

15 03081
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y
HUMANIDADES.**

**“LA CITOCROMO cOXIDASA TIPO *cbb₃* DE
Rhodobacter sphaeroides: UNA OXIDASA
HEMO-COBRE CON CAPACIDAD DE
BOMBLEAR PROTONES”**

T E S I S
TRABAJO DE INVESTIGACION
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A :
M. EN IBB. ELVA MAYRA TOLEDO CUEVAS

CD. UNIVERSITARIA

MAYO 1998.

260855



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

Este trabajo se inició en el Laboratorio de los Dres. Arturo García Horsman y Blanca Barquera (IFC-UNAM). Posteriormente se continuo en el Laboratorio del Dr. Heliodoro Celis Sandoval (IFC-UNAM), en donde se obtuvo la mayor parte de los resultados. Adicionalmente, varios otros resultados se generaron en el Grupo de Bioenergética de la Universidad de Helsinki, Finlandia, durante una estancia doctoral.

El proyecto se realizó bajo la dirección de los Dres. Arturo Garcia Horsman y Heliodoro Celis Sandoval.

Gracias Celis por tu altruista y generosa ayuda, que nunca buscó ser recompensada. Gracias por que sin todo esto nunca lo habría logrado.

Gracias Arturo, por que constantemente recibí tu ayuda, tus consejos y enseñanzas, aún en los momentos más difíciles.

A los miembros de mi comité tutorial

**Dres. Heliodoro Celis Sandoval, Diego González Halphen,
y Alejandro Zentella Dehesa.**

Muchas gracias por todo el tiempo que con paciencia me brindaron.

**Gracias por sus valiosos comentarios que me ayudaron a mejorar
y a ver con objetividad mis resultados.**

Gracias también por hacerme perderle el miedo a los tutoriales.

**Gracias especialmente a ti Alejandro, por todas las horas extras de asesoría
que más de una vez me orientaron.**

A los miembros de mi Jurado

Dra. Esperanza Martínez Romero.

Dra. Laura Camarena Mejía.

Dr. Diego González Halphen.

Dr. Armando Gómez Puyou.

Dr. Edgardo Escamilla Marván.

Dr. Roberto Coria Ortega.

Dr. Mario Soberón Chávez.

**Gracias por sus valiosas sugerencias que mejoraron mi trabajo y por el tiempo
que amablemente le dedicaron.**

**Gracias Dios, por que a lo largo de mi vida
tu infinito amor ha colmado mi camino;
por que cada día te me regalas en abundancia
y sobre todo gracias, por que además me has obsequiado maravillos dones:
mi esposo, mi bebé, mi familia, mi doctorado y la vida para disfrutarlos.**

A tí mi amado Ernesto

**Por que el haber realizado este doctorado compartiendo nuestras vidas,
le dio un sentido pleno y especial a esta etapa.**

**Gracias por que tu amor, tu apoyo incondicional,
la inmensa seguridad que me brindas, tu amistad, tu fuerza,
tus consejos y toda esa maravilla de nuestra vida juntos
han sido el motor que me ha mantenido a lo largo de este arduo camino,
que ahora logramos culminar juntos.**

A tí mi bebé

**Por que al fin llegas después de desearte tanto.
Gracias por que vienes a darle un nuevo sentido
a esta etapa de mi vida.**

A ti mamita

**Por que tu gran amor y amistad
siguen siempre ahí, al alcance de mi mano,
siempre seguros y atentos.**

A mis hermanos, mi papá y a mi nueva familia

**Roberto, Claudia, Migue y Hugo, Vero, Margarita, Violeta,
Julio y mis seis queridos sobrinos.**

**Gracias por que su amor es la base
desde donde se puede emprender un vuelo seguro.**

A mis suegros

**Por la fortuna que la vida me ha regalado
al ser ustedes los padres de la pareja a quien amo.**

**Gracias por su constante disponibilidad, su
ayuda, su cariño y su aceptación.**

A mis compañeros y amigos del laboratorio

Irma, Lupita, Bety, Silvia y Olivia. Muchas gracias por hacerme sentir siempre como en casa y por la ayuda que me brindaron.

A todos mis amigos

Lupis, Miriam, Marce, Laura, Carla, Vero, Olga, Ronit, Humberto, Bertha, Ember, Sirpa, Satu, Ulla, Mirja, Els, Sabrina, LuzMa, Minerva, Irma, Silvias y a todos los que sin querer he omitido.

Contar con su bella amistad, estemos lejos o cerca, es siempre un apoyo para superar las dificultades.

CONTENIDO

Resumen.	I
Abstract.	III
1. Introducción.	
1.1. Generalidades.	1
1.2. Características estructurales de las tres principales subunidades de las oxidasas hemo-cobre.	10
1.3. La oxidasa eucarionte y las procariontes.	17
1.4. Algunos datos sobre el mecanismo molecular de catálisis de las oxidasas respiratorias y sobre su mecanismo de bombeo de protones.	20
1.5. Las citocromo <i>c</i> oxidasas tipo <i>cbb₃</i> de distintos organismos: su posible función y su patrón de expresión.	27
1.6. Características estructurales de las citocromo oxidasas tipo <i>cbb₃</i> .	31
1.7. El sistema respiratorio de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> y su citocromo <i>c</i> oxidasa tipo <i>cbb₃</i> .	33
2. Objetivos del trabajo.	37
3. Metodología.	
3.1. Construcción del mapa de restricción de la clona pUI1957.	38
3.2. Construcción de vectores para la inactivación del operón.	40
3.3. Actividades de ascorbato-TMPD y citocromo <i>c</i> oxidasa.	43
3.4. Estequiometría del bombeo de protones.	45

Artículo de Investigación "The *cbb₃*-type cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*, a proton-pumping heme-copper oxidase" Mayra Toledo-Cuevas, Blanca Barquera, Robert B. Gennis, Mårten Wikström, and J. Arturo García-Horsman.

Artículo de Investigación (en preparación). "A novel proton pumping *b*-type ubiquinol oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* with extremely high resistance to cyanide" Blanca Barquera, Mayra Toledo-Cuevas, Moshe Finel, Robert. B. Gennis, Mårten Wikström and J.A. García-Horsman.

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Localización de la cadena respiratoria (CR) y de la ATP sintetasa en organismos procariontes y eucariontes.	3
Figura 2. Representación de la cadena respiratoria aeróbica.	4
Figura 3. Estructura de los principales tipos de hemo.	8
Figura 4. Esquema de algunas subclases de la superfamilia de las oxidasas hemo-cobre.	9
Figura 5. Esquema de las tres principales subunidades de la citocromo <i>c</i> oxidasa tipo <i>aa₃</i> y su localización en la membrana.	12
Figura 6. Esquema del sistema respiratorio de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>.	36
Figura 7. Mapas parciales de restricción de los plásmidos pUI1943 y pUI1957.	39
Figura 8. Estrategia para inactivar a la oxidasa <i>cbb₃</i> por la interrupción del operón <i>ccoNOQP</i>.	41
Figura 9. Estrategia para inactivar a la oxidasa <i>cbb₃</i> por la eliminación de fragmentos de los genes <i>ccoN</i> y <i>ccoO</i>.	42
Figura 10. Secuencia de eventos durante la recombinación homóloga.	44
Tabla A. Actividades específicas de ascorbato-TMPD y citocromo <i>c</i> oxidasa	49
Tabla B. Estequiometrías del bombeo de protones medidas como cambios de pH dependientes de pulsos de oxígeno.	50

RESUMEN

Las oxidasas son las enzimas terminales de las cadenas respiratorias aeróbicas. Catalizan la reducción del oxígeno molecular a agua y generan un gradiente electroquímico de protones utilizado en los procesos celulares que requieren de energía.

La superfamilia de oxidasas hemo-cobre, a la cual pertenecen la mayoría de estas enzimas, poseen un centro binuclear hemo-cobre (formado por un hemo de alto spin y un centro Cu_B) en donde se reduce a agua el oxígeno, en un proceso acoplado a la translocación de protones.

Existen dos clases de oxidasas dentro de la superfamilia: las quinol- y las citocromo *c*- oxidasas. Estas últimas se dividen a su vez en citocromo *c* oxidasas tipo aa_3 y tipo cbb_3 . Las quinol oxidasas y las citocromo oxidasas tipo aa_3 difieren principalmente en la subunidad II y particularmente en el centro Cu_A , el cual se encuentra presente solo en las citocromo oxidasas. Las citocromo oxidasas tipo cbb_3 son los miembros más distantes de la superfamilia y aunque conservan el centro binuclear, carecen de las subunidades II y III clásicas y del centro Cu_A . Presentan, en cambio, dos subunidades que unen covalentemente hemo C, los cuales pudieran jugar el papel del Cu_A . Al parecer, estas diferencias estructurales en las citocromo *c* oxidasas cbb_3 no se traducen en diferencias en el mecanismo catalítico de la enzima.

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria gram negativa fotoheterotrófica facultativa. Su sistema respiratorio parece consistir de al menos tres oxidasas: dos citocromo *c* oxidasas, una tipo aa_3 y otra tipo cbb_3 ; y una quinol oxidasa denominada bb_3 .

En este trabajo se caracterizó la región genómica *ccoNOQP* que codifica para la citocromo *c* oxidasa cbb_3 . Esta región está comprendida por cuatro marcos de lectura abiertos que codifican para las cuatro subunidades que constituyen la enzima, las cuales son muy semejantes en otros organismos.

El gene *ccoN* codifica para una proteína homóloga a la subunidad I de las oxidasas hemo-cobre. Aún cuando carece de muchos de los residuos conservados en las enzimas miembros de esta familia, conserva seis residuos de histidinas que en las oxidasas hemo-cobre son los ligandos del hemo de bajo spin y de los metales del centro

binuclear, el hemo de alto spin y el Cu_B .

Los genes *ccoO* y *ccoP* codifican para dos subunidades que unen covalentemente a uno y a dos hemos tipo C, respectivamente. El gene *ccoQ* codifica para una proteína de bajo peso molecular con función desconocida.

Alineamientos de las secuencias de las oxidasas *cbb₃* de varias especies indican que *CcoN/FixN* y *CcoO/FixO* son las subunidades más conservadas, seguidas por la subunidad *CcoP/FixP*. Este grado de conservación puede interpretarse como un reflejo de la importancia de las distintas subunidades en la función de la oxidasa.

Hacia el extremo 5' del grupo génico *ccoNOQP* se encontró una secuencia muy conservada implicada en la unión de factores tipo *Fnr/FixK*, los cuales se han descrito como reguladores de la expresión genética que responden a distintas condiciones de aereación.

El análisis de las mutantes en las que se inactivó al operón *ccoNOQP* nos llevó a concluir que éste codifica para la citocromo oxidasa *cbb₃* previamente purificada. También se pudo corroborar que *aa₃* y *cbb₃* son las únicas citocromo c oxidasas en la cadena respiratoria de *R. sphaeroides*, pero que ninguna es esencial para el crecimiento bacteriano.

Se determinó que la oxidasa *cbb₃* es capaz de bombear protones. Este hecho sugiere que muchas de las estructuras que han sido propuestas como fundamentales para el acoplamiento de la reacción redox de formación de agua y la de bombeo de protones no son realmente esenciales para estos procesos; siempre y cuando los mecanismos catalíticos de las oxidasas hemo-cobre clásicas y las de las oxidasas *cbb₃* fueran los mismos.

Finalmente, se determinó también que la quinol oxidasa de *R. sphaeroides* es capaz de bombear protones, la cual, a semejanza de *cbb₃*, parece presentar un hemo de tipo B como hemo de alto spin.

ABSTRACT

The respiratory oxidases are the final enzymes of the aerobic respiratory chain. They catalyze the reduction of molecular oxygen to water, with generation of an electrochemical gradient useful for most of the energy demanding cellular processes.

Most of the oxidases belong to the heme-copper superfamily. They possess a heme-copper binuclear center, constituted of a high spin heme and a Cu_B center, where the reduction of oxygen takes place in a process coupled to proton translocation.

The superfamily can be divided in two classes: the quinol- and the cytochrome *c*-oxidases. The latter are divided in the aa_3 - and the cbb_3 -type cytochrome *c* oxidases. The subunit II is where many of the differences between quinol- and the aa_3 -type cytochrome *c*-oxidases are. The main difference between them is the presence of a Cu_A center in the aa_3 -type oxidases, which is absent in the quinol oxidases. The cbb_3 -type cytochrome oxidases have the binuclear center, but lack the Cu_A center. They also do not have the classical subunits II and III, but have two subunits that are mono- and diheme cytochromes *c*, which maybe play the role of the Cu_A center. These differences seem not to indicate a different mechanism for oxygen reduction or proton pumping activity.

Rhodobacter sphaeroides is a gram-negative facultative photoheterotrophic bacterium. It has a respiratory system terminated by at least three different oxidases. They are two cytochrome *c* oxidases, aa_3 and cbb_3 , and a bb_3 -like quinol oxidase.

We report here the characterization of the genes that encode for the cbb_3 -cytochrome *c* oxidase. The *ccoNOQP* gene cluster contains four ORF's with high similarity to all *cco/Fix NOQP* gene clusters reported so far.

The gene *ccoN* encodes a protein homologous to the heme-copper oxidase family subunit I. The six histidines involved in binding the low-spin heme, and the binuclear center metals, the high-spin heme and Cu_B , in the heme-copper oxidases are present in this subunit. The genes *ccoO* and *ccoP* encode membrane-bound mono- and diheme-cytochromes *c*, and the gene *ccoQ* encodes a small hydrophobic protein of unknown function.

Sequence alignments of the cbb_3 -type oxidase gene cluster of several organisms shows that *CcoN/FixN* and *CcoO/FixO* are the most conserved subunits, followed by

CcoP/FixP. These levels of conservation seem to reflect the importance of the role that these different subunits play in the enzyme.

Upstream of the *ccoNOQP* cluster there is a conserved *Fnr/FixK*-like box that may participate in the regulation of the cluster expression as a consequence of oxygen concentration changes or other growth conditions.

Analyses of two kinds of mutants in which the *ccoNOQP* gene clusters were inactivated confirm that this cluster encodes the *cbb₃*-type oxidase previously purified. The phenotype of the mutants also let us to conclude that the cytochromes *cbb₃* and *aa₃* are the only cytochrome *c* oxidases in the respiratory chain of *Rhodobacter sphaeroides*, nevertheless none of them is essential for growth.

The assay of proton translocation in whole cells shows that the cytochrome *cbb₃* is a proton pump. If the catalytic mechanism for all the heme-copper oxidases is the same, this finding will suggest that the oxidases do not need to conserve most of the structures considered as essential for oxygen reduction and proton translocation.

Finally, we find that the *bb₃*-like quinol oxidase from *R. sphaeroides* is also able to pump protons, even though it seems to have a high-spin heme *b* as the *cbb₃* cytochrome *c* oxidases.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES

Las células requieren que la energía obtenida por el catabolismo de los alimentos sea convertida en reservorios energéticos utilizables para llevar a cabo procesos tales como la síntesis de macromoléculas, la motilidad, etc. Las formas de preservar la energía metabólica son por un lado la síntesis de moléculas con enlaces químicos de alta energía y por otro, la generación de gradientes electroquímicos transmembranales. Ambos reservorios energéticos son interconvertidos por la acción de las ATPasas. Los organismos heterótrofos generan estos tipos de energía útil a través de diversas rutas por medio de la fosforilación a nivel de sustrato y/o por la fosforilación oxidativa. En los organismos fotosintéticos la energía luminosa es convertida en gradientes electroquímicos a través del aparato fotosintético.

En la fosforilación a nivel de sustrato, la energía libre de una reacción enzimática particular es usada directamente para la síntesis de moléculas con enlaces de alta energía como el ATP y otras moléculas. Este tipo de reacciones enzimáticas son catalizadas por enzimas solubles.

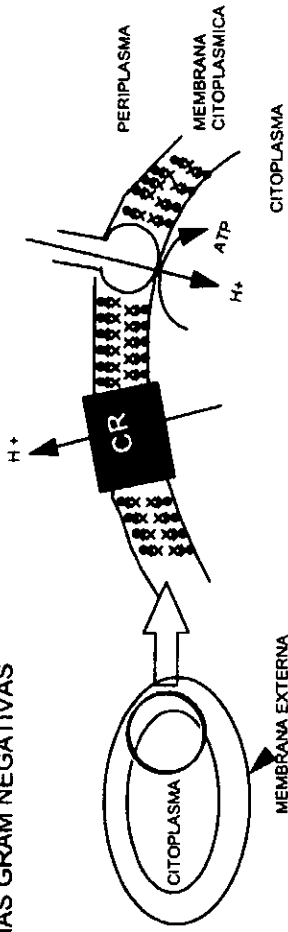
En la fosforilación oxidativa, la energía de las reacciones de oxido-reducción es convertida en energía electroquímica al acoplar las reacciones redox con la translocación de iones (generalmente protones) a través de la membrana. De esta forma se genera un gradiente electroquímico constituido por dos componentes, un gradiente de concentración de iones o protones (ΔpH) y un potencial eléctrico transmembranal ($\Delta\psi$). Los gradientes electroquímicos así formados son utilizados para la síntesis de ATP y también para llevar a cabo otros procesos celulares que requieren

energía, como el transporte de nutrientes, metabolitos, iones y otros solutos a través de la membrana; o para la motilidad en algunos sistemas celulares (Skulachev, 1992).

En el mecanismo de **fosforilación oxidativa**, invariablemente asociado con las membranas, se **acopla la oxidación de los sustratos reducidos a la fosforilación del ADP a ATP**. La **parte oxidativa** del proceso es **catalizada por la cadena respiratoria**, la cual genera el gradiente electroquímico; y la **parte fosforilativa** por la **ATP-sintetasa**, la cual utiliza el gradiente para la síntesis de ATP. Así que por razones obvias ambos complejos enzimáticos se encuentran localizados en la misma membrana, la membrana citoplásmica en los organismos procariontes o la membrana interna mitocondrial en los organismos eucariontes. (**Figura 1**).

La **cadena respiratoria** (**Figura 2**), que deriva su nombre por ser la responsable del consumo del oxígeno durante la respiración, está constituida en su mayoría por complejos catalíticos de naturaleza proteica inmersos en la membrana. La entrada de los electrones a la cadena respiratoria es a través de las llamadas "deshidrogenasas", que son enzimas que reciben los electrones de los sustratos reducidos solubles generados principalmente en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Estas son la NADH deshidrogenasa (**COMPLEJO I**), la succinato deshidrogenasa (**COMPLEJO II**) y otras deshidrogenasas. Los electrones recibidos por estas enzimas son transferidos a la ubiquinona, un acarreador redox liposoluble que es el único componente no proteico de la cadena. A su vez la ubiquinona dona los electrones al complejo *bc₁*, (**COMPLEJO III**) y éstos son finalmente transferidos a través del citocromo *c* al último complejo respiratorio, la citocromo *c* oxidasa (**COMPLEJO IV**). No obstante, la ubiquinona también puede donar directamente los electrones a otro tipo de oxidasas, las llamadas ubiquinol oxidasas (**Figura 2**). Es en los centros redox de todos estos

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS



CELULAS EUCARIOTES

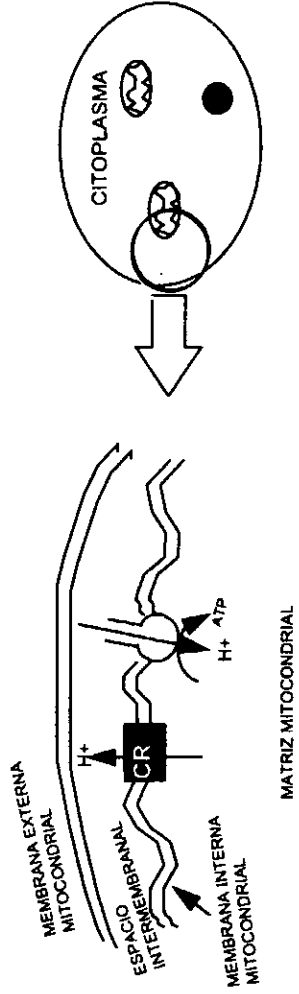


Figura 1. Localización de la cadena respiratoria (CR) y de la ATPsintetasa en organismos procaríotes y eucariotes.

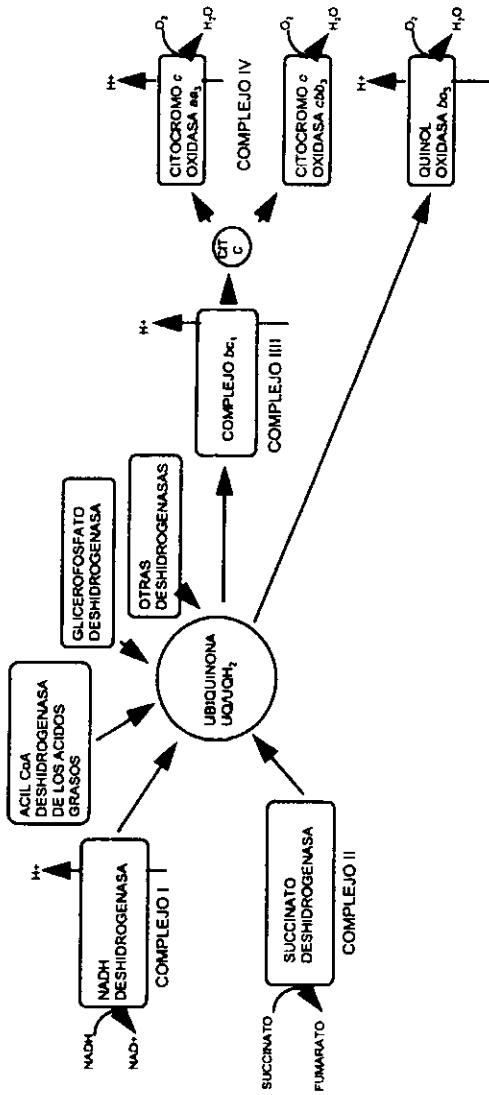
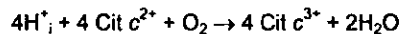


Figura 2. Representación de la cadena respiratoria aeróbica. Se indican varios puntos de entrada de los electrones provenientes de diversos sustratos a través de las deshidrogenasas. También se esquematiza a los complejos enzimáticos intermediarios entre estas deshidrogenasas y las oxidasas.

complejos enzimáticos (centros fierro-azufre, iones cobre y otros grupos prostéticos, como por ejemplo hemos y flavinas) en donde se llevan a cabo los procesos de oxidoreducción.

En los organismos aeróbicos, el oxígeno es el aceptor final de los electrones de la cadena respiratoria. La caída de potencial redox desde el NADH hasta el oxígeno (de aproximadamente 1.13 V, equivalente a 218 KJoules/mol de energía libre) libera la energía suficiente para que varios de los componentes de la cadena puedan translocar protones a través de la membrana; así pues, la energía redox es conservada en forma de gradientes electroquímicos.

Como hemos mencionado, las **oxidasas respiratorias** son las enzimas aceptoras terminales de los electrones de la cadena. Estas catalizan la reducción del oxígeno molecular para la formación de agua de acuerdo a la reacción:



Las oxidasas son uno de los componentes de la cadena respiratoria que contribuyen a la formación del gradiente electroquímico. Esto lo realizan de dos formas: a) por la separación de cargas (electrones y protones involucrados en la reducción del oxígeno) a través de la membrana, evento que todas las oxidasas respiratorias realizan; y b) por la translocación o bombeo de protones a través de la membrana (Wikström, 1977), evento que muchas de las oxidasas respiratorias llevan a cabo. Este último tipo de oxidasas translocan cuatro protones a través de la membrana además de los cuatro protones consumidos para la reducción de una molécula de oxígeno. De esta forma, ocho protones provenientes del lado interno de la membrana (el lado interno se refiere

al lado de la matriz mitocondrial o al lado citoplásmico en las bacterias, **Figura 1**) son consumidos, cuatro de éstos son translocados hacia el lado externo de la membrana (el lado externo se refiere al espacio intermembranal mitocondrial en los organismos eucariontes o al lado del espacio periplásmico en las bacterias) y otros cuatro son usados para la formación de dos moléculas de agua.

Todos los organismos aeróbicos, procariontes o eucariontes, poseen oxidasas respiratorias. Hasta ahora se han reportado tres clases de estas enzimas: las **oxidasas hemo-cobre**, las **oxidasas tipo *bd*** y las **oxidasas alternativas**. Todas estas enzimas catalizan esencialmente la misma reacción, aunque el mecanismo molecular es diferente y también su importancia en el metabolismo oxidativo del organismo en cuestión.

Las oxidasas alternativas son quinol oxidasas altamente resistentes a cianuro, que no bombean protones. Se encuentran presentes en todas las plantas angiospermas, en muchas algas y en algunos hongos. Su expresión es inducida por estímulos de estrés y su función parece ser la de regular el balance entre el metabolismo del carbono y el transporte de electrones a la cadena respiratoria, evitando así, por ejemplo, la sobrerreducción de los componentes de la cadena y la formación de especies dañinas de oxígeno (Vanlerberghe & McIntosh, 1997). **Las oxidasas tipo *bd*** son también quinol oxidasas que carecen de la capacidad de translocar vectorialmente protones a través de la membrana. Sin embargo, participan en la generación de un gradiente protón-motriz por que durante la oxidación del ubiquinol se libera un protón del lado externo de la membrana por cada electrón transferido a la enzima. Estas oxidasas están presentes en varias bacterias y su función parece ser la de generar energía en condiciones de crecimiento de baja aereación (Kranz & Gennis, 1985;

Puustinen et al., 1991; Lauraeus & Wikström, 1993; Poole, 1994). **Las oxidasas hemo-cobre** pueden ser citocromo *c* oxidasas o quinol oxidasas. Probablemente todas ellas translocan activamente protones, por lo que su función principal para las células es la de proveer energía. A este grupo pertenecen la mayoría de las oxidasas hasta ahora reportadas y serán a las que nos enfocaremos en este trabajo.

Los miembros de la familia de las oxidasas hemo-cobre (García-Horsman¹ et al, 1994) conservan propiedades estructurales y funcionales que han permitido su agrupación, sobre todo basada en dos criterios: un alto grado de similitud en la secuencia de aminoácidos de la subunidad I y la presencia de un centro binuclear hemo-cobre en esta subunidad. Sin embargo, dentro de la familia hay una gran diversidad de oxidasas, que difieren tanto en el sustrato que utilizan como en los tipos de hemos presentes en las enzimas. Los tipos de hemo que se han encontrado en estas oxidasas son el A, B, O y C (**Figura 3**); no obstante, no existe correlación entre el sustrato donador de electrones y el tipo de hemo en la oxidasas.

Los sustratos donadores de electrones son el quinol para las **quinol oxidasas** y el citocromo *c* para las **citocromo *c* oxidasas**. Existen dos tipos de citocromo *c* oxidasas, las **tipo *aa₃*** (como las de mitocondria) y las posteriormente descubiertas **citocromo *c* oxidasas tipo *cbba***. Las diferencias entre ambas las detallaremos más adelante (**Figura 4**). La similitud entre las distintas oxidasas hemo-cobre ha dado a conocer datos importantes acerca de los elementos estructurales que son necesarios para su función y sus diferencias han revelado características de su mecanismo único acción o han ayudado a indicar los elementos que no son esenciales en la función o aquellos que son equivalentes y que pueden ser sustituidos.

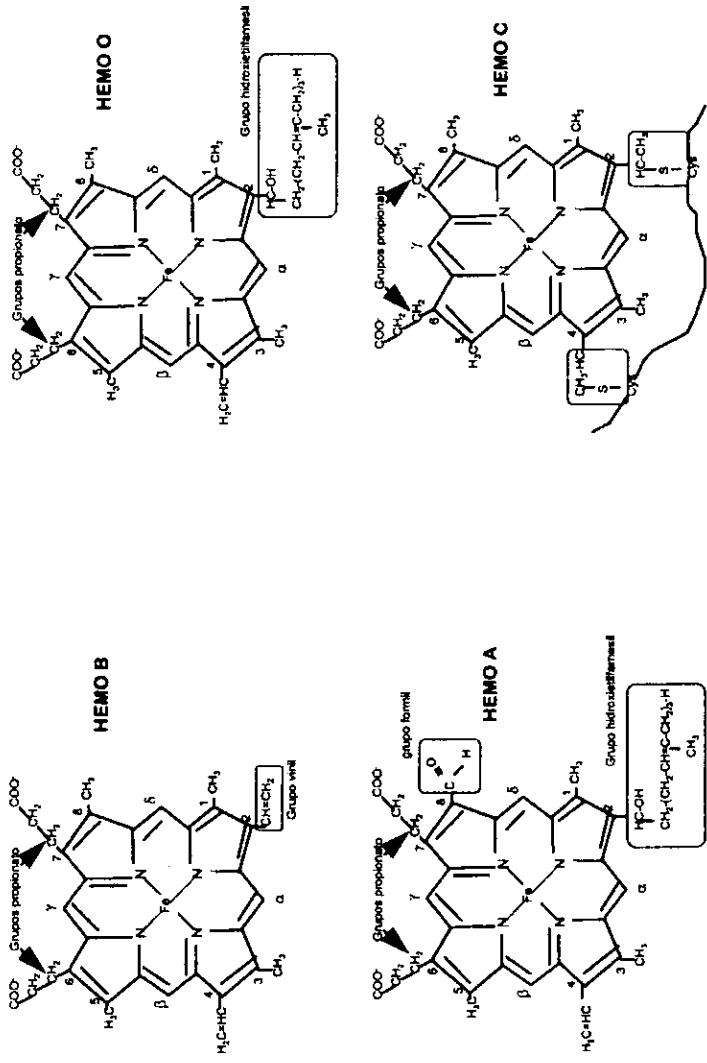
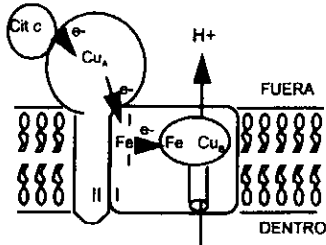


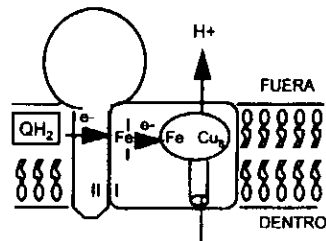
Figura 3. Estructura de los principales tipos de hemo. Estos están constituidos por un anillo tetrapirrólico en cuyo centro se encuentra unido un átomo de hierro. Este se une a la proteína por uno o dos enlaces de coordinación que establece con residuos de histidinas, metioninas y cisteínas, entre otros. El hemo tipo C es el único que, además de establecer estos enlaces de coordinación, se une covalentemente a la proteína (representada por la barra negra). Los tipos de hemo se caracterizan por distintos sustituyentes del anillo pirrólico, que se indican en la figura encerrados en un círculo.

