

00562

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA  
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

PAPEL DE LA MENAQUINONA EN LA INACTIVACION  
DEL SISTEMA RESPIRATORIO DE LA ESPORA DE  
Bacillus cereus.

Tesis que para obtener el grado de  
Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica)  
presenta la Q. BLANCA LILIA BARQUERA ALCALDE.

1988

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## SUMMARY

A clear explanation for the inactivation of the forespore respiratory system of Bacillus species during late sporulation stages is still lacking. Our studies in B. cereus showed that dormant spores still contain good levels of functional dehydrogenases and cytochromes.

Here evidence is presented suggesting that the inactivation of the forespore respiratory system could be due to a major decrease in the content of endogenous menaquinone (2-methyl 3-farnesyl digeranyl 1,4 naphthoquinone, MK-7; it can be restored (NADH-oxidase) by the addition of menaquinone analogs such as menadione (Vitamin K<sub>3</sub>; 2-methyl-1,4 naphthoquinone). Thus, electron flow in the dormant spore is arrested at the menaquinone level.

During germination, the capacity for NADH oxidation is restored and it is accompanied by a significant increase in the menaquinone levels.

## RESUMEN

No existe una explicación satisfactoria de como ocurre la inactivación del sistema respiratorio (S.R.) de la endospora en Bacillus. Los estudios previos demuestran que las esporas latentes contienen niveles relativamente altos de deshidrogenasas y citocromos.

En el presente trabajo se aporta evidencia que indica que la inactivación del S.R. de la endospora se debe al decremento en el contenido de menaquinona (2-metil 3 farnesil digeranil 1,4-naftoquinona, MQ-7), por lo que el flujo de electrones en la espora latente esta detenido a nivel de MQ. Es posible reconstituir la actividad de NADH oxidasa, en una preparación de membranas, por la adición de menadiona (2-metil 1,4 naftoquinona, análogo de MQ).

Cuando la germinación de la espora se lleva a cabo, la capacidad para oxidar al NADH se regenera paralelamente a un incremento significativo de la concentración de Menaquinona.

## INTRODUCCION

Los eventos por medio de los cuales una bacteria pasa a ser una espora, que posee una baja o nula actividad metabólica, son sumamente complejos. Dichos eventos consisten en una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que capacitan a la célula para resistir condiciones ambientales extremas.

Aunque desde hace casi un siglo se ha venido estudiando el mecanismo de la latencia y de como se preserva, se puede decir que no se entienden todavía los eventos bioquímicos necesarios que acompañan la maduración de la espora y su mantenimiento en un estado que se puede considerar como programado para la germinación.

El proceso de diferenciación en la espora está relacionado con el metabolismo oxidativo. Al inicio de la esporulación, cuando la fuente de carbono fermentable se ha agotado, la glucólisis se detiene y la célula esporulante depende por completo del ciclo de Krebs y de la respiración (Freese, 1981).

La etapa esporulante se caracteriza por una alta actividad metabólica, para proveer a la espora en formación, de los constituyentes que le permiten formar una estructura latente. La célula esporulante está constituida por dos compartimentos perfectamente diferenciados morfológica y bioquímicamente, que son la célula madre y la endospora.

Como se mencionó anteriormente, la célula esporulante depende

energéticamente del ciclo de Krebs y de la respiración, siendo las máximas actividades en las etapas iniciales de la esporulación. Por ejemplo, la actividad de la NADH oxidasa fué de 390  $\mu$ ngramos átomo de O/ min/mg proteína, la TMPD-oxidasa fué de 120 nmoles de DCFIP reducido/min/mg proteína, así mismo la deshidrogenasa de NADH tuvo su nivel más alto que es de 300 nmoles de Dicloro fenol indofenol (DCFIPred)/min/mg proteína. Las concentraciones de los citocromos estuvieron entre 0.07 y 0.1 nmol/mg proteína. (Escamilla, et.al. 1986). Estas actividades respiratorias son las más altas que se pueden encontrar para el Sistema Respiratorio en la célula esporulante.

A partir de  $t_3$ , (indica 3 horas posteriores al inicio de la esporulación), es posible separar y purificar los compartimientos de la célula madre de la endospora y medir las actividades respiratorias asociadas a cada tipo de membrana. Cuando se midieron las actividades del Sistema Respiratorio asociadas a estas membranas, se observó que la actividad de NADH oxidasa de las membranas de la endospora cayó bruscamente a partir  $t_{1.5}$ , este descenso llegó al nivel más bajo en las membranas de la espora madura (la actividad cayó aproximadamente 20 veces), ver fig.1 y Tabla 1. (Escamilla, et.al., 1986). Por otra parte el decremento de la actividad de TMPD-oxidasa fue considerablemente menor y se puede decir que se mantuvo constante a lo largo de la esporulación y aún en la espora latente. En el caso de la NADH deshidrogenasa, ésta cayó prácticamente a la mitad en la espora con respecto a la etapa esporulante  $\approx t_{3.0}$ .

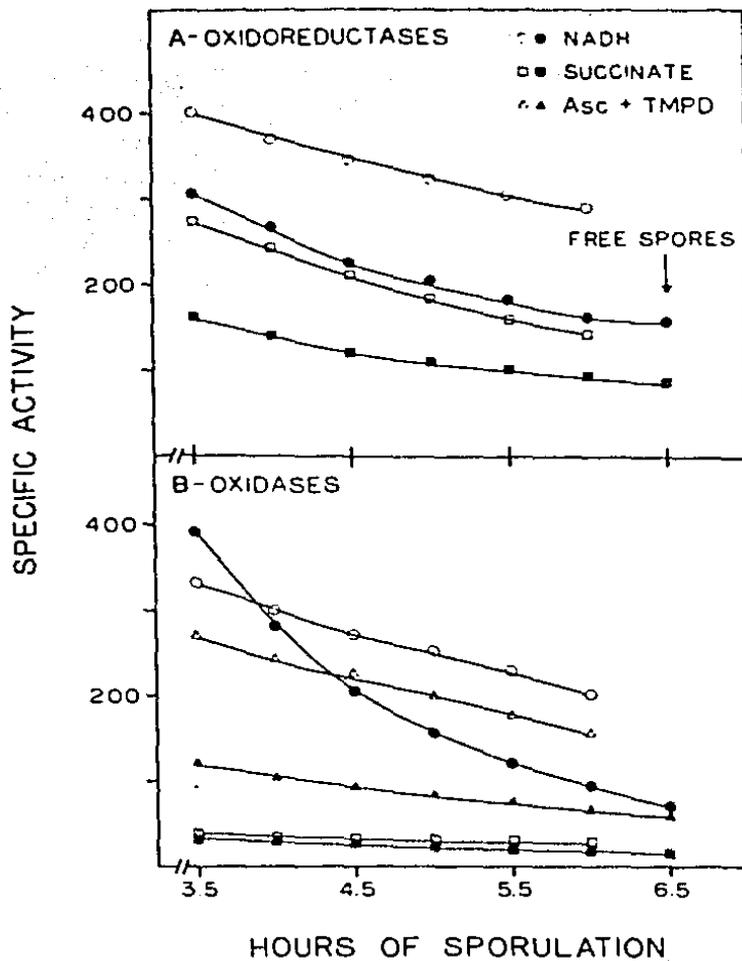


FIG. 1. ACTIVIDADES RESPIRATORIAS ASOCIADAS A LAS MEMBRANAS DE CELULA MADRE (○, □, △) Y ENDOSPORA (●, ■, ▲). *Bacillus cereus*, DURANTE EL CURSO DE LA MADURACION

Las actividades de oxidoreductasas (a) están expresadas como unidades de DCFIP por miligramo proteína. Las oxidasas (b) como unidades de O<sub>2</sub> por miligramo proteína. (Estadilla, et al., 1968).

TABLA 1. COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES RESPIRATORIAS ESPECIFICAS Y CONCENTRACIONES DE CITOCROMOS DE LAS ESPORAS LATENTES Y CELULAS ESPORULANTES T<sub>3</sub> DE Bacillus cereus.

ENSAYO ENZIMATICO	Sp act (a)		Relación
	Endosporas	Esporas	
<b>Oxidoreductasas:</b>			
NADH	300	140	0.46
<b>Oxidasas:</b>			
NADH	390	19	0.05
Ascorbato-TMPD	120	55	0.45
<b>Citocromos: (b)</b>			
aa <sub>3</sub>	0.07	0.05	0.71
b <sub>559</sub>	0.36	0.27	0.75
c <sub>550</sub>	0.27	0.22	0.81
o-CO	0.120	0.10	0.83
a <sub>3</sub> -CO	0.10	0.07	0.70

(a) Las actividades específicas de las oxidoreductasas y de las oxidasas están expresadas de la misma forma que en la fig.1.

(b) La concentración de los citocromos está expresada como nmoles/mg proteína.

Si observamos ahora el comportamiento de las membranas de la célula madre, se puede notar que las actividades de oxidasas, tanto de NADH como de TMPD cayeron de manera paulatina. NADH oxidasa cayó  $\approx$  de 350 a 250 y la TMPD oxidasa  $\approx$  de 290 a 200. De la misma forma, los niveles de la deshidrogenasa de NADH bajaron de 400 a aproximadamente 300.

A partir de estos datos se puede sugerir que existe una inactivación del S.R. del esporangio que ocurre de manera diferencial. Es decir, el decremento de actividad respiratoria está estrechamente relacionado al medio ambiente que rodea cada compartimento y a sus características intrínsecas. Cuando la espora es totalmente madura, la actividad respiratoria se da en su mínima expresión, precisamente como resultado de un proceso de inactivación específico.

A pesar de que a partir del estadio t<sub>4</sub>, la concentración de coenzimas reducidas es muy baja, lo que podría ser suficiente para mantener nula la actividad respiratoria, (Setlow y Setlow, 1977a), no parece ser que la baja actividad de oxidación del NADH se deba solo a la carencia de sustratos.

Se puede considerar que la caída en la respiración de la espora es un proceso de inactivación porque cuando se aislan las membranas de la espora, estas son incapaces de oxidar al NADH aunque mantengan niveles relativamente altos de los componentes de la cadena (como la NADH deshidrogenasa y citocromos), (Escamilla, et.al., 1986).

Lo que se puede suponer es que falta la conexión entre la

NADH deshidrogenasa y los citocromos en las membranas de las esporas maduras. En particular, porque cuando las esporas germinan la actividad de NADH oxidasa se incrementa de manera importante. Esto no se modifica por la inclusión el medio de germinación de un inhibidor de síntesis de proteínas (Wilkinson, et.al., 1977).

En la germinación, los piridin nucleótidos reducidos aumentan y por lo tanto se genera sustrato para la cadena.

Con estos datos en mente cabe preguntarse: ¿Qué sucede en las membranas de las esporas durante el proceso de maduración de la endospora, para que la actividad respiratoria descienda hasta 20 veces sin que los componentes, como la deshidrogenasa de NADH y los citocromos cambien notablemente su concentración?

Puede entonces plantearse un mecanismo de inactivación que preferentemente ocurra en la endospora, este mecanismo hace que al final de la esporulación la espora madura prácticamente carezca de respiración, lo cual contribuye fuertemente a mantener el estado criptico de la espora.

Cuando la germinación se lleva a cabo, también surge la pregunta ¿cómo ocurre la súbita reactivación del S.R.?

Antes de abordar el problema más a fondo y plantear la metodología y los resultados obtenidos, es conveniente explicar los eventos por los cuales una espora se prepara para la germinación (es decir, el proceso de maduración) y por otro lado hablar de manera general de los Sistemas Respiratorios Bacterianos, tal que podamos conjuntar ambos antecedentes hacia

el problema de la inactivación del S.R. en la endospora.

