

00362

2

29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Purificación y Propiedades de la citocromo oxidasa  $aa_3$   
de *Bacillus cereus*.

Tesis que para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

Presenta el Químico

JUAN ARTURO GARCIA HORSMAN

1988

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE

ABREVIATURAS	5
SUMARY	6
RESUMEN	7
INTRODUCCION	8
ANTECEDENTES	12
MATERIAL Y METODOS	26
RESULTADOS Y DISCUSION	29
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFIA	60

## SUMMARY

Membrane cytochromes have a central role in energy transduction of living systems. Cytochrome oxidases are generally enzymes located at terminal step in bacterial respiratory systems. They catalyze, like mitochondrial cytochrome oxidase, the electron transfer from a cytochromic donor to oxygen. The cytochrome oxidase  $aa_3$  from bacteria occurs in many aerobic microorganisms; but, as the mitochondrial enzyme, is not well understood.

In this work, the purification of cytochrome oxidase  $aa_3$  from *Bacillus cereus* is described. This enzyme can be purified as two forms. One has a molecular weight of 71 kDa and signals of heme  $a$  and  $a_3$ . The other one has a M.W. around 50 kDa and signals of heme  $a$ ,  $a_3$ , and heme  $c$ . The  $aa_3$  enzyme is fully active and composed by three subunits. Its activity depends upon Triton X-100 and does not upon phospholipids. It can accept electrons from yeast cytochrome  $c$ , but not from the mammalian one. On the other hand the activity of the complex  $caa_3$  depends upon the presence of Triton X-100 too, but its activity cannot be stimulated by any exogenous cytochrome  $c$ .

This is the second cytochrome  $aa_3$  from a bacterium from genus *Bacillus* that has been purified.

## RESUMEN

Los citocromos unidos a membrana tienen un papel central en la transducción de energía de los sistemas vivientes. Las citocromo oxidasas son por lo general, enzimas localizadas en la sección terminal de los sistemas respiratorios bacterianos. Estas enzimas catalizan, así como en la mitocondria, la transferencia de electrones desde un donador, generalmente un citocromo, hasta oxígeno. Las citocromo oxidasas  $aa_3$  bacterianas se encuentran en la mayoría de los microorganismos aerobicos pero, como la enzima mitocondrial, no son bien entendidas.

En este trabajo se describe la purificación de la citocromo oxidasa  $aa_3$  de *Bacillus cereus*. Esta enzima se purifico en dos formas. Una de ellas con un peso molecular de 71 kDa y con señales de hemo  $a$  y  $a_3$ . La otra con peso molecular de alrededor de 90 kDa y señales de hemo  $a$ ,  $a_3$  y  $c$ . La enzima  $aa_3$  es activa y compuesta de tres subunidades. Su actividad depende de la adición de Triton X-100, no siendo así para fosfolípidos. Esta enzima puede aceptar electrones del citocromo  $g$  de levadura, pero no del cit  $g$  de mamífero. Por otro lado la actividad del complejo  $caa_3$  también depende de la adición de Triton X-100, pero su actividad se estimula con ningún citocromo  $g$  exógeno.

Este es el segundo citocromo  $aa_3$  de una bacteria del género *Bacillus* que se ha purificado.

## ABREVIATURAS

ATP	Adenosina 5'-trifosfato.
cit	Citocromo.
CMC	Concentracion micelar critica.
Da	Daltones.
DEAE	N,N-dietilaminoetil.
DCCD	1,3-diciclohexilcarbodiimida.
DNA	Acido desoxiribonucleico.
EPR	Resonancia paramagnética electronica.
FPN	NADH deshidrogenasa (Flavoproteina de NADH).
FP <sub>s</sub>	Succinato deshidrogenasa (Flavoproteina de succinato).
kDa	Kilodaltones.
LDS	Dodecil sulfato de litio.
Mk	Menaquinona (2-metil,3-poliisoprenil,1,4-naftoquinona)
NADH	Nicotin adenin dinucleotido reducido.
PMS	Fenazina metosulfato (N-metilfenazonio metosulfato).
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (fluoruro de $\alpha$ -toluensulfonilo)
RPM	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TMPD	N,N,N',N'-Tetrametil p-fenilendiamina.
Tris	Tris(hidroxiometil)aminometano.

## INTRODUCCIÓN

Los citocromos juegan un papel fundamental en la transducción de energía, tanto en organismos eucariontes como en procariontes (27). En general, las cadenas respiratorias de las bacterias son más complicadas y diversas que en los organismos eucariontes (36).

Las oxidasas bacterianas forman un grupo de proteínas estructuralmente diversas que ocupan un lugar fundamental de el metabolismo energético aeróbico. Este tipo de proteínas, son esencialmente enzimas que transfieren electrones siendo miembros terminales de las cadenas respiratorias, donando sus electrones a un aceptor de alto potencial, el oxígeno. Entre otras características son enzimas asociadas a membrana y en algunas de ellas su papel en la transducción de energía es debido a su capacidad de bombeo de protones. En general, son enzimas estructuralmente simples, comparadas con la enzima mitocondrial, pues están constituidas de 2 o 3 subunidades.