CITOCROMO *c* OXIDASAS

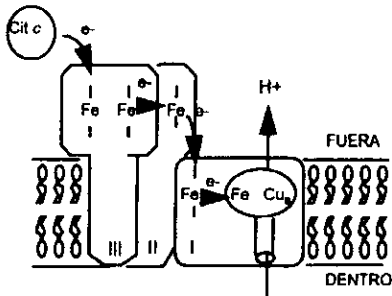
QUINOL OXIDASAS



TIPO aa_3
(ejemplos aa_3 y ba_3)



TIPO bo_3
(ejemplos bo_3 , aa_3 ,
 ba_3 y bb_3)



TIPO cbb_3

Figura 4. Esquema de algunas subclases de la superfamilia de las oxidasas hemo-cobre. Se muestran sólo las subunidades que contienen centros redox. Como se indica, los tipos de hemos en cada subclase pueden ser distintos, excepto en las citocromo *c* oxidasas tipo cbb_3 . (Tomado de García-Horsman et al., 1994).

Se ha estimado que cerca del 90% del oxígeno que es consumido por los organismos aeróbicos es reducido a agua por las oxidasas respiratorias, con la consiguiente obtención de energía (Chan & Li, 1990). Por esto y por la complejidad de la reacción que catalizan, las oxidasas han sido objeto de extensos estudios desde su descubrimiento con la finalidad de conocer como están estructuradas y cual es el mecanismo molecular de las reacciones que llevan a cabo. Estos estudios incluyen caracterizaciones biofísicas y bioquímicas, así como estudios a nivel genético, entre los que se encuentran la determinación de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las diferentes oxidasas y la mutagénesis dirigida a residuos conservados. Actualmente también se cuenta con la descripción de las estructuras cristalinas de dos citocromo *c* oxidasas tipo aa_3 (Iwata et al., 1995; Tsukihara et al., 1995; Tsukihara et al., 1996). Todos estos resultados han permitido un gran avance en el conocimiento de estas enzimas; sin embargo, aún quedan muchas interrogantes que contestar.

A continuación describiremos las características estructurales de las tres principales subunidades que constituyen a las oxidasas hemo-cobre y se discutirán ciertos aspectos del mecanismo molecular de catálisis.

1.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LAS TRES PRINCIPALES SUBUNIDADES DE LAS OXIDASAS HEMO-COBRE.

La subunidad I se encuentra totalmente inmersa en la membrana, rodeada a ambos lados por las subunidades II y III (Figura 5). Es la más grande de las subunidades de la enzima y también la más conservada entre los miembros de la familia de las oxidasas hemo-cobre. En esta subunidad se encuentran localizados tres

centros redox: un hemo de bajo spin, un hemo de alto spin y un ión cobre conocido como Cu_B . El hemo de alto spin y el Cu_B constituyen el **centro binuclear hemo-cobre**, que es una característica diagnóstica de los miembros de la familia. Es en este centro binuclear en donde la reducción del oxígeno tiene lugar y adonde probablemente se acopla la translocación de protones. Los tres centros redox están localizados cerca del lado externo de la membrana, por lo que los protones usados para la formación de agua y los que son bombeados (cuyo origen es el lado interno de la membrana) probablemente requieren de rutas conductoras a través de la enzima. Más adelante se detallarán estas.

Los hemos de alto y bajo spin difieren tanto en sus características espectroscópicas (por el distinto ambiente proteico en el que se encuentran) como en el número de enlaces de coordinación que el hierro de sus grupos hemos establece. El átomo de hierro del hemo de bajo spin establece seis enlaces de coordinación, cuatro con nitrógenos del grupo tetrapirrol y dos con los nitrógenos de residuos de histidinas de la proteína. El hierro del hemo de alto spin presenta solo cinco enlaces de coordinación, los cuatro que establece con los nitrógenos del anillo tetrapirrólico y un enlace más con el nitrógeno de un residuo de histidina de la proteína. Así pues, el hemo de alto spin aún cuenta con un sitio libre de coordinación a donde se puede unir el oxígeno y los intermediarios de su reducción, así como otros ligandos externos tales como el monóxido de carbono, la azida y el cianuro.

En la nomenclatura de las oxidasas el hemo de alto spin se indica al final de la lista de los otros hemos de la oxidasa y con un subíndice "3". Por ejemplo en las oxidasas aa_3 , bo_3 y cbb_3 el hemo de bajo spin es del tipo A, B y B, respectivamente; y el de alto spin es A, O y B.

	CO I	CO II	CO III
GENES QUE CODIFICAN PARA LAS TRES SUBUNIDADES MAYORES DELAS OXIDASAS aa ₃	ctaD	ctaC	ctaE

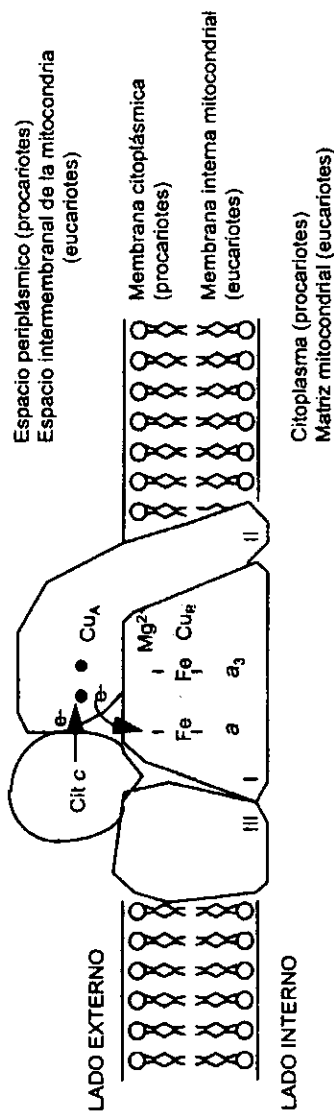


Figura 5. Esquema de las tres principales subunidades de la citocromo c oxidasa tipo aa₃ y su localización en la membrana. También se describe la nomenclatura de los genes que codifican para estas subunidades.

De entre los residuos más conservados en la subunidad I se encuentran seis histidinas (García-Horsman¹ et al., 1994). Estas muy probablemente son los ligandos de los centros redox; tres parecen unir al Cu_B (His-276, His-325 y His-326, de acuerdo a la numeración de la oxidasa aa₃ de *P. denitrificans*, a menos que se especifique algo diferente), dos al hemo de bajo spin (His-94, His-413) y una al hemo de alto spin (His-411). La sustitución de cualquiera de estas seis histidinas conservadas elimina la actividad de la oxidasa, aunque ésta aún puede ensamblarse en la membrana (Saraste, 1990). La His-325, uno de los ligandos del cobre, parece participar importantemente en la reducción del oxígeno y en el bombeo de protones (ver más adelante).

Estudios de mutagénesis dirigida en más de 60 residuos conservados en la subunidad I han mostrado que solo unos cuantos parecen ser esenciales para la función. Dentro de éstos se encuentran varios aminoácidos polares de la hélice VIII (que parecen estar involucrados en la ruta de los protones "químicos", ver pag. 21), los residuos del asa entre las hélices II y III (cuya mutación parece desacoplar la reducción del oxígeno al bombeo de protones) y los residuos del asa entre las hélices IX y X (que parecen involucrados en la asociación entre la subunidad I y el dominio hidrofílico de la subunidad II).

El análisis de los cristales de las citocromo oxidasas tipo aa₃ (Iwata et al, 1995; Tsukihara et al, 1995; Tsukihara et al, 1996) y los perfiles de hidropatía permiten postular que la subunidad I está constituida por doce segmentos transmembranales, aunque la longitud de éstos puede ser variable. Desde la perspectiva del lado interno de la membrana se ha observado que los doce segmentos transmembranales forman tres semicírculos simétricos que dan la apariencia de poros. En el poro A se encuentran varios residuos aromáticos conservados; en el poro B, el hemo de alto spin (hemo a₃) y

el Cu_B; y en el poro C, el hemo de bajo spin (hemo a) y su cadena lateral hidroxietilfarnesilo (Iwata et al., 1995). El grupo farnesilo del hemo a₃ (ver **Figura 3** para estructura de los hemos) no parece alojarse en el poro B, por que penetra en la bicapa lipídica de la membrana; así que probablemente deja un poro más libre como para el acceso de protones desde el lado interno de la membrana. A esta cadena farnesilo del hemo de alto spin se le han atribuido importantes funciones; sin embargo, las citocromo oxidasas tipo *cbb*₃ carecen de esta cadena por que tienen un hemo tipo B como hemo de alto spin. No obstante no parece afectarse su mecanismo de catálisis (ver más adelante).

La subunidad II clásica de las oxidasas hemo-cobre, menos conservada que la subunidad I, es en donde más se reflejan las diferencias estructurales inherentes al tipo de sustrato utilizado por estas enzimas. Esto es debido a que es la subunidad implicada en la unión del sustrato donador de electrones. Esta subunidad II está conformada por dos hélices transmembranales y un gran segmento globular hidrofílico extramembranal. Las oxidasas tipo *aa*₃ presentan una serie de residuos muy conservados localizados en este segmento hidrofílico (Iwata et al., 1995). Estos son varios residuos ácidos implicados en la unión del citocromo *c* (Witt et al, 1995; Lappalainen et al., 1995) y los residuos responsables de la unión del centro bimetalico de cobre (Cys-216, Cys-220, His-181, His-224, Met-227 y Glu-218) conocido como Cu_A (Lappalainen et al., 1993; Malmström & Aasa, 1993; Blackburn et al., 1994, entre otros). Este centro Cu_A constituye el sitio de entrada de los electrones provenientes del citocromo *c* y como se encuentra localizado en la región extramembranal, facilita que el citocromo *c* con su naturaleza hidrofílica pueda donar sus electrones a la oxidasa.

Las quinol oxidasas hemo-cobre carecen del centro Cu_A y de los residuos ligandos de éste, así como de los residuos implicados en la unión del citocromo *c*. Presentan, en cambio, residuos que parecen estar involucrados en unir el ubiquinol (García-Horsman¹, et al., 1994). Muy seguramente la naturaleza hidrofóbica del ubiquinol le permite donar sus electrones directamente a la subunidad I sin requerir un centro redox ubicado en la parte externa de la membrana.

Así pues, la distinción estructural más importante entre las citocromo *c* oxidasas tipo aa_3 y las quinol oxidasas hemo-cobre reside principalmente en esta subunidad II (Trumpower & Gennis, 1994). Por otro lado, ambos tipos de oxidasas parecen tener mucha similitud entre sus centros activos y en la estructura primaria de las subunidades I, en la que conservan muchos residuos que probablemente participan en la transferencia de electrones y/o en la translocación de protones (Puustinen et al., 1989; Saraste, 1990; Hill et al., 1992; Musser et al., 1993; Thomas et al., 1993; García-Horsman et al., 1995). Aún más, parece ser que el mecanismo de reducción del oxígeno es muy similar en las quinol y en las citocromo *c* oxidasas tipo aa_3 (Lauraeus et al., 1993).

Las citocromo *c* oxidasas tipo cbb_3 son las únicas citocromo oxidasas hemo-cobre hasta ahora descritas que a pesar de aceptar electrones de un citocromo *c* (no se conoce cual citocromo *c* es el donador fisiológico de esta oxidasas en los distintos organismos), carecen del centro Cu_A , pues no presentan las subunidades II y III clásicas. En cambio presentan otras dos subunidades distintas que se caracterizan por unir covalentemente uno y dos hemos *c*, respectivamente, los cuales muy probablemente están localizados hacia el lado externo de la membrana. Seguramente son estos hemos *c* los que compensan la ausencia del centro Cu_A por ser ahora ellos

los aceptores iniciales de los electrones provenientes del citocromo *c* (Gray et al, 1994).

La subunidad III clásica, mucho menos conservada que las otras dos subunidades, presenta una estructura de siete hélices transmembranales sin dominios hidrosolubles (Saraste, 1990). Estas hélices están divididas en dos haces formando una hendidura en forma de "V". Probablemente ésta sea el sitio de anclaje de alguna proteína membranal, como por ejemplo el citocromo *c* de *Paracoccus denitrificans*, el cual podría localizar en este sitio su dominio globular quedando en posición apropiada para transferir los electrones al Cu_A de la subunidad II. Parece ser que esta hendidura también es importante en la ruta de acceso del oxígeno a la enzima (Hofacker y Schulten, 1998). No obstante estas propuestas, la subunidad III no es esencial en el mecanismo de reducción de oxígeno ni en el de bombeo de protones; pero parece ser importante para el correcto ensamblaje de la enzima (Saraste, 1990). Esta subunidad tampoco une centros redox, por lo que parece que solo las subunidades I y II son las que constituyen la unidad mecanística mínima funcional de la oxidasa.

Así que la ruta de ingreso de los electrones a las citocromo oxidasas comienza con el citocromo *c*, el cual dona sus electrones al centro Cu_A en la subunidad II. Estos son posteriormente transferidos al hemo de bajo spin y de aquí al centro binuclear (hemo de alto spin y Cu_B), que como mencionamos, es el sitio donde se reduce el oxígeno a agua, proceso durante el cual se acopla la translocación de protones (Figura 5). En las quinol oxidasas los electrones provenientes del ubiquinol penetran directamente hasta los grupos redox de la subunidad I. En este tipo de oxidasas se ha detectado una molécula de ubiquinona fuertemente unida a la enzima, la cual podría canalizar más eficientemente el movimiento de electrones al hemo de bajo spin (Puustinen et al., 1996).

Muy probablemente la **transferencia de electrones** entre los centros redox se lleve a cabo a través de enlaces de hidrógeno y enlaces peptídicos establecidos entre los residuos ligados de los centros redox y/o otros residuos conservados, aunque también pueden estar participando algunas moléculas de agua localizadas en cavidades de la enzima. Se cree que estas rutas de movimiento de electrones son más factibles que la transferencia directa de electrones entre los centros redox (Iwata et al., 1995; Tsukihara et al., 1995; Tsukihara et al., 1996), aunque no se puede descartar este último evento, ya que las distancias entre los centros redox son muy pequeñas y existen fuerzas favorables para el movimiento de electrones (Williams, 1995).

1.3 . LA OXIDASA EUKARIOTE Y LAS PROCARIOTES

La mayoría de los organismos eucariotes **presentan una única citocromo c oxidasa hemo-cobre**, que es del tipo aa_3 (Figura 5). En todos los sistemas ensayados la citocromo oxidasa es capaz de translocar protones con una eficiencia de un protón por electrón, por lo que su función en estos organismos es la de generar energía.

La citocromo oxidasa tipo aa_3 de mamíferos está constituida por trece subunidades proteicas y cuatro centros redox, formados a su vez por cinco átomos metálicos. Estos son dos hemo tipo A como hemo de alto y bajo spin; y los dos centros cobre, Cu_A (centro bimetalico de cobre) y Cu_B (Tsukihara et al., 1995; Tsukihara et al., 1996). Las tres subunidades mayores son codificadas por el DNA mitocondrial y las otras diez por el DNA nuclear. Las subunidades mayores (subunidades I-III) son las más conservadas en la escala evolutiva y sus características las hemos ya descrito. Las

otras diez subunidades no tienen contraparte en los organismos procariontes ni unen centros redox activos. Se sugiere que éstas están involucradas en modular la actividad de la oxidasa en forma tejida específica y en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas y/o que tengan un papel en la biogénesis de la enzima (Capaldi, 1990; Ferguson-Miller, 1996). Oxidasas tipo aa_3 se encuentran también presentes en muchas bacterias y ciertos hongos y aunque varía el número de las subunidades que las constituyen, todas presentan subunidades homólogas a las subunidades I, II y III descritas (Ludwig, 1987).

Además de los cinco metales que constituyen los centros redox (tres átomos de cobre y dos de hierro), la citocromo oxidasa de bovino presenta otros dos metales que no participan en las reacciones de oxido-reducción, estos son un **átomo de zinc** y uno de **magnesio** (Einarsdóttir & Caughey, 1985; Steffens et al., 1987; Steffens et al., 1993). Estos metales parecen también estar presentes en las oxidasas de otros mamíferos (Bombelka et al., 1986) y en las de otras especies eucariontes, como en *Dictyostelium discoideum* (Rizzuto et al., 1991). El zinc se encuentra unido a la subunidad Vb de la oxidasa (Capaldi, 1990), del lado de la matriz, y su papel parece ser estructural (Tsukihara et al., 1995). Ya que las oxidasas bacterianas carecen de subunidades homólogas a las nucleares eucarióticas, éstas parecen no contener zinc; pero varias de ellas sí presentan magnesio (Gennis & Ferguson-Miller, 1995; Capaldi, 1990) o manganeso, como es el caso de *P. denitrificans* (Steffens et al., 1987; Buse & Steffens, 1991; Haltia, 1992) y *R. sphaeroides* (Hosler et al., 1992; Hosler et al., 1995). Este átomo de magnesio (o manganeso) se encuentra localizado en la interfase de las subunidades I y II en las enzimas bacteriana y mitocondrial, directamente entre el Cu_A y el hemo a_3 (Figura 5). Se sugiere que este metal participa en: la estabilización del sitio

Cu_A, el reforzamiento de la interacción entre las subunidades I y II, el control de la dirección de transferencia de electrones entre el Cu_A y el hemo a₁, entre éste y el hemo a₃ (Tsukihara et al., 1995) y en facilitar la translocación de protones (Gennis & Ferguson-Miller, 1995). Sin embargo, la ausencia de magnesio en algunas oxidasas bacterianas (como en la oxidasa tipo bo₃ de *Escherichia coli*) sugiere que este metal no es esencial para la función de la enzima, por lo menos no para la transferencia de electrones después del hemo de bajo spin ni para el bombeo de protones.

A diferencia de lo que sucede en la mayoría de los organismos eucariontes, los **organismos procariontes** suelen poseer cadenas respiratorias ramificadas en las que se encuentran varios tipos de oxidasas (ubiquinol y citocromo c oxidasas). Dentro de éstas, la mayoría pertenecen a la familia de las oxidasas hemo-cobre. Estas enzimas están constituidas en general por 3 o 4 subunidades, tres de ellas similares a las subunidades mayores de la oxidasa mitocondrial (Ludwig, 1987; Saraste, 1990). Sin embargo, algunas oxidasas bacterianas presentan también subunidades sin homología con las de los organismos eucariontes.

En general las oxidasas procariontes están codificadas por grupos genéticos u operones, en donde además de los genes que dictan la expresión de las subunidades de la oxidasa, también se encuentran otros genes cuyos productos participan en la biosíntesis de los hemos (Saiki et al., 1992), en el ensamblaje de los grupos redox, o en el plegamiento de la enzima, entre otras funciones (Thöny-Meyer¹ et al., 1994). Homólogos de estos genes se encuentran seguramente codificados en el DNA nuclear en los organismos eucariontes.

Como mencionamos, existen varios tipos de oxidasas procariontes, cuya diversidad radica no solo en el sustrato donador de electrones (ubiquinol y citocromo c), sino también en la estructura y composición química de los centros redox, en las condiciones de crecimiento en que se expresan, en su afinidad por oxígeno y en la capacidad y eficiencia para translocar protones. Los centros redox pueden variar tanto en la composición de metales como en los tipo de hemos. En las oxidasas de los procariontes los hemos no siempre son hemos A como en la oxidasa de mamíferos, sino que pueden encontrarse hemos tipo B, C, D, O u otra variante (Figura 3).

Los sistemas respiratorios bacterianos no siempre son utilizados para generar energía. Bajo ciertas circunstancias, como sucede cuando las demandas de energía de la célula son cubiertas por la fermentación o la fotosíntesis o por otra oxidasa respiratoria, la capacidad o eficiencia para bombear protones puede no ser tan importante. En estos casos las oxidasas no necesitan optimizar su función para maximizar la proporción de protones bombeados por electrón (H^+/e^-), sino que su función más importante puede ser la de eliminar el exceso de equivalentes reductores para mantener el balance redox celular, el regenerar NAD^+ , o simplemente el disminuir los niveles de oxígeno intracelulares. Todas estas características de los organismos procariontes les permite expresar una cadena respiratoria adecuada para los requerimientos fisiológicos particulares, dándoles así una gran capacidad para crecer en una gran variedad de condiciones ambientales.

1.4 . ALGUNOS DATOS SOBRE EL MECANISMO MOLECULAR DE CATÁLISIS DE LAS OXIDASAS RESPIRATORIAS Y SOBRE SU MECANISMO DE TRANSLOCACION DE PROTONES.

La reacción de reducción del oxígeno parece ocurrir como una secuencia de pasos cortos en los que se forman distintos intermediarios durante la transferencia secuencial de cuatro electrones provenientes del citocromo c hasta el oxígeno. Durante esta reducción del oxígeno parecen requerirse dos tipos de protones: los protones “químicos”, que se utilizan para la formación de agua; y los protones “bombeados”, los que son translocados a través de la membrana. Ambos tipos de protones provienen del citoplasma o de la matriz mitocondrial, situación que, aunada a la localización del centro binuclear cerca de la superficie externa membranal, hacen clara la necesidad de rutas de acceso para la introducción de los distintos tipos de protones, además de un canal para la salida del agua formada. El bombeo de protones parece estar acoplado a los pasos catalíticos de la reducción del oxígeno, particularmente al ingreso del tercer y cuarto electrón al centro binuclear. Es de este acoplamiento de donde la energía necesaria para el proceso de translocación de protones posiblemente se origina (Morgan et al., 1994). El acoplamiento probablemente ocurre a través de cambios en la protonación de ciertos grupos ácido-base asociados a cambios en el estado de óxido-reducción y/o a cambios en la ligación de centros metálicos.

Diversos estudios de mutagénesis dirigida (Fetter et al., 1995; García-Horsman et al., 1995; Thomas et al., 1993) y el análisis de los cristales de las citocromo oxidasas bacteriana (Iwata et al., 1995) y mitocondrial (Tsukihara et al., 1995; Tsukihara et al.,

1996), han permitido establecer la existencia de **dos rutas** independientes para la **entrada de protones**, una para los protones "químicos" y otra para los protones "translocados". La separación de los dos tipos de protones parece ser muy necesaria, por que de no existir, los protones "translocados" podrían consumirse preferentemente durante la reducción del oxígeno (por la alta electronegatividad de los intermediarios de la reacción), desacoplando al sistema.

La **ruta de ingreso de los protones "químicos"** parece estar constituida por el poro B de la subunidad I (donde se encuentran el hemo a_3 y el Cu_B), desde donde entrarían los protones provenientes del lado interno de la membrana hasta llegar al centro binuclear, en donde los protones serían usados para la reducción del oxígeno. En esta ruta propuesta parecen participar residuos de las hélices VI y VIII, que incluyen a la Ser-91, la Lys-354, la Thr-351 y la Tyr-280 y al **grupo hidroxilo de la cadena lateral farnesilo del hemo a_3** (Iwata et al., 1995; Tsukihara et al., 1996). Esta ruta también se denomina "**canal K**" por contener una lisina. Hofacker y Schulten (1998) proponen la existencia de una red de moléculas de agua dentro de este canal, lo cual constituiría un elemento muy importante para el movimiento de protones.

Es importante mencionar en este punto la importancia que se ha propuesto para la **cadena lateral farnesilo del hemo de alto spin**. Todas las oxidasas hemo-cobre descritas, a excepción de las oxidasas cbb_3 , presentan hemos tipo A y O en el centro binuclear, es decir, hemos que poseen esta cadena farnesilo (**Figura 3**). Por esta razón anteriormente se había sugerido que el grupo farnesilo era esencial para la reducción del oxígeno y el bombeo de protones, así como también parecía participar importantemente en la transferencia de electrones y en la estabilización del hemo de alto spin (Caughey et al., 1975; Hill et al., 1992; Saiki, et al., 1992; Woodruff, 1993). De

los estudios en los cristales de las oxidasas bacteriana (Iwata et al., 1995) y mitocondrial (Tsukihara et al., 1995; Tsukihara et al., 1996) se sugiere que esta cadena famesilo está participando en la transferencia de electrones entre el hemo de alto spin y el Cu_8 y en el ingreso de los protones consumidos durante la reducción del oxígeno, como hemos mencionado. Sin embargo, el hallazgo de las citocromo oxidasas cbb_3 , como hemos mencionado. Sin embargo, el hallazgo de las citocromo oxidasas cbb_3 , que poseen un hemo tipo B como de alto spin, es decir, un hemo sin cadena lateral famesilo, sugiere que esta cadena no es esencial para la reducción del oxígeno ni para la translocación de protones. Esto último parece ser cierto al menos en las oxidasas cbb_3 de *P. denitrificans* (Raitio & Wikström, 1994; de Gier et al., 1996) y de *R. sphaeroides* (este trabajo), puesto que ha sido demostrado que bombean protones. Así que se propone que en este tipo de oxidasas la ausencia de la cadena famesilo puede ser suplida por algún residuo o incluso por moléculas de agua, suponiendo que estas oxidasas funcionan bajo el mismo mecanismo catalítico de las hemo-cobre.

También cabe la posibilidad de que la cadena famesilo solo juegue un papel meramente estructural en la oxidasa, es decir, que su función sea la de conferir una estructura estable al centro binuclear. En consecuencia, la pérdida de la cadena lateral podría producir un colapso local en el centro binuclear con la pérdida de la actividad. Esto podría explicar lo que sucede con las quinol oxidasas ba_3 de *P. denitrificans* (Zickerman et al, 1997) y bo_3 de *E. coli* (Hill et al., 1992; Saiki et al., 1992), cuyas variantes enzimáticas bb_3 son inactivas. El centro binuclear de las citocromo oxidasas tipo cbb_3 parece poseer residuos con cadenas laterales más grandes que los presentes en las otras oxidasas hemo-cobre, de tal suerte que éste podría mantener una estructura estable a pesar de que el hemo de alto spin, el hemo tipo B, carezca de la cadena de famesilo (Wang et al; 1995).

Se postulan tres posibles rutas para los protones "translocados". Iwata y col (1995) proponen la ruta conocida como "canal D", denominada así por contener un ácido aspártico. Esta inicia en la parte inferior citoplásmica del poro A y llega a una cavidad localizada casi a la mitad de la membrana, en donde se encuentra el Glu-278 (residuo altamente conservado, ubicado en la entrada del centro binuclear), para de aquí continuar finalmente por la parte superior del poro B. Los residuos involucrados en esta ruta son los de las hélices III y IV, en especial el Asp-124, la Asn-113 y la Asn-131. Mutaciones en residuos homólogos a éstos en la oxidasa bo_3 de *E. coli* producen la pérdida del bombeo de protones sin afectar la actividad de la oxidasa (Thomas et al., 1993; Garcia-Horsman et al., 1995; Verkovskaya et al., 1997). En esta vía se propone que los protones atraviesan el centro binuclear por la participación del grupo formilo del hemo a_3 y la His-325 (ligando del Cu_B), o alternativamente, por la participación del Glu-278 y un grupo propionato del hemo a_3 . Riistama y col. (1997) y Hofacker y Schulten (1998) sugieren la existencia de moléculas de agua dentro del canal D. Estas podrían formar cadenas de enlaces de puentes de hidrógeno a través de las cuales los protones serían fácilmente desplazados. Ambos grupos apoyan la propuesta de que la ruta de los protones translocados inicie en el Asp-124 y continúe hasta el Glu-278, aunque después de este punto tienen propuestas distintas. Iwata y col. (1995) y Riistama y col. (1997) proponen que la ruta de los protones translocados continúa del Glu-278 a la His-325, a través de puentes de hidrógeno formados con moléculas de agua.

La ruta del canal D parece cumplir el requerimiento de una asociación muy estrecha, funcional y estructural, de los protones translocados con el centro binuclear, requerimiento del mecanismo directo de acoplamiento entre la reducción del oxígeno y la translocación de protones propuesto por el grupo Wikström. En este modelo de

acoplamiento directo, las entidades químicas involucradas en el bombeo de protones serían los ligandos de los mismos centros redox y se sugieren que la separación necesaria de los protones químicos y los bombeados podría darse a través de la His-325 ya que a pesar de que la distancia entre ambos tipos de protones es mínima en este sitio, las rutas de acceso hacia este lugar son diferentes. Además postulan que el pKa del grupo imidazol de la histidina pueda ser lo suficientemente alto para atraer y aislar a los protones translocados del sitio de formación de agua, que se encuentra del lado opuesto del Cu_B, localización que significa también una barrera entre ambos tipos de protones (Wikström et al., 1994; Morgan et al., 1994). Pese a las evidencias experimentales que apoyan esta ruta propuesta, Williams (1995), Tsukihara y col. (1996) insisten en que es necesaria la separación física de los protones químicos y los bombeados para evitar el consumo de éstos en la reducción del oxígeno. Por tal razón, Tsukihara y col (1996) proponen otras dos rutas alternativas para el ingreso de los protones "translocados".

La primera ruta es semejante a la propuesta por Iwata y col (1995), pero difiere en el camino posterior al Glu-278. La segunda vía propuesta involucra residuos conservados en el poro C y cruza cerca del hemo a, con lo que se hace susceptible a cambios redox. Estas dos rutas propuestas por Tsukihara no atraviesan el centro binuclear, lo que sugiere que el acoplamiento entre la translocación de protones y la reducción del oxígeno es indirecto y que ocurre lejos del hemo a₃ y el Cu_B. De ser esto cierto, el posible mecanismo involucrado se desconoce (Ferguson-Miller, 1996) ya que no puede ser explicado por el mecanismo molecular hasta ahora propuesto (Wikström et al., 1994). Este mecanismo indirecto de acoplamiento dependería en extremo de la estructura de la oxidasa ya que estaría mediado por cambios conformacionales que

transmitieran la energía de los centros redox a los acarreadores de protones; por lo tanto, estructuras proteicas distintas podrían eliminar el acoplamiento (Morgan et al., 1994). No obstante, esto no parece ocurrir ya que enzimas con diferencias importantes no sólo son funcionales, sino que, al menos las oxidasas *cbb₃* de *P. denitrificans* (Raitio & Wikström, 1994; de Gier et al., 1996) y de *R. sphaeroides* (este trabajo), parecen ser también capaces de bombear protones. Así que muy probablemente el mecanismo general de catálisis no depende de la conservación estricta de muchos residuos o rutas (García-Horsman et al., 1995; Wikström et al., 1994), sino que los cambios puedan compensarse por otros residuos cercanos o por moléculas de agua, o bien por la existencia de varias rutas alternativas para la transferencia de protones (Mitchell et al., 1996). Estos datos hacen muy improbable que estas rutas alternativas sugeridas por Tsukihara (1996) sirvan para la translocación de protones. Incluso Hofacker y Schulten (1998) indican que estas rutas no parecen contener suficientes moléculas de agua para establecer una buena vía de transferencia de protones.

