrificans. Cuando se crece en altas concentraciones de O₂ en este microorganismo se expresa una cadena de transporte de electrones muy similar a la mitocondrial; debido a ello se piensa que este organismo puede estar estrechamente relacionado con el posible ancestro de la mitocondria (John, 1987). De las tres subunidades que componen a la enzima mínima funcional, las dos más grandes, I y II, son sorprendentemente similares. Si dichas subunidades se aíslan juntas, ya sea a partir de la mitocondria o de la bacteria, conservan la capacidad para translocar protones; esta capacidad se acrecenta cuando se une la subunidad III (Saraste et al, 1986). Se han hecho análisis de las secuencias de aminoácidos a partir de las secuencias de nucleótidos para predecir, en cierto modo, el arreglo de las subunidades en la membrana (Holm et al. 1987); con ellos se han construido modelos que facilitan el estudio detallado del proceso de transporte de electrones.

La bacteria termofílica *Bacillus* PS3 presenta una citocromo oxidasa aa3 que consiste de tres subunidades: I, II y III. Contiene dos hemo A, un hemo C y dos átomos de cobre. El hemo C se encuentra fuertemente unido a la subunidad II. Las oxidasas de este tipo, que tienen a un citocromo c asociado se conocen como citocromo oxidasas caa3. Esta enzima es capaz de oxidar a los citocromos c-551 de la misma PS3, el citocromo c-552 de *Thermus thermophilus*, y con menor afinidad a los citocromos c de la levadura y del caballo; esta actividad se puede inhibir con cianuro o azida. Además tiene capacidad de translocar protones (García-Horsman et al. 1991).

Thermus thermophilus. En esta especie termófila se presenta una citocromo oxidasa del tipo caa3. La enzima consta de dos subunidades: la grande de 55 KDa y la pequeña de 33 KDa, homólogas a las subunidades I y II, respectivamente, de otras oxidasas bacterianas. Al igual que otras oxidasas del tipo aa3, esta enzima contiene a los hemo a y a₃, y a los átomos de cobre CuA y CuB. En este caso también se ha demostrado su función como bomba de protones acoplada a un potencial redox. Como resultado del análisis de la secuencia de nucleótidos del gen, y de aminoácidos de la proteína, se sabe que la citocromo oxidasa caa3 de *Thermus thermophilus* es el resultado de la fusión de la subunidad II de una citocromo oxidasa aa3 con un citocromo c típico, que puede considerarse como la unión de la enzima con su sustrato (Mather et al 1991). La misma fusión del citocromo c se puede encontrar en otras citocromo oxidasas caa3 como las de PS3 o de *Bacillus subtilis*.

Bacillus subtilis presenta dos tipos de oxidasas terminales: una aa3 y otra

caa3 (Saraste et al 1991). Ambas enzimas contienen dos hemo A y dos átomos de cobre, A y B, y presentan capacidad de translocar protones. La oxidasa caa3 tiene además un citocromo c unido covalentemente a la enzima aa3, de la misma forma que en otras bacterias termófilas. De esta enzima se conoce con cierto detalle la organización de los genes que la codifican, así como su secuencia y otras propiedades espectroscópicas.

En *Rhodobacter sphaeroides* también se han secuenciado los genes que codifican para las tres subunidades, de 45, 37 y 35 KDa, que la componen, (Shapleigh y Gennis 1991). Contiene los grupos hemo característicos de la citocromo oxidasa aa3, y los dos sitios de unión al cobre que son propios de este grupo de oxidasas y presenta también la capacidad para translocar protones. Los análisis de la secuencia de nucleótidos muestran que se trata de una citocromo oxidasa aa3.

Bacillus cereus también presenta dos tipos de oxidasas terminales que se expresan diferencialmente en la etapa vegetativa y en la esporulación. La oxidasa aa3 está presente durante todo el ciclo de vida, pero predomina durante la etapa vegetativa, mientras que la enzima caa3 es exclusiva de la etapa de esporulación. La subunidad II de la enzima caa3 tiene un peso molecular aproximado de 37 KDa, osea, 7 KDa mayor al de la subunidad II de la aa3. La diferencia en peso se debe al dominio para el citocromo c.

Se han caracterizado bioquímicamente las citocromo oxidasas aa3 de muchas otras especies como: *Pseudomonas sp* cepa AM1, *Nitrobacter agilis*, *Nitrosomonas europaea*, *Bacillus stearothermophilus*, *Halobacterium halobium*, *Erythrobacter longus*, *Anabaena variabilis*, y *Bradyrhizobium japonicum* entre otros (García-Horsman y Escamilla, 1990).

Ya se dijo que algunas especies bacterianas poseen un tipo de citocromo aa3 unido covalentemente a un citocromo del tipo c, sin embargo cabe resaltar el hecho de que los primeros que se describieron se encontraron en bacterias termófilas como *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus PS3*. En 1991 se describieron casi simultáneamente dos citocromo oxidasas del tipo caa3 en *Bacillus subtilis* (Saraste et al, 1991) y en *Bacillus cereus* (García-Horsman et al, 1991), es curioso que estas especies no son termófilas, pero presentan ambos tipos de oxidasas: aa3 y caa3.

Como ya se mencionó, *B subtilis* y *B cereus* pueden sintetizar dos oxidasas terminales que contienen hemo A, la aa3 y la caa3 (van der Oost et al, 1991). Se plantea que en *B subtilis* la enzima aa3 es un a quinol oxidasa, pues presenta poca actividad con varios citocromos c, pero sí cataliza la oxidación de quinoles

(Laureaus et al, 1991). En contraste, el citocromo aa3 de *B. cereus* tiene una clara actividad de citocromo oxidasa (García-Horsman et al, 1991). No obstante una preparación de citocromo aa3 de la cepa W23 de *B. subtilis* mostró actividad de citocromo c oxidasa, presentando afinidad por citocromo c de caballo y de levadura (De Vrij y Konnings, 1987). Aunque una preparación similar de la enzima aa3, pero con dos subunidades, no mostró actividad de citocromo oxidasa y, en cambio, pudo oxidar quinoles artificiales (Laureaus et al, 1991). Recientemente se esclareció el arreglo de los genes para ambas enzimas en *B. subtilis*: el operon *cta-ABCDEF* que codifica para la citocromo oxidasa caa3 (Saraste et al, 1991), y *qox-ABCD*, quinol oxidasa, que codifica para aa3 (Santana et al, 1992). Ambos operones son similares en cuanto al arreglo y secuencia, pero los residuos responsables de la unión del CuA en la subunidad II de caa3, no están presentes en la secuencia de la subunidad II de aa3 en *B. subtilis* (Wachenfeldt y Hederstedt, 1992).

Hasta la fecha se desconoce la importancia fisiológica de las isoformas de la citocromo oxidasa en *Bacillus*. Se cree que la presencia de un dominio para el hemo C en la citocromo oxidasa, puede ser una forma de evitar que el citocromo c libre se pierda durante la translocación a través de la membrana, debido a la carencia de un espacio periplásmico en las bacterias Gram positivas (Wachenfeldt y Hederstedt, 1992). Sin embargo dado que este tipo de enzimas también está presente en bacterias termófilas Gram negativas, se han propuesto algunas otras explicaciones; una de ellas plantea que la mayor termoestabilidad del citocromo caa3 presenta ventajas adaptativas durante el proceso de esporulación.

Hasta el momento se desconoce el arreglo de los genes que codifican para la síntesis de ambas enzimas en el cromosoma bacteriano, así como también la relación con las etapas de inducción o regulación de la esporulación, y su organización transcripcional; sin embargo es posible que la subunidad I sea idéntica para los citocromos aa3 y caa3, y que tenga promotores distintos para la expresión durante el crecimiento vegetativo, o durante la esporulación. Esto mismo se puede plantear para la subunidad II; aunque los loci que codifican para los citocromos caa3 y aa3 se localicen en operones separados.

Este patrón de expresión diferencial de las citocromo oxidasas en *B. cereus*, en particular de la caa3, de acuerdo al estado de desarrollo de la bacteria, y en relación a la esporulación, hace que el análisis genético del mismo, sea de interés; y que el esclarecimiento de los mecanismos de regulación de la expresión genética que lo hacen posible se vuelva muy importante en el entendimiento de los procesos de diferenciación celular.

A lo largo de esta introducción, se ha hecho énfasis en la esporulación bacteriana como modelo para el estudio de la diferenciación celular a nivel bioquímico. Ello brinda el marco teórico en el que se incluye el estudio de la cadena respiratoria bacteriana, y en particular, el estudio de las citocromo oxidasas. El presente trabajo se centra en el análisis de secuencias, que en la actualidad es una herramienta muy poderosa en la búsqueda de las relaciones filogenéticas entre los organismos y, más aún, es la base de una gran variedad de análisis genéticos.

En el intento por presentar de forma clara los antecedentes de este trabajo y su marco teórico, se han omitido varios detalles que pueden servir al lector para entender mejor algunas ideas. Es por eso que a continuación se incluyen algunos apartados, en espera de agregar información útil a este trabajo.

1.1 LA ESPORULACION BACTERIANA

Hace más de un siglo que Ferdinand Cohn y Robert Koch descubrieron las oligos endosporas bacterianas. Con el paso del tiempo otros investigadores como Pasteur, Adamson y Berliner, se encargaron de ampliar el catálogo de especies bacterianas que son capaces de esporular. Hoy se conoce mucho más sobre la ultraestructura y la composición química de las esporas.

Es hasta la década de los 1950 cuando se instrumenta la microscopía electrónica y se desarrollaron los métodos para sincronizar el crecimiento de los cultivos bacterianos, que fue posible ampliar la información acerca del desarrollo de la espora, sobre todo en lo referente a la secuencia de cambios bioquímicos.

Al seguir las etapas de crecimiento de un cultivo de bacterias en sincronía se distinguen tres etapas. La fase lag, durante la cual no se observa un aumento en la población del cultivo. La fase de crecimiento exponencial, o fase logarítmica (conocida como log), donde el tamaño de la población aumenta rápidamente debido a la abundancia de nutrientes en el medio de cultivo. Una vez que los nutrientes se han agotado la tasa de crecimiento va en descenso, hasta que el crecimiento es nulo; a partir de este momento el tamaño de la población permanece constante, y se conoce como fase estacionaria (figura 3). La falta de C, N, y P inducen respuestas celulares que preparan a las células para sobrevivir a un periodo donde los nutrientes no estarán disponibles.

Una de las oligos respuestas que se dan en la fase estacionaria temprana es la formación del flagelo, lo cual capacita a la célula para la quimiotaxis. Otra respuesta es la desrepresión de genes para enzimas intracelulares, como las enzimas del ciclo del ácido tricarbóxico, y enzimas extracelulares como proteasas, amilasas, nucleasas o

fosfatasa, así como otras enzimas que se relacionan con la utilización de fuentes de carbono.

Al considerar esta curva de crecimiento se pueden definir los tiempos para cada etapa, en cada especie o cepa en particular. La posibilidad de marcar en el tiempo los fenómenos fisiológicos o los cambios morfológicos, dio como resultado la descripción detallada del proceso de esporulación en algunas especies, particularmente en *Bacillus subtilis* (Young y Mandelstam 1979).

Dado que la formación de esporas es una respuesta a los cambios del ambiente, es fácil imaginar que la escasez de nutrientes en el medio de cultivo es una forma de inducir la esporulación en el laboratorio. Las células en fase estacionaria que se someten a este "ayuno" comienzan el proceso de esporulación que se puede seguir desde el momento en que el crecimiento deja de ser exponencial, llamado t_0 , y a partir de entonces se asignan los nombres de t_1 , t_2 , t_3 etc, a los periodos de cada hora después de t_0 (Young and Maldestam 1979).

LAS ETAPAS DE LA ESPORULACION

En la célula vegetativa, en crecimiento exponencial, justo antes de comenzar la fase estacionaria se observan dos cuerpos compactos en el citoplasma que corresponden a dos o más cromosomas en duplicación, al inicio de la fase estacionaria los cromosomas se arreglan en un filamento central; un poco de tiempo después el filamento axial se divide y los cromosomas se dirigen hacia los polos del bacilo. Enseguida se forma un septo, por la invaginación de la membrana de forma semejante a lo que sucede en la división celular, que da lugar a dos paquetes asimétricos. Dicho septo sufre una invaginación anular; además, en este sitio ya se observan componentes de la pared celular. Posteriormente, la célula mayor, o célula madre envuelve a la pequeña y se origina un organismo "doble", donde una célula está dentro de otra. El espacio que forman las membranas de la célula madre y la preespora se considera extracelular para ambas, ya que las membranas están dispuestas "cara a cara". Después de eso, se forma la corteza, cuya síntesis es dirigida por el cromosoma de ambas células, a esta etapa se le conoce como fase de "preesporas grises". La corteza continúa su desarrollo mientras se depositan proteínas en la superficie de la membrana externa de la preespora, con esto se forma la parte interna de la cubierta que consiste en una estructura multilaminar. La parte externa de la cubierta se deposita sobre la interna. Conforme la cubierta se engrosa, la espora es cada vez más resistente a los agentes químicos y al calor. Una vez que se alcanza este estado de resistencia, la espora se considera madura. Finalmente la espora se libera de la célula madre. Esto representa el término de la diferenciación. (ver figura 4).

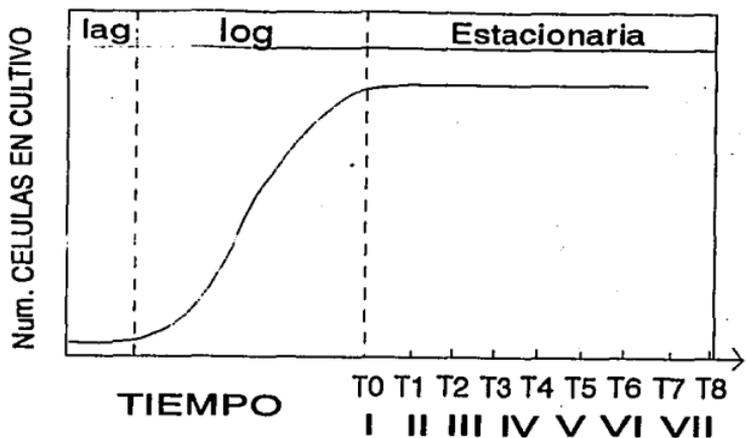


Figura 3. Gráfica de crecimiento de un cultivo de bacterias. T0 indica el inicio de la fase estacionaria, T1 a T8 son tiempos de una hora contados a partir de T0. Los números romanos indican las etapas de la esporulación.

El proceso de esporulación en *Bacillus subtilis* se divide en ocho estadios básicos: 0 que representa el momento inmediatamente anterior al t0; I que va de t0 a t1; II de t1 a t1.5; III de t1.5 a t3; IV de t3 a t4; V de t4 a t5.5; VI de t5.5 a t7 y finalmente la liberación de la endospora es el estado VII.

Los fenómenos de la esporulación son una secuencia pleiotrópica en la que la ocurrencia de un cada paso depende de otro previo. Se desconocen los efectores bioquímicos de cada estado. Existen además otros fenómenos secundarios que no forman parte de la secuencia principal.

A continuación se describen brevemente los principales eventos que se asocian con cada uno de los primeros estados:

En el estado 0, las células son morfológicamente iguales a las vegetativas, pero se distinguen varios fenotipos que se basan en la aparición de marcadores bioquímicos, tales como el incremento en los niveles de proteasas y citocromos. Además de cambios metabólicos que se relacionan con las enzimas del ciclo de Krebs, la NADH oxidasa, citocromos y menaquinonas.

El estado I se caracteriza por la formación del septo. Ahí se observa una acumulación de los precursores de las protefínas de la cubierta y la acumulación de la fosfatasa alcalina lo mismo que de la DNAsa extracelular. También ocurre una síntesis

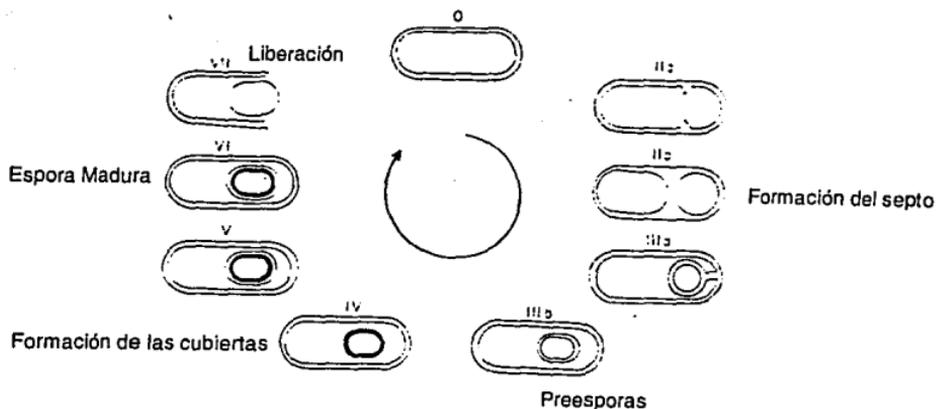


Figura 4. Diagrama de los estados de esporulación en *B. subtilis*. Se muestran desde el estado 0 que corresponde al fin de la fase logarítmica de crecimiento. (Tomado de Doi, 1989).

asimétrica de la membrana de la preespora. Generalmente, el estado I no se usa para definir un estado morfológico, por lo que estos sucesos se consideran, en ocasiones, como parte del estado 0.

