



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Efecto de la clonación y sobre expresión del citocromo *C550*
en los complejos respiratorios durante el crecimiento de
*Bacillus subtilis***

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de Biólogo

PRESENTA:

Becerra-Rivera Victor Antonio

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid

**Unidad de Biomedicina (UBIMED), FES Iztacala, UNAM.
Av. De los Barrios #1. Col. Los Reyes Iztacala.
Tlalnepantla, Edo. de México, 2012.**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo está dedicado a mis Padres y Hermanos, cuyo cariño y apoyo incondicional nutrió mi visión, para culminar esta licenciatura. Y convertirme hoy en Biólogo.

Les agradezco a todas los que hicieron posible este proyecto, a los señores sinodales; Dr. Ramón Víctor Moreno Torres, Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras, Dr. Ricardo Mejía Zepeda, Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid y Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez, quienes se tomaron el tiempo necesario para revisar este manuscrito.

A mi tutora, cuya dirección y paciencia fueron fundaménteles, agradecimientos técnicos a la M. en C. Tecilli Cabellos Avelar, quien me mostró una y otra vez la magia de la Biología Molecular.

Tania Graciela Ortiz Díaz, gracias por ser siempre mi confidente y alentarme siempre que lo necesité. A todos mis compañeros de laboratorio; Led, Ana, Gerardo, Eddisa, Irlanda y Cesar de quienes aprendí todos los días.

A todas las personas que he tenido la fortuna de conocer y han dejado marca en mi. Mario, por convertirte en mi hermano dentro de la Universidad, Ericka, por que tus platicas siempre me dieron una lección de vida, Yolitzin, por todas esas tardes esplendidas que me regalaste, Mariana, por enseñarme que en una persona hay mucho más de lo que ves. Gracias a todos.

A la UNAM y mis Profesores que no solo forjaron mi postura y carácter profesional, sino también me entregaron a mis mejores amigos y compañeros.

Este trabajo se realizó con el apoyo de los donativos: UNAM-DGAPA IN211208, IN221611 y CONACYT 102102.

Índice

Abreviaturas	5
Resumen	7
1. Introducción	10
1.1 Fosforilación oxidativa	10
1.2 Transportadores de electrones	11
1.3 Complejos respiratorios mitocondriales	13
1.4 <i>Bacillus subtilis</i>	17
1.5 Complejo tipo <i>b₆c</i> de <i>B. subtilis</i>	18
1.6 Citocromos <i>c</i> de <i>B. subtilis</i>	19
1.7 Citocromo <i>c</i> oxidasa de <i>B. subtilis</i>	20
2. Antecedentes	21
2.1 Objetivos	23
3. Material y métodos	24
3.1 Cepas y plásmido	24
3.2 Extracción del DNA cromosomal de <i>B. subtilis</i>	24
3.3 Amplificación del gen <i>cccA</i>	25
3.4 Clonación	26
3.5 Transformación de <i>B. subtilis</i> 168	28
3.6 Crecimiento de <i>B. subtilis</i> y obtención de membranas	29
3.7 Determinación de la concentración de proteína de membrana por el método de Lowry	30
3.8 Obtención de espectros de absorción	31
3.9 Geles de poliacrilamida al 14% con Dodecil Sulfato de Litio (DSL _i)	32
3.10 Determinación de actividades enzimáticas de los cuatro complejos respiratorios en membranas aisladas	33
4. Resultados	35
4.1 Clonación del citocromo <i>c₅₅₀</i> de <i>B. subtilis</i>	35
4.2 Rendimiento de células y obtención de membranas de las diferentes cepas utilizadas	39
4.3 Espectros de absorción e identificación de citocromos de las membranas aisladas	40

4.4 Caracterización de proteínas membranales por geles de DSLi y tinción con TMBZ	46
4.5 Identificación inicial de algunas proteínas membranales por geles de DSLi y tinción con Coomasie	48
4.6 Actividad enzimática de los cuatro complejos respiratorios	50
5. Discusión	55
5.1 Rendimiento celular	55
5.2 Citocromos	56
5.3 Perfiles electroforéticos	59
5.4 Actividad de los complejos respiratorios	61
6. Conclusiones	64
7. Perspectivas	64
8. Anexo	65
9. Bibliografía	73

Abreviaturas.

DNA:*	Ácido desoxirribonucleico
EDTA:*	Ácido etilendiaminotetraacético
ADP:	Adenosín difosfato
ATP:	Adenosín trifosfato
BSA:*	Albúmina de suero de bovino
Amp:	Ampicilina
cm:	Centímetro
Cit:	Citocromo
Cm:	Cloranfenicol
AEBFSF:*	Clorhidrato de 4-2 aminoetil-benceno sulfonilo fluoruro
DBH:	Decil hidroxiquinol
DQ:	Decil quinona
DO:	Densidad óptica
dNTP:	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DSLi:	Dodecil Sulfato de Litio
Em:	Eritromicina
FAD:*	Dinucleótido de flavin adenina
FADH:*	Dinucleótido de flavin adenina reducido
FMN:*	Mononucleótido de flavina
FMNH:*	Mononucleótido de flavina reducido
g:	Gramo
H y hrs:	Horas
IPTG:	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Kan:	Kanamicina
Kb:	Kilobases
kDa:	Kilodaltons
L:	Litro
LB:*	Luria Broth
MSR:	Medio Súper Rico
PMS:*	Metosulfato de fenacina
μ g:	Microgramo
μ L:	Microlitro

mg:	Miligramo
mL:	Mililitro
mM:	Milimolar
min:	Minuto
ng:	Nanogramo
nm:	Nanómetros
nmol:	Nanomoles
NAD:*	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH:*	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NADP:*	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato
pb:	Pares de bases
pmol:	Picomoles
QOX:	Quinol oxidasa
rpm:	Revoluciones por minuto
seg:	Segundo
SDH:	Succinato deshidrogenasa
TMBZ:	Tetrametil benzidina
UV:	Ultravioleta
V:	Volts
TTFA:*	2-tenoiltrifluoroacetona
DCPIP:*	2,6-diclorofenolindofenol
X-gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

*: por sus siglas en inglés

Resumen.

El citocromo tipo *c* es una proteína pequeña móvil, que transporta electrones del complejo III a la citocromo *c* oxidasa en el espacio intermembranal. Puede presentarse en dos formas en las bacterias: como una proteína periplásmica soluble ó anclada a la membrana por una extensión hidrofóbica en el N-terminal. El citocromo tipo *c* de *B. subtilis* está codificado por el gen *cccA* y es llamado citocromo *c₅₅₀*. Esta proteína de 12.6 kDa está compuesta de una α hélice transmembranal y un dominio soluble donde se une covalentemente el hemo localizado en la superficie de la membrana plasmática.

En este trabajo se clonó el gen *cccA* para sobre expresar al citocromo *c₅₅₀* y evaluar si existe un efecto en los complejos respiratorios de *B. subtilis*, crecida en medio LB y MSR (3% succinato). Además, se cosechó en tres tiempos diferentes (5, 9 y 23 hrs. de crecimiento). Las células cultivadas en MSR presentan un rendimiento superior al medio LB (bacterias g/L). La sobre expresión del citocromo *c₅₅₀* se demostró mediante análisis espectrofotométrico de membranas aisladas de estas bacterias. La máxima concentración obtenida para el citocromo *c₅₅₀* fue similar (36.7 y 40.4 μ M) para LB y MSR respectivamente. Sin embargo se requirió el doble del volumen de cultivo LB que en MSR. En geles de poliacrilamida usando DSLi se observó el incremento de la expresión del citocromo *c₅₅₀* en MSR de acuerdo al tiempo, mientras en LB la expresión aumentó de 5 a 9 hrs. y disminuyó a las 23 horas.

La actividad enzimática del complejo I se incrementó significativamente después de las 9 hrs. de crecimiento en medio LB pero en MSR incrementó a las 23 hrs. El complejo II muestra un incremento significativo de actividad en medio MSR en los tres diferentes tiempos de cosecha. Los complejos III y IV presentaron un incremento significativo en su actividad en los dos medios pero sólo a las 9 hrs. Finalmente la actividad del complejo IV se incrementó significativamente entre las 5 y 9 hrs. de crecimiento en ambos medios. Podemos concluir que la sobre expresión del citocromo *c₅₅₀* de *B. subtilis*, varía

dependiendo de la fuente de carbono en la que crece y que los complejos b_6c y caa_3 respondieron a esta sobre expresión.

Abstract.

Cytochrome *c* is a small mobile protein that transports electrons from complex III to the terminal oxidase in the intermembrane space. It can be present in two forms: as soluble periplasmic proteins or attached to the membrane with a hydrophobic N-terminal extension and its mechanism of action is still unknown. The *c*-type cytochrome in *B. subtilis* is encoded by the gene *cccA* and is called cytochrome *c*₅₅₀. This 12.6 kDa protein is composed of a transmembrane binding domain and consists of an α helix and a heme domain. It located as all bacterial *c*-type cytochromes on the outer surface of the plasma membrane.

In this work, we cloned and over expressed the membrane-bound cytochrome *c*₅₅₀ to evaluate its effect on the respiratory complexes in *B. subtilis* grown in LB medium and MSR (3% succinate). We harvested the bacteria at three different times (5, 9 and 23 hrs. of growth). Cells grown in MSR medium gave a higher yield as well as over-expression of cytochrome *c*₅₅₀ demonstrated by spectrophotometric analysis of the isolated membranes of these bacteria. The maximum concentration obtained for cytochrome *c*₅₅₀ was similar (36.7 and 40.4 μ M) for LB and MSR respectively, but it required twice the amount of cells grown in LB than MSR. Polyacrylamide gels using lithium dodecyl sulfate showed that in MSR expression of cytochrome *c* increased according to time. We observed that in LB medium, expression of cytochrome *c*₅₅₀ increases from 5 to 9 hrs. and then decreases at 23 hrs.

The enzyme activity of the four respiratory complexes was measured spectrophotometrically. We found that the complex I activity increased significantly after 9 hrs. of growth in the case of LB medium but in MSR increased at 23 hours. Complex II shows a significant increase in activity in MSR medium at the three different times of harvesting. Complexes III and IV also show a significant increase in the two media but only at 9 hours. Finally, complex IV activity increased significantly only between 5 and 9 hrs. of growth in both media. We can conclude that overexpression of cytochrome *c*₅₅₀ of *B. subtilis*, varies depending on the carbon source.

1. Introducción.

1.1 Fosforilación oxidativa.

La energía que requieren los organismos para cumplir sus funciones se deriva de la oxidación parcial de moléculas ricas en energía libre y es utilizada para formar ATP, a través de un conjunto de reacciones que integran a la glucólisis y que tienen lugar en el citosol (Alberts y cols., 2004). En la historia de la vida se desarrolló un proceso mucho más eficiente conocido como fosforilación oxidativa, que es la culminación del metabolismo energético en organismos aeróbicos. Se basa en utilizar la energía libre de compuestos oxidables por medio de la transferencia de electrones y la translocación de protones a través de membranas impermeables a protones. Todos los pasos oxidativos en la degradación de carbohidratos, grasas y aminoácidos convergen en el escenario de la respiración celular (Nelson y Cox, 2008).

La membrana que se utiliza para producir ATP en organismos eucariontes es la membrana interna mitocondrial, mientras que en células procariontes es la membrana plasmática (Alberts y cols., 2004). En ambas se produce una serie de reacciones de oxidación y reducción acopladas a una transferencia de protones, en un proceso escalonado desde los transportadores reducidos, con potenciales redox negativos, hasta el oxígeno molecular que tiene un potencial redox positivo (Mathews y cols., 2002).

El sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial eucarionte comprende cinco complejos de proteína embebidos en la membrana interna mitocondrial. Primero la energía redox de los sustratos NADH y succinato se convierten en un potencial electroquímico de protones que atraviesa la membrana interna mitocondrial mediante el complejo respiratorio I (NADH: ubiquinona reductasa), el complejo II (succinato: ubiquinona reductasa), el complejo III (ubiquinol: citocromo *c* reductasa), y el complejo IV (citocromo *c* oxidasa) (Fig. 1). El potencial electroquímico de protones es usado por la ATP sintasa o complejo V para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato (Nübel y cols., 2009).

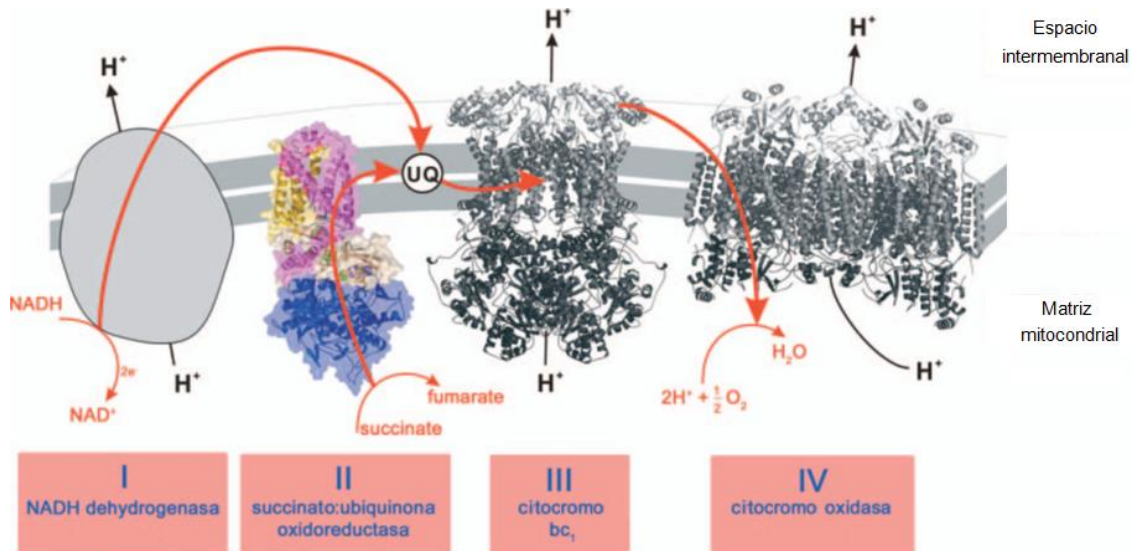


Figura 1. Cadena respiratoria mitocondrial, compuesta por los complejos I al IV y la ubiquinona (UQ) quien funciona como transportador móvil de electrones de los complejos I o II al III. En la figura se muestra la estructura de los complejos II-IV y un esquema del complejo I. El complejo II se acopla a la cadena a través del ciclo de Krebs. La transferencia de electrones se muestra con líneas rojas, el gradiente de protones, que es aprovechado por la ATPsintasa para formar ATP, se observa con líneas negras (Tomado de: Sun y cols., 2005).

1.2 Transportadores de electrones.

Si se compara la secuencia del flujo de electrones entre los transportadores electrónicos respiratorios con sus potenciales redox estándar se puede observar que este valor aumenta en el mismo orden que la secuencia de su uso en el transporte electrónico (Mathews y cols., 2002). Los diversos elementos transportadores de electrones que comprenden las cadenas respiratorias son las flavoproteínas, hemos, centros hierro azufre, quinonas y citocromos, que se asocian para conformar complejos respiratorios (Thony-Meyer, 1997).

El NADH y NADPH son acarreadores de electrones solubles en agua que se asocian reversiblemente a las deshidrogenasas. Por otra parte el nucleótido de flavina oxidado puede aceptar un electrón y formar FADH o FMNH, igualmente captando dos electrones genera FADH₂ o FMNH₂, la transferencia de electrones ocurre favorablemente, ya que las flavoproteínas tienen un elevado potencial redox (Nelson y Cox, 2008).

Los citocromos se definen como hemo-proteínas, su grupo prostético hemo sufre oxidación-reducción como parte de la función de la proteína. Su

clasificación se basa en la estructura química del hemo y cómo se une al polipéptido (Fig. 2). Los citocromos de tipo *a* tienen hemo A, los citocromos tipo *b* contienen hemo B (protohemo IX), los citocromos de tipo *c* poseen protohemo IX unido covalentemente a dos o a un residuo de cisteína, los citocromos *d* albergan un hemo de tipo clorina y los citocromos tipo *o*, tienen el hemo O (von Wachenfeldt y Hederstedt, 1992).

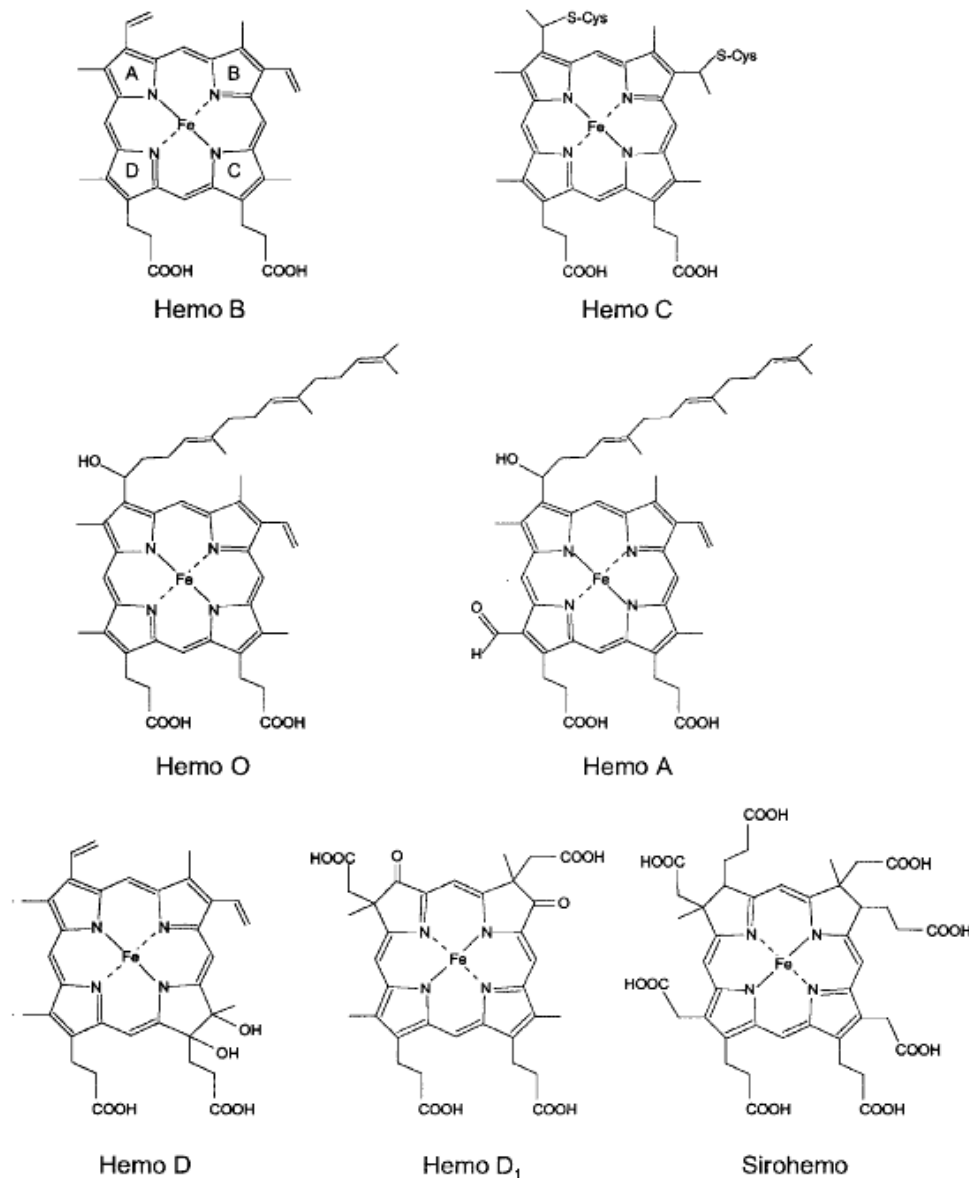


Figura 2. Grupos hemo de citocromos bacterianos. En esta figura, se muestra el hemo C unido covalente por dos enlaces tioéter a las cisteínas del polipéptido. También están indicados los anillos de porfirina (A-D) para el hemo B, la estructura de éste difiere del hemo O en el grupo vinilo del carbono 3 que está sustituido por una cadena de hidroxietil farnesil. El hemo A se distingue del O en su grupo metilo del carbono 18 ya que el anillo tetrapirrol se oxida a un grupo formilo (Tomado de: Thöny-Meyer, 1997).

Los citocromos tienen un espectro de absorción, según el tipo de hemo al que estén asociados. El Fe de la forma oxidada está presente como Fe^{3+} ,

mientras que reducido se presenta como Fe^{2+} , dando lugar a tres picos principales de absorción, los cuales se designan como α , β , y γ . Los picos α (entre 550 y 557 nm) se utilizan para clasificar citocromos tipo *c*. Los tipo *b* y *o* presentan un máximo entre 555 y 565 nm, los citocromos *a* muestran un máximo de 600 nm y alrededor de 630 nm los citocromos tipo *d* (Thöny-Meyer, 1997).

Las proteínas hierro-azufre constituyen la segunda familia de transportadores de electrones y se componen de un átomo de hierro que forma un complejo con un átomo de azufre unido a una o varias cisteínas, en cuatro formas conocidas (FeS , Fe_2S_2 , Fe_3S_4 y Fe_4S_4), formando un centro hierro-azufre en la proteína. Al igual que los citocromos estos centros sólo transportan un electrón a la vez (Alberts y cols., 2004).

El transportador electrónico coenzima Q, también llamado ubiquinona, posee una cola de isoprenos que le proporciona su carácter hidrofóbico, lo que le permite difundir rápidamente a través de la membrana. Ésta lleva los electrones tanto desde el NADH como desde el succinato, como se muestra en la figura 1. Posteriormente la coenzima es oxidada por los citocromos del complejo III mitocondrial, pasando los electrones para su transporte final al O_2 , proporcionando así una interface de conexión de entre los transportadores de dos electrones a los de uno (Mathews y cols., 2002).

1.3 Complejos respiratorios mitocondriales.

Complejo I

La transferencia de electrones dentro del complejo I o NADH deshidrogenasa a su vez aporta energía libre para translocar protones a través de la membrana y generar ATP. El complejo aislado de mitocondrias de bovino se conforma de 7 subunidades codificadas en el genoma mitocondrial y por lo menos 39 en el genoma del núcleo. Homólogos bacterianos tienen 14 subunidades únicamente, de las cuales 7 son homólogas a las codificadas mitocondrialmente y las otras 7 son homólogas a las nucleares en mamíferos.

Esta enzima presenta un brazo hidrofóbico transmembranal y un dominio hidrofílico que contiene un flavín mononucleótido (FMN) unido no covalentemente con varios centros fierro-azufre (Fe_2S_2 - Fe_4S_4). Las reacciones redox exigen la transferencia de electrones desde el NADH, a través del FMN al centro N3. La transferencia electrónica se conecta a través de otros centros fierro-azufre al centro N2, de potencial redox más alto, que probablemente sea el donador inmediato a la ubiquinona (Rich, 2003).

Complejo II

Este complejo también conocido como succinato: ubiquinona oxidoreductasa es un complejo membranal clave en el ciclo de Krebs. Cataliza la oxidación del succinato a fumarato y la reducción de la ubiquinona. Los electrones son transferidos del succinato hacia la ubiquinona a través del FAD y de los centros fierro-azufre, además del hemo tipo *b* el cual forma parte integral del complejo. Esta proteína normalmente consiste en un dímero soluble catalítico y una región integral de membrana. El dímero se compone de la subunidad A con el cofactor FAD unidos covalentemente y la subunidad B que contiene tres centros Fe_2S_2 , Fe_3S_4 y Fe_4S_4 . La región membranal contiene uno o dos péptidos hidrofóbicos con o sin grupos hemo (tipo B para este complejo). Las dos proteínas transmembranales se denominan CybL o subunidad C y CYBS o subunidad D (Sun y cols., 2005).

Complejo III

El complejo citocromo *bc*₁ (quinol: citocromo *c* óxido reductasa) constituye una superfamilia de enzimas presentes en las cadenas de transferencia de electrones fotosintética y respiratoria en eucariontes y procariontes. Estas enzimas translocan protones a través de la membrana mientras transfieren electrones desde el quinol al citocromo *c*, por un mecanismo conocido como ciclo Q. El núcleo funcional está compuesto por el citocromo *b*, una proteína fierro-azufre y el citocromo *c*₁. Estas tres subunidades contienen grupos prostéticos redox: un centro Fe_2S_2 , un hemo C y dos hemos B (Fig. 3) (Sone y cols., 2001; Rich, 2003).