## ESPORULACION

La esporulación se ha dividido arbitrariamente para su estudio en una serie de etapas que involucran cambios fisiológicos y bioquímicos. Dichas etapas abarcan desde el final del crecimiento vegetativo, que coincide con el inicio de la esporulación, hasta la liberación de la espora madura o latente. En las primeras etapas, desde  $t_0$  hasta  $t_2$  ( $t_2$ , indica 3 horas posteriores a la esporulación), se lleva a cabo la formación visible del compartimento que constituirá la espora. A partir de este momento, se producen los cambios que conducen a la maduración de ésta, como la formación de la corteza, cubierta y síntesis de moléculas específicas para la latencia. La maduración corresponde del estado  $t_4$  hasta la liberación. En este proceso la espora acumula varios tipos de moléculas de diversos tamaños aunque la actividad metabólica es nula, ésto debido a la deshidratación del protoplasto y a la acumulación masiva de calcio.

Al final del crecimiento vegetativo se terminan los nutrientes de rápida utilización y se inducen el ciclo de Krebs y la esporulación, la espora en formación depende, por tanto, del aporte energético de la respiración. El recambio de proteínas durante esta etapa es muy alto, pues algunas enzimas específicas se sintetizan mientras otras propias de la fase vegetativa se inactivan y/o se degradan.

A medida que la maduración de la espora se produce, los

cambios en el patrón de proteínas en los compartimientos de la célula madre y de la endospora. Se sabe que la endospora tiene proteínas del transporte de electrones y para el metabolismo de aminoácidos (por ejemplo, la aspartasa) que no se encuentra en la célula madre.

Por otra parte una cantidad relativamente grande de proteínas en la espora latente son las proteínas de bajo peso molecular y solubles en medio ácido (SASP) (Setlow, 1981). Estas proteínas no están presentes en las células en la fase de crecimiento ni en los primeros eventos de la esporulación, sin que se sintetizan en el estado  $t_4$ , siendo su síntesis controlada transcripcionalmente. Las SASP se degradan en los primeros minutos de la germinación y los aminoácidos producidos pueden sostener el metabolismo energético y la síntesis de proteínas.

No es claro si la resistencia al calor depende de la formación normal de la corteza, lo que produce deshidratación del protoplasto o de la producción del complejo Ca-dipicolinato (Piggot y Coote, 1976). Algunos reportes indican que la producción del dipicolinato es esencial para la resistencia, pues mutantes carentes del complejo son termosensibles y cuando se les permite esporular en presencia de dipicolinato recuperan la resistencia (Balasa, et. al., 1979). También se ha propuesto que el dipicolinato de calcio estabiliza ciertas enzimas y al DNA contra la inactivación por calor y otros agentes (Murrell, 1981). Lo que se conoce con seguridad es que ambos mecanismos (la

deshidratación y la formación del dipicolinato) mantienen la latencia.

La deshidratación se regula por el estado físico del peptidoglicano cortical cuyas dimensiones responden al ambiente iónico. El peptidoglicano se hincha o contrae, dependiendo de los contraiones cercanos, así la expansión de la corteza crea presión sobre el protoplasto deshidratado (Dworkin, 1985). Por otro lado la quelación de componentes por el dipicolinato y por cationes ( $Ca^{2+}$ ) estabilizan el sistema en una matriz insoluble.

Si la espora madura se expone a las condiciones adecuadas (en presencia de nucleósidos o aminoácidos) se produce la germinación, la cual convierte a una espora latente en una célula activa. El proceso en términos generales, se ha dividido en: activación, germinación y desarrollo (Dworkin, 1985).

La activación es el condicionamiento reversible de la espora para la germinación, no parece involucrar metabolismo y consiste aparentemente en cambios en la configuración de las moléculas por la entrada masiva de agua.

El primer paso irreversible en la conversión de la espora a una célula vegetativa es la germinación. Esta va acompañada por una rápida degradación de varios tipos de moléculas, pérdida de la resistencia al calor y el incremento de la permeabilidad celular.

La germinación se define arbitrariamente como el periodo en el cual ocurren los eventos que se mantienen por las reservas

endógenas de la espora.

Puesto que la actividad metabólica empieza casi en los primeros minutos de la germinación, se puede esperar que compuestos de alta energía aparezcan en este tiempo. De hecho en E. megaterium, se ha observado la acumulación de ATP, NADH, NADPH y Acetil CoA durante los primeros minutos del proceso. Sin embargo, se ha sugerido que la producción de estos compuestos no es esencial para algunos eventos iniciales de la germinación. La formación de ATP en la espora se lleva a cabo por la fosforilación a nivel de sustrato y la oxidativa a partir de reservas endógenas de la espora (Setlow y Setlow, 1977/c). Estos eventos están relacionados con un rápido consumo de oxígeno en los primeros minutos de la germinación.

La principal fuente de energía con que cuentan las esporas es el 3-fosfoglicerato (3-PGA), el cual es abundante en la espora y desaparece en los primeros minutos de la germinación, en una serie de reacciones que ocurren aún en presencia de inhibidores del metabolismo oxidativo y de inhibidores de la síntesis de RNA o proteínas (Setlow y Kornberg, 1970 b). El 3-PGA puede pasar a piruvato y este reaccionar con CoA para producir acetil CoA y poder reductor en forma de NADH.

La utilización de 3-PGA y la acumulación de ATP son inhibidos por fluoruro, el cual es potente inhibidor de la enolasa. (Setlow y Kornberg, 1970a).

Una segunda fuente de energía endógena son los aminoácidos generados por la degradación de las proteínas SASP. Los

aminoácidos se oxidan para dar NADH dentro de los primeros 20 minutos del evento (Setlow y Primus, 1975).

Se sabe, por otro lado, que en la espora germinada el flujo de carbono ocurre por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y en menor medida por la vía colateral de las hexosas fosfato.

A pesar de que el ciclo de Krebs no es funcional durante la germinación y el desarrollo, las esporas contienen, aún en la forma latente, un sistema respiratorio (S.R), el cual se inactiva durante el proceso de maduración de la endospora (Escamilla, et.al., 1986) y activado solo durante la germinación (Seto-Young y Ellar, 1979; Wilkinson, et.al., 1977). Un componente de la fosforilación oxidativa que podría activar después de la germinación es la H<sup>+</sup>ATPasa (Seto-Young, 1979). Sin embargo, en otros trabajos, no se reporta haber encontrado activación de esta enzima (Dills y Vary, 1978).

Por otro lado, a pesar de la controversia inicial sobre la existencia de citocromos en la espora latente, se han encontrado niveles relativamente altos de citocromos, lo cual hace difícil entender el proceso de inactivación de la NADH oxidasa. Los citocromos que han sido identificados son a<sub>3</sub>, b, c y c<sub>1</sub>, los cuales son capaces de completar su ciclo redox con el uso de donadores artificiales (menadiol, ascorbato-TMPD, etc.) (Tochikubo, 1971; Wilkinson y Ellar, 1975; Escamilla, et.al., 1986).

En varios estudios con inhibidores se han sugerido diferencias funcionales entre las enzimas en las membranas de

espora y las correspondientes a la célula vegetativa. Sin embargo, dichas diferencias no se han definido (Bahnweg y Douthit, 1975; Wilkinson y Ellar, 1975). Se piensa además que los fosfolípidos de la membrana participan en un mecanismo desconocido de reparación. Se cree que las membranas de la espora latente están defectuosas y en el momento de la germinación ocurre la reparación posiblemente de los fosfolípidos, la cual no requiere la síntesis de proteínas y es inhibida parcialmente por KCN (Wilkinson, et.al., 1977).

Con respecto a los piridin-nucleótidos y sulfhidrilos, estos se encuentran en la espora latente en forma oxidada y las especies reducidas son generadas en los primeros minutos de la germinación (Scott, et.al., 1978; Setlow y Kornberg, 1970 a; Setlow y Setlow, 1977b). La reducción NAD y NADP depende en gran parte de las reservas del 3-PGA, aunque parte del NADPH se forma por la fosforilación del NAD preexistente en la espora.

La CoA oxidada se encuentra formando un complejo con proteínas en la espora latente (Setlow y Setlow, 1977 a,c). El enlace disulfuro formado en el complejo CoA-SS-Proteína es roto dentro de los primeros minutos de la germinación por un sistema enzimático (una reductasa) o simplemente por el intercambio con glutatión reducido, aunque no han sido detectados complejos glutatión-proteína en las esporas (Cheng et.al., 1973; Setlow y Setlow, 1977c). Se sugiere que el complejo CoA-SS-Proteína participa en el mantenimiento de la latencia, entre otras cosas por mantener los niveles de CoA libre muy bajos.

## MACROMOLECULAS.

### Proteínas.

Aunque no hay síntesis de proteínas en la espora latente, dado que la espora latente contiene ribosomas defectuosos, los cuales detienen el proceso, además de no existir mensajeros estables. El aparato biosintético es activo en los primeros minutos de la germinación pero posterior a la síntesis de RNA. En el periodo comprendido entre la germinación y el desarrollo, aunque es preferentemente degradativo, se sintetizan varias proteínas, siendo esta síntesis controlada transcripcionalmente. Existen proteínas previas a la síntesis de mensajeros, (posiblemente almacenadas) por ejemplo, proteínas ribosomales, del metabolismo de aminoácidos y nucleótidos, las involucradas en el catabolismo del carbono y las asociadas a la replicación del DNA (Setlow, 1973; Setlow y Kornberg, 1970b).

Además de la síntesis existe una rápida degradación de las proteínas de la espora latente en los primeros minutos de la germinación. La actividad proteolítica es independiente de ATP, síntesis de proteínas y RNA (Setlow, 1975a, b, c.).

### RNA.

Las esporas, a diferencia de otros sistemas latentes, no almacenan RNA mensajeros. La evidencia consiste en que toda la síntesis de proteínas se detiene durante la germinación y el desarrollo si las esporas se germinan en presencia de inhibidores de síntesis de RNA (Sakakibara, et. al., 1965). Aunque se piensa

que la síntesis de los mensajeros funcionales empiece en los primeros minutos de la germinación.

Aún con la información precedente permanece la pregunta de ¿qué es la latencia? La respuesta es sumamente compleja pues hay una serie de eventos que pueden causar en conjunto la baja actividad metabólica: deshidratación del protoplasto, formación de quelatos con calcio y ácido dipicolínico, la caída en la actividad respiratoria y disminución de sustratos: piridín nucleótidos reducidos, CoA libre, etc.

En el contexto del metabolismo oxidativo, la regulación del Sistema Respiratorio juega un papel central en el mantenimiento de la actividad metabólica. Durante la latencia su inactivación debe ser mantenida para evitar el consumo de energía almacenada. Durante la germinación, la reactivación se manifiesta, entre otras cosas, gracias a un gradiente protón motriz que puede ser utilizado para diversos procesos que se llevan a cabo.

## SISTEMAS RESPIRATORIOS BACTERIANOS

Los sistemas respiratorios (S.R.) bacterianos resultan ser sumamente complejos, su expresión depende de factores ambientales y de la capacidad del microorganismo para oxidar sustratos orgánicos o inorgánicos en presencia de oxígeno molecular u otro aceptor final. Todos ellos comparten la característica de encontrarse en la membrana plasmática de las bacterias. Están constituidos por componentes, que al igual que en la mitocondria, se encuentran acomodados de acuerdo a su potencial redox, empezando con un sustrato reducido (que puede provenir de reacciones metabólicas), de bajo potencial hasta llegar al aceptor que es el más electropositivo, con la concomitante liberación de energía libre. Así mismo comparten la característica de tener sitios de acoplamiento, aunque estos son variables y dependientes del tipo de cadena de que se trate. Pero debe decirse que para algunas oxidasas bacterianas no se sabe con certeza si son ó no sitios de acoplamiento. (Jones, 1983).