Entre los estados II y III se sintetizan ocho proteínas que se requieren para la formación asimétrica del septo y para el engullimiento, y una síntesis asimétrica de los componentes de la membrana de la preespora.

Durante los estados IV a V, es evidente la síntesis y acumulación de las SASPs (Small Acid-Soluble Spore Proteins) y del 3-PGA (ácido 3-fosfoglicérico). Las SASPs son características de estos estados; forman entre el 10 y el 20% de la proteína total de la espora latente, y se degradan durante la germinación al funcionar como reservorio de aminoácidos para esta etapa. Se les atribuye una función en la resistencia del DNA a la radiación ultravioleta.

Los demás estados se conocen poco y en ellos los marcadores bioquímicos están menos caracterizados, aunque en general se observa la producción de la deshidrogenasa de glucosa, la presencia de una catalasa termoresistente, y el almacenamiento de proteínas de diversa índole (Young y Mandelstam 1979).

INDUCCION DE LA ESPORULACION

Parece razonable suponer que la esporulación es una respuesta a la privación periódica de nutrientes que ocurre en muchos ecosistemas; de este modo, la permanencia en el medio depende de la posibilidad de alcanzar un estado de latencia o letargo. Por otro lado, es importante que la esporulación se induzca en el momento adecuado, es decir cuando la concentración de nutrientes en el medio de crecimiento disminuya hasta un nivel crítico, aunque durante el crecimiento exponencial exista una pequeña proporción de células que esporulan. Entonces la inducción de la esporulación debe estar controlada por inductores específicos, que seguramente actúan a nivel genético; no se conoce aún nada acerca de las moléculas que controlan los operones para la iniciación, sin embargo existen varias propuestas.

Una de las hipótesis consiste en pensar que la esporulación es una función represible, y que las altas concentraciones de algunos metabolitos que contienen C y N son los represores (Doi, 1989). Algunos otros han propuesto que la glutamina es el catabolito represor, puesto que varios mutantes que no presentan glutamina sintetasa no son capaces de esporular.

Desde varios enfoques experimentales se demostró que el inicio de la esporulación se afecta por el ambiente nutricional donde se encuentra la célula. Otros factores son: el estado de replicación del DNA, el nivel de GTP en la célula, la función de las diferentes holoenzimas de la RNA polimerasa y otros (Doi 1989). La iniciación

de la esporulación, así como otras respuestas a la privación de nutrientes, se controlan por la acción directa o indirecta de los genes de *spo0* con la maquinaria de transcripción que incluye a la holoenzima principal de la RNA polimerasa ($E\sigma^{43}$). Se postula que cuando los nutrientes decaen, los productos de los genes *spo0* responden al interactuar con las holoenzimas de la RNA polimerasa y disparan la expresión de genes que tienen que ver con el metabolismo, activan funciones de la membrana tales como la motilidad (formación del flagelo), sintetizan las enzimas extracelulares (hidrolíticas) y encienden otros genes de esporulación. El GTP, o sus derivados, interactúan con los productos de *spo0*, con la polimerasa y con otras proteínas regulatorias al actuar como cofactor en la represión o en la desrepresión genética (Doi 1989).

Con anterioridad se habían propuesto a los nucleótidos altamente fosforilados (HPN) por ejemplo pppAppp, como posibles inductores (Doi 1977). Dado que los HPN solo se sintetizan durante la esporulación. Además, algunos mutantes para el HPN IV no pueden esporular y los revertantes recuperan la capacidad de esporulación; sin embargo, actualmente se considera que el principal de ellos, el ppGpp, ejerce influencia, solo por tratarse de un derivado del GTP. También se ha observado que el ayuno de purinas estimula la esporulación, aunque lo mismo sucede con las pirimidinas. Finalmente, aún no es posible saber si el control de la esporulación es positivo o negativo, y ninguno de los catabolitos propuestos con anterioridad se ha confirmado como el importante, puesto que la fluctuación en la concentración de un intermediario puede alterar la concentración de los productos de más de una vía metabólica a la vez. Tal es el caso de la concentración o aporte de glutamina, que al ser un donador del grupo amino (NH_3) puede afectar la concentración de otros aminoácidos, purinas y pirimidinas (Chambliss, 1979).

Las células son sensibles al estímulo de esporulación solo en un estado específico del ciclo de vida, algunos experimentos sugieren que la esporulación se expresa no en la célula que ha sido inducida sino hasta la siguiente generación. Quizá el periodo crítico para la esporulación está determinado por el estado de duplicación del cromosoma, pues se requiere síntesis de DNA para que ésta sea posible (Young y Mandelstam, 1979).

CONTROL GENETICO DE LA ESPORULACION

Al igual que cualquier proceso de diferenciación, la esporulación bacteriana requiere un enorme número de cambios en los patrones de expresión génica que tienen que ver con los aparatos de transcripción y de traducción de la célula. Durante los estados tempranos de esporulación se activan más de 20 loci diferentes, varios

de los cuales ya se hallan ubicados en los mapas del cromosoma bacteriano. Son varios los modelos que se han propuesto para los procesos de regulación durante el estado esporulante, uno de ellos propone que la regulación se da al nivel de la RNA polimerasa, por un reconocimiento diferencial de los promotores en ambos estados. La expresión diferencial de los genes de esporulación, se controla por un mecanismo complejo de transcripción que consiste en un arreglo de factores σ de la RNA polimerasa (Doi, 1982). Cada uno permite el reconocimiento temporal de diferentes conjuntos de promotores, y la actividad de otros factores reguladores de la transcripción que no han sido caracterizados hasta la fecha. En la actualidad ya está bien documentada la presencia de diferentes holoenzimas de la RNA polimerasa, que se distinguen por el tipo de factor σ que presentan, se denotan como $E\sigma^A$, $E\sigma^B$, etc (el superíndice indica el tipo de factor sigma asociado). Cada tipo de enzima actúa sobre un tipo de promotor específico.

$E\sigma^A$ comprende entre el 90% y el 95% de la RNA polimerasa presente en las células vegetativas, aunque también se llega a encontrar durante la esporulación, aún en el estado T5, donde regula la expresión del gen para la subtilisina. También durante la fase vegetativa se encuentra que $E\sigma^B$ y $E\sigma^D$ controlan la expresión de genes para la quimiotaxis, la síntesis del flagelo, y la respuesta de choque térmico. Durante el mismo estado $E\sigma^E$, $E\sigma^C$, $E\sigma^B$ y $E\sigma^F$ actúan sobre promotores cuya regulación es temporal. Algunos de los factores σ son los productos génicos de los *spo*. Hay una interacción entre los productos de los genes *spoQ* y algunas subunidades σ de la RNA polimerasa, donde se ha observado una represión catabólica. Entre las evidencias experimentales que apoyan esta hipótesis se incluyen: la observación de que bacteriófagos no se pueden duplicar en las esporas y no lisan a la célula, tan solo pueden hacerlo después de que el desarrollo de la espora ha terminado. Aunque la baja disponibilidad de nutrientes puede ser la responsable, se sugiere que la RNA polimerasa no transcribe el DNA del fago porque no lo reconoce. Lo anterior se atribuye a una baja cantidad del factor σ de la enzima durante la esporulación, lo que explica que el fago Φ , si se pueda transcribir in vitro por la RNA polimerasa de la espora. Recientemente se observó la presencia de polipéptidos que se unen a la RNA polimerasa y que probablemente se producen durante el estado 0, lo cual se ha correlaciona con otra propuesta que sostiene que el ambiente interno cambia durante la esporulación, lo que progresivamente vuelve menos activa a la polimerasa. Un ejemplo es la síntesis de contrantibióticos, como el que da resistencia a rifampicina, y que afectan a la subunidad β de la RNA polimerasa (Revisado en Doi, 1989)

Las hipótesis anteriores no descartan la posibilidad de que la regulación se de a otros niveles, por ejemplo, mediante diferencias en la estabilidad del RNAm, por

diferencias en la eficiencia del ribosoma o por alteraciones en el RNAt y en las RNAt sintetasas.

El entendimiento que se tiene actualmente sobre la regulación es escaso y se basa en el único ejemplo bien estudiado de inducción que es el operón lac. No es sorprendente que para el caso de la formación de la espora sean pocos los avances que se tienen respecto a este fenómeno. Se han podido elaborar mapas genéticos de algunas mutaciones que afectan la esporulación, y se han designado de acuerdo con la etapa en la que se observa el efecto. De este modo, una mutación en el gen spQA afecta el inicio de la etapa 0 de la esporulación, y spQB afecta el siguiente suceso en la misma etapa. Se supone que en estos genes la activación, la transcripción, la traducción y la función de su producto, no están muy desacoplados, por lo que se considera cada loci como un operón; aunque esto presenta algunos problemas de interpretación, facilita en cierto modo su organización.

No hay un número de loci bien determinado aunque se estiman 37 o 42 pensando en los que son menos susceptibles de mutación. De ellos 9 se han identificado en el estado 0, y 7 en el estado II.

Recientemente se describieron muchos productos proteicos de los genes de esporulación, spo, así como algunos de la germinación, ger. Originalmente se identificaron como mutantes para etapas determinadas de la esporulación. La mayoría de ellos se han aislado, clonado y caracterizado, llegando incluso hasta la definición del papel que juegan en el proceso (Doi, 1989). No es el propósito de este apartado el revisar cada uno de ellos, por lo que solo se hará mención de los siguientes: spo0 del A al H y K, spoII A al C, spoIII A, B y E, spoIV C, spoV A, B y G, spoVI A y B, ger A, ger D, ger E, ger J, y ger M.

LATENCIA Y GERMINACION

La endospora madura ahora es capaz de resistir condiciones ambientales adversas. Durante este periodo la espora es termorresistente y presenta las tasas respiratorias más bajas conocidas. Se ha observado que las enzimas del ciclo del ácido tricarbóxico están ausentes, y que el nivel de nucleótidos trifosforados y de azúcares fosforilados es bajo. Las reservas de energía constan esencialmente de fosfoglicerato y de proteínas básicas, la acetil CoA está unida covalentemente a proteínas por medio de puentes disulfuro (Parish 1979).

El estado de bajo metabolismo y la resistencia de la espora se adquieren resultado de la síntesis de una serie de integumentos que rodean al protoplasto y traen consigo la inactivación de las macromoléculas, además de unos cuantos compuestos de bajo peso molecular y de algunas proteínas especiales que contribuyen a la estabilidad del estado de latencia y a las propiedades de resistencia.

La participación de las cubiertas en el mantenimiento de la resistencia es de suma importancia. Vistas de afuera hacia adentro se distingue primero al exosporidio, que es una estructura membranosa resistente a proteasas pero que no participa activamente en las propiedades de resistencia, aunque puede ayudar a concentrar las proteínas de la cubierta para asegurar la polimerización de éstas en la preespora. Después se encuentran las cubiertas que ocupan alrededor del 50% del volumen de la espora, del 30 al 60% del peso seco y que contienen el 80% del total de la proteína de la espora. Entre la cubierta y la pared celular se ubica la corteza, compuesta casi totalmente de peptidoglicanos especiales (figura 5).

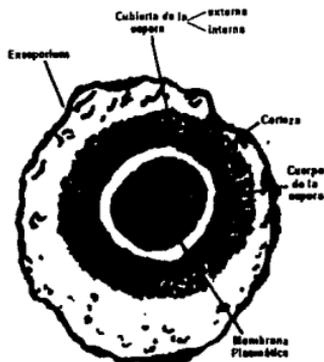


Figura 5. Esquema de una espora de *B cereus* (Redibujado de Setlow, 1983).

Esta etapa de bajo metabolismo, o latencia, permanece mientras la espora no germina. Durante este tiempo la espora se encuentra en un estado de letargo, en donde la espora es inerte a sustratos exógenos que causan la germinación de la misma cuando está acívada. La activación es el resultado de un tratamiento de las esporas que por sí mismo no provoca la germinación pero que conlleva a una germinación más rápida, o más completa, y que en ocasiones es reversible.

Cuando las esporas activadas se exponen a ciertos compuestos, inician el proceso de germinación, que se compone de una serie de eventos degradativos irreversibles. Entre los compuestos que inducen la germinación se puede citar a la

L-alanina, y a varios ribósidos como la adenosina, aunque esto también se puede lograr con otros agentes que provocan la despolimerización de las estructuras de resistencia. Una vez que se ha perdido el estado de latencia, se liberan de la espora el ácido dipicolínico, el calcio y el ácido sulfoláctico, se degrada la corteza y las cubiertas se desechan, tan solo se conserva la pared celular.

Es posible que la termorresistencia sea una consecuencia de los cambios evolutivos que resultaron en la deshidratación, y que permiten reducir el metabolismo y alcanzar la latencia; Gould y Dring (citados en Parish, 1979) proponen que la expansión de los peptidoglicanos que se acumulan en la corteza, debida a la repulsión del ácido diaminopimélico, DPA, se suma a la acumulación de compuestos de bajo peso molecular como el ácido dipicolínico, glutamato y otros iones; dando lugar a un potencial osmótico que favorece la deshidratación del protoplasma. El DPA es un componente muy abundante en la corteza.

Todo esto hace que las esporas de bacterias sean comunes en suelos, ambientes marinos y dulceacuícolas, en el aire, en climas templados, desérticos y polares. Muchas se incluyen entre los patógenos oportunistas u obligados, y en la flora natural de, animales e insectos (Priest, 1989).

LA RESPIRACION EN LAS ESPORAS

En parrafos anteriores se hizo mención a los cambios que se producen en las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos durante la esporulación, también se mencionó que en la esporogénesis suceden cambios en la composición de las enzimas de la cadena respiratoria (Escamilla et al, 1985). Durante este proceso la capacidad de las bacterias para oxidar ciertos sustratos como el acetato, además se observa una disminución en la producción de CO₂ como producto de la respiración, y esto sugiere una disminución en la tasa respiratoria durante los últimos estados (Hanson et al, 1962) lo cual afecta la síntesis de las enzimas de la cadena respiratoria. Por otra parte, durante la germinación se recupera el metabolismo, en consecuencia se debe reactivar la síntesis de estas enzimas.

Como se ha visto, el entendimiento de los mecanismos de regulación de la expresión genética durante la esporulación es un tópico de interés. Son muchos los genes que participan en este proceso, por lo cual se debe centrar la atención en aquellos que dispongan de mayor cantidad de información acumulada, que tengan que ver directamente con el fenómeno y que sean de importancia central para el desarrollo de la célula, como es el caso de los genes que codifican para las enzimas de la cadena respiratoria, particularmente para las citocromo oxidasas bacterianas.

1.2 LOS CITOCROMOS Y LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

Los citocromos se descubrieron en tejidos animales hace más de cien años por Charles MacMunn. Aunque fue Keilin, cuarenta años después, quien demostró su presencia en animales, levaduras y bacterias. Desde entonces han sido objeto de estudio de numerosos investigadores interesados en los mecanismos de conservación y transducción de energía en la célula.

El intercambio de electrones entre las enzimas de la cadena respiratoria se logra mediante reacciones redox catalizadas por enzimas. Dichas enzimas, o citocromos, presentan grupos prostéticos metálicos capaces de modificar su estado de oxidación en función de cuantos electrones presenten en su centro metálico (Stryer 1988). Los citocromos son hemoproteínas que juegan un papel muy importante en los procesos de respiración y fotosíntesis gracias a su capacidad de presentarse en las formas ferro, (reducida) Fe^{2+} y ferri (oxidada) Fe^{3+} . Esta propiedad hace posible su participación en reacciones de oxidación-reducción.

Las hemoproteínas, citocromos y hemoglobinas, al igual que las clorofilas, conforman un grupo amplio de proteínas que presentan derivados de porfirina como grupos prostéticos. Las diferencias entre las porfirinas de cada tipo de proteína se basa, en principio, en el catión quelado que se halla en el centro del anillo de cuatro pirroles que forma a la porfirina, y en segundo término, por el tipo de sustituyentes laterales. Las hemoproteínas contienen al anillo protoporfirina con un átomo único de hierro que oscila entre el estado reducido, Fe^{2+} , y el estado oxidado, Fe^{3+} . Este está generalmente en la configuración de bajo spin formando así, un complejo de coordinación octaédrico que tiene la capacidad de unir seis ligandos. Cuatro de los seis sitios de coordinación, los ecuatoriales, están ocupados por los nitrógenos de los anillos de pirrol, mientras que el quinto y el sexto sitios están ocupados por los átomos de nitrógeno y/o azufre, de las cadenas laterales de los residuos de histidina o metionina de la proteína. (Lehninger, 1982; Jones y Poole, 1985) (figura 2).