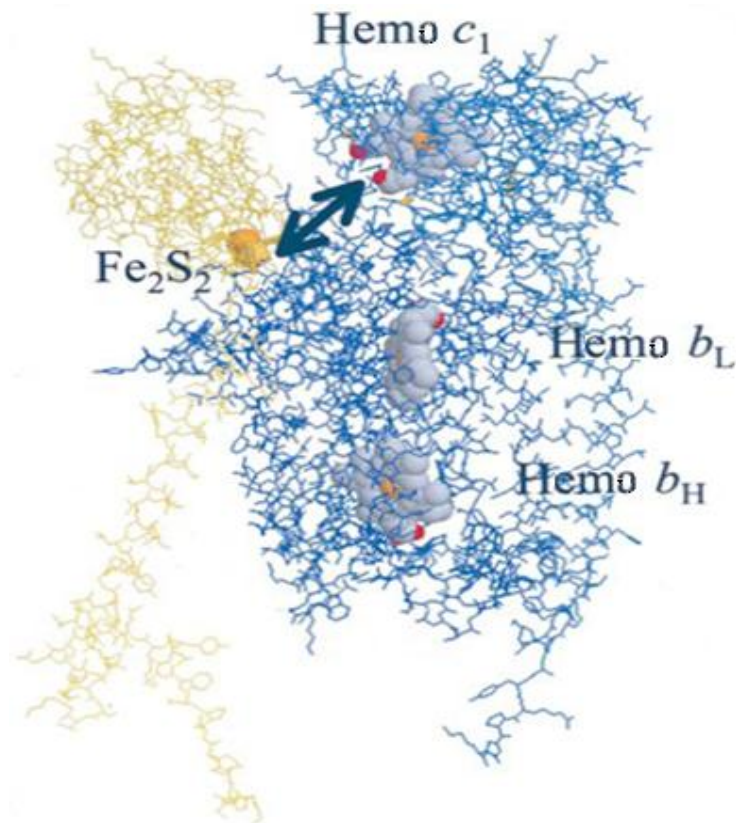


Figura 3. Estructura del dominio catalítico del complejo bc_1 de bovino, centro hierro-azufre (amarillo), citocromo c_1 y citocromo b se muestran con sus grupos prostéticos (azul), la flecha indica el movimiento propuesto de la proteína hierro-azufre (Tomado de: Rich, 2003).

Este complejo tiene su análogo en organismos fotosintéticos, el complejo b_6f , el cual lleva acabo la óxido-reducción del plastoquinol a la plastocianina, mediando el flujo de electrones entre el fotosistema II y el fotosistema I, también contribuye a la creación de una gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal que se utilizan para la generación de ATP. El complejo b_6f consta de cuatro subunidades principales; el citocromo f (29 kDa), el citocromo b_6 (24 kDa, similar a los primeros cuatro cruces transmembranales de los citocromos b), la proteína hierro-azufre (22 kDa), y la subunidad IV (18 kDa, similar a los últimos tres segmentos transmembranales de los citocromos b), con excepción de esta última, todas las subunidades presentan centros de reacción; el citocromo f contiene un grupo hemo tipo C, el citocromo b_6 dos hemos tipo B, además del recién descubierto hemo X y la proteína hierro-azufre con un centro Fe_2S_2 (Stephan-Olav y cols., 2005).

Citocromo *c*

El citocromo de tipo *c* es una proteína monomérica móvil hidrosoluble con un hemo C como grupo prostético, que transporta electrones del complejo III hacia la oxidasa terminal en el espacio intermembranal. Puede presentarse en dos formas: como proteína soluble periplásmica o unido a la membrana con una extensión hidrófoba en la región N-terminal (Thöny-Meyer, 1997). Se ha propuesto que la transferencia de electrones al hierro del hemo del citocromo *c* ocurre mediante un ataque periférico en los bordes expuestos del hemo ó a través de una porción de la proteína a un ligando axial del hierro hemo (Inji y cols., 2005).

Complejo IV

El complejo IV ó citocromo *c* oxidasa y el citocromo *c* interactúan durante el proceso de la respiración mitocondrial y de bacterias aerobias, al transferir electrones al O₂. La citocromo *c* oxidasa mitocondrial está compuesta por hasta 13 subunidades individuales, las tres más grandes (I-III) se expresan en el genoma mitocondrial y se encuentran dentro del grupo de oxidasas hemo-cobre, las otras subunidades están codificadas en el genoma nuclear (Andrews y cols., 2005). Los centros catalíticos de este complejo que transfieren los electrones del citocromo *c* al oxígeno están unidos a las subunidades I y II. La subunidad I contiene dos hemos A, denominados citocromo *a* y *a*₃ respectivamente, además de uno de los dos centros de cobre, Cu_B. La subunidad II está compuesta de dos hélices transmembranales en el N-terminal, seguidos de un dominio soluble expuesto a la superficie externa de la membrana, dentro de este dominio encontramos el centro Cu_A (Andrews y cols., 2005). Acoplado a la reducción del oxígeno, este complejo también funciona como “bomba” al translocar cuatro protones a través de la membrana al espacio intermembranal mitocondrial, generando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. Con la reducción total de la citocromo *c* oxidasa, se determinó que se liberan 2.4 H⁺, de los cuales 0.4 parecen estar asociados al centro Cu_A y los dos restantes al centro binuclear *a*₃-Cu_B (Michel y cols., 1998).

1.4 *Bacillus subtilis*.

La bacteria aeróbica Gram positiva *B. subtilis* es un microorganismo con forma de bastón que produce endosporas, comúnmente se encuentra en el suelo, fuentes de agua y en asociación con plantas. Este organismo y sus parientes cercanos son una importante fuente de enzimas, por lo que son de gran interés comercial tanto industrial como médico. *B. subtilis* es uno de los procariontes de los que se dispone gran cantidad de información, incluyendo la secuencia del genoma de la cepa 168, el cual consiste en un cromosoma circular de 4.2 Mega pares de bases (Kunst y cols., 1997).

El metabolismo de este microorganismo le permite desarrollarse bajo condiciones anóxicas, empleando nitrato o nitrito como aceptores terminales de electrones, también presenta un metabolismo fermentativo en ausencia de oxígeno, aunque preferentemente crece aeróbicamente (Sonenshein y cols., 2002). El sistema respiratorio de *B. subtilis* se compone de varias deshidrogenasas; NADH deshidrogenasa (tipo 2), succinato deshidrogenasa y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, que transfieren electrones a la poza de menaquinona 7, la cual es oxidada por el complejo tipo *bc* (menaquinol: citocromo *c* reductasa), quien finalmente reduce al complejo citocromo *c* oxidasa. Este sistema también incluye al citocromo *c*₅₅₀ que tiene un cruce transmembranal, además de un segundo citocromo identificado como *c*₅₅₁ que tiene una unión a fosfolípido (Bengtsson y cols., 1999). Alternativamente el menaquinol puede ser oxidado aeróbicamente por al menos dos quinol oxidadas (Fig. 4) (Azarkina y cols., 1999).

El conocimiento de los componentes de la vía respiratoria aeróbica de *B. subtilis* se ha expandido rápidamente durante los últimos años. Ahora se sabe que todos los citocromos de esta bacteria están unidos a la membrana y exhiben una composición muy compleja (von Wachenfeldt y Hederstedt, 1992). Características particularmente interesantes pueden observarse en el complejo menaquinol: citocromo *c* reductasa, el cual no solo cumple con el transporte de electrones del menaquinol a un citocromo tipo *c*, sino que contribuye a la formación de un gradiente transmembranal de protones.

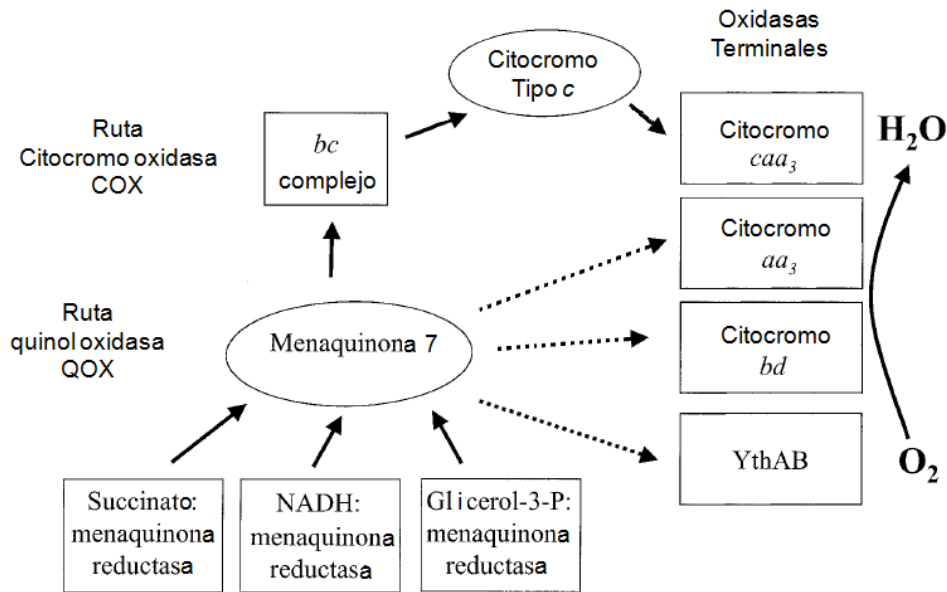


Figura 4. Cadena respiratoria de *Bacillus subtilis*, menaquinona 7, citocromo c, citocromo c oxidasa (COX), quinol oxidasa (QOX). La ruta clásica de oxidación se indica con flechas continuas, mientras la ruta alterna con flechas discontinuas (Tomado de: Azarkina y cols., 1999).

1.5 Complejo tipo *b₆c* de *B. subtilis*.

Se sabe que estas proteínas constituyen una gran súper familia de enzimas altamente conservadas en diversas especies, por lo cual se ha podido aislar tanto de bacterias y mitocondrias (tipo *bc₁*) como de cloroplastos y cianobacterias (tipo *b₆f*), lo que ha servido para describir y comparar estos complejos. En *B. subtilis* este complejo está codificado por el operón *qcrABC* (Fig. 5), el cual tiene tres subunidades: QcrA es una proteína hierro-azufre y tiene de 43 a 55% de similitud con la proteína hierro-azufre de los complejos *bc₁/b₆f*. QcrB parecido en tamaño y secuencia a los citocromos tipo *b₆*, con un 44 a 47% de identidad y un 69 a 72% de similitud, igualmente muestra identidad de un 33 a 40% y un 59 a 68% de similitud con la parte N-terminal de los citocromos *b* del complejo *bc₁*. QcrC presenta similitud de un 45 a 54% con el citocromo *c* de los complejos *bc₁/b₆f*, esta proteína es una fusión del citocromo tipo *c* con lo parece una subunidad IV (fotosintética), al mostrar 21 a 33% de identidad y 51 a 57% de similitud con en la región N-terminal de la proteína QcrC (Yu y cols., 1995).

Este complejo presenta un hemo unido covalentemente, denominado hemo X en el citocromo tipo *b*. La presencia de una cisteína en la posición 43, la cual

está conservada en todos los organismos que tienen un citocromo tipo b_6 y que corresponde a la cisteína 35 en cloroplastos y cianobacterias en los cuales la estructura cristalográfica reveló un tercer hemo covalentemente unido (Yu y cols., 1998).

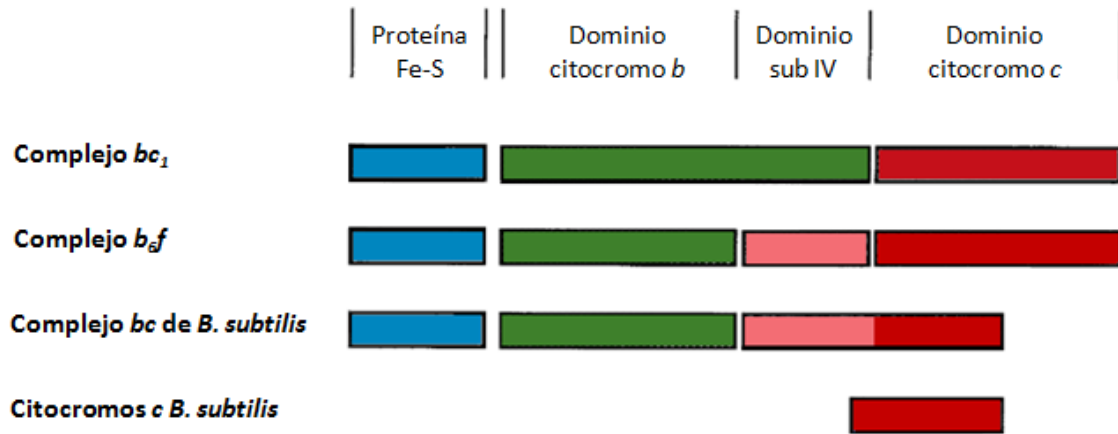


Figura 5. Organización y comparación esquemática de las subunidades proteicas de los complejos tipo bc_1 , b_6f y bc de *B. subtilis*, además de sus pequeños citocromos c . También se muestra la división del citocromo b en dos polipéptidos, el citocromo b_6 y la subunidad IV. (Tomado de: Yu y cols., 1995).

Otro estudio empleando secuencias de citocromos tipo b para elaborar un árbol filogenético, que incluye citocromos b_6 de plástidos y cianobacterias, además de citocromos b proteobacterianos y mitocondriales indica que las secuencias de los citocromos b de organismos como *Chlorobium limicola*, *Heliobacillus mobilis* y *B. subtilis* conforman un nuevo clado, el grupo de los citocromos tipo b_6c (Sone y cols., 2001).

1.6 Citocromos c de *B. subtilis*.

El citocromo tipo c , está codificado por el gen *cccA* y se denomina citocromo c_{550} . Esta proteína de 12.6 kDa se compone de un dominio de unión transmembranal que consiste en una α hélice de 30 residuos y un dominio hemo de 74 residuos, localizado en la superficie externa de la membrana citoplasmática. Mediante el análisis de la secuencia del genoma de esta bacteria se encontró al gen *cccB* que codifica para otro citocromo c denominado c_{551} unido a la membrana por un lípido (Fig. 6). La secuencia muestra cerca de un 35% de identidad a *cccA* además de tener el motivo

consenso CXXCH (presente en todos los citocromos *c*) en la parte C-terminal del polipéptido (Bengtsson y cols., 1999).

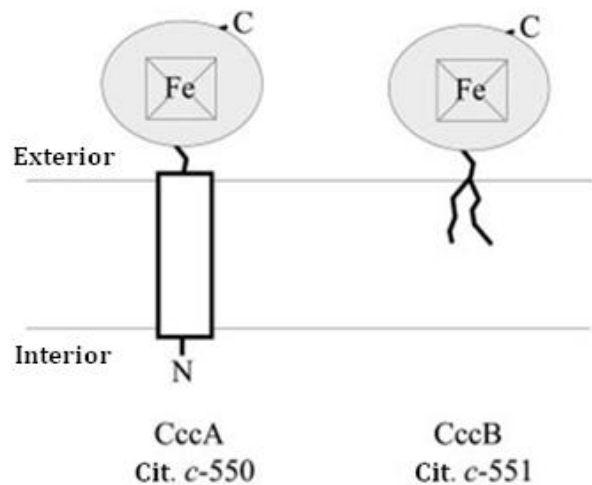


Figura 6. Representación esquemática de los citocromos c_{550} (*cccA*) y c_{551} (*cccB*) anclados a la membrana de *B. subtilis* mediante un segmento transmembranal y una unión a fosfolípido, respectivamente. (Tomado de: Bengtsson y cols., 1999).

1.7 Citocromo *c* oxidasa de *B. subtilis*.

El complejo IV o citocromo *c* oxidasa tipo *caa₃* está codificada por los genes *ctaBCEF*, pertenece a la familia de oxidasas hemo-cobre. La subunidad II tiene 100 aminoácidos extra en el C-terminal (similares con su homólogo mitocondrial), esta extensión codifica para un grupo hemo C (Andrews y cols., 2005). Además del bombeo de protones para la producción de energía, se sabe que este complejo se expresa preferentemente durante el crecimiento en sustratos no fermentables como el succinato y en fase estacionaria (Winstedt y cols., 2000).

B. subtilis es un organismo de metabolismo aeróbico con un complejo *bc* de características fotosintéticas, que interactúa con un citocromo c_{550} membranal. Debido a este cruce transmembranal este citocromo puede formar interacciones más estables con los complejos respiratorios *b₆c* y *caa₃*, por lo que es de gran interés el estudio del posible efecto que tendrá sobre expresar al citocromo c_{550} en la cadena respiratoria de *B. subtilis*, para conocer aspectos de su función y regulación

2. Antecedentes.

Para identificar factores en la expresión de los genes de la toxina del ántrax en *B. anthracis*, Wilson y cols., 2009 obtuvieron cepas mutantes en la biosíntesis y maduración de los citocromos *c*. Este trabajo reveló a los citocromos *c₅₅₀* y *c₅₅₁* como reguladores en la expresión del gen de la toxina, afectando a su vez la expresión de *Atxa* (gen maestro regulador de virulencia). La desregulación de este gen a principios de la fase exponencial dio lugar a una mayor expresión de los genes de la toxina, como respuesta a la pérdida de los citocromos *c*.

Inji y cols., 2005 investigaron el efecto de la sobre expresión del gen del citocromo *c₅₅₀* durante la esporulación de *B. subtilis* y observaron que ésta se acelera significativamente, mientras que en mutantes carentes de este gen se retrasa. Mediante un análisis por la técnica de Northern blot se demostró que la cepa que sobre expresa al gen *cccA* presentan un alto nivel de transcripción del gen *spo0A* (elemento regulador de la iniciación de la esporulación), a diferencia de la mutante carente del gen *cccA*, que rara vez expresa el *spo0A*. Estos datos sugieren que aunque el citocromo *c₅₅₀* es prescindible para el crecimiento y la esporulación, pero puede desempeñar un papel importante para la iniciación de la esporulación mediante la regulación de la expresión de *spo0A*.

Monedero y cols., en el 2001 demostraron que citocromo *c₅₅₀* de *B. subtilis* codificado por el gen *cccA* es regulado mediante represión catabólica. Usando cepas con una fusión *cccA-lacZ*, las cuales al cultivarlas en medio sólido formaron colonias de color azul, mientras al crecerlas en presencia de glucosa se obtuvieron colonias blancas. Con lo anterior se propuso que al igual que en la mayoría de los genes y operones reprimidos catabólicamente, el gen *cccA* de *B. subtilis* parece contener un elemento de respuesta catabólico (CRE, un operador reconocido por el CcpA), sobrepuesto a la región -35 del promotor.

Otros elementos del sistema respiratorio de esta bacteria han sido clonados, Hägerhäll y cols., 1992 sobre expresaron al complejo Succinato:

menaquinona oxidoreductasa de *B. subtilis*, al clonar el operón *sdhCAB* en un plásmido con bajo número de copias (pHP13) y lograron purificarlo utilizando Tritón X-100. Esta enzima cataliza la reducción de diferentes quinonas y además se demostró la presencia de dos protohemos IX por complejo; característica diferente a la de las SDH mitocondriales que tienen un hemo por complejo.

En 1998 Winstedt y cols., caracterizaron la biosíntesis del complejo citocromo oxidasa *bd* de *B. subtilis* mediante la clonación y expresión total y parcial del operón *cydABCD*. Reportaron que los productos de los genes *cydC* y *cydD* se requieren para ensamblar un citocromo *bd* funcional, mientras que las subunidades codificadas por los genes *cydA* y *cydB* tienen una función estructural. Mediante experimentos de disrupción se concluyó que los genes *cyd* no tienen efecto aparente en el crecimiento celular.

Objetivo general:

- Evaluar el efecto de la sobre expresión del citocromo c_{550} en los complejos respiratorios durante el crecimiento de *B. subtilis*.

Objetivos particulares:

- Clonar el gene que codifica para el citocromo c_{550} utilizando el plásmido pHP13 para sobre expresarlo en *B. subtilis* 168.
- Crecer a las bacterias transformadas en dos medios: uno con 3% de succinato y en medio LB, a tres diferentes tiempos, 5, 9 y 23 horas.
- Comparar el crecimiento de la bacteria transformada con el plásmido recombinante pHP13-550 contra *B. subtilis* WT y *B. subtilis* pHP13 en los dos medio de cultivo a los tres tiempos de crecimiento.
- Aislar las membranas de las tres bacterias, analizar su contenido de citocromos por medio de espectros de absorción, geles de DSLi-PAGE y actividad de los complejos respiratorios.

3. Materiales y métodos.

3.1 Cepas y plásmido.

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α (stock de laboratorio), *B. subtilis* 168 y el plásmido pHP13 (Fig. 7) fueron adquiridos del *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC) de la Universidad Estatal de Ohio, EUA. Ambos microorganismos fueron mantenidos en medio Luria Broth (LB), que contiene 1% de bactotripton, 5% de extracto de levadura y 1% de NaCl.

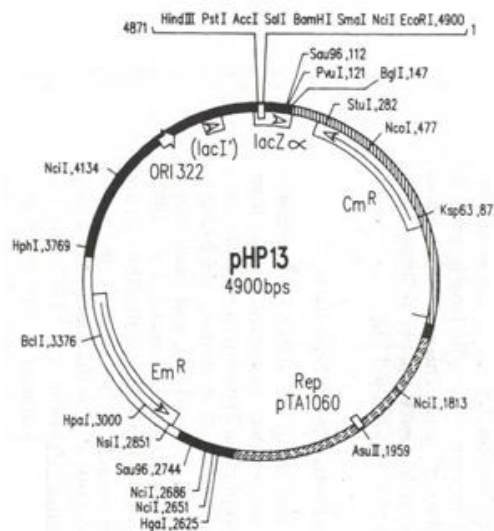


Figura 7. El vector pHP13, es un plásmido de clonación y expresión en *B. subtilis* y *E. coli*, basado en la replicación de funciones de pTA1060 (*B. subtilis*) y pBR322 (*E. coli*). Proporciona resistencia a cloranfenicol (Cm^R) y a eritromicina (Em^R), además de contener el gen *lacZ α* , para selección por la actividad de β - galactosidasa (Tomado de: Harwood y Cutting, 1990).

3.2 Extracción del DNA cromosomal de *B. subtilis*.

El DNA se obtuvo con el kit DNA Purification de Promega, el cual consiste en tres pasos; a) lisis celular, b) eliminación de proteínas y c) precipitación de DNA, como se describe a continuación:

- Un mL de un cultivo de *B. subtilis* crecido por toda la noche a 37 °C con agitación a 200 rpm, se centrifugó a 12,000 rpm (todas las centrifugaciones serán a la misma velocidad) durante 2 min. Las células se resuspendieron en 50 mM EDTA (pH 8.0) y 10 mg/mL en lisozima, para incubarse 45 min. a 37°C, posteriormente se centrifugaron por 2 min. La pastilla resultante se

resuspendió con solución de lisis e incubó a 80°C durante 5 min. (dejando enfriar a temperatura ambiente). Posteriormente se adicionó solución de RNAsa e incubó 40 min. a 37°C.

- b) Se agregó solución para precipitar proteínas, se mezcló e incubó en hielo por 5 min. Terminado el tiempo las células se centrifugaron por 3 min.
- c) El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio con isopropanol absoluto a temperatura ambiente, el cual se centrifugó por 3 min., el sobrenadante se retiró y se agregó etanol al 70%, nuevamente se centrifugó por 2 min., el etanol se eliminó y la pastilla se dejó secar de 10 a 15 min., finalmente el DNA se rehidrató con agua bidestilada estéril.