Finalmente, Konstantinov y col. (1997) proponen que quizás los canales K y D están funcionalmente asociados con diferentes pasos del ciclo catalítico de la química del oxígeno. Así que los protones podrían ingresar a cualquiera de los canales y cambiar a otro canal a través de cambios conformacionales de la enzima, originados por la unión del oxígeno o la formación de alguno de los intermediarios durante la reducción de éste.

Por lo pronto es claro que aún se requiere de más estudios para establecer las rutas fisiológicas del movimiento de protones en la enzima. Entre estos estudios pueden estar el análisis de cristales de enzimas distintas, de variantes enzimáticas obtenidas por mutagénesis dirigida o bien, de oxidasas en distintos estados de oxidación o de

ligación.

La vía de salida de los protones bombeados parece estar constituida por una región con carga negativa formada por los residuos Asp-399, Asp-404, Asp-193, Glu-218, His-403 y el grupo propionato del hemo a_3 , cerca de donde está el magnesio o el manganeso. Esta región parece también tener una cadena de moléculas de agua (Hofacker & Schulten, 1998) a través de la cual los protones podrían moverse hasta llegar a la hendidura hidrofílica (localizada entre las subunidades I y II) al otro lado de la membrana (Iwata et al., 1995).

Además de las rutas de acceso y liberación de protones que hemos descrito, parecen también necesitarse rutas para el ingreso del oxígeno al centro binuclear y rutas para la salida del agua formada. En relación al acceso del oxígeno, hay varias vías propuestas que podrían funcionar en condiciones fisiológicas. Todas ellas dependen importantemente de la hidrofobicidad del medio y de la alta solubilidad del oxígeno en estos ambientes hidrofóbicos. Además también parecen estar involucrados los fosfolípidos unidos a la subunidad III, los cuales podrían participar como posibles reservorios de oxígeno asegurando así máximas velocidades de difusión de éste (Tsukihara et al., 1996). Riistama y col. (1996) y Hofacker y Schulten (1998) sugieren que el canal más factible para el ingreso del oxígeno es el que inicia en la hendidura en forma de "V" de la subunidad III y termina en el centro binuclear. Ellos proponen que la existencia de un canal específico es importante para controlar el acceso y retención del oxígeno al centro binuclear.

El canal de salida del agua podría iniciarse en una región hidrofílica formada por: el magnesio (o manganeso), los propionatos del hemo a_3 , los aminoácidos básicos Arg-438 e His-368, el Asp-364 (de acuerdo a la numeración de la citocromo oxidasa aa_3

de bovino) y dos moléculas de agua; todos ellos unidos por puentes de hidrógeno. Esta región estaría conectada con un canal hidrofílico formado en la interfase de las subunidades I y II, el cual puede constituir el canal de salida hacia el lado externo de la enzima. Esta ruta de salida propuesta requiere de pequeños cambios conformacionales para que las moléculas de agua atraviesen la enzima ya que no es suficientemente amplio; sin embargo, esta ligera estrechez del canal parece ser indispensable para prevenir el regreso de los protones del lado externo de la membrana. Todos los residuos propuestos en esta vía están muy conservados entre las distintas oxidasas, lo que parece implicar un mecanismo común para la remoción de agua del sitio activo (Tsukihara et al., 1996).

1.5. LAS CITOCROMO *c* OXIDASAS TIPO *cbb₃* EN DISTINTOS ORGANISMOS: SU FUNCIÓN Y SU PATRÓN DE EXPRESIÓN.

El conocimiento de la existencia de oxidasas del tipo *cbb₃* parece remontarse a hace ya varios años. Había sido propuesto que la mayoría de las bacterias fotosintéticas, cultivadas en bajas concentraciones de oxígeno, parecían presentar oxidasas del tipo *bc* (anteriormente denominadas oxidasas tipo "o" u "co"). Sin embargo, esto no fue confirmado hasta que se logró la purificación de la oxidasa de *Rhodospseudomonas palustris*, enzima conformada por cuatro polipéptidos con solo hemo *b* y *c*, que se inhibe con muy bajas concentraciones de cianuro (King & Drews, 1976). Posteriormente otra enzima con hemo *b* y *c* y con alta sensibilidad al cianuro fue caracterizada en *Azotobacter vinelandii* (Yang & Jurtschuk, 1978; Yang et al., 1979;

Hunter et al., 1989) y otra más en *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria en la cual la oxidasa parece ser la responsable de generar la energía durante el crecimiento aeróbico (Matsushita et al., 1982). Esta alta sensibilidad a cianuro, al igual que la presencia de un hemo B que reacciona con monóxido de carbono, parecen ser características comunes para las oxidasas *cbb₃*.

Las bacterias metilotróficas también parecen expresar una citocromo oxidasa del tipo *cbb₃*. *Methylophilus methylotrophus* presenta una enzima que solo contiene citocromos *b* y *c*, que es altamente sensible a cianuro y que se expresa durante el crecimiento en condiciones de exceso de metanol, limitación de oxígeno o amonio (Froud & Anthony, 1984). *Acetobacter methanolicus* parece tener también una oxidasa tipo *cbb₃* ya que en esta bacteria se reportó una oxidasa con alta sensibilidad a cianuro y aunque solo se detectó al hemo *b*, hay indicios de la existencia de hemos tipo C (Anthony, 1992; Chan & Anthony, 1991; Elliott & Anthony, 1988). Sin embargo, no existen estudios recientes que confirmen la identidad de todas las enzimas anteriores como oxidasas tipo *cbb₃* (Tamegai & Fukumori, 1994).

El grupo génico *fixNOQP* fue descrito originalmente en varias especies del género rhizobia (*Rhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azorhizobium caulinodans*, entre otros) como uno de los operones regulados por el factor de transcripción *FixK*, que activa, durante la fase de simbiosis, a algunos de los genes relacionados con la fijación de nitrógeno (Fischer, 1994). Posteriormente se descubrió que el operón *FixNOQP* codifica para la oxidasa tipo *cbb₃*, responsable de generar la energía durante el proceso de fijación de nitrógeno y el desarrollo de los bacteroides simbióticos (Keefe & Maier, 1993; Preisig et al., 1993; Mandon et al., 1994). La presencia de un operón homólogo en *Agrobacterium tumefaciens*, bacteria que no fija

nitrógeno a pesar de pertenecer a la familia Rhizobiaceae, sugirió que la oxidasa *cbb₃* no está solo relacionada con este proceso de fijación de nitrógeno. En *A. tumefaciens* la oxidasa parece proveer la energía necesaria para el desarrollo de la bacteria en las condiciones microaerobias existentes en la rizosfera, a la que coloniza y tumora (Schlüter et al., 1995).

Recientemente se han encontrado oxidasas del tipo *cbb₃* en muchos otros organismos, ya sea que se haya aislado a la enzima o que solo se haya detectado su presencia a nivel genético. Ejemplos son *Rhodobacter capsulatus*, una bacteria muy cercana a las rhizobia, que fija nitrógeno sin establecer simbiosis (Thöny-Meyer² et al., 1994; Gray et al., 1994); dos bacterias muy relacionadas, *Rhodobacter sphaeroides* (Shapleigh et al., 1992; García-Horsman² et al., 1994) y *Paracoccus denitrificans* (Raitio & Wikström, 1994; de Gier et al., 1994); y otras bacterias con metabolismos muy particulares, como *Magnetospirillum magnetotacticum* (Tamegai & Fukumori, 1994), *Thiobacillus sp W5* (Visser et al., 1997), *Helicobacter pylori* (Nagata et al., 1996), entre otras. Así que queda claro que la distribución de las oxidasas tipo *cbb₃* es de un espectro muy amplio y que su existencia no está ligada ni al proceso de fijación de nitrógeno ni al fotosintético. La función de la oxidasa en estos procesos no se conoce aún con certeza, aunque se sugiere que podría generar la energía necesaria para el proceso de fijación de nitrógeno y eliminar el oxígeno para el proceso fotosintético. Hasta antes de este trabajo sólo para la oxidasa de *P. denitrificans* se había demostrado su capacidad de bombear protones (Raitio & Wikström, 1994; de Gier et al., 1996), por lo que aún hay pocas evidencias de si estas oxidasas participan importantemente en la generación de energía en todos los organismos o juegan otros papeles.

La mayoría de los organismos (*B. japonicum*, *A. caulinodans*, *A. tumefaciens*, *P. denitrificans*, *H. pylori*, *M. methylotrophus* y *M. magnetotacticum*) expresan a la oxidasa *cbb₃* en condiciones de baja aereación, lo que correlaciona con su aparente alta afinidad por oxígeno (Nagata et al; 1996; Preisig et al; 1996). Esta expresión diferencial de *cbb₃* tiene su origen en que el inicio de su transcripción está regulado por la unión de factores tipo *Fnr/FixK* a secuencias localizadas arriba del operón (Fischer, 1994; Zeilstra-Ryalls & Kaplan, 1995; de Gier et al., 1996). Dichos factores de transcripción están involucrados en activar la expresión de genes bajo condiciones anaeróbicas de crecimiento (Unden & Trageser, 1991; Fischer, 1994; Spiro, 1994). El factor *Fnr* parece no responder directamente a las concentraciones de oxígeno sino más bien al estado redox de los intermediarios respiratorios, el cual es generalmente negativo durante la limitación de oxígeno y positivo durante la aereación (van Spanning et al., 1995). El factor *FixK* es insensible al oxígeno. Las concentraciones de oxígeno en *R. meliloti* son sentidas por el factor *FixL*, que en combinación con *FixJ*, inducen la transcripción de *FixK* (Fischer, 1994).

En muy pocos organismos (como *R. capsulatus*, *Thiobacillus sp W5* y en cepas de *R. sphaeroides* y de *P. denitrificans* que carecen de citocromo *aa₃*) la oxidasa *cbb₃* se expresa fisiológicamente tanto en condiciones aeróbicas como microaeróbicas. Esta expresión aeróbica de la oxidasa sugiere la pérdida de la regulación por oxígeno, evento que puede tener su origen en la pérdida de las secuencias reguladoras, en la pérdida de su funcionalidad o en la modificación del esquema de regulación. En estos organismos la oxidasa *cbb₃* es la única citocromo c oxidasa en el sistema respiratorio, así que necesita ser expresada bajo casi cualquier condición de crecimiento por ser la principal oxidasa responsable de generar la energía en la bacteria. Contrario a esto, la

oxidasa *cbb₃* se expresa preferentemente en condiciones de microaerobiosis en aquellos organismos que cuentan con otras citocromo *c* oxidasas que funcionan en condiciones de alta tensión de oxígeno, por lo que *cbb₃* no es la principal oxidasa para estas bacterias.

1.6. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LAS CITOCROMO *c* OXIDASAS TIPO *cbb₃*.

Las citocromo *c* oxidasas tipo *cbb₃* están codificadas por el grupo génico *fixNOQP* o *ccoNOQP*, *fix* para las bacterias fijadoras de nitrógeno (Preisig et al., 1993; Mandon et al., 1994; Fischer, 1994) y *cco* (citocromo *c* oxidasa) para las bacterias no fijadoras de nitrógeno (de Gier et al., 1996; Thöny-Meyer² et al., 1994). Este grupo génico está constituido por cuatro genes (*fix/ccoN*, *fix/ccoO*, *fix/ccoQ* y *fix/ccoP*) que parecen estar regulados como un operón (Preisig et al., 1993; Mandon et al., 1994; Thöny-Meyer² et al., 1994; Schlüter et al., 1995; Zufferey et al., 1996).

El gene *ccoN* codifica para la subunidad I, la subunidad más grande de la oxidasa (Figura 4), muy probablemente estructurada por 14 hélices transmembranales, aunque en algunos organismos esta subunidad solo presenta 12 hélices. Las doce hélices hacia el carboxilo terminal tienen relativa similitud (aproximadamente del 20%) con el resto de las oxidasas hemo-cobre (Preisig et al., 1993) y en ellas se encuentran seis residuos de histidinas altamente conservados en estas oxidasas. Estos probablemente participan en la unión del hemo de bajo spin, del hemo de alto spin y del Cu₂, los dos últimos formando el centro binuclear. La existencia de este centro binuclear

en las oxidasas tipo *cbb*₃ ha sido confirmada por varios estudios espectroscópicos (Gray et al., 1994; García-Horsman² et al., 1994; Varotsis et al., 1995; Wang et al., 1995), lo que reafirma a estas enzimas como miembros de la familia de las oxidasas hemo-cobre (García-Horsman¹ et al., 1994). Sin embargo, son los miembros más distantes de la familia, los cuales carecen de muchos de los residuos conservados en las otras oxidasas clásicas.

Como ya habíamos mencionado, estas citocromo *c* oxidasas carecen de las subunidades II y III clásicas junto con el centro Cu_A y en su lugar poseen dos subunidades que unen uno y dos hemo *c* covalentemente. Ambas subunidades están ancladas a la membrana y orientadas hacia el periplasma.

El gene *ccoO* codifica para la subunidad II de la oxidasa, la cual une covalentemente un hemo tipo C. Esta subunidad presenta una sola hélice transmembranal en su extremo amino terminal y un dominio hidrofílico en el lado carboxilo. Este último probablemente está expuesto al espacio periplásmico, a donde se encuentra unido el hemo C (Figura 4).

El polipéptido codificado por el gene *ccoP* es identificado como la subunidad III que une covalentemente dos hemo tipo C. Al parecer esta subunidad está estructurada por un dominio transmembranal en el extremo amino terminal y un dominio hidrofílico orientado hacia el espacio periplásmico, a donde probablemente se unen los hemo *c*.

El gene *ccoQ* codifica para el polipéptido de menor tamaño y el menos conservado entre las oxidasas tipo *cbb*₃. La función de este polipéptido no se conoce aún e incluso se ignora si forma parte de la oxidasa ya que la eliminación del gene no parece afectar el ensamblaje ni la función de la enzima (Zufferey et al., 1996) y la subunidad CcoQ parece estar ausente en las preparaciones purificadas y activas de la

oxidasa (García-Horsman² et al., 1994).

Zufferey y col. (1996) han demostrado que los polipéptidos CcoN y CcoO forman un complejo central que permite la asociación con CcoP para formar una oxidasa activa. CcoN y CcoO son también esenciales para el ensamblaje y estabilidad de la oxidasa e incluso suficientes para una actividad parcial. Se sugiere que la subunidad CcoO es el donador directo de los electrones a los centros redox de la subunidad CcoN, con la que parece estar estrechamente unida y que la subunidad CcoP es el acarreador entre el citocromo *c* (o el complejo *bc₁*) y el complejo CcoO-CcoN (Figura 4). La unión de los hemos *c* a las subunidades CcoO y CcoP es un requisito para el ensamblaje y estabilidad del complejo enzimático (Zufferey et al., 1997).

1.7. EL SISTEMA RESPIRATORIO DE *Rhodobacter sphaeroides* Y SU CITOCROMO *c* OXIDASA TIPO *cbb*.

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria púrpura no sulfurosa, gram (-), capaz de crecer en diversas condiciones. En ausencia de O₂ y presencia de luz puede crecer fotosintéticamente usando la bacterioclorofila y los carotenoides asociados a cromatóforos que sintetiza. En condiciones aerobias o microaerobias la bacteria es capaz de crecer con un sistema respiratorio ya que hay represión del aparato fotosintético y disminución de la síntesis de pigmentos. En la oscuridad y ausencia de oxígeno la bacteria crece con un sistema respiratorio anaeróbico. Como en muchos procariontes esta capacidad de crecer en distintas condiciones se debe principalmente a la expresión de un sistema respiratorio ramificado.

El sistema respiratorio aeróbico de *R.sphaeroides* está constituido de al menos dos deshidrogenasas (NADH y succinato deshidrogenasas), una ubiquinona, un complejo *bc*₁ (Yun et al., 1990) y al menos tres distintas oxidasas: dos citocromo *c* oxidasas (*aa*₃ y *cbb*₃) y una quinol oxidasa *bb*₃ (Shapleigh et al., 1992; Shapleigh & Gennis, 1992; García-Horsman² et al, 1994; Yun et al; 1990; Figura 6).

La citocromo oxidasa *aa*₃ predomina en el crecimiento aeróbico bacteriano y disminuye drásticamente en condiciones de baja tensión de oxígeno (Gennis et al., 1982; Shapleigh et al., 1992). Los genes que codifican para esta oxidasa ya han sido secuenciados y se ha purificado y caracterizado a la proteína, incluso se cuenta con una mutante (JS100) que carece de esta enzima (Shapleigh & Gennis, 1992). La oxidasa es capaz de bombear protones con una estequiometría de 1 H⁺/e⁻ y tiene un muy alto porcentaje de identidad (aproximadamente el 50%) con la citocromo *c* oxidasa mitocondrial (Gennis, 1993).

Durante el crecimiento en microaerobiosis o fotosíntesis, o en cepas sin citocromo *c* oxidasa *aa*₃ cultivadas en aerobiosis, la oxidasa que principalmente se detecta es la citocromo oxidasa tipo *cbb*₃ (Gennis et al., 1982; Shapleigh & Gennis, 1992). Esta oxidasa ha sido purificada y caracterizada bioquímicamente (García-Horsman² et al.,1994). Antes de este trabajo aún no se conocía si esta oxidasa era capaz de bombear protones o cual era su función para la bacteria.

La actividad de quinol oxidasa fue detectada en condiciones aeróbicas en cepas deficientes del complejo respiratorio *bc*₁ (Yun et al., 1990). Esta oxidasa parece expresarse constitutivamente, aunque en muy bajos niveles en cepas que cuentan con alguna de las citocromo *c* oxidasas. La enzima ha sido parcialmente purificada y parece contener solo hemos tipo B, por lo que se cree que se trate de una quinol oxidasa tipo

*bb*₃. De ser así, esta enzima pudiera ser un segundo ejemplo de oxidasas funcionales con hemos tipo B en el centro binuclear, además de la ya descrita citocromo *c* oxidasa *cbb*₃. La quinol oxidasa presenta una muy alta resistencia a cianuro, concentraciones de 500 μ M inhiben solo el 50% de la actividad (Barquera et al, 1996). Se considera la posibilidad de que esta enzima sea también miembro de la familia de las oxidasas hemo-cobre y que tenga homología con la quinol oxidasa tipo *ba*₃ de *P.denitrificans*, bacteria muy relacionada con *R. sphaeroides* y que tiene un sistema respiratorio muy semejante.

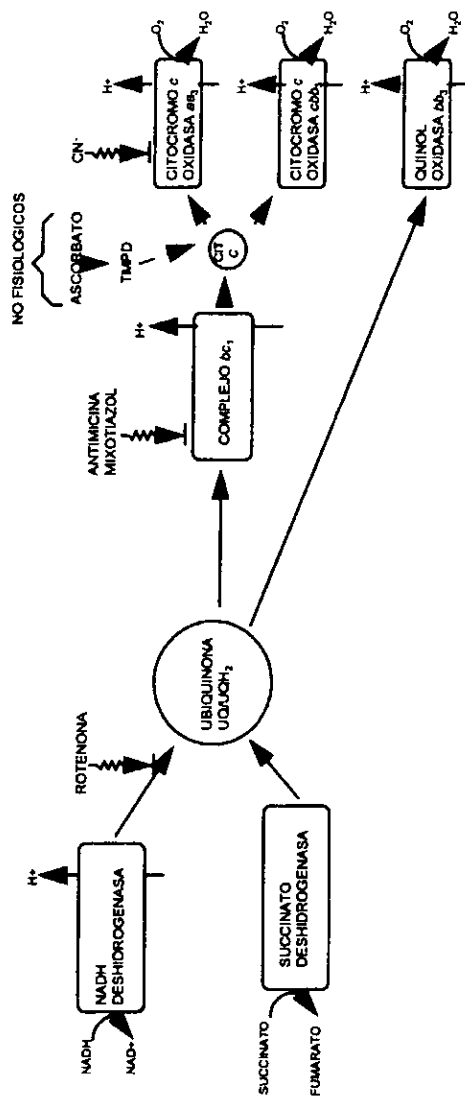


Figura 6. Esquema del sistema respiratorio de *Rhodospirillum rubrum*. Se muestran los sitios en los que algunos inhibidores específicos actúan en la cadena respiratoria. Así mismo, también se muestra el sitio de entrada de los electrones provenientes de los sustratos no fisiológicos ascorbato-TMPD.

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Se ha generado un gran conocimiento acerca del mecanismo y estructura de las oxidasas de la familia hemo-cobre. Sin embargo, aún quedan muchas dudas acerca del mecanismo molecular por el cual estas enzimas acoplan la reacción química de la reducción del oxígeno a la translocación de protones. Encontrar nuevos modelos de estudio, como es el caso de las citocromo *c* oxidasas tipo *cbb₃*, ayudará indudablemente a resolver estas preguntas ya que el examinar oxidasas distintas puede ayudar a conocer los elementos esenciales para la función o aquellos no esenciales que pueden ser sustituidos.

En este trabajo nos interesó hacer un estudio de la región cromosómica que codifica para la citocromo *c* oxidasa tipo *cbb₃* de *R. sphaeroides*. Nos planteamos también el objetivo de construir mutantes que carecieran de esta citocromo oxidasa para identificar el posible papel que esta enzima juega en la bacteria, así como confirmar que oxidasas forman el sistema respiratorio. Finalmente nos interesó determinar si esta oxidasa *cbb₃* y la quinol oxidasa de *R. sphaeroides*, a pesar de las diferencias estructurales tan marcadas con las otras oxidasas hemo-cobre, eran capaces de bombear protones.

3. METODOLOGÍA

La metodología empleada se encuentra descrita en el artículo de investigación que resume los resultados de este trabajo. Sin embargo, ciertas metodologías se explicarán con más detalle en esta sección.

3.1. CONSTRUCCIÓN DEL MAPA DE RESTRICCIÓN DE LA CLONA pUI1957.

La secuencia del operón *ccoNOQP* de *R. sphaeroides* se obtuvo a partir de las clonas pUI1957 y pUI1943, amablemente donadas por Jill Zeilstra-Ryalls y Samuel Kaplan (Universidad de Texas).

La secuenciación se inició a partir de la clona pUI1943, la cual contiene un fragmento *PvuII-PvuII* de aproximadamente 2.2 kpb clonado en el fagémido pBluescript II SK +/- . En esta clona se encuentra la secuencia parcial de los genes *ccoN* y *ccoO*. Para completar la secuencia se procedió a ubicar el operón *ccoNOQP* en la clona pUI1957, la cual está constituida por un fragmento *BamHI-BamHI* de 8.5 kpb aproximadamente, clonado en el vector de expresión pRK-415. Con esta finalidad se construyó un mapa parcial de restricción de la clona pUI1957 (Figura 7).

La secuencia de la región 5' de *ccoN*, de la región 3' de *ccoO* y la de los genes *ccoQ* y *ccoP* se obtuvo a partir de las subclonas pT7PS1.7 (fragmento *PstI-SaI* de 1.7 kpb), pT7SP0.85 (fragmento *SaI-PstI* de 0.85 kpb) y pT7PE0.8 (fragmento *PstI-EcoRI* de 0.8 kpb, todos ellos provenientes de pUI1957) clonadas en pT7-T319 α (Figura 7).

Más detalles sobre la secuenciación son mostrados en el artículo.

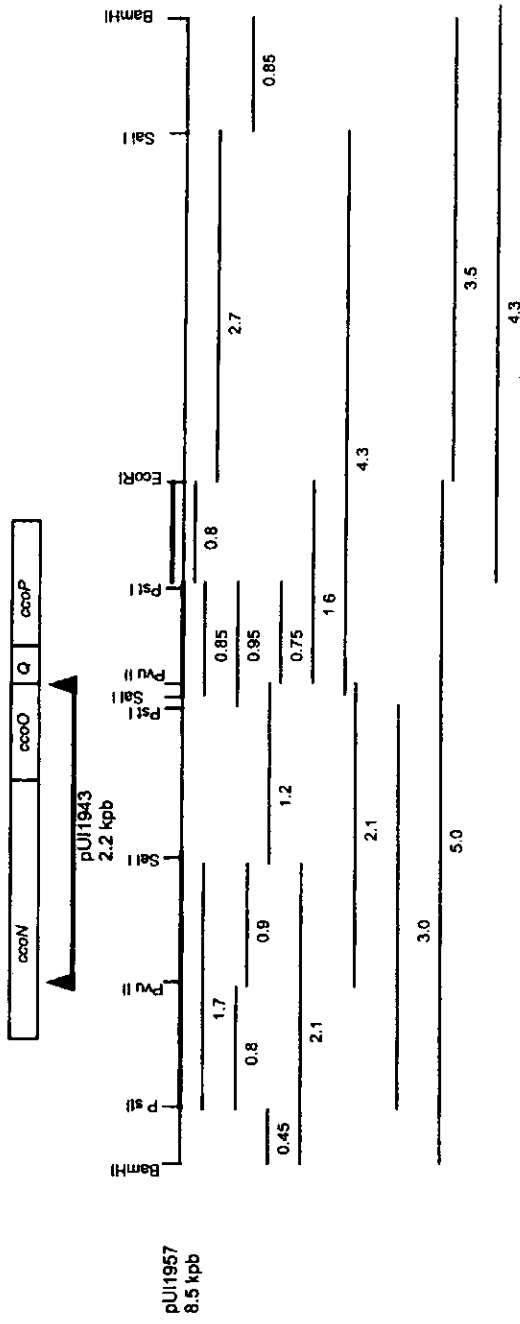


Figura 7. Mapas parciales de restricción de los plásmidos pUI1943 y pUI1957.

3.2. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PARA LA INACTIVACIÓN DEL OPERÓN *ccoNOQP* DE *R. sphaeroides*.

La construcción de mutantes esta basada en el intercambio, por recombinación homóloga, de la copia normal genómica del operón por una que ha sido inactivada.

Para la inactivación de la citocromo *c* oxidasa tipo *cbb₃* de *R. sphaeroides* se generaron dos construcciones. En la primera de ellas (Figura 8), un fragmento de pUI1943 se clonó en pT7-T319 α (pT7-1943) y posteriormente se interrumpió por un gene de resistencia a kanamicina en el único sitio *SaI* presente (pT7-1943Kan). Un fragmento *Pst*I-*Eco*RI (de 3.2 kpb) de esta última construcción, conteniendo al gene *ccoN* interrumpido, se clonó en el plásmido suicida pSUP202, generando la construcción pSUP-1943Kan, que se utilizó para obtener a las mutantes por interrupción.

En la segunda estrategia (Figura 9) se construyó un vector en el cual se eliminó parte de los genes *ccoN* y *ccoO*. Para esto, los fragmentos de restricción *Pst*I-*Sa*I y *Sa*I-*Eco*RI, ambos de aproximadamente 1.7 kpb, se subclonaron en el plásmido pT7-T319 α , generando el vector pT7PSE3.4. En éste, un fragmento de 1.2 kpb con el gene de resistencia a kanamicina se subclonó en el sitio *Sa*I. Posteriormente, un sitio *Eco*RI se generó en el sitio múltiple de clonación del vector a través de la introducción en el sitio *Hind*III del oligodesoxinucleótido de doble cadena denominado EcoLINK. Con este nuevo sitio *Eco*RI se logró movilizar un fragmento *Eco*RI-*Eco*RI de 4.6 kpb y subclonarlo en el plásmido suicida pSUP202, generando así el vector denominado pSUP-EPSEKan. Con éste se produjeron las mutantes por eliminación.

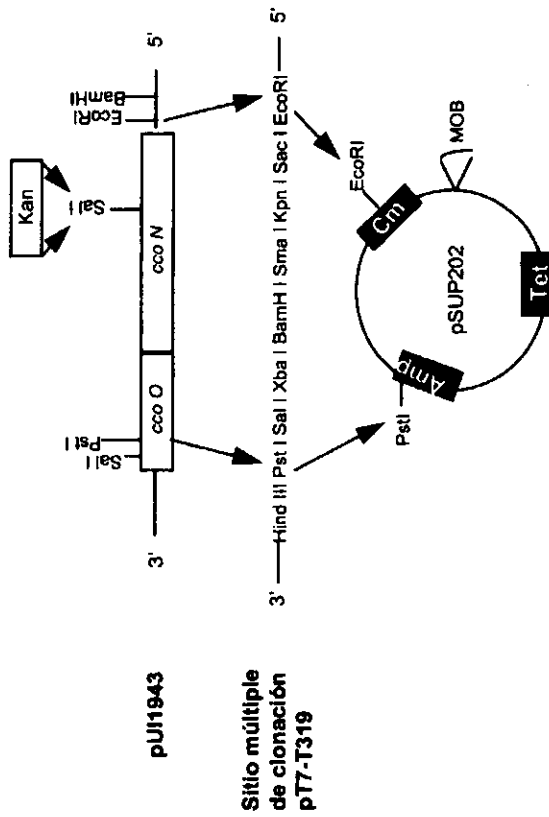


Figura 8. Estrategia para inactivar a la oxidasa *cbb₃* por la interrupción del operón *ccoNOQP*.