El arreglo de los citocromos a lo largo de la membrana permite una secuencia de reacciones redox entre ellos. Durante ésta los equivalentes reductores en forma de átomos de hidrógeno, o electrones, se transfieren de un donador hacia un aceptor con mayor potencial redox. Simultáneamente se translocan H^+ a través de la membrana. Este movimiento vectorial de H^+ conserva la energía, libre que se libera por las reacciones de oxidación-reducción, como un potencial de membrana o potencial electroquímico (Mitchell, 1966).

METODOS DE ESTUDIO DE LOS CITOCROMOS

Para poder identificar los diferentes tipos de citocromos es necesario basarse en sus propiedades espectroscópicas. Como ya se mencionó, los sustituyentes que están presentes en el grupo hemo, modifican el espectro de absorción de cada citocromo en particular. De la misma forma, el estado de oxidación del centro metálico, así como la cinética de reacción de estos citocromos, se pueden estudiar con base en dichas propiedades. Se han desarrollado diversos métodos espectroscópicos en busca de mayores facilidades en el estudio de las propiedades de los citocromos, entre ellas, las principales son: la de haz partido, la espectrofotometría de doble rayo, la de rayo múltiple, y la de haz sencillo (Jones y Poole, 1985).

El análisis de la diferencia de los espectros reducido menos oxidado (espectro diferencial) de las muestras a estudiar se utiliza ampliamente para identificar los tipos de citocromos que están presentes en ellas. Las muestras pueden ser células enteras o fracciones, así como preparaciones puras o semipuras de los citocromos. La manera en que se obtienen este tipo de espectros, es al reducir la muestra al agregar con algún agente reductor como la ditionita de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). La muestra de referencia u oxidada se obtiene al usar un oxidante exógeno, o mediante la aereación vigorosa de la misma. En este método se construye una línea base que toma como referencia la muestra oxidada comparada con ella misma, que se tiene como registro para la comparación posterior de ésta con el espectro reducido, así se logra un espectro diferencial de ambas. En el espectro diferencial que se obtiene se observan máximos de absorción que indican el tipo de citocromos presentes en la muestra. Para esto se cuenta con información sobre las características espectrales de los citocromos de muchas bacterias que han sido reportados en otros trabajos.

La capacidad que tienen ciertos citocromos para unirse a ligandos de bajo peso molecular, como el monóxido de carbono CO o el cianuro (CN), es una herramienta muy útil para el estudio de sus características funcionales. El CO se une a la forma reducida de las citocromo oxidasas y algunos otros citocromos, al actuar como un inhibidor competitivo con respecto al O_2 . Generalmente se forma un compuesto con una absorción máxima característica. Los complejos de CO de varias citocromo oxidasas bacterianas son fotodisociables, y con unas cuantas excepciones, la tasa de reasociación con el CO es relativamente lenta. Se realizan experimentos con cianuro, azida, oxianiones de nitrógeno, isonitrilos, etc (Jones y Poole, 1985).

El estudio de los citocromos en bacterias se ha realizado, en su mayoría, tomando como modelo al género *Bacillus*, en especial *B subtilis* que es un organismo estrictamente aeróbico y con capacidad de esporular (Wachenfeldt y Hederstedt, 1992). Actualmente se conocen con cierto detalle, varias de las características estructurales de

las moléculas de los citocromos de esta especie, de los cuales a continuación se mencionan algunos detalles.

CITOCROMOS DEL TIPO C.

Se tiene poca información sobre los citocromos del tipo c de las bacterias Gram positivas, actualmente solo se conocen cuatro estructuras primarias completas: el citocromo c-550 de *B subtilis*, el c-551 de PS3 y la subunidad II de las citocromo oxidasas caa3 de *B subtilis* y PS3. Todos los citocromos que se han encontrado en *B subtilis* se definen como proteínas integrales de membrana. Por los pesos moleculares de cada uno de estos citocromos, se identifican a los polipéptidos con: el c-550, la subunidad II de la citocromo oxidasa (van der Oost et al, 1991) y c-554 que forman parte del complejo bc₁ (De Vrij y Konings, 1987); para los dos restantes no se ha establecido relación alguna.

CITOCROMO OXIDASAS

Las citocromo oxidasas son las enzimas que se encuentran en la parte final de la cadena respiratoria, su función consiste en transferir electrones desde el citocromo c, o desde el complejo quinona-citocromo b, hacia el oxígeno molecular con la consecuente formación de agua.

La mayoría de las cadenas respiratorias bacterianas terminan con más de una citocromo oxidasa, solo unas cuantas son cadenas lineales que terminan en una oxidasa única. Estas enzimas toman su nombre de acuerdo al tipo de hemo que presentan. Hay varios tipos, entre ellos están: las del tipo aa3 que son las más comunes, las o, las d y las a₁. Estas enzimas son regulables de acuerdo a la fuente de carbono, la tensión de oxígeno y el estado de desarrollo de la bacteria.

Bacillus subtilis puede sintetizar dos oxidasas terminales que contienen hemo a: la aa3 y la caa3, la última es una citocromo c oxidasa, mientras que para la oligoa hay controversia acerca de su función específica, pues se ha encontrado que puede utilizar como sustrato al quinol y al citocromo c (van der Oost et al, 1991 y Laureaus et al, 1991). Ambas enzimas se codifican en locus separados, y recientemente se bautizaron como locus Cta del que se han identificado los genes A,B,C,D y F, cada uno correspondiente a una subunidad en particular; y el locus cox (quinol oxidasa), del que se conocen cuatro genes correspondientes también a las subunidades respectivas, estos son: A,B,C y D.

En *B subtilis* se conoce el arreglo genético de la citocromo oxidasa caa3. También se conocen las características de las subunidades que la componen, entre éstas, la subunidad II (COII/CtaC) es la que resulta de mayor interés, dado que presenta un dominio con un hemo C en el extremo carboxilo terminal. El dominio para

el hemo *c* puede considerarse como una extensión del polipeptido que se encuentra comúnmente en COII en las citocromo oxidasas del tipo *aa3* de las bacterias aeróbicas y en mitocondrias. Este dominio de la proteína, muestra similitud en la secuencia con otros citocromos *c* mitocondriales (Wachenfelt y Hederstedt, 1992).

La citocromo oxidasa *o* se ha encontrado en muchas especies de bacterias. El número de subunidades de que están compuestas, así como su peso molecular, varían de acuerdo con la especie a la que pertenezcan. La subunidad I se une a una molécula de hemo *b*, en otras especies se une además a un hemo *c*. Esta enzima es muy sensible al cianuro.

La citocromo oxidasa *d* es casi completamente insensible a la inhibición por cianuro, lo que hace que algunos organismos la sintetizen cuando están creciendo en un medio que contiene este radical, o bajo condiciones que promueven la formación del mismo. La citocromo oxidasa *d* presenta una alta afinidad por el oxígeno, mayor que otras citocromo oxidasas; esta propiedad conlleva a un aumento en su síntesis durante el crecimiento en condiciones limitantes de oxígeno. También se le encuentra en varias especies de bacterias anaeróbicas que incluyen a varias bacterias fermentativas, donde su papel puede ser el de trampa de oxígeno. Esta citocromo oxidasa se une a dos moléculas de hemo *d* y a dos de hemo *b*, pero no presenta cobre (Jones y Poole, 1985) .

La citocromo oxidasa *a1* es poco conocida en comparación con otras citocromo oxidasas. Se encuentra unida firmemente a la membrana y contiene dos moléculas de hemo *a* con diferentes valores de potencial redox, pero no presenta cobre. Su función aun no está completamente clara.

1.3 RELACIONES FILOGENETICAS

Ya se mencionó con anterioridad la relación estrecha que existe entre las subunidades de las citocromo oxidasas bacterianas y las tres subunidades principales de la mitocondria. De acuerdo con la teoría de la endosimbiosis propuesta por Lynn Margulis, tres de las clases de orgánulos de eucariotes (mitocondrias, plástidos y undulipodia) se originaron a partir de bacterias de vida libre (respiradores aeróbicos, bacterias fototróficas oxigénicas y espiroquetas, respectivamente) en asociación con microbios que se convirtieron en el nucleocitoplasma (arqueobacterias hospederas como *Thermoplasma*) (Margulis y Bermudes 1985).

El estudio de las formas de utilización de la energía en las bacterias ha sido de gran utilidad en la búsqueda del posible ancestro de los orgánulos que se encargan de esta función en las células eucarióticas. Lo que ha llevado a enfatizar en el análisis

comparativo de las vías metabólicas de varios grupos de bacterias. Con este enfoque se ha concluido que las mitocondrias provienen de la subdivisión α de las bacterias púrpura fotosintéticas al que pertenecen *Paracoccus*, *Rhodobacter* y *Rhodospseudomonas*. *Paracoccus* probablemente evolucionó de un ancestro parecido al actual *Rhodobacter sphaeroides* por pérdida de la fotosíntesis. Con base en la secuencia del citocromo c se estableció que la mitocondria proviene de un ancestro en el mismo subgrupo α ; de esta forma *Paracoccus* y la mitocondria se consideran como condescendientes (Jhon, 1987).

A pesar de la simplicidad estructural de la citocromo oxidasa de *Paracoccus*, por su función se relaciona con la enzima mitocondrial, tanto en sus propiedades oxidativas como en la translocación de protones. En la mitocondria hay un mayor número de subunidades que en *Paracoccus*, sin embargo, fuera de las tres subunidades principales todos los demás polipéptidos se codifican en el núcleo y su función, aunque importante en el ensamblaje de la enzima, no tiene un papel relevante en las propiedades catalíticas de ésta.

Todas las oxidasas transductoras de energía parecen haber evolucionado de una proteína precursora común. Actualmente se encuentra una gran variedad de oxidasas en las bacterias, muchas de ellas difieren en su donador de electrones, (Kadenbach et al. 1991).

Como se ha visto, las citocromo oxidasas son enzimas que participan de manera muy importante en el metabolismo celular, pero además son importantes en el análisis taxonómico y filogenético de las bacterias y muchos otros grupos. Es de resaltar que los avances en el análisis de secuencias ha sido de gran utilidad en el establecimiento de las relaciones "filogenéticas" de las proteínas, y en este caso en particular de las citocromo oxidasas; así como en los estudios estructurales y bioquímicos de las mismas (Macfarlane et al, 1990).

1.4 EL ANALISIS GENETICO

ANALISIS DE SECUENCIAS

La historia del análisis de las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas, es relativamente reciente. Se inicia en 1951 cuando Sanger obtiene la secuencia completa de la cadena β de la insulina de bovino a través de la combinación de digestiones proteolíticas limitadas. Para ese tiempo se comienza a incrementar la cantidad de reportes de secuencias de proteína que son resultan de la aplicación de técnicas químicas elaboradas. Holley y sus colaboradores en 1965, más de una década después

de la proposición del modelo de la doble hélice del DNA por Watson y Crick, lograron obtener la secuencia completa de nucleótidos del RNA de transferencia para alanina en la levadura (revisado en Erlich, 1992). A partir de entonces se comienza a buscar la forma de optimizar la secuenciación de fragmentos del DNA. En 1977 se publican los dos métodos de secuenciación de ácidos nucleicos más empleados hasta la fecha, se trata de los métodos de: Maxam y Gilbert y de Sanger y colaboradores (Maxam y Gilbert, 1977; Sanger et al, 1977).

El almacenamiento de la información sobre secuencias se inició en un formato tradicional, un libro: el Atlas de Secuencias y Estructuras de Proteínas que publicó por Dayhoff en 1972. La información contenida en este Atlas creció cuando se incluyeron los datos de las secuencias de nucleótidos, más fáciles de obtener. Este crecimiento hizo necesario el empleo de bancos de datos computarizados para el mejor manejo de la información creciente. En la década de 1980 surgen los bancos de secuencias más importantes como la del EMBL (European Molecular Biology Laboratory) en Alemania, o el GenBank y el NCBI (National Center for Biotechnology Information) en los Estados Unidos. Desde su creación, la información contenida en estos bancos, se ha multiplicado varias veces. Para 1985 Burks y sus colaboradores estimaron que el número de bases secuenciadas por año es de alrededor de dos millones. En Abril de 1986, la base de datos del EMBL contaba con más de 6.3 millones de pares de bases y un tiempo de duplicación de dos años (Heijne, 1987).

Las potencialidades del uso de las computadoras en el análisis de secuencias es hoy en día muy grande. Una vez que se conoce la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos de una molécula, podemos hacer uso de los diversos programas de computadora que existen para realizar inferencias teóricas acerca de ésta. Tales análisis van desde el cálculo aritmético del peso molecular, hasta predicciones de la estructura secundaria de la proteína. Los resultados que se obtienen por medios electrónicos son solamente teóricos, aunque es preciso señalar que los programas se basan en datos experimentales sólidos. A pesar de que ningún algoritmo que se utiliza para hacer predicciones como esta tiene una precisión del cien por ciento, los resultados son de suma utilidad para el diseño de experimentos; además la capacidad predictiva de los programas ha ido en aumento constante.

Algunas de las predicciones que se pueden hacer con una secuencia de nucleótidos al usar programas de computadora son: detección de secuencias de inicio y de término de la transcripción tanto para eucariotes como para procariotes, detección de los sitios de unión al ribosoma, detección de los marcos de lectura y de las regiones codificantes, traducción a aminoácidos, posibles estructuras secundarias (en RNA principalmente), mapas de restricción con diferentes enzimas, geometría del DNA,

punto de fusión (T_m) y, quizá lo más importante la comparación con otras secuencias (Heijne, 1987). La comparación entre las secuencias, trátese de aminoácidos o de nucleótidos, tiene una enorme importancia en la construcción de filogenias y en el diseño de oligonucleótidos para estudios posteriores.

En el caso de una secuencia de aminoácidos, es posible realizar una serie de análisis de gran interés, en especial en la predicción de la estructura secundaria de la proteína, lo cual siempre brinda un apoyo teórico para hacer inferencias acerca de su función. Dada una secuencia de aminoácidos, la computadora puede predecir su posible estructura secundaria; por ejemplo se pueden inferir las regiones del polipéptido que están en forma de α -hélice, de lámina β -plegada o regiones de giro. El método de Garnier-Robinson es de los que más se utilizan en la predicción de estructuras secundarias; se basa en las propiedades estadísticas de las estructuras conocidas, y en el supuesto de que el estado conformacional de un residuo dado, se determina no solo por sí mismo, sino por los residuos que lo acompañan. Y no solo eso, sino que es posible predecir estructuras supersecundarias como dominios α o $\beta\beta$.

También es posible predecir la naturaleza polar o apolar de las proteínas. Se sabe que en solución acuosa, las moléculas apolares o parte de ellas, tienden a agregarse de tal forma que el área apolar expuesta al agua sea la mínima posible. La naturaleza de este fenómeno es compleja, sin embargo, en la literatura existen escalas de hidrofobicidad que se basan en reportes de estructuras conocidas, las cuales se usan para facilitar la predicción del arreglo tridimensional del polipéptido. Las regiones que están expuestas hacia la superficie de una proteína plegada son seguramente ricas en residuos polares y residuos cargados. Tales regiones hidrofílicas pueden identificarse fácilmente en las gráficas de hidrofobicidad; los métodos propuestos para estos fines difieren solo en la escala de hidrofobicidad que se elige para el análisis.

Las regiones más expuestas en la superficie de una proteína, comúnmente son las más antigénicas, es decir, son las que tienen mayor predisposición al reconocimiento por un anticuerpo. Estas regiones se pueden utilizar para fabricar péptidos sintéticos que se utilicen para producir anticuerpos contra la proteína de la cual se conoce la secuencia, aún sin conocer su estructura. A los anticuerpos que se obtienen así se les puede dar una amplia variedad de usos.

Otro uso que se le puede dar a la computadora cuando se tiene una secuencia de proteína, es la detección de señales de secreción, como son péptidos de tránsito hacia mitocondrias y cloroplastos, o péptidos líder. Estos análisis se basan en hallazgos experimentales sobre algunas estructuras tridimensionales específicas que incluyen residuos hidrofóbicos y apolares en el extremo NH_2 de la cadena.

Con la información que se obtiene con otros análisis se puede, incluso, predecir

la clase de proteína con la que se está trabajando, en el caso de que esto se desconosca. Esto se logra al buscar similitudes en cuanto a la composición de residuos, regiones específicas, tamaño de la molécula, etc; con otras secuencias de proteínas de función conocida dentro de los bancos de secuencias. Finalmente, es posible predecir modificaciones covalentes de las proteínas, como sitios de glucosilación, remoción de metioninas o acetilación, además de que se puede calcular el tiempo de vida media de la proteína.