3.3 Amplificación del gen *cccA*.

Para obtener este gene se diseñaron oligonucleótidos específicos sobre la secuencia reportada del citocromo *c₅₅₀* de *B. subtilis* 168 (Kunst y cols., 1997). Se analizó su capacidad de amplificación por medio del programa de computadora Serial Cloner 2.0. La amplificación se realizó usando el kit para PCR de QIAGEN®, mezclando 1µL de DNA de *B. subtilis*, al cual se le agregó: 0.5 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂ Buffer 10X, 19.5 pmol de cada oligonucleótido, *Taq* polimerasa (5 unidades) y agua bidestilada estéril suficiente para un volumen final de 50 µL.

Se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en un termociclador Eppendorf Mastercycler; la muestra se desnaturalizó a 95°C de 5 a 10 min. (durante el primer ciclo, después por 30 seg.), posteriormente por 20 seg. a 67°C se efectuó el alineamiento y finalmente se polimerizó a 72°C. Estos tres pasos componen un ciclo, de los cuales se realizaron 30.

El amplificado obtenido por PCR (600 pb aproximadamente) se analizó en un gel de agarosa al 1% en TBE (10.9% Trizma base, 5.5% Ácido Bórico y 0.46% EDTA) por electroforesis horizontal a 90 V por 40 min. Se colocaron 5 µL del PCR y marcador de peso molecular de 100 a 1500 pb (Invitrogen), ambos se mezclaron con buffer de carga (0.21% xilen-cianol, 0.21% azul de

Bromofenol, 200 mM EDTA y 50% glicerol) (Eguiarte y cols., 2007). Finalmente el gel se tiñó con 3 μ L SYBR DNA (Invitrogen) por cada 30 mL de agua bidestilada, para observar el patrón de bandas de DNA al exponerlo a luz UV.

3.4 Clonación.

El producto de PCR (gen *cccA*) se ligó al plásmido pCR® 2.1 (Invitrogen) usando T4 DNA ligasa. Esta unión se basa en que la Taq polimerasa agrega una extensión de Poli A en el amplicón que se puede utilizar como “ancla” al vector. Posteriormente se obtuvieron células competentes de *E. coli* DH5 α por RbCl, estas bacterias se crecieron en medio LB a 37°C hasta una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.6, alcanzada esta densidad las células se incubaron 15 min. en hielo e inmediatamente se recuperaron por centrifugación a 3,000 rpm a 4°C por 15 min., para lavarse con buffer RF1 (1.2% RbCl, 0.9% MnCl \cdot 4H $_2$ O, 0.1% CaCl, 15% glicerol y 3% de una solución de KAc 1 M pH 7.5). Las bacterias se incubaron nuevamente en hielo, se centrifugaron (misma condición) y se resuspendieron en 2.6 mL de buffer RF2 (0.1% RbCl, 1.1% CaCl, 15% glicerol y 0.02% MOPS 0.5 M pH 6.8), finalmente estas células se alicuotaron para su almacenaje a -70°C o para su utilización inmediata (Samaniego, 2007).

Estas células competentes se transformaron por choque térmico, usando 5 μ L de ligación (pCR® 2.1+*cccA*). Las bacterias se sembraron en agar LB con 100 μ g/mL de ampicilina y 50 μ g/mL de kanamicina, como método de selección. Además se adicionaron 40 μ g/mL de X-gal y 100mM de IPTG para su incubación por 12 hrs. a 37°C.

Las clonas positivas que contienen el vector más el inserto se seleccionaron por el color blanco que muestran. Esto gracias a que el plásmido contiene al gen *lacZ* (Fig. 7), el cual se interrumpe al llevar a cabo una clonación exitosa. Como consecuencia, las clonas positivas no pueden hidrolizar el X-gal (análogo de la lactosa) y mantienen un color blanquecino a diferencia de las clonas negativas que al metabolizar este compuesto se tornan azules (Harwood y Cutting, 1990).

Las clonas positivas se analizaron en un gel de agarosa al 0.75% tipo cracking en TBE (http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/index.php?page=Cracking_gel_method). Mediante este método se seleccionó una clona positiva de la cual se extrajo el plásmido recombinante que contiene el gen *cccA*, con el Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). A continuación se describe la extracción: se centrifugaron 3 mL del cultivo a 8,000 rpm, las pastillas obtenidas se resuspendieron en 250 μ L de buffer P1 en seguida se añadieron 250 μ L de buffer P2, posteriormente se adicionaron 350 μ L de buffer N3, para mezclarse y centrifugarse 10 min. a 12,000 rpm. El sobrenadante se decantó en una columna QIAprep Spin donde se centrifugó por 1 min. a 12,000 rpm y se desechó, en la columna se agregaron 500 μ L de buffer PB y se centrifugó por 1 min. Nuevamente, se eliminó el sobrenadante y se lavó la columna con 750 μ L de buffer PE, centrifugando 1 min. a 12,000 rpm. para desechar el sobrenadante y una vez más centrifugar 1 min. adicional. Finalmente se colocaron 50 μ L de agua bidestilada estéril en la columna la cual se pasó a un tubo limpio, y se centrifugó 1 min.

El plásmido se digirió a 37°C con la enzima de restricción *EcoRI* (Promega®) por 12 hrs, para su análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE (Eguiarte y cols., 2007). Una vez verificado el tamaño correcto del gen *cccA*, se purificó usando el Kit QIAquick Gel Extraction. El fragmento de interés se cortó del gel para agregar buffer QG en una relación 3:1 e incubar 10 min. a 50°C. Una vez disuelto el fragmento se le agregó isopropanol 1:1 e inmediatamente se mezcló, esta reacción se pasó a un columna QIAquick donde se centrifugó a 12,000 rpm (siempre se usó la misma velocidad y tiempo) desechando el sobrenadante para agregar 500 μ L de buffer QG y volver a centrifugar. La columna se lavó adicionando 750 μ L de buffer PE la cual se centrifugó, el sobrenadante obtenido se desechó y se realizó una centrifugación adicional. Finalmente la columna se pasó a un tubo limpio donde el DNA se eluyó en 50 μ L de agua destilada estéril con ayuda de una última centrifugación. Para corroborar la purificación del gen se realizó una electroforesis del DNA resultante en un gel de agarosa al 1% en TBE (Eguiarte y cols., 2007).

Por otra parte el vector pHP13 fue digerido con *EcoRI* 12 hrs. a 37°C para ligarse a *cccA* con T4 DNA ligasa (Invitrogen) por 3 hrs. a 22°C y 12 hrs. a 4°C. Posteriormente se procedió a transformar células competentes por RbCl (Samaniego, 2007) de *E. coli* DH5 α , agregando 5 μ l de ligación e incubándolas por 45 min. en hielo, inmediatamente se sometieron a un choque térmico de 42°C por 90 seg., para agregar 500 μ L de medio Psi Broth (1% de bactotriptona, 5% de extracto de levadura y 1% de NaCl, 4 mM MgSO₄ y 10 mM KCl) e incubarlas por 2 hrs. a 37°C en agitación a 150 rpm. Estas células se sembraron en agar LB con 20 μ g/mL cloranfenicol, 10 μ g/mL eritromicina, 50 μ g/mL X-gal e 50 μ g/mL IPTG, y se incubaron durante 12 hrs. a 37°C, las colonias obtenidas se seleccionaron por su coloración blanca o azul.

Las clonas positivas a la prueba X-gal e IPTG se analizaron en un gel de agarosa al 0.75% tipo cracking en TBE (http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/index.php?page=Cracking_gel_method), para detectar los plásmidos del tamaño esperado (pHP13-550, 5,500 pb aproximadamente). Las clonas con un peso molecular cercano se cultivaron en medio LB líquido con 20 μ g/mL cloranfenicol y 10 μ g/mL eritromicina por 12 hrs. en agitación a 200 rpm a 37°C. La extracción del plásmido de estas bacterias se realizó con el Kit QIAprep Spin Miniprep y el plásmido pHP13-550 (5,500 pb) se sometió a una digestión con *EcoRI* (12 unidades), se verificó la presencia del gen *cccA* al correr un gel de agarosa al 1% en TBE (Eguiarte y cols., 2007).

3.5 Transformación de *B. subtilis* 168.

Se creció la cepa de *B. subtilis* 168 en una placa de LB agar durante 12 hrs. a 37°C. Este cultivo se usó para inocular 6.5 mL de medio A (10% de medio base [10 g extracto de levadura, 2 g casaminoácidos, 100 mL de glucosa al 50% por L] y 9% de sales [20 g (NH₄)₂SO₄, 183 g K₂HPO₄·3H₂O, 60 g KH₂PO₄, 10 g citrato de sodio y 2 g MgSO₄·7H₂O por L]) entre 0.1-0.2 de densidad óptica (DO_{650nm}). El crecimiento de este cultivo se siguió en un espectrofotómetro Biomate Thermo (calibrando con medio A como blanco) cada 60 min. hasta obtener la t₀, entre 0.4-0.6 de DO_{650nm} a 200 rpm y 37°C. Alcanzada la densidad óptica la incubación continuó durante 90 min., para

llegar a la t_{90} donde 50 μL de este cultivo se transfirieron a 450 μL de medio B (medio A, con 0.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.66 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), donde se incubaron 90 min. a 37°C en agitación a 200 rpm. Inmediatamente estas células fueron transformadas con 100 ng de ambos plásmidos (pHP13 y pHP13-550), se incubó las bacterias 30 min. más y se transfirieron a placas de agar LB con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol, adicionadas con 0.02 mg/ml triptofano. Estas bacterias fueron crecidas durante 12 hrs. a 37°C (<http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf>).

El plásmido se extrajo de las clonas resultantes usando el Kit QIAprep Spin Miniprep con las modificaciones para *B. subtilis* (www.qiagen.com/literature/handbooks/default.asp). El plásmido aislado se analizó por medio de la digestión con enzimas de restricción y por secuenciación, en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Para esta última se diseñaron oligos específicos para el sitio de multiclonaje, mediante programa de computadora Serial Cloner 2.0, basándose en la secuencia reportada del vector pHP13.

3.6 Crecimiento de *Bacillus subtilis* y obtención de membranas.

Las clonas de *B. subtilis* 168 WT, *B. subtilis* pHP13 y *B. subtilis* pHP13-550 se crecieron en 10 mL del medio requerido posteriormente, durante 12 hrs. a 250 rpm y 37°C para inocular 1 L de Medio Súper Rico (MSR) que contiene 2.5% de bactotripton, 2% de extracto de levadura, 0.3% de K_2HPO_4 y 3% de succinato de sodio pH 7.5, suplementado con 300 $\mu\text{L}/\text{L}$ de solución de micronutrientes (2.2g MnCl_2 , 0.5g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g H_3BO_3 , 0.016g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.025g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.46g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.5 mL H_2SO_4 concentrado para cada 100 mL) y 2 L de medio LB (las bacterias con plásmidos se crecieron con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol). Las diferentes bacterias se cultivaron por 5, 9 y 23 hrs. en ambos medios.

Se procedió a cosechar los cultivos, centrifugándolos 20 min. a 5,000 rpm en una centrífuga con rotor GSA Sorvall Evolution. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en amortiguador 100 mM de fosfatos (pH 6.6), para nuevamente centrifugar 10 min. a 11,000 rpm en un rotor SS-34. El

sobrenadante se desechó y se obtuvo el peso húmedo de éstas, finalmente se almacenaron a -20°C (Konings y Freese, 1972).

Las membranas de las tres cepas de *Bacillus* crecidas en todas las condiciones se obtuvieron mediante lisis celular. Las bacterias cosechadas se resuspendieron a una concentración de 30g por litro en amortiguador 50 mM de fosfatos de potasio (pH 8.0). También se añadió 0.13 mM de inhibidor de proteasas AEBSF, 0.3 g/L lisozima, 10 mg/L DNAsa y 10 mg/L RNAsa. Las células se incubaron por 15 min. a 37°C y 140 rpm, después se adicionó 10 mM MgSO_4 y 20 mL/L de una mezcla de inhibidores de proteasas (250 mM ϵ -aminocapróico, 2 mM EDTA), y se incubó bajo las mismas condiciones 30 min., terminado el tiempo se agregó 15 mM EDTA y se incubó por 2 min. e inmediatamente se añadió 20 mM MgSO_4 . Los siguientes pasos se realizaron en frío, las células se centrifugaron a 5,000 rpm, 20 min. con un rotor GSA, se recuperó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 11,000 rpm, por 42 min. Se desechó el sobrenadante, el pellet con las membranas se resuspendió con amortiguador 100 mM de fosfatos de potasio (pH 6.6), para centrifugar 15 min. a 15,000 rpm en un rotor SS-34, la pastilla resultante se resuspendió en el volumen mínimo del mismo amortiguador de fosfatos y finalmente se agregó glicerol (1:1) y 0.1 mM de AEBSF. Las membranas se almacenaron a -20°C (Hägerhäll y cols., 1992; Hederstedt, 1986).

3.7 Determinación de la concentración de proteína de membrana por el método de Lowry.

La cuantificación de proteína total de las membranas obtenidas se realizó con este método espectrofotométrico modificado por Markwell para proteínas de membrana, mediante la interpolación de los valores de absorbancia en una curva patrón. Esta se construyó con albúmina de suero de bovino (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BSA), medida en un espectrofotómetro Biomate Thermo a 750 nm (Lowry, 1951 y Markwell, 1978). Tanto la curva como las muestras problema se hicieron por duplicado (ver Tabla 1).

Tabla1. Volúmenes requeridos para construir la curva patrón e incorporar las muestras problema.
^aSolución A (2% Na₂CO₃, 0.4% NaOH, 0.2% NaK tartrato de sodio-potasio y 1% SDS por L), Solución B (4% CuSO).

Tubo	Agua	BSA o Problema	Solución AB ^a (1mL de B + 99mL de A)		Folin-agua (1:1)	
0 µL	200 µL	0 µL de BSA	1 mL		100 µL	
10 µL	190 µL	10 µL de BSA	1 mL	M	100 µL	M
20 µL	180 µL	20 µL de BSA	1 mL	E	100 µL	E
40 µL	160 µL	40 µL de BSA	1 mL	Z	100 µL	Z
80 µL	120 µL	80 µL de BSA	1 mL	C	100 µL	C
150 µL	50 µL	150 µL de BSA	1 mL	L	100 µL	L
200 µL	0 µL	200 µL de BSA	1 mL	A	100 µL	A
20 µL	180 µL	20 µL de problema	1 mL	R	100 µL	R
40 µL	160 µL	40 µL de problema	1 mL	incubar 10 min.	100 µL	incubar 30 min.
80 µL	120 µL	80 µL de problema	1 mL		100 µL	

3.8 Obtención de espectros de absorción.

Se realizaron espectros de absorción a las diferentes membranas aisladas con un espectrofotómetro de doble haz, doble longitud de onda, marca Aminco DW2 con modernización de OLIS. Primeramente, se obtuvo una línea base con amortiguador 50 mM de fosfatos de potasio (pH 7) en un rango de 400 a 650 nm de longitud de onda. A continuación, se realizó un espectro de las membranas oxidadas. El procedimiento se repitió para obtener otro espectro de las membranas reducidas, agregando a la muestra ditionita.

Con estos espectros, se realizó un espectro diferencial, restando el espectro oxidado al reducido. Así, se identificaron los citocromos por su pico alfa de absorción (citocromo *c*: 550 nm, citocromo *b*: 560 nm, citocromo *a*: 600 nm). Se usaron los coeficientes de extinción para *B. subtilis* de 19.1 mM⁻¹ cm⁻¹ para cit *c* + *c*₁, 20 mM⁻¹ cm⁻¹ para cit *b* del complejo *bc*, 16.5 mM⁻¹ cm⁻¹ para cit *a* de la citocromo oxidasa y con la ecuación de la ley de Lambert-Beer se obtuvo la concentración µM de citocromos y a continuación la cantidad relativa expresada en nmoles de cada citocromo por mg de proteína (de Vrij y cols., 1987).

3.9 Geles de poliacrilamida al 14% con Dodecil Sulfato de Litio (DSL_i).

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (al 14%-DSL_i 10%, a 4°C) de las diferentes membranas aisladas en cada grupo (colocando la misma cantidad de proteína), en condiciones nativas para preservar lo mejor posible las proteínas, ya que el DSL_i utilizado no se precipita en frío (Broglie y cols., 1980).

Se usó una proporción de detergente:proteína de 10 µg DSL_i:µg proteína. Las muestras se trataron a 4°C, utilizando una mezcla digestora para cada muestra (12% glicerol, 62.5 mM Tris pH 6.8, 1 mM AEBSF e inhibidor de proteasas de Roche 2 ml por cada 50 ml de muestra). También se emplearon marcadores de peso molecular no teñidos (con un rango de: 225-10 kDa, Promega).

El gel (ver preparación en Tabla 2) se corrió con un buffer inferior (0.78% de Tris y 5.04% de glicina) y un buffer superior (1 mM de EDTA, 0.1% de DSL_i, 0.78% de Tris y 5.04% de glicina) a 50 V durante 3 hrs. una vez pasado el gel concentrador, el voltaje se modificó a 140 V durante 20 hrs.

Tabla 2. Composición de los geles separador y condensador, volúmenes para un gel de 0.2 cm de espesor, usando placas de 20 x 21.5 cm.

Gel de separación 14% acrilamida		Gel de condensación 5% acrilamida	
2M Tris pH 8.8	12 ml	2M Tris pH 6.8	975 µl
10% DSL _i	600 µl	10% DSL _i	150 µl
30% Acrilamida		30% Acrilamida	
0.938% bis	28 ml	0.938% bis	2.4 ml
10% Persulfato de NH ₄	180 µl	10% Persulfato de NH ₄	45 µl
TEMED	60 µl	TEMED	15 µl
Agua	19.16 ml	Agua	9.75 ml

Terminada la electroforesis se tiñó el gel con tetrametil benzidina (TMBZ), usando una solución 6.3 mM benzidina en metanol de la cual se mezclaron 3 partes de bencidina en metanol con 7 partes de 250 mM acetato de sodio (pH 5.0). El gel fue sumergido en esta solución en agitación y

obscuridad a 55 rpm de una a dos horas. Después de este tiempo se agregó 30mM H₂O₂, la agitación continuó por 20 min. (máximo) para observar un patrón de bandas verdosas, perteneciente a las proteínas que contienen grupos hemo. Posteriormente el gel se lavó dos veces en una solución de isopropanol con acetato de sodio (250 mM, pH 5.0) en una proporción 3:7 respectivamente, para eliminar los residuos de bencidina (Thomas, 1976). Finalmente la imagen se capturó con un escáner Hp Scanjet 4070 Photosmart para su análisis y obtener la masa molecular aparente de las bandas con ayuda del programa de computadora Image Gauge 4.0 FUJIFILM.

A continuación se realizó una tinción con azul de Coomasie con una solución de 0.25% azul brillante de Coomasie R, 50% metanol, y 10% ácido acético, durante 12 hrs. a temperatura ambiente. Los excesos de la tinción se eliminaron con una solución de 15% metanol y 10% ácido acético (Laemmli, 1970). El gel se escaneó para su análisis, y se obtuvo la masa molecular aparente de las bandas más sobresalientes con ayuda del programa de computadora Image Gauge 4.0 FUJIFILM, a partir del marcador de peso molecular (con un rango de: 10-225 kDa, Promega).

3.10 Determinación de actividades enzimáticas de los cuatro complejos respiratorios en membranas aisladas.

Se realizaron ensayos para medir la actividad enzimática de los complejos I, II, III y IV (NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, menaquinol: citocromo *c* reductasa y citocromo *c* oxidasa respectivamente). Se utilizó un espectrofotómetro tipo doble haz, doble longitud de onda marca Aminco DW2 con modernización de OLIS (usando modo DUAL donde 2 haces de luz con diferentes longitudes de onda pasan en la misma muestra). El ensayo I para los complejos III y IV, fue realizado a 550 y 540 nm, donde se siguió la óxido-reducción del citocromo *c* de corazón de caballo. Se ajustó la absorbancia a cero con amortiguador de actividad (50 mM fosfatos de potasio pH 7, 250 mM sacarosa, 0.2 mM EDTA pH 8 y 0.01% Tween-20) y se agregó 10 µM citocromo *c* reducido. A continuación se agregaron las membranas de *B. subtilis* o las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* como control (0.3 mg

de proteína para ambos), después 8 μM rotenona, 1 mM NaCN, 5 mM succinato de Na, 30 μM citocromo *c* oxidado, 2 mM TTFA, 1 mM EDTA, 50 μM DBH₂ (200 μM DBH₂ para *B. subtilis*), y 1 μM antimicina. Para determinar la velocidad de reducción (u oxidación) del citocromo *c*, se usó el coeficiente de extinción del citocromo *c* ($19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, de Bénit y cols., 2006) y la ecuación de la ley de Lambert-Beer con las pendientes obtenidas en cada adición.

En el ensayo 2 se midió la actividad de los complejos I y II usando longitudes de 600 y 750 nm (modo DUAL) en el cual se siguió la reducción del 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP). Se ajustó a cero de absorbancia con amortiguador de actividad con azida de Na, (igual al buffer de actividad más azida de Na 1 mM) al cual se le agregó, mitocondrias o membranas (0.3 mg de proteína) y posteriormente 1 mM NaCN, 40 μM DCPIP, 50 μM NADH, 8 μM rotenona, 40 μM DCPIP, 5 mM succinato de Na, 1 mM PMS, 4 mM TTFA, 40 μM DCPIP opcional y 80 μM DQ. Finalmente haciendo uso del coeficiente de extinción del DCPIP ($22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, de Vrij y cols., 1987) se calculó su velocidad de reducción utilizando las pendientes obtenidas del trazo y ecuación de la ley de Lambert-Beer (Bénit y cols., 2006).

Los datos obtenidos con estos ensayos se sometieron a un análisis estadístico (t-Student) para verificar si existen diferencias significativas en la variación de la actividad obtenida de los diferentes complejos respiratorios.

4. Resultados.

4.1 Clonación del citocromo *c₅₅₀* de *B. subtilis*.

Para sobre expresar al citocromo *c₅₅₀* de *B. subtilis*, se amplificó el gen *cccA* por PCR (Figura 8A), usando los oligonucleótidos 5`-GGAAAGCTTCAAAATCTAATTCCATATTTTCTATTGTAAG-3` (se muestra el sitio *Hind*III en la secuencia subrayada) y 5`GGAATTCTATTTAATTTTTGACACCCACTCTGCATA-3` (se muestra el sitio *Eco*RI en la secuencia subrayada). Estas secuencias fueron modificadas para ligar el gene amplificado al vector pHP13 utilizando los sitios *Eco*RI generados. El fragmento amplificado tuvo el tamaño esperado de 600 pb aproximadamente y se observó que no existieran bandas de amplificaciones inespecíficas contaminando el producto para proceder a clonarlo en el plásmido pCR® 2.1 y obtener una construcción estable con este gen y mayor cantidad del mismo.