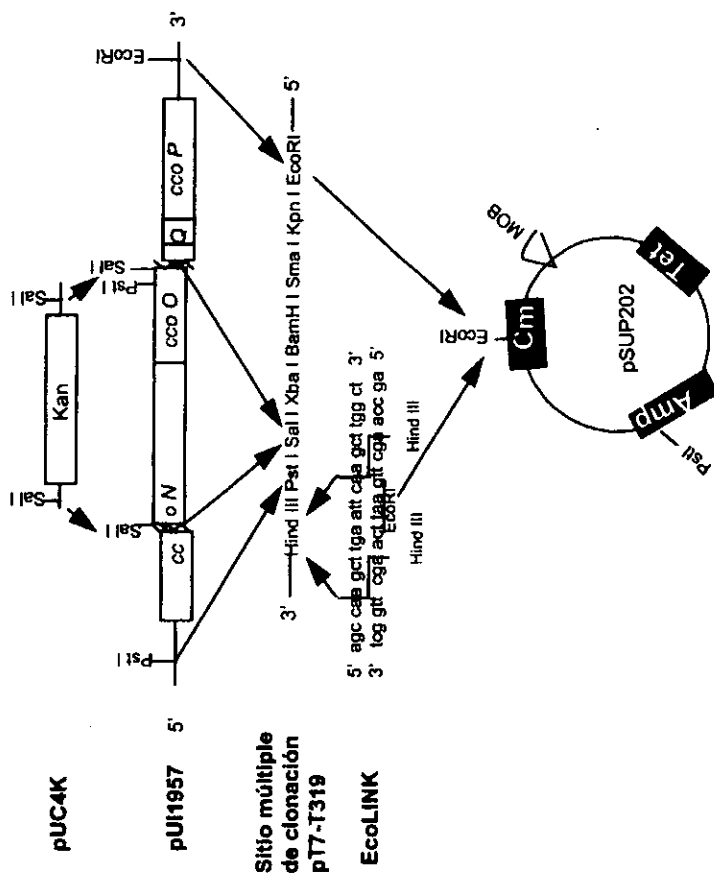


Figura 9. Estrategia para inactivar a la oxidasa *cbb₃* por la eliminación de fragmentos de los genes *ccoN* y *ccoO*.

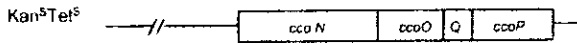
Las dos construcciones, pSUP1943Kan y pSUP-EPSEKan, se introdujeron por conjugación a la cepa JS100 de *R. sphaeroides*, cepa que carece de la citocromo *c* oxidasa tipo aa₃. Como pSUP202 no posee origen de replicación en *R. sphaeroides*, la única forma de mantener un fenotipo resistente a kanamicina en las células es que éste se integre por recombinación homóloga al cromosoma. De esta forma las colonias resistentes a kanamicina y sensibles a tetraciclina debieron ser el resultado de eventos de doble entrecruzamiento, donde el operón normal fue sustituido por el operón interrumpido o con eliminación. La sensibilidad a tetraciclina se debe a la pérdida del gene de resistencia localizado en pSUP202 (Figura 10).

3.3. ACTIVIDADES DE ASCORBATO-TMPD Y CITOCROMO *c* OXIDASA.

Estas actividades fueron medidas en membranas citoplásmicas de la cepa progenitora JS100, de las dos mutantes obtenidas, MT101 (mutante por interrupción) y ME127 (mutante por eliminación) y de la cepa MT101 complementada (MT101C).

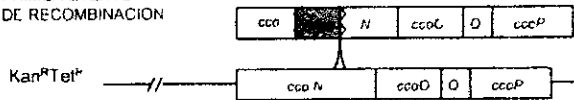
El consumo de oxígeno fue registrado en un polarógrafo usando un electrodo tipo Clark. El registro se inició después de la adición de los sustratos (ascorbato-TMPD o ascorbato-citocromo *c*), considerándose este trazo como la actividad basal en donde se puede observar consumo de oxígeno debido a la autooxidación del TMPD o del citocromo *c*. La actividad enzimática se inició con la adición de una cantidad conocida de proteínas de membrana en la cámara del oxímetro.

DNA CROMOSOMAL
CEPA SILVESTRE



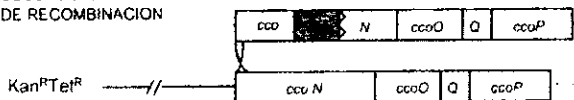
Tet

PRIMER EVENTO
DE RECOMBINACION



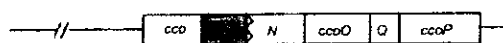
Tet

SEGUNDO EVENTO
DE RECOMBINACION



Tet

Kan^RTet^R



DNA CROMOSOMAL
CEPA MUTADA

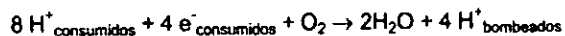


Figura 10. Secuencia de eventos durante la recombinación homóloga.

3.4. ESTEQUIOMETRÍA DEL BOMBEO DE PROTONES.

La capacidad de bombear protones de las oxidasas *cbb₃* y *bb₃* de *R. sphaeroides* fue determinada por el método de pulso de oxígeno. En éste se registra la acidificación del pH externo de una suspensión anaeróbica celular como una medida de los protones liberados por la actividad de las oxidasas. Para esto se adiciona una pequeña cantidad de oxígeno (en forma de agua saturada con aire) que induce la actividad respiratoria de las oxidasas, la cual puede acompañarse de la liberación de protones escalares y/o vectoriales.

La proporción de protones liberados por electrón consumido por la enzima (H^+/e^-) es determinada dividiendo la cantidad de nanomoles de protones liberados por la enzima entre los nanomoles de electrones. Los nmoles de protones liberados se calculan usando la calibración de la acidificación obtenida con un volumen conocido de una solución 1mM de ácido clorhídrico anaeróbico. Para el cálculo de los nmoles de electrones, primero se calculan los nmoles de O_2 adicionados, considerando el volumen de agua añadido y sabiendo que éste contiene 0.258 mM de O_2 disuelto, a 25 °C, 1 atm. Posteriormente se considera la siguiente ecuación catalizada por la citocromo c oxidasas:



Conociendo los nmoles de O_2 adicionados puede calcularse los neq de electrones consumidos.

En los trazos de bombeo de protones mostrados en el primer artículo se observa que la acidificación producida por el bombeo de protones es transitoria y que el pH posteriormente regresa al equilibrio inicial previo a la adición de oxígeno. Esta recuperación del pH es debida principalmente a la permeabilidad parcial que la membrana presenta por los protones, lo que permite el lento regreso de éstos al interior de la célula. El uso de compuestos desacoplantes, como el CCCP, permite distinguir a los protones vectoriales de los escalares. Esto tiene su fundamento en el hecho de que estos compuestos son acarreadores de protones y por lo tanto aceleran el regreso de éstos al interior celular, eliminando así la posibilidad de detectar la acidificación producida por los protones bombeados. No obstante, los desacoplantes no afectan la acidificación producida por los protones químicos.

4. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos durante la realización de este proyecto se resumen en dos artículos de investigación que a continuación se presentan. Ambos son seguidos por tablas (Tablas A y B) que complementan resultados no mostrados en los correspondientes artículos. El primer artículo muestra la mayoría de los resultados generados y ya ha sido aceptado para su publicación en la revista *Biochimica et Biophysica Acta*. El segundo artículo aún está en preparación y a pesar de que no contiene todas las figuras, consideramos importante incluirlo para mostrar algunos resultados que también fueron fruto de este proyecto de doctorado.

En el primer artículo se describe la estrategia para lograr la secuenciación del operón que codifica para la citocromo *c* oxidasa tipo *cbb₃* de *Rhodobacter sphaeroides*. Para esto se requirió de la subclonación de algunos fragmentos de los plásmidos pUI1943 y pUI1957, de los cuales previamente se construyeron mapas parciales de restricción para localizar en ellos a los genes de interés (Metodología 3.1 y Figura 7 de la tesis). En este artículo se muestra la secuencia completa del operón y el análisis que se hizo de ésta.

Se realizó también la construcción de dos tipos de mutantes en las que se inactivó a la citocromo *c* oxidasa *cbb₃* (Metodología 3.2, Figuras 8 y 9 de la tesis). Las construcciones se introdujeron por conjugación en la cepa JS100 (Δaa_3) de *R. sphaeroides* y las mutantes generadas fueron el resultado de eventos de recombinación homóloga (Figura 10 de la tesis).

La inactivación de la citocromo oxidasa *cbb₃* en las mutantes generadas (MT101 y ME127) se verificó mediante la hibridación tipo Southern blot (datos no mostrados) y por la determinación de actividades de ascorbato-TMPD y citocromo *c* oxidasa (Metodología 3.3 y Figura 6 de la tesis). La Tabla A, mostrada al final del primer artículo, resume los resultados de las actividades de oxidasas. Como se observa, MT101 y ME127 carecen de estas actividades, sugiriendo que *aa₃* y *cbb₃* son las únicas citocromo *c* oxidasas en el sistema respiratorio de *R. sphaeroides*. En esta tabla también se muestra la recuperación de estas actividades en la mutante MT101 después de haber sido complementada por la introducción y expresión de la versión normal del operón *ccoNOQP*, contenido en el plásmido pRK-415.

Por otro lado, MT101 y ME127 mostraron una alta actividad de quinol oxidasa, lo que sugiere que el crecimiento aeróbico de estas mutantes es sostenido por la actividad de esta oxidasa. Considerando que estas mutantes carecen de citocromo *c* oxidasas, constituyen excelentes sistemas para a partir de ellas purificar a la quinol oxidasa.

La caracterización de la quinol oxidasa de *Rhodobacter sphaeroides* se muestra en el segundo artículo. Como se discute aquí, esta quinol oxidasa posee características muy particulares que describen a una enzima con diferencias importantes con el resto de las oxidasas relacionadas. En el artículo se muestran evidencias de que se trata de una quinol oxidasa funcional del tipo *bb₃*, con un hemo tipo B como hemo de alto spin, que probablemente pertenece a la familia de las oxidasas hemo-cobre, pero que presenta una inusual alta resistencia a cianuro.

Finalmente, en ambos artículos se muestra la determinación de la capacidad de translocar protones de ambas oxidasas, la citocromo *c* oxidasa *cbb₃* y la quinol oxidasa *bb₃*. Ambas bombean protones con una estequiometría de $1\text{H}^+/\text{e}^-$ (Fig. 5 y Tabla 2 del primer artículo y Tabla B al final del segundo artículo).

BBA

Editorial Secretariat, P.O. Box 1345, 1000 BH Amsterdam, The Netherlands

Telephone +31 (20) 485 3510; Telex +31 (20) 485 3508; E-mail: lbc@elsevier.nl

Editor-in-Chief
P.C. van der Vliet

Executive Editors

J. Avrami
M. Fujisada
J. Challa
T. Kreis
A.G. Lee
Y. Lindqvist
G.M. Lorimer
P.R. Rich
J.R. Riordan
O.E. Varon
H. van den Bosch
M. Wikström
P. Yeagle

Dr. J. Arturo Garcia-Horsman
Dept. Medical Chemistry
Helsinki Bioenergetics Group
Inst. Biomedical Sciences
Siltavuorenpenger 10A
00014 Helsinki
Finland

Honorary Managing Editor
E.C. Stoter

Amsterdam, 2 April 1998


Ref: RPB AM016825 - 'The *cbh3*-type cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*, a proton-pumping heme-copper oxidase'.

Dear Dr. Garcia-Horsman,

On behalf of the Executive Editors of *Biochimica et Biophysica Acta*, we are pleased to inform you that the above paper has been accepted for publication in BBA.

The typescript has been forwarded to the Publishers and will be included in the section devoted to *Bioenergetics*.

Yours sincerely,


Albert van der Werf
Head Editorial Office

**The *cbb*₃-type cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*,
a proton-pumping heme-copper oxidase.**

by

**Mayra Toledo-Cuevas¹, Blanca Barquera², Robert B. Gennis³, Mårten Wikström²,
and J. Arturo García-Horsman^{2*}.**

1. Departamento de Bioquímica. Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F.

2. Helsinki Bioenergetics Group. Department of Medical Chemistry. Institute of Biomedicine, PO Box 8 (Siltavuorenpenger 10 A) FIN-00014 University of Helsinki, Finland.

3. Department of Biochemistry, University of Illinois at Urbana 505 S Matthew's Av. Urbana. IL 61801 USA.

* Correspondence to J. A. García-Horsman. Helsinki Bioenergetics Group. Institute of Biomedicine. P. O. Box 8. Siltavuorenpenger 10A. FIN-00014 University of Helsinki. Finland. Tel (358)-9-191-8279. Fax: (358)-9-191-8296. E-mail: garciaho@rock.helsinki.fi

Keywords: *Rhodobacter sphaeroides*, cytochrome oxidase, cytochrome *cbb*₃, proton pumping, *ccoNOQP* operon, respiratory system.

Rhodobacter sphaeroides expresses a bb_3 -type quinol oxidase, and two cytochrome *c* oxidases: cytochrome aa_3 and cytochrome cbb_3 . We report here the characterization of the genes encoding this latter oxidase. The *ccoNOQP* gene cluster of *R. sphaeroides* contains four open reading frames with high similarity to all *ccoNOQP/fixNOQP* gene clusters reported so far. CcoN has the six highly conserved histidines proposed to be involved in binding the low-spin heme, and the binuclear center metals. *ccoO* and *ccoP* code for membrane bound mono- and diheme cytochromes *c*. *ccoQ* codes for a small hydrophobic protein of unknown function. Upstream of the cluster there is a conserved *Fnr /Fix* K-like box which may regulate its expression. Analysis of a *R. sphaeroides* mutant in which the *ccoNOQP* gene cluster was inactivated confirms that this cluster encodes the cbb_3 -type oxidase previously purified. Analysis of proton translocation in several strains shows that the cytochrome cbb_3 is a proton pump. We also conclude that the cytochromes cbb_3 and aa_3 are the only cytochrome *c* oxidases in the respiratory chain of *R. sphaeroides*.

1. Introduction

Rhodobacter sphaeroides is a Gram-negative facultative bacterium. It can grow aerobically, anaerobically in the dark, or photosynthetically. As in many bacteria, these growing abilities are mainly due to the expression of a branched respiratory system.

It has been shown previously that *R. sphaeroides* possesses at least two cytochrome *c* oxidases and one quinol oxidase [1-3]. The *aa₃*-type cytochrome *c* oxidase predominates when the cells are grown aerobically [4], while the *cbb₃*-type alternative cytochrome *c* oxidase is expressed mainly under microaerobic or photosynthetic conditions, or in strains which lack the *aa₃*-type oxidase [2]. On the other hand, the presence of a quinol oxidase was also previously confirmed with the generation of a *bc₁*-deficient mutant capable to grow in aerobic conditions [3].

The *R. sphaeroides* alternative cytochrome *c* oxidase was purified and characterized as a novel member of the heme-copper oxidase superfamily, and was identified as a *cbb₃*-type oxidase [1], also detected in several other bacteria [5-11]. This type of oxidase shows features quite different from the main family of heme-copper oxidases [12]. One of these characteristics is the presence of a B-type heme in the binuclear center. Analysis of bacterial [13] and mitochondrial [14, 15] cytochrome *c* oxidase crystal structures shows that the hydroxyl group of the heme *a₃* hydroxyethylfarnesyl side chain may be involved in a hydrogen-bond path, which in turn might be conducting protons to the binuclear center [13-15]. Moreover, a strict requirement for a hydroxyethyl farnesyl side chain of the high spin heme for activity has been pointed out for the *Paracoccus denitrificans* cytochrome *ba₃* [16], and for

Escherichia coli cytochrome bo_3 [17, 18]; the corresponding bb_3 -type enzymes in these organisms are inactive.

It has been shown that the cbb_3 -type oxidases play important roles in low-oxygen growth conditions. In *B. japonicum* the cbb_3 -type oxidase is essential for the nitrogen fixation [19]. In these bacteria this oxidase is expressed under microaerophilic growth conditions and shows high affinity for oxygen [8]. Additionally, cbb_3 -type oxidases can also play important roles in the aerobic growth, as in *R. capsulatus*, where the cytochrome cbb_3 is the sole cytochrome c oxidase present [6].

In this study we have characterized the *R. sphaeroides* chromosomal region that encodes cytochrome cbb_3 , and described the complete *ccoNOQP* gene cluster sequence. Based on sequence comparisons among all cbb_3 sequences known so far and the crystal structure for cytochrome aa_3 published recently, a 2-dimensional model of the CcoN subunit is proposed. We also provide evidence that the cbb_3 -type oxidase is a proton pump.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strains, plasmids and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used in this work are summarized in Table 1. *E. coli* strains were grown at 37° C in L Broth in the presence of the appropriate antibiotic concentrations according to the strain and plasmid hosted (ampicillin 100 µg/ml; kanamycin 50 µg/ml; tetracycline 20 µg/ml). *R. sphaeroides* strains were grown aerobically or photosynthetically in Siström's media

at 32°C as reported previously [3]. Antibiotics were added when required (streptomycin/spectinomycin 50 µg/ml; tetracycline 4 µg/ml; kanamycin 20 µg/ml).

2.2. *Sequencing and DNA manipulation.* DNA cloning techniques were performed according to standard protocols [20]. Southern hybridization was performed using a non-radioactive DNA labeling and detection system (DIG-System non radioactive nucleic acid detection system, Boehringer Mannheim). DNA sequencing was carried out using an automated sequencer (Applied Biosystems) at the Biotechnology Center, University of Illinois at Urbana. DNA sequences were analyzed with computer programs available at ExPASy Molecular Biology Server at the University of Geneva (<http://expasy.hcuge.ch/www/expasy-top.html>) or at The Virtual Genome Center at the University of Minnesota (<http://alces.med.umn.edu/JGC.html>). The DNA sequence reported here is available in the GenBank (accession No. U58092).

The *ccoNOQP* insertion mutant (MT101) was made by the introduction of a blunt-ended *Pst*I-cleaved kanamycin-resistance cartridge into the unique *Sal*I site in pT7-1943 (Fig. 1; Table 1). The kanamycin cartridge was inserted in the 3' to 5' orientation with respect to the *ccoN* gene (pT71943Kan in Table 1; Fig.1). The *Pst*I/*Eco*RI fragment from pT71943Kan was then cloned into the ampicillin and chloramphenicol-resistance loci of pSUP202. This construct was designated pSUP1943Kan. This vector was used to transform *E. coli* S17-1. The resulting strain was used as donor to mobilize the plasmid into *R. sphaeroides*.

The deletion mutant (ME127) was made by replacing part of the *ccoN* and *O* genes by a kanamycin resistant cartridge (Table 1). For this purpose we cloned a 1.7 kbp *PstI-SalI* fragment from pUI1957 to the pT7-T319 α plasmid, generating pT7PS1.7. Another 1.7 kbp *SalI-EcoRI* fragment from pUI1957 was subcloned in this vector, resulting the plasmid designated as pT7PSE3.4. In this, an *EcoRI* restriction site was introduced into the *HindIII* site by the linker EcoLINK (5' AGC CAA GCT TGA ATT CAA GCT TGG CT 3'), generating now the plasmid pT7EPSE3.4. A *SalI* cleaved kanamycin cartridge was ligated (with the 3' to 5' orientation with respect of the *ccoN* gene) into the *SalI* site of pT7EPSE3.4, generating pT7EPSE-Kan (Table 1). Finally, the *EcoRI-EcoRI* fragment from this last construction was subcloned into the chloramphenicol-resistance locus of pSUP202 to generate pSUP-EPSE-Kan. This was again used to transform *E. coli* S17-1 for using it as a donor to mobilize the plasmid into *R. sphaeroides*.

Conjugation between *E. coli* S17-1 and *R. sphaeroides* strains was carried out as described before [21].

Complementation of the cytochrome *cbb₃* deficient mutants (MT101 or ME127), was made by introducing a plasmid (pRK415) containing a *BamHI/EcoRI* 5.5 kbp insert which contains the whole *ccoNOQP* operon. The strains were called MT101C and ME127C.

2.3. Biochemical Methods. Membrane preparation. Aerobically grown cells were washed and treated with lysozyme as described by Raitio and Wikström [22]. Osmotically

shocked cells were treated with DNase I (Sigma) and membranes were recovered and washed by centrifugation.

Activity measurements. Oxygen uptake was measured polarographically as described by Raitio and Wikström [22], in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl and 0.5 mM EDTA. Ascorbate-*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylene diamine (TMPD)-cytochrome *c* oxidase activity was assayed in the presence of sodium ascorbate (5 mM), TMPD (10 μM), horse heart cytochrome *c* (15 μM) and antimycin A, or myxothiazol (2.8 μg/ml). 1,4-dithiothreitol (DTT; 4.4 mM) and ubiquinone-1 (Q₁; 0.2 mM) were used to assay quinol oxidase activity in the presence or absence of myxothiazol.

Proton translocation measurements were performed by the oxygen-pulse method using intact cells washed and resuspended in 200 mM KCl as reported previously [23-25].

3. Results.

3.1. *Cloning and sequencing of the ccoNOQP cluster from R. sphaeroides.* From studies on the environmental regulation of the *R. sphaeroides* gene expression, Zeilstra-Ryalls and Kaplan found a cosmid (pUI8180) in their *R. sphaeroides* genomic library which contained sequences homologous to the *fixN* gene of *Bradyrhizobium japonicum* [26, 27]. pUI1957 (kindly provided by Zeilstra-Ryalls and Kaplan), a *Bam*HI subclone in pRK415-1 of pUI8180, was used here to sequence the complete *ccoNOQP* gene cluster (Fig. 1). This cluster maps at around 443 kbp on the physical map of the *R. sphaeroides* 2.4.1

chromosome I [26].

The sequence strategy is outlined in Fig. 1. Different DNA fragments from pUI1957 were cloned into pT7T319 α and DNA sequences of both strands were obtained using standard M13/pUC forward and reverse primers, or internal primers (sequences shown in the Fig.2).

The DNA sequence of the region reported here comprises 4258 base pairs. 3395 base pairs correspond to the *ccoNOQP* predicted coding region. The sequences of the *ccoNOQP* cluster 5' and 3' flanking regions of 365 bp and 461 bp respectively are shown in Fig. 2. The entire sequence showed a high G+C content (63.4 %) which is typical for the *R. sphaeroides* genome. The cluster comprises four open reading frames (ORF's) in close physical proximity: *ccoN*, *ccoO*, *ccoQ* and *ccoP*. One potential transcription termination site was found with a stem-loop structure, located 16 bp downstream of the *ccoP* gene (Fig.2). The proposed initiation codons of all four genes are five to eight bases downstream of putative Shine-Dalgarno sequences. A potential binding site for an *Fnr/FixK*-like protein was found located at positions -133 and -101 upstream from the start codon of *ccoN*. This sequence is almost identical to the "anaerobox" found upstream of the *ccoNOQP* cluster from *P. denitrificans* [28], and that of *A. caulinodans* [29]. It has been observed that the *ccb₃*-like oxidase is preferentially expressed in low-oxygen tensions [2, 19], and a FNR-type gene expression regulatory system has been described in *R. sphaeroides*. Zeilstra-Ryalls and Kaplan [26] reported that the *fnrL* gene product is involved in the regulation of gene expression in response of environmental changes. de Gier et al., [28] also found an ORF that potentially codes for a

fnrP transcription regulator. This is located in the flanking region of the *ccoNOQP* operon of *P. denitrificans*. Accordingly, this *fnrL* or P gene seems to be the regulator for the oxygen-regulated expression of the *cbb₃*-type oxidase through binding to the *Fnr/FixK*-like site.

Around 190 bp upstream from the *ccoN* start codon, an ORF was found with an orientation opposite to the *ccoNOQP* operon. This ORF corresponds to Rs-ORF277 identified by Zeilstra-Ryalls & Kaplan [26], which is homologous to the *B. japonicum* ORF 277 of unknown function [19].

ccoN. This gene encodes a basic ($pI=8.97$) membrane protein of 535 amino acid residues, with a predicted molecular weight of 60,060 Da. The corresponding polypeptide in the purified enzyme showed a relative molecular mass of 45,000 on SDS-PAGE [1]. This discrepancy may be due to anomalous electrophoretic migration and/or possible protein processing. Hydropathy analysis predicts 14 transmembrane segments with both N- and C-termini facing the cytoplasmic side (see Figure.3). This subunit is predicted to bind the low spin heme *b*, the high spin heme *b₃* and the Cu_B , which have been spectroscopically detected [1, 30]. From 13 histidine residues in the sequence only seven are conserved in all the *CcoN/FixN* sequences reported (Fig.4). Hydropathy analysis predicts that only four conserved histidines (His118, His-267, His-405, and His-407) are within transmembrane α -helices while three (His-317, His-318, and His-397) are probably located on periplasmic loops. By comparison with the location of the histidine ligands in cytochrome *aa₃* crystal structure, it is most likely that His-118 and His-407 are the

ligands for the low spin heme b , and His-405 the axial ligand for the high-spin heme b_3 . His-267, His-317 and His-318 are probably ligands of Cu_B . The His-397 might be equivalent to the conserved His-403 (*P. denitrificans* cytochrome aa_3) which is a ligand for the magnesium ion. Otherwise, alignments of the CcoN sequences with subunit I of the main heme-copper oxidase family, indicate that there is little similarity between them. For example, residues suggested to be involved in H^+ conduction (Asp-124, Glu-278, Lys-354, Leu-393 and Asp-399 in *P. denitrificans* cytochrome aa_3), or in H-bonding to the Cu_B histidine ligands (Thr-344 and Tyr-280) are missing in the cytochrome cbb_3 sequences, or placed in other positions (but see below). A suggested two-dimensional model for this protein is shown in figure 3. The high degree of hydrophobicity for the first two helices of CcoN (helices -I and 0 in Fig.3) contributes to our prediction of them being transmembrane. However, Zufferey et al. [31] showed evidence which suggests that these two helices in *B. japonicum* FixN may be peripheral facing the cytoplasm. These two helices might not have a role in the function/structure of the oxidase since they are missing in the *Helicobacter pylori* ccoN sequence, in which the predicted protein starts at the level of the third transmembrane segment of the rest of the sequences.

ccoO. *ccoO* gene encodes for a 241-amino acid polypeptide with a calculated molecular mass of 27,376 Da, which is predicted to be a c-type membrane bound cytochrome. The corresponding polypeptide in the purified preparation shows a Mr of 29,000. Furthermore, the identity of the CcoO subunit in the protein preparation is now here confirmed since the N-terminal amino-acid sequence reported before [1] corresponds to

the deduced sequence from the *ccoO* gene (the first methionine residue is missing from the peptide sequence, but this should be due to post-translational processing) .

Hydropathy analysis shows that CcoO probably has a single membrane-spanning domain near the N-terminus, and a hydrophilic domain, which is most probably exposed to the periplasmic side where the heme C is attached. A predicted totally conserved heme C binding site (CXXCH--MP) motif is found in this region (C₆₈-Y₆₉-L₇₀-C₇₁-H₇₂, and M₁₄₀-P₁₄₁; Fig.4).

ccoQ. The *ccoQ* gene codes for a 67 amino acid acidic (pI=5.52) polypeptide with a calculated MW of 7, 778 Da (Fig.4). It has a high hydrophobic amino acid stretch near the N-terminus, and a charged motif at the C-terminus as previously suggested [10]. The corresponding polypeptide is apparently not present in the purified preparation [1] and its role remains unknown.

ccoP. The product of the *ccoP* gene codes for an acidic membrane protein (pI=4.54) of 290 amino acids and a calculated Mr of 31,361. This product corresponds to the 35 kDa subunit on the SDS-PAGE analysis of the purified enzyme [1]. Hydropathy profiles predict two main domains: a hydrophobic transmembrane domain near to the N-terminus; and a hydrophilic domain most probably facing the periplasmic side (Fig.4). Two heme C binding motifs can be found in this domain (-C₁₂₄-V₁₂₅-Q₁₂₆-C₁₂₇-H₁₂₈---//---M₁₇₆-P₁₇₇; and C₂₂₀-A₂₂₁-A₂₂₂-C₂₂₃-H₂₂₄---//---M₂₆₅-P₂₆₆).

Considering that only CcoN, CcoO, and CcoP, are part of the functional cytochrome *cbb*₃, the total mass calculated from the sequence accounts for 118,797 Da, which is very close to the mass electrophoretically estimated before using electrophoresis [1].

3.2. *Deactivation of the ccoNOQP gene cluster and trans-complementation.* In order to confirm that the *ccoNOQP* cluster encodes for the *cbb*₃-type cytochrome *c* oxidase, we constructed two mutants, one in which the cluster was inactivated by inserting a kanamycin resistance gene and other in which most of the sequence coding for the *ccoN* and *ccoO* genes were substituted by the kanamycin cartridge (see Materials and Methods).

During the mating of *R. sphaeroides* JS100 (Δaa_3) with *E. coli* S17-1/pSUP1943Kan (*ccoNOQP* Kan-interrupted vector), kanamycin resistant colonies were obtained only when the plates were incubated under photosynthetic conditions. Approximately 100 colonies were picked and were able to grow aerobically. Three of them were sensitive to tetracycline, which indicated that the double crossover event had taken place. One of these colonies (designated here as MT101) was grown and its respiratory activity tested. Similar strategy was employed for obtaining ME127, which is a mutant in which a deletion of part of *ccoN* and *ccoO* was filled in with the kanamycin resistance gene, also using JS100 strain as parent. Location of the kanamycin resistance gene was confirmed by Southern blot hybridization (data not shown).

Membranes isolated from MT101 and ME127 showed no detectable cytochrome

c- nor TMPD-oxidase activity, but they could oxidize ubiquinol at high rates, in a myxothiazol-resistant way. Succinate- and NADH-dehydrogenase activities, as well as ubiquinol:cytochrome *c* oxidoreductase activity, were comparable with these activities measured in the parent strain JS100.

Cytochrome *c* oxidase activity was complemented in *Rhodobacter sphaeroides* MT101 or ME127 by the introduction of a plasmid encoded *ccoNOQP* operon (see Methods for details). The resulting strain (MT101C, or ME127C) had cytochrome *c* oxidase activity at comparable levels as our wild type strain (JS100), and the spectroscopic cytochrome *c* levels were enhanced in comparison with MT101 or ME127 (data not shown).

3.4. *Proton translocation*. Since genetic inactivation of the *ccb₃*-type cytochrome *c* oxidase produces strains (MT101 and ME127) that do not show detectable cytochrome *c* or TMPD oxidase activity, we conclude that cytochrome *ccb₃* is the sole cytochrome *c* oxidase in the parent strain (JS100, Δaa_3). Washed and starved *R. sphaeroides* JS100 cells were incubated in a non-buffered medium in the presence of a reductant (TMPD/ascorbate or succinate). After anaerobiosis, proton translocation following a small pulse of O₂ was determined by previously reported methods [23-25].