TECNICAS EXPERIMENTALES PARA EL ANALISIS GENETICO

El desarrollo de los métodos de análisis de secuencias fue posible gracias al desarrollo previo de todo un conjunto de técnicas bioquímicas y citológicas, que sirvieron de apoyo experimental a los nuevos procedimientos químicos o de computación. Este conjunto de técnicas sigue siendo el apoyo indiscutible para el análisis genético. A continuación se describe, brevemente, la utilidad de algunas de las técnicas a las que se hace mención.

El uso de radioisótopos contribuyó enormemente al modelo que tenemos actualmente de los procesos celulares. Se basa en las propiedades de emisión radioactiva de algún isótopo que se utiliza para sintetizar una molécula sin que se alteren las propiedades químicas de esta última. El marcaje radioactivo se usa principalmente para ensayos de cuantificación, al utilizar aparatos que se conocen como "contadores" que miden la cantidad de radioactividad de una muestra. Además se usan para revelar la distribución y/o localización del material marcado dentro de una célula o un gel de electroforesis, para ello la muestra se expone a un emulsión fotográfica que es sensible a la radiación.

La determinación del tamaño de las moléculas de DNA tiene una importancia central en los análisis genéticos. El método que más se utiliza para determinar el tamaño de una molécula de DNA es la electroforesis en gel. La electroforesis se basa en el hecho de que las moléculas disueltas, en una matriz porosa en un campo eléctrico, se mueven a una velocidad que está determinada por su forma, su tamaño y su carga. Los ácidos nucleicos en solución tienen una carga negativa porque sus grupos fosfato están ionizados, de esta manera, migran hacia el polo positivo del campo eléctrico al que se someten. El gel actúa como soporte y resistencia para la migración de las moléculas. Por lo general se utilizan geles de agarosa o acrilamida.

Las técnicas de hibridización molecular de los ácidos nucleicos se usan con mucha frecuencia para conocer la localización y/o concentración de una secuencia de interés. Se basan en la posibilidad de separar las cadenas complementarias de un fragmento de DNA, a lo que se le llama desnaturalización. La desnaturalización se

consigue al elevar la temperatura o aumentat el pH. Por el contrario, si hacemos descender la temperatura o el pH, las hebras de DNA se reasocian. Ahora bien, si las hebras no se reasocian entre si, sino que se asocian con una cadena ajena, entonces se forma un híbrido; a la formación de moléculas híbridas se le llama hibridación. Esta depende de el grado de complementariedad entre el fragmento de secuencia que se conoce como sonda, y el fragmento blanco. Para visualizar la formación de los híbridos por lo general las sondas se marcan con radioactividad o con algún otro agente químico como la biotina. Este principio básico se ha diversificado en varios métodos de hibridización que incluye la hibridación *in situ*, o la hibridización sobre un filtro con ácidos nucleicos inmovilizados. La hibridización se puede utilizar como medida cualitativa del grado de similitud entre dos secuencias

Con el descubrimiento de las endonucleasas de restricción, que son enzimas que cortan el DNA en sitios específicos, fue posible obtener análisis parciales de secuencia. La mezcla de fragmentos que resultan de la digestión del DNA con alguna o varias de estas enzimas, se separar por electroforesis en gel, y esto aporta información rápida para la construcción de mapas. Los mapas de restricción son de gran utilidad en los análisis genéticos, en bacterias principalmente. El avance en el conocimiento de estas enzimas, junto con los avances en las técnicas electroforéticas y de marcaje radioactivo han dado lugar a técnicas compuestas como el "Southern blot" o los "Restriction fragment length polymorphisms" (RFLP). La oligoa consiste en hibridar un oligonucleótido marcado radiactivamente con el patrón electroforético resultado de la digestión del DNA con una o varias enzimas de restricción.

Una clona genómica es una célula hospedera selecta (casi siempre se trata de una bacteria), en la cual se halla un vector que contiene un fragmento de DNA de origen diferente. Los vectores se construyen mediante la inserción de una secuencia dada dentro de un plásmido o en una molécula de DNA viral. De esta manera se puede obtener un número elevado de copias del fragmento de DNA que se requiera. Sin duda, la clonación es el fundamento de todo el edificio que constituye la tecnología del DNA recombinante, que se apoya además en los métodos de separación, comparación, identificación y cuantificación de las moléculas de ácidos nucleicos (Darnell et al, 1990).

Quizá la tecnología de mayor impacto y auge reciente es el PCR ("Polimerase Chain Reaction") o reacción en cadena de la polimerasa. Es un método enzimático para la amplificación de segmentos específicos de secuencias de DNA. Para la amplificación se usa un par de oligonucleótidos, que hibridizan con cadenas opuestas, y que flanquean la región del DNA que se desea amplificar (DNA blanco). Consiste en una serie de ciclos repetitivos de los siguientes pasos: desnaturalización del DNA

blanco a una temperatura cercana a los 94 °C, alineamiento o hibridación de los oligos a una temperatura menor -la temperatura depende de la especificidad y punto de fusión de los oligos, y por lo general es alrededor de 55°C-; y extensión de los oligos ya alineados al usar la DNA polimerasa. Debido a que los productos de la extensión del oligo, que se sintetizaron en un ciclo, pueden servir como molde en el próximo ciclo; el número de copias del DNA blanco casi se duplica en cada ciclo. Así, un PCR de 20 ciclos que parte de una sola copia de la secuencia blanco, da una amplificación de aproximadamente un millón de veces (20^{20}) (Erlich, 1992).

Los componentes de una mezcla de reacción para el PCR son: DNA polimerasa, desoxirribonucleótidos de trifosfato (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), la secuencia blanco (que no necesita purificarse), los oligos, y un amortiguador con la cantidad adecuada de Mg^{++} . Por lo general la reacción se lleva a cabo en un volumen final de 50 μ l con 30 ciclos de amplificación. A pesar de la facilidad con que se puede hacer la mezcla de PCR, generalmente se tienen que optimizar las condiciones para lograr una buena amplificación. La parte más importante es el diseño de los primers, se busca que hibriden lo más específicamente posible con nuestra secuencia blanco; además, se recomienda que no sean complementarios uno con otro, que no formen estructuras secundarias estables y de preferencia con una distribución aleatoria de las bases con contenido similar de purinas (A,G) y pirimidinas (C,T). Un factor importante es la concentración del ion Mg^{++} en el amortiguador. Finalmente los tiempos y temperaturas de cada paso de la reacción influyen de manera directa en la calidad del resultado de la amplificación (Saiki, 1992).

El PCR tiene muchas aplicaciones en investigación y en medicina. Se puede usar para detectar secuencias desconocidas dentro del genoma de un organismo mediante el empleo de los oligos adecuados. También, se usa para análisis de variación genética, es decir, para detectar mutaciones o polimorfismos. Una variante del método general se usa para hacer análisis de expresión genética, al amplificar DNA complementario que proviene de la transcripción inversa del RNA mensajero. El método que se conoce como PCR inverso se utiliza para amplificar las regiones que flanquean a una región de secuencia conocida, por ejemplo, la resultante de la secuenciación de un fragmento amplificado por PCR. Recientemente se ha utilizado el PCR para detectar secuencias DNA poco comunes como las que resultan de una recombinación homóloga errónea. Otro uso muy importante que se le da a esta técnica es la posibilidad de obtener directamente material para secuenciación, es decir sin necesidad de realizar el proceso de clonación. Uno más de los usos del PCR es la construcción fácil de secuencias novedosas o inexistentes, dicho de otra forma, la ingeniería de proteínas. Además de todas las aplicaciones en evolución, mapeo

genético, diagnóstico y expresión, el PCR tiene una gran plasticidad, esto es, puede adaptarse a diversos protocolos según la necesidad del investigador (Erich, 1992).

II. OBJETIVOS

- Recopilar y alinear las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos para la subunidad II (COXII) de la citocromo oxidasa bacteriana caa3.
- Construir una secuencia consenso total para COXII.
- Analizar la secuencia consenso total por medio de programas de computadora y construir un modelo bidimensional para COXII con base en estos análisis.
- Localizar en la secuencia consenso regiones conservadas para el diseño y síntesis de oligonucleótidos para experimentos de amplificación por PCR.
- Detectar el gen para la COXII de *Bacillus cereus* mediante amplificación por PCR.

III. MATERIALES Y METODOS

Como paso inicial se procedió a la búsqueda de secuencias reportadas para las citocromo oxidasa aa3 y caa3 en bacterias, con la finalidad de obtener una secuencia consenso mediante el alineamiento de las mismas. El propósito no fue el de analizar exhaustivamente la totalidad de las secuencias reportadas para estas enzimas, sino solo el de obtener información suficiente para la construcción de la secuencia consenso, a partir de las especies bacterianas cuyas secuencias se encontraran disponibles. Para ello se recurrió a los bancos de datos y a la literatura.

La secuencia consenso total que se obtuvo se analizó mediante programas de computadora. Los datos que generó el análisis sirvieron para construir un modelo bidimensional de la protefna COXII. Posteriormente se localizaron las zonas más conservadas en la secuencia consenso total, dos de las cuales se usaron en el diseño de oligonucleótidos para amplificar, por PCR, una región del extremo 3' de la COXII. Los experimentos de amplificación se hicieron con el fin de detectar el gen de la citocromo oxidasa caa3 de *B cereus*.

COMPILACION Y ANALISIS DE LAS SECUENCIAS

Para obtener las secuencias se recurrió a la literatura y a los bancos de datos como el GenBank. El alineamiento se realizó a mano y mediante la rutina PAPA del programa NEWAT'85 (Johnson y Doolittle, 1986). Ambas secuencias, la de aminoácidos y la de nucleótidos se alinearon por separado y se obtuvo su secuencia consenso respectiva. Después se construyó una secuencia consenso total por comparación de las anteriores. A lo largo de este análisis se siguió el método empleado por Arredondo-Peter y Escamilla (1991). Todo esto con el propósito de determinar con certeza cuáles residuos ocupan posiciones hipervariables, y así eliminar a aquellos residuos que tienen la misma abundancia pero presentan menor probabilidad de estar codificados en la secuencia que se busca. Por ejemplo, en la posición 80 del alineamiento de aminoácidos los residuos I y L se encuentran en la misma proporción, no obstante, en la posición correspondiente de la secuencia consenso de nucleótidos (238), el triplete más probable es ATC. Por tal motivo en la secuencia consenso total se decidió colocar a I como el residuo más probable.

Los residuos conservados, variables e hipervariables se designaron de acuerdo a su abundancia en una posición específica. Como se detectaron cinco secuencias, el parámetro para decidir cual residuo era más abundante fue el de tener el mismo residuo en cuando menos tres secuencias. En el caso de tener dos, dos y uno, por ejemplo: TTGCG (posición 132 del alineamiento de nucleótidos, fig 7), se eligió aquel que

estuvo presente en las especies más cercanas a *Bacillus cereus*; en el ejemplo se eligió T, debido a que la secuencia de *Bacillus subtilis*, especie del mismo género, presenta T. El mismo criterio se siguió en los casos donde se tenían dos y uno, hacia la región 3' de la secuencia.

La secuencia consenso total que se obtuvo, COXIICS, se caracterizó mediante el uso de programas de computadora. Se utilizaron diversas rutinas de los programas: NEWAT'85 (Kyte Y Doolittle, 1982) y PC-GENE (Intelligenetics Inc y Genofil SA, University of Geneva, versión 6.01). Los tipos de análisis que se realizaron con cada una de las rutinas se muestran en la tabla I. Por último, la secuencia consenso se comparó con otras secuencias reportadas en bancos de datos, para lo cual se utilizó el programa BLAST (Altschul et al, 1990) en el banco de datos Swiss-Prot 23 del NCBI, USA.

Tabla I. Programas y rutinas utilizados en el análisis de COXII CS.

ANALISIS	RUTINA Y PROGRAMA
Perfil de hidropata	GREASE/NEWAT'85
Composición aminoacídica, estimación de la vida medi y punto isoeléctrico	CHARGPRO/PC-GENE
Predicción de estructuras secundarias	GARNIER/PC-GENE
Predicción de determinantes antigénicos y perfil de hidrofiliidad	ANTIGE/PC-GENE
Predicción de regiones flexibles	FLEXP/PC-GENE
Detección de secuencias de secreción y hélices transmembranales	PSIGNAL/PC-GENE
Firmas ("signatures")	PROSITE/PC-GENE

OBTENCION DEL DNA

Después de haber concluído la parte del análisis teórico, y de tener diseñados los oligos para la amplificación, se procedió a la extracción y caracterización del DNA de *B. cereus*. Para ello se utilizó la cepa CSU (California State University), crecida en 1 lt de una modificación del medio G que consiste en: extracto de levadura al 0.1%, sacarosa al 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0.2%, K_2HPO_4 al 0.05%, MgSO_4 al 0.02%, MnSO_4 al 0.005%, CaCl_2 al 0.0025%, FeSO_4 al 0.0005%, CoSO_4 al 0.00002%, ZnSO_4 al 0.0005%, y CuSO_4 al 0.0025%. El crecimiento se realizó a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica de 2.5.

Las células se cosecharon por centrifugación a 10,000 rpm durante 5 minutos.

Se lavaron con 10 ml de una solución de NaCl 100 mM Tris 10 mM EDTA 10 mM (pH 7.9). El botón se resuspendió en 5 ml de NaCl 150 mM Tris 10 mM EDTA 100 mM (pH 7.9), se agregó lisozima a una concentración final de 4.0 mg /ml, y se incubó a 37°C por 30 minutos. Finalmente, las células se lisaron con 6.25 ml de Tris 100 mM NaCl 100 mM SDS al 2% (pH 7.9) bajo agitación constante por 50 minutos o hasta que la solución se aclare.

Un método de ruptura alternativo puede ser el de "la prensa de RIBI". Mediante este método las células se fraccionan al someterlas a un cambio brusco de presión que va de las 30,000 psi, dentro del aparato, hasta la presión atmosférica (Duerre y Ribí, 1963). Con este método se pueden romper cantidades grandes de células, pero tiene la desventaja de que el DNA que se obtiene suele estar muy degradado.

Al contar con el lisado de células, se siguió una técnica de extracción de DNA; para lo cual el lisado se llevó a una concentración final de NaCl de 1.4 mM, y se le agregó un volumen igual (20 ml) de cloroformo-alcohol Isoamílico (24:1). Después de agitar la mezcla por 15 minutos se consiguió una emulsión que se centrifugó a 3,000 rpm por 20 minutos en una centrifuga Beckman J2-21, rotor JA-20, a TA.

Después de centrifugar se recuperó la fase acuosa. A esta fase se le agregaron 2/3 de volumen de isopropanol, se agitó, y se centrifugo a 5,000 rpm durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 76% (v/v)/ acetato de amonio 10 mM, durante 20 minutos. Posteriormente la solución se centrifugó a 3,000 rpm, y el botón se resuspendió en 1 ml de TE8 con 10 µg de RNasa por ml y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. El DNA se recuperó al agregar 2 volúmenes de TE8, acetato de amonio a una concentración final de 2.5 M, y 2.5 volúmenes de isopropanol. El DNA se recuperó con una varilla de vidrio, se resuspendió en 1ml de TE8, y se dializó contra 1,000 volúmenes del mismo amortiguador por 24 horas a 4°C.

Para conocer la cantidad del DNA total se determinó la absorbencia a 260 y a 280 nm de una dilución 1:10 y se obtuvo una concentración de 28.4 µg/ml. Se calculó el cociente R260/280 (coeficiente de extinción molar del DNA = $13,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), y se obtuvo un barrido de la absorbencia desde 300 hasta 230 nm para observar los máximos. Esto sirvió para estimar la calidad del DNA total que se obtuvo.

Otra manera de estimar la calidad del DNA, consistió en hacer una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE8 (Tris 89 mM Acido bórico 89 mM EDTA 2.5 mM, pH 8.0) a 1.5 mA por pozo durante 2.5 h. Se cargaron aproximadamente de 28 a 280 ng en orden creciente con 5 µl de una mezcla de colorantes llamada "cocktail" (azul de bromofenol 0.25 % Cianol xileno 0.25 % sacarosa 20 % EDTA 50 mM) La tinción se realizó con bromuro de etidio al 0.5 % durante 3 minutos, se destiñó con

agua durante 3 minutos y se visualizó en un transiluminador de UV.