Por otro lado, los S.R. bacterianos contienen componentes adicionales como las menaquinonas, entre otros, que generalmente se encuentran en las bacterias gram (+) en lugar de la ubiquinona de la cadena. (Haddock y Jones, 1977).

Las cadenas de transporte pueden ser ramificadas a diferencia de la cadena única de la mitocondria. Existen varias rutas alternativas en la célula y se expresan por la influencia de factores externos.

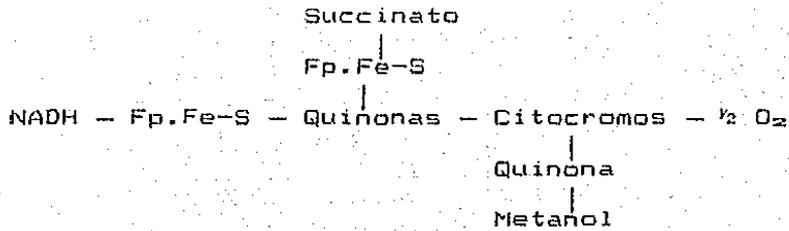
Puede hacerse una clasificación de los diferentes tipos de sistemas respiratorios bacterianos: (ver figura 2). (Haddock y Jones, 1977; Thauer, 1977).

1.- Respiración aerobia en quimioheterótrofos y fotótrofos facultativos, los cuales usan principalmente como sustrato oxidable NADH, succinato o metanol y al oxígeno molecular como aceptor final.

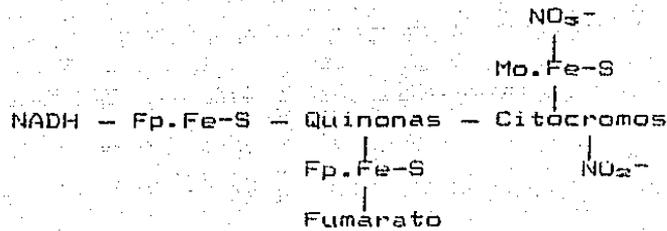
2.- Respiración anaerobia en quimioheterótrofos facultativos y anaerobios estrictos. Pueden reemplazar al  $O_2$  con aceptores alternos como fumarato, nitrato, nitrito, sales de azufre y de  $Fe^{2+}$ ,  $CO_2$ , óxido de trimetilamina, etc. En términos generales las cadenas anaerobias contienen básicamente el mismo tipo de acarreadores redox excepto las citocromos oxidasas que son reemplazadas por reductasas específicas.

3.- Respiración de quimiolitótrofos (Quimioautótrofos). Este tipo de microorganismos oxidan principalmente sustratos inorgánicos usando al oxígeno como el aceptor más importante, aunque pueden usar  $NO_3^-$ . Los donadores mejor caracterizados son  $H_2$ , algunos compuestos de azufre, nitrógeno,  $Fe^{2+}$  y CO. Las cantidades de ATP que pueden producirse en estos sistemas es muy variable y en términos generales se producen cantidades menores de ATP que en otros tipos respiratorios.

1.-



2.-



3.-

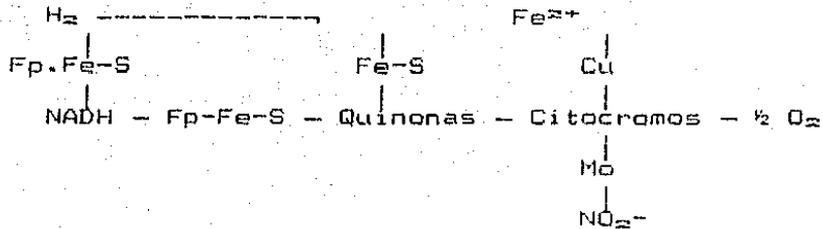


Fig.2 . Tipos respiratorios bacterianos.

- 1.- Quimiheterótrofos y Fotótrofos facultativos.
- 2.- Quimiheterótrofos anaerobios y facultativos.
- 3.- Quimiolitótrofos. (Jones, 1983).

Respiración Aerobia. (Jones, 1983; Haddock y Jones, 1977; Knowles, 1980).

Componentes de la cadena.

a.- Flavoproteínas. Están constituidas por una apoproteína de tamaño variable a la que se une el grupo prostético que puede ser FMN ó FAD.

Ambas flavinas transportan dos hidrógenos en su núcleo de isoaloxazina. Los  $E^{\circ}$  (potenciales estándar a pH 7) son -205 y -219 mV para los pares FMN/FMNH<sub>2</sub> y FAD/FADH<sub>2</sub>, aunque estos valores se modifican un poco cuando se unen a la proteína.

b.- Centros Fe-S. son proteínas que contienen al átomo de fierro covalentemente unido por cisteína. Este fierro se une a otro Fe por uniones de azufre que son lábiles en medio ácido. Estas proteínas pueden contener 2, 4 u 8 átomos de fierro aún cuando cada centro acarrea un solo electrón.

Análisis de las proteínas membranales han demostrado que la NADH deshidrogenasa ( de Paracoccus denitrificans y de Escherichia coli ) contiene un grupo FMN y 4 centros Fe-S de bajo potencial. Mientras que la succinato deshidrogenasa tiene un FAD más 3 centros Fe-S.

c.- Quinonas. (Kröger y Unden, 1983). Generalmente son los componentes que se encuentran entre las deshidrogenasas y los citocromos y son los únicos transportadores redox de naturaleza lipídica en la cadena.

Las quinonas bacterianas pueden ser: Ubiquinona (UQ),

Menaquinona o vitamina K<sub>2</sub> (MQ) y desmetilmenaquinona (DMQ) (ver figura 3). En general la ubiquinona (2,3 dimetoxi-5 metilbenzoquinona, fig. 3.c), se encuentra en las bacterias gram (-), mientras que las naftoquinonas (MQ y DMQ, fig. 3.a y 3.b) forman parte de la cadena de las bacterias gram (+), sin embargo se han encontrado mezclas de ellas en algunas bacterias.

Las bacterias puramente fermentativas, no contienen quinonas incluidas en la membrana plasmática.

Cualquiera de las quinonas puede participar en el transporte de electrones teniendo como aceptor final al oxígeno o nitrato. En el caso de E. coli, en condiciones aerobias sintetiza preferentemente UQ y en el crecimiento microaerofílico se induce la síntesis de MQ, pudiendo usar en condiciones anaerobias al fumarato o al nitrato como aceptores finales.

La diferencia de función entre UQ y MQ puede explicarse por la diferencia de potencial redox:

<u>QUINONA</u>	<u>E'° (mV)</u>
MQ	-74
DMQ	36
UQ	112

Según estos datos solo MQ y DMQ podrían funcionar como par redox en el transporte de electrones hacia fumarato pues UQ no podría ser oxidada por el par fumarato/succinato (E'° 30 mV).

Todas las quinonas comparten la característica de tener una cadena de unidades isoprénicas de largo variable, que puede ir de

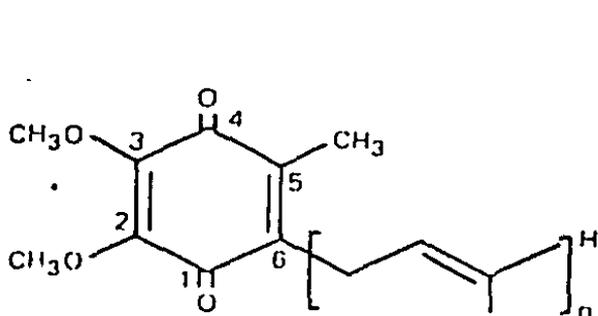
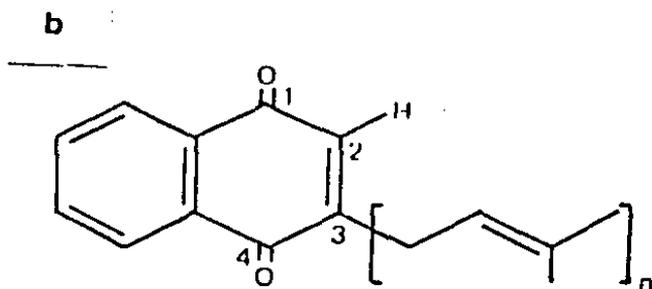
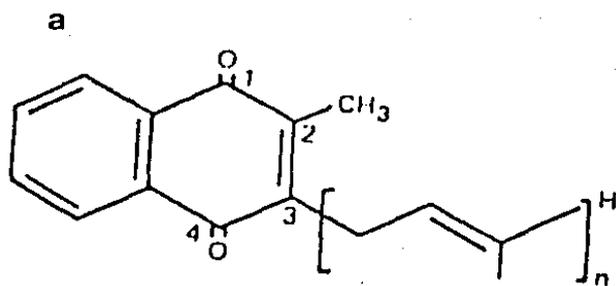


FIGURA 3. ESTRUCTURAS DE LAS NAFTOQUINONAS. (a) MENAQUINONA. (b) DESMETILMENAQUINONA; Y DE LA (c) UBIQUINONA.

2 a 13 unidades, siendo en la mayoría un promedio de 7 a 10 unidades. La estructura de la cadena lateral ha sido útil en la clasificación de bacterias y tiene una influencia predominante en el "anclaje de la quinona" a la fase lipídica de la membrana, permitiéndole alta movilidad.

Por otro lado la cadena de isoprenos no está involucrada en las reacciones de transporte de electrones y no tiene influencia significativa en el valor del potencial redox.

El hecho de que la Quinona sea un componente obligado en el S.R. fué demostrado por varias evidencias independientes:

-Por irradiación con U.V. para la destrucción de la quinona, con la concomitante caída en la actividad respiratoria. Sin embargo este método ha dado resultados inespecíficos. (Sone, 1974; Kröger y Uden, 1985).

-Otro método mucho más eficiente es el de extracción-reincorporación. Así la respiración y la reducción de fumarato, por ejemplo, han demostrado ser dependientes de la presencia de MQ en B. megaterium. (Kröger y Dadak, 1969).

-La forma más clara de conocer la participación de MQ en la cadena de transporte de B. subtilis, fué usando una mutante MQ<sup>-</sup>, la cual es incapaz de oxidar NADH, pero si se agrega un analogo estructuro-funcional como la Menadiona o una Menaquinona se puede reestablecer la respiración. (Bergsma, et.al., 1976).

Finalmente, existe un caso especial de quinona, con características hidrofílicas que funciona como grupo prostético de las deshidrogenasas de metanol, glucosa y metilamina. Esta

quinona también transfiere electrones al sistema terminal de citocromos y es una 4,5 pirroloquinoleína quinona o metoxatina, siendo su potencial parecido al de UQ ( $E_m$  PQQ/PQQH<sub>2</sub> ≈ 150 mV).

d.- Citocromos. Existen identificados cuatro tipos fundamentales de citocromos, a,b,c,d, donde sus grupos prostéticos hemos están unidos a una apoproteína determinada. El átomo central es un Fe<sup>3+</sup> que puede aceptar un solo electrón para dar Fe<sup>2+</sup>. (Jones, 1983).