Fig. 5A shows an experiment with TMPD/ascorbate as electron donor. The addition of O₂ first induces fast release of protons to the extent of 1.1-1.6 H⁺/e⁻ (Table 2). On subsequent anaerobiosis there is a slow decay of the pH trace to an equilibrium, which corresponds to an overall consumption of 0.5 H⁺/e⁻ in the reaction. In the presence

of the uncoupling agent carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) the decay is much faster, but the equilibrium position is unchanged. In this type of experiment the O₂ pulse might activate oxidation of endogenous substrates by cytochrome *bb*₃-type quinol oxidase despite starvation of the cells. However, the observation of an overall consumption of 0.5 H⁺/e⁻ excludes significant contribution from quinol oxidase activity, showing that ascorbate is the electron donor. We conclude, therefore, that this experiment measures the activity of the *cbb*₃ enzyme alone. After subtraction of the proton release due to ascorbate oxidation from the extent of proton ejection after the O₂ pulse, we arrive at an observed proton translocation quotient of 0.6-1.1 H⁺/e⁻. This result strongly suggests that the *cbb*₃-type oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* functions as a proton pump much like the major enzymes of the heme-copper oxidase family.

In similar experiments with succinate as substrate (Fig.5B, Table 2), we observe H⁺/e⁻ ratios of proton ejection in the range of 2.7-3.1 H⁺/e⁻. This ratio fell to values below 2.0 in the presence of the cytochrome *bc*₁-complex inhibitor myxothiazol. Succinate is exclusively oxidized via the quinol oxidase with myxothiazol present, and the expected H⁺/e⁻ ratio is 2 [22, 32]. In the absence of myxothiazol virtually all electron flux occurs via the *bc*₁-complex (and cytochrome *cbb*₃), as in the case of *P. denitrificans* [22, 23]. This is possibly due to a higher affinity of the *bc*₁-complex than the quinol oxidase for ubiquinol. Since the H⁺/e⁻ quotient of proton release is 2 for the *bc*₁-complex, we may conclude that cytochrome *cbb*₃ pumps protons with a H⁺/e⁻ ratio close to unity.

5. Discussion.

The *ccoNOQP* gene cluster from *R. sphaeroides* was cloned and sequenced and in the current work is demonstrated to encode the *cbb₃*-type cytochrome *c* oxidase that has been observed spectroscopically in photosynthetically grown cells, and purified from a strain from which the *aa₃*-type oxidase has been deleted [1]. Many of the features predicted from the sequence correspond with those previously found by biochemical characterization of the purified enzyme.

The cluster seems to be organized as an operon based on the following criteria: (I) close physical proximity of the ORF's, (II) the presence of just one potential transcription termination site at the end of *ccoP*, (III) the loss of cytochrome *cbb₃* expression by genetic interruption of the gene cluster, and (IV) the fact that *fixNOQP* or *ccoNOQP* clusters from other bacteria appear to be regulated as operons [10, 19, 31, 33].

Alignments of all the *cbb₃*-type oxidase sequences reported so far (Fig.4), indicate that the subunits with a substantial degree of conservation are those encoded by the *ccoN/fixN* and *ccoO/fixO* genes (25% and 24%, respectively). The degree of conservation among the CcoP subunits is lower (9.7%) and the CcoQ subunits are the least conserved (1.3%). These values seem to reflect the significance of each subunit. Zufferey et al., [31] have shown that the CcoN and CcoO polypeptides are essential for the assembly and function of the oxidase complex. In that study, an in-frame deletion of the *ccoP* gene gave rise to the assembly of a partially active CcoN-CcoO complex. The CcoQ subunit seems not to be important for the assembly or function of the oxidase complex [31]. This

agrees with the high activity found for the purified *cbb*₃-type enzyme of *R. sphaeroides*, which appears to lack the subunit encoded by *ccoQ* [1]. However it cannot be excluded that subunit CcoQ could be part of the oxidase in sub-stoichiometric amounts, as previously suggested [31], or that could have a role in the expression of the complex, or in activity regulation.

The ability of the *cbb*₃-type oxidases to pump protons has been subject of discussion. It has been reported that maximal rates of oxidative phosphorylation in *P. denitrificans* were found only in the presence of cytochrome *aa*₃ [34, 35]. Both growth yield [36] and some proton translocation measurements [5, 37, 38] were interpreted to suggest that *P. denitrificans* alternative cytochrome c oxidase (i.e. of *cbb*₃-type) is not a proton pump.

However, Raitio and Wikström [22] found that the *cbb*₃ oxidase in *P. denitrificans* does pump protons during oxidation of succinate, while proton translocation linked to oxidation of TMPD/ascorbate appears very poor. More recently, de Gier et al. [28] reported very similar results. In agreement with these reports, we show here that the *R. sphaeroides* cytochrome *cbb*₃ readily translocate protons during succinate oxidation. We also found that, in this organism, proton translocation is also observed with TMPD/ascorbate as substrate. The reason for this difference is presently unknown. It could be due to the presence of another O₂-consuming enzyme in *P. denitrificans* that accepts electrons from TMPD/ascorbate system, but not from succinate [22]. Alternatively, it could be due to a more subtle phenomenon related to the mechanism of proton translocation in the *cbb*₃-type enzymes. One may speculate that the proton

translocation mechanism in some of these enzymes could be unusually sensitive to controlled redox potential at the donor site. Sufficient control may be achieved only if electrons are fed into the enzyme via the cytochrome bc_1 -complex, but not when fed via the TMPD/ascorbate system. On the other hand, our present finding of proton translocation with TMPD/ascorbate in the *Rhodobacter sphaeroides* cbb_3 enzyme, and its strong homology to the enzyme from *Paracoccus denitrificans*, does not seem to favor explanations of this kind.

Both the hydropathy profile and the conservation of the histidine residues that serve as ligands to heme, iron, and Cu_B in subunit I suggest that the general architecture of the cbb_3 -type oxidases is similar to that of the more traditional cytochrome c oxidases, despite the low level of sequence similarity. This subunit (CcoN) therefore probably contains the low spin heme b as well as the heme b_3 - Cu_B binuclear center. The Cu_A center of the traditional cytochrome c oxidases is probably replaced functionally by the membrane bound c -type cytochromes, which are likely to transfer electrons to the binuclear site via the low spin heme b .

More interesting, perhaps, is that the cbb_3 -type oxidases lack several residues that have been shown to be key components of the proton translocating mechanism in the more conventional heme-copper oxidases. For example, none of the otherwise very highly conserved residues of subunit I, K265, Y244, D91 and E242 (bovine oxidase numbering) are conserved in the cbb_3 -type enzymes. Yet, the present work clearly confirms the proton translocating property of the cbb_3 -type enzyme. Two different scenarios may be considered to explain this problem. On one hand, many of the

mentioned residues have been implicated in passive proton transfer pathways, either leading to the binuclear center or to the molecular pump machinery, which is still elusive. Hence, the basic molecular mechanism of the proton pump could still be the same in all heme-copper oxidases, while the structural support from the protein for passive proton transfer pathways could differ. There are already reports suggesting that bound water molecules may be essential in such pathways [39, 40]. This scenario would lead to a direct role of the metal cofactors and their ligands in a universal proton-pumping mechanism [41]. The other extreme scenario is, of course, that the mechanistic principle is different in the *cbb₃*-type enzymes. It is for this reason that both functional and structural research on the *cbb₃*-type oxidases should be encouraged.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. S. Kaplan and Dr. J. Zeilstra-Ryalls (Department of Microbiology and Molecular Genetics, Medical School, The University of Texas Health Science Center, Houston) for the plasmids and sequence information, and Hoffman-La Roche for the kind gift of ubiquinone-1. This work was supported by a grant from The Academy of Finland, and by grants from the National Institutes of Health (HL16101 to R.B.G.) and the Human Frontiers of Science Program (R.G.B.). M.T.-C. was supported in part by a DGAPA/PADEP fellowship and by a grant from the Center of International Mobility of Finland. We thank Professor Heliodoro Celis at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for essential support, guidance, and facilities provided to M.T.-C. during her work at UNAM.

References

- 1 J. A. García-Horsman, E. Berry, J. P. Shapleigh, J. O. Alben and R.B. Gennis. A novel cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* that lacks Cu_A, *Biochemistry* 33 (1994) 3113-3119.
- 2 J. P. Shapleigh, J. Hill and R.B. Gennis. Spectroscopic and Genetic Evidence for Two Heme-Cu-Containing Oxidases in *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Bacteriol* 174 (1992) 2338-2343.
- 3 C. Yun, R. Beci, A. R. Crofts, S. Kaplan and R.B. Gennis. Cloning and DNA sequencing of the *fbc* operon encoding the cytochrome *bc*₁-complex from *Rhodobacter sphaeroides*: characterization of *fbc* deletion mutants and complementation by a site-specific mutational variant, *Eur. J. Biochem.* 194 (1990) 399-411.
- 4 R.B. Gennis, R. P. Casey, A. Azzi and B. Ludwig. Purification and characterization of the cytochrome *c* oxidase from *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Eur. J. Biochem.* 125 (1982) 189-195.
- 5 J.W.L. de Gier, M. Lübben, W.N.M. Reijnders, C. T. Tipker, D. J. Slotboom, R.J.M. van Spanning, A.H. Stouthamer and J. van der Oost. The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*, *Mol. Microbiol* 13 (1994) 183-196.
- 6 K.A. Gray, M. Grooms, H. Myllykallio, C. Moomaw, C. Slaughter and F. Daldal. *Rhodobacter capsulatus* contains a novel *cb*-type cytochrome *c* oxidase without a Cu_A center, *Biochemistry* 33 (1994) 3120-3127.
- 7 K. Nagata, S. Tsukita, T. Tamura and N. Sone. A *cb*-type cytochrome-*c* oxidase terminates the respiratory chain in *Helicobacter pylori*, *Microbiology* 142 (1996) 1757-1763.
- 8 O. Preisig, R. Zufferey, L. Thöny-Meyer, C.A. Appleby and H. Hennecke. A high-affinity *cbb*₃-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*, *J. Bacteriol* 178 (1996) 1532-1538.

- 9 P. A. Kaminski, C. L. Kitts, Z. Zimmerman and R.A. Ludwig. *Azorhizobium caulinodans* uses both cytochrome *bd* (quinol) and cytochrome *cbb₃* (cytochrome *c*) terminal oxidases for symbiotic N₂ fixation, J. Bacteriol 178 (1996) 5989-5994.
- 10 L. Thöny-Meyer, C. Beck, O. Preisig and H. Hennecke. The *ccoNOQP* Gene Cluster Codes for a *cb*-Type Cytochrome oxidase that Functions in Aerobic Respiration of *Rhodobacter capsulatus*, Mol. Microbiol 14 (1994) 705-716.
- 11 J. M. Visser, G. A. H. de Jong, S. de Vries, L. A. Robertson and J.G. Kuenen. *cbb₃*-type cytochrome oxidase in the obligately chemolithoautotrophic *Thiobacillus* sp. W5, FEMS Microbiol. Lett. 147 (1997) 127-132.
- 12 J. A. Garcia-Horsman, B. Barquera, J. Rumbley, J. Ma and R. B. Gennis. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases, J. Bacteriol 176 (1994) 5587-5600.
- 13 S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig and H. Michel. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, Nature 376 (1995) 660-669.
- 14 T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å, Science 269 (1995) 1069-1074.
- 15 T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å, Science 272 (1996) 1136-1144.
- 16 I. Zickermann, O.S. Tautu, T. A. Link, M. Korn, B. Ludwig and O.-M. H. Richter. Expression studies on the *ba₃* quinol oxidase from *Paracoccus denitrificans*. A *bb₃* variant is enzymatically inactive., Eur. J. Biochem. 246 (1997) 618-624.

- 17 J. Hill, V. C. Goswitz, M. Calhoun, J. A. Garcia-Horsman, L. Lemieux, J. O. Alben and R. B. Gennis. Demonstration by FTIR that the *bo*-type ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* contains a heme-copper binuclear center similar to that in cytochrome *c* oxidase and that proper assembly of the binuclear center requires the *cyoE* gene product, *Biochemistry* 31 (1992) 11435-11440.
- 18 K. Saiki, T. Mogi and Y. Anraku. Heme O biosynthesis in *Escherichia coli*: the *cyoE* gene in the cytochrome *bo* operon encodes a protoheme IX farnesyltransferase, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 189 (1992) 1491-1497.
- 19 O. Preisig, D. Anthamatten and H. Hennecke. Genes for a Microaerobically Induced Oxidase Complex in *Bradyrhizobium japonicum* are Essential for a Nitrogen Fixing Endosymbiosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 3309-3313.
- 20 J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 21 J. P. Shapleigh and R.B. Gennis. Cloning, Sequencing and Deletion from the Chromosome of the Gene encoding Subunit I of the *aa₃*-Type Cytochrome *c* Oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*, *Mol. Microbiol* 6 (1992) 635-642.
- 22 M. Raitio and M. Wikström. An Alternative Cytochrome Oxidase of *Paracoccus denitrificans* Functions as a Proton Pump, *Biochim. Biophys. Acta* 1186 (1994) 100-106.
- 23 A. Puustinen, M. Finel, M. Virkki and M. Wikström. Cytochrome *o* (*bo*) is a proton pump in *Paracoccus denitrificans* and *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* 249 (1989) 163-167.
- 24 A. Puustinen, M. Finel, T. Haltia, R.B. Gennis and M. Wikström. Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*, *Biochemistry* 30 (1991) 3936-3942.
- 25 J.W. Thomas, A. Puustinen, J. O. Alben, R.B. Gennis and M. Wikström. Substitution of asparagine for aspartate-135 in subunit I of the cytochrome *bo*

- ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* eliminates proton-pumping activity, *Biochemistry* 32 (1993) 10923-10928.
- 26 J.H. Zeilstra-Ryalls and S. Kaplan. Aerobic and anaerobic regulation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: the role of the *fnrL* gene, *J. Bacteriol* 177 (1995) 6422-6431.
- 27 J.H. Zeilstra-Ryalls and S. Kaplan. Control of *Hema* expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: Regulation through alterations in the cellular redox state, *J. Bacteriol* 178 (1996) 985-993.
- 28 J. W. de Gier, M. Schepper, W. N. M. Reijnders, S. J. van Dyck, D. J. Slotboom, A. Warne, M. Saraste, K. Krab, M. Finel, A. H. Stouthamer, R. J. M. van Spanning and J. van der Oost. Structural and functional analysis of aa3-type and cbb3-type cytochrome c oxidases of *Paracoccus denitrificans* reveals significant differences in proton-pump design, *Mol. Microbiol* 20 (1996) 1247-1260.
- 29 K. Mandon, P.A. Kaminski and C. Elmerich. Functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*., *J. Bacteriol* 176 (1994) 2560-2568.
- 30 C.A. Varotsis, G.T. Babcock, J. A. Garcia-Horsman and R.B. Gennis. Resonance Raman Spectroscopy of the Heme Groups of Cytochrome *cbb3* in *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 16817-16820.
- 31 R. Zufferey, O. Preisig, H. Hennecke and L. Thöny-Meyer. Assembly and function of the cytochrome *cbb3* oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum*., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 9114-9119.
- 32 M. Lauraeus and M. Wikström. The terminal quinol oxidases of *Bacillus subtilis* have different energy conservation properties, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 11470-11473.
- 33 A. Schlüter, S. Rüberg, M. Krämer, S. Weidner and U.B. Priefer. A homolog of the *Rhizobium meliloti* nitrogen fixation gene *fixN* is involved in the production of microaerobically induced oxidase activity in the phytopathogenic bacterium *Agrobacterium tumefaciens*, *Mol. Gen. Genet.* 247 (1995) 206-215.

- 34 F. C. Boogerd, H.W. van Verseveld and A. H. Stouthamer. Respiration-driven proton translocation with nitrite and nitrous oxide in *Paracoccus denitrificans*, *Biochim. Biophys. Acta* 638 (1981) 181-191.
- 35 H.W. van Verseveld and G. Bosma. The respiratory chain and energy conservation in the mitochondrion-like bacterium *Paracoccus denitrificans*, *Microbiol. Sci.* 4 (1987) 329-333.
- 36 A.H. Stouthamer. Metabolic regulation including anaerobic metabolism in *Paracoccus denitrificans*, *J. Bioenerg. Biomem.* 23 (1991) 163-185.
- 37 J. van der Oost, A. P. N. de Boer, J. W. L. De Gier, W. G. Zumft, A. H. Stouthamer and R. J. M. van Spanning. The Heme-Copper Oxidase Family Consists of Three Distinct Types of Terminal Oxidases and is Related to Nitric Oxide Reductase, *FEMS Microbiol. Lett.* 121 (1994) 1-10.
- 38 R. J. M. van Spanning, A. P. N. de Boer, W. N. M. Reijnders, J.-W. L. de Gier, C. O. Delorme, A. H. Stouthamer, H. V. Westerhoff, N. Harms and J. van der Oost. Regulation of Oxidative Phosphorylation: The Flexible Respiratory Network of *Paracoccus denitrificans*, *J. Bioenerg. Biomem.* 27 (1995) 499-512.
- 39 S. Riistama, G. Hummer, A. Puustinen, R. B. Dyer, W. H. Woodruff and M. Wikström. Bound water in the proton translocation mechanism of the haem-copper oxidases, *FEBS Lett.* 414 (1997) 275-280.
- 40 I. Hofacker and K. Schulten. Oxygen and proton pathways in cytochrome c oxidase, *Proteins* 30 (1998) 100-107.
- 41 M. Wikström, A. Bogachev, M. Finel, J.E. Morgan, A. Puustinen, M. Raitio, M. Verkhovskaya and M. I. Verkhovsky. Mechanism of proton translocation by the respiratory oxidases. The histidine cycle., *Biochim. Biophys. Acta* 1187 (1994) 106-111.
- 42 C. Yanisch-Perron, J. Vieira and J. Messing. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* 33 (1985) 103-119.
- 43 J. A. Gough and N. E. Murray. Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules, *J. Mol. Biol.* 166 (1983) 1-19.

- 44 U. B. Priefer, R. Simon and A. Pühler. Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions, *J. Bacteriol* 163 (1985) 324-330.
- 45 G. Cohen-Bazire, W.R. Siström and R.Y. Stainer. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria, *J. Cell. Comp. Physiol.* 49 (1957) 25-68.
- 46 N. T. Keen, S. Tamaki, D. Kobayashi and D. Trollinger. Improved broad- host-range plasmids for DNA cloning in Gram- negative Bacteria, *Gene* 70 (1988) 191- 197.
- 47 J. Vieira and J. Messing. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers, *Gene* 19 (1982) 259-268.

Fig.1. Physical map of the *R. sphaeroides* *ccoNOQP* cluster and sequence strategy. Broken lines indicate the fragments sub-cloned for sequencing. The headed arrows indicate sequences obtained. The places where the kanamycin-resistance gene was inserted (Kan*) or replaced for internal sequence (Kan**) are shown. See text for details.

Fig. 2. The complete nucleotide sequence of the *ccoNOQP* cluster of *R. sphaeroides*. The deduced amino-acid sequence from the four ORF's (corresponding to *ccoN*, *O*, *Q* and *P* genes) is shown, as well as partial sequence of Rs-ORF277, which is transcribed in opposite direction to the *ccoNOQP* cluster. Bold letters indicate a potential binding site for an *Fnr/FixK*-like protein. The opposite arrows indicate a putative factor-independent transcription terminator at the end of *ccoP*. Possible Shine-Dalgarno ribosome-binding sites (SD) are shown upstream of each ORF by dotted underline. Internal sequencing primers sequences are indicated by broken arrows.

Fig. 3. Proposed two-dimensional model of the *Rhodobacter sphaeroides* CcoN subunit. The model was derived from hydropathy plots of the CcoN/FixN consensus sequence, and from the inspection of crystal structure of cytochrome *aa₃*. Totally conserved residues among CcoN/FixN sequences are shaded. Sequence numbers are indicated for the totally conserved histidines and acidic residues. Putative metal ligands are indicated by bold circles.

Fig. 4. Amino acid sequence alignments for the CcoN/FixN, CcoO/FixO, CcoQ/FixQ and CcoP/FixP subunits. Fully conserved residues are bold faced. Potential transmembrane helices are underlined. Putative histidine ligands for the low spin heme and the binuclear center metals are indicated by stars. Amino acid residues probably involved in the binding of the hemes *c* in CcoO/FixO and CcoP/FixP are also indicated by stars. (GenBank accession numbers: *A. tumefaciens*, Z46239; *R. capsulatus*, X80134; *B. japonicum* L07487; *A. caulinodans*, X74410; *R. meliloti*, Z21854; *R. etli*, U76906; *R. leguminosarum*, Z70305; *P. denitrificans*, U34353; *R. sphaeroides*, U58092; *H. pylori*, AE000536).

Fig.5. Proton translocation in *Rhodobacter sphaeroides* JS100 whole cells. Washed and starved cells were incubated to anaerobiosis in a medium containing 100 mM KSCN, 100 mM KCl, 2 μ M of myxothiazol, 15 μ M rotenone, and 10 μ M TMPD/5 mM K⁺-ascorbate (A.), or 15 mM succinate (B). Arrows indicate the addition of oxygen saturated water (O₂) or anaerobic HCl solution (H⁺). Myxothiazol was added only when the electron donors were TMPD/ascorbate. The CCCP was added to a final concentration of 6 μ M.

Table 1. Strains and plasmids used in this work.

Strain/ Plasmid	Relevant characteristics	Ref./Source
<u>Strain</u>		
<i>E. coli</i>		
JM101	SupE, thi, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI ^q Z ΔM15]	[42]
NM522	hsdΔ5Δ[lac.pro]F'lacI ^q lacZΔM15Pro+	[43]
S-17-1	Sm ^r . Modified RP4 plasmid integrated into the genome of <i>E. coli</i> 294. <i>RecA</i>	[44]
<i>R. sphaeroides</i>		
Ga	2.4.1 derivative with a mutation in carotenoid biosynthesis.	[45]
JS100	Ga derivative, ΔctaD::sm/sp	[21]
MT101	JS100 derivative, ccoN::Kan	This work
ME127	JS100 derivative, ΔccoNO::Kan	This work
<u>Plasmid</u>		
pUI1957	pRK-415 derivative containing a 8-9 kbp <i>Bam</i> HI <i>R. sphaeroides</i> DNA fragment including the complete <i>ccoNOQP</i> cluster and surrounding sequences.	[26]
pUI1943	pBluescript II SK+/- derivative containing a 2.2 kbp <i>Pvu</i> II <i>R. sphaeroides</i> DNA fragment that includes the <i>ccoO</i> gene and a fragment of <i>ccoN</i> .	[26]
pT7PS1.7	pT7T319 derivative containing a 1.7 kbp <i>Pst</i> I- <i>Sal</i> I <i>R. sphaeroides</i> DNA fragment that includes the 5' region of <i>ccoN</i> .	This work
pT7SP0.85	pT7T319 derivative containing a 0.85 kbp <i>Sal</i> I- <i>Pst</i> I <i>R. sphaeroides</i> DNA fragment that includes <i>ccoQ</i> and a fragment of <i>ccoP</i> .	This work
pT7PE0.8	pT7T319 derivative containing a 0.8 kbp <i>Pst</i> I- <i>Eco</i> RI <i>R. sphaeroides</i> DNA fragment that includes the 3' region of <i>ccoP</i> .	This work
pRK-415	Tc ^r , oriT lacZ.	[46]
pSUP202	mob, Cm ^r , Amp ^r , Tc ^r .	[44]
pUC4K	pUC18 derivative Amp ^r , Kn ^r , source of kanamycin resistant gene.	[47]
pBluescript II SK+/-	Amp ^r , sequencing vector with T3 and T7 promoters.	Stratagene, (La Jolla, California)
pT7-1943	pT7T319 derivative containing the <i>Pst</i> I- <i>Pvu</i> II fragment derived from pUI1943.	This work
pT7-1943Kan	pT7-1943 derivative where the kanamycin gene was introduced in the <i>Sal</i> I site of <i>ccoN</i> gene (see Fig.1).	This work
pSUP1943Kan	pSUP202 derivative containing the <i>Pst</i> I- <i>Eco</i> RI fragment derived from pT7-1943Kan.	This work
pT7PSE3.4	pT7PS1.7 derivative containing a 1.7 kbp <i>Sal</i> I- <i>Eco</i> RI fragment that includes the <i>ccoQ</i> and <i>P</i> genes from <i>R. sphaeroides</i> .	This work
pT7EPSE3.4	pT7PSE3.4 derivative where an <i>Eco</i> RI site was introduced by an oligonucleotide.	This work
pT7EPSE-Kan	pT7EPSE3.4 derivative where the kanamycin cartridge was introduced into the <i>Sal</i> I site.	This work
pSUP-EPSE-Kan	pSUP202 derivative where the 4.6 kbp <i>Eco</i> RI- <i>Eco</i> RI fragment from pT7EPSE-Kan was subcloned.	This work

Table 2. Proton translocation in *Rhodobacter sphaeroides* cells. See Fig.5 legend and Material and Methods section for experimental details.

Substrate:	H^+/e^- *	
	Ga (wild Type)	JS100 ($\Delta a a_3$)
Succinate	2.6-3.1	2.7-3.1
Succinate + Myxothiazol	1.7-1.9	1.8-2.0
Ascorbate/TMPD**	0.9-1.2	0.6-1.1

* Range obtained from 4-6 independent experiments.

**Corrected for the release of 0.5 H^+/e^- by ascorbate oxidation.

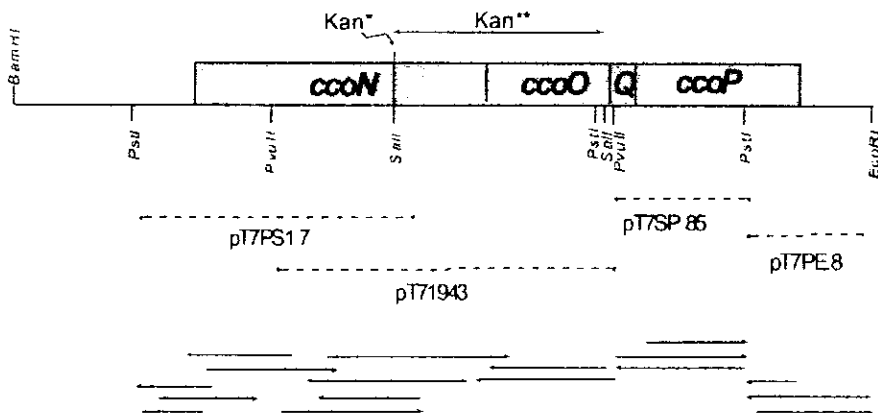
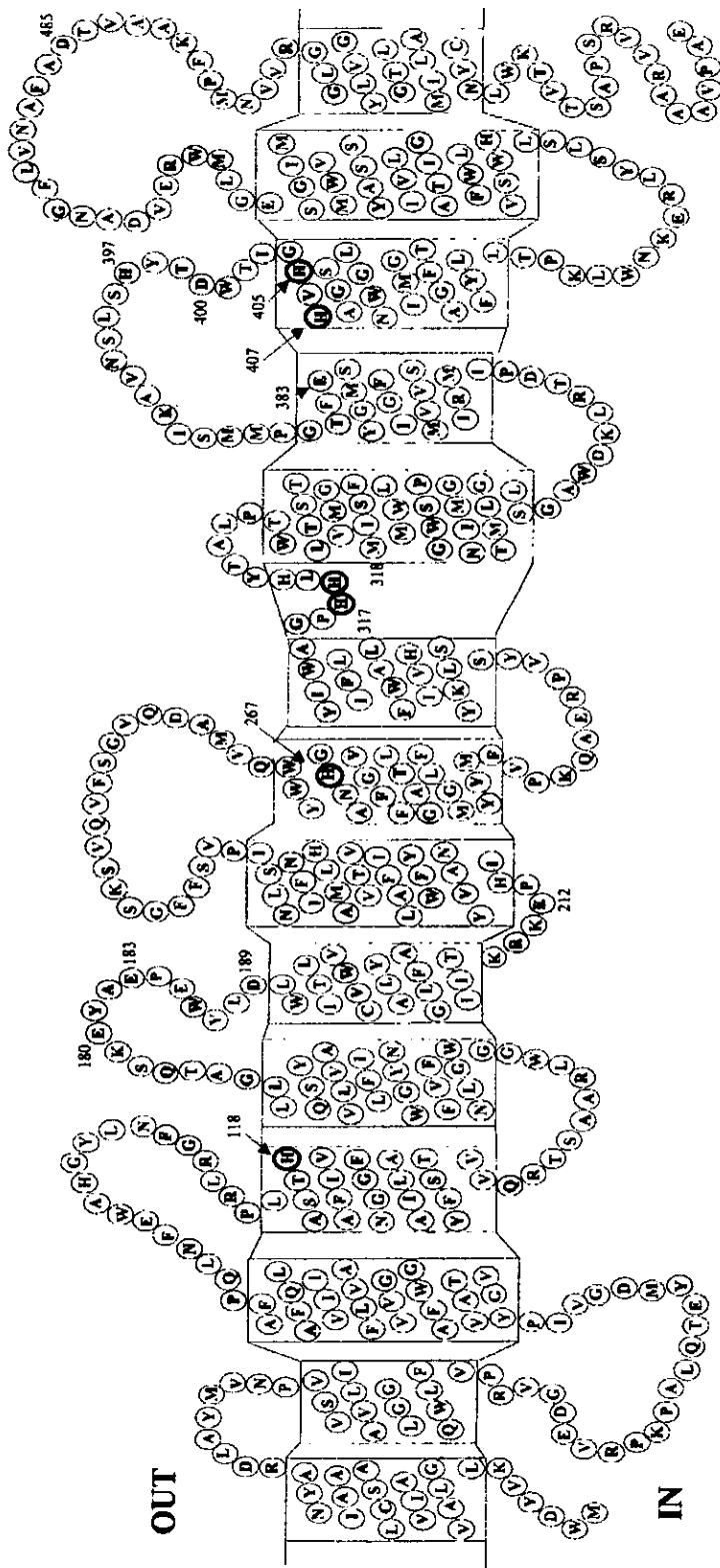


Figure 1.