Con el mismo propósito, el DNA total se digirió con enzimas de restricción. Se digirieron 28 η g de DNA más 6 μ l de espermidina, 3 μ l de β -mercapto-etanol, 3 μ l de enzima, 6 μ l de amortiguador y agua a un volumen final de 60 μ l. Se usaron tres enzimas: EcoRI (25 U) amortiguador Tris-HCl 50mM MgCl₂ 10 mM NaCl 0.1 mM (pH 8.0), Hind III (25 U) amortiguador Tris-HCl 50 mM MgCl₂ 10 mM NaCl 50 mM (pH 8.0) y Pst (25 U) amortiguador Tris-HCl 50 mM MgCl₂ 10 mM NaCl 50 mM (pH 8.0). El digerido se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y dos volúmenes de etanol absoluto, los tubos se congelaron a -70°C por 20 minutos y se centrifugaron a 15,000 rpm durante 20 minutos. El botón se resuspendió en 15 μ l de TE8. El total de cada una de estas soluciones de resuspendido se corrió en electroforésis en gel bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

AMPLIFICACION POR PCR

Dos de las regiones más conservadas en la secuencia consenso, se utilizaron para el diseño de los oligos 850 y 1160 que se usaron en los experimentos de amplificación por PCR. El número con el que se identifica cada primer corresponde aproximadamente a su localización en la secuencia consenso; ambos pertenecen a una región del extremo 3' de *caa3* (la secuencia y localización precisa se detalla en la sección de resultados). La síntesis de oligos estuvo a cargo de los doctores Laura Ongay (IFC-UNAM) y Mario Soberón (IBT-UNAM). Los componentes de la mezcla de reacción fueron los siguientes: oligo 850, 5 μ l (concentración 54 η g/ μ l), oligo 1160, 10 μ l, (concentración 27 η g/ μ l), dNTPs 1 μ l de cada uno (concentración 200 μ M, Pharmacia), ADN de *B cereus* 1 μ l, (0.2 μ g), Amplitaq DNA polimerasa fragmento stoffel (10 U), amortiguador stoffel (10x) 5 μ l, MgCl₂ 25 mM 10 μ l, y agua desionizada estéril hasta 50 μ l. Los componentes del control positivo (fragmento de amplificación de 500 pb con DNA de λ) se obtuvieron del equipo GenAmp, (Perkin Elmer). La mezcla de reacción final se cubrió con 50 μ l de aceite mineral para evitar la evaporación.

El programa que se utilizó para los ciclos de amplificación se muestra en la tabla II. La amplificación se llevó a cabo en un controlador térmico programable PTC-100 (MJ Research Inc).

Las muestras de amplificación se separaron por electroforésis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 10%. El corrimiento fue durante 1.5 h a 25 mA (2.5 mA por pozo). El gel se tiñó con una solución de bromuro de etido al 0.5% por 20 minutos y se destiñó con agua por otros 20 minutos. Las muestras se cargaron en el gel con 3 μ l de la mezcla de colorantes "cocktail".

Tabla II. Resumen de las condiciones en las que se llevó a cabo la amplificación por PCR de un fragmento de COXII.

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (segundos)
1 Desnaturalización	95	180
2 Alineamiento	52	45
3 Extensión	72	90
4 Desnaturalización	92	60
Regresar al paso 2		29 veces
5 Extensión final	72	300

IV. RESULTADOS

Se obtuvieron las siguientes secuencias para la subunidad II de la citocromo oxidasa (COXII): *Bacillus subtilis*; (BS) (Santana et al, 1992); la bacteria termofílica *Bacillus* PS3 (Saraste et al, 1991); *Paracoccus denitrificans*, (PD) (Raitio et al, 1987); *Thermus thermophilus*, (TT) (Mather et al, 1991); y *Rhodobacter sphaeroides* (RS) (Cao et al 1991).

La **figura 6** muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos para la COXII bacterianas. Los guiones (-) indican un INDEL; los signos de número (#) indican residuos altamente conservados; los asteriscos (*) residuos medianamente conservados, y las X residuos hipervariables.

En la **figura 7** se muestra el alineamiento de las secuencias de nucleótidos para las COXII de bacterias.

Por último en la **figura 8** se muestra la secuencia consenso total para COXII de bacterias (COXII CS). En la secuencia de nucleótidos, las X indican posiciones hipervariables (cualquiera de los cuatro nucleótidos). Cuando hay una ligera degeneración, se muestran dos nucleótidos alternativos para la misma posición. En la secuencia de aminoácidos, los # indican residuos altamente conservados, los * indican residuos conservados, y las X residuos hipervariables. Cuando para un triplete se encontraron dos aminoácidos correspondientes igualmente posibles, se anotaron ambos. La región correspondiente al probable péptido líder se muestra subrayada. Las cinco regiones más conservadas se denotan con cajas, y las cajas dobles corresponden a las "firmas" para los citocromos: aa3 la primera y caa3 la segunda.

En las figuras 6 y 7 se muestra el alineamiento de las secuencias, en ellas, se aprecia la presencia de residuos hipervariables, y residuos altamente conservados. Es claro que la longitud de las secuencias para COXII de cada especie es diferente, lo cual generalmente se atribuye a acontecimientos de inserción y/o delección (INDEL) en cada secuencia (Li y Graur, 1991). Las secuencias de COXII de *Paracoccus denitrificans* y *Rhodobacter sphaeroides* son menores en aproximadamente 87 residuos de aminoácidos debido a que carecen de un dominio para el citocromo c lo que hace una diferencia en peso molecular de alrededor de 10 KDa. En las secuencias de *Bacillus subtilis*, de PS3 y de *Thermus thermophilus*, se presenta un INDEL de tamaño considerable, entre las posiciones 175 y 212 de la secuencia de aminoácidos, lo que denota la ausencia de un fragmento de cerca de 37 aminoácidos en cada una de ellas (**figura 6**).

La secuencia consenso total, resultado de la suma de ambas secuencias consenso parciales (**figura 8**), tiene una longitud de 1,260 nucleótidos, que corresponden a 480

Figura 6

```

      10          20          30          40          50
BS  -----MVKHWRLLLLLALVPLLLSG-----CGKPFLLSTL--KPAGEV
PS3 -----MNKGLCNWRLFSLFGMALLLAG-----CGKPFLLSTL--QPAGEV
PD  MAIATKRRRGVAAVMSLGVATMTAVPALA-QDVLGDLPLVIGKPVNGGMNFQPASSP
TT  -----MQRSF AALGLWGLS-----LA-QE-----AHRVAITHPGGFSF
RS  ----MRHSTTLTPCATGAAGLLAATAAAAQ--QQTLEIIGRPQGGTGFHGSASP

```

```

      R S      A SA      S      RV K SA F
      TK K      S LV M P ALG E QQT EII R GG THGSGEP
CS  MAIAMXRXXXXXXXXLXGLXXLXAXXLAQAQDVLGDLPVCCKPXXSTXXFQPAGSV
      *          *          #

```

```

      60          70          80          90          100          110
ADKQYDLTVLSTLIMVVVVAVVSVIFFYVIV-RFRRSRVGENTIPKQ-VEGNKF-
ADMQYSMLLSTSIMVLVIVVVVAIFVYVVI-RFRRRRGEENKIPKQ-VEGSHK-
LAHDQQWLDHFVLYIITAVTIFVCLLLLICIVFRNRANPV----PAR-FTHNTP-
NQE-VAFLFPWVYFFSFLIFLVVAGSLAYVTWKFRRARPEDQ----EPPQIHGNDR
VATQIHWLDGDFLVIIGAITTFVTLILYAVWRPFHEKRNV---PAR-FTHNSP-

```

```

      Q   FM WIY FS A L A GS A T HEK Q   EP QI G
      A D WT FVS II LV IFS LL L IVK NAS V T EAR FTGS
CS  XDQXXXLLXXSTLXMXVXIXVVVXIFXYXXVWRFRRRXXXENKIPKQPYEHNXXR
      *          #          *

```

```

      120          130          140          150          160
LEITWTVIPILLIILVITVVLITLELADTSPMDKRRKAEDALVVNVRANLYWW
LEIIWTVIPIILLILAVPTVLTTFKLADVKAMNDKRRDKNT-VVVNVRANQYWW
IEVIWTLVPLVILVAIGAFSLPILIRSQEMPNDDP-----LVIKAIGHQYWW
LEVVWTLIPLAIVFVLFGLTAKALIQVNR-PIPGA-----MKVEVTGYQFVW
LEIAWTIVPILVLAIGAFSLPVLFNQQEIP-EAD-----ETVKVTGYQYWW

```

```

      L   V   VAK L NR K A   T E I H F
      I V IWIV LV AI SLP TI QE S K K DKNT KIKATAYLWY
CS  LEIXWTVIPXXILXILXXXTVLXLFXKXADXPXXDKRRKAEDAXVVNVRGNQYWW
      *# ## # *          *          *#

```

```

      170          180          190          200          210          220
EFEYPD-YG-----IITSQELI
EFEYPD-YG-----IITSQDLV
SYEYPN-DGVAFDALMLEKEA-----LADAGYSEDEYLLATDNFVV
DFHYPEL-----GLRNSNELV
GYEYPD-EEISFESYMGSPATGGDNRMSTEDEQQLIEAGYTRDEFLLATDTAMV

```

```

      E      R T M
      YH N EIS ESY YGSP      AE TR TGIINDN VI
CS  XFEYDPLXGVAFDALMLEKEATGGDNRMSTEDEQQLIDAGYSEDEYLLATSQXLV
      *##          *

```


Figura 7

```

                24                                48
BS ----- ATGGTAAAGCAT TGGCGTCTTATT TTATATTAGCC
PS3 ----- --ATGAACAAG GGGCTCTGTAAC TGGCGCTTATTT TCCCTGTTCGGG
PD ATGGCAATTGCG ACCAAGCGCCGC GGGGTGGCGGCG GTGATGAGCCTG GGAGTGGCGACG
TT ----- --ATGCAGAGA AGCTTCGCGGCG CTAGGTCTTTGG GGTCGTGCC---
RS ----- ATGAGACATTCC ACGACCTTGACC CCATGCGCCACG GGGCGGCAGGG

                T   GA   C   T   GC   G   CAAC   T   T   A   G
                AAG   GCC   CAG   TGAG   CTA   TC   GCCGT   TC   GCTGTAAAC
CS ATGGCAATTGCG AXXAXGCAXXXX AGGXTCTXGACC TGGXGTXTTTTG GXCTGTCCGG

                72                                96                                120
TTAGTGGCCGCTT CTATTAAGCGGA ----- --TGTTGA
ATGATGGCGCTG TTGCTCGCCGGC ----- --TGCGGG
ATGACGGCCGCTG CCGGCCTTGGCG ---CAGGACGTG CTGGGCGATCTG CCGGTGATCGGC
----- --CTGGCC ---CAGGAG--- -----
CTTCTGGCGGCC ACGGCCGCGGCC GCGCAG----- CAGCAGACGCTC GAGATCATCGGG

                G   A
                C   C   CCC   CA   CA   TC   GG                C   A   CAGACG   C   GA   A   CATT
CS XTXXTGGCGGTX XTXGTXCXCGGCC GCGCAGGAGGTG CTGGGCGATCTG CCGGTGTGCGGX

                144                                168
AAACCTTTTTTA TCCACGCTC--- ---AAGCTTGCT GCGGAGGTGGCT GATAAACAGTAT
AAGCCGTTTTTA TCGACGCTC--- ---CAGCCCGCC GGTGAAGTAGCG GACATGCAGTAT
AAGCCGGTGAAC GGGGGATGAAC TTCCAACCGGCG TCAGCCCGCTG CCGCATGACCAG
-----GCCAC CGGGTGGCCATC ACCCACCCGGGC GGCTCCTTCAAC CAGGAG---GTG
CGGCCGACGCG GGGGCACGGGC TTCCACGGTTCC GCGAGCCCGGTG GCCACGCAGATC

                CACACG   C   T   G                A   TC   T   TTCAT   CAAC   TGCT   C
                CGA   TGGCCAC   GCCAGCACGG   AC   A   CGGGTGG   TCGAGGCCACTT   CCCCTAG   C   TG
CS AAGCCGTTTTTA TGGGCGCTCAXC TTCCAGCCTGCC GGCACGCTGGCG GAGAAGCAGXAT

                192                                216                                240
GACCTGACAGTG CTCAGCACATTG ATTATGGTGGTT GTTGTTCAGTA GTATCTGTATTC
TCGCTCATGTTG TTGAGCACATCG ATCATGGTGCTC GTCATTGTGTC GTGGCGATCATC
CAATTGCTGGAT CATTTCTGTGCTC TACATCATCAGC GCCGTGACGATC TTCGTCTGCCTG
GCCTTCTCTTTC CCTTGGGTCTAC TTCTTCTCCTTC CTGATCTTCTG GTGGTGGCCGGG
CATTTGCTCGAC GGGTTCATCAGC GTCATCATCGGC GCCATCACCATC TTCGTCAAGCTC

                T   A   T   TC   G   A   G   T   GG   G   GT   AC   G   A   TTGGG
                CC   CGCACCTAC   G   TATGGCCCCG   TATT   GACG   CT   CCTG   CATGA   A   T   CTCACCTCGG
CS SAHTTGTGTGTX CXGTGCATATTC ATCATCGTCTXC GTCATTGCCGTC GTGGTGGTTCATC

```

Figura 7

264
 TTCCTTTTATGTG ATTGTG---AGA TTCAGAAGATCA CGGGTCGGTGAG AACACGATACCG
 TTCGTTTACGTT GTCATC---CGC TTCCGCCGGCGC AAGGGGGAAGAA AACAAAAATCCCG
 CTGCTGCTGATC TGCATCGTCCGT TTCAACCGCCGG GCGAATCCGGTG -----CCG
 TCCTTGCGGTAC GTCACCTGGAAG TTCCGGGCAAGG CCCCAGGACCAG -----GAG
 CTTATCTCTAT GCGGTC TGCGC TTCCATGAGAAG CCGCAACAAGGTG -----CCG

T CGCTA G TCG AACTAC AA GTAC
 CCG GCTGTAC AGTGGGCTCAA AA GCGACA GCCATCCG CTA AA CGA
 CS TTCXTTACGTT GTCATCTGGCGX TTCCGXCGACGG CGGGAGGAXGAG AACACGATACCG

312 336 360
 AAACAG---GTA GAGGGGAATAAA TTT---TTAGAA ATCACATGGACC GTGATCCCGATT
 AAGCAA---GTG GAAGGAAGTCAT AAG---CTGGAA ATTATTGGACT GTCATCCGATC
 GCGCGC---TTT ACCCACAACACC CCG---ATCGAG GTGATCTGGACC CTGGTCCCGGTG
 GAACCTCCCCAG ATCCACGGGAAC GACCGCCTCGAG GTGGTCTGGACC CTGATCCCCCTG
 GCCCGC---TTC ACCCACATTTCC CCG---CTCGAG ATCGCCTGGACC ATCGTCCCGATC

C C C TA A TGT T TC A G T T G A G C T
 ACG G TA GCGGGGGCCCA CT T A A G GGCA T C CG T CG G
 CS GAACAXCCCGTX AACCACAATAAC XAGCGCCTCGAG ATCATCTGGACC GTGATCCCGATC

384 408
 TTGCTGCTCATT ATCTTGTGATT CCTCTTCTATTA TATACGCTGCAG CTAGCCCACACA
 ATCCTCTTGCTC ATTTTGGCTGTG CCGACGGTATTG ACTACATTTAAA CTCGCCGACGTC
 CTGATCTGGTG GCGATCGGGGGC TTCTCGCTGCCG ATCCTGTTCGCG AGCCAGGAGATG
 GCCATCGTCTTC GTCTCTTCGGCC CTCACGGCCAAAG GCCTCATCCAG GTGAACCGC---
 GTCATCTCGTG GCCATCGGGGCC TTCTCGCTGCCG GTGCTGTCAAC CAGCAGGAAATC

G T GT G CC GG GC CAA TAG CA T A GAAA A
 CGC GT G G ACCA TTGTACT TCTTTTCCGCCA GTCACAC GAGC AGGCCGCGGGC
 CS XTCATCTCXTC GTTCTCGTGGTC CTCACGGTATTG ACTCTGTTCAG CTCGACGACATX

432 456 480
 TCACCAATGGAT AAAAAAGGCCGC AAAGCTGAGGAT GCTCTTGTAGTC AATGTTAGGGCA
 AAGGCGATGAAC GACAAAAAACCC GATAAGAATACA ---GTTGTCGTC AATGTTGCGGCC
 CCGAACGATCCC GAC----- ---CTGGTGATC AAGGCCATCGGC
 CCCATCCCTGGG GCC----- ---ATGAAGGTG GAGGTACACGGG
 CCC---GAGGCG GAC----- ---GAGACGGTG AAGGTACGGGC

T A CC CGT A CC T G
 AAC GATACG A A AAA G TAAGA TACA GATAAAA G G T CTGGC CA
 CS CCGXXXATGGAC GACAAAGGCCGC AAAGCTGAGGAT GCTCTGGTGGTC AAGGTACGGGC