Los 4 tipos de citocromos difieren básicamente en la naturaleza de los grupos sustituyentes del hemo, teniendo propiedades fisicoquímicas diferentes (como sus espectros de absorción,  $E_m$ , (potencial medio a un pH definido) etc.) que finalmente están determinadas por su estructura individual y de como estén unidos al grupo hemo (ver Tabla I ). Los potenciales van desde -100 hasta 400 mV, sus máximas de absorción van de 550 a 650 nm y los pesos moleculares van de 12000 (algunos b y c) 350000 para la oxidasa d.

Su disposición en la membrana también es variable; mientras que los citocromos c y algunos b son muy hidrofílicos y por tanto son proteínas periféricas, los b en su mayoría y las oxidasas son proteínas intrínsecas de membrana.

Los sistemas de citocromos de las bacterias quimioheterótrofas pueden dividirse en dos grupos: varios citocromos tipo b y c no autooxidables y uno ó más citocromos que son autooxidables, unen CO y que por tanto funcionan como oxidasas terminales (aa<sub>3</sub>, o (ba<sub>2</sub>), d, a<sub>1</sub>, c<sub>oo</sub> y posiblemente

TABLA I. CARACTERISTICAS DE LOS CITOCROMOS DE LAS CADENAS AEROBIAS.

CITOCROMO	GRUPO PROSTETICO	INHIBICION POR:		Em (mV)	PM (Kd)
		CO	CN <sup>-</sup>		
b	Hemo b	-	-	-104 a +110	12-17.5
c	Hemo c	-	-	+190 a +342	12-100
aa <sub>3</sub>	2 Hemos a 2 Cu	++	++	+200a 265 y 360-375 +210	73
o	2 Hemos b	++	+	-122 a 417	28
d	2 Hemos d 2 Hemos b	++	<u>+</u>	+280 +140 y +250	350
a <sub>1</sub>	2 Hemos a	<u>+</u>	++	+160 y +260	--
c <sub>CO</sub>	Hemo c	++	+	+360	12.5
ca	Hemo c 1 a 2 Hemos a 1 Cu	++	++	?	38-118

Tomada de Jones C. Bacterial Respiration and Photosynthesis. (1983). American Soc. for Microbiol. ED. 16pp.

posiblemente ca, aunque esta última se ha encontrado en las bacterias termófilas no se sabe si existe como tal). Las oxidasas varían por su afinidad por el oxígeno, siendo los valores de afinidad:  $d \gg aas \text{ u } o$  (citocromo  $b_{552}$ ). El citocromo  $g$  es una enzima constitutiva en muchos microorganismos (B.cereus, E.coli, etc), que se expresa en cualquier condición de tensión de  $O_2$ . (Escamilla, 1986).

Debe decirse que muy pocas oxidasas han sido purificadas, y no se saben muchas de sus propiedades, por ejemplo, si funcionan como bomba de protones, lo cual ya se confirmó para la oxidasa  $aas$ , (Ludwig, 1980).

Es interesante mencionar que no todas las bacterias aerobias o facultativas pueden sintetizar citocromos, por ejemplo, Streptococcaceae y Lactobacillaceae no lo hacen. Al crecer aeróbicamente, las cadenas respiratorias terminan con una flavinoxidasa, la cual puede reducir  $O_2$  a  $H_2O_2$ . Estas bacterias cuentan además, con una catalasa para reducir el agua oxigenada a  $H_2O$  (Jones, 1983).

Como hemos visto las cadenas respiratorias pueden modificarse fenotípicamente, lo que depende finalmente de las condiciones ambientales a las que se enfrenta la bacteria (calidad y cantidad de nutrientes, la presencia de inhibidores respiratorios o alteraciones en la fuente de carbono o energía y la tensión de oxígeno en condiciones limitantes).

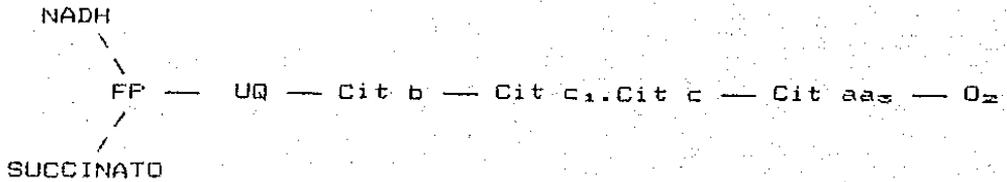
El S.R. puede también modificarse genotípicamente con la formación de mutantes que sean deficientes en algún centro redox,

por ejemplo la mutante de E.coli MQ<sup>-</sup> ya señalada.

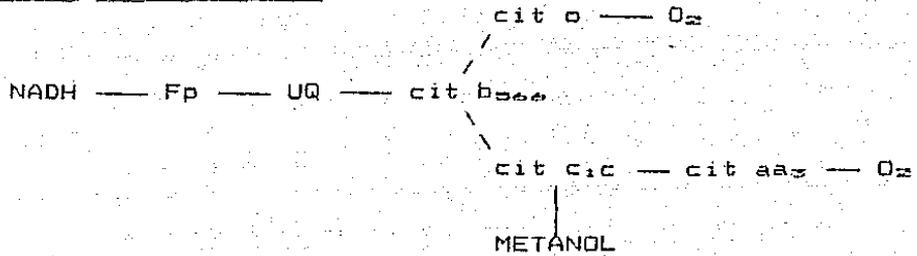
#### Ejemplos de Vias Respiratorias.

Todos los quimioheterotrofos y fotótrofos facultativos presentan una variación considerable en la composición y organización de su S.R.. Todos presentan ramificaciones a nivel de las deshidrogenasas y una o varias oxidasas. Las vias lineales son relativamente raras y limitadas a alguna condición, por ejemplo, E.coli, bajo condiciones aerobias. A continuación se comparan las vias de algunos microorganismos con el sistema de transporte de electrones de la mitocondria. (Haddock y Jones, 1977; Jones, 1983; Thauer et.al., 1977; Stouthamer, 1980).

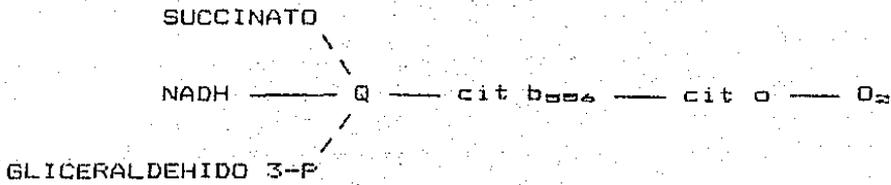
MITOCONDRIA.



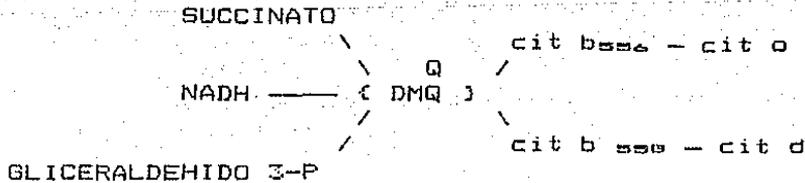
Paracoccus denitrificans



Escherichia coli (aeróbico)



E. coli (microaerofilia)



## ANTECEDENTES

En el laboratorio se ha estudiado el sistema respiratorio (SR) de Bacillus cereus y su expresión durante el desarrollo de la bacteria, de manera especial en el proceso de esporulación. Se ha demostrado que la actividad respiratoria es máxima en el estado esporulante para descender de manera diferencial, a partir de  $t_0$  en la célula madre y en la endospora. En esta última el descenso en la actividad de deshidrogenasas es de apenas el 50% mientras que los citocromos caen a menos de la mitad de su concentración, con respecto a la célula esporulante. En cambio la actividad de NADH oxidasa cae hasta 10 veces en la endospora. Entonces no se puede explicar la baja capacidad para oxidar NADH en un sistema donde los citocromos y las deshidrogenasas son funcionales. (Escamilla, et.al., 1986).

Por otro lado, Wilkinson, et.al. (1977) ha demostrado que las esporas al germinar aumentan su respiración endógena y la actividad de NADH oxidasa en un evento independiente de la síntesis de proteínas, lo que sugiere que la espora latente mantiene su baja o casi nula respiración porque existe un componente de la cadena entre la deshidrogenasa de NADH y los citocromos que se inactiva específicamente.

El único componente del que no se le ha determinado su concentración durante el proceso de esporulación es la quinona; la cual era el único transportador redox no proteico y su síntesis no dependería directamente de la síntesis de proteínas.

Como una primera aproximación se reconstituyó la actividad respiratoria de la espora con un análogo estructuro-funcional de la Menaquinona, la menadiona, obteniéndose que la actividad de oxidasa aumenta hasta 15 veces.

Esto parece indicar que el S.R. de la espora es inactivo porque la deshidrogenasa está desconectada de los citocromos, entonces la menadiona pudiera funcionar como intermediario, lo que podría indicar que esta ocupa el lugar de la Menaquinona.

Por lo tanto se puede plantear la siguiente hipótesis: si es la caída de concentración de la menaquinona la responsable de la inactivación del S.R., entonces se deben encontrar niveles de MQ concordantes con la actividad de NADH oxidasa, en la endospora y cuando esta germina la MQ debe aumentar de manera paralela a la oxidasa.

Resulta necesario entonces probar si la reactivación por menadiona es fisiológica, descartando cualquier artefacto, es decir que la Menadiona ocupa el lugar fisiológico de la MQ.

Además es indispensable conocer lo que sucede a la MQ, ¿Se degrada a lo largo del proceso de maduración o se modifica de tal forma que no participa en el transporte de electrones?

Si se degrada entonces debemos encontrar niveles de MQ, concordantes con la actividad respiratoria y en el momento de la germinación debe volverse a sintetizar para regenerar la actividad de NADH oxidasa.

Es necesario cuantificar la MQ en los diferentes estadios del proceso de maduración de la espora, si es que se modifica la

concentración de MQ puede no cambiar y esto nos llevará a buscar la modificación.

Debemos buscar la MQ en la endospora y en la célula madre para establecer las causas de la inactivación diferencial de la endospora y finalmente correlacionar los niveles de MQ con la actividad de oxidasa y los niveles de citocromos en la espora latente y germinada.

## MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo se usó una cepa silvestre de Bacillus cereus, aislada y caracterizada por Andreoli (Andreoli, et.al., 1973 ).

Cultivo de células.

El medio de cultivo que se utilizó fue el medio G modificado (Hanson, et.al., 1963), el cual contenía:

Sacarosa 0.1 % , como fuente de Carbono.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2 % , como fuente de Nitrógeno.

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 % .

$\text{MgSO}_4$  0.02 % .

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

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

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.005 % .

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

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

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0005 % .

En el caso de obtención de esporas las fuentes de C, N y fosfato se agregaron al doble de concentración.

Los cultivos se hicieron en un fermentador construido por el Centro de Instrumentos, UNAM, con una capacidad de 25 litros usando las siguientes condiciones: Temperatura constante de 30°C, agitación de 200 rpm y un flujo de aire de 10 litros/min. El cultivo en el fermentador se inició con un inóculo que provenía

de cuando menos 4 resiembras en fase logaritmica de crecimiento, cada 3 horas, consiguiendo con esto sincronia en el cultivo. El volumen del inoculo fué de 1 a 4 litros.

El crecimiento del cultivo se siguió midiendo la densidad óptica (DO) a 540 nm cada hora hasta que se alcanzaba la fase de crecimiento deseada. Bajo estas condiciones el final del crecimiento vegetativo era a las 5 horas de cultivo, que coincide con el inicio de la fase de esporulación y es aproximadamente igual a una hora después de haber obtenido el pH más bajo del cultivo (pH 6.2).