I II III IV V VI VII VIII IX X XI XII

CcoN/FixN

Agrobacterium tumefaciens	MYTLETADR-ALGA FPALIGAFAH----	DBLFA AHMVLFFTLVSTL LLRRV--SFLPPVA GPPC----	RRTYFDE
Rhizobium melliloti	MKHTVBAVL-SVGA FLALVAGLQAO----	DRLFG AHMVLFPALLAGTL VLBRV---DFRPAV AGHGD-	RRRSYFDE
Paracoccus denitrificans	---MLDTIKLALGT IAVLAIAANTARP----	DDLAY LUNALLIKLAAANGMF LRVLRQMGNE-QPAL	EPHP-----ETQFMD
Rhodobacter capsulatus	---MNDVYKVALGV VAAIAAASQAR----	DLPYM VNVVEVLSAVIALI WFLYNG--DFPQK	-----DEYFDG
Rhodobacter sphaeroides	---MNDVYKVALGV IALCSAIAANTAR----	DLAYM VNVSVILVAGGLP MVDPRVG-DEVRPK	AL-----QTEYMDG
Azorhizobium caulinodans	MSI-VQTPAKMTGG HGLGLVPAALGFFS	IYVAAKATPE--YA FHALFAASIAIATF	VIGNRYM--D-RPAE LPPQTIDOKPFRMA
Bradyrhizobium japonicum	MS-QP8ISKMTIGE SGLAVVFAATFLCV	IAAKAL----DAPLA FHALSAAASVAATF	LVNRYP--E-RPAE LPPAEIKRPNRYM8
Rhizobium etli	MYTETMVIIV-AAP LALLAAAFAN----	DHLLFA VMHGLICLIVACTL LLVRNV--	DFSPG QQRKTEL--TVCDE
Rhizobium leguminosarum	MYTETMVI-AVAA FLALIGAFAH----	DHLLFA VMHGLICLIVAGNA LLVRNV--	DFSPOP T-ASRYL--SYFDE
Helicobacter pylori	-----I-----	-----MQ--ENVP--	-----LSYDYS
Agrobacterium tumefaciens	VYKYGMATVPMGVV GFLVGVVALQLAFP	DLMIAPY----FNFG RMLPETSAVIFAP-	-GGNALIATS-FY-V VQRTCRARLFGG----
Rhizobium melliloti	VYKYGMATVPMGVV GFLVGVVVALQLAFP	ELNVEPM----FNFG RMLPETSAVIFAP-	-GGNALIATS-FY-V VQRTSARLFGG----
Paracoccus denitrificans	VVRAGVIATAPMGV GFLVGVVIAFQLAFP	ALMLSDIWGYTFNG KMLPETSAVIFAP-	-GGNALIATS-FY-V VQRTSARLFGG----
Rhodobacter capsulatus	VIRAGVIATAPMGV GFLVAVVIAFQLAFP	ALMLRFG-MGMLNFG RMLPETSAVIFAP-	-GGNALIA-SAPY-V VQRTSARLFGGT----
Rhodobacter sphaeroides	VIPYGVVATAPMGV GFLVAVVIAFQLAFP	OLMFEWA-HGYLAFG RMLPETSAVIFAP-	-GGNALIATS-FY-V VQRTSARLFGG----
Azorhizobium caulinodans	PVKQTLAVPMGIA GFLIGVITIALQWAP	LRFMDLP---WISFG RMLPETSAVIFAP-	-GGNVLATS-FY-V VQRTSHARLAGY----
Bradyrhizobium japonicum	PIKFSFMMWPMGIA GFLVGLLIIASQLAWP	ALMFDLP---WISFG RMLPETSAVIFAP-	-GGNVLATS-FY-V VQKSCRVLAGD----
Rhizobium etli	VIRYGLIATVPMGV GFLVGVVIALQLAFP	DLMIAPY----WVFG RMLPETSAVIFAP-	-GGNALIMTS-FY-V VQRTCRARLFGG----
Rhizobium leguminosarum	VIRYGLIATVPMGVV GFLVGVVIALQLAWP	DLMIAPY LNFQ RMLPETSAVIFAP-	-GGNALIMTS-FY-V VQRTCRARLFGG----
Helicobacter pylori	ISKFLYAMVGFIV GMLIGIVIAFELSFP	NLMY--IAGEYGFQ RMLPETSAVIYGF	LOGG---IWAS-WYI GQRVLIKTYHQHPFL
Agrobacterium tumefaciens	-NLGNFVPMGNLFI IMAATGYLIGITQGR	ETABPEWYDMLTI VWVAYLATFLGTLT	RKEPHIVANNFTLS FIVTIAMLHVNNLA
Rhizobium melliloti	-DLGNFVPMGNLFI VLAASGYLIGITQSR	ETABPEWYDMLTI VWVAYLVAFLGTLK	RKEPHIVANNFTLS FIVTIAMLHVNNLA
Paracoccus denitrificans	-NANFVPMGNLFI VLAATGYLIGITQSK	ETABPEWYDMLTI VWVYLAFLGTLTK	RKEPHIVANNFTLS FIVTIAMLHVNNLA
Rhodobacter capsulatus	-ALGNFVPMGNLFI VTAATGYLIGITQSK	ETABPEWYDMLTI VWVYLAFLGTLTK	RKEPHIVANNFTLS FIVTIAMLHVNNLA
Rhodobacter sphaeroides	-NLGNFVPMGNLFI VLVAGSYLIGITQSK	ETABPEWYDMLTI VWVYLAFLGTLTK	RKEPHIVANNFTLS FIVTIAMLHVNNLA
Azorhizobium caulinodans	-LAPFVPMGNLFI VIAGTYLIGITQSK	ETABPEWYDMLTI VWYTFIVLIGTVLK	FULTIATVHLGKQAA
Bradyrhizobium japonicum	-LAPFVPMGNLFI LVAGTYLIGITQSK	ETABPEWYDMLTI VWVYLLVPLATLTK	RKEPHIVANNFTLS FIVTIAMLHVNNLA
Rhizobium etli	-TLANFVPMGNLFI VMAATGYLIGITQSR	ETABPEWYDMLTI VWVAYLVAFLGTLK	RKEPHIVANNFTLS FIVTIAMLHVNNLA
Rhizobium leguminosarum	-SLANFVPMGNLFI VMAATGYLIGITQAR	ETABPEWYDMLTI VWVAYLVAFLGTLK	RKEPHIVANNFTLS FIVTIAMLHVNNLA
Helicobacter pylori	KIVGLLHFWLWILL ILGVLSIFLAGLQSK	ETABPEWYDMLTI VWVAYLVAFLGTLK	RKEPHIVANNFTLS FIVTIAMLHVNNLA

Figure 4.

Agrobacterium tumefaciens
 Rhizobium meliloti
 Paracoccus denitrificans
 Rhodobacter capsulatus
 Rhodobacter sphaeroides
 Azorhizobium caulinodans
 Bradyrhizobium japonicum
 Rhizobium etli
 Rhizobium leguminosarum
 Helicobacter pylori

Agrobacterium tumefaciens
 Rhizobium meliloti
 Paracoccus denitrificans
 Rhodobacter capsulatus
 Rhodobacter sphaeroides
 Azorhizobium caulinodans
 Bradyrhizobium japonicum
 Rhizobium etli
 Rhizobium leguminosarum
 Helicobacter pylori

Agrobacterium tumefaciens
 Rhizobium meliloti
 Paracoccus denitrificans
 Rhodobacter capsulatus
 Rhodobacter sphaeroides
 Azorhizobium caulinodans
 Bradyrhizobium japonicum
 Rhizobium etli
 Rhizobium leguminosarum
 Helicobacter pylori

VII

VI

IX

VIII

XI

XII

VPVS-FLGVK-----SYSAPSGVQAAALIQW YGCHNAVGFLLTAGF LGWYFFIPKQVNRP VYSTRLSIIHFMAII FMYTWAGPHEHLRYTA 322
 VPVS-FLGSK-----SYSAPSGVQDALIQW YGCHNAVGFLLTAGF LAMWYFFIPKQVNRP VYSTRLSIIHFMAII FMYTWAGPHEHLRYTA 322
 IPVSLFG-SK-----SVQLFSGVQDAMIQW YGCHNAVGFLLTAGF LGWYFFIPKQABRP VYSTRLSIIHFMAII FLYTWAGPHEHLRYTA 327
 VPVSIFG-TK-----SVQLMAGVQDAMIQW YGCHNAVGFLLTAGF LGWYFFIPKQABRP VYSTRLSIIHFMAII FLYTWAGPHEHLRYTA 320
 IPVS-IFGSK-----SVQVFSGVQDAMIQW YGCHNAVGFLLTAGF LGWYFFIPKQABRP VYSTRLSIIHFMAII FLYTWAGPHEHLRYTA 323
 IPVSIFB-PK-----SYIVNSGVQDAMIQW YGCHNAVGFLLTAGF LALMYYFFIPKQABRP VYSTRLSIIHFMAII FLYTWAGPHEHLRYTA 337
 LPVSAFG-SK-----SYVAMGGVQDAMIQW YGCHNAVGFLLTAGF LAMTYFFIPKQABRP IYSTRLSIIHFMAII FLYTWAGPHEHLRYTA 336
 VPAS-FLGSK-----SYSLFSGVQDALIQW YGCHNAVGFLLTAGF LGWYFFIPKQABRP VYSTRLSIIHFMAII FMYTWAGPHEHLRYTA 321
 VPYTY-FVADMGSVWH SISRYSGSDNALIQW YGCHNAVAVFTTSGV IGTIYFFIPKESQOP IFSYKTLPLFSVSLM FLYTWAGPHEHLRYST 275

LPDWAQTLGAVPFSIM LMPSPWCGMIBGLMT LSGAWDKIRTDPIVR MVMVAVAFYGMATPFGPMSIKAVNSLSHSEY TDWTLGHRVBSGALGW 412
 LPDWAQTLGAVPFSIM LMPSPWCGMIBGLMT LSGAWDKIRTDPIVR MVMVAVAFYGMATPFGPMSIKAVNSLSHSEY TDWTLGHRVBSGALGW 412
 LPDWAQTLGAVPFSII LMPSPWCGMIBGLMT LSGAWDKIRTDPIIR MVMVAVAFYGMATPFGPMSIKAVNSLSHSEY TDWTLGHRVBSGALGW 417
 LPDWAQTLGAVPFSI LMPSPWCGMIBGLMT LSGAWDKIRTDPIVR MVMVAVAFYGMATPFGPMSIKAVNSLSHSEY TDWTLGHRVBSGALGW 410
 LPDWAQTLGAVPFSIM LMPSPWCGMIBGLMT LSGAWDKIRTDPIIR MVMVAVAFYGMATPFGPMSIKAVNSLSHSEY TDWTLGHRVBSGALGW 413
 LPDWAQTLGAVPFSIM LMPSPWCGMIBGLMT LSGAWDKIRTDPIIR MVMVAVAFYGMATPFGPMSIKAVNSLSHSEY TDWTLGHRVBSGALGW 427
 LPDWAQTLGAVPFSIM LMPSPWCGMIBGLMT LSGAWDKIRTDPIVR MVMVAVAFYGMATPFGPMSIKAVNSLSHSEY TDWTLGHRVBSGALGW 426
 LPDWAQTLGAVPFSIM LMPSPWCGMIBGLMT LSGAWDKIRTDPIIR MVMVAVAFYGMATPFGPMSIKAVNSLSHSEY TDWTLGHRVBSGALGW 411
 LPDWAQTLGAVPFSIM LMPSPWCGMIBGLMT LSGAWDKIRTDPIIR MVMVAVAFYGMATPFGPMSIKAVNSLSHSEY TDWTLGHRVBSGALGW 411
 VEDWYQTLSSVPSV LILPSPWCGMIBGLMT MRCQWHLKESPLIK FLVLAQSTYMLSTLE GSIQAIKSVKALABF TDWTLGHRVBSGALGW 365

NGMITFGAIYYLTPK LMRORLYSLQLVNVH FWLALTLGIVVYAAVM WYAGIQOQALMWRREY DSOQFLVYSPASVYA ALFFYYVKBALGGML 502
 NGLITFGAIYYLTPK LMRERLYSLVNVNH FWLALTLGIVVYAAVM WYAGIQOQALMWRREY DSOQFLVYSPASVYA AMFFYYVKBALGGAL 502
 NGMITFGAIYYLTPR LMRERLYSLVNVH FWLALTLGIVVYAAVM WYAGIQOQALMWRREY DSOQFLVYSPASVYA AKFPMNVYKALGGVL 507
 NGMITFGAIYYLTPK LMRERLYSLVNVH FWLALTLGIVVYAAVM WYAGIQOQALMWRREY DSOQFLVYSPASVYA AKFPMNVYKALGGVL 500
 VAYISFGAIYYLTPK LMRERLYSLVNVH FWLALTLGIVVYAAVM WYAGIQOQALMWRREY DSOQFLVYSPASVYA AKFPMNVYKALGGVL 503
 VAYISFGAIYYLTPK LMRERLYSLVNVH FWLALTLGIVVYAAVM WYAGIQOQALMWRREY DSOQFLVYSPASVYA AKFPMNVYKALGGVL 517
 VGMITFGAIYYLTPK LMRERLYSLVNVH FWLALTLGIVVYAAVM WYAGIQOQALMWRREY DSOQFLVYSPASVYA AMIPYYVKBALGGAL 516
 VGMITFGAIYYLTPK LMRERLYSLVNVH FWLALTLGIVVYAAVM WYAGIQOQALMWRREY DSOQFLVYSPASVYA AMIPYYVKBALGGAL 501
 VGMITFGAIYYLTPK LMRERLYSLVNVH FWLALTLGIVVYAAVM WYAGIQOQALMWRREY DSOQFLVYSPASVYA AMIPYYVKBALGGAL 501
 VGMITFGAIYYLTPK LMRERLYSLVNVH FWLALTLGIVVYAAVM WYAGIQOQALMWRREY DSOQFLVYSPASVYA AMIPYYVKBALGGAL 454

Agrobacterium tumefaciens KSATDLHAQADP-NA DGAELLERYP-KAKV GDFDGRP----- 212
 Rhizobium meliloti NNAADLKAQADP-NA DSGSVEARYP-KAKL GDFDGD-PQRLTEND ALVAYLQMLGLTVDF STYDDAAGYR 243
 Paracoccus denitrificans AAGEDFRYQAAP-DA DASGLEERYP-GAQQ RNFDRR--PGVSEMD ALIAYLQVLGTWYDF STPEFDNRR- 241
 Rhodobacter sphaeroideus NAVADPFAQAMP-DA DTDGLLERYG-KAAV RNFDDQ--BELTEND ALISYQLVLTWYDF STFPQVASR- 241
 Rhodobacter capsulatus SAKADPVAQADP-NA DSTILLANGYGEKWI RNFDDQ--RFLTEND ALIAYLQVLGTWYDF KLYDMKANVR 243
 Azorhizobium caulinodans SAQDDLKIQATP-EA DADALQKRYP-KAQA RFDQGN-PGELTEND ALIAYLQVLGTWYDF KIYNEKANLR 246
 Bradyrhizobium japonicum NASADLKAQADPDNA GADAPNRYA-KAVV RNFDDG-TUTPTEND ALIAYLQMLGLTVDF ----- 234
 Rhizobium leguminosarum NABADMKAQADP-NA DTTALLARYP-KAKT GDFDGD-PAALTEND ALVSYLQMLGLTVDF STYDDATGYR 244
 Helicobacter pylori KLGVSVEARKAY-LE EAKKITADMKKRVL EALERG---EVLEIV ALIAYLNSLNSRIN ANQNAK---- 232

CcoQ/FixQ

Rhizobium meliloti -----METYTAMRHPA DSWGLLANTLFFLGV VFFIFRPGAKNAAQ ASVILPKED----- 50
 Paracoccus denitrificans -----MDRYFSLRELA DSWVLILLVVFVFGT IVFAFRFGFAAASR RGRGHLP----- 48
 Rhodobacter sphaeroideus -----MDYTSILRQPA DSNMLIVMTLFFVGV VFWAWRPRSREKQDE AASAIFRHEHTKPADD DPVSSDDARK- 67
 Rhodobacter capsulatus -----MDYHILREPA DSWAALLLTFLGA VINAFRPGSSKVVHDD IANIPFRHEDKPADH GRG----- 58
 Azorhizobium caulinodans ---MRETYMQLAGFA QTWGLVYFVGAFLCV CAYAYWPSKKKSFNE AAOIPLKED----- 51
 Bradyrhizobium japonicum MKAILLIDNLASGLV TTIWTTPVVAIFLAI IAVAFWRNKAAQDE AAKLPLREE----- 54
 Rhizobium leguminosarum -----METYTAMRHPA DSWALLMRAAPFVGV VFTLFRPGSKQTAKE AADIPLKDD----- 50
 Helicobacter pylori -----MMDLESRLGF AYAFPITLIFLFLYA YIFSMYRKQKKGIMD YERYGLALANDALED ELIEPRKHKVHDNGI KES 73

CcoP/FixP

Rhizobium meliloti -----MADK HGHVDFPS-----GVTG HEMDGIIBLNMPR 33
 Paracoccus denitrificans MADTDEHASQMPD NRIELERQADEAHK AKLILHPPENGDDPL HPPVFRPGATVVR DRUGRRRVVEVPSTG HSWDGIIEYDNLPLR 90
 Rhodobacter capsulatus -----MSKXP-----ITKKEVQTTG KOWDGIIEBLNTPLR 30
 Rhodobacter sphaeroideus -----MSVKP---TK QKPG-----EPPTG HSWDGIIEFNDMPR 32
 Azorhizobium caulinodans -----MSTSHESH HAPVDGNG-----GPTTG HEMDGIIEBLNLPLR 37
 Bradyrhizobium japonicum -----MTD HSEFDSVS-----GKTTG HEMDGIIEBLNTPLR 32
 Helicobacter pylori -----M DFLNDRHNVPGLIAA LVTLVLTIVYESSSLI KEMWRDSSK-----QGELVENG HLIIDGIGEPANNVPV 62

Rhizobium meliloti	HWVSYFYATIWAIG YAIAYVSPWMLTSA	TKMLOYSSRAEVSV ELAARAKAQAQNLQ	IASSVSEI IANPOL	QOFPAYSAGSAPKVN	122
Paracoccus denitrificans	WMLTIFYATIWGVL YLIAYPAFLVNG-A	TCGLLQONTYRSVAA ZIQRFNEANPIQAK	LVEPLSEIAADPEL	ANYTANAGAAIFRTW	179
Rhodobacter capsulatus	WMLTIFYATIWGA YSIAMPANPFI	SDKA TPELLSSSTRADVEK	DIAPFAEMKAVEEK	LVATDLTAIAADPEL	120
Rhodobacter sphaeroides	WMLTIFYATIWAIG YSILYPAWPLING-A	TNGLIGHSTRADVQR	DIAPFANATIRQQ	LVNTDLTAIAADPNL	121
Azorhizobium caulinodans	WMLTIFYATIWAIG YWVAYPAWPLVSN-Y	TSCVLGWNSRSVVE	QISDLOKLRRASSAK	LANNPLEDIEKNPEL	126
Bradyrhizobium japonicum	HWVICFYLTIVWAIG YWIVYPAWPLISS-N	TTGLFPYSSBRADVAV	ELANLEKIRGDKMAA	LGAASLADVEKDPAL	121
Helicobacter pylori	WVIASFMCITVWAFW YFFFG--YPLNSF--	--SQIQOYN-BEYKA	HNQKFEAK----	NKH LGQKELVDM-----	128
Rhizobium meliloti	CAQCHSGAAGQQF PNLNDDDMWGGKQP	EIYQTIAGVYRHAPD	-GETRVSEMPFFG--	DMLTPELMQOOTAAYV	208
Paracoccus denitrificans	CAQCHSGAGGATGY PSLNDDMLWGGTLE	EIHTYMHGTRDPKD	-ADTRYSEMRFPGID	GLEENRQIISQVYVHV	267
Rhodobacter capsulatus	CAQCHGAGGNTGF PSLLOGDMLHGGRAIE	TIYTNVNHGIRDPID	PDLLVANMFAHLTD	ELLEPAQIDEVQVYV	209
Rhodobacter sphaeroides	CVQCHSGNAAGVGY PNLNDDMLWGGDIE	SIHTYVTHGIRFTTD	-DEARYSEMRFVAG	GLLDSTQISQVYV	209
Azorhizobium caulinodans	CAPCHGAGGAKGF PNLNDDDMWGGTTLA	QIQCTITHGIRSGD	--EGHOGMMLAFG--	SILSKADISVADYV	212
Bradyrhizobium japonicum	CAPCHSGGAGKGF PNLNDDDMWGGTLD	QIMGTIQPGARSQHA	--KTHEGOMLAFGND	GVLKGEIIVTVANYV	209
Helicobacter pylori	CSQCCHGITABGLHGS AQNLVLR--	WG-KBE GINDTIRHQSK-GMD	---	YLAGEMPAMELD	208
Rhizobium meliloti	QKQVYFADN-CASCE	GADAKREMGAPNL	ADAIWLKGBG--	EOA VITQMTPKHGVMFA	288
Paracoccus denitrificans	EGVEYFADN-CSSCE	AEDGTDRAGAPDL	TDAVWLYGSD--	PAT ITRIVRDPFGVMFA	347
Rhodobacter capsulatus	AQQIYFADN-CASCE	GEDAKLVEMGAPNL	TGGINLYGSD--	VAT LTSTIQYGRGVMPDS	296
Rhodobacter sphaeroides	EGATIFADN-CAACE	GEDGTGSDVGGAPNL	TDGIMLYGSD--	RAT VRETIVYARFGVMFN	289
Azorhizobium caulinodans	KGAEYFADN-CATCE	GENGKGNQELGSKNL	TDGIMLYGSD--	KAT IVOTITNRCGVMPDA	292
Bradyrhizobium japonicum	KGEKIFVEN-CVACE	GDEGKGNQEGKAPNL	TDKIMLYGSD--	EAA LIETISQGRAGVMFA	289
Helicobacter pylori	KGKELFESMGCTGCE	GNDGKGLQEN--	QVF AADLTAYGTENFLRN	ILTHGRKXNIGHMPS	286
Rhizobium meliloti	E	289			
Paracoccus denitrificans	E	348			
Rhodobacter capsulatus	Q	297			
Rhodobacter sphaeroides	E	290			
Azorhizobium caulinodans	Q	293			
Bradyrhizobium japonicum	X	290			
Helicobacter pylori	-	286			

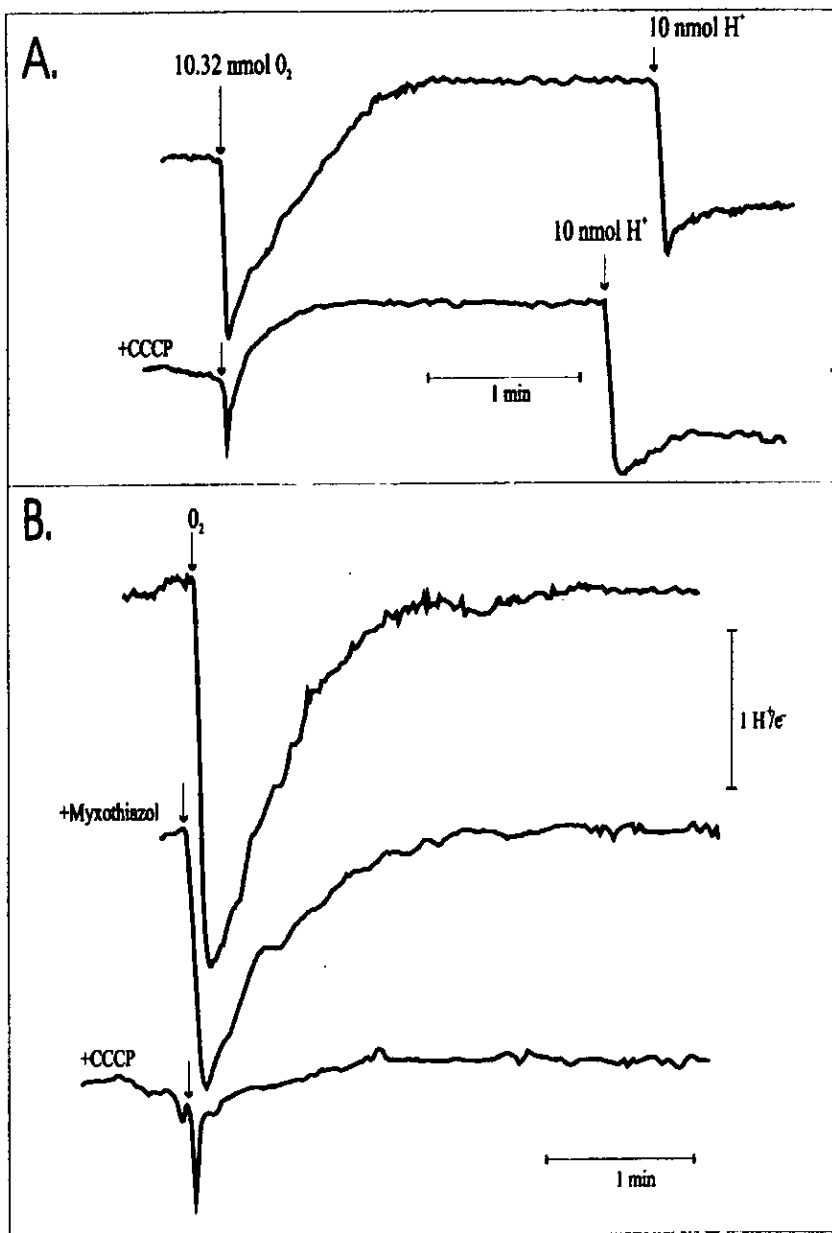


Figure 5.

Tabla A. Actividades específicas de ascorbato-TMPD y citocromo *c* oxidasa.

ACTIVIDAD nAtO ₂ /mg de proteína/min				
MEMBRANAS				
	JS100	MT101	ME127	MT101C
Condiciones				
TMPD 0.01mM + Cit c 0.05 mM	168	3.8	0	197
Cit c 0.05mM	102	7.6	0	110

Las actividades respiratorias fueron medidas usando una concentración final de 5mM de ascorbato, 2.8 µg/ml de antimicina y 400 µg de proteína de las distintas membranas: JS100, cepa receptora ($\Delta a a_3$); MT101, mutante por interrupción ($\Delta a a_3, c b b_3^-$); ME127, mutante por eliminación ($\Delta a a_3, \Delta c b b_3$) y MT101C, mutante complementada ($\Delta a a_3, c b b_3^+$).

A novel proton-pumping *b*-type ubiquinol oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* with extremely high resistance to cyanide.

by

**Blanca Barquera,¹ Mayra Toledo-Cuevas,² Moshe Finel,¹ Robert B. Gennis,³
Mårten Wikström,¹ and J. Arturo García-Horsman.^{1,*}**

¹Helsinki Bioenergetics Group. Department of Medical Chemistry, Institute of Biomedicine, P.O. Box (Siltavuorenpenger 10A) 00014 University of Helsinki, Finland

²Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Ciudad Universitaria, 04510 México D.F.

³Department of Biochemistry, University of Illinois at Urbana. 505 S. Mathews Av. Urbana, IL 61801. USA.

Keywords: proton pumping; ubiquinol oxidase; cytochrome *b*; cyanide; respiration; (*Rhodobacter sphaeroides*)

*Corresponding author: Department of Medical Chemistry, P.O.Box 9 (Siltavuorenpenger 10) FIN-00140 University of Helsinki, Finland. Fax: (358) 191-8267. E-mail: garciaho@rock.helsinki.fi

ABSTRACT

The quinol oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* is described in this paper and shown to be a unique enzyme. Spectral characterization and heme analysis of this oxidase revealed the presence of heme B in the oxygen reactive site, suggesting that the enzyme is a *bb₃*-type quinol oxidase. It is also shown that the oxidase vectorially translocates one H^+/e^- and that the electron transport activity is very sensitive to carbon monoxide (150% = 2 μ M). On the other hand, this quinol oxidase exhibits very low sensitivity to cyanide. As high as 5 mM of cyanide the oxidase activity is only inhibited by approximately 50%, and this behavior is strikingly atypical for a classical heme-copper oxidase.

1. Introduction.

Respiratory oxidases catalyze the terminal step in aerobic respiration. They are membrane bound enzymes that reduce dioxygen to water, in a process coupled to proton translocation across the mitochondrial inner membrane, or the bacterial plasma membrane. Most of the respiratory oxidases, either cytochrome *c* oxidases or quinol oxidases, belong to the heme-copper oxidase family [1,2]. Representative enzymes of this family include the mitochondrial cytochrome *aa*₃, the cytochrome *bo*₃ from *Escherichia coli*, and the cytochrome *cbb*₃ from *R. sphaeroides*. Heme-copper oxidases possess a highly conserved subunit I that binds a six-coordinated low spin heme and a binuclear (five-coordinated high spin heme-Cu_B) center, where the reduction of oxygen takes place [3]. Cytochrome *c* oxidases can be further divided into two subgroups. Members of one of them contain the Cu_A binuclear center in subunit II, which is the first electron acceptor from cytochrome *c* [4]. The second subgroup lack the Cu_A center, and it is formed by the less homologous *cbb*₃-type oxidases, which have been described in several microorganisms [5-12]. Quinol oxidases lack of the Cu_A center in subunit II but presumably have the quinol binding site instead in that subunit [13]. Extensive analysis of several oxidases has lead to the conclusion that all members of the heme-copper oxidase family work by following the same mechanism for oxygen reduction, and for proton pumping [14-17].

R. sphaeroides is able to grow under a wide variety of conditions. Aerobically, this bacterium expresses a branched respiratory system that contains several terminal

oxidases [2]. At high aeration an *aa*₃-type cytochrome *c* oxidase is mainly expressed, while under microaerobic conditions the *cbb*₃-type cytochrome *c* oxidase prevails. Both of these enzymes have been purified and characterized [6,18,19] and have been shown to belong to the heme-copper oxidase family [2]. The presence of a third oxidase in *R. sphaeroides* with an ubiquinol oxidase activity was anticipated since a mutant lacking the *bc*₁-complex was able to grow under aerobic conditions [20]. In addition, myxothiazol or antimycin insensitive respiration has been detected in membranes from several strains of *R. sphaeroides* [21].

A closely related bacterium, *P. denitrificans*, expresses a respiratory chain that is very similar to the *R. sphaeroides* system, and includes two analogous cytochrome *c*-oxidases, and one quinol oxidase [22]. As in *R. sphaeroides*, a total absence of heme O has been reported for *P. denitrificans*. The *ba*₃ *P. denitrificans* quinol oxidase has been purified and its genes have been sequenced, and shown to be a classical heme copper oxidase [22,23,24].

In this paper a systematic study of the quinol oxidase from *R. sphaeroides* is presented, and the results are compared with the analog enzyme from *P. denitrificans*. Interesting differences were found which may suggest that the *R. sphaeroides* quinol oxidase is a unique enzyme in terms of its structure and/or catalytic mechanism.