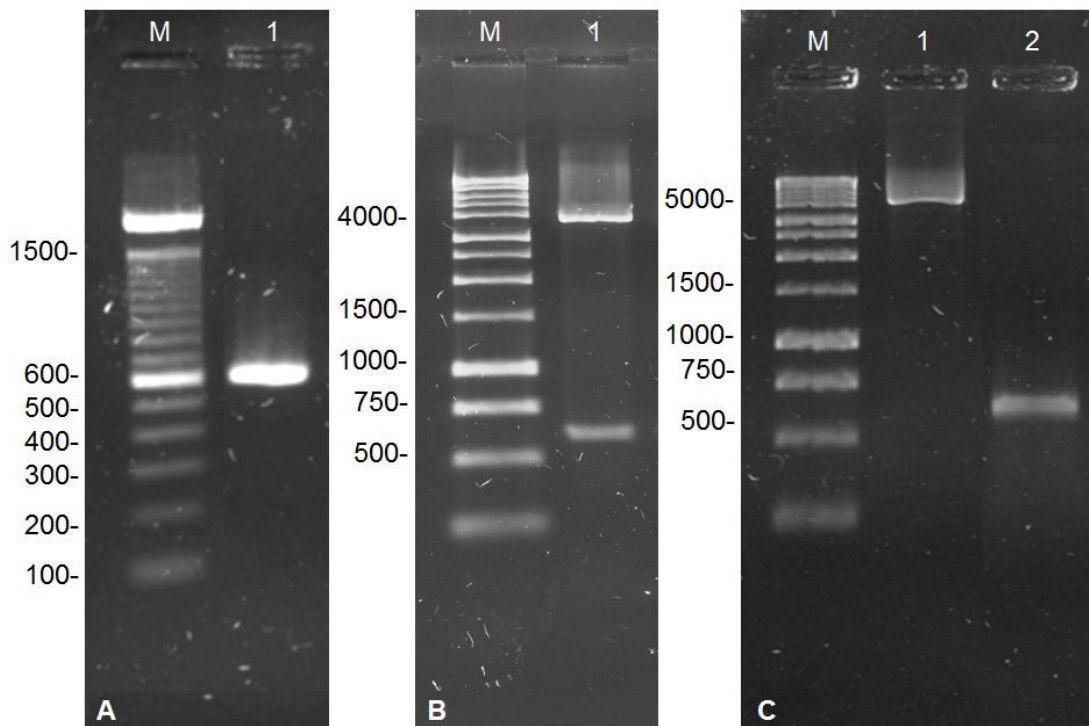


Figura 8. Clonación del citocromo *c₅₅₀*. Geles de agarosa al 1% en TBE, A; PCR de *cccA* de *B. subtilis*, M: Marcador de peso molecular de 100 pb, carril 1: amplicón de 600 pb aproximadamente, B; plásmido recombinante pCR2.1-550 de *E. coli* que contiene *cccA* de *B. subtilis*, M: Marcador de peso molecular de 1 Kb, carril 1: patrón de restricción del vector con *Eco*RI, C; plásmido e inserto, M: Marcador de peso molecular de 1 Kb, carril 1: pHP13 digerido y purificado y carril 2: *cccA* purificado a partir del plásmido pCR2.1-550. En estos geles se usaron; A: 750 ng, B: 250 ng y C: 100 ng de DNA.

Después de conseguir una clona positiva se extrajo el plásmido (pCR2.1-550) recombinante para digerirlo con la enzima *EcoRI*. Se obtuvo el patrón de restricción esperado con una banda cercana a 4,000 pb del plásmido y otra a 600 pb del inserto (Fig. 8B). De esta manera se confirmó la clonación del citocromo *c₅₅₀* y se procedió a extraer el gen a partir del gel de agarosa, el cual se ligó al plásmido pHP13 previamente digerido (*EcoRI*) y purificado (Fig. 8C). Esta ligación se usó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α por RbCl (Samaniego, 2007).

Realizada la transformación se seleccionaron y analizaron 18 colonias positivas a la prueba IPTG/X-gal, mediante un gel tipo cracking (Fig. 9). Cinco clonas mostraron un plásmido de peso molecular entre 5,000 y 6,000 pb, se les extrajo el plásmido recombinante para digerirlo y corroborar que el patrón de restricción fuera el correcto (Fig. 10A). Se seleccionó 1 clona positiva y se aisló el plásmido pHP13-550, para transformar a *B. subtilis*. Terminada la transformación, las bacterias se analizaron para asegurar la presencia del gen de interés mediante el patrón de restricción del plásmido con la enzima *EcoRI* (Fig. 10B). Una vez que se consiguió una clona de *B. subtilis* con la construcción pHP13-550 se secuenció el inserto clonado dentro de este vector usando los primers diseñados para este fin (ya que pHP13 no es un plásmido comercial): 5`-GGAATTGTGAGCGGATAACAATTTTCACAC-3` y 5`-AAGTTGG GTAACGCCAGGGTTTTCCAG-3`. La secuenciación mediante el primer forward resultó en 397 nucleótidos mientras que con el reverse se obtuvieron 304 nucleótidos, un total de 719 bases de las 737 esperadas, estas secuencias se alinearon con la secuencia ya reportada de gen *cccA*, obteniendo 99% de identidad. También se tradujo la secuencia para compararla con el citocromo *c₅₅₀*, en este análisis encontramos la metionina de inicio, la región de unión del hemo a la proteína con la secuencia consenso CXXCH, que para *B. subtilis* fue CIACH y el último aminoácido del C-terminal (Fig. 11). Una vez confirmada la identidad de nuestro gen clonado se creció a *B. subtilis* para iniciar el estudio de la sobre expresión de este citocromo.

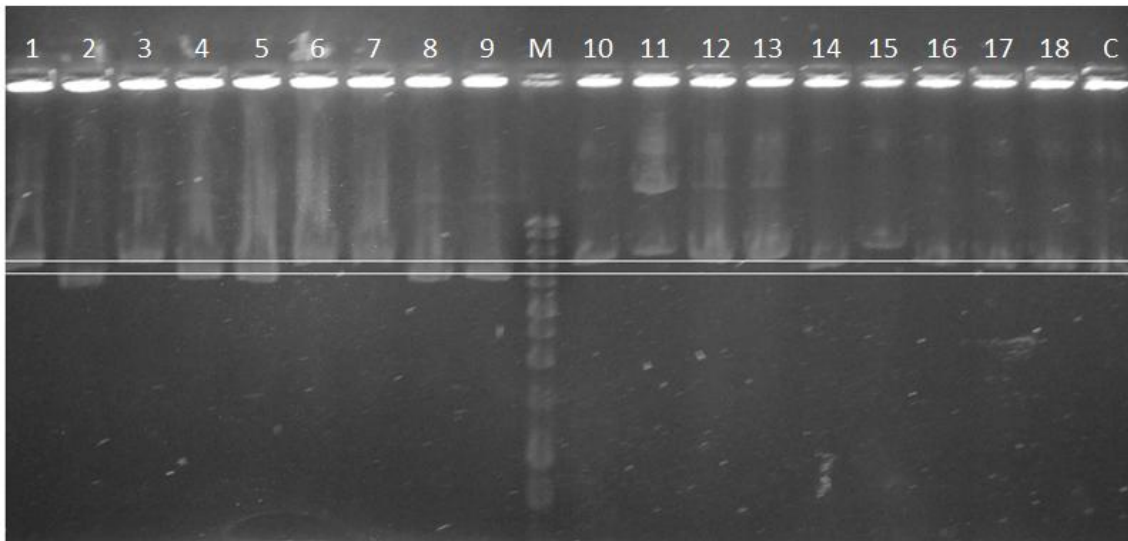


Figura 9. Análisis de los plásmidos pHP13-550 obtenidos de las clonas positivas a la prueba IPTG/X-gal. Gel tipo cracking al 0.75% de agarosa, M: marcador de peso molecular de 1 Kb, los carriles 3, 6, 7, 12 y 13 muestran las construcciones más cercanas al plásmido recombinante pHP13-550, ya que presentan cercanía a las 5,500 pb, C: plásmido pHP13 sin inserto usado como control.

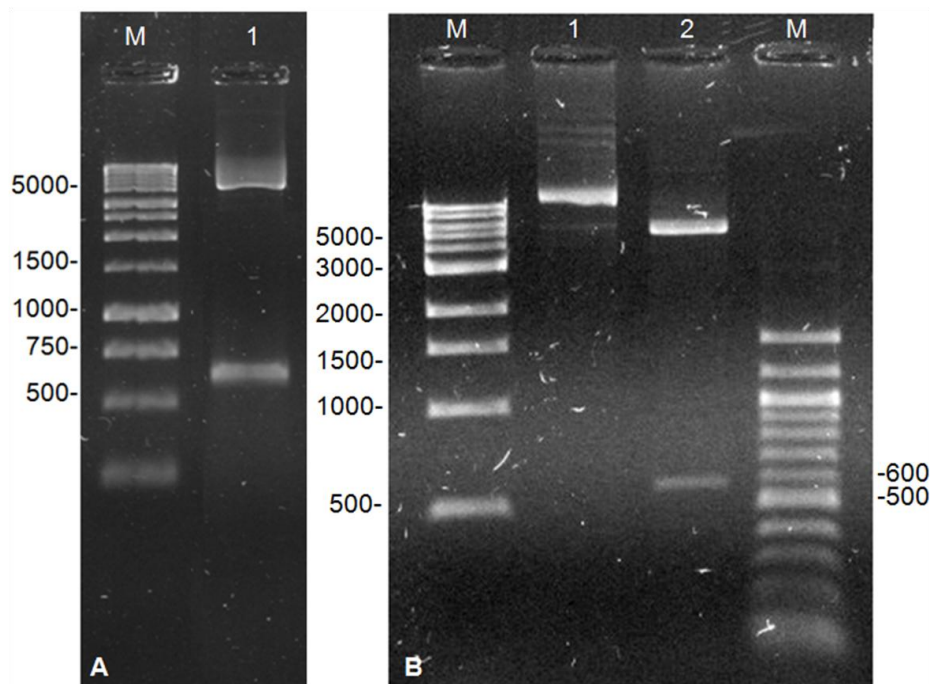


Figura 10. Obtención del plásmido pHP13-550 aislado de *B. subtilis*. Geles de agarosa al 1%, A; M: Marcador de peso molecular de 1 Kb, carril 1: pHP13-550 de *E. coli* digerido con *EcoRI*, B; M: Marcador de peso molecular de 1 Kb y de 100 pb, carril 1: plásmido pHP13-550 de *B. subtilis* súper enrollado (sin digerir) y carril 2: patrón de restricción de plásmido pHP13-550 de *B. subtilis* con *EcoRI*. En estos geles se usaron; A: 150 ng y B: 650 ng de DNA.

A Identidad = 344/348 (99%), Diferencia = 4/348 (1%).

Problema	54	TTCAAAATCTAATTCATATTTTCTATTGTAAGCGTATACAATACATTATACAATAGAAT	113
Referencia	328	TTCAAAATCTAATTCATATTTTCTATTGTAAGCGTATACAATACATTATACAATAGAAT	387
Problema	114	AAAAAGGATATTAGAGATTTAGGCATGTTTCTATTCAATTTTGTATAAAGTGTGAATAAA	173
Referencia	388	AAAAAGGATATTAGAGATTTAGGCATGTTTCTATTCAATTTTGTATAAAGTGTGAATAAA	447
Problema	174	AAACTTTTGTATAGCAATCCATTTACTTTTTGTAAAAATAAGTTAGAATTAGAAGTGTTT	233
Referencia	448	AAACTTTTGTATAGCAATCCATTTACTTTTTGTAAAAATAAGTTAGAATTAGAAGTGTTT	507
Problema	234	ACATAGGGGAAGGATCAAAAAGGGGAAGGGAAATGAAATGGAACCCGCTTATTCCATT	293
Referencia	508	ACATAGGGGAAGGATCAAAAAGGGGAAGGGAAATGAAATGGAACCCGCTTATTCCATT	567
Problema	294	TTTGCTGATCGCTGTTTTAGGAAITGGTCTAATTTCTTTTTATCAGTAAAAGGACTTGA	353
Referencia	568	TTTGCTGATCGCTGTTTTAGGAAITGGTCTAATTTCTTTTTATCAGTAAAAGGACTTGA	627
Problema	354	TGACTCTCGGGAGATTGCGAG---AGGAGAAAGCAA-TCTGCTGAAA 397	
Referencia	628	TGACTCTCGGGAGATTGCGAGCGGAGGAGAAAGCAAATCTGCTGAAA 675	

B Identidad = 247/250 (99%), Diferencia = 3/250 (1%).

Problema	483	TATTTAAITTTTIGACACCCACTCTGCCATATCATCCAGCTTATCGGCCGGAACAAGACCG	542
Referencia	903	TATTTAAITTTTIGACACCCACTCTGCCATATCATCCAGCTTATCGGCCGGAACAAGACCG	844
Problema	543	GAAGGCATTCATTACCGCCTTTTTTCGATCTTTGTTTTAAITTCAGCGACATCTTTCTTA	602
Referencia	843	GAAGGCATTCATTACCGCCTTTTTTCGATCTTTGTTTTAAITTCAGCGACATCTTTCTTA	784
Problema	603	TCCCTACACCTTTTAAAGCTAGGACCCGAAACACCTTCATAATTTTACCGTGGCATGCG	662
Referencia	783	TCCCTACACCTTTTAAAGCTAGGACCCGAAACACCTTCATAATTTTACCGTGGCATGCG	724
Problema	663	ATGCAGTITGCCTTGAAAATTTCTTCTGGTGAAGCGITTCATCTTTCTTTTCA-CA--T	719
Referencia	723	ATGCAGTITGCCTTGAAAATTTCTTCTGGTGAAGCGITTCATCTTTCTTTTCAAGAT	664
Problema	720	TTGCTTCTC 729	
Referencia	663	TTGCTTCTC 654	

C Identidad = 113/120 (94%), Diferencia = 6/120 (5%).

Problema	1	MKWNPLIPFLLI AVLGLTFFFLSVKGLDSDREIARG-----EKKDANASPEEIIYKANCIA	54
Referencia	1	MKWNPLIPFLLI AVLGLTFFFLSVKGLDSDREIA G EKKDANASPEEIIYKAN CIA	60
Problema	55	CHGENYEGVSGPSLKGVDKDVAEIKTKIEKGGNGMPSGLVPADKLLDMAEWSKIK	114
Referencia	61	CH GENYEGVSGPSLKGVDKDVAEIKTKIEKGGNGMPSGLVPADKLLDMAEWSKIK	120

Figura 11. Alineamiento de secuencias del citocromo *c₅₅₀*. Análisis realizado en el programa BLAST de NCBI se muestra en tres secciones, A; corresponde al alineamiento de la secuencia de nucleótidos obtenida con el oligo forward después de la secuenciación del plásmido pHP13-550 de *B. subtilis* (problema), B; presenta el alineamiento de los nucleótidos con el oligo reverse (problema), y C; muestra el alineamiento de la traducción de la secuencia obtenida del plásmido pHP13-550, la sección subrayada y en negritas corresponde a la secuencia de unión del grupo hemo a la proteína presente en los citocromos, también se muestra la ausencia de 6 aminoácidos, debido a que no se secuenciaron 18 nucleótidos. Ambos alineamientos se realizaron con las secuencias del citocromo *c₅₅₀* de *B. subtilis* 168 disponibles en el GenBank (referencia).

4.2 Rendimiento de células y obtención de membranas de las diferentes cepas utilizadas.

Las clonas de *B. subtilis*; WT, pHP13 y pHP13-550 se crecieron en dos medios de cultivo, (LB y MSR) por tres diferentes tiempos (5, 9 y 23 hrs.). El rendimiento en peso húmedo por litro de estas bacterias se muestra en la Tabla 3. En el Anexo, (Tabla 8), se muestran resultados para nuevos cultivos con las mismas características, a modo de comparación. Con las *Bacillus* crecidas en medio LB se obtuvo un rendimiento de peso húmedo semejante en los diferentes tiempos de crecimiento. En contraste, a las 23 hrs. se obtuvo casi el doble y el triple de peso húmedo que a 9 y 5 horas respectivamente, de las células cultivadas en medio MSR, por lo que se optó por usar 2 L de medio LB.

Tabla 3. Comparación del rendimiento celular (g de peso húmedo/L) de las diferentes *B. subtilis* crecidas en los dos medios de cultivo.

Cepas (LB g/L)	5 horas	9 horas	23 horas	Cepas (MSR g/L)	5 horas	9 horas	23 horas
WT	3.13	4.80	4.20	WT	4.62	7.41	12.10
pHP13	2.95	4.55	4.69	pHP13	4.88	6.96	11.75
pHP13-550	3.31	4.63	4.74	pHP13-550	4.91	6.74	13.14

Se extrajeron las membranas de todas las bacterias y se observó un incremento de intensidad de su color a medida que aumenta el tiempo de crecimiento, en el caso de las tres cepas crecidas en MSR. A diferencia de las membranas de LB en donde la coloración a 5 hrs. es baja, a 9 hrs. es más oscura y disminuye a las 23 hrs. Este cambio en la coloración puede indicar que la expresión de citocromos no sólo varía con respecto al tiempo sino en relación a los nutrientes presentes en el medio de cultivo (Fig. 11). La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry, los datos de esta cuantificación se presentan en la Tabla 4.

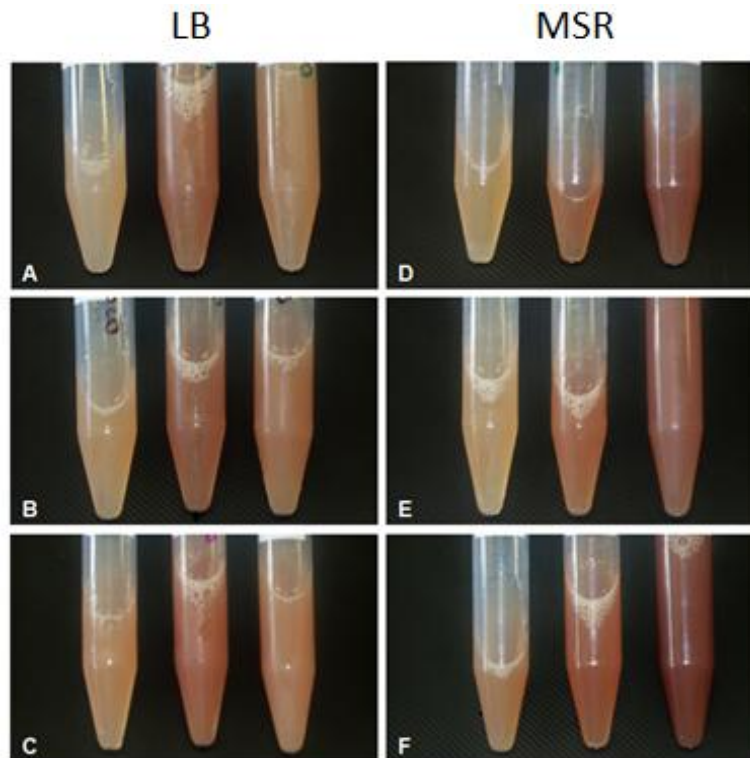


Figura 11. Membranas aisladas de *B. subtilis*. Las membranas de los cultivos de 5, 9 y 23 horas se observan alineadas de izquierda a derecha (para todos los paneles). Las membranas de bacterias crecidas en LB; WT, pHP13 y pHP13-550 se muestran en el panel A, B, y C respectivamente, mientras que los paneles D, E y F representan las cepas WT, pHP13 y pHP13-550 de medio MSR.

Tabla 4. Comparación de la concentración de proteína membranal por mg/mL de las diferentes *B. subtilis* crecidas.

Cepas LB	mg/mL	Cepas MSR	mg/mL
WT 5 H	13.0	WT 5 H	5.6
pHP13 5 H	11.8	pHP13 5 H	8.1
pHP13-550 5 H	13.2	pHP13-550 5 H	12.8
WT 9 H	16.3	WT 9 H	8.0
pHP13 9 H	18.9	pHP13 9 H	9.3
pHP13-550 9 H	12.7	pHP13-550 9 H	6.3
WT 23 H	7.20	WT 23 H	18.2
pHP13 23 H	15.6	pHP13 23 H	11.4
pHP13-550 23 H	15.7	pHP13-550 23 H	7.4

4.3 Espectros de absorción e identificación de citocromos de las membranas aisladas.

Para conocer la identidad y la concentración de los diferentes citocromos que contienen las membranas de las cepas de *B. subtilis* obtenidas en este trabajo, se obtuvieron los espectros diferenciales (reducido con ditionita menos

oxidado) de cada membrana. Se identificó a los citocromos usando el pico de absorción (nm) y los coeficientes de extinción molar ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ya reportados para identificar a cada citocromo (Tabla 9, Anexo). Estos resultados se muestran en las Tablas 5 y 6, y en la repetición de los experimentos en las Tablas 12 y 13 del Anexo.

Se procedió a agrupar de la siguiente manera: WT, pHP13 y pHP13-550, tipo de medio y tiempo de crecimiento, para conocer la proporción de los citocromos de estas diferentes membranas. La cepa que tiene al citocromo c_{550} clonado, siempre presenta un pico de absorción cercano a 550 nm de longitud de onda, indicando una sobre expresión de éste, a diferencia de los otros citocromos que se ven afectados dependiendo de la cepa y de las condiciones de crecimiento.

En los espectros de absorción de las membranas de *B. subtilis* cultivada en medio LB por 5 hrs. (Fig. 12A) se observaron los citocromos tipo *c* a una longitud de onda de 551 nm para las cepas con los plásmidos pHP13 y pHP13-550, mientras que en membranas WT a los 554 nm, valor cercano a una de las subunidades del complejo *bc*. Los citocromos *b* de todas las membranas parecen corresponder al citocromo *b* del complejo b_6c , ya que se ubicaron en los 563 nm, de la misma manera las tres cepas exhiben la quinol oxidasa aa_3 a 600 nm.

A las 9 hrs. en este mismo medio (Fig. 12B) los citocromos *c* se presentaron en 551 y 550 nm para las cepas pHP13 y pHP13-550 respectivamente, a diferencia de las membranas WT quienes exhiben un pico de absorción a 553 nm. Cabe destacar que la altura del pico de absorción de estos citocromos en la clona pHP13-550 sobrepasa la obtenida para las membranas control (rebasando las concentraciones calculadas para las cepas WT y pHP13 en una proporción de 4 a 1 y de 6 a 1 respectivamente, Tabla 5). Los citocromos tipo *b* de *Bacillus* WT se ubicaron a los 561 nm, mientras en las membranas pHP13 y pHP13-550 mostraron su máximo de absorción en 564 y 563 nm, atribuibles al citocromo *b* del complejo *bc*, la concentración μM de esta última cepa casi duplicó la calculada para las cepas WT y pHP13 (Tabla 5).

Para los citocromos tipo *a* el patrón observado a 5 hrs. se siguió manteniendo, los picos de absorción se obtuvieron cerca de los 600 nm, correspondiendo a la oxidasa tipo *aa*₃, a diferencia de la cepa con el plásmido pHP13 que parece exhibir la citocromo *c* oxidasa *caa*₃ (pico a 605 nm).

En medio LB a las 23 hrs. (Fig. 12C) se observó en membranas WT y pHP13 un pico de absorción a los 553 nm, perteneciente a los citocromos tipo *c*. A diferencia de pHP13-550 cuyo valor se ubicó en 550 nm, el cual mostró una disminución muy marcada contra el espectro de 9 hrs. (reduciendo su concentración de 36.72 a 16.14 μ M). Con respecto a los citocromos *b* por su longitud de onda (562 y 563 nm) parecen pertenecer al complejo tipo *bc* en las cepas pHP13 y pHP13-550 y a la SDH para la bacteria sin plásmido. El comportamiento observado en la concentración de los citocromos *c* también se observa para los *b*, donde estos se incrementan de 6.60 a 14.31 μ M de las 5 a las 9 hrs. y de las 9 a 23 hrs. disminuyen de 14.31 a 8.81 μ M. Por último los citocromos tipo *a* presentes en todas las membranas mostraron un corrimiento a la derecha en los picos de absorción, indicando menor proporción de la quinol oxidasa *aa*₃ con respecto a la citocromo *c* oxidasa *caa*₃.

En los espectros de absorción en medio MSR a 5 hrs. (Fig. 13A) se observó la presencia de los citocromos *b* (a 560 nm) y *a* (a 600 nm) en las membranas WT y WT-pHP13. Posiblemente los citocromos *c* estén presentes pero sean enmascarados por los picos de absorción de los citocromos *b* cercanos que están en mayor concentración, los cuales presentan su máximo de absorción (entre 559 y 560 nm) próximo al pico del citocromo de la SDH. Los citocromos tipo *a* corresponden a la quinol oxidasa *aa*₃ en todas las membranas, a diferencia de los citocromos *c* y *b* de pHP13-550 que se encontraron a los 551 nm y 562 nm respectivamente (obteniendo los cocientes de $c:b = 1.1$ y $c:a = 1.2$). Otro dato es que sólo en este medio, a las 5 hrs. los espectros de absorción de las tres cepas muestran un pico cercano a los 628 nm donde absorbe el citocromo *d* de la oxidasa alterna *bd*, sin embargo el coeficiente de extinción molar del citocromo *d* de esta quinol oxidasa no se conoce, por lo que se optó por realizar una aproximación usando el coeficiente

del citocromo *a* de la citocromo *c* oxidasa, obteniendo valores de 1.66 μM de citocromo *a*.