Para la obtención de esporas latentes o maduras, el cultivo se cosechó en el momento en que por microscopia de contraste de fases se observaban esporas libres.

Los cultivos se cosecharon en una centrifuga de flujo continuo Sharples Mod T1 y las células se lavaron 3 veces con buffer que contenía: Tris-HCl 50 mM, pH 7.4; MgCl<sub>2</sub> 5mM y CaCl<sub>2</sub> 5 mM. (Buffer TCM).

#### Ruptura y fraccionamiento.

Las células resuspendidas en el buffer TCM en presencia de fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF, inhibidor de proteasas), se rompieron en un fraccionador DYNO-MILL Type KDL con perlas de vidrio de 0.1-0.2 mm de diámetro; el tiempo de ruptura dependió del tipo de células, desde 30 segundos para las células vegetativas y esporulantes hasta 3 y 6 minutos para las esporas germinadas o latentes respectivamente.

El homogenado resultante de la ruptura se centrifugó a 7500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante obtenido en el paso anterior fué centrifugado a 40,000 rpm por 30 minutos, sedimentando así las membranas, las cuales se resuspendieron en buffer TCM y fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de utilización.

#### Determinación de Proteína.

Se usó el método de Lowry (Lowry, et.al., 1951).

#### Ensayos Enzimáticos.

- NADH Deshidrogenasa. (E.C.1.6.99.3) (Lang, et.al., 1972).

La enzima se midió de acuerdo con la siguiente reacción:



En una celda de 1 ml se agregó: (Concentraciones finales).  
Buffer fosfatos 50 mM, pH 7.6; KCN 10 mM; Diclorofenolindofenol (DCPIP)  $8 \times 10^{-5}\text{M}$ ; NADH  $2 \times 10^{-4}\text{M}$ ; agua cbp 1 ml; se registró la basal y se inició la reacción con la adición de membranas (5 mg de proteína/ml). El Coeficiente de extinción molar (CEM) para el DCPIP usado fué de  $21 \text{ mN.cm}^{-1}$ .

-Succinato Deshidrogenasa (E.C.1.3.99.1) (Lang, et.al., 1972).

La reacción que se utilizó para la medición de la actividad fué:

Succinato + FMS  $\xrightarrow{-e^-}$  Fumarato + FMSH<sub>2</sub>

FMSH<sub>2</sub> + DCPIP (azul)  $\xrightarrow{-e^-}$  FMS + DCPIPH<sub>2</sub> (incoloro)

En 3 ml de volumen final se agregó: Succinato de sodio 20 mM, Buffer fosfatos 50 mM, pH 7.6; Fenazina metosulfato (FMS), 1.1 mM; DCPIP 0.08 mM; KCN 0.1 mM; la reacción empezó con la adición de FMS y DCPIP y membranas. El CEM usado para el DCPIP fué de 21 mM.cm<sup>-1</sup>.

#### -Succinato y NADH Oxidasas.

Las actividades se midieron por el consumo de oxígeno en un oxímetro Yellow Springs Mod. 53. El medio de reacción contenía buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.4; membranas (1.5 mg/ml de proteína). Se registró el consumo basal de oxígeno y se agregaron los sustratos, NADH 0.5 mM o Succinato 20 mM.

#### -Citocromo c oxidasa.

La actividad fué estimada polarográficamente usando TMPD y ascorbato como sistema donador de electrones para el citocromo c.

Preparación de la menadiona reducida. (Modificación de Krivankova y Dadak, 1976).

Se disolvieron 0.4 g de menadiona en 7 ml de éter etílico y se colocaron en un embudo de separación que contenía 2 g de NaBH<sub>4</sub> disuelto en 6 ml de agua. La mezcla se agitó durante 2 horas hasta que el color café pasó a amarillo.

A la fase etérea ya separada se le agregaron 5 ml de solución

saturada de NaCl y 0.4 ml de una solución 0.5 g/ml de NaBH<sub>4</sub> y se filtró sobre un papel filtro impregnado de éter que contenía Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El filtrado se evaporó a sequedad, cristalizando la menadiona reducida (menadiol), la cual se lavó con éter de petróleo frío. Se registró el espectro de las especies oxidada y reducida, ver fig.4 .

Extracción de la menaquinona de membranas de Bacillus cereus. (Kröger y Dadak, 1969).

Las membranas de diferentes estadios fueron liofilizadas para la extracción. El liofilizado se resuspendió en 40 ml de una mezcla acetona:éter de petróleo (1:1) y se agitó por 30 minutos a 4°C. Al terminar el tiempo señalado la mezcla se filtró al vacío y el filtrado se secó con un flujo de nitrógeno de alta pureza. Al extracto seco, se le agregaron 5 ml de etanol absoluto y se cuantificó la menaquinona espectrofotométricamente, registrando el espectro de la especie oxidada y el de la reducida.

-Espectro oxidado.

A una alícuota de 40 µl del solubilizado en etanol se le agregaron 100 µl de KOH 5 N y 860 µl de etanol, esta se leyó contra etanol. Se corrió el espectro de 300 a 220 nm, tomando las absorbancias a 265 y 289 nm.

-Espectro reducido.

A una alícuota de 40 µl del solubilizado etanólico se le agregaron 100 µl de NaBH<sub>4</sub> 7 mg/ml y 15 µl de buffer acetatos 1 M pH 5, en este caso se leyó contra 885 µl de etanol y 15 µl de

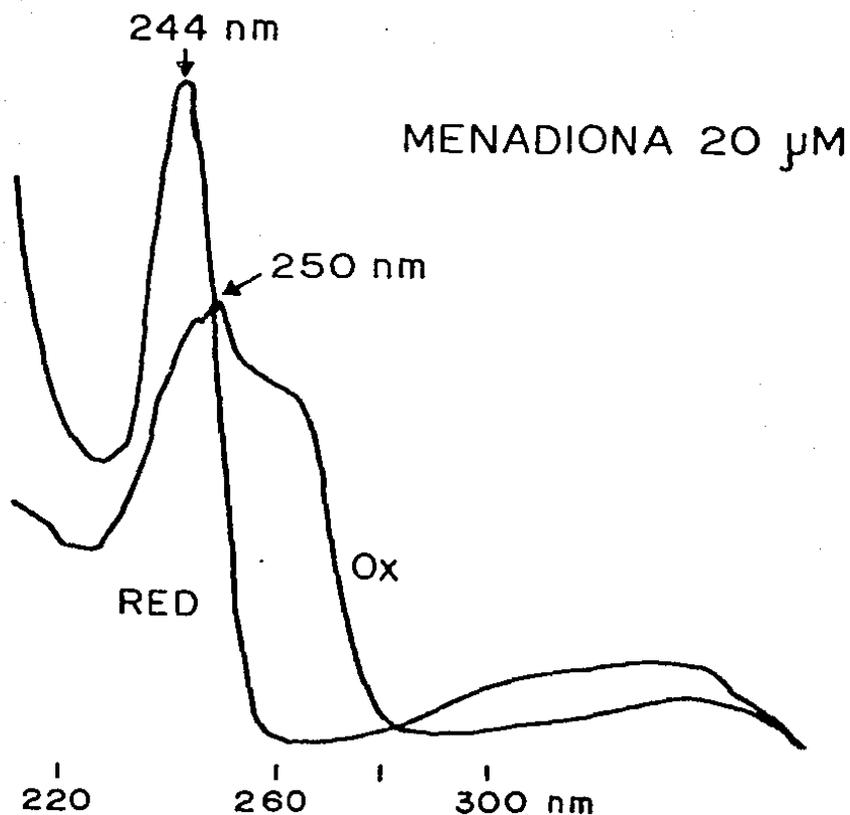


FIGURA 4. ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LA MENADIONA (20 µM) Y DEL MENADIOL.

El Menadiol se obtuvo reduciendo la menadiona con borohidruro de sodio.

Se señalan las máximas características de cada especie.

buffer de acetatos; el espectro se corrió de la misma forma que el espectro oxidado.

Para obtener la cantidad de Menaquinona se usó la siguiente relación:

$$(E_{red} - E_{ox})_{265nm} - (E_{red} - E_{ox})_{267nm} = 14.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}.$$

Germinación de esporas. (Tochikubo, et. al. 1986).

-Activación.

La activación de las esporas se realizó por choque térmico a 80°C por 20 minutos. Se usaron 2 mg/ml de una suspensión liofilizada de esporas.

Las esporas activadas se resuspendieron en agua destilada y como germinantes, se agregó L-Ala y adenosina (20 mM y 1mM concentraciones finales respectivamente), la mezcla se incubó por 20 minutos a 30°C.

La germinación se siguió por 3 métodos diferentes: la observación en el microscopio de contraste de fases, a medida que la germinación ocurre las esporas pasan de ser refringentes a opacas. Esta misma propiedad se usó para medir la caída en DO a 540 nm. Al mismo tiempo se midió el aumento de la respiración endógena en el oxímetro.

Todos los reactivos fueron grado analítico de las casas Sigma, Merck y J.T. Baker.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1.- Reactivación del Sistema Respiratorio de la Espora con Menadiona.

Una primera aproximación para tratar de explicar la baja actividad respiratoria de las esporas, dado que la actividad de NADH deshidrogenasa y citocromos era suficientemente alta, fué adicionar un análogo estructuro-funcional de la menaquinona, la cual era el único componente que no se habia determinado en el sistema. Para esto se midió la actividad de NADH oxidasa en presencia de concentraciones crecientes de menadiona, encontrándose un comportamiento como se muestra en la figura.5 . Podemos observar en la figura que la actividad de la oxidasa aumentó primero linealmente conforme la concentración de la menadiona se incrementa (de 0 a 100  $\mu\text{M}$ ), para después alcanzar la saturación, obteniéndose un valor de actividad máxima alrededor de 20 veces la actividad basal, (la actividad basal de las esporas latentes era entre 6 y 12 nanogramos de  $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  proteína). Esto implicó que el simple hecho de adicionar el análogo de la menaquinona, reactiva al sistema respiratorio de la espora en un fenómeno, que por la saturación parecia ser dependiente del sistema enzimático. De hecho, Konings, (Bergsma, et. al., 1976), al trabajar con mutantes de B. subtilis deficientes en menaquinona, ha demostrado la participación de ciertos analogos (entre ellos la menadiona), en la reconstitución del sistema respiratorio de la bacteria. Parece ser que dichos análogos son más eficientes

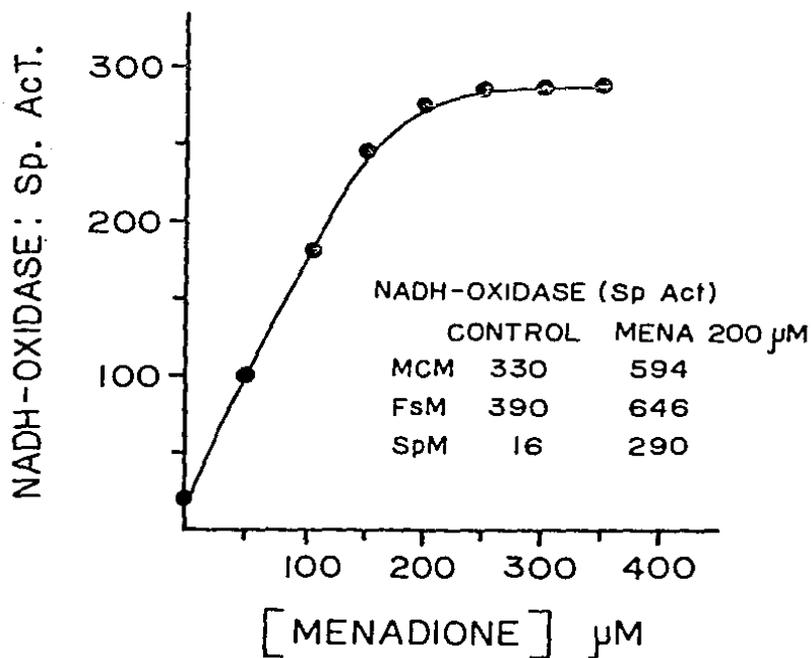


FIG. 5. REACTIVACION DEL SISTEMA RESPIRATORIO DE LA ESPORA DE Bacillus cereus CON MENADIONA.