Figura 7

744
 TGGATTCCCTCA GTTGGAGGAAAA CTTGATACGAAT ACGGATAATGAA AATAAGTTCCTC
 TGGATTCCGGCG GTCCGGCGGCAAA ATGGATACGAAC ACGGACAACAAA AACCAATTTTGG
 ACCATCCC CGCC TTCGCGGTCAAG CAGGACGCCGTG CCGGGCCGCATC GCGCAGCTGTGG
 TGGGTGCCGGCG CTCGCGCGGAAG CGGGACGCCATT CCGGGACAACCG ACCCGCATCTCC
 ACCGTGCC--- TTCGCGGTGAG CAGGATGCCGTG CCGGGCCGCCTC GCGCAGCTCTGG

 C T C A G C A CCG T C A T C
 ACGG G CTG T T CA TG GA AAT CA CGAG A ATAG GTC GAGAGAC G TC
 CS TGGATTCCGGCX GTCCGGCGGCAAG CTGGATGCGATT CCGGGCCAXAAA ACCCAGTTCCTG

792
 CTGACATTGAT TCAAAACGAAGC AAAGAGGCAGGA GATAATGTTTTT GGAAGTGTGCA
 CTTGTTTTTGTAT CAAAAGCGACC GATAAGGCCGGC GGCCTCTTTTAC GGCAAATGTGCG
 TTCGCGGTGCAC CAG-----GAG GGCCTCTATTTT GGCCAGTGTCTCC
 TTTGAACCCAAG GAG-----CCC GGCTCTACTAC GGCTTCTGCGCC
 TTCGGGGCCGAG CGC-----GAG GGGATCTTCTTC GGCCAGTGTGCG

G TC C GG CA GC T C A
 C C GGCTA G TCA CGA G A AG ACAG ATG G AC AT GCTA CT C
 CS TTTXXATTCGAT CAGAAAGCGACC GATAAGGCCGGC GGCATCTTTTTC GGCAAGTGTGCG

864
 GAGCTTTGCGGC CCTTCACATGCC CTGATGGATTTT ---AAGGTGAAG ACGATGTCTGCA
 GAGCTTTGCGGT CCGTCCCATGCC CTGATGGATTTT ---AAAGTTCGG CCGTGTCCGCGC
 GAGCTTTGCGGC ATCAACCACGCC TATATGCCCATC ---GTCGTCAAG CCGGTACGCCAG
 GAGCTCTGCGGG GCGAGCCACGCC CGCATGCTCTTC CGCGTCTGTGTC CTCCTCAAGGAG
 GAGCTCTGCGGC ATCTCGCACGCC TACATGCCGATC ---ACGGTCAAG GTCGTGTCTGAA

G G T AG GT TG CA TGT A CAC GC
 C C T ATCAGA T G TAC GCCA T GTC CCGC GTC CCAGTCCG
 CS GAGCTTTGCGGC CCGTCCCACGCC CTGATGCAATTC CGCAAGGTGAAG CCGXTGTCTGAA

912
 AAAGAATTTTCA GGCTGGACAAAA GAAATGAAGAAC TATAAGTCTACA GCAGAGAGCCAT
 GACCAATTTGAC GCCTGGGTGAAA AAGATGCAAAAT GCGAAAAAACCG GTTGTACTGTAT
 GAGAAATACGAA GCCTGGCTTTGCC GCGCGGAAAGAG GAAATCGCCGTC GACGCTCGGAG
 GAGTTTACGCC TTCGTGGAGGCC GCCAAAGCCTCC CCGGCCCCGTC GCGCATGAGCGG
 GAAGCCTATGCC CCGTGGCTCGAA CAGGCCCGCGGC GGC---ACCTAC GAGCTGTCTCTC

C CC G CA G AA G CCA ACGGTGG CG A AA T CTGATTCG
 A G TTCTCCGG TT GT CC ACC AGCGCACCCGCT TC AT TC A CTCTGCCGC
 CS GAAXAATATGAC GCCTGGGTGAAA GAGATGAAAAAC GAXXXXXCCXCG GCXGAGACGGAT

Figura 7

```

          984                                1008
---TTGGCTAAG CAGGGTGAAGAA CTGTTTAAACAG AAAAACTGCCCTG AGCTGCCATGGC
CCGGTCGCCAAA GAAGGGGAAGCG ATTTTC---AAT AAAAGCTGTATT GCGTGTCAATGGC
TACCTGCCCGCC AGCCCCGTCAAG CTGGCCTCGGCA GAG-----
GGCCAGCAGGTC TTCCAGCAGAAC -----TGCGCC GCCTGCCACGGC
GTCTGTCCCGCG ACGCCT---GCG GCGGTGTGCGTG CAG-----

      G   G TA   A AC   C
      GTACGATACC CGCGCT ACA G GC AAA   G G   TACT AGG T C GC
CS XXCCTGCCCGAG XKXCGTGAXGAG XTXTTXXTCGXXX XAAAAC TGCGTC GCCTGCCATGGC

          1032                                1056                                1080
GTAGAGCCGAAT GATAAGCGTGCA GAAGCCGCTAGA ACGGCACCTAAC TTGGCGACCTTC
GTGACGCCTCTT GATAAGCGTCCG GCGCAACGCCCG ACAGCGCCGAAC TTGGCGGATTTT
-----
GTGGCCCGGAGC ATGCC---CCC GCGGTCATCGGG CCCGAGCTTGGG CTTTGGGGCAAC
-----

      A           A   C GC A A   G           C
      AAAC GTCTC ATGCC G G AACACGTC C C A AA TGGGG C TTG AATAAT
CS GTGGCGCCGAGT GATAAGCGTCCC GCGGTCATCGGG ACCGCGCCTAAC TTGGCGGGCTTC

          1104                                1128
GGTGA AAGGACA AAAGTGGCAGGG GTGAAAGAGGCC AACAAAGAAAAT GTGAAGGCTTGG
GCGCATCGCGAA CGAATTGCGGGT ATTTTGAACAT AATGAAGAAAAT CTAAAAAATGG
-----
CGCACGAGCCTG ---GGGCGGGC ATCGTGAGAAAC ACCCCGAAAAC CTCAAGGCCTGG
-----

      AC           GA   G   A           G   T
      C TA TC GGAG AA AGT A CT G TTAA ACCT CTGGC C G A AAAA
CS GCGCAAAGCCTA CGAGTGGCGGGG ATCGTGAGAAAC AACCAAGAAAAT CTCAAGGCCTGG

          1152                                1176                                1200
CTGAAGGACCTT GACAGCATAAAG CCGGGGAACAAA ATGACAGGCACA TATCCAAAGCTC
CTGAGAGACCCG AACAGCGTGAAG CCTGGAATAAA ATGGCGGGTACA TACGGCCACTTG
-----
ATCCGCGACCCC GCGGGGATGAAG CCCGGGGTGAAG ATGCCCGGC--- TTCCCCAGCTC
-----

      G   T           G   C           A A
      A CCAA   G ACGG GG A   T AGTT G   G G T   TTGGAA CT G
CS CTGAGGACCCG GACAGCATGAAG CCGGGGAAGAAA ATGCCCGGCACA TACCCCGAGCTC

```

		1224		1248
TCAGACAGCGAA	ACAAATGCGCTT	TATGAATACTTA	AAAGGCTTAAAA	GCGGAAAGCAAG
ACGGAAGAGCAA	ATTGACGCATTG	ACGAAATATTTG	ATGAGCTTAAAA	GTGGAA
-----	-----	-----	-----	-----
TCCGAGGAGGAC	CTGGACGCTCTG	GTGGCGTACCTG	GAGGGCTCAAG	GTGGAG
-----	-----	-----	-----	-----

	A	C		A	G	TA												
A	G	AAGCC	C	CCTA	T	AT	T	ACTACG	TC	A	ATAA	GC	C	G	C	G		
CS	TCCGAGGAGGAA	ATGGACGCTCTG	GTGGAATACTTG	GAGGGCTTAAAA	GTGGAAGCAAG													

Figura 8

ATGGCAATTCGG ATGATGCAXXXX GGGGTCGCGGCX TGGCGTCTXKTTG GSXCTGTGXGGG 60
 M A I A M M X X G V A A W R L L G L S G 20

 ATGXXGGCGXXX XXXGCCCGGCC GCGCAGGAGGTG A CAGACG C GA ACATT
 M X A X X A A A A Q E V L G D L P E I V I C G 120

 AAGCCGTTTPTTA TGGGGGXXXAXC TTCCAGCCXGCC GGXGAAGTGXXX GACXXXCAGXXX 180
 K P F L W G X X F Q P A G E V X D X Q X 60
 * * * * *
 XXXTGTCTXGTX XXXTTCATATTG ATCATCGTCXXX GTCATTXXXGTX GTXGTXXXXATC 240
 X F L V X F I L I I V X V I X V V V X I 80

 TTCXTTACXXX GTCGCTGGCGX TTCCGXCGXCGX CGGGAGXXXGAG AA AACACGATACCG 300
 F X Y X V V W R F R R R R E X E N K I P 100
 * * * * *
 GAGCAGCCCGTX ACXCACAATAAC XXXCGCCTXGAG ATCATCTGGACX CTGGTCCCAGTC 360
 E Q P V T H N N X R L E I I W T L V P I 120
 * * * * *
 XTCATCTCTXTC GTXCTXGGXXXX CTCACGGTXXTG CC C ATCTGTTCXXX XXXCAGGACATC 420
 X I L X V L G X L T V P L I L F X X Q D I 140
 * * * * *
 CCGXXXATGXXX GACAAAGCGCGC G TAAGA TACA AAAGCTGAGGAT GCTCTGGTXGTC AAGGTACGGGC 480
 P X N X D K K R R D K K A N E T D A L V V K V T G 160
 * * * * *
 AAC CAGTACTGG TGGGAGTTGAA TACCCC GATCTC G G C CGCGCTG TACGGCATCTCG TTCGAGAGCTAC : 540
 N Q Y W W E F E Y P D L Y G I V S A F E D S A Y L 180
 * * * * *
 C G AGAA GAG
 ATGAGCGGCTCG CCCGCCACGGGT GGCACAACCGT ATGTCGCCCCAG GTCGAGCAGCAG 600
 M Y L G E S K P E A T G G D N R M S P Q V E Q Q 200

 GC T TT CGAG ATGGC
 CTGATCGAGGCC GGCTACACGCGC GACGAGTTCCTG CTGATCACCAGC AACGAGXTGGTX 660
 L A I E D A G Y T S R E D E T Y G L L I T S N E X V 220
 * * * * *
 GTXCCGGCGGAT XXXAAAGTXXXX TTCCAGTTGACC GCXTCG GACGTX ATCCACTCC TTC 720
 P A D X K V X F Q L T A S D V I H S F 240
 * * * * *
 TGGATTCCXGXC GTCCGGCGCAAG CAGGATGCGATT CCGGGCAACXXX ACXCAGTTCCTG 780
 W I P A V G G K Q D A I P G N X T Q F W 260
 * * * * *

residuos de aminoácidos. En esta secuencia, el residuo más abundante es alanina, aproximadamente 8%, y los menos abundantes fueron la cisteína y la histidina, ambas con 0.9%. Esto concuerda con el porcentaje de residuos que se encuentra en otras proteínas de procariotes, donde la alanina es el residuo más abundante (Doolittle, 1987). El peso molecular calculado para esta secuencia consenso total, es de 46.704 KDa, lo que incluye el dominio del citocromo *c*. El punto isoeléctrico calculado para el polipéptido correspondiente a esta secuencia, es de 4.56, la estabilidad de la proteína calculada con base en la composición de aminoácidos da una estimación del tiempo de vida media de más de 20 horas.

La secuencia consenso para COXII (COXII CS) muestra un bajo nivel de conservación, 16.4%, sin embargo, dentro de ella se pueden distinguir cinco regiones claramente conservadas. En la tabla III se muestran las posiciones que ocupan dichas regiones en la secuencia consenso. La región 3 presenta la firma ("signature") del sitio de unión al CuA, y la región 4 la firma del sitio de unión del hemo *c*. Lo cual indica que la región 1 forma parte importante del dominio del aa3 de la enzima, además de ser la región más conservada.

Tabla III. Las regiones más conservadas en la secuencia consenso total para COXII

REGION	POSICION	PORCENTAJE DE CONSERVACION
1	162-170	66.6
2	235-239	80.0
3	277-290	71.4
4	335-339	60.0
5	388-396	77.7

Se hizo una búsqueda de secuencias similares a la COXII CS en los bancos de datos con la finalidad de corroborar su confiabilidad, como se esperaba, se encontró una gran similitud con secuencias para COXII de bacterias y mitocondrias, pero no se encontró similitud significativa con otras proteínas; la secuencia más parecida fue la COXII de *B subtilis* (315 puntos) y la menos parecida fue la de la vinculina de pollo (54 puntos). Lo anterior indica confiabilidad en la construcción de esta secuencia consenso. No obstante, la secuencia para CyoA de *Escherichia coli*, mostró una considerable similitud con la COXII CS (77 puntos), que es mayor comparada con otras secuencias para COXII en eucariotes. Esto sugiere una estrecha relación

filogenética entre CyoA y las COXII bacterianas.

La subunidad II de la Qox, quinol oxidasa, de *B subtilis*, que carece de los sitios de unión al CuA y al hemo c, no aparece en la lista de las secuencias más similares, lo que indica que hay un alto grado de divergencia entre ésta y las secuencias de COXII, aunque Santana et al (1992), reportan un porcentaje de identidad del 25% entre COXII de *B. subtilis* y las secuencias de proteína de QoxA.

La secuencia consenso total, se sometió a diversos tipos de análisis. Uno de ellos fue el perfil de hidropatía, donde se muestran claramente tres regiones de alta hidrofobicidad cerca del amino terminal (figura 9); la primera de ellas puede corresponder a un péptido líder, como indican las posiciones de los posibles sitios de corte que se muestran en la tabla IV, las otras dos regiones corresponden a fragmentos transmembranales, que pueden funcionar para anclar a la proteína en la membrana de la célula al formar una estructura en forma de asa; mientras que los dominios catalíticos se hallan hacia el exterior, como se ha descrito por otros autores (Mather et al, 1991; Holm et al, 1987). Al parecer los sitios de unión al CuA y al hemo C, se localizan en un ambiente relativamente hidrofóbico (figura 9). En contraste el perfil de hidrofiliidad mostró tres regiones altamente hidrofílicas: dos se localizan en el dominio del citocromo aa3 (posiciones 90-96 y 145-150 en la secuencia de aminoácidos), y una en el dominio del citocromo c (posición 401-406). De acuerdo con Hoop y Woods (1981) estas regiones son potencialmente antigénicas.

Tabla IV. Predicción de los posibles sitios de corte del péptido líder en COXII CS. Obtenido del análisis de la secuencias de secreción para procariontes.

SITIO DE CORTE	PUNTUACION	SECUENCIA
25-26	7.13	axx : AAA
27-28	7.87	xaa : AAQ
28-29	9.67	aaa : AQE
29-30	8.1	aaa : QEV

Otros análisis de estructura secundaria aportaron diversa información. Se ha visto que los citocromos c y otras proteínas relacionadas carecen de hojas β -plegadas en su estructura secundaria (Dickerson, 1980). La COXII CS concuerda con esta observación, pues no presenta conformación de hojas β -plegadas. Las regiones con estructura de α -hélice son abundantes en la COXII CS. En la tabla V, se muestran las regiones donde se detectaron estructuras las principales secundarias: α -hélices, hojas β

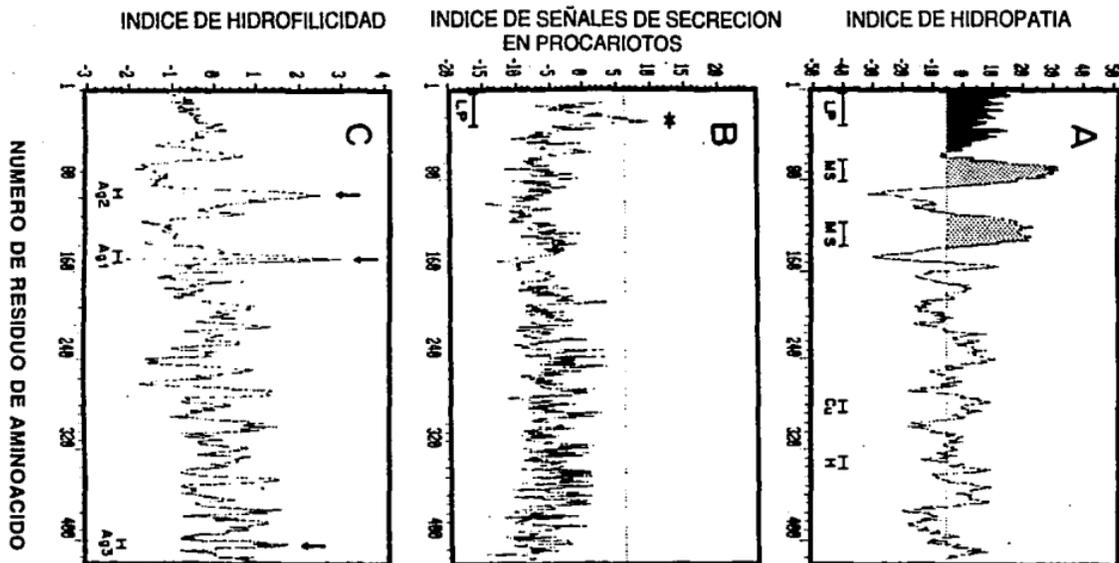


Figura 9. Predicción de algunos índices en COXII CS. (A) Perfil de hidropatía; el área oscura muestra la región del péptido líder, las áreas punteadas muestran las dos regiones más hidrofóbicas; LP, péptido líder; MS, fragmento transmembranal; Cu, sitio de unión del CuA; y H, sitio de unión del hemo C. (B) Perfil de posibles señales de secreción; el *, marca la región del péptido líder. (C) Perfil de hidrofiliidad: las flechas señalan los valores de hidrofiliidad más altos, y Ag1-3 son los sitios potencialmente antigénicos.