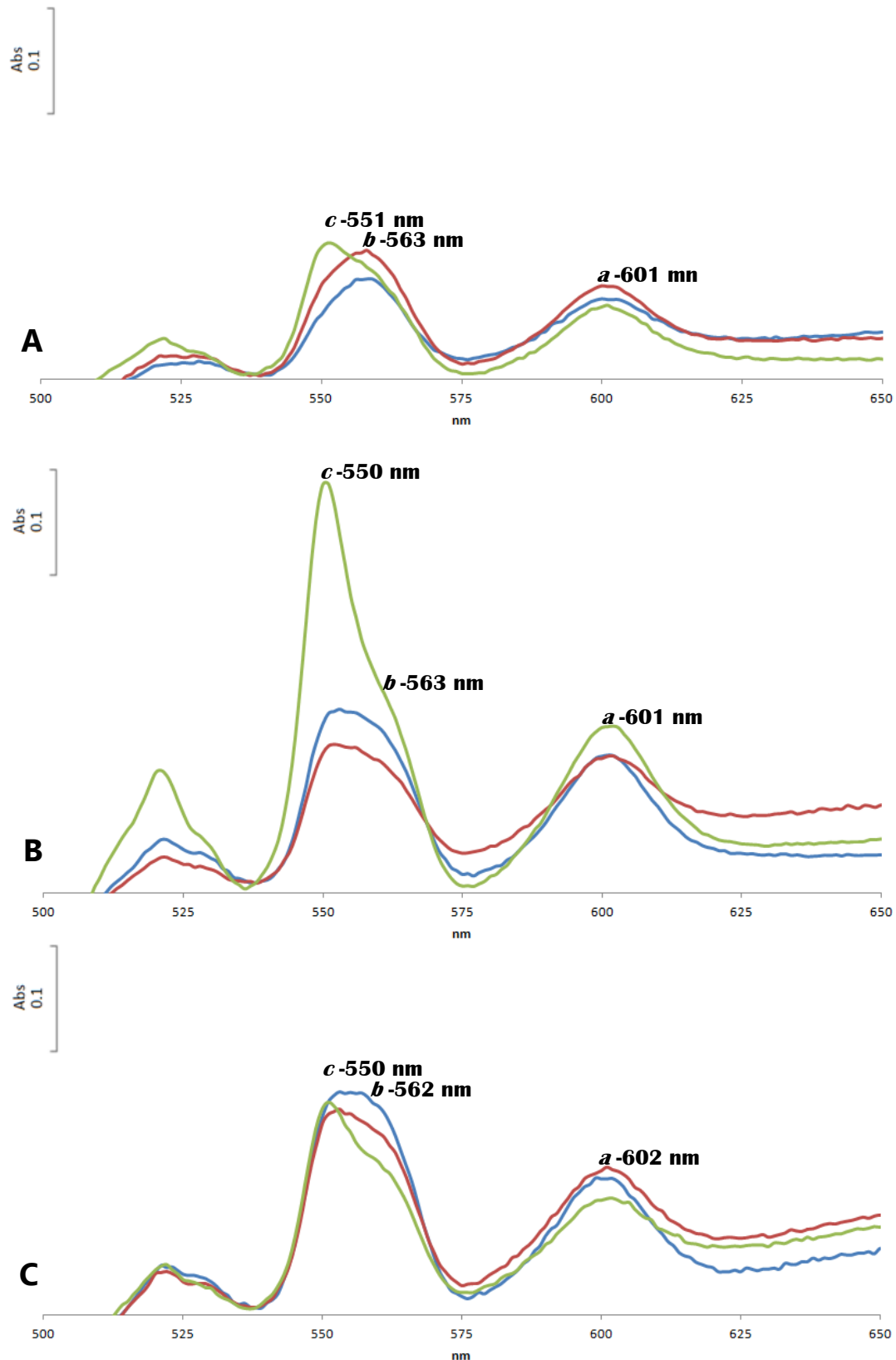


Figura 12. Espectros de absorción diferenciales (reducido con ditionita menos oxidado) de las membranas de *B. subtilis* crecidas en LB, usando 2 mg de proteína de las diferentes membranas (WT/línea azul, pHP13/línea rojo y pHP13-550/línea verde), A; 5 horas, B; 9 horas y C; 23 horas. Los valores de absorción mostrados corresponden a los picos de la cepa pHP13-550.

A las 9 hrs. de crecimiento en medio MSR (Fig. 13B), se observó que los picos de absorción de los citocromos tipo *c* de las membranas WT y pHP13 presentan mayor cercanía al valor del citocromo *c* del complejo *bc* (pico a 554 nm). Para pHP13-550 el máximo de absorción se encontró a 550 nm, pico que mostró una altura mayor (comparado con el tiempo anterior y las cepas control) indicando una expresión superior, como lo muestran los cocientes obtenidos de; $c:b = 3.8$ y $c:a = 4.8$. Los citocromos *b* en las tres diferentes membranas se pueden atribuir a la SDH, por su máximo de absorción (entre 558-560 nm). Para la *Bacillus* pHP13-550 sólo se aprecia un hombro en 560 nm, posiblemente debido a la sobre expresión del citocromo c_{550} . Por último, para los citocromos *a* los picos de absorción se aproximaron a los 605 nm y se observó un corrimiento en el pico de absorción de 601 a 603 nm, correspondiente a la quinol oxidasa tipo aa_3 y a citocromo oxidasa caa_3 respectivamente, indicando mayor expresión de la caa_3 (Tabla 6).

En MSR a las 23 hrs. (Fig. 13C) se puede observar que en la región de los citocromos *c* (pico a 551 nm) de las membranas de pHP13-550 la absorbancia se incrementa con respecto a la obtenida en los espectros de 9 hrs. de crecimiento, la concentración aumenta de 16.90 a 40.44 μM (los cocientes en este caso fueron de $c:b = 1.9$ y $c:a = 2.2$). Estos citocromos para las cepas WT y pHP13 fueron ubicados a los 551 nm, mientras que los citocromos tipo *b* de todas las membranas pueden atribuirse al complejo b_6c , debido a que el pico de absorción de 563 nm es típico del citocromo *b* este complejo, al igual que los citocromos *c* la concentración de los *b* de 9 a las 23 hrs. se incrementó. Para los citocromos tipo *a* su pico de absorción se encontró próximo a los 605 nm, atribuible al citocromo *c* de la oxidasa caa_3 .

Durante el análisis espectrofotométrico de la expresión del citocromo c_{550} se observó la expresión máxima de esta proteína a las 9 hrs. para medio LB y a las 23 hrs. para MSR con una concentración similar de 36.72 y 40.44 μM respectivamente. Sin embargo debemos recordar que se crecieron las bacterias en 2 L de medio LB a diferencia de MSR donde se usó 1 L.

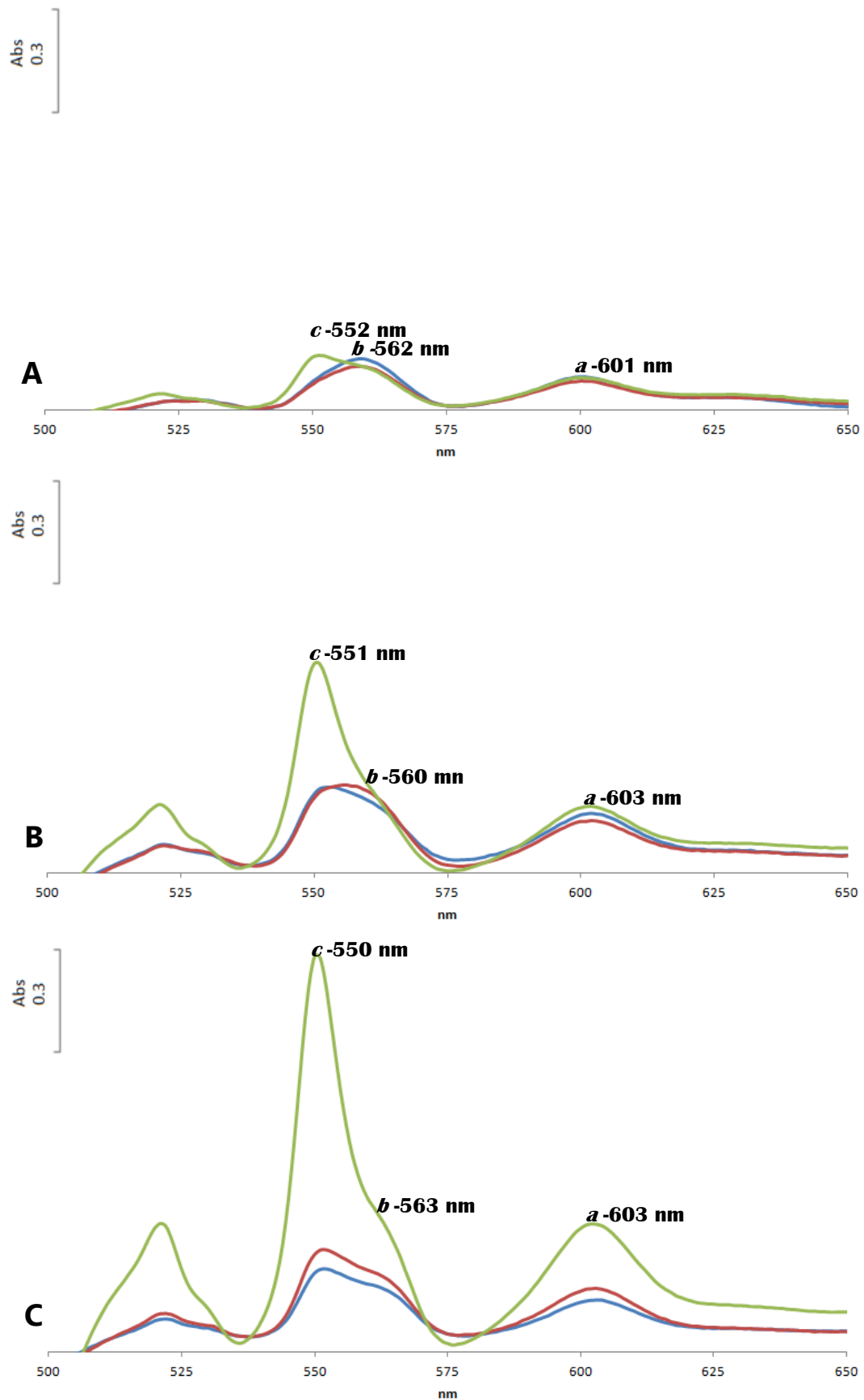


Figura 13. Espectros de absorción diferenciales (reducido con ditionita menos oxidado) de las membranas de *B. subtilis* crecidas en MSR. Usando 2 mg de proteína de las diferentes membranas (WT/azul, pHP13/rojo y pHP13-550/verde), A; 5 horas, B; 9 horas y C; 23 horas. Los valores de absorción mostrados corresponden a los picos de la cepa pHP13-550.

Tabla 5. Citocromos presentes en la membrana de *Bacillus subtilis*. Medio LB, ^a posible identidad del citocromo, a partir de la Tabla 9 (Anexo).

Cepa	nm	^a posible citocromo	μM Cit c	nm	^a posible citocromo	μM Cit b	nm	^a posible citocromo	μM Cit a
WT 5 H	554	bc	7.87	563	bc	6.17	600	aa ₃	4.09
pHP13 5 H	551	C ₅₅₁	0.46	563	bc	1.41	600	aa ₃	3.28
pHP13-550 5 H	551	C ₅₅₁	8.02	563	bc	6.60	601	aa ₃	5.72
WT 9 H	553	bc	8.18	561	SDH	7.97	601	aa ₃	8.73
pHP13 9 H	551	C ₅₅₁	5.79	564	bc	5.79	603	caa ₃	4.70
pHP13-550 9 H	550	C ₅₅₀	36.72	563	bc	14.31	601	aa ₃	12.08
WT 23 H	553	bc	4.47	560	SDH	4.09	602	caa ₃	3.08
pHP13 23 H	553	bc	13.26	563	bc	10.37	602	caa ₃	6.19
pHP13-550 23 H	550	C ₅₅₀	16.14	562	bc	8.81	602	caa ₃	4.39

Tabla 6. Citocromos presentes en la membrana de *Bacillus subtilis*. Medio MSR, ^a posible identidad del citocromo, a partir de la Tabla 9 (Anexo).

Cepa	nm	^a posible citocromo	μM Cit c	nm	^a posible citocromo	μM Cit b	nm	^a posible citocromo	μM Cit a
WT 5 H	X	X	X	560	SDH	6.37	601	aa ₃	5.05
pHP13 5 H	X	X	X	559	SDH	5.31	601	aa ₃	3.54
pHP13-550 5 H	551	C ₅₅₁	3.75	562	bc	3.37	600	aa ₃	3.09
WT 9 H	554	bc	7.10	560	SDH	5.41	603	caa ₃	4.65
pHP13 9 H	553	bc	4.03	558	SDH	4.30	602	caa ₃	3.87
pHP13-550 9 H	550	C ₅₅₀	16.90	560	SDH	4.35	603	caa ₃	3.48
WT 23 H	552	C ₅₅₁	29.85	563	bc	16.90	604	caa ₃	15.92
pHP13 23 H	552	C ₅₅₁	21.81	562	bc	15.98	603	caa ₃	13.80
pHP13-550 23 H	551	C ₅₅₁	40.44	563	bc	20.83	603	caa ₃	18.11

4.4 Caracterización de los citocromos por geles de DSLi y tinción con TMBZ.

En los geles de poliacrilamida al 14% con el detergente dodecil sulfato de litio (DSLi) se evita la desnaturalización total de las proteínas y pueden conservarse los grupos prostéticos, ya que este detergente no se precipita a bajas temperaturas y permite trabajar las muestras en frío (Broglie y cols., 1980). En la figura 14 se muestra el patrón electroforético de los citocromos de las diferentes membranas después de realizar la tinción con TMBZ, estos geles fueron realizados con tres diferentes concentraciones de proteína (200 μg, 280 μg y 360 μg) y se encontró que las dos primeras fueron las adecuadas para esta técnica, eliminando la tinción inespecífica.

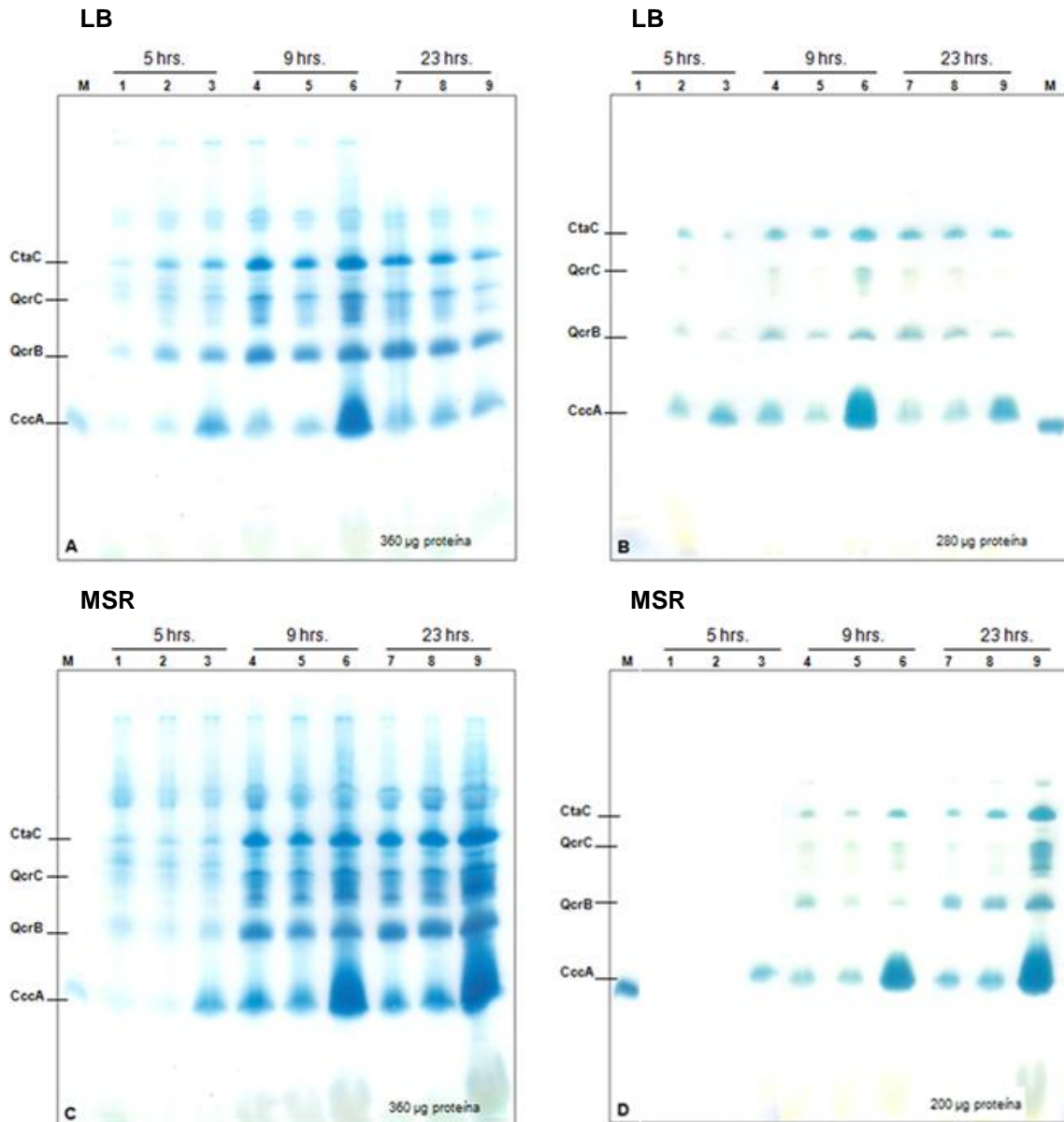


Figura 14. Geles de poliacrilamida al 14%-DSLi, teñidos con TMBZ. Comparación de las diferentes membranas de *B. subtilis* por tiempo de crecimiento y medio de cultivo, con diferentes concentraciones de proteína membranal; A y C) 360 µg, B) 280 µg y D) 200 µg. Los paneles A y B corresponden a las membranas obtenidas de medio LB mientras C y D al medio MSR. M: Marcadores de peso molecular, los carriles 1, 4 y 7 contienen membranas de la cepa WT, los 2, 5 y 8 de la cepa WT-pHP13 y los 3, 6 y 9 de la cepa pHP13-550. A la izquierda de cada gel se muestran los cuatro citocromos pertenecientes a la cadena respiratoria de *B. subtilis* identificados por su masa molecular aparente.

Los geles en los paneles A y C mostraron un mayor número de bandas teñidas con TMBZ, en contraste con geles de los paneles B y D, debido a la cantidad de la proteína usada. Con 280 y 200 µg de proteína, se definieron cuatro bandas, a las cuales se les asignó su identidad por su masa molecular aparente. Se identificaron a CtaC (subunidad II de la *caa3*), QcrC, QcrB (subunidades III y II del *b₆c*) y CccA (citocromo *c₅₅₀*), su masa molecular es semejante a los valores obtenidos a partir del genoma de *B. subtilis* (Tabla 7).

En el caso de las membranas WT y WT-pHP13 a 5 hrs. en MSR no se obtuvo señal de citocromos, probablemente porque el tiempo de tinción fue reducido a 5 min. ya que en los carriles de 9 y 23 horas se obtuvo una tinción muy definida.

Tabla 7. Masas moleculares aparentes de las proteínas que dieron señal con la tinción de TMBZ.

Complejo-subunidad	Masa molecular obtenida a partir del genoma de <i>B. subtilis</i> (kDa)	Masa molecular aparente (kDa) Membranas LB	Masa molecular aparente (kDa) Membranas MSR
IV-CtaC	40.09	30.53	34.00
III-QcrC	28.16	26.90	27.90
III-QcrB	25.48	22.96	23.10
CccA	12.76	14.10	14.04

Estos geles nos permitieron observar el incremento del citocromo *c₅₅₀* (CccA) en los diferentes tiempos de crecimiento, en las membranas de MSR, mientras que en LB aumentó de las 5 a las 9 hrs. y posteriormente disminuyó, tal como se observó en los espectros de absorción. La intensidad de las bandas de las subunidades de los complejos *b_{6c}* y *caa₃* (QcrB, QcrC y CtaC) también aumentó en el tiempo, siguiendo el mismo patrón expresión del citocromo *c₅₅₀*, con lo cual se puede pensar que la sobre expresión de esta proteína influye en la síntesis de estos complejos.

4.5 Identificación inicial de algunas proteínas membranales por geles de DSLi y tinción con Coomassie.

Para visualizar al resto de las proteínas presentes en las membranas se realizó una tinción con azul de Coomassie. En las figuras, se aprecian las dos diferentes tinciones, en azul verdoso la de TMBZ y azul oscuro (azul de Coomassie) (Fig. 15). En estos los geles se identificó a diversas subunidades de los complejos respiratorios, la SDH, la ATPsintasa y la quinol oxidasa *aa₃*, además de otras proteínas no relacionadas directamente con la cadena respiratoria aeróbica como la nitrito y nitrato reductasa (Tabla 8). Es necesario realizar pruebas directas de la presencia de estas enzimas para confirmar su identidad.

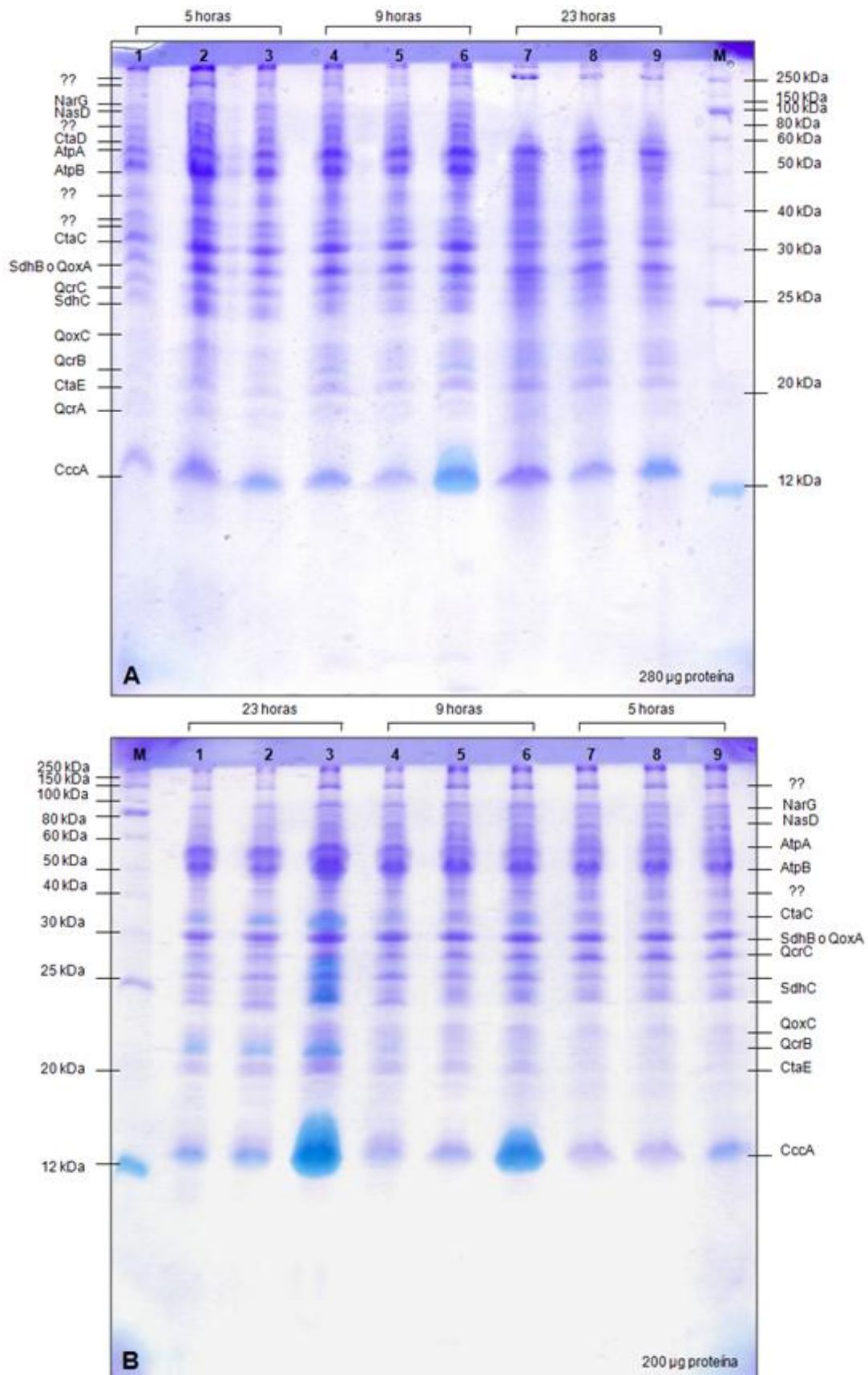


Figura 15. Geles de poliacrilamida-DSLi al 14%, teñidos con azul de Coomassie. Comparación del patrón electroforético de las membranas de las diferentes cepas de *B. subtilis* por tiempo y medio; A) 280 µg de membranas LB y B) 200 µg de membranas MSR, M: Marcadores de peso molecular, los carriles 1, 4 y 7 representan la cepa WT, los 2, 5 y 8 a WT-pHP13 y los 3, 6 y 9 corresponden a pHP13-550. Se muestran las proteínas que pudieron identificarse por su masa molecular aparente.