Se uso Menadiona disuelta en etanol absoluto en las concentraciones indicadas. La medicion se hizo en un Buffer fosfatos 0.1 M, pH 6.2, NADH 0.5 mM, proteina membranal 1.4 mg, volumen final 2 ml.

que la propia menaquinona para el transporte de electrones.

La reactivación con menadiona podría indicar que la quinona endógena no era suficiente para sostener la actividad de oxidación del NADH (en condiciones basales) o que la menaquinona había sido modificada de tal forma que no estaba disponible como acarreador redox.

Sin embargo, estos resultados podrían ser producto de algún artefacto en nuestro sistema experimental, por lo tanto se hicieron una serie de controles tomando en cuenta ciertos criterios que Konings considera para el uso de análogos de MQ. Estos son: la menadiona debe de tener un potencial adecuado para funcionar como acarreador de electrones entre la deshidrogenasa de NADH y el citocromo b; el sistema reactivado debe de ser sensible a inhibidores respiratorios; el pH del medio de reacción debe ser el adecuado para disminuir al mínimo la reacción espontánea de oxidación del menadiol; no debe de haber reacción química detectable entre el NADH y la menadiona y por lo tanto solo debe haber consumo de oxígeno en presencia de membranas.

Dadas estas condiciones podemos decir lo siguiente: Con respecto al potencial redox de la menadiona sabemos que a pH de 7 es de  $\approx -12$  mV, (Bisschop and Konings, W., et. al., 1976) lo que resulta adecuado para que ésta funcionara como par redox entre la NADH deshidrogenasa, cuyo potencial estándar a pH 7 es de  $-320$  mV y el del citocromo b, en las mismas condiciones es de  $113$  mV (Hager y Deeb, 1967). Por lo tanto en este sentido la menadiona resultó adecuada para nuestros propósitos.

El siguiente punto a investigar fué la sensibilidad a inhibidores respiratorios y compararla con aquella en el sistema respiratorio funcional (en membranas de células esporulantes). Se ensayó entonces la inhibición por KCN de la actividad estimulada con menadiona (ver fig. 6.), encontrándose una curva en la que se observó una rápida inhibición inicial hasta 500  $\mu$ M y una resistencia parcial a concentraciones mayores de cianuro. Esta curva fué semejante a la que se ha reportado en nuestro laboratorio para el S.R. de células esporulantes (Escamilla y Benito, 1984).

Se sabe que la menadiona es oxidada espontáneamente por el oxígeno cuando se encuentra en el estado reducido (menadiol), en un proceso dependiente del pH. Entonces era muy importante conocer en que rango de pH dicha autooxidación era mínima. Para esto se sintetizó menadiol a partir de menadiona (ver Métodos).

Con el menadiol se construyó una curva de autooxidación, midiendo el consumo de oxígeno a varios valores de pH (5.8 a 7.5), (ver fig. 7.). Como podemos observar la autooxidación del menadiol es fuertemente dependiente del pH. A pH menor de 6.2 es prácticamente nula, lo que indica que en los experimentos previamente descritos la contribución al consumo de oxígeno debido a la autooxidación del menadiol fué despreciable.

Para asegurarnos ahora de que no había reacción directa de óxido-reducción entre el NADH y la menadiona, se midió el consumo de oxígeno resultante al mezclar menadiona y NADH. Es decir, si el NADH estaba reduciendo a la menadiona directamente, ésta

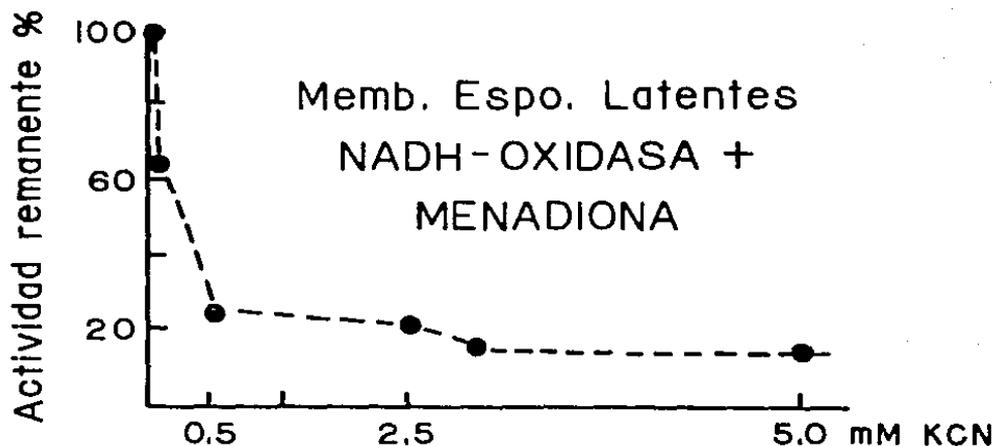


FIG. 6. INHIBICION CON KCN DE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA DE LA ESPORA ESTIMULADA CON MENADIONA.

La medición se hizo en un buffer fosfatos 0.1 M, pH 6.2, NADH 0.5 mM, proteína 1.4 mg. Menadiona 200  $\mu$ M. La actividad se expresa como % de actividad remanente con respecto al control sin KCN.

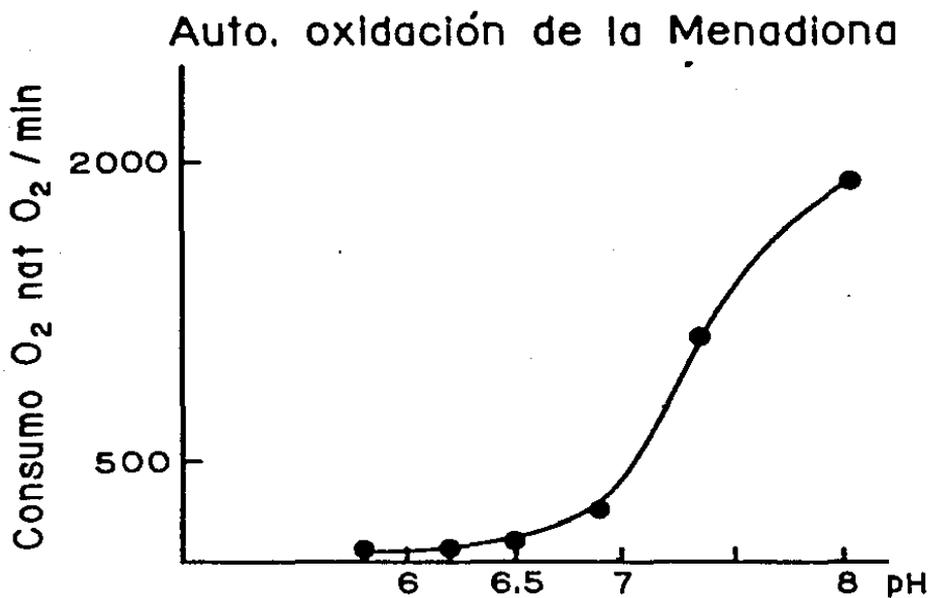


FIG. 7. AUTOOXIDACION DE LA MENADIONA.

La curva se construyó con Menadiona reducida con borohidruro de sodio. Se usó una concentración de menadiona de 300  $\mu$ M. Los pH se fijaron con diferentes amortiguadores de fosfatos 0.1 M.

debería de oxidarse con el  $O_2$  del medio, lo cual no sucedió.

También se observó que el espectro en la zona del ultravioleta, de la menadiona oxidada no se modificaba al agregar NADH.

El experimento concluyente de que la menadiona estaba funcionando como intermediario de óxido-reducción en el S.R. de la espora, fué que solo en presencia de membranas activas y un sustrato respiratorio, la menadiona era capaz de producir una activación, medida por el aumento del consumo de oxígeno. Esto se muestra en la Tabla 3: la menadiona producía una estimulación de la NADH oxidasa, de aproximadamente 20 veces con respecto al control sin menadiona.

Cuando las membranas son inactivadas por calor ( ver pie de la Tabla 3 ) o no se añadieron al medio de reacción no se registró consumo de oxígeno. De la misma forma se hicieron los experimentos con menadiol, obteniéndose resultados similares comparados con los de la menadiona. Esto demostró que la menadiona podía funcionar como aceptor y donador de electrones en el sitio fisiológico de la Menaquinona.

TABLA 3. REACTIVACION DE LA NADH-OXIDASA DE ESPORAS LATENTES POR MENADIONA.

Preparación: (a)	NADH-OXIDASA nat O min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>
MEMBRANAS + NADH	6
MENADIONA OX. + NADH	18
MENADIONA OX. + MEMBRANAS + NADH	120
MENADIONA OX. + MEMBRANAS TERMOINACTIVADAS (b) + NADH	10
<hr/>	
MENADIONA RED (c) + NADH	32
MENADIONA RED + MEMBRANAS + NADH	125
MENADIONA RED + MEMBRANAS TERMOINACTIVADAS + NADH	14

(a) La actividad se mide en buffer de fosfatos de potasio 0.1 M, pH 6.6, NADH 0.5 mM.

(b) Membranas termoinactivadas 5 min a 90°C.

(c) La menadiona fué reducida con borohidruro de sodio. Ambas menadionas se usaron en una concentración de 100 µM.

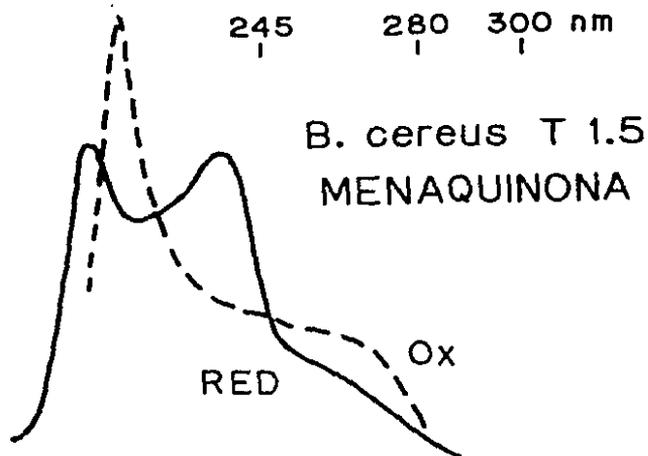
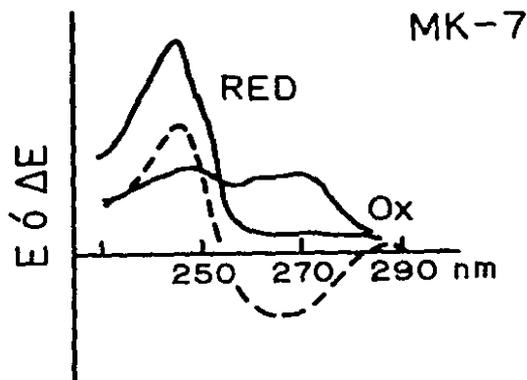
## 2.- Extracción de la Menaquinona.