2. Materials and Methods.

Bacterial strains. The strains of *Rhodobacter sphaeroides* used in this work are: Ga (wild type), a derivative of strain 2.4.1. [25]; BC17, a Ga derivative with a kanamycin

resistance gene replacement at the *fbcB* gene (cytochrome *b* subunit of the bc_1 -complex) [20]. JS100 is a Ga derivative with a streptomycin/spectinomycin resistance gene replacement at the *ctaD* gene (cytochrome aa_3 subunit I) [26]. MT001 and MT101 are derivatives from Ga and JS100 respectively with a kanamycin resistance gene insertion into the *ccoN* gene of the *cbb₃*-type oxidase *ccoNOQP* operon [27]. The *R. sphaeroides* strains were grown aerobically as described before [6]. *P. denitrificans* 1222 (wild type) was grown aerobically on LB media as reported previously [28].

Cytoplasmic membrane preparation. Cell pellets from a 1 L overnight cultures were washed and treated with lysozyme as described in [29]. Osmotic shocked cells were treated with DNase I (Sigma) and membranes were recovered and washed by centrifugation.

Isolation of the Rhodobacter sphaeroides quinol oxidase. Purified membranes from *R. sphaeroides* BC17 were extracted with 0.7% dodecyl-maltoside in 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, and the clear solubilized material was applied to a Sepharose CL-6B gel filtration column (200 mM NaCl, 0.05% dodecyl-maltoside, 20 mM Tris-HCl pH 7.5). Fractions with activity were concentrated and applied to a DEAE-Sepharose FF column equilibrated with the same buffer as above. The myxothiazol resistant quinol oxidase activity eluted within the flowthrough, and after concentration, this fraction was used for analysis. Table I summarizes the isolation protocol. Attempts to further purify this enzyme resulted in complete loss of quinol oxidase activity (not shown).

Activity measurements. Oxygen uptake. Respiratory activities were measured polarographically as described before [29] and in the legend of Table II.

Proton translocation measurements were carried out using intact cells that were washed three times with 150 mM potassium chloride. The assay conditions were as previously described [30-32].

Other analytical methods. Reverse phase HPLC analysis was done as reported previously [6]. Optical spectroscopy was done in a DBS-type spectrophotometer (Johnson Foundation, PA) at room temperature. Details are stated in the figure legends. Protein determinations were made using the BCA protocol (Pierce Co.). All the chemicals used were at least of analytical grade.

3. Results.

Characterization of the quinol oxidase activity in cytoplasmic membranes. Table II shows oxygen uptake activities of membranes from wild type (Ga), and from the mutant strains JS100 (Δaa_3), MT001 (cbb_3^-), BC17 (Δbc_1), and MT101 ($\Delta aa_3, cbb_3^-$), using succinate, ubiquinone-1, or ascorbate-TMPD as electron donors. These five strains showed relatively high activity with all electron donors, except for the case of MT101 which lacks ascorbate-TMPD oxidase activity (or ascorbate-TMPD-cytochrome *c* oxidase activity, data not shown). Inhibitors of the bc_1 -complex, such as Antimycin A or myxothiazol, partially blocked succinate oxidation in the membranes of Ga, JS100 and MT001, which contain at least one active cytochrome *c* oxidase. However, succinate

oxidation in both BC17 (Δbc_1) and MT101 ($\Delta aa_3, chb_3$) was insensitive to either myxothiazol or Antimycin A. Similar results were obtained when Q_1 was the electron donor (TableII).

Cyanide inhibition of the succinate oxidase or ubiquinol-1 oxidase activity was only partial. The strongest inhibition was obtained in Ga, JS100 or MT001 that have a functional cytochrome *c* oxidase branch. However, inhibition of succinate or ubiquinol-1 oxidation in BC17 or MT101 by cyanide was less effective. Furthermore, in the presence of 100 μ M cyanide, the remaining succinate oxidation in BC17 or MT101 was insensitive to myxothiazol. On the other hand, ascorbate-TMPD oxidase activities of Ga, JS100, MT001 and BC17 were almost totally abolished by 100 μ M of cyanide.

To further investigate this observation, the ubiquinol-1 oxidation activity in membranes from strain MT101 was titrated with cyanide. As a comparison, the same cyanide titration was made using *P. denitrificans* membranes. Figure 1A shows the effect of cyanide on the Q-1 oxidation by both membrane preparations, *R. sphaeroides* MT101 and *Paracoccus* 1222 (w.t.). It can be seen that at 500 μ M of KCN approximately 90% of the *P. denitrificans* quinol oxidase activity was inhibited, but only 25% of the *R. sphaeroides* activity was blocked. Furthermore, at 5 mM KCN, where *Paracoccus* Q-1 oxidase activity was negligible, MT101 membranes were more than 40% active. Pre-incubations of the membranes with cyanide in the absence or presence of substrates (over a range of pH from 6.3 to 7.7) gave the same effect of cyanide on the activity (not shown).

Carbon monoxide on the other hand, was shown to be a strong inhibitor of the *R. sphaeroides* quinol oxidase in comparison with the similar enzyme in *P. denitrificans* (Fig. 1B). At 20 μ M of CO, *R. sphaeroides* oxidase was inhibited nearly 90% while the *P. denitrificans* activity was only 20% lower than the control.

Spectral analysis. The reduced minus oxidized spectrum of an isolated preparation of the quinol oxidase from *R. sphaeroides* is shown in Figure 2A. The main contribution to this spectrum consists of *b*-type cytochromes, as revealed by absorption maxims at 432 and 558 nm. The availability of *R. sphaeroides* strain MT101 that lacks both cytochrome *c* oxidases has made it possible to dissect the CO-binding species of the quinol oxidase. Figure 2B shows the reduced+CO minus reduced difference spectrum of solubilized membranes from *R. sphaeroides* MT101. The spectrum shows a peak at around 417 nm and trough at 430 nm in the Soret region, classical features for a CO-heme B (or heme O, but see below) complex.

Heme analysis. Hemes were extracted from membranes of *R. sphaeroides* MT101, and the spectral analysis of the pyridine hemochromes revealed only the presence of heme B (or O) (Fig. 2C). This result suggests that the *R. sphaeroides* quinol oxidase does not possess an A-type high spin heme. Furthermore, in order to thoroughly identify the heme composition of the quinol oxidase, HCl-acetone heme extraction from an isolated preparation of the enzyme, as well as from membranes of different strains of *R. sphaeroides* was performed, and the hemes were then separated and identified by reverse-phase HPLC (Figure 3). Only heme B was found to be present in the isolated

preparation of the quinol oxidase or in total heme extracts from membranes of either JS100 or MT101. There was no indication for the presence of heme A in any strain where the *ctaD* gene (cytochrome *aa*₃ subunit I) was absent, while heme O was undetectable in all cases.

Proton pumping. The ability of the quinol oxidase to vectorially translocate protons across the membrane was examined using oxygen pulses to an anaerobic preparation of intact cells, in the presence of succinate and rotenone. Figure 4 shows the results obtained with cells of *R. sphaeroides* Ga and MT101. Wild type cells showed ratios of around 2.7-3.0 H⁺/e⁻, and this stoichiometry dropped to 1.7-2.1 H⁺/e⁻ when myxothiazol was added. For the mutant MT101, which lacks cytochrome *c* oxidase activity, the stoichiometry was 1.8-2.1 H⁺/e⁻, and it was not affected by myxothiazol. These values indicate that the quinol oxidase is a proton pump.

The effect of cyanide and carbon monoxide on the quinol oxidase proton translocation activity was also tested and was found to be consistent with the inhibitors effect on electron transport. At 20 μM of CO, or 1 mM cyanide, the rate of acidification was strongly decreased, however, the overall H⁺/e⁻ stoichiometry was not modified from a value near 2.0.

4. Discussion.

R. sphaeroides expresses two cytochrome *c* oxidases: cytochrome *aa*₃ [18,19], and cytochrome *cbb*₃ [6]. Both enzymes are members of the heme copper family.

Evidence for a third oxidase in these bacteria came from the characterization of a mutant in which the gene coding for the cytochrome *b* subunit of the *bc*₁-complex was deleted [20].

In this paper, the heme composition of this quinol oxidase, its sensitivity to several inhibitors, as well as its proton pumping activity are characterized. Heme and spectral analysis show that this enzyme has a *b*-type cytochrome in the oxygen reactive site, and clearly demonstrate that it does not contain heme O or A, suggesting that this oxidase is of the *bb*₃-type. This enzyme is a proton pump (Fig. 4), and may be a member of the heme-copper oxidase family. However, a striking peculiarity of the *R. sphaeroides* quinol oxidase is its relatively high resistance to cyanide.

The close similarity observed for the respiratory chains of *R. sphaeroides* and *P. denitrificans*, prompt us to compare both quinol oxidases. We present here clear evidence that the *R. sphaeroides* quinol oxidase has a B-type high spin heme, while active *P. denitrificans* enzyme has a A-type high spin heme [23, 24]. The *bb*₃-type quinol oxidase of *P. denitrificans* [22] is inactive [24]. The difference in sensitivity towards cyanide between these two quinol oxidases suggests significant structural and/or functional differences between them.

A large number of quinol and cytochrome *c* oxidases have been described in the literature (see for example [2] and references therein). All those that translocate protons, except for cytochrome *cbb*₃, have either heme A or heme O in the binuclear center. However, *cbb*₃-type oxidases have several unusual properties [6-8,10,11,22,33,34], and

can be classified separately. Analysis of bacterial [35] and mitochondrial [36,37] cytochrome oxidase crystal structure revealed the role of the hydroxyl group of the hydrofarnesil substituent of the heme a_3 . This group is hydrogen bound to a conserved tyrosine in helix VI, which is positioned a turn below one of the histidine Cu_B ligands. These two residues, tyrosine and histidine, are also hydrogen bound to one another. There are strong indications that this hydrogen-bond path is important in either electron transfer between heme aa_3 and Cu_B , or in a proton conducting wire to the Cu_B histidine ligand, that is probably involved in the proton pumping machinery [15]. The lack of such an important entity in the *R. sphaeroides* quinol oxidase may suggest that this enzyme might be very different from the members of the heme-copper oxidase family.

The relevance of the unusual high resistance of the quinol oxidase to cyanide is still unclear. One speculation is a possible absence of Cu_B at the oxygen reactive site. The presence of this center has been correlated with high sensitivity towards cyanide in heme-copper oxidases [38] in comparison with cytochrome *bd* or hemoglobin. A second possibility is that the route that leads to the binuclear center has differences with respect to the rest of the heme-copper oxidases. For example, the existence of an oxygen channel has been suggested [35-37,39,40], and we can speculate that in the *R. sphaeroides* quinol oxidase this channel is narrower and/or more hydrophobic. Such a change may almost stop cyanide for reaching the binuclear center, but have little effect on the diffusion of the smaller and more hydrophobic dioxygen molecule.

Further understanding of these observations and their relevance requires better knowledge of the structure of this enzyme. Attempts to find the genes and to further

purify this interesting oxidase are currently being made in our laboratory.

References.

- [1] Saraste, M. (1990) *Quarterly Reviews of Biophysics* 23, 331-366.
- [2] García-Horsman, J.A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J. and Gennis, R.B. (1994) *J. Bacteriol* 176, 5587-5600.
- [3] Babcock, G.T. and Wikström, M. (1992) *Nature* 356, 301-309.
- [4] Hill, B.C. (1993) *J. Bioenerg. Biomem.* 25, 115-120.
- [5] De Gier, J.W.L., Schepper, M., Reijnders, W.N.M., van Dyck, S.J., Slotboom, D.J., Warne, A., Saraste, M., Krab, K., Finel, M., Stouthamer, A.H., van Spanning, R.J.M. and van der Oost, J. (1996) *Mol. Microbiol* 20, 1247-1260.
- [6] García-Horsman, J.A., Berry, E., Shapleigh, J.P., J.O., A. and Gennis, R.B. (1994) *Biochemistry* 33, 3113-3119.
- [7] Gray, K.A., Grooms, M., Myllykallio, H., Moomaw, C., Slaughter, C. and Daldal, F. (1994) *Biochemistry* 33, 3120-3127.
- [8] Preisig, O., Anthamatten, D. and Hennecke, H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3309-3313.
- [9] Schlüter, A., Rüberg, S., Krämer, M., Weidner, S. and Priefer, U.B. (1995) *Mol. Gen. Genet.* 247, 206-215.
- [10] Thöny-Meyer, L., Beck, C., Preisig, O. and Hennecke, H. (1994) *Mol. Microbiol* 14, 705-716.
- [11] Wang, J., Gray, K.A., Daldal, F. and Rousseau, D.L. (1995) *J. Amer. Chem. Soc* 117, 9363-9364.
- [12] Zufferey, R., Preisig, O., Hennecke, H. and Thöny-Meyer, L. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 9114-9119.
- [13] Welter, R., Gu, L.-Q., Yu, L., Yu, C.-A., Rumbley, J. and Gennis, R.B. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 28834-28838.
- [14] Puustinen, A., Verkhovsky, M., Morgan, J.E., Belevich, N.P. and Wikström, M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1545-1548.
- [15] Morgan, J., Verkhovsky, M. and Wikstrom, M. (1994) *J. Bioenerg. Biomem.* 26, 599-608.
- [16] Morgan, J.E., Verkhovsky, M., Puustinen, A. and Wikström, M. (1993) *Biochemistry* 32, 11413-11418.
- [17] Morgan, J.E., Verkhovsky, M., Puustinen, A. and Wikström, M. (1995) *Biochemistry* 34, 15633-15637.
- [18] Cao, J., Hosler, J., Shapleigh, J.P., Revzin, A. and Ferguson-Miller, S. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 24273-24278.
- [19] Hosler, J.P., Fetter, J., Tecklenburg, M.M.J., Espe, M., Lerma, C. and Ferguson-Miller, S. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 24264-24272.
- [20] Yun, C., Beci, R., Crofts, A.R., Kaplan, S. and Gennis, R.B. (1990) *Eur. J. Biochem.* 194, 399-411.
- [21] Yun, C.-H., Barquera, B., Iba, K., Takamiya, K., Shapleigh, J., Crofts, A.R. and Gennis, R.B. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* 120, 105-110.
- [22] De Gier, J.W.L., Lübber, M., Reijnders, W.N.M., Tipker, C.T., Slotboom,

- D.J., van Spanning, R.J.M., Stouthamer, A.H. and van der Oost, J. (1994) *Mol. Microbiol* 13, 183-196.
- [23] Richter, O.M.H., Tao, J., Turba, A. and Ludwig, B. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 23079-23086.
- [24] Zickermann, I., Tautu, O.S., Link, T.A., Korn, M., Ludwig, B. and Richter, O.-M.H. (1997) *Eur. J. Biochem.* 246: 618-624.
- [25] Cohen-Bazire, G., Siström, W.R. and Stainer, R.Y. (1957) *J. Cell. Comp. Physiol.* 49, 25-68.
- [26] Shapleigh, J.P. and Gennis, R.B. (1992) *Mol. Microbiol* 6, 635-642.
- [27] Toledo-Cuevas, M., Barquera, B., Gennis, R.B., Wikström, M. and García-Horsman, J.A. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* (accepted).
- [28] Raitio, M., Pispá, J.M., Metso, T. and Saraste, M. (1990) *FEBS Lett.* 261, 431-435.
- [29] Raitio, M. and Wikström, M. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1186, 100-106.
- [30] Puustinen, A., Finel, M., Virkki, M. and Wikström, M. (1989) *FEBS Lett.* 249, 163-167.
- [31] Puustinen, A. and Wikström, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6122-6126.
- [32] Thomas, J., Puustinen, A., Alben, J.O., Gennis, R.B. and Wikström, M. (1993) *Biochemistry* 32, 10923-10928.
- [33] van der Oost, J., de Boer, A.P.N., De Gier, J.W.L., Zumft, W.G., Stouthamer, A.H. and van Spanning, R.J.M. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* 121, 1-10.
- [34] Varotsis, C.A., Babcock, G.T., García-Horsman, J.A. and Gennis, R.B. (1995) *J. Phys. Chem.* 99, 16817-16820.
- [35] Iwata, S., Ostermeir, C., Ludwig, B. and Michel, H. (1995) *Nature* 376, 660-669.
- [36] Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Takashi, T., Yamaguchi, H., Shinzaha-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1995) *Science* 269, 1069-1074.
- [37] Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinizawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1996) *Science* 272, 1136-1144.
- [38] Rich, P.R. (1995) *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 479-486.
- [39] Riistama, S., Puustinen, A., García-Horsman, J.A., Iwata, S., Michel, H. and Wikström, M. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 1-4.
- [40] Hofacker, I and Schulten, K. (1998) *Proteins* 30, 100-107.

Figure Legends.

Figure 1 A) Effect of cyanide (A) and carbon monoxide (B) on the quinol oxidase activity in membranes of *Rhodobacter sphaeroides* MT101 (●); and *Paracoccus denitrificans* 1222 (○). A. 20 min. pre-incubations of membranes (approx. 5 μg of protein) in 200 uL of media that contained 220 μM ubiquinone-1 (Q-1), 5 mM dithiothreitol (DTT), 1 ug/ml rotenone, 10 μM myxothiazol, and the indicated amounts of potassium cyanide. Oxygen uptake measurements were started with the addition of 100 uL of the previous mixture to the oxygenmeter cuvette that contained the same concentrations of Q-1, DTT, rotenone myxothiazol, and cyanide. Each point in the curves represents an average of 4-6 independent traces. Potassium cyanide stock solutions were always made fresh in 250 mM potassium phosphate pH 7.5.

B) Measurements were started with the addition of fresh membranes (5 μg) to the oxygenmeter cuvette in the same conditions as in A. Indicated amounts of CO were then added. CO was added from a CO saturated stock solution and the measurements were performed in the dark.

Figure 2 A) Reduced *minus* oxidized spectrum of the *Rhodobacter sphaeroides* quinol oxidase. An isolated preparation was used (see Methods). Base line was made with an air oxidized sample (50 μg of protein) in 200 mM Tris pH 7.5. The reduction was made by adding few grains of dithionite.

B) Reduced plus CO *minus* reduced difference spectrum of membranes from *Rhodobacter sphaeroides* MT101. 0.5 ml of membranes (approx. 5 mg of protein) were

solubilized with 1% dodecyl-maltoside in 200 mM Tris-HCl pH 7.5 and brought to 1 ml. The baseline was recorded with a dithionite reduced sample. CO gas was bubbled by 5 minutes to a reduce sample and the spectrum was taken.

C) Pyridine hemochromogens reduced minus oxidized spectrum from membranes of *Rhodobacter sphaeroides* MT101. 1 mg of *Rhodobacter sphaeroides* MT101 membranes were resuspended in 40 mM pyridine and 50 mM NaOH. Dithionite reduced spectrum was subtracted from the air oxidized spectrum. All spectra were performed at room temperature.

Figure 3. Reversed-phase HPLC analysis of the hemes extracted and purified from an isolated preparation of the quinol oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* MT101.

Elution profile for the hemes from the quinol oxidase (A) and *Escherichia coli* cytochrome bo_3 (B) are shown. The elution times for protoheme IX (heme B) and heme O are indicated.

Figure 4. Proton translocation in *Rhodobacter sphaeroides* Ga (top) and MT101 (bottom) whole cells. Cells were suspended in 100 mM KCl, 100 mM KSCN, 0.5 mM HEPES- K^+ medium at pH 7.0 which also contained 2.5 mM succinate, 10 μ M rotenone and 10 μ M myxothiazol. Arrows indicate injection of 2.86 μ M of O_2 into the anaerobic cell suspension.

Table I. Isolation of the quinol oxidase activity from membranes of *Rhodobacter sphaeroides* BC17.

Step	Activity (Purif. fold) (nmol Q ₁ /min./mg of protein)	Heme B (purif. fold) (nmol heme/mg of protein)	Activity recovery %
Pure Membranes	735 (1)	0.31 (1)	100
Solubilized membranes	780 (1.1)	0.58 (1.8)	74
Gel filtration	1680 (2.3)	0.92 (3)	66
DEAE-Sephrose	3050 (4.1)	1.65 (5.3)	55

Table II. Respiratory activities of isolated membranes of *Rhodobacter sphaeroides* wild type (Ga), $\Delta a a_3$ (JS100), $\Delta c b b_3$ (MT001), $\Delta b c_1$ (BC17), and $\Delta a a_3 \Delta c b b_3$ (MT101).^a

	Ga	JS100	MT001	BC17	MT101
Succinate	340	475	350	560	585
5 μ M Myxothiazol	300	305	290	530	565
100 μ M Cyanide	210	215	200	450	440
Ascorbate-TMPD	520	480	750	670	5
100 μ M Cyanide	80	10	95	65	-
Ubiquinone-1	925	875	705	1250	650
5 μ g/ml Antimycin A	325	700	450	1050	620
100 μ M Cyanide	230	510	390	950	530

^aActivity units: nato-g O/min./mg

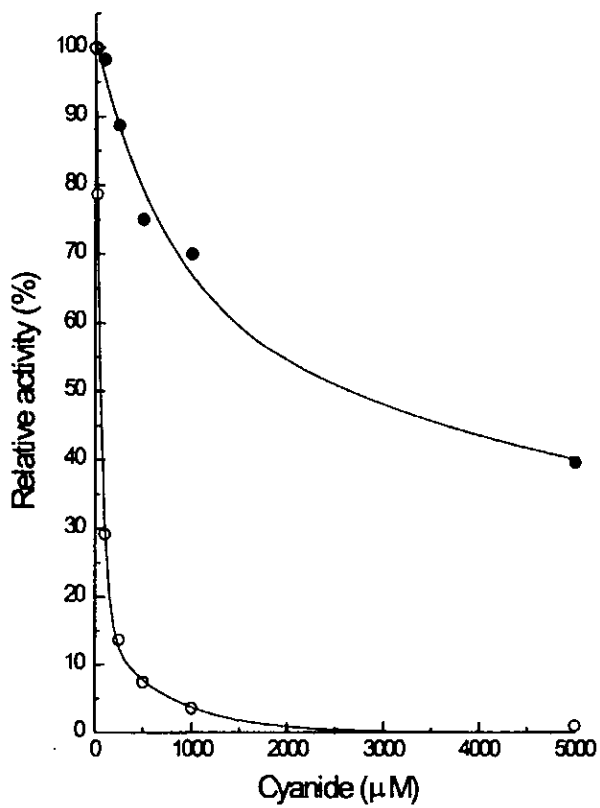


Figure 1 A.

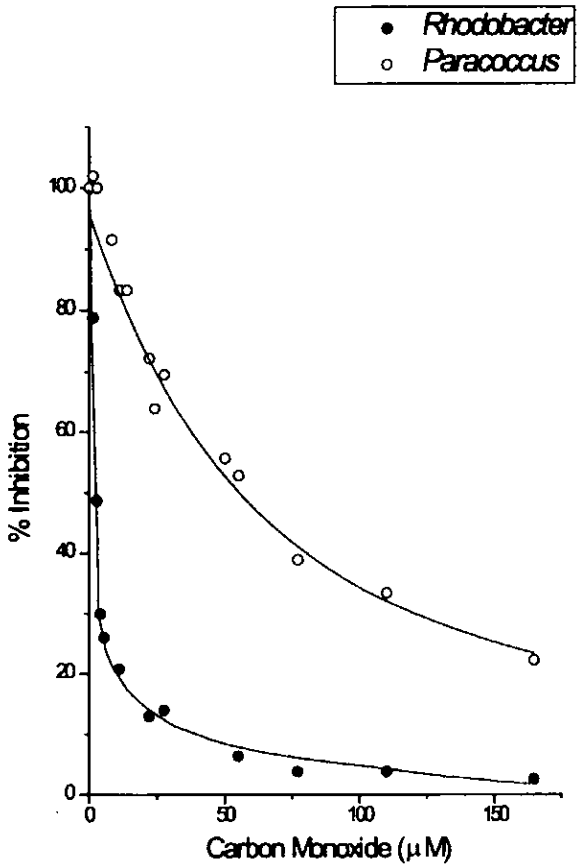


Figure 1 B.

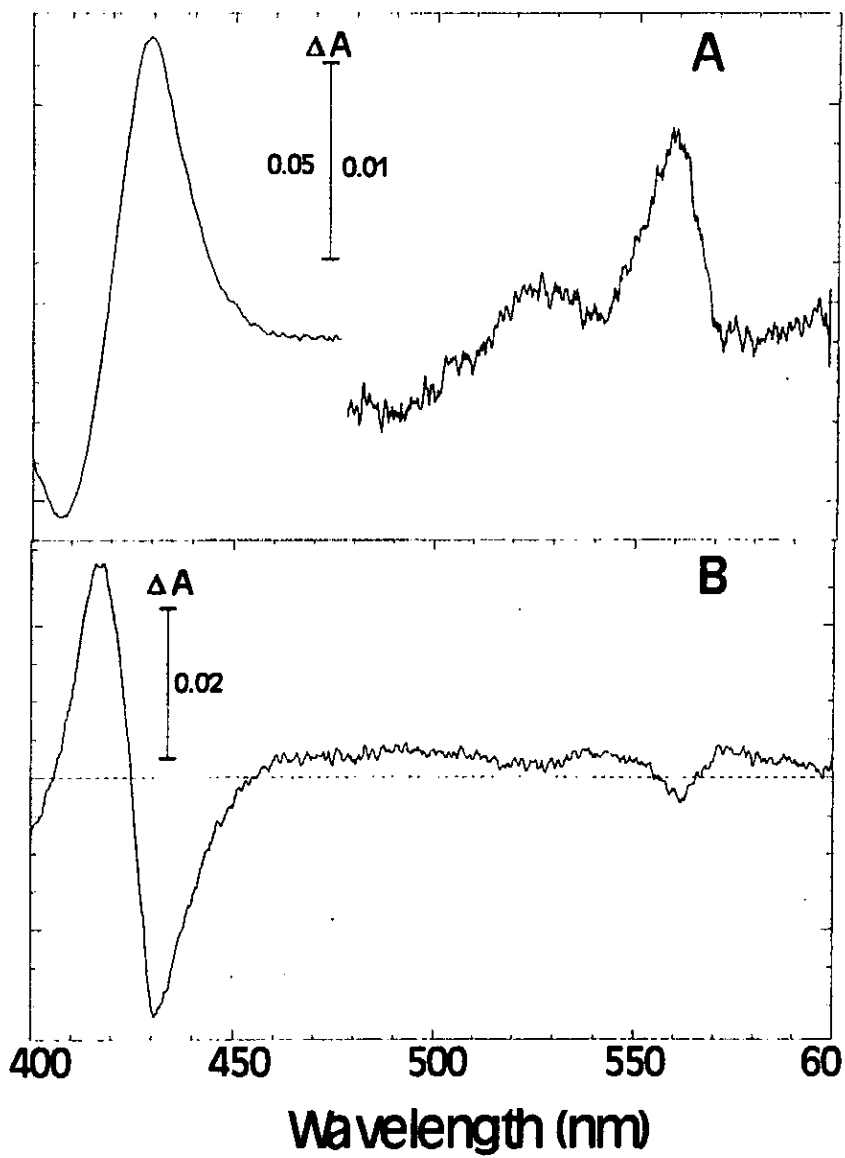


Figure 2.

Tabla B. Estequiometrias de bombeo de protones medidas como cambios de pH dependientes de pulsos de oxigeno. Las mediciones se realizaron en preparaciones anaerobicas de células completas de *R. sphaeroides*.

H ⁺ /e ⁻		
	Ga(wt)	MT101($\Delta a a_3, c b b_3^-$)
Sustrato		
Succinato	2.7-3.0	1.8-2.1
Succinato + Mixotiazol	1.7-2.1	1.7-2.1

Los ensayos se realizaron en un buffer que contenía 100mM KSCN, 100mM KCl, 10 μ M rotenona, 2.5 mM succinato y 10 μ M mixotiazol; este último sólo cuando está indicado en la Tabla.

5. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.

En este trabajo obtuvimos la secuencia completa del operón *ccoNOQP* que codifica para la citocromo *c* oxidasa tipo *cbb₃* de *Rhodobacter sphaeroides*. Se secuenciaron 4,258 pb en donde se localizaron cuatro marcos de lectura abiertos que corresponden a los genes *ccoN*, *ccoO*, *ccoQ* y *ccoP*. La región 5' de un quinto marco de lectura abierto fue localizada arriba del gene *ccoN*, pero con un sentido de transcripción inverso al del operón. Este marco de lectura se identificó como el ORF277 previamente reportado por Zeilstra-Ryalls & Kaplan (1995), pero sin función aún conocida.

Entre el ORF277 y el inicio de *ccoN* fue localizada una región muy conservada que se ha visto involucrada en la unión de factores de transcripción tipo *Fnr/FixK*. Estos regulan la expresión genética bajo diferentes condiciones de crecimiento, como por ejemplo, bajo condiciones de poca aereación. Zeilstra-Ryalls y Kaplan (1995) identificaron en *R. sphaeroides* a un gene que parece codificar para el factor de transcripción *FnrL*, el cual regula la expresión en respuesta a cambios ambientales. Probablemente la expresión preferencial de la citocromo oxidasa *cbb₃* durante el crecimiento microaeróbico o anaeróbico de la bacteria sea inducida por la unión de este factor *FnrL* al sitio localizado arriba de *ccoN*.

Por los siguientes criterios se propone que la región génica *ccoNOQP* de *R. sphaeroides* está regulada como un operón: a) la existencia de un solo sitio posible de unión para el factor *Fnr/FixK*, b) que todos los genes están a distancias muy pequeñas entre ellos, c) que el operón parece poseer un único sitio posible de terminación de la transcripción localizado hacia 3' de *ccoP*, d) que la interrupción del gene *ccoN* provoca la pérdida de la actividad de la oxidasa y e) que en otros organismos esta región parece

estar regulada como operón.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de los genes *ccoN*, *O*, *Q* y *P* para las citocromo *c* oxidasas tipo *cbb₃* de diversos organismos indica que las subunidades más conservadas son las codificadas por los genes *ccoN* y *ccoO* (con un 25 y 24% de identidad respectivamente). De aquí que se sugiere que estas subunidades son muy importantes para la función de la oxidasa, predicción que correlaciona con los hallazgos de Zufferey y col. (1996) en los que se aportan evidencias de que éstas subunidades son esenciales para el ensamblaje de la enzima y suficientes para una actividad parcial de la oxidasa. La subunidad *ccoP*, aunque menos conservada que las otras dos (9.7% de identidad), es también importante para la función de la oxidasa ya que el complejo CcoNOP posee la actividad enzimática observada en preparaciones puras de la oxidasa (García-Horsman² et al., 1994; Zufferey et al., 1996). Se sugiere que esta subunidad CcoP es el intermediario del paso de los electrones entre el citocromo *c*, o el complejo *bc₁* y el complejo CcoNO (Zufferey et al., 1996). CcoQ no parece jugar un papel esencial en el ensamblaje o función de la oxidasa, lo que coincide con ser la menos conservada de las subunidades (1.3% de identidad). Aún no se conoce la función de éste polipéptido. Es importante aclarar que los bajos porcentajes de identidad obtenidos en las comparaciones que se hicieron se deben, en gran medida, a que la oxidasa de *Helicobacter pylori* presenta grandes diferencias con las de los demás organismos.