-plegadas, regiones de conformación extendida, y regiones con conformación de vuelta o doblez.

Tabla V. Predicción de estructuras secundarias para COXII CS

ESTRUCTURA	POSICION (secuencia de aminoácidos)
Conformación helicoidal	1-34
	54-66
	143-153
	196-210
	222-226
	230-234
	268-337
	360-382
400-420	
Conformación de vuelta	92-97
	170-173
	244-247
	344-345
	384-386
Conformación extendida	35-43
	67-89
	101-141
	154-169
	174-179
	210-221
	227-229
	235-243
	249-261
347-357	

La comparación de los análisis de estructura secundaria de la proteína y el análisis de hidropatía permitieron la construcción de un modelo de caricatura para la COXII CS, basado en modelos previamente reportados como el propuesto por Mather et al. (1991) o Holm et al. (1987) (ver figura 10). El modelo es una representación bidimensional de el posible arreglo de la COXII en la membrana plasmática. Para ilustrar mejor la manera en que se llegó al modelo, es necesario mencionar que con la

forman una asa citoplásmica que contiene una región potencialmente antigénica; las otras dos regiones antigénicas predichas, se hallan en la parte hidrofílica externa de la proteína.

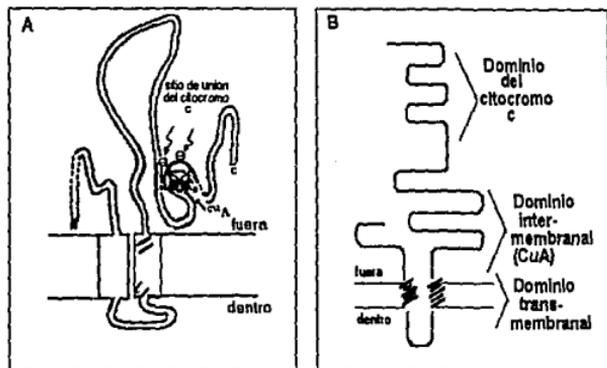


Figura 4.5 A) Modelo de la subunidad II de COXII de *P. denitrificans*, redibujado de Holm et al. 1987. B) Representación gráfica de la subunidad II de COXII de *Thermus thermophilus*, redibujado de Mather et al. 1991. En ambos modelos podemos notar la presencia de un dominio transmembranal de anclaje hacia la región N terminal y los dominios catalíticos hacia el exterior de la membrana plasmática (C terminal).

La mayor utilidad de los análisis de la secuencia consenso, fue la de facilitar el diseño de oligonucleótidos para usarse en experimentos de amplificación por PCR. Se eligieron las regiones más conservadas, y de éstas, aquellas que por su posición dentro de la secuencia permitieran la amplificación de un fragmento cuya secuencia estuviese formada por una parte del dominio de aa3 y una parte del dominio del citocromo c. Lo anterior tuvo como finalidad la de asegurar que al obtener un fragmento de amplificación este correspondiera al gen para la enzima caa3 y descartar la posibilidad de que se amplificara un fragmento del gen para aa3 además del de caa3.

La secuencia de los oligos, así como su posición en la secuencia consenso se muestran en la figura 12.

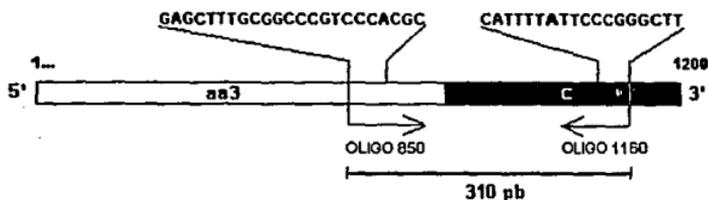


Figura 12. Secuencia y localización de los oligos diseñados para amplificar un fragmento de COXII de 310 pb. El primer nucleótido del oligo 850 ocupa la posición 841 con respecto a la secuencia consenso, y el oligo 1160 ocupa la posición 1161. Las flechas indican la orientación del oligo de acuerdo al extremo 3' OH terminal libre.

Se buscaron en el banco de datos EMBL aquellas secuencias reportadas en la literatura que pudieran alinearse estos oligos, las secuencias localizadas con mayor puntaje fueron: Bsctabf X54140 (Genes cta B-F de *B. subtilis*), Synbctcons L07419 (Secuencia cosenso para citocromo oxidasa bacterianas), y Baccta M94110 (DNA fotoliasa de *B. firmus*). Estos resultados hacen pensar en que es alta la probabilidad de que los oligos hibriden con el gen *ctaC*.

Se obtuvieron 0.1 g de células al cosechar los 50 ml del cultivo, con estas se llevó a cabo la técnica de lisado de células y obtención del DNA total. El rendimiento final fue de 2.84 µg de DNA por mg de lisado. Esta misma técnica se llevó a cabo cuando se utilizó la prensa de RIBI como método de ruptura.

El cociente R260/280 fue de 1.4, lo que indica que la preparación contenía pocas proteínas. Se hizo también un barrido de absorbencia desde 300 hasta 230 nm, y en el se halló solo un máximo a 260 nm, indicativo de una preparación de DNA bastante limpia (no se muestra). En la electroforesis del DNA total que se obtuvo (figura 13) se distingue un patrón de corrimiento bastante bueno; se nota que el DNA obtenido prácticamente no está degradado, y por lo tanto es de buena calidad. La digestión del DNA con enzimas de restricción reafirmó lo anterior, en la figura 14 se muestra el patrón de corrimiento del DNA digerido. Se observa un barrido muy limpio y completo, en comparación al DNA total. Por lo general cuando una preparación de DNA no está lo suficientemente limpia, las proteínas contaminantes en particular las que se asocian con el DNA interfieren con las enzimas y la digestión no es completa (Maniatis et al, 1982).

Una vez que se corroboró la calidad del DNA obtenido, se procedió a llevar a

cabo la amplificación por PCR. Se hicieron varios intentos, al variar las condiciones iniciales, por ejemplo la concentración de Mg^{2+} , la cantidad de DNA y de enzima, la concentración de los oligos, y la temperatura y duración de cada ciclo. Finalmente se llegó a las condiciones que se describieron con anterioridad, en las que se consiguió amplificación. En la figura 15a se muestra una fotografía de la electroforesis de la amplificación por PCR del DNA de *B cereus*. En ella se puede notar la presencia de un fragmento de amplificación de aproximadamente 315 a 320 pb, que corresponde al tamaño esperado de acuerdo a la posición de los oligos en la secuencia consenso: 310 pb (ver figura localización de los oligos).

Después se procedió a extraer el fragmento de DNA amplificado mediante electroelución. Posteriormente se realizó una reamplificación de este fragmento al usar los mismos oligos, con la finalidad de verificar la especificidad de la amplificación y para obtener una mayor cantidad del fragmento libre de otros contaminantes y así utilizarse en experimentos futuros. En la figura 15b se nota la eficiencia de la reamplificación del fragmento de 310 pb, indicio de una alta especificidad de los oligos por esta región del DNA de *B cereus*.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (µl)



Figura 13. Electroforésis del DNA total de *B. cereus*. Corrimiento en agarosa al 1% a 1.5 mA por 2.5 horas. Se aplicaron cantidades crecientes del DNA total de 1 a 10 µl.

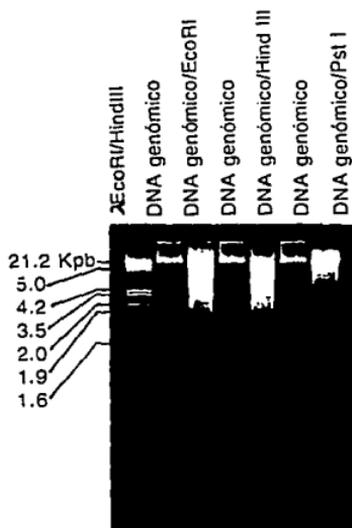


Figura 14. Digestión del DNA total de *B. cereus*. Con cada enzima de restricción se digirieron 10 µl de DNA.

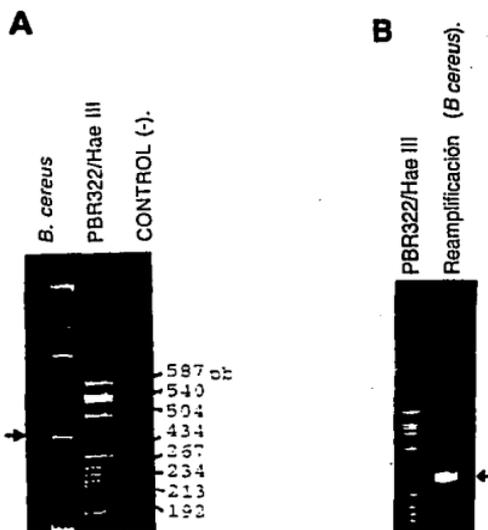


Figura 15. (A) Amplificación por PCR del DNA de *B. cereus* al utilizar los oligos que se diseñaron con COXII CS. Se distingue con claridad la presencia de una banda de aproximadamente 310 pb que corresponde al tamaño esperado según la posición de los primers. La temperatura de alineamiento fue de 52°C. La electroforesis se llevó a cabo en PAGE al 10 %. (B) Reamplificación del fragmento de 310 pb. Se repitió el PCR usando como molde una solución del fragmento de amplificación que se recuperó.

V. DISCUSION

Ya se mencionó que los métodos computacionales ocupan un lugar de suma importancia en el análisis genético. El acelerado desarrollo de los programas de computadora para el análisis de secuencias abre un vasto campo de acción para hacer inferencias teóricas sobre la estructura y evolución de las proteínas. Con el tiempo la comprobación experimental de los datos teóricos retroalimentará este enfoque. Se sabe que en la actualidad, la construcción de secuencias consenso, brinda una herramienta muy útil sobre la cual es posible diseñar experimentos con las cada vez más innovadoras técnicas de la genética y la bioquímica.

El nivel de conservación de la secuencia consenso es bajo, apenas de un 16.4 %, en comparación del nivel de conservación de la secuencia del gen para COXI (ctaD) que es mayor al 47% (Quirk et al, 1993); lo anterior puede explicarse al pensar en que COXI presenta, en términos generales, una mayor restricción funcional que COXII (Babcock y Wikström, 1992). La mayor parte de los residuos conservados en la COXIICS se encuentran hacia el extremo carboxilo terminal de la proteína. En esta región se hallan los cinco sitios más conservados de la secuencia, dos de los cuales son de particular importancia, pues corresponden al sitio de unión al CuA y al sitio de unión al hemo C. Este mismo patrón de conservación de COXII hacia la región del carboxilo terminal se encuentra en otras citocromo oxidasas *aa3* de vertebrados, equinodermos, artrópodos o levaduras (Saraste, 1990), el patrón de conservación que presenta COXII a lo largo de la escala filogenética, habla sobre el papel funcional de esta región de la proteína. En este momento no es posible hacer una relación directa entre la filogenia de los organismos de los cuales se obtuvo la secuencia y el nivel de conservación de COXII, como se ha hecho para otros organismos como es el caso de las angiospermas (De Benedetto et al, 1992). Para tal efecto es necesario contar con información adicional sobre las relaciones particulares entre dichas especies y, además, en un análisis de este tipo debería usarse una proteína que tuviese un mayor nivel de conservación como lo es la COXI.

En la sección de resultados se habló de un INDEL en las secuencias para las enzimas *caa3*, lo cual nos indica algún tipo de relación filogenética entre las tres especies que la comparten (*B subtilis*, *T thermophilus* y *Bacillus* PS3). Aunque no se cuenta con datos suficientes para hacer especulaciones sobre esto, de manera interesante, se trata de las mismas proteínas (subunidad II) que presentan el dominio para el hemo *c*. En relación a esto se puede pensar en que si se acepta que la proteína *caa3*, ha evolucionado por un fenómeno de "Exon-Shuffling" o "barajeo de exones" (Dorit et al, 1990), resulta difícil que este tipo de suceso haya ocurrido cuatro o más

veces de manera independiente (Li y Graur, 1991). Desde luego que en este caso no se trataría de exones sino de fragmentos particulares del DNA. Por otro lado la carencia de esta porción de la proteína en dichas especies, indica que esta región no es determinante para la función de la subunidad.

Las secuencias con las cuales COXII CS presenta mayor similitud, son precisamente citocromos bacterianos, lo cual muestra la confiabilidad del alineamiento. Es de resaltar que la citocromo *q* quinol oxidasa (operón *cyo*) de *E coli* que es una proteína lejana, presenta una considerable similitud con COXII CS. Curiosamente no hay gran similitud entre COXII CS y la *qox II* de *B subtilis*, y como ya se mencionó, esta última carece de sitio de unión al cobre, lo cual concuerda con la observación de Saraste et al (1992) de que la enzima *aa3* podría no ser una citocromo *c* oxidasa sino más bien una quinol oxidasa (Babcock y Wikström, 1992). Por el grado de divergencia de las secuencias, es hace claro que los genes para COXII y QOXA son distintos no solo funcionalmente sino también en su origen. Sin embargo no debemos olvidar que hay una gran similitud entre QOXB (subunidad I) y COXI del mismo *B subtilis*: 48% (Santana et al. 1992), lo mismo que entre QOXC y COXIII cuya similitud es del 49%. Ahora bien, es interesante hacer notar que ambas quinol oxidasas: *qox* de *B subtilis* (*aa3*), y *cyo* de *E coli* (*bo3*) prácticamente solo difieren de las enzimas *aa3* en la subunidad II, sin embargo, funcionalmente parecen combinar los procesos de transferencia de electrones de los complejos *bcl* y *aa3* (Musser et al, 1993). Por lo tanto no es sorprendente que QOXB presente cierta similitud con la COXII CS; de hecho sería interesante pensar en la posibilidad de que la amplia gama de complejos enzimáticos de la cadena respiratoria, no fuese sino el resultado de la combinación de distintas subunidades en una sola enzima, o que tal vez las subunidades de varios de los complejos tengan un origen común

En cuanto a la predicción de estructuras secundarias en la secuencia de nucleótidos, se puede decir que la cantidad de información que nos aporta para hacer inferencias teóricas, es compartativamente menor que en el caso de los residuos de aminoácido, sin embargo otros tipos de análisis, como la detección de sitios de restricción, resulta de gran utilidad para el diseño experimental, pues aún al considerar las diferencias respectivas para cada especie, se pueden utilizar como guía en la búsqueda de resultados cuando sea necesario hacer digestiones de fragmentos de COXII.

Los análisis de estructura secundaria y de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de la COXII CS, permitieron la construcción de un modelo bidimensional para dicha secuencia. Es claro que existen dos sitios predominantemente hidrofóbicos que se localizan en una región cercana a la región amino terminal, y deben

corresponder a fragmentos transmembranales de la proteína que forman un asa, cuyo "codo" o doblez se encuentra fuera de la membrana, pues los análisis de hidropatía muestran que esta región es una zona altamente hidrofóbica; este es uno de los sitios que se pueden usar como determinantes antigénicos en la proteína. El péptido líder se hace claro no solo por la predicción de los sitios de corte, sino por la hidrofobicidad detectada en este fragmento de la secuencia.