El grupo de resultados anteriores sugirieron que los niveles de MQ libre en las membranas de la espora estaban bajos, por lo que decidimos investigar la cantidad de MQ a lo largo del proceso de maduración de la endospora, (ver figura 8). Si la menaquinona era el punto de regulación de la respiración de la endospora entonces debíamos encontrar una caída en la concentración de MQ paralela a la caída en la actividad de NADH oxidasa.

Se determinó la cantidad de menaquinona de extractos membranales de células en diferentes estados, tanto de la endospora como de la célula madre. Los resultados se muestran en la fig. 9 .. Encontramos efectivamente que los cambios en la actividad respiratoria de la endospora a lo largo de la esporulación, fueron paralelos a los cambios en la concentración de MQ. Hay que hacer notar que la caída más drástica en la MQ se detectó a partir de las 3.5 horas de iniciada la esporulación, tiempo en el cual se ha reportado que bajan los niveles de ATP y CoA, entre otros metabolitos (Setlow y Setlow, 1977b).

Con respecto a la célula madre, la cantidad de menaquinona cayó de manera paulatina, similarmente al cambio en la actividad de la NADH oxidasa.

Estos resultados son el producto de un experimento, aunque para la espora madura y para  $t_2$  se hicieron triplicados (los valores que se reportan son el promedio de los 3 datos). Por otro lado se puede decir que cada experimento es control del anterior



#### 8. ESPECTRO DE LA MENAQUINONA.

espectro de la especie oxidada se obtuvo en presencia de N y etanol. La especie reducida se midió en presencia de etanol, borohidruro de sodio y buffer de acetatos 1 M pH 5.

En la parte superior de la figura se muestra el espectro característico de la menaquinona (MK-7) de *B. thuringiensis*. Los espectros para *B. cereus* fueron obtenidos de la misma forma. (Bröger, 1969).

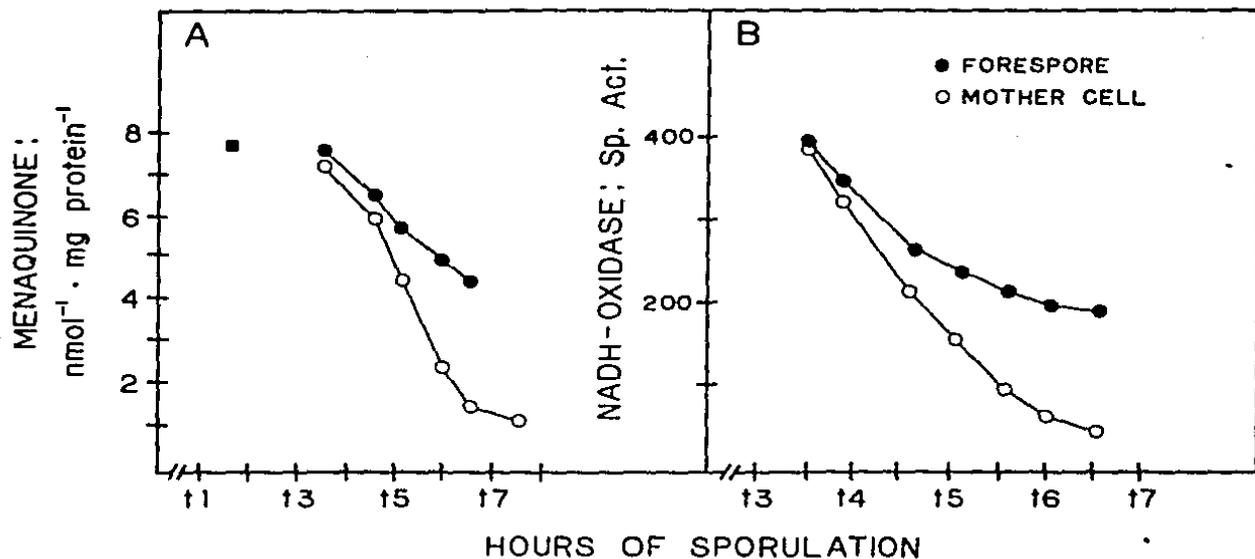


FIGURA 9. (A). NIVELES DE MENAQUINONA A LO LARGO DE LA ESPORULACION DE *Bacillus cereus*.

(B). ACTIVIDAD DE NADH OXIDASA EN EL CURSO DE LA ESPORULACION.

Las concentracion de Menaquinona se expresa como nmol  $\cdot$  M $\cdot$ mg proteina.  $\cdot$  celula madre, o endosporas.

La actividad de NADH oxidasa esta expresada como nanogramo de O<sub>2</sub>  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg proteina.

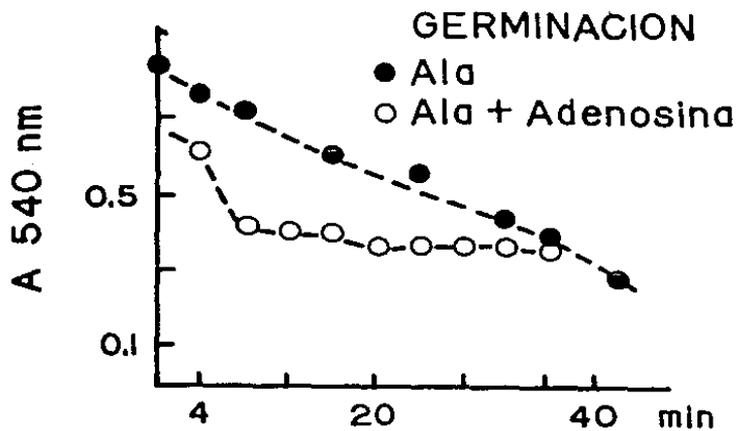


FIGURA 10. GERMINACION DE ESPORAS DE Bacillus cereus.

La germinación se siguió con la caída de D.O. a 540 nm de una suspensión de esporas (0.8 mg/ml). se usaron como germinantes -- L-Ala (20 mM) ó L-Ala + Adenosina ( 20mM y 1mM, respectivamente).

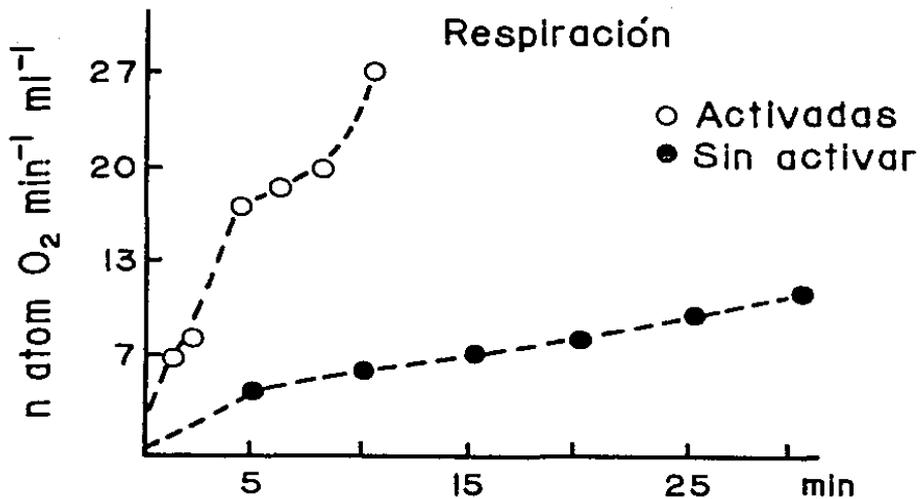


FIGURA 11. RESPIRACION ENDOGENA DURANTE LA GERMINACION.

Se uso una concentracion de esporas de *B. cereus*, de 0.8 mg/ml.

El aumento en respiración se midió como el consumo de O<sub>2</sub> durante la germinación.

La activación se llevo a cabo por choque termico (ver Metodos). Se usaron como germinantes L-Ala + Adenosina, en las mismas concentraciones que en la figura anterior.

y están de acuerdo con lo que reporta Taber (Farrand y Taber, 1974), para el contenido de MQ en E. subtilis.

Por otro lado cuando las esporas germinan, la actividad metabólica aumenta considerablemente. En los primeros minutos la actividad respiratoria endógena aumenta 10 veces aproximadamente en un proceso independiente de la síntesis de proteínas (Wilkinson, ., et. al., 1977).

Tomando esto en cuenta podíamos esperar un aumento en los niveles de MQ concomitante al aumento en la respiración durante los primeros minutos de la germinación.

En la fig. 10. se muestran los parámetros que se siguieron para medir la germinación. Como se puede observar la caída en la DO depende de la activación y de la presencia de germinantes, siendo totalmente indispensable la activación. La mezcla de L-Alanina + Adenosina resultó ser la más adecuada para tener una rápida y sincrónica germinación. De igual manera, estos efectos se pudieron observar al medir el aumento de la respiración endógena (fig. 11 .). De tal forma elegimos hacer las mediciones de la menaquinona a los 20 minutos de haberse iniciado la germinación, que fue cuando observamos un aumento de 10 veces en la respiración endógena y una caída máxima de la densidad óptica.

La cantidad de menaquinona que se detectó en las membranas de esporas germinadas fue 4 veces mayor a la que se encuentra en las membranas de esporas latentes, (ver Tabla 4 ), este resultado fue congruente con el hecho de que la MQ sea el punto de regulación

de la actividad del S.R..

Se midieron también las actividades de NADH deshidrogenasa y los niveles de los citocromos en ambos tipos de esporas (ver Tabla 4 ), y se encontró que estos no aumentan significativamente durante la germinación, como para explicar el aumento de la actividad de NADH oxidasa.

Con estos datos podíamos asegurar que la concentración de MQ es un factor importante en la regulación de la actividad respiratoria durante el proceso de diferenciación de la bacteria, ya que podemos decir que a bajos niveles de MQ hubo baja respiración.

TABLA 4. COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES RESPIRATORIAS ESPECIFICAS, CONCENTRACION DE CITOCROMOS Y MENAQUINONA DE LAS ESPORAS LATENTES Y GERMINADAS DE Bacillus cereus.

ENSAYO ENZIMATICO	Sp act (a)		Relación
	Latentes	Germinadas	
<b>Oxidoreductasas:</b>			
NADH	47	48	1.0
<b>Oxidasas:</b>			
NADH	8.5	61	7.2
Ascorbato-TMPD	154	205	1.3
<b>Citocromos: (b)</b>			
b	0.21	0.22	1.0
c	0.14	0.18	1.3
aa <sub>3</sub>	0.042	0.043	1.0
Menaquinona: (b)	0.8	3.3	4.1

(a) Las actividades especificas de las oxidoreductasas y de las oxidasas están expresadas de la misma forma que en la fig.1.

(b) La concentración de citocromos y de menaquinona está expresada como: nmol/mg proteína.

## DISCUSION

Por los resultados obtenidos en este trabajo, podemos sugerir que un punto importante en la regulación del sistema respiratorio de la endospora es la concentración de Menaquinona, siendo esto mucho más importante que la caída en actividad de la deshidrogenasa de NADH y niveles de citocromos (ver tablas 1 y 4). Esto coincide con un reporte de Taber (Farrand y Taber, 1974), en el que señala que la concentración de MQ en B. subtilis, cae conforme el proceso de esporulación se lleva a cabo, aunque finalmente la inactivación del S.R. de la endospora es el resultado de la caída en todas las actividades asociadas a este, lo que conduce al estado criptico.

La inactivación del sistema respiratorio sería un evento específico dentro del mecanismo general de mantenimiento de latencia (deshidratación del protoplasto de la espora y formación de complejos con el calcio y el ácido dipicolínico); podríamos decir, incluso, que esta inactivación funcionaría como un "seguro" que evitaría fugas de poder reductor innecesarias.