En el panel A de la figura 15 (membranas LB) se identificaron 14 bandas de proteína, las bandas atribuidas a la NarG y NasD (nitrito y nitrato reductasa, respectivamente) exhiben una disminución muy marcada en las membranas aisladas de cultivos en medio LB a 23 horas. Este comportamiento que también se observó para las subunidades atribuidas a la ATP sintasa. En el gel de membranas obtenidas de MSR (panel B) donde se identificaron 12 bandas de proteína, las asignadas como AtpA y AtpD (subunidad alfa y beta respectivamente) se vuelven más intensas a mayor tiempo de crecimiento. Las bandas atribuidas a QoxC, QcrB y CtaE en este gel son más visibles a mayor tiempo de crecimiento, a diferencia del medio LB donde estas proteínas mantiene una intensidad similar.

Tabla 8. Masas moleculares aparentes de algunas de las proteínas identificadas en las diferentes membranas de *B. subtilis* mediante la tinción de azul de Coomassie. No identificada: n.i.

Complejo-subunidad	Masa molecular calculada a partir del genoma de <i>B. subtilis</i> (kDa)	Masa molecular aparente (kDa) Membranas LB	Masa molecular aparente (kDa) Membranas MSR
II-SdhB/QOX-QoxA	28.4/36.2	28.1	30.3
II-SdhC	22.9	25.8	26.5
III-QcrA	18.7	20.5	n.i.
III-QcrB	25.4	22.9	23.1
III-QcrC	28.1	26.9	27.9
IV-CtaC	40.0	30.5	34.0
IV-CtaD	69.1	72.4	n.i.
IV-CtaE	23.2	22.0	22.6
V-AtpA	54.4	59.3	69.6
V-AtpD	51.2	50.0	53.7
CccA	12.7	14.1	14.0
NarG	139	115.9	138.5
NasD	88.4	94.6	101.2
QOX-QoxC	22.6	23.9	23.7

4.6 Actividad enzimática de los cuatro complejos respiratorios.

Debido a que no se observaron diferencias de contenido de citocromos y de proteínas entre las membranas WT y WT-pHP13 en los geles de DSLi, se decidió medir la actividad enzimática únicamente de las membranas WT-pHP13 y pHP13-550. Por lo tanto, las comparaciones que se establecen son de las membranas pHP13-550 contra membranas pHP13. También se efectuó un

análisis estadístico (t-Student) para verificar si existe significancia en la variación de la actividad obtenida de cada complejo.

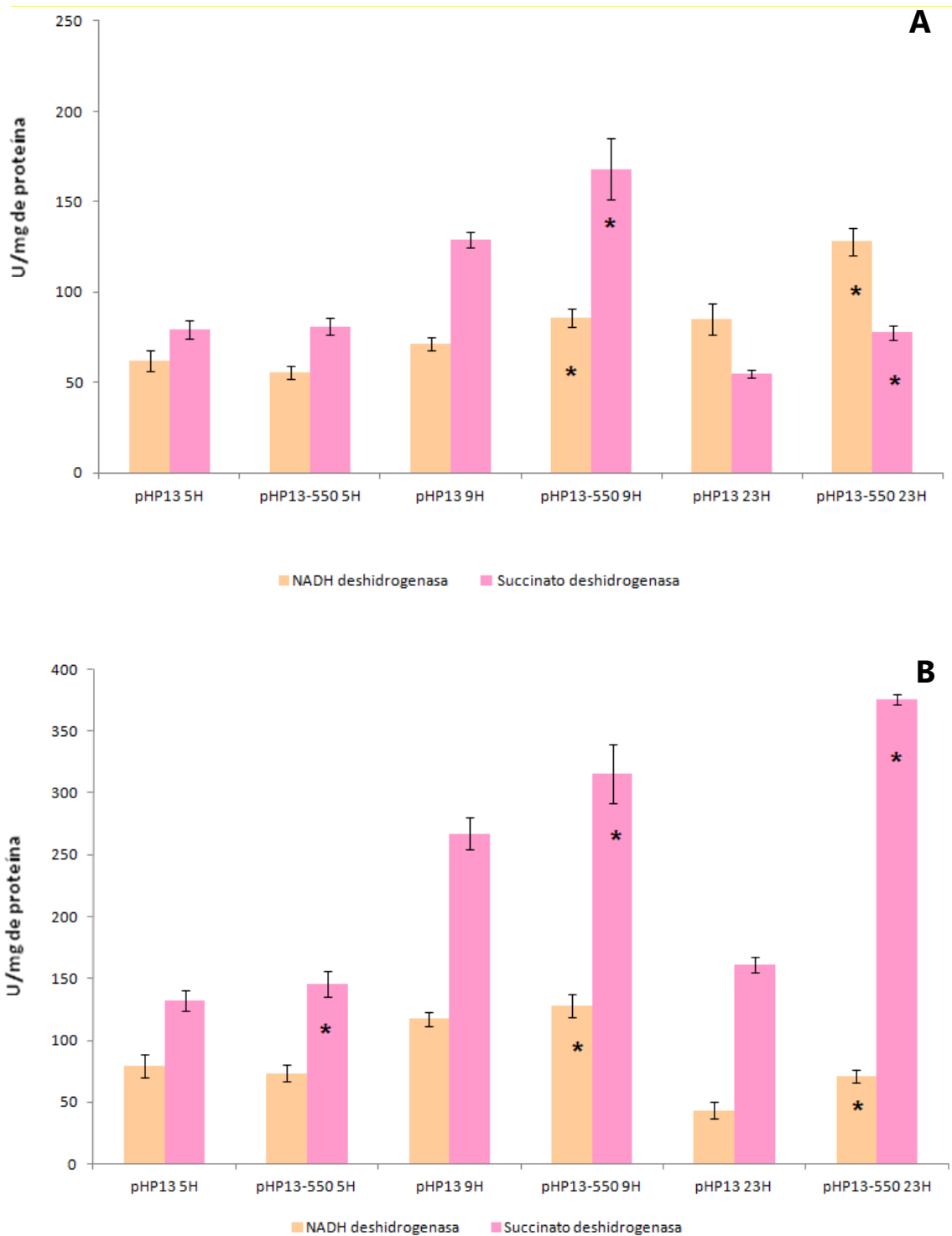


Figura 16. Actividad enzimática de la NADH deshidrogenasa (barras naranjas) y SDH (barras rosas). A; Actividad obtenida utilizando membranas de células crecidas en LB y B; usando membranas de bacterias cultivadas en MSR (Ensayo 2). Los asteriscos representan un cambio significativo en la actividad del complejo en particular. La actividad está reportada en U/mg, donde U= nmol de DCPIP oxidado min^{-1} , los valores obtenidos se muestran en las Tablas 16A y 17A, Anexo.

La actividad de la NADH y la SDH en membranas de medio LB (Fig. 16A) aumentó de 5 a 9 hrs. y disminuyó de 9 a 23 hrs. al igual que lo que ocurre con el citocromo c_{550} en los espectros de absorción y los geles de DSLi. Sin embargo a las 5 hrs. la actividad enzimática de la NADH y SDH de pH13-550 no mostró incremento mientras que en los últimos tiempos si, siendo este cambio significativo en ambos complejos.

En membranas obtenidas de MSR la actividad enzimática de los cuatro complejos respiratorios de las cepas pHP13 y pHP13-550 aumentó en función al tiempo, similar al observado para el citocromo c_{550} en los espectros de absorción y los geles de DSLi, (con la excepción del complejo I a las 23 horas). La actividad de la SDH de pHP13-550 se incrementó significativamente en todos los tiempos con respecto al control, mientras la NADH deshidrogenasa aumentó significativamente en las 23 horas (Fig. 16B).

La actividad de los complejos b_6c y caa_3 de las cepas pHP13-550 de 5 y 9 hrs. medio LB presentaron mayor actividad. De estos el incremento de los complejos b_6c y caa_3 son significativos en las 5 hrs., mientras a las 9 hrs. de crecimiento lo fue el b_6c (Fig. 17A). En este medio la actividad enzimática aumento linealmente con respecto al tiempo de las 5 a las 9. Y de este a 23 hrs. disminuye en todos los complejos (Tabla 14A), de la misma forma que en los espectros de absorción y el citocromo c_{550} en los geles de DSLi. La actividad del complejo bc en las cepas de *Bacillus* probablemente sea mayor ya que la benzoquinona sintética usada no es el sustrato adecuado para el complejo de *B. subtilis*, sino que es más similar al del sistema mitocondrial.

En membranas de medio MSR la actividad enzimática obtenida para los complejos b_6c y caa_3 de membranas pHP13-550 aumentó con respecto al tiempo al igual que el citocromo c_{550} . La actividad de la citocromo c oxidasa aumentó significativamente a las 5 hrs. de crecimiento, al igual que todos los complejos a las 9 hrs., mientras que a las 23 hrs. el complejo b_6c mostró un incremento significativo en su actividad (Fig. 17B).

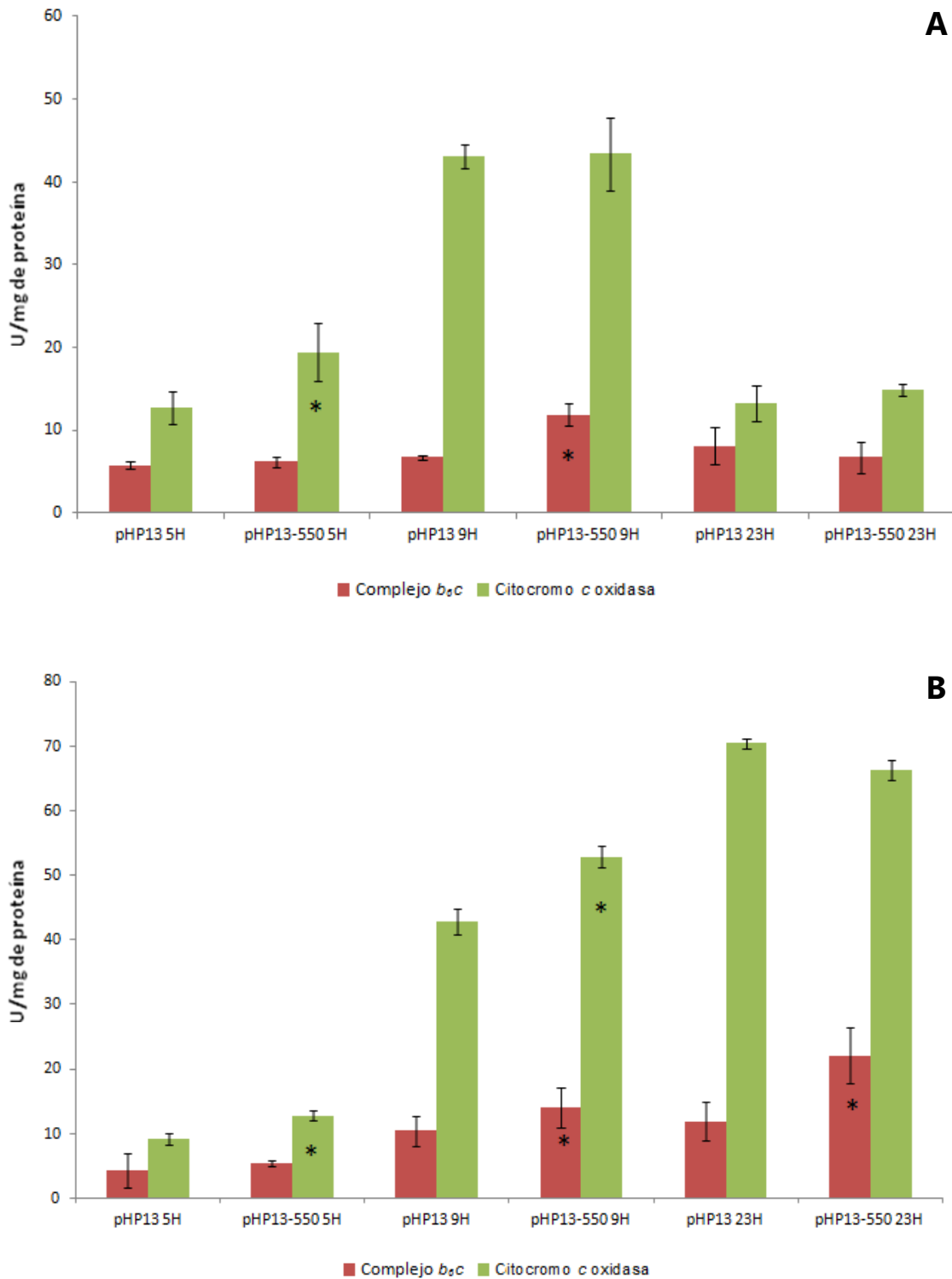


Figura 17. Actividad enzimática de los complejos b_6c (barras rojas) y citocromo c oxidasa (barras verdes). A; Actividad obtenida utilizando membranas de células crecidas en LB y B; usando membranas de bacterias cultivadas en MSR (Ensayo 1). Los asteriscos representan un cambio significativo en la actividad del complejo en particular. Los asteriscos representan un cambio significativo en la actividad del complejo en particular. La actividad está reportada en U/mg, donde U= nmoles de citocromo c oxidado o reducido min^{-1} , los valores obtenidos se muestran en las Tablas 14A y 15A, Anexo.

Al comparar estos dos medios de cultivo, se pudo determinar que la actividad de los complejos SDH+ b_6c , b_6c y la citocromo c oxidasa en membranas de

pHP13-550 es menor en medio LB que en MSR a las 9 y 23 hrs., mientras que a 5 hrs. los valores son muy similares en ambos medios. La actividad la NADH y SDH de membranas de medio MSR es superior a la de membranas de LB.

5. Discusión.

B. subtilis tiene de una cadena respiratoria que exhibe dos rutas para el transporte de electrones, ya sea por medio de las quinol oxidasas o mediante la citocromo *c* oxidasa (*caa₃*) a través del menaquinol: citocromo *c* oxidorreductasa (*b₆c*) y de dos citocromos *c* unidos a la membrana (Azarkina y cols., 1999). En este trabajo se analizó el efecto de la sobre expresión del citocromo *c₅₅₀*, en la cadena respiratoria de *B. subtilis*.

La sobre expresión se realizó en dos medios de cultivo para evidenciar si las fuentes de carbono usadas son las adecuadas para la sobre expresión, ya que se sabe que en *B. subtilis* la síntesis de enzimas del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria son reprimidas en presencia de glucosa durante las primeras 5 hrs de cultivo (Monedero y cols., 2001). Este microorganismo también se creció por tres diferentes tiempos, con el fin de conocer si la síntesis del citocromo *c₅₅₀* siempre es igual durante el desarrollo de esta bacteria, ya que se ha reportado que estos citocromos son prescindibles para el crecimiento de *B. subtilis* (Inji y cols., 2005).

Además se realizó una segunda preparación de membranas de las bacterias utilizadas en los tres tiempos de crecimiento (Anexo, Tablas 10-17 y Fig. 18-21). Al comparar ambas caracterizaciones se observó que los resultados de estas son similares y consistentes.

5.1 Rendimiento celular

Uno de los factores que regula el crecimiento bacteriano es la fuente de carbono presente en el medio donde se desarrollan los organismos, materia prima necesaria para fabricar proteínas y membranas que conforman la maquinaria estructural y bioquímica de la célula. Según su composición y utilización los medios de cultivo se clasifican como simples y enriquecidos. Los primeros poseen los requisitos nutricionales mínimos para permitir el desarrollo bacteriano en general, como lo es el medio LB. Los enriquecidos son medios simples a los que se les añaden ciertos componentes que neutralizan agentes

inhibidores del crecimiento o sustancias que permiten el aporte de factores de crecimiento como es el caso del medio súper rico (MSR) (Montoya, 2008). Por esta razón el rendimiento celular bacteriano de los cultivos en LB es menor al obtenido en MSR (Tabla 3 y Anexo Tabla 10). Así mismo, al comparar el rendimiento de proteína de membrana por litro de los dos medios se observó que en la mayoría de los cultivos de *B. subtilis* en MSR la concentración es mayor a la obtenida en medio LB, al igual que en el estudio de García en el 2010. Con respecto a los cultivos de la cepa pHP13-550 la biomasa obtenida es ligeramente mayor a las bacterias WT y pHP13, indicando que la sobre expresión del citocromo *c₅₅₀* influye en el rendimiento celular.

5.2 Citocromos

Mediante los espectros de absorción pudimos observar cómo se va desarrollando la cadena respiratoria de *B. subtilis* durante el crecimiento. Los resultados presentados a lo largo de ese trabajo indican que tanto el tiempo de crecimiento como el medio de cultivo utilizado para estas bacterias juegan un papel directo en la síntesis y expresión de los citocromos.

Los citocromos *c* de membranas pHP13 y pHP13-550 de 5 hrs. obtenidas en medio LB se ubicaron en los 551 nm, a diferencia de las WT donde el pico de absorción de estos citocromos puede atribuirse al citocromo *c* del complejo *b₆c*, al igual que los citocromos *b* de las diferentes cepas. En membranas de pHP13-550 en MSR los citocromos *c* y *b* presentaron picos de absorción muy similares a los de LB. En las de membranas WT y pHP13 no se lograron identificar los citocromos *c*, debido posiblemente a la baja concentración en la que se encontraban y a su vez por la cercanía con los tipo *b* que presentan un máximo de absorción entre 555 y 565 nm (Thöny-Meyer, 1997). En las cepas donde no se identificaron a los citocromos *c*, el máximo de absorción de los citocromos *b* mostró más cercanía al pico de absorción de la SDH que del complejo *b₆c*.

Al analizar los espectros de las membranas pHP13-550, en muchos casos se observó que los citocromos tipo *c* se localizaron en los 551 nm, este

corrimiento de un nanómetro puede explicarse debido a que el espectro de absorción es de membranas que contienen diversos citocromos y no del citocromo puro. En el trabajo de von Wachenfeldt y Hederstedt de 1990, después de clonar y sobre expresar el citocromo c_{550} el máximo de absorción observado en su perfil espectrofotométrico fue a 548 nm (2 nm menos). Es difícil concluir que haya un cambio en la estructura del citocromo a partir del espectro de las membranas aisladas.

En el mismo estudio (von Wachenfeldt y Hederstedt, 1990) se mostró que los citocromos tipo b identificados pertenecen a la SDH, creciendo a *B. subtilis* por 4 hrs. en medio mínimo. En las membranas que nosotros aislamos a 5 hrs., de crecimiento no observamos el pico de absorción a 558 nm atribuible a la SDH. El pico de absorción del citocromo b corresponde al complejo b_6c , esto indica que la sobre expresión del citocromo c_{550} induce a una mayor expresión del complejo bc . Además, a diferencia de los medios LB y MSR el medio mínimo se adiciona con glucosa como fuente de carbono, del cual se sabe que reprime genes que codifican para enzimas del ciclo de Krebs y la respiración en bacterias, como la oxidasa caa_3 , el complejo bc y los citocromos c_{550} y c_{551} (Blencke y cols., 2003).

A las 9 hrs. se observó un incremento en la concentración de los citocromos c en ambos medios. Esta tendencia se ha presentado en otros trabajos con *B. subtilis* y *B. cereus*, donde se observó un notable aumento en el nivel de los citocromos en la fase estacionaria antes de la esporulación, la cual se inicia cerca de las 12 hrs., pero es acelerada en *Bacillus* con la sobre expresión del citocromo c_{550} . Esto debido a la función en el transporte de electrones que juega el citocromo c_{550} en la respiración (Félix y Lundgren, 1973; Inji y cols., 2005). También hay que tomar en cuenta que estos cultivos tuvieron agitación constante.

Al seguir creciendo nuestros cultivos estos se acercan cada vez más a la fase de esporulación lo cual aumenta la síntesis del citocromo c_{550} como se muestra en las concentraciones obtenidas de los espectros de absorción de la cepa pHP13-550 en MSR a 23 horas. Probablemente gracias a que este

citocromo dona electrones al complejo caa_3 el cual bombea protones, obteniendo así la energía suficiente para la esporulación (Winstedt y von Wachenfeldt, 2000). En medio LB se observó que a 23 hrs. la concentración del citocromo c_{550} no se incrementó, tal vez debido a que las fuentes de energía disminuyeron más rápido, ya que este medio de cultivo es simple.

Los citocromos b presentaron un pico cercano a los 558 nm, atribuible a la SDH en las membranas de medio MSR tanto de 5 como de 9 hrs. Con lo anterior, se puede suponer que este complejo enzimático comienza a expresarse a partir de las primeras horas de crecimiento, como lo mostró la actividad enzimática del complejo (Fig. 16B). Este comportamiento se ha observado en *B. subtilis* mutantes en la síntesis del hemo precursor ácido 5-aminolevulínico, las cuales crecen óptimamente durante tres generaciones y posteriormente la proteína hierro-azufre y la flavoproteína muestran una disminución en sus membranas, como lo observaron en geles de poliacrilamida con SDS, debido a que estas proteínas se unen a la membrana por medio del citocromo b (Holmgren y cols., 1978). También se ha visto mediante ensayos en la transcripción que el RNAm del operón *sdh* comienza a disminuir su expresión en la fase estacionaria tardía del crecimiento de *B. subtilis* (Resnekov y cols., 1990). Lo anterior se puede homologar a lo visto en nuestras membranas a 5 y 9 hrs. de crecimiento en MSR.

El succinato (fuente de carbono del MSR), reduce a la SDH que es parte del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria, permitiendo así la obtención de energía por fosforilación oxidativa (Sonenshein, 1993). En el medio LB la fuente principal de energía son los aminoácidos (Schemidt y cols., 1998), de los cuales la glutamina sirve a *B. subtilis* como la mejor fuente de nitrógeno seguido por la arginina. La glutamina sirve para síntesis de aproximadamente 15% de las moléculas nitrogenadas en la célula (Fisher, 1999). No conoce como ocurre la biosíntesis de citocromos únicamente por aminoácidos como fuente de carbono en *B. subtilis*, sin embargo los resultados de este trabajo sugieren una que al menos hasta las 9 horas de crecimiento *B. subtilis* puede sostener la cadena respiratoria con aminoácidos como fuente de carbono.

B. subtilis puede expresar dos oxidasas terminales con hemo A, la aa_3 y la caa_3 , en este trabajo la primera se expresó a las 5 y 9 hrs. de crecimiento en medio LB y a 5 hrs. en MSR, a diferencia de la citocromo oxidasa caa_3 que se presentó en LB a las 23 hrs. y en MSR a partir de las 9 hrs. Este comportamiento es similar al reportado por Winstedt y von Wachenfeldt en el 2000, donde describen la expresión de las quinol oxidasas aa_3 y bd como esenciales para el crecimiento aeróbico de *B. subtilis* 168 durante la fase exponencial, mientras que la citocromo oxidasa caa_3 se expresa hasta que las células entran en fase estacionaria, ya que es necesaria para la esporulación eficiente de *B. subtilis* 168, probablemente porque también bombea protones, necesarios para conservar la energía suficiente para la esporulación. Los cultivos de LB mantuvieron a la oxidasa aa_3 por más tiempo probablemente por la fuente de carbono presente en el medio, que al no alimentar directamente a la cadena respiratoria como el succinato retrasó el desarrollo de la citocromo oxidasa caa_3 del cultivo.