El modelo bidimensional que aquí se propone se realizó de acuerdo a la orientación y el arreglo de los modelos propuestos previamente para COXII en otras especies por Mather et al (1991) y por Holm et al (1987). En ambos se describe a los dominios catalíticos en la parte externa de la membrana. Este modelo, intenta ampliar las ideas sobre la estructura total de la proteína, así como las interacciones específicas entre los residuos de aminoácidos, por ejemplo de aquellos que se unen a los grupos: hemo C y CuA. Este modelo no solo se traza la orientación bidimensional de la estructura primaria de la proteína, sino que se muestra la posible distribución de las estructuras helicoidales y de las regiones con conformación de vuelta, de acuerdo a las predicciones. En concordancia con el modelo de Holm, el sitio catalítico se define en un paquete hidrofóbico, aunque menos estrecho. Además, a diferencia de los otros modelos, en este se define con más detalle la parte del polipéptido que corresponde al dominio del citocromo c y el sitio de corte del péptido líder. Futuros análisis computacionales de las subunidades I y III de la citocromo oxidasa bacteriana, pueden dar lugar a la proposición de sus modelos de caricatura correspondientes, que al integrarse al modelo obtenido para COXII contribuya a dar una visión general del arreglo de las subunidades de la citocromo oxidasa en la proteína funcional.

Es notoria la cercanía de los sitios de unión del CuA y del hemo c, que de acuerdo a los análisis de la secuencia de aminoácidos, se encuentran en un paquete hidrofóbico. La cercanía de ambos sitios de transferencia de electrones puede estar facilitando la transferencia de electrones entre el hemo C y el CuA, en una enzima donde el hemo c no tiene que estar en un polipeptido soluble, pues ya forma parte de la enzima (Musser, 1993), a pesar de que se encuentran en un ambiente hidrofóbico. Un modelo como el que aquí se propone, puede resultar útil en el esclarecimiento de la estructura de esta enzima, y al mismo tiempo explicar el mecanismo de transporte de electrones.

Además de lo anterior los resultados que se obtuvieron con el análisis de las secuencias de aminoácidos de la COXII CS se pueden aplicar, por ejemplo, en la purificación de la proteína, ya que las regiones antigénicas detectadas se pueden utilizar para la síntesis de oligopéptidos, que sirvan para la producción de anticuerpos (Avrameas et al, 1978). Los anticuerpos a su vez, pueden conjugarse con resinas para

realizar separaciones en cromatografía de afinidad, estos mismos se pueden usar para determinar la orientación correcta de la proteína en la membrana mediante procedimientos de inmunolocalización al microscopio electrónico.

La construcción de esta secuencia consenso permitió diseñar oligos para PCR. Se buscó que estos oligos fueran lo más específicos posible; se copiaron directamente de la secuencia consenso y sin degeneración, en espera de no tener una población múltiple de los mismos. Las secuencias de los oligos que se utilizaron se sometieron a una comparación en bancos de datos, lo que brinda seguridad en el apareamiento específico de éstos con el DNA de *B cereus*. A pesar de que por su secuencia los oligos podrían aparearse con secuencias de otros genes de diferentes organismos, predomina la similitud con COXII de bacterias.

La obtención de un fragmento de amplificación por PCR fue difícil, se modificaron las condiciones hasta que finalmente se logró obtener un fragmento que corresponde al tamaño esperado, según la localización de los oligos en la secuencia consenso. En la amplificación se detectan algunas bandas de tamaño diferente que pueden resultar de alineamientos inespecíficos, sin embargo la banda de interés es la mayoritaria, y es la que se consideró como resultado de la amplificación de un fragmento de la citocromo oxidasa. Además hubo una buena reamplificación del fragmento lo cual indica que los oligos se unen a este con una alta especificidad. Esta reamplificación se puede considerar como un resultado a favor de que la banda de amplificación que se obtuvo corresponde a la COXII de *B cereus*.

La confirmación de estos resultados deberá esperar hasta que se conozca la secuencia del fragmento que se amplificó. El siguiente paso en este trabajo deberá ser clonar y secuenciar dicho fragmento, primero para confirmar los presentes resultados, y segundo para diseñar experimentos que permitan obtener la secuencia completa del gen para COXII. Por ejemplo se podrán intentar procedimientos de PCR inverso (Ochman et al, 1990) para la amplificación de secuencias no codificantes en 5' o en 3' que permitan obtener las regiones regulatorias del gen. Por otro lado, el fragmento de amplificación, se podrá usar como una sonda específica para experimentos de mapeo génico en "Southern blot", o bien, mediante el uso del "Northern blot", se podrá explorar el desarrollo de los cambios en los patrones de expresión del RNA que suceden durante la esporulación.

VI. REFERENCIAS

- Altshul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Anraku, Y. (1988). "Bacterial electron transport chains". *Ann Rev Biochem* 57: 101-103.
- Arredondo-Peter, R., and Escamilla, E. (1991). "A Consensus Sequence of Plant Hemoglobins." *Plant Mol Biol Rep* 2 (3), 195-207
- Arredondo-Peter, R. (1985). "Los mecanismos para evaluar la evolución a nivel bioquímico." *Bol Eduq Bioq (México)* 85 (4) 2: 40.
- Avrameas, S. et al. (1978). "Coupling of enzymes to antibodies and antigens". *Scand J Immunol* 8 (7), 7-11.
- Babcock, G. T., and Wikström M. (1992). "Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration." *Nature* 356 (26), 301-309.
- Cao, J., Shapleigh, J., Gennis, R., Revzin, A., and Ferguson-Miller, S. (1991). "The gene encoding cytochrome c oxidase subunit II from *Rhodobacter sphaeroides*; comparison of the deduced amino acid sequence with sequences of corresponding peptides from other species." *Gene* 101, 133-137.
- Carls, R. A., and Hanson, R. S. (1971). "Isolation and Characterization of tricarboxylic acid cycle mutants of *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 106 (3), 848-852.
- Chambliss, G. H. (1979). "The molecular biology of *Bacillus subtilis* sporulation" Capítulo 4 en: Developmental biology of Prokariotes. University of California Press. USA.
- Cotter, P. A., Chepuri, V., Gennis, R. B., and Gunsalus, R. P. (1990). "Cytochrome o (cyoABCDE) and d (cydAB) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fir* gene product." *J Bacteriol* 172 (11), 6333-6338.
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D., (1990). "Molecular Cell Biology." 2nd edition. Scientific American Books. USA.
- De Benedetto, C., De Gara, L., Arrigoni, O., Albrizio, M., y Gallerani, R. (1992). "The structure of the cytochrome oxidase subunit II gene and its use as a new character in

- the construction of the phylogenetic tree of Angiospermae." *Plant Science* **81**, 75-82.
- De Vrij, W., and Konings, W. N. (1987). "Kinetic characterization of cytochrome c oxidase from *Bacillus subtilis*." *Eur. J Biochem* **166**, 581-587.
- Dickerson, R. E. (1980). "The cytochromes c: An exercise in scientific serendipity. en: The evolution of protein structure and function." Sigman, D. S. & Brazier, M. A. B. ed. Acad. Press. NY. USA.
- Doi, H. R. (1977). "Genetic control of sporulation." *Ann Rev Genetics* **11**, 29-33.
- Doi, H. R. (1982). "RNA polymerase of *Bacillus subtilis*." *The Molecular Biology of the Bacilli*. Vol 1, *Bacillus subtilis* (D. A. Dubnau, ed.) Academic Press, New York.
- Doi, H. R. (1989). "Sporulation and Germination." en: "*Bacillus*" Colin, R. and Harwood ed. *Biotechnology Handbooks 2*. Plenum Press. USA.
- Doolittle, R. F. (1987). "Of URFs and ORFs: A primer on how to analyze derived amino acid sequences. University Science Books. Mill Valley, CA. USA.
- Dorit, R. L., Scholenbach, y Gilbert, W. (1990). "How big is the universe of exons?" *Science* **250**, 1377-1382.
- Duerre, J. A., and Ribi, E. (1963). "Enzymes released from *Escherichia coli* with the aid of a cell fractionator." *Appl Microb* **11** (6), 467-470.
- Erlich, H. A. (1992). "PCR Technology: principles and applications for DNA amplification." Freeman. USA.
- Escamilla, E., Contreras, M. L., Ramírez, R., y Linares, V. (1985). "Organización, regulación y evolución del sistema respiratorio bacteriano". en *Mensaje Bioquímico Vol VIII*, Alvarez, G., LL., et al. ed. UNAM. Mex.
- García-Horsman, J. A., and Escamilla, E. (1990). "Structural and functional properties of cytochrome *aa3* from bacteria." *Bol Estud Méd Biol Méx.* **38**, 29-36.
- García-Horsman, J. A., Barquera, B., and Escamilla, E. (1991). "Two different *aa3*-type cytochromes can be purified from the bacterium *Bacillus cereus*." *Eur J Biochem* **199**, 761-768.
- Hanson, R. S., Srinivasan, V. R., y Halvorson, O. (1963). "Metabolism of acetate by

vegetative and sporulating cells." *J. Bacteriol* 85, 851-460.

Heijne, G. (1987). "Sequence analysis in molecular biology." Academic Press Inc. UK.

Holm, L., Saraste, M., y Wikström M. (1987). "Structural models of the redox center in cytochrome oxidase." IRL Press Limited. Oxford UK. 2819-2823.

Hoop, T. P. & Woods K. R. (1981). "Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences." *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 3824-3831.

Jhon, P. (1987). "Paracoccus as free-living mitochondrion." *Cap II Endocitobiology III*. 503, 141-149.

Jhonson, M. S., & Doolittle, R. F. (1986). "A method for the simultaneous alignment of three or more amino acid sequences." *J Mol Evol* 25, 267-278.

Jones, C.W. & Poole, R.K. (1985) "The analysis of Cytochromes" en *Methods in microbiology*. Vol 18, 285-293.

Jones, C. W. (1988). "Membrane-associated energy conservation in bacteria: a general introduction. En: Anthony, C. (ed), *Bacterial energy transduction*. Academic Press, London. 1.

Kadenbach, B., Stroh, A., Hüther, F.-J., Reimann, A., and Steverding, D. (1991). "Evolutionary Aspects of Cytochrome c Oxidase." *J Bioenerg Biomem* 23 (2), 321-333.

Keinan, A., and Sandler, N. (1983). "Spore Research in Historical Perspective." en: "The Bacterial Spore" Vol 2. Hurst, A., and Gould, C. W. ed. Academic Press. U.K.

kluyver, A. J. & Van Niel, C. B. (1956). "The John M. Prather Lectures 1954." Harvard University Press, Cambridge, USA.

Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982). "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein." *J Mol Biol* 157, 105-132

Lauraeus, et al. (1991). "*Bacillus subtilis* expresses two kinds of haem A-containing terminal oxidases." *Eur J Biochem* 197, 699-705.

Lehninger, A. L. (1982). "Biochemistry." Second edition. Worth Publishers Inc. USA.

Li, W. H., y Graur, D. (1991), "Fundamentals of Molecular Evolution." Sinauer

associates, INC. Publishers. USA.

Margulis, L., and Bermudes, D. (1985). "Symbiosis as a Mechanism of Evolution Status of Cell Symbiosis Theory." *Symbiosis in Evolution*. Balaban Publishers. USA.

Mather, M. W., Springer, P., and Fee J. A. (1991) "Cytochrome Oxidase Genes from *Thermus thermophilus*." *J Biol Chem* **266** (8), 5025-5035.

Maxam, A. M., y Gilbert, W. (1977). "A new method for sequencing DNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 560-566.

Mitchel, P. (1966). "Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by proctivity." *Trans Biochem Soc.* **4**, 399-404.

Ochman, H., Meduora, M. M., Garza, D., y Hartl, D. L., (1990). "Amplification of flanking sequences by inverse PCR." en *PCR protocols: A guide to methods and applications* Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., y White, T. J. ed. Academic Press, New York 219-227.

Parish, J. H., (1979). "The physiology and diversity of bacterial endospores." Capitulo 3 en: *Developmental biology of Prokaryotes*. University of California Press. USA.

Priest, F. G. (1989). *Isolation and Identification of Aerobic Endospore-Forming Bacteria*. Capitulo 3 en: "*Bacillus*" Colin, R. and Harwood ed. *Biotechnology Handbooks 2*. Plenum Press. USA: 27-56.

Quirk, P. G., Hicks, D. B., y Krulwich, A. (1993). "Cloning of the cta Operon from Alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 and Characterization of the pH-regulated Cytochrome caa3 Oxidase it encodes." *J. Biol. Chem.* **268**:1, 678-675.

Raitio, M., Jalli, T., and Saraste, M. (1987). "Isolation and analysis of the genes form cytochrome c oxidase in *Paracoccus denitrificans*." *EMBO J* **6**, 2825-2833.

Saiki, R., (1992). "The design and optimization of the PCR." En: *PCR technology: Principles and applications*. Editado por Henry A. Erlich. Freeman. USA.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). "Molecular cloning". Cold Spring Harbor.

Sanger, F., Nicklen S. y Coulson A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

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

Saraste, M., Raitio, M., Jalli, T., and Per  m  , A. (1986). "A *gen* in *Paracoccus* for subunit III of cytochrome oxidase." *FEBS Lett* **206** (1), 154-159.

Saraste, M. (1990). "Structural features of cytochrome oxidase." *Quarterly Reviews of Biophysics* **23** (4), 331-366.

Saraste, M., Metso, T., Nakari, 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.

Shapleigh, J. P., and Gennis, R. B. (1991). "Cloning, sequencing and deletion from the chromosome of the gene encoding subunit I of the *aa3* type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*." *Mol Microbiol* **6** (5), 653-661.

Strickberger, M. W. (1990). "Evolution." Jones and Bartlett Publishers. USA.

Stryer, L. (1988). "Biochemistry." Third edition. Freeman. USA.

Svensson, B., Mathias, L., and Hederstedt, L. (1993). "*Bacillus subtilis* CtaA and CtaB function in haem A biosynthesis." *Mol Microbiol* **10** (1), 193-199.

van der Oost, J. et al. (1991). "*Bacillus subtilis* cytochrome oxidase mutants: biochemical analysis and genetic evidence for two *aa3* type oxidases." *Mol Microbiol* **5** (8), 2063-2971.

Wachenfeldt, C.V., and Hederstedt, L. (1990). "*Bacillus subtilis* 13-Kilodalton Cytochrome c-550 Encoded by *cccA* Consist of a Membrane-Anchore and a Heme Domain." *J Biol Chem* **265** (23), 13939-13946.

Wachenfeldt, C. V., and Hederstedt, L. (1992). "Molecular biology of *Bacillus subtilis* cytochromes." *FEMS Microbiol Lett* **100**, 91-99.

Young, M., and Mandelstam, J. (1979). "Early events during bacterial endospore formation." in: *Advances in microbial physiology* Vol 20. Academic Press. U.K.

AGRADECIMIENTOS

A mi Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi Facultad de Ciencias por cinco maravillosos años.

Al Dr. Raúl Arredondo Peter, quien me cedió su tiempo, su paciencia, su invaluable ayuda y su amistad.

Al Dr. J. Edgardo Escamilla Marván por darme la oportunidad de finalizar el camino y por su confianza.

Al Dr. Jesús Manuel León Cazares por escucharme y aconsejarme siempre que lo necesito.

A mis maestros y sinodales: Biol. Carlos Alberto Castillo Pompeyo y al Dr. Alejandro Sosa Peinado por su ayuda y por el entusiasmo que me inculcaron.

A la Dra. Laura Ongay y al Dr. Mario Soberón por la síntesis de los oligos.

Al Dr. Jesús Aguirre, al IBB Jorge Membrillo y a la M. en C. Martha Contreras por sus consejos y asesoría técnica.

A mis compañeros del laboratorio 101 por su alegría.

A la D.G.A.P.A. por otorgarme una beca durante la realización de esta tesis.

A mi padre Bernardo Hernández Ortíz, por impulsarme siempre.

A la señora Luisa Angeles Gómez por enseñarme el significado de la palabra madre.

A mis hermanos por su paciencia y esfuerzo.

A mis amigos por hacer del paso por la facultad la mejor época de mi vida.

Mi gente:

Bernardo Hernández Ortíz y Luisa Angeles Gómez.

Eneida, Angélica, Elvia, Bernardo, Daniel, y Josefina.

Yanin, Nirvana, Javier, Juan Carlos, Victor y Erika.

Nancy, Ivonne, Fabiola, Liliana, Bruno, Eréndira, Alberto y Mónica.
Guillermo, Juana y Guadalupe y Pilar.

Margarita, Francisca, Rosario, María, Alfonso y José.

Norma, Ana, Berenice, Patricia, Arturo, Alfonso, Marco, Mayeli y David.

Pancho, Sara, Amelia, Alejandro, Elizabeth, Salomón, Elvira, Alvaro, Israel.

Miguel Angel, Idalia, Lydiá, Margarita, Susana, Alejandro, Jesús, Luis y Edgar.
Arturo, Julieta y Cecilia.

Y el resto de la gente que no anoté, pero de la cual guardo un grato recuerdo.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**