Los experimentos con Menadiona, demuestran que la espora latente al carecer de MQ, es incapaz de oxidar al NADH y solo se detecta consumo de oxígeno en presencia de menadiona, ya que ésta ocupa el lugar fisiológico de la quinona. Estamos seguros de que en estos experimentos no hay artefactos, pues descartamos toda posibilidad de ello. Esto quiere decir que en presencia de la menadiona el NADH puede funcionar como sustrato porque los

electrones pueden pasar desde la deshidrogenasa a los citocromos.

Lo anterior es fuertemente apoyado por los experimentos de extracción de quinona en los cuales se encuentra una caída concomitante de esta con la actividad de NADH oxidasa.

En el momento en que la germinación ocurre, se observa un incremento de 10 veces aproximadamente en la respiración endógena de las esporas (ver figura 11), además de un incremento de 7 veces en la actividad de NADH oxidasa. Lo que coincide con el incremento en 4 veces de la quinona (ver tabla 4). Esto es importante pues en la germinación los aumentos en la capacidad respiratoria y en los niveles de ATP, son necesarios para sostener el desarrollo de la espora germinada a una célula vegetativa primaria, esto coincide también con el incremento de piridín nucleótidos reducidos (ver Introducción).

La caída en concentración de MQ durante la esporulación y su posterior recuperación en la germinación, habla de un fenómeno enzimático involucrado en "regular" la concentración de la quinona que finalmente regularía de manera importante la actividad respiratoria.

Cabe entonces preguntarse que le sucede a la MQ y que mecanismos están involucrados en degradarla o inactivarla.

La degradación de MQ implicaría la existencia de un sistema enzimático que se expresa de manera diferencial durante el proceso de esporulación. No se conocen a la fecha, mecanismos relacionados con la degradación de quinonas bacterianas.

Por otro lado, durante la germinación debería de haber

síntesis de menaquinona, posiblemente a partir de shikímico. Este podría sintetizarse partir de 3-PGA y eritrosa 4-fosfato, (ver esquema 1). Sin embargo, la vía de síntesis de MQ está constituida por varios pasos enzimáticos más a partir de shikímico (Bentley y Meganathan, 1982), lo que implicaría que las enzimas necesarias posteriores al shikímico, o se sintetizan en los primeros minutos de la germinación o se guardan en la espora durante la esporulación.

Lo anterior podría ser demostrado, si se germina a las esporas en presencia de shikímato radiactivo buscando la marca en la menaquinona. Esto demostraría que se activa su síntesis a partir de este intermediario. Por otro lado se podría intentar la germinación en presencia de agua tritiada y buscar si se encuentra marca en la quinona lo que significaría su síntesis.

El otro mecanismo posible, es que la Menaquinona se inactive y esto no le permita participar en el transporte de electrones. La inactivación podría llevarse a cabo en una forma similar a la de la CoA, (Setlow y Setlow, 1977a), es decir por unión a proteínas. Por tanto, la MQ extraíble sería menor ya que esta estaría formando un complejo MQ-proteína. La unión a proteínas (por medio de una cisteína) o al glutatión reducido, sería en la posición 3 del anillo, la cual es la más favorecida químicamente (Nickerson et.al., 1963; Klubes y Cerna, 1972), lo que implicaría la remoción de la cadena de isoprenos de tal manera que quedara anclada no pudiendo funcionar como acarreador móvil.

Durante la germinación, el complejo debe de romperse y

liberarse la quinona en un proceso en el cual la cadena de isopreno debe volverse a unir en la posición 3. Por consiguiente, en los primeros minutos del evento se registraría un incremento de MQ extraíble y por ende el aumento de actividad de la NADH oxidasa.

Otro punto interesante por demostrar, sería, si el aumento en la concentración de MQ detectado en la germinación, se registra en otras condiciones de germinación.

Por ejemplo, si se hiciera la germinación en condiciones anaerobias ¿ se sintetizaría MQ? Posiblemente en presencia de un aceptor diferente a oxígeno la MQ pueda sintetizarse pues la quinona sería un componente obligado en la cadena anaerobia.

Si la germinación ocurriera en presencia de fluoruro (potente inhibidor de la enolasa), (Setlow, 1983), la concentración de 3-PGA disminuiría y por tanto no habría precursores de shikímico. Si la concentración de MQ aumenta, querría decir que la quinona se sintetiza a partir de un precursor posterior al shikímico en la vía.

De cualquier forma, haciendo a un lado las especulaciones anteriores, lo cierto es que los niveles de MQ tienen un efecto muy grande en la regulación de la expresión del S.R. de la endospora e indirectamente en el mantenimiento del estado latente y su posterior reactivación durante la germinación.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Andreoli, A.J., S. Suehiro, D. Sakiyama, J. Takemoto, E. Vivanco, J.C. Lara y M.C. Klute. (1973). *J. Bacteriol.* 115: 1159.
- 2.- Bahnweg, G. y H. Douthit. (1975). *J. Bacteriol.* 121: 743.
- 3.- Balasa, G., P. Milhaud, R. Raulet, M.T. Silva y J.C.F. Sousa. (1979). *J. Gen. Microbiol.* 110: 365.
- 4.- Bentley, R. y R. Meganathan. (1982). *Microbiol. Revs.* 46: 241.
- 5.- Bergsma, J., K.E. Meihuise, W.V. Deveren y W.N. Konings. (1982). *Eur. J. Biochem.* 125: 651.
- 6.- Bisschop, A. y W.N. Konings. (1976). *Eur. J. Biochem.* 67: 357-365.
- 7.- Cheng, H.M., A.I. Aronson, S.C. Holt. (1973). *J. Bacteriol* 113: 1134.
- 8.- Dilss, S.S. y J.C. Vary. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 541: 301.
- 9.- Dworkin, M. (1985). En "Developmental Biology of Bacteria" Cap. 3. Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc. EUA.
- 10.- Escamilla, J.E. y M.C. Benito. (1984). *J. Bacteriol.* 160: 473.
- 11.- Escamilla, J.E., R. Ramirez, P. del Arenal y A. Aranda. (1986). *J. Bacteriol.* 167: 544.
- 12.- Farrand, S.K. y H.W. Taber. (1974). *J. Bacteriol.* 117: 324.
- 13.- Freese, E. (1981). En "Sporulation and Germination" (Levison, H.A., L. Sonenshien y D.J. Tipper, eds) pp. 1-12 Amer. Soc. for Microbiol. Washington, D.C.

- 14.- Haddock, B.A. y C.W. Jones. (1977). *Bacteriol. Rev.* 41:47.
- 15.- Hager, L.P. y S.S. Deeb. (1967). *Meth. Enzymol.* X. (Estabrook, R.W. y M.E. Poolman, eds.) pp. 372.
- 16.- Jones, C.W. (1973). *Bacterial Respiration and Photosynthesis.* Amer. Soc. for Microbiol. pp. 1-36.
- 17.- Klubes, P. y I. Cerna. (1972). *Biochem. Pharmacol.* 21:249.
- 18.- Krivankova, L. V. Dadak. (1976). *Anal. Biochem.* 75:305.
- 19.- Knowles, C.J. Ed. *Diversity of Bacterial Respiratory Systems.* Vol.1. crc Press. Florida.
- 20.- Krüger, A. y V. Dadak. (1969). *Eur. J. Biochem.* 11:328.
- 21.- Krüger, A. y G. Uden. (1985). En "CoQ" (Lenaz, G. ed) pp. 285. John Wiley and Sons Ltd. N.York.
- 22.- Lang, D.R., J. Felix y G. Lundgren. (1972). *J. Bacteriol.* 110:968.
- 23.- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, a.l. Farr y R.J. Randall. (1951). *J. Biol. Chem.* 193:265.
- 24.- Ludwig, B. (1980). *Biochim. Biophys. Acta.* 594: 177.
- 25.- Murrell, W.G. (1981). En "Sporulation and Germination" (H.S. Levinson, A.L. Sonenshein and D.J. Tipper, eds.) pp. 64. Amer. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
- 26.- Nickerson, W., G. Falcone y G. Strauss. (1965). *Biochemistry.* 2:573.
- 27.- Piggot, P.J. y J.G. Coote. (1976). *Bacteriol. Rev.* 40:908.
- 28.- Petit-Glatron, M.F. y G. Rapaport. (1975). En "Spores". (Gerhardt, P., R.N. Costilow y H.L.S. Sadoff, eds.) Vol VI. pp. 255. Amer. Soc. for Microbiol. Washington, D.C.

- 29.- Rodenberg, S., W. Steinberg, J. Piper, K. Nickerson, J. Vari, R. Epstein y H.O. Halvorson. (1968). *J. Bacteriol.* 96:492.
- 30.- Sakakibara, Y., H. Saito y Y. Ikeda. (1965). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 11:243.
- 31.- Scott, J.R., G.S.A.B. Stewart, M.A. Konczenwicz, D.J. Ellar y A. Crafts-Lighty. (1975). En "Spores" (G. Chambliss y J.C. Vary, eds.). Vol. VII. pp. 95. Amer. Soc. for Microbiol. Washington, D.C.
- 32.- Setlow, B. y P. Setlow. (1977a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75:45.
- 33.- Setlow, B. y P. Setlow. (1977b). *J. Bacteriol.* 129:837.
- 34.- Setlow, B. y P. Setlow. (1977c). *J. Bacteriol.* 132:44.
- 35.- Setlow, P. (1973a). *J. Bacteriol.* 114:1099.
- 36.- Setlow, P. (1973b). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52:365.
- 37.- Setlow, P. (1975a). *J. Biol. Chem.* 250:631.
- 38.- Setlow, P. (1975b). *J. Biol. Chem.* 250:8154.
- 39.- Setlow, P. (1975c). *J. Biol. Chem.* 250:8168.
- 40.- Setlow, P. (1981). En "Sporulation and Germination". (Levinson, H.S., A.L. Sonenshein y D.J. Tipper, eds.). pp. 13. Amer. Soc. for Microbiol. Washington, D.C.
- 41.- Setlow, P. (1983). En "The Bacterial Spore" (Hurst, A. y G.M. Gould, eds.) Vol. 2. pp. 219. Academic Press. London.
- 42.- Setlow, P. y A. Kornberg (1970a). *J. Biol. Chem.* 245:3637.
- 43.- Setlow, P. y A. Kornberg (1970b). *J. Biol. Chem.* 245:3645.
- 44.- Setlow, P. y G. Primus. (1975). *J. Biol. Chem.* 250:623.
- 45.- Seto-Young, D.L.T. y D.J. Ellar. (1979). *Microbios.* 26:7.
- 46.- Sone, N. (1974). *J. Biochem.* 76:137.

- 47.- Stouthamer, A.H. (1980). Trends Biochem.Sci. 5:164.
- 48.- Thauer, R.K., K. Jungerman y K. Decker. (1977). Bacteriol. Rev. 41:100.
- 49.- Tochikubo, K. (1974). J. Bacteriol. 108:652.
- 50.- Tochikubo, K., Y. Yasuda y S. Kosuka. (1980). J. Gen. Microbiol. 132:277.
- 51.- Wagner, G.C., R.J. Kassner, M.D. Kamen. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71:253.
- 52.- Wilkinson, B.J., D.J. Ellar, I.R. Scott y M.A. Koncewicz. (1977). Nature (London). 266:174.
- 53.- Wilkinson, B.J., y J.A. Deans. (1975). Biochem. J. 152:561.