Se construyeron dos tipos de mutantes en las que se inactivó a la citocromo oxidasa *cbb₃*. Una fue construida solo por la interrupción del gene *ccoN* (MT101) y la otra por la eliminación de fragmentos cruciales de los genes *ccoN* y *ccoO* (ME127). Estas mutantes fueron construidas en JS100, cepa que carece de la citocromo oxidasa

aa₃. El análisis de la cepa JS100 y otros antecedentes sugerían que *R. sphaeroides* solo poseía dos citocromo c oxidasas, lo que nos hacía esperar que las dobles mutantes producidas por nosotros carecieran de actividad de citocromo c oxidasa. En efecto, tanto MT101 como ME127 no presentaron actividad de ascorbato-TMPD ni de citocromo c oxidasa. Esto confirmó que *aa₃* y *cbb₃* son las únicas citocromo c oxidasas de la cadena respiratoria de *R. sphaeroides*, al menos bajo las condiciones de cultivo ensayadas en este trabajo.

Las mutantes generadas pudieron ser aisladas solo en condiciones de cultivo fotosintético, aunque posteriormente readquirieron la capacidad de crecer aeróbicamente. Parece ser que este es el mismo fenómeno que se observó cuando se construyeron en *R. sphaeroides* mutantes deficientes en el complejo bc₁ (Yun et al., 1990). La incapacidad para obtener mutantes en condiciones aeróbicas de cultivo fue atribuida a una aparente necesidad de adaptación para crecer en estas condiciones. Esta incapacidad podría tener su origen en que la quinol oxidasa de *R. sphaeroides* parece expresarse constitutivamente en bajos niveles cuando en la bacteria existe al menos una citocromo c oxidasa (Yun et al., 1994). En concordancia, la mayor actividad de quinol oxidasa es detectada en mutantes carentes del complejo bc₁ (Yun et al., 1990; Yun et al., 1994). Así que se podría pensar que la incapacidad inicial para crecer en aerobiosis pudo ser debida a que la presencia de la citocromo oxidasa *cbb₃* en la cepa receptora JS100 pudo originar que las concentraciones de quinol oxidasa fueran bajas. Esto haría necesario un periodo de adaptación para lograr elevar los niveles de esta quinol oxidasa, de tal forma que ahora pudiera mantener el crecimiento aeróbico. Sin embargo, creemos que esto podría explicar un muy lento crecimiento de las exconjugantes, en caso de haberse presentado, pero no sabemos si puede explicar la

total incapacidad de las mutantes para crecer aeróbicamente.

La capacidad de las mutantes para crecer en condiciones aeróbicas y fotosintéticas sugiere que, a pesar de que *aa₃* y *cbb₃* son las únicas citocromo c oxidasas del sistema respiratorio de *R. sphaeroides*, ninguna es esencial para el crecimiento bacteriano.

MT101 y ME127 mostraron una alta actividad de quinol oxidasa, resistente a mixotiazol y con muy baja sensibilidad a cianuro (ver segundo artículo). El hecho de que estas mutantes solo tengan actividad de quinol oxidasa y que sean capaces de crecer aeróbicamente nos hizo suponer que quizás la oxidasa pudiera bombear protones. Los experimentos de bombeo en la mutante MT101, con succinato como sustrato, mostraron una estequiometría de $2 \text{ H}^+/\text{e}^-$ (Tabla B, al final del segundo artículo). Este valor sugiere que la quinol oxidasa libera $1 \text{ H}^+/\text{e}^-$ producto de la reacción de oxidación del ubiquinol, como sucede con otras quinol oxidasas (Lauraeus & Wikström, 1993); pero que además es capaz de translocar activamente otro H^+/e^- , como sucede con la quinol oxidasa *bo₃* de *E. coli* (Puustinen et al., 1991).

Esta capacidad de la quinol oxidasa de *R. sphaeroides* para bombear protones parece sugerir que se trata de un segundo ejemplo de oxidasa terminal que, a pesar de tener un hemo sin cadena farnesilo en el centro binuclear (las preparaciones parcialmente purificadas de esta enzima solo muestran hemos tipo B), es capaz de translocar protones. Por otro lado, si la quinol oxidasa de *R. sphaeroides* en verdad fuera una oxidasa tipo *bb₃*, ésta constituiría el primer ejemplo de una quinol oxidasa activa con esta estructura, ya que las variantes enzimáticas *bb₃* en *P. denitrificans* (Zickermann et al., 1997) y en *E. coli* (Hill et al., 1992; Saiki et al., 1992) son inactivas.

Las dobles mutantes obtenidas, MT101 y ME127, son útiles para a partir de ellas purificar a la quinol oxidasa de *R. sphaeroides* y con esto lograr hacer una mejor caracterización de esta enzima.

P. denitrificans es una bacteria muy cercana a *R. sphaeroides* y presentan sistemas respiratorios muy similares. Ambas poseen las mismas citocromo *c* oxidasas. Sin embargo, pese a que ambas tienen una quinol oxidasa, la enzima de *P. denitrificans* es del tipo ba_3 (Richter et al., 1994; Zickermann et al., 1997), con una mayor sensibilidad a cianuro que la quinol oxidasa bb_3 de *R. sphaeroides* (ver segundo artículo). Además, como ya habíamos mencionado, la quinol oxidasa de *R. sphaeroides* parece ser la única quinol oxidasa bb_3 activa hasta ahora reportada. Estas características nos motivan a hacer una mejor caracterización bioquímica y genética de la quinol oxidasa de *R. sphaeroides* ya que nos ayudaría a determinar las diferencias estructurales que le confieren estas propiedades.

Por otro lado, nos interesó también el determinar si la citocromo *c* oxidasa cbb_3 de *R. sphaeroides*, con sus características estructurales particulares y la presencia de un hemo B en el centro binuclear, era capaz de bombear protones. Ya que con nuestras mutantes hablamos demostrado que la única citocromo *c* oxidasa presente en JS100 es la citocromo oxidasa cbb_3 , cualquier actividad de translocación de protones detectada en esta cepa debiera ser originada por esta oxidasa, o por la quinol oxidasa. Como se muestra en la Tabla 2 del primer artículo (Resultados), cbb_3 bombea protones con una estequiometría cercana a $1 H^+/e^-$ cuando se usa ascorbato-TMPD como sustrato. Como el ascorbato parece ser el donador de electrones y como la estequiometría no se modifica por la eliminación de los sustratos endógenos, se excluye la contribución de la quinol oxidasa en el bombeo atribuido a cbb_3 . La citocromo oxidasa aa_3 mitocondrial

bombea protones con una estequiometría de $1\text{H}^+/\text{e}^-$, por lo que las diferencias estructurales de las citocromo c oxidasas *cbb*₃ no parecen afectar la capacidad ni eficiencia para translocar protones. Esto podría tener su origen en que las rutas de translocación de protones fueran lo suficientemente flexibles para admitir cambios, los cuales podrían ser compensados por otros residuos, por rutas alternativas, o por moléculas de agua, como ya habíamos mencionado anteriormente. También cabe la posibilidad de que las citocromo c oxidasas *cbb*₃ bombeen protones por un mecanismo distinto al de las otras oxidasas hemo-cobre, pero que sean bastante similares en la eficiencia de translocación. Sería de gran interés conocer cual de estas propuestas es la correcta.

Las citocromo oxidasas *cbb*₃ carecen de casi todos los residuos conservados que forman los canales de protones "químicos" y "translocados". Sin embargo, esto no elimina su capacidad de bombear protones ni de reducir oxígeno. Así que es interesante averiguar que residuos son importantes para estas funciones en estas oxidasas y si estos forman rutas alternativas de las ya propuestas para las otras oxidasas hemo-cobre. Las mutantes MT101 y ME127, que carecen de la oxidasa *cbb*₃, son un buen sistema para expresar en ellas variantes de la oxidasa producidas por mutagenesis dirigida. Los resultados obtenidos nos ayudarían a entender más sobre estas enzimas.

Para confirmar que el fenotipo observado en estas dobles mutantes MT101 y ME127 era debido exclusivamente a la inactivación del operón *ccoNOQP*, éstas fueron complementadas con un fragmento de 3.5 kpb conteniendo la versión normal completa del operón. Este fragmento se encontraba subclonado en el vector de expresión pRK-415, que fue transferido por conjugación a las mutantes. El hallazgo de las cepas denominadas MT101C y ME127C, que recuperaron el 100% de la actividad de TMPD y

citocromo c oxidasa, nos confirma que la ausencia de actividad de citocromo oxidasa en las mutantes se debía exclusivamente a la inactivación del operón que codifica para *cbb₃*.

Las conclusiones más importantes de este trabajo son las siguientes:

- 1) La cadena farnesilo del hemo de alto spin no es esencial para la función de la oxidasa, tanto para el transporte de electrones como para el de protones.**
- 2) No se requiere la conservación estricta de muchos residuos o rutas para las actividades de reducción del oxígeno y de translocación de protones. Esto creemos debilita aún más el mecanismo indirecto de acoplamiento sugerido en las rutas alternativas de bombeo de protones propuestas por Tsukihara y col. (1995 y 1996). Posiblemente las diferencias estructurales de las diversas oxidasas se vean reflejadas como variaciones al diseño molecular de catálisis y de translocación de protones de las enzimas, más que en cambios radicales en el mecanismo de su funcionamiento.**
- 3) La capacidad de la citocromo oxidasa *cbb₃* de *R. sphaeroides* para translocar protones sugiere que el papel de esta oxidasa es el de generar energía. No se conoce cual podría ser la función de esta oxidasa durante el proceso fotosintético, pero cualquiera que esta sea, no es esencial.**
- 4) Las oxidasas *aa₃* y *cbb₃* son las únicas citocromo c oxidasas del sistema respiratorio de *R. sphaeroides*.**
- 5) Las tres oxidasas, *aa₃*, *cbb₃* y *bb₃*, son capaces de translocar protones con una misma eficiencia de 1 H⁺/e⁻. Este hallazgo confirma la enorme capacidad que esta bacteria tiene para crecer bajo diversas condiciones ambientales, en este caso con el solo uso de su muy eficiente sistema respiratorio.**

6. PERSPECTIVAS.

En los últimos años ha habido un gran avance en el conocimiento de las oxidasas respiratorias. Se cuenta ya con la descripción de la estructura cristalina de dos citocromo *c* oxidasas del tipo aa_3 , lo cual ha permitido tratar de dilucidar las rutas de acceso de los distintos tipos de protones, del oxígeno y la ruta de salida de agua. También ha habido avances respecto al entendimiento del mecanismo de catálisis de estas enzimas; sin embargo, aún queda muchas interrogantes por contestar.

El análisis genético y bioquímico de distintas oxidasas seguramente ayudará a mejorar el conocimiento de los elementos que son importantes y/o esenciales para la función de reducción del oxígeno y de la translocación de protones que llevan a cabo estas importantes enzimas.

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

7. REFERENCIAS.

- Anthony C. The c-type cytochromes of methylotrophic bacteria. *Biochim Biophys Acta* (1992) 1099:1-15.
- Barquera B, Toledo-Cuevas M, Finel M, Wisktröm M, Garcia-Horsman JA. Properties of the quinol oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta* (1996) EBEC Short Reports 9:79.
- Blackburn NJ, Barr ME, Woodruff WH, van der Oost J, de Vries S. Metal-metal bonding in biology: EXAFS evidence for a 2.5 Å copper-copper bond in the Cu_A center of cytochrome oxidase. *Biochemistry* (1994) 33:10401-10407.
- Bombelka E, Richter FW, Stroh A, Kadenbach B. Analysis of the Cu, Fe, and Zn contents in cytochrome c oxidases from different species and tissues by proton-induced x-ray emission (PIXE). *Biochem Biophys Res Commun* (1986) 140:1007-1014.
- Buse G, Steffens GCM. Cytochrome c oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Protein, Chemical, Structural, and Evolutionary aspects. *J Bioenerg Biomembr* (1991) 23:269-289.
- Capaldi RA. Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem* (1990) 59: 569-596.
- Caughey WS, Smythe GA, O'Keeffe DH, Maskasky JE, Smith ML. Heme A of cytochrome c oxidase. Structure and properties: comparisons with hemes B, C, and S and derivatives. *J Biol Chem* (1975) 250: 7602-7622.
- Chan HTC & Anthony C. The o-type oxidase of the acidophilic methylotroph *Acetobacter methanolicus*. *J Gen Microbiol* (1991)137: 693-704.
- Chan SI & Li PM. Cytochrome c oxidase: understanding nature's design of a proton pump. *Biochemistry* (1990) 29: 1-12.
- de Gier J-WL, Lübben M, Reijnders WNM, Tipker CA, Slotboom D-J, van Spanning RJM, Stouthamer AH, van der Oost J. The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. *Mol. Microbiol* (1994) 13: 183-196.
- de Gier J-WL, Schepper M, Reijnders WNM, van Dyck SJ, Slotboom DJ, Warne A, Saraste M, Krab K, Finel M, Stouthamer AH, van Spanning RJM, van der Oost J. Structural and functional analysis of aa₃-type and cbb₃-type

- cytochrome *c* oxidases of *Paracoccus denitrificans* reveals significant differences in proton-pump desing. *Mol Microbiol* (1996) 20: 1247-1260.
- Einarsdóttir O & Caughey WS. Bovine heart cytochrome *c* oxidase preparations contain high affinity binding sites for magnesium as well as for zinc, copper and heme iron. *Biochem Biophys Res Commun* (1985) 129: 840-847.
- Elliott EJ & Anthony C. The interaction between methanol dehydrogenase and cytochrome *c* in the acidophilic methylotroph *Acetobacter methanolicus*. *J Gen Microbiol* (1988) 134: 369-377.
- Ferguson-Miller, S. Mammalian cytochrome *c* oxidase, a molecular monster subdued. *Science* (1996) 272: 1125.
- Fetter JR, Qian J, Shapleigh J, Thomas JW, García-Horsman A, Schmidt E, Hosler J, Babcock GT, Gennis RB, Ferguson-Miller S. Possible proton relay pathways in cytochrome *c* oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92: 1604-1608.
- Fischer H-M. Genetic regulation of nitrogen fixation in Rhizobia. *Microbiol Rev* (1994) 58:352-386.
- Froud SJ & Anthony C. The purification and characterization of the *o*-type cytochrome oxidase from *Methylophilus methylotrophus*, and its reconstitution into a "methanol oxidase" electron transport chain. *J Gen Microbiol* (1984)130: 2201-2212.
- García-Horsman¹ JA, Barquera B, Rumbley J, Ma J, Gennis RB. The superfamily of heme- copper respiratory oxidases. *J Bacteriol* (1994) 176: 5587-5600.
- García-Horsman² JA, Berry E, Shapleigh JP, Alben JO, Gennis RB. A novel cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* that lacks Cu_A. *Biochemistry* (1994) 33: 3113-3119.
- García-Horsman JA, Puustinen A, Gennis RB, Wikström M. Proton transfer in cytochrome *bo*₃ ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* : second-site mutations in subunit i that restore proton pumping in the mutant Asp135→Asn. *Biochemistry* (1995) 34: 4428-4433.
- Gennis RB, Casey RP, Azzi A, Ludwig B. Purification and characterization of the cytochrome *c* oxidase from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Eur J Biochem* (1982) 125: 189-195.

- Gennis R & Ferguson-Miller S. Structure of cytochrome *c* oxidase, energy generator of aerobic life. *Science* (1995) 269: 1063-1064.
- Gennis RB. Prokaryotic models for mitochondrial cytochrome *c* oxidase. *Biochem Soc Trans* (1993) 21: 992-998.
- Gray KA, Grooms M, Myllykallio H, Moomaw C, Slaughter C, Daldal F. *Rhodobacter capsulatus* contains a novel *cb*-type cytochrome *c* oxidase without a Cu_A center. *Biochemistry* (1994) 33: 3120-3127.
- Haltia T. Reduction of Cu_A induces a conformational change in cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochim Biophys Acta* (1992) 1098: 343-350.
- Hill J, Goswitz VC, Calhoun M, Garcia-Horsman JA, Lemieux L, Alben JO, Gennis RB. Demonstration by FTIR that the *bo*-type ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* contains a heme-copper binuclear center similar to that in cytochrome *c* oxidase and that proper assembly of the binuclear center requires the *cyoE* gene product. *Biochemistry* (1992) 31: 11435-11440.
- Hofacker I, Schulten K. Oxygen and proton pathways in cytochrome *c* oxidases. *Proteins* (1998) 30: 100-107.
- Hosler JP, Fetter J, Tecklenburg MMJ, Espe M, Lerma C, Ferguson-Miller S. Cytochrome *aa*₃ of *Rhodobacter sphaeroides* as a model for mitochondrial cytochrome *c* oxidase. *J Biol Chem* (1992) 267: 24264-24272.
- Hosler JP, Espe MP, Zhen Y, Babcock GT, Ferguson-Miller S. Analysis of site-directed mutants locates a non-redox-active metal near the active site of cytochrome *c* oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* (1995) 34: 7586-7592.
- Hunter DJB, Brown KR, Pettigrew GW. The role of cytochrome *c*₄ in bacterial respiration. Cellular location and selective removal from membranes. *Biochem J* (1989) 262:233-240.
- Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel H. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* (1995) 376: 660-669.
- Keefe RG & Maier RJ. Purification and characterization of an O₂-utilizing cytochrome-*c* oxidase complex from *Bradyrhizobium japonicum* bacteroid membranes. *Biochim Biophys Acta* (1993) 1183: 91-104.

- King K-T & Drews G. Isolation and partial characterization of the cytochrome oxidase from *Rhodopseudomonas palustris*. *Eur J Biochem* (1976) 68: 5-12.
- Konstantinov AA, Siletsky S, Mitchell D, Kaulen A, Gennis RB. The roles of the two proton input channels in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94: 9085-9090.
- Kranz RG & Gennis RB. Immunological investigation of the distribution of cytochromes related to the two terminal oxidases of *Escherichia coli* in other gram-negative bacteria. *J Bacteriol* (1985) 161: 709-713.
- Lappalainen P, Aasa R, Malmström BG, Saraste M. Soluble Cu_A-binding domain from the *Paracoccus* cytochrome *c* oxidase. *J Biol Chem* (1993) 268: 26416-26421.
- Lappalainen P, Watmough NJ, Greenwood C, Saraste M. Electron transfer between cytochrome *c* and the isolated Cu_A domain: identification of substrate-binding residues in cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry* (1995) 34: 5824-5830.
- Lauraeus M & Wikström M. The terminal quinol oxidase of *Bacillus subtilis* have different energy conservation properties. *J Biol Chem* (1993) 268: 11470-11473.
- Lauraeus M, Morgan JE, Wikström M. Peroxy and ferryl intermediates of the quinol-oxidizing cytochrome *aa*₃ from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* (1993) 32: 2664-2670.
- Ludwig B. Cytochrome *c* oxidase in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* (1987) 46:41-56.
- Malmström BG & Aasa R. The nature of the Cu_A center in cytochrome *c* oxidase. *FEBS Lett* (1993) 325: 49-52.
- Mandon K, Kaminski PA, Elmerich C. Functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*. *J Bacteriol* (1994) 176: 2560-2568.
- Matsushita K, Shinagawa E, Adachi O, Ameyama M. o-type cytochrome oxidase in the membrane of aerobically grown *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* (1982) 139: 255-258.

- Mitchell DM, Fetter JR, Mills DA, Ädelroth P, Pressler MA, Kim Y, Aasa R, Brzezinski P, Malmström BG, Alben JO, Babcock GT, Ferguson-Miller S, Gennis RB. Site-directed mutagenesis of residues lining a putative proton transfer pathway in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* (1996) 35:13089-13093.
- Morgan JE, Verkhovsky MI, Wikström M. The histidine cycle: a new model for proton translocation in the respiratory heme-copper oxidases. *J Bioenerg Biomembr* (1994) 26: 599-608.
- Musser SM, Stowell MHB, Chan SI. Comparison of ubiquinol and cytochrome *c* terminal oxidases. An alternative view. *FEBS Lett* (1993) 327: 131-136.
- Nagata K, Tsukita S, Tamura T, Sone N. A *cb*-type cytochrome-*c* oxidase terminates the respiratory chain in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* (1996) 142: 1757-1763.
- Poole RK. Oxygen reactions with bacterial oxidases and globins: binding, reduction and regulation. *Antonie van Leeuwenhoek* (1994) 65: 289-310.
- Preisig O, Anthamatten D, Hennecke H. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90: 3309-3313.
- Preisig O, Zufferey R, Thöny-Meyer L, Appleby CA, Hennecke H. A high-affinity *cbb*₃-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* (1996) 178: 1532-1538.
- Puustinen A, Finel M, Virkki M, Wikström M. Cytochrome *o* (*bo*) is a proton pump in *Paracoccus denitrificans* and *Escherichia coli*. *FEBS Lett* (1989) 249: 163-167.
- Puustinen A, Finel M, Haltia T, Gennis RB, Wikström M. Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*. *Biochemistry* (1991) 30: 3936-3942.
- Puustinen A, Verkhovsky MI, Morgan JE, Belevich NP, Wikström M. Reaction of the *Escherichia coli* quinol oxidase cytochrome *bo*₃ with dioxygen: the role of a bound ubiquinone molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 93: 1545-1548.
- Raitio M & Wikström M. An alternative cytochrome oxidase of *Paracoccus denitrificans* functions as a proton pump. *Biochim Biophys Acta* (1994) 1186: 100-106.

- Richter O-MH, Tao J-S, Turba A, Ludwig B. A cytochrome *ba₃* functions as a quinol oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Purification, cloning, and sequence comparison. *J Biol Chem* (1994) 269: 23079-23086.
- Riistama S, Puustinen A, Garcia-Horsman A, Iwata S, Michel H, Wikström M. Channelling of dioxygen into the respiratory enzyme. *Biochim Biophys Acta* (1996) 1275: 1-4.
- Riistama S, Hummer G, Puustinen A, Dyer RB, Woodruff WH, Wikström M. Bound water in the proton translocation mechanism of the haem-copper oxidases. *FEBS Lett* (1997) 414: 275-280.
- Rizzuto R, Sandona D, Brini M, Capaldi RA, Bisson R. The most conserved nuclear-encoded polypeptide of cytochrome *c* oxidase is the putative zinc-binding subunit: primary structure of subunit V from the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta* (1991) 1129: 100-104.
- Saiki K, Mogi T, Anraku Y. Heme O biosynthesis in *Escherichia coli*: the *CYOE* gene in the cytochrome *BO* operon encodes a protoheme IX farnesyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* (1992) 189: 1491-1497.
- Saraste M. Structural features of cytochrome oxidase. *Quarterly Rev Biophys* (1990) 23:331-366.
- Schlüter A, Rüberg S, Krämer M, Weidner S, Priefer UB. A homolog of the *Rhizobium meliloti* nitrogen fixation gene *fixN* is involved in the production of a microaerobically induced oxidase activity in the phytopathogenic bacterium *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* (1995) 247: 206-215.
- Shapleigh JP, Hill JJ, Alben JO, Gennis RB. Spectroscopic and genetic evidence for two heme-Cu-containing oxidases in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* (1992) 174: 2338-2343.
- Shapleigh JP & Gennis RB. Cloning, sequencing and deletion from the chromosome of the gene encoding subunit I of the *aa₃*-type cytochrome *c* oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* (1992) 6: 635-642.
- Skulachev VP. The laws of cell energetics. *Eur J Biochem* (1992) 208: 203-209.
- Spiro S. The FNR family of transcriptional regulators. *Antonie van Leeuwenhoek* (1994) 66: 23-36.

- Steffens GCM, Biewald R, Buse G. Cytochrome *c* oxidase is a three-copper, two-heme-A protein. *Eur J Biochem* (1987) 164: 295-300.
- Steffens GCM, Soulimane T, Wolff G, Buse G. Stoichiometry and redox behaviour of metals in cytochrome-*c* oxidase. *Eur J Biochem* (1993) 213: 1149-1157.
- Tamegai H & Fukumori Y. Purification, and some molecular and enzymatic features of a novel *ccb*-type cytochrome *c* oxidase from a microaerobic denitrifier, *Magnetospirillum magnetotacticum*. *FEBS Lett* (1994) 347: 22-26.
- Thomas JW, Puustinen A, Alben JO, Gennis RB, Wikström M. Substitution of asparagine for aspartate-135 in subunit I of the cytochrome *bo* ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* eliminates proton-pumping activity. *Biochemistry* (1993) 32: 10923-10928.
- Thöny-Meyer¹ L, Loferer H, Ritz D, Hennecke H. Bacterial genes and proteins involved in the biogenesis of *c*-type cytochromes and terminal oxidases. *Biochim Biophys Acta* (1994) 1187: 260-263.
- Thöny-Meyer² L, Beck C, Preisig O, Hennecke H. The *ccoNOQP* gene cluster codes for a *cb*-type cytochrome oxidase that functions in aerobic respiration of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Microbiol* (1994) 14: 705-716.
- Toledo-Cuevas M, Barquera B, Gennis RB, Wikström M, Garcia-Horsman JA. The *ccb₃*-type cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*, a proton-pumping heme-copper oxidase. *Biochim Biophys Acta* (Accepted).
- Trumpower BL & Gennis RB. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: The enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annu Rev Biochem* (1994) 63: 675-716.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* (1995) 269: 1069-1074.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* (1996) 272: 1136-1144.

- Uden G & Trageser M. Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: control of anaerobic respiration by the FNR protein. *Antonie van Leeuwenhoek* (1991) 59: 65-76.
- Vanlerberghe GC & McIntosh L. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* (1997) 48: 703-734.
- van Spanning RJM, de Boer APN, Reijnders WNM, de Gier J-WL, Delorme CO, Stouthamer AH, Westerhoff HV, Harms N, van der Oost J. Regulation of oxidative phosphorylation: the flexible respiratory network of *Paracoccus denitrificans*. *J Bioenerg Biomembr* (1995) 27:499-512.
- Varotsis C, Babcock GT, Garcia-Horsman JA, Gennis RB. Resonance raman spectroscopy of the heme groups of cytochrome *cbb₃* in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Phys Chem* (1995) 99: 16817-16820.
- Verkhovskaya ML, Garcia-Horsman A, Puustinen A, Rigaud J-L, Morgan JE, Verkhovsky MI & Wikström M. Glutamic acid 286 in subunit I of cytochrome *bo₃* is involved in proton translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94:10128-10131.
- Visser JM, de Jong GAH, de Vries S, Robertson LA, Kuenen JG. *cbb₃*-type cytochrome oxidase in the obligately chemolithoautotrophic *Thiobacillus* sp. W5. *FEMS Microbiol Lett* (1997) 147: 127-132.
- Wang J, Gray KA, Daidal F, Rousseau DL. The *cbb₃*-type cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter capsulatus* contains a unique active site. *J Am Chem Soc* (1995) 117: 9363-9364.
- Wikström M, Bogachev A, Finel M, Morgan JE, Puustinen A, Raitio M, Verkhovskaya M, Verkovsky MI. Mechanism of proton translocation by the respiratory oxidases. The histidine cycle. *Biochim Biophys Acta* (1994) 1187: 106-111.
- Wikström MKF. Proton pump coupled to cytochrome *c* oxidase in mitochondria. *Nature* (1977) 266: 271-273.
- Williams RJP. Purpose of proton pathways. *Natura* (1995) 376: 643.
- Witt H, Zickermann V, Ludwig B. Site-directed mutagenesis of cytochrome *c* oxidase reveals two acidic residues involved in the binding of cytochrome *c*. *Biochim Biophys Acta* (1995) 1230: 74-76.

- Woodruff WH. Coordination dynamics of heme-copper oxidases. The ligand shuttle and the control and coupling of electron transfer and proton translocation. *J Bioenerg Biomembr* (1993) 25: 177-188.
- Yang T, O'Keefe D, Chance B. The oxidation-reduction potentials of cytochrome *o* +_{c4} and cytochrome *o* purified from *Azotobacter vinelandii*. *Biochem J* (1979) 181: 763-766.
- Yang T Y & Jurtshuk Jr P. Studies on the red oxidase (cytochrome *o*) of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem Biophys Res Commun* (1978) 81: 1032-1039.
- Yun C-H, Beci R, Crofts AR, Kaplan S, Gennis RB. Cloning and DNA sequencing of the *fbc* operon encoding the cytochrome *bc₁* complex from *Rhodobacter sphaeroides*. Characterization of the *fbc* deletion mutants and complementation by a site-specific mutational variant. *Eur J Biochem* (1990) 194: 399-411.
- Yun C-H, Barquera B, Iba K, Takamiya K-i, Shapleigh J, Crofts AR, Gennis RB. Deletion of the gene encoding cytochrome *b₅₆₂* from *Rhodobacter sphaeroides*. *FEMS Microbiol Lett* (1994) 120: 105-110.
- Zeilstra-Ryalls JH & Kaplan S. Aerobic and anaerobic regulation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: the role of the *fnrL* gene. *J Bacteriol* (1995) 177: 6422-6431.
- Zickermann I, Tautu OS, Link TA, Korn M, Ludwig B, Richter O-MH. Expression studies on the *ba₃* quinol oxidase from *Paracoccus denitrificans*. A *bb₃* variant is enzymatically inactive. *Eur J Biochem* (1997) 246:618-624.
- Zufferey R, Preisig O, Hennecke H, Thöny-Meyer L. Assembly and function of the cytochrome *cbb₃* oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biol Chem* (1996) 271: 9114-9119.
- Zufferey R, Hennecke H, Thöny-Meyer L. Heme C incorporation into the *c*-type cytochromes FixO and FixP is essential for assembly of the *Bradyrhizobium japonicum* *cbb₃*-type oxidase. *FEBS Lett* (1997) 412: 75-78.