Con respecto a la regulación de la expresión de la quinol oxidasa bd en *B. subtilis*, se sabe que se expresa cuando las células se crecen en alta aeración. La expresión del operón *cyd* que codifica para este citocromo se induce y alcanza su punto máximo durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria del crecimiento (Winstedt y cols., 1998), por lo que este complejo se observó a las 5 hrs. en MSR. El espectro de absorción del citocromo d de *B. subtilis* es similar al del complejo citocromo bd de *E. coli* teniendo un pico alfa a 628 nm, sugiriendo que esta enzima podría ser similar a la de bacterias Gram-negativas (von Wachenfeldt y Hederstedt, 1992). Se sabe que cepas carentes del citocromo d no pueden crecer bajo condiciones aeróbicas en sustratos no fermentables como el lactato o succinato (Anraku y Gennis, 1987), por lo cual se esperaría observar esta oxidasa en MSR y no en LB.

5.3 Perfiles electroforéticos

En este trabajo se mostró que al realizar una electroforesis con DSLi para las diferentes membranas de *B. subtilis* en concentraciones mayores a

280 µg de proteína se presenta una mayor cantidad de bandas al teñir con TMBZ (Fig. 14, panel A y C), debido quizá a una tinción inespecífica o por una sobre exposición. También es posible que diversas proteínas que poseen hemos unidos no covalentemente, los hayan retenido ya que el detergente DSLi permite hacer electroforesis a 4°C y de esta manera, se evitó la pérdida de los hemos.

Mediante la tinción de TMBZ se observó, que al haber mayor expresión del citocromo *c₅₅₀* a las 9 hrs. en LB y 23 hrs. en MSR, las bandas de las subunidades: CtaC (*caa₃*), QcrC y QcrB (*b_{6c}*) se ven incrementadas. Lo anterior indica una relación estrecha entre estos complejos y el citocromo *c₅₅₀*, como lo reportado para *Paracoccus denitrificans* donde su complejo III, IV y uno de los citocromos pequeños (*c₅₅₂*) se asocian y forman súper complejos con diferente estequiometría (Stroh y cols., 2004).

En un estudio reciente de la formación de súper complejos de la cadena respiratoria de *B. subtilis* 168 en medio MSR cultivada por 23 hrs., mediante geles de dos dimensiones se demostró que el complejo *b_{6c}*, *caa₃* y el citocromo *c₅₅₀* se asocian para formar diferentes súper complejos (García Montes de Oca, 2011). Datos comparables se observaron en este trabajo donde al sobre expresar el citocromo *c₅₅₀* subunidades de los complejos *b_{6c}* y *caa₃* se ven afectadas sin importar el medio de cultivo (Fig. 14, panel B y D), con lo que proponemos la presencia el súper complejo *b_{6c}-c₅₅₀-caa₃* en ambos medios, aunque en diferentes tiempos de cultivo.

Por otra parte se ha observado que en cultivos *B. subtilis* en condiciones no limitantes de nitrógeno los aminoácidos presentes en el medio de cultivo son usados para generar células y coenzimas acopladas a la reducción del nitrato. El ciclo de Krebs se mantiene inactivo debido a que *Bacillus* toma los nutrientes (aminoácidos, vitaminas y micronutrientes) para el anabolismo. La energía producida por la reducción del nitrato a nitrito y la ruta de la acetoína-butanodiol es de 25% cada una (Espinosa de los Monteros, 2005). Estos argumentos muestran por qué en nuestro estudio las bandas identificadas como subunidades de la nitrito y nitrato reductasa en los geles de DSLi a las 5 hrs. se

ven en menor cantidad en MSR que en medio LB, pues el nitrógeno proporcionado por los diferentes péptidos que contiene el medio solo aportan una cuarta parte de esta. Estos elementos también apoyan nuestra descripción al menor rendimiento celular en LB y la baja concentración de la SDH en este medio. Sin embargo además de la masa molecular aparente es necesario realizar pruebas directas de la presencia de estas enzimas.

Las bandas de proteína atribuidas a la ATP sintasa en medio LB se van haciendo menos intensas a mayor tiempo del cultivo, contrario a lo observado en MSR (Fig. 15). Este fenómeno también se ha presentado en *E. coli* al cultivarla en medio LB, LB-glucosa y LB-succinato. Mediante ensayos de inmunoprecipitación la relación de las subunidades b y c de la F_0 siempre es mayor en la ATP sintasa purificada a partir de células crecidas en LB-glucosa, siguiendo el LB-succinato y finalmente el LB (Schemidt y cols., 1998). Probablemente las subunidades α y β de la F_1 identificadas sean afectadas de la misma manera.

5.4 Actividad de los complejos respiratorios

La actividad de la NADH deshidrogenasa de *Bacillus* pHP13-550 mostró un incremento significativo a las 9 y 23 hrs. en medio LB y a 23 hrs en MSR (Tablas 16 y 17), este fenómeno parece responder a los niveles máximos de sobre expresión del citocromo c_{550} y a la fase de crecimiento en ambos casos. Estos comportamientos se han explicado en mitocondrias y alfa proteobacterias mediante una estabilización estructural al formar súper complejos, como la reportada para los complejos I y III mitocondriales la cual resulta en el control de la velocidad de la oxidación del NADH (Bianchi y cols., 2004). Sin embargo en *B. subtilis* este mecanismo es poco probable ya que su NADH deshidrogenasa está compuesta por una sola proteína y análisis de sus súper complejos en nuestro laboratorio indican que no se asocia con otros complejos. El aumento de la actividad de esta enzima en medio LB puede tener relación con el mayor requerimiento energético de la bacteria, mientras en MSR el succinato al ingresar al ciclo de Krebs genera más NADH.

Hägerhäll y cols. en 1992 obtuvieron valores de actividad enzimática del complejo SDH en membranas, de 65 y 58 nmoles de DCPIP reducido min^{-1} por mg^{-1} de proteína, valores similares a los obtenidos en nuestro estudio en LB al primer y último tiempo. Estos valores se obtuvieron de *B. subtilis* con el vector pHP13 y con la sobre expresión de la SDH crecidas hasta la fase exponencial en un medio compuesto de sales y aminoácidos. A las 9 hrs., (Tabla 16A) se obtuvo un incremento de actividad que podría deberse a que las células están en fase de estacionaria, mientras en MSR la actividad de este complejo fue mayor, debido a la elevada cantidad de succinato presente en este medio.

La actividad máxima del complejo b_6c se presentó en membranas de pHP13-550 a las 9 hrs. en LB y a las 23 hrs. en MSR, valores significativamente mayores a la actividad de membranas pHP13. Estas velocidades (con excepción a las obtenidas a 23 hrs. en MSR, que casi la duplica, Tablas 15) son similares a las obtenidas en nuestro laboratorio para *B. subtilis* 168 (WT) con 12.58 nmoles de citocromo reducido min^{-1} mg de proteína $^{-1}$. Es importante mencionar que utilizamos al DBH₂ (decilubiquinol), que siendo una benzoquinona no es el sustrato adecuado para la cadena transportadora de electrones de *B. subtilis* que trabaja con naftoquinonas (García, 2010). También pudimos observar que la mayor actividad obtenida parece responder a los niveles máximos de sobre expresión del citocromo c_{550} , mostrados tanto en los espectros de absorción como en los geles de DSLi teñidos con TMBZ, donde se presentó mayor intensidad en las bandas correspondientes a las subunidades QcrC y QcrB del complejo b_6c .

Finalmente la citocromo c oxidasa de las bacterias pHP13-550 mostró mayor actividad en todos los tiempos y medios de cultivos, con excepción de las 23 hrs. en MSR (Tablas 15). Estas diferencias fueron significativas a 5 hrs. en ambos medios y a las 9 hrs. en MRS. Es probable que esto se deba a un comportamiento similar al observado en la bacteria termófila *Bacillus* PS3, donde el citocromo c_{551} fue propuesto para desempeñar un papel importante en la cadena respiratoria con el complejo caa_3 , ya que este citocromo actúa como mediador transfiriendo electrones entre los complejos citocromo bc_1 o b_6f y la oxidasa terminal, manifestándose en la actividad del complejo caa_3 (Sone y

cols., 1989). En nuestro estudio al sobre expresar el citocromo c_{550} también se podría estar estimulando la actividad de este complejo, ya que con ayuda de la tinción con TBMZ en los geles de DSLi se observó que la banda identificada como CtaC del complejo caa_3 se intensifica en el mismo tiempo donde se incrementa la sobre expresión del citocromo c_{550} , al igual que las subunidades del complejo tipo b_6c (Fig. 14). Esta observación concuerda con lo reportado para los complejos respiratorios b_6c y caa_3 de muchas bacterias, donde se ha demostrado la presencia de súper complejos en *P. denitrificans* y *Bacillus* PS3, componiendo así un súper complejo con los citocromos bc_1 y c_{552-aa_3} , que funciona como quinol oxidasa terminal (Iwasaki y cols., 1995).

6. Conclusiones.

- 1.- Se logró clonar y sobre expresar el citocromo *c₅₅₀* en *B. subtilis*.
- 2.- El rendimiento de biomasa en peso húmedo de *B. subtilis* fue mayor al cultivarlo en medio MSR.
- 3.- La sobre expresión del citocromo *c₅₅₀* no es constitutiva durante el desarrollo de *B. subtilis* y varía dependiendo de la fuente carbono presente en el medio.
- 4.- El enriquecimiento del citocromo *c₅₅₀* de *B. subtilis* contribuye a una mayor biosíntesis de las subunidades QcrB, QcrC y CtaC de los complejos tipo *bc* y la oxidasa *caa₃*.
- 5.- La sobre expresión del citocromo *c₅₅₀* influye en la actividad enzimática en ambos medios, incrementándola significativamente a las 23 hrs. en la NADH deshidrogenasa, a las 9 y 23 hrs. en la SDH, a las 9 hrs. en el complejo *b₆c* y a las 5hrs. en el complejo *caa₃*.

7. Perspectivas.

- 1.- Actualmente se está tratando de obtener la región soluble del citocromo *c₅₅₀* de *B. subtilis* para medir la actividad del complejo *b₆c*.
- 2.- La caracterización de esta ruta metabólica puede seguir estudiándose usando una mutante en la síntesis del citocromo *c₅₅₀*.
- 3.- Se puede proceder a estudiar el efecto que tiene esta sobre expresión en la formación de súper complejos de la cadena respiratoria.
- 4.- Podemos insertar este plásmido recombinante en *B. subtilis* mutantes de las diversas quinol oxidasas, como estrategia para la posible purificación del complejo *b₆c*.

8. Anexo.

Tabla 9. Identidad de los citocromos de *Bacillus subtilis*.

Citocromos	pico nm	Referencia
SDH		
citocromo <i>b</i> ₁	553	Hagerhall y cols., (1992). <i>Biochemistry</i> . 31 : 7411-7421.
citocromo <i>b</i> ₂	558	
<i>bc</i>		
citocromo <i>c</i>	554	de Vrij y cols., (1987). <i>Eur. J. Biochem.</i> 166 : 589-595.
citocromo <i>b</i>	564	
<i>cccA</i>	550	Bentsson y cols. (1999). <i>J. Biol. Chem.</i> 274 (37): 26179-26184.
<i>cccB</i>	551	
<i>caa</i> ₃		
citocromo <i>c</i>	550	Henning, W. y cols. (1995). <i>Biochem J.</i> 309: 279-283.
citocromo <i>a</i>	605	
<i>aa</i> ₃		
citocromo <i>a</i>	600	Henning, W. y cols. (1995). <i>Biochem J.</i> 309: 279-283.
QOX tipo <i>bd</i>		
citocromo <i>b</i>	561-563	Azarkina y cols. (1999). <i>J. Biol. Chem.</i> 46 (12): 32810-17.
citocromo <i>d</i>	628	

Para corroborar los datos presentados a lo largo de este trabajo, se procedió a crecer cultivos y obtener membranas nuevamente, para realizar repeticiones independientes de la caracterización realizada. Los siguientes datos son los resultados obtenidos usando material biológico nuevo, los cuales son similares al compararlos con los contenidos en el apartado de resultados. Con respecto a las velocidades obtenidas de los diversos ensayos enzimáticos, en esta sección se muestra una comparación de tablas que muestran la similitud de los valores en ensayos independientes.

Tabla 10. Comparación del rendimiento celular (g de peso húmedo/L) del nuevo crecimiento de las cepas de *B. subtilis*.

Cepas (LB g/L)	5 horas	9 horas	23 horas	Cepas (MSR g/L)	5 horas	9 horas	23 horas
pHP13	3.01	5.30	5.25	pHP13	5.02	6.61	12.63
pHP13-550	3.10	5.37	5.50	pHP13-550	4.62	8.23	11.60

Tabla 11. Comparación de la concentración de proteína membranal por mg/mL de las diferentes *B. subtilis* crecidas.

Cepas LB	mg/mL	Cepas MSR	mg/mL
pHP13 5 H	15.2	pHP13 5 H	6.10
pHP13-550 5 H	11.8	pHP13-550 5 H	6.60
pHP13 9 H	18.4	pHP13 9 H	18.8
pHP13-550 9 H	28.3	pHP13-550 9 H	13.7
pHP13 23 H	24.5	pHP13 23 H	20.6
pHP13-550 23 H	30.6	pHP13-550 23 H	18.2

Tabla 12. Citocromos presentes en la membrana de *Bacillus subtilis*, crecidas nuevamente en Medio LB, ^a posible identidad del citocromo, a partir de la Tabla 9 (Anexo).

Cepa	nm	^a posible citocromo	μM Cit c	nm	^a posible citocromo	μM Cit b	nm	^a posible citocromo	μM Cit a
pHP13 5 H	550	<i>C₅₅₀</i>	1.06	561	<i>bc</i>	1.65	600	<i>aa₃</i>	3.98
pHP13-550 5 H	551	<i>C₅₅₁</i>	9.08	563	<i>bc</i>	4.6	601	<i>aa₃</i>	2.34
pHP13 9 H	551	<i>C₅₅₁</i>	4.31	563	<i>bc</i>	5.3	600	<i>caa₃</i>	3.10
pHP13-550 9 H	550	<i>C₅₅₀</i>	32.81	563	<i>bc</i>	12.80	601	<i>aa₃</i>	10.63
pHP13 23 H	551	<i>C₅₅₁</i>	14.93	563	<i>bc</i>	10.30	603	<i>caa₃</i>	7.25
pHP13-550 23 H	550	<i>C₅₅₀</i>	17.89	563	<i>bc</i>	7.85	603	<i>caa₃</i>	5.28

Tabla 13. Citocromos presentes en la membrana de *Bacillus subtilis*, crecidas nuevamente en Medio MSR, ^a posible identidad del citocromo, a partir de la Tabla 9 (Anexo).

Cepa	nm	^a posible citocromo	μM Cit c	nm	^a posible citocromo	μM Cit b	nm	^a posible citocromo	μM Cit a
pHP13 5 H	X	X	X	558	SDH	5.31	600	<i>aa₃</i>	3.98
pHP13-550 5 H	551	<i>C₅₅₁</i>	3.69	562	<i>bc</i>	4.07	601	<i>aa₃</i>	3.21
pHP13 9 H	552	<i>C₅₅₁</i>	4.57	557	SDH	5.21	603	<i>caa₃</i>	2.26
pHP13-550 9 H	550	<i>C₅₅₀</i>	13.68	560	SDH	5.02	604	<i>caa₃</i>	3.67
pHP13 23 H	551	<i>C₅₅₁</i>	19.44	562	<i>bc</i>	12.01	604	<i>caa₃</i>	12.52
pHP13-550 23 H	550	<i>C₅₅₀</i>	39.82	563	<i>bc</i>	14.62	603	<i>caa₃</i>	13.66

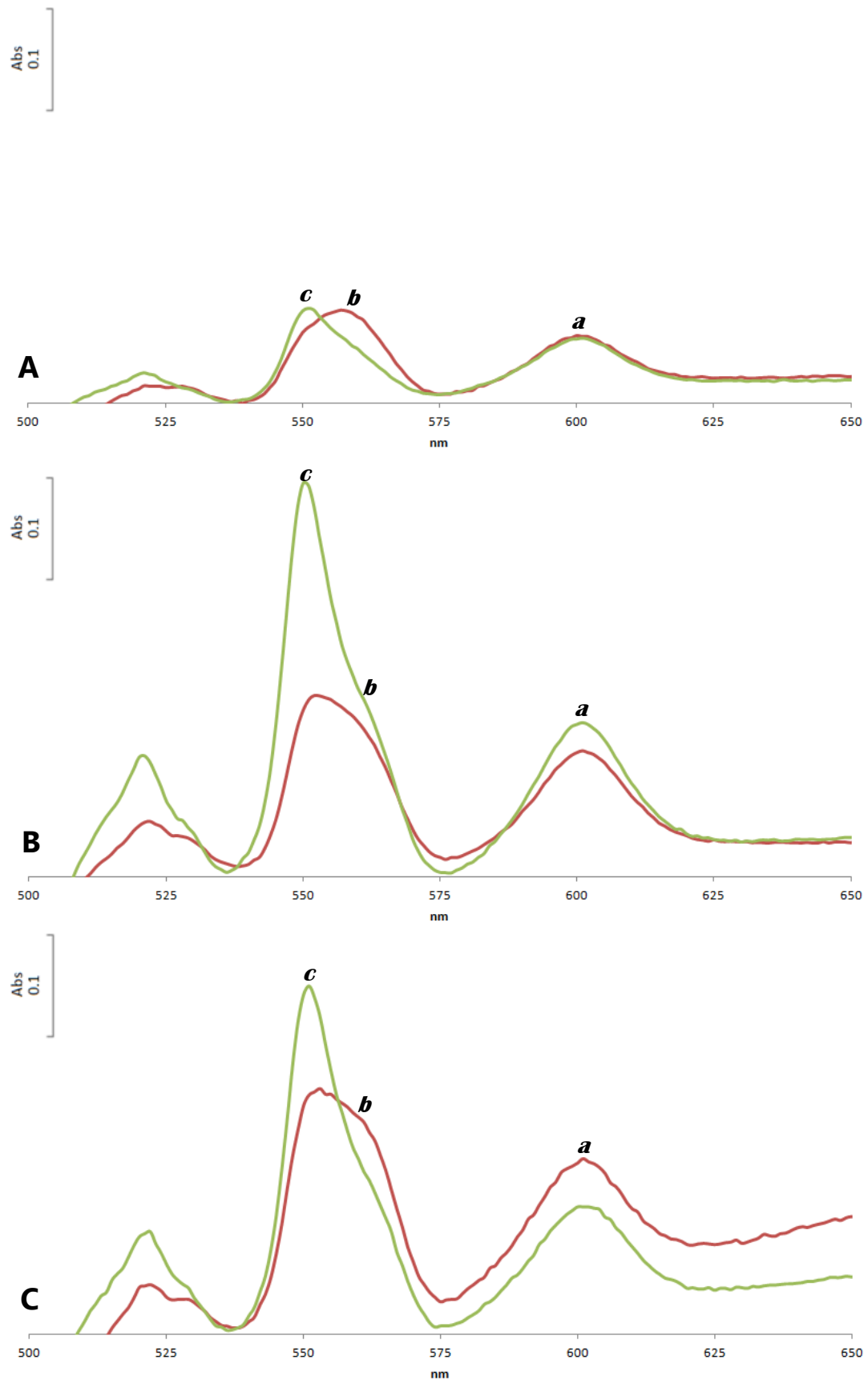


Figura 18. Espectros de absorción diferenciales (reducido con ditionita menos oxidado) de nuevas membranas de *B. subtilis* crecidas en LB. Usando 2 mg de proteína de las diferentes membranas (pHP13/línea rojo y pHP13-550/línea verde), A; 5 horas, B; 9 horas y C; 23 horas.

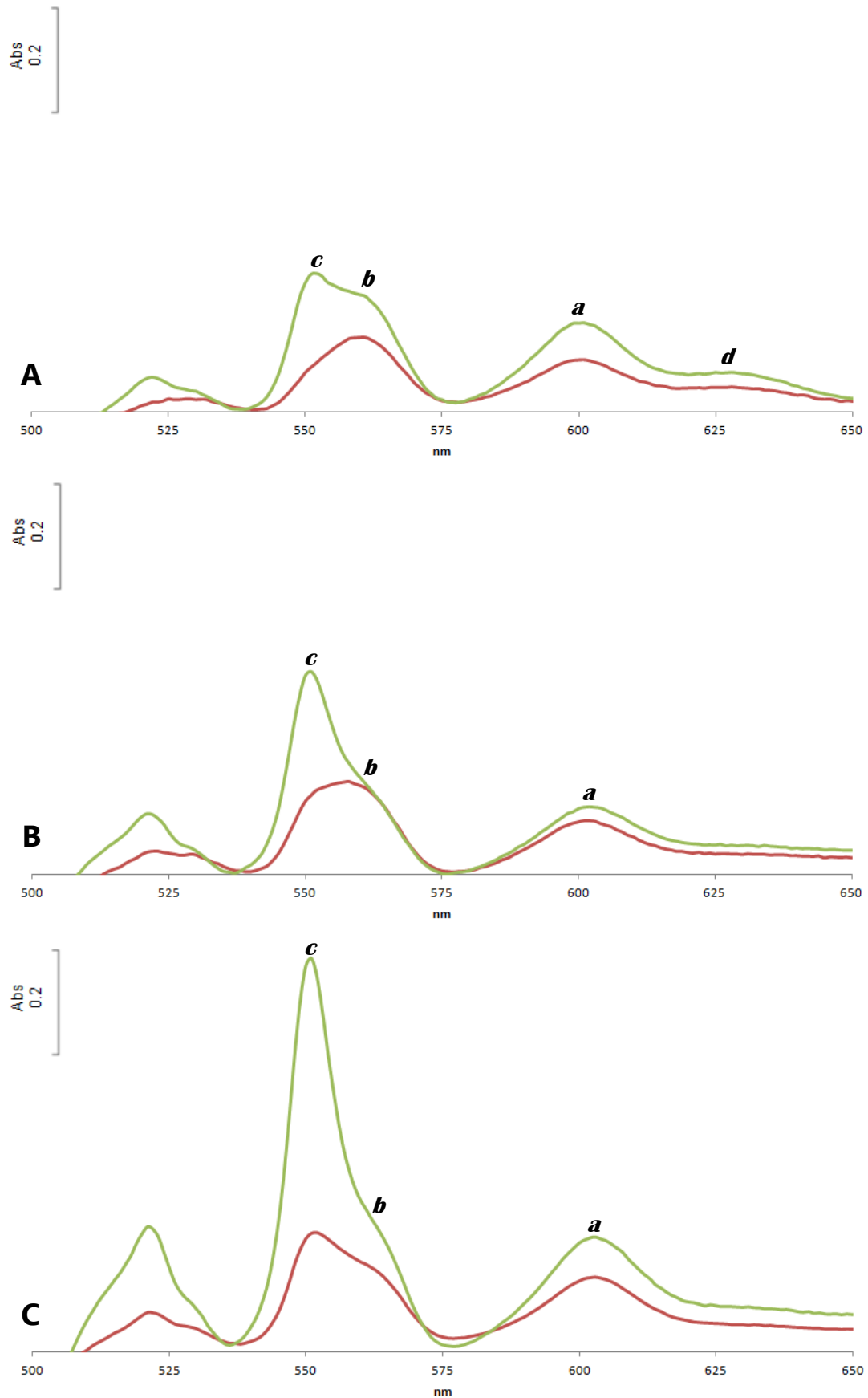


Figura 19. Espectros de absorción diferenciales (reducido con ditionita menos oxidado) de las membranas de *B. subtilis* crecidas en MSR. Usando 2 mg de proteína de las diferentes membranas (WT/azul, pHP13/rojo y pHP13-550/verde), A; 5 horas, B; 9 horas y C; 23 horas.

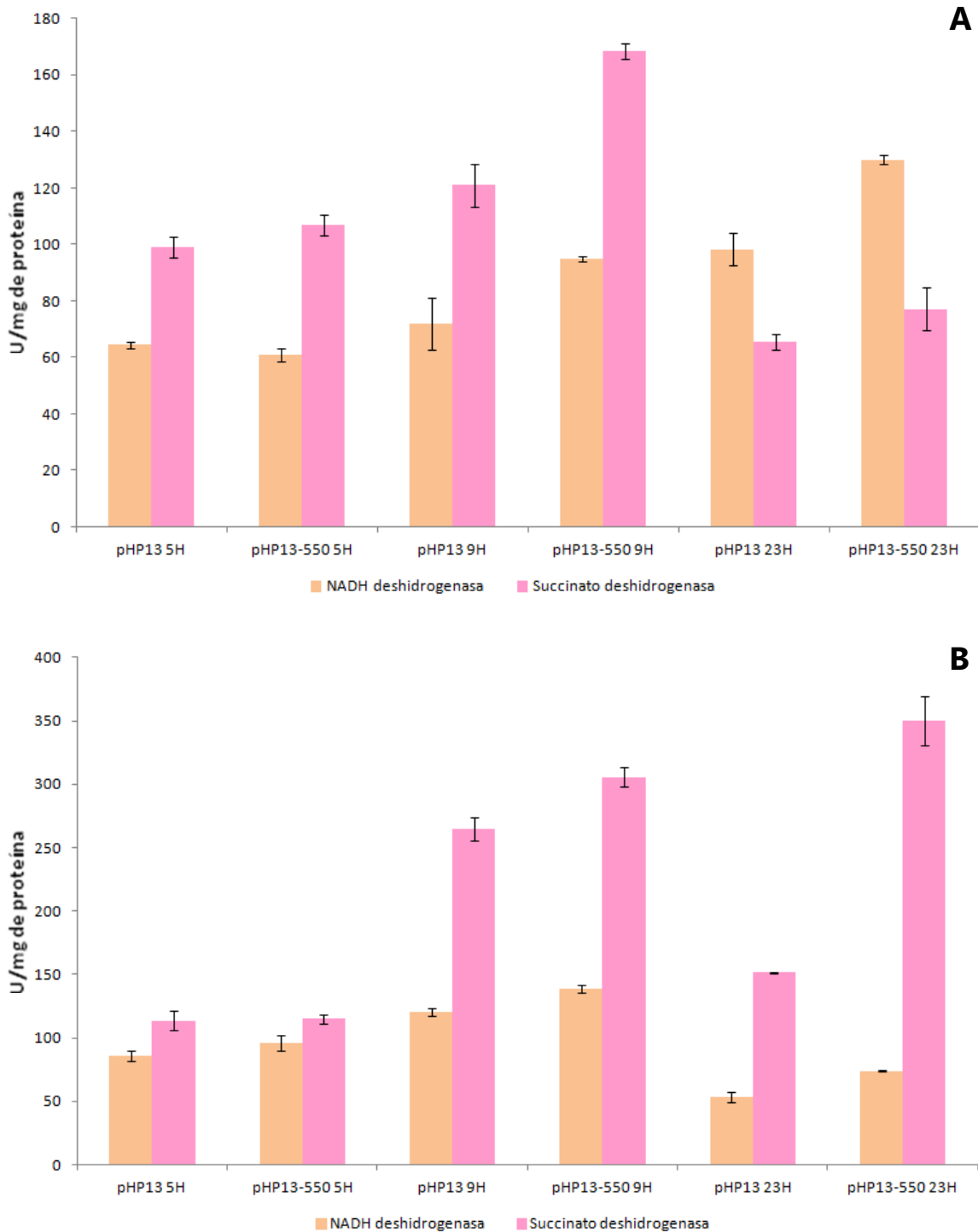


Figura 20. Actividad enzimática de la NADH deshidrogenasa (barras naranjas) y SDH (barras rosas). A; Actividad obtenida utilizando membranas de células crecidas en LB y B; usando membranas de bacterias cultivadas en MSR (Ensayo 2). Los asteriscos representan un cambio significativo en la actividad del complejo en particular. La actividad está reportada en U/mg, donde U= nmol de DCPIP oxidado min^{-1} , los valores obtenidos se muestran en las Tablas 16B y 17B, Anexo.

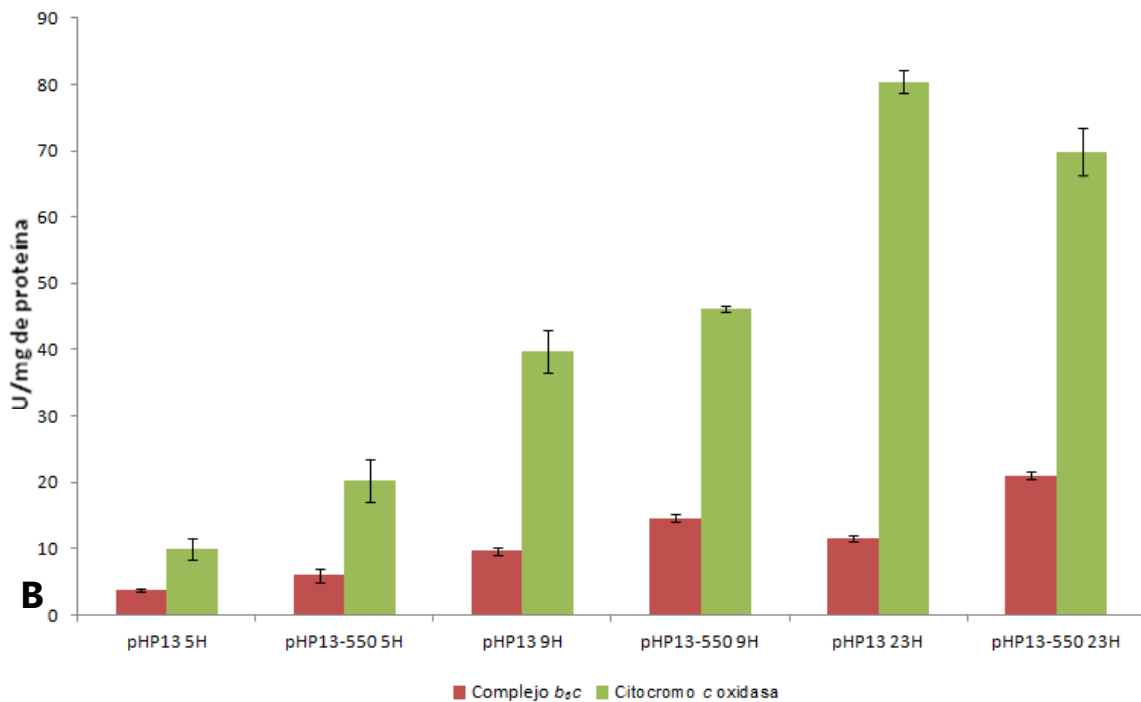
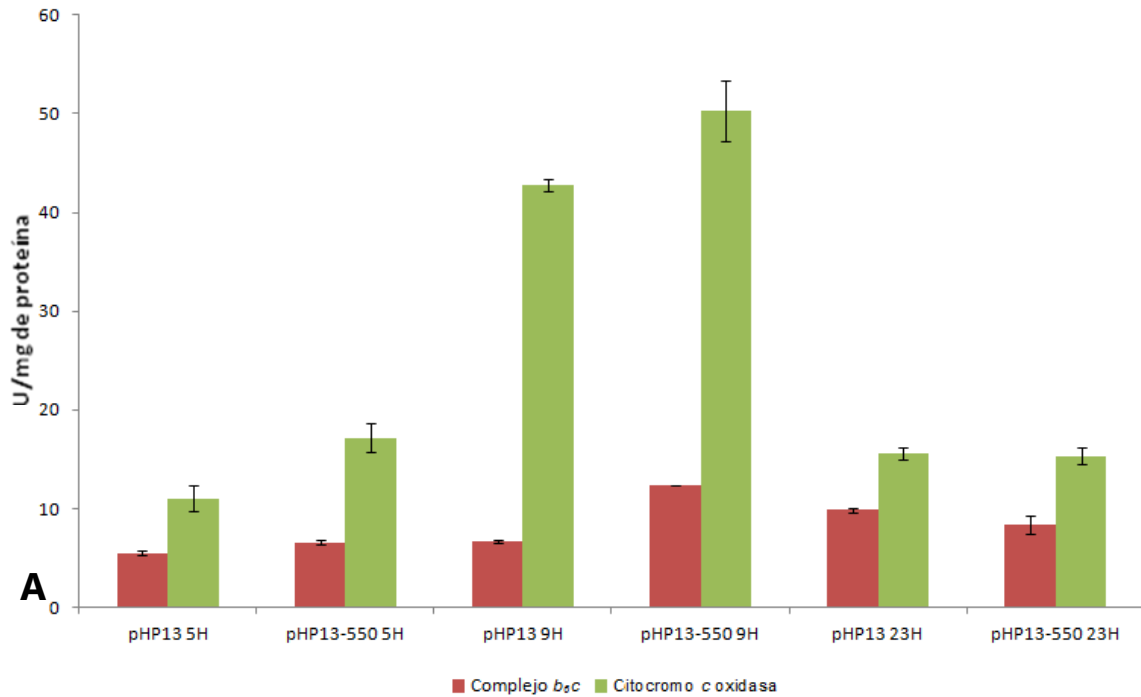


Figura 21. Actividad enzimática de los complejos b_5c (barras rojas) y citocromo c oxidasa (barras verdes). A; Actividad obtenida utilizando membranas de células crecidas en LB y B; usando membranas de bacterias cultivadas en MSR (Ensayo 1). Los asteriscos representan un cambio significativo en la actividad del complejo en particular. Los asteriscos representan un cambio significativo en la actividad del complejo en particular. La actividad está reportada en U/mg, donde U= nmoles de citocromo c oxidado o reducido min^{-1} , los valores obtenidos se muestran en las Tablas 14B y 15B, Anexo.

Tabla 14. Actividad de los complejos respiratorios (expresadas en nmoles óxido-reducidos de citocromo c de corazón de caballo por minuto por mg de proteína) obtenidas con el ensayo 1, de mitocondrias de levadura y las diferentes membranas de *B. subtilis* de medio LB. La tabla A contiene los valores promedio de un primer grupo de ensayos, mientras la tabla B presenta el promedio de un segundo grupo realizado con una nueva extracción de membranas.

14A	Levadura	pHP13 5H	pHP13-550 5H	pHP13 9H	pHP13-550 9H	pHP13 23H	pHP13-550 23H
Complejo III	31.08	5.77	6.19	6.68	11.84	8.07	6.68
Complejo IV	30.20	12.73	19.43	43.16	43.37	13.22	14.85

14B	Levadura	pHP13 5H	pHP13-550 5H	pHP13 9H	pHP13-550 9H	pHP13 23H	pHP13-550 23H
Complejo III	37.88	5.49	6.58	6.68	12.34	9.84	8.31
Complejo IV	32.65	11.04	17.19	42.76	50.29	15.52	15.30

Tabla 15. Actividad de los complejos respiratorios (expresadas en nmoles óxido-reducidos de citocromo c de corazón de caballo por minuto por mg de proteína) obtenidas con el ensayo 1, de mitocondrias de levadura y las diferentes membranas de *B. subtilis* de medio MSR. La tabla A contiene los valores promedio de un primer grupo de ensayos, mientras la tabla B muestra el promedio de un segundo grupo realizado con una nueva extracción de membranas.

15A	Levadura	pHP13 5H	pHP13-550 5H	pHP13 9H	pHP13-550 9H	pHP13 23H	pHP13-550 23H
Complejo III	31.08	4.28	5.40	10.45	13.99	11.82	22.07
Complejo IV	30.20	9.21	12.76	42.84	52.87	70.41	66.21

15B	Levadura	pHP13 5H	pHP13-550 5H	pHP13 9H	pHP13-550 9H	pHP13 23H	pHP13-550 23H
Complejo III	37.88	3.84	6.00	9.62	14.65	11.56	21.02
Complejo IV	32.65	9.97	20.33	39.70	46.19	80.41	69.89

Tabla 16. Actividades de los complejos respiratorios (expresados en nmoles de DCPIP reducido por minuto por mg de proteína) obtenidas con el ensayo 2, de mitocondrias de levadura y las diferentes membranas de *B. subtilis* de medio LB. La tabla A contiene los valores promedio de un primer grupo de ensayos, mientras la tabla B presenta el promedio de un segundo grupo realizado con una nueva extracción de membranas.

16A	Levadura	pHP13 5H	pHP13-550 5H	pHP13 9H	pHP13-550 9H	pHP13 23H	pHP13-550 23H
Complejo I	278.87	62.14	55.83	71.50	85.77	85.10	127.97
Complejo II	14.23	79.30	80.80	129.09	167.89	54.81	77.70

16B	Levadura	pHP13 5H	pHP13-550 5H	pHP13 9H	pHP13-550 9H	pHP13 23H	pHP13-550 23H
Complejo I	304.09	64.43	60.88	71.97	94.92	98.29	129.95
Complejo II	12.27	98.98	106.86	120.92	168.39	65.50	77.15

Tabla 17. Actividades de los complejos respiratorios (expresados en nmoles de DCPIP reducido por minuto por mg de proteína) obtenidas con el ensayo 2, de mitocondrias de levadura y las diferentes membranas de *B. subtilis* de medio MSR. La tabla A contiene los valores promedio de un primer grupo de ensayos, mientras la tabla B presenta el promedio de un segundo grupo realizado con una nueva extracción de membranas.

17A	Levadura	pHP13 5H	pHP13-550 5H	pHP13 9H	pHP13-550 9H	pHP13 23H	pHP13-550 23H
Complejo I	278.87	79.40	73.26	117.11	127.77	43.30	71.20
Complejo II	14.23	131.97	145.91	267.33	315.61	161.12	375.54

17B	Levadura	pHP13 5H	pHP13-550 5H	pHP13 9H	pHP13-550 9H	pHP13 23H	pHP13-550 23H
Complejo I	304.09	85.47	96.37	120.53	138.35	53.33	73.85
Complejo II	12.27	113.66	115.06	264.64	305.45	151.40	350.45

9. Bibliografía.

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J. D. (2004). *Biología molecular de la célula*. Omega. Barcelona. 1465 pag.
- Anraku, Y. y Gennis, R. B. (1987). The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochemical Sciences*. **12**:262-266.
- Andrews, D., Mattatall, N., R., Arnold, D. y Hill, B., C. (2005). Expression, purification and characterization of the CuA–cytochrome c domain from subunit II of the *Bacillus subtilis* cytochrome *caa*₃ complex in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. **42**:227–235.
- Azarkina, N., Siletsky, S., Borisov, V., von Wachenfeldt, C., Hederstedt, L. y Konstantinov, A. A. (1999). A cytochrome bb'-type quinol oxidase in *Bacillus subtilis* strain 168. *J. Biol. Chem.* **274**:32810-17.
- Bengtsson, J., Rivolta, C., Hederstedt, L. y Karamata D. (1999). *Bacillus subtilis* contains two small c-type cytochromes with homologous heme domains but different types of membrane anchors. *J. Biol. Chem.* **274**:26179–26184.
- Bénit, P., Goncalves, S., Philippe, D. E., Brière, G. M. y Rustin, P. (2006). Three spectrophotometric assays for the measurement of the five respiratory chain complexes in minuscule biological samples. *Clinical Acta*. **874**:81-86.
- Bianchi, C., Genova, M. L., Castelli, G. P. y Lenaz, G. (2004). The Mitochondrial Respiratory Chain Is Partially Organized in a Supercomplex Assembly. *J. Biological Chemistry*. **279**: 36562–36569.
- Blencke H. M., Homuth, G., Ludwig, H., Mäder, U., Hecker, M. y Stülke, J. (2003). Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metabolic Engineering*. **5**:133–149.
- Broglie, R. M., Hunter, C. N., Delepelaire, P., Niederman, R. A., Chua, N. y Clayton, R. K. (1980). Isolation and characterization of the pigment-protein complexes of *Rhodospseudomonas sphaeroides* by lithium dodecyl sulfate/ polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*. **77**:87-91.

- de Vrij, W., Van Den Burg, B. y Konings, W. N. (1987). Spectral and potentiometric analysis of cytochromes from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **166**:589-595.
- Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Zhou, Y., Hutcheon, M. L. y Cross, R. L. (1995). Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F₁ ATPase. *Proc. Natl. Acad.* **9**:10964–10968.
- Eguiarte, L. E., Sousa, V. y Aguirre, X. 2007. Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT. México. 499-336 pp.
- Espinosa de los Monteros, F., J., J. 2005. Caracterización del proceso de crecimiento de *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaerobias. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. Cuernavaca. 106 pp.
- Felix, J. A. y D. G. Lundgren. (1973). Electron transport system associated with membranes of *Bacillus cereus* during vegetative growth and sporulation. *J. Bact.* **115**:552-559.
- Fisher, S. H. 1999. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference. *Mol. Microbiol.* **32**:223–232.
- García, G., A., P. 2010. Caracterización de la actividad del complejo tipo *bc* de *Bacillus subtilis* con diferentes quinonas. Universidad Nacional Autónoma de México. FES Iztacala. México. 100 pp.
- García Montes de Oca, L., Y., J. 2011. Caracterización de la formación de súper complejos de la cadena respiratoria de la bacteria *Bacillus subtilis* 168. Universidad Nacional Autónoma de México. FES Iztacala. México. 63 pp.
- Hägerhäll, C., Aasa, R., Von Wachenfeldt, C. y Hederstedt, L. (1992). Two hemes in *Bacillus subtilis* succinate:menaquinone oxidoreductase. *Biochemistry.* **31**:7411-7421.
- Harwood, C. R. y Cutting, S. 1990. Molecular biological methods for *Bacillus*. Wiley Editorial. England. 146-147 pp.
- Hederstedt, L. (1986). Molecular properties, genetics, and biosynthesis of *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase complex. *Methods Enzymol.* **126**: 399-414.

- Henning, W., Vo, L., Albanese, J. y Hill, B. C. (1995). High-yield purification of cytochrome aa_3 and cytochrome caa_3 oxidases from *Bacillus subtilis* plasma membranes. *Biochem J.* **309**: 279-283.
- Holmgren, E., Hederstedt, L. y Rutberg, L. (1978). Role of Heme in Synthesis and Membrane Binding of Succinic Dehydrogenase in *Bacillus subtilis*. *J. Bact.* **138**:377-382.
- Inji, S., Han-Bong, R., Hyung-Soon, Y. y Sa-Ouk, K. (2005). Cytochrome C_{550} is related to initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiology.* **43**:244-250.
- Iwasaki, T., Matsuura, K. y Oshima, T. (1995). Resolution of the Aerobic Respiratory System of the Thermoacidophilic Archaeon, *Sulfolobus* sp. Strain 7. *J. Biological Chemistry.* **270**:30881–30892.
- Konings, W. N. y Freese, E. (1976). Amino Acid Transport in Membrane Vesicles of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **247**: 2408-2418.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F. y Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* **390**:249-256.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *JBC.* 193: 265-275.
- Markwell, M. A, Haas S. M., Bieber L. L. y Tolbert N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**:206-210.
- Mathews, C. K., van Holde, K. E. y Ahern, K. G. 2002. Bioquímica. Pearson. Madrid. 583-622 pp.
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A. y Kannt, A. (1998). Cytochrome c oxidase: Structure and Spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**:329–56.

- Monedero, V., Boël, G. y Deutscher, J. (2001). Catabolite Regulation of the Cytochrome *c*₅₅₀-Encoding *Bacillus subtilis* *cccA* Gene. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:433-438.
- Montoya, V., H., H. 2008. Microbiología básica para el área de la salud y afines. Universidad de Antioquia. 282 pag.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. 2008. Lehninger Principles of Biochemistry. New York. 1013 pag.
- Nübel, E., Wittig, I., Kerscher, S., Brandt, U. y Schägger, H. (2009). Two-dimensional native electrophoretic analysis of respiratory supercomplexes from *Yarrowia lipolytica*. *Proteomics.* **9**:2408–2418.
- Resnekov, O., Rutberg, L. y von Gabain, A. (1990). Changes in the stability of specific mRNA species in response to growth stage in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry.* **87**:8355-8359.
- Rich, P., R. (2003). The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochemical Society.* **31**:1095-1105.
- Schemidt, R., A., Qu, J., Williams, J., R. y Brusilow, W., S., A. Effects of Carbon Source on Expression of F_o Genes and on the Stoichiometry of the c Subunit in the F₁F_o ATPase of *Escherichia coli*. *J. Bact.* **180**:3205-3208.
- Samaniego, H., M. 2007. Clonación, sobre-expresión y purificación de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en *Escherichia coli*. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. Mexico. 89 pp.
- Sone, N., Kutoh, E. y Yanagita, Y. (1989). Cytochrome *c*-551 from the thermophilic bacterium PS3 grown under air-limited conditions. *Biochimica et Biophysica Acta.* **977**:329-334.
- Sone, N., Nagata, K., Kojima, H., Tajima, J., Koderá, Y., Kanamaru, T., Noguchi, S. y Sakamoto, J. (2001). A novel hydrophobic diheme *c*-type cytochrome. Purification from *Corynebacterium glutamicum* and analysis of the *QcrCBA* operon encoding three subunit proteins of a putative cytochrome reductase complex. *Biochimica et Biophysica Acta* **1503**:279-290.

- Sonenshein, A. L., Hoch J. A. y Losick, R. 2002. *Bacillus subtilis* and its closest relatives from genes to cells. American Society Microbiology. Washington, DC. 629 pag.
- Stephan-Olav, W., Schneider, D., Boronowsky, U., Jäger, C., Klughammer, C., de Weerd, F., van Roon, H., Vermaas, W., Dekker, J. y Rögner, M. (2005). Functional implications of pigments bound to a cyanobacterial cytochrome *b₆f* complex. *FEBS Journal*. **272**:582–592.
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B. y Schägger, H. (2004). Assembly of Respiratory Complexes I, III, and IV into NADH Oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biological Chemistry*. **279**:5000–5007.
- Sun, F., Huo. X., Zhai, Y., Wang. A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M. y Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein Complex II. *Cell*. **121**:1043–1057.
- Thomas, P. E., Ryan, D. y Levin, W. (1976). An improbed staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P450 on sodium dodecil sulfate poliacrylamide gels. *Anal. Biochem*. **75**:168-176.
- Thony-Meyer, L. (1997). Biogenesis of Respiratory Cytochromes in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology*. **61**:337–376.
- von Wachenfeldt, C. y Hederstedt, L. (1990). *Bacillus subtilis* 13-Kilodalton Cytochrome c-550 Encoded by *cccA* Consists of a Membrane-Anchor and a Heme Domain. *FEMS Microbiology*. **100**:91-100.
- von Wachenfeldt, C. y Hederstedt, L. (1992). Molecular biology of *Bacillus subtilis* cytochromes. *J. Biological Chemistry*. **265**:13939-13948.
- Wilson, A. C., Hoch J. A. y Perego, M. (2009). Two small c-type cytochromes affect virulence gene expression in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology*. **72**:109–123.
- Winstedt, L., Yoshida, K., Fujita, Y. y von Wachenfeldt, C. (1998). Cytochrome *bd* Biosynthesis in *Bacillus subtilis*: Characterization of the *cydABCD* Operon. *J. Bact.* **180**:6571–6580.
- Winstedt, L. y von Wachenfeldt, C. (2000). Terminal Oxidases of *Bacillus subtilis* Strain 168: One Quinol Oxidase, Cytochrome *aa₃* or Cytochrome *bd*, Is Required for Aerobic Growth. *J. Bact.* **182**: 6557–6564.

- Yu, J. Y., Hederstedt, L., y Piggot, P. J. (1995). The cytochrome bc complex (menaquinone:cytochrome c reductase) in *Bacillus subtilis* has a nontraditional subunit organization. *J. Bact.* **177**:6751-60.
- Yu, J. Y. y Le Brun, N. (1998). Studies of the Cytochrome Subunits of Menaquinone:Cytochrome c Reductase (*bc* Complex) of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **273**:8860-66.
- <http://www.bgsc.org/Catpart4.pdf>
- http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/index.php?page=Cracking_gel_method
- www.qiagen.com/literature/handbooks/default.asp.

El tiempo es un mito, la muerte un sueño, todo estará bien...

Stephen King