Se ha descrito una variedad de citocromo oxidasas en bacterias (27). La oxidasa terminal bacteriana que más se asemeja con la oxidasa de eucariontes es la citocromo c oxidasa tipo aa<sub>3</sub>. Esta enzima se ha purificado y caracterizado de diferentes fuentes bacterianas (termófilos, fototrofos, facultativos y aeróbicos estrictos). Una característica general de estas oxidasas es su composición polipeptídica simple, comparada con la enzima de mitocondria, mientras que sus propiedades funcionales y espectrales son muy similares. Al parecer el citocromo c.

identificado como un citocromo b que enlaza monóxido, es la oxidasa terminal más ampliamente distribuida entre las bacterias. A diferencia de las oxidasas tipo aa<sub>3</sub>, las propiedades funcionales y espectrales del cit b muestran diferencias significativas con respecto a la oxidasa mitocondrial. Las propiedades de transducción de energía de las oxidasas bacterianas b y aa<sub>3</sub> se han estudiado extensamente. Ambas oxidasas efectúan translocación vectorial de electrones construyendo una fuerza proton-motriz, habilidad que se ha reportado para algunas oxidasas del tipo aa<sub>3</sub>, mientras que para solo dos del tipo b (15, 26, 30, 31, 32, 34 y 38).

Las oxidasas bacterianas tienen características relacionadas con la adaptabilidad y la diversidad metabólica de los microorganismos. En primer lugar su síntesis (o su detectabilidad) está sujeta a una regulación dramática en respuesta a las condiciones ambientales prevalecientes. Algunas oxidasas son multifuncionales puesto que existen enzimas pueden usar otros aceptores además o en lugar del oxígeno, o la posibilidad de que algunas oxidasas actúen como proteínas que almacenen oxígeno. Finalmente, aún más, es raro que una bacteria posea un sistema respiratorio no ramificado terminado por una sola oxidasa.

Los tipos de oxidasas bacterianas que se han descrito son los citocromos aa<sub>3</sub>, b, d, a<sub>1</sub> y cd<sub>1</sub>. Los tres primeros, se han caracterizado como oxidasas en una gran cantidad de bacterias. El citocromo a<sub>1</sub> encierra dudas en su papel como oxidasa, mientras que el citocromo cd<sub>1</sub> se le ha atribuido más bien el papel como nitrito reductasa que como oxidasa.



El citocromo d, que es particularmente común en bacterias heterotróficas gram negativas, funciona como oxidasa terminal (17). Inicialmente se consideró el citocromo a, como oxidasa, sin embargo este citocromo es el menos entendido. Recientemente se ha cuestionado tanto su papel fisiológico como su caracterización como citocromo a.

Se han descrito los sistemas respiratorios de algunas especies del género *Bacillus* (*B. subtilis* (40), *B. cereus* (5,6), entre otras). En *Bacillus subtilis* se ha detectado la presencia de oxidasas del tipo aa<sub>3</sub> y o (39,40), de las cuales solo el cit aa<sub>3</sub> se ha demostrado su capacidad como bomba de protones (39).

Una excelente revisión de estas oxidasas fue reportada por Foole en 1983 (27), en donde puede encontrarse una gran información de estas enzimas. Esta tesis se centrará sobre la citocromo oxidasa tipo aa<sub>3</sub>.

En *Bacillus cereus* se ha descrito la presencia de las oxidasas aa<sub>3</sub>, o y d cuya expresión varía con la tensión de oxígeno y la fuente de carbono (7). El esquema reportado para el sistema respiratorio de *B. cereus* es el siguiente:



Como se puede notar, el sistema está constituido por las deshidrogenasas, que reciben los electrones de las coenzimas o sustratos reducidos del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, y de

un sector de citocromos. Este último, está unido a las deshidrogenasas por medio de la menaquinona. El punto de ramificación de la cadena se plantea en el citocromo  $b_{555}$ , de donde los electrones pueden ser transferidos por varias rutas hacia el oxígeno. Una es por medio de los citocromos  $c_{540}$  y  $a_a$ , otra por medio del citocromo  $g$  y la última por medio del citocromo  $d$ .

Estos resultados se obtuvieron en base a datos espectrofotométricos y a las cinéticas de reacción con el oxígeno e inhibición con cianuro y monóxido de carbono, en fracciones membranales de la bacteria. Sin embargo, surgió la necesidad de purificar las oxidasas de este microorganismo para corroborar dichos resultados cinéticos, y para hacer la caracterización estructural y funcional de estas enzimas.

En el presente trabajo se describen el aclamamiento y la purificación de la citocromo oxidasa  $a_a$  de *B. cereus*. Esta enzima fue aislada en dos fracciones. La primera como una proteína de 72 kDa constituida por 3 polipéptidos con pesos moleculares de 34,23 y 19 kDa, y que da señales espectrales de hemo  $a$  y  $a_g$ . La otra fracción, de peso molecular de 92 kDa, con tres subunidades de pesos moleculares parecidos a las de la primera fracción, presentando, además de la señal de hemo  $a$  y  $a_g$ , señal de citocromo  $g$ . Posiblemente dicho citocromo  $g$  se encuentra enlazado a la enzima, pues se sabe que el citocromo  $g$  en la mayoría de los sistemas tiene alta afinidad por la oxidasa. Incluso se han obtenido preparaciones de citocromos membranales en donde el

citocromo c se encuentra en las mismas fracciones que el cit aa<sub>9</sub> (39).

La oxidasa aa<sub>9</sub> es capaz de oxidar al TMPD y al citocromo c de levadura presentando dependencia de detergentes (Triton X-100). Por otro lado el complejo caa<sub>9</sub> tiene una actividad mayor en la oxidación del TMPD no viéndose estimulación por citocromo c. Las dos oxidasas presentan un comportamiento anómalo en filtración molecular dando un peso molecular de 165 y 195 kDa para aa<sub>9</sub> y caa<sub>9</sub> respectivamente, probablemente por la fuerte unión de moléculas de Triton X-100 a las proteínas, aún después de haber sido lavadas las enzimas.

Este es el segundo reporte de la purificación de la oxidasa aa<sub>9</sub> de una especie del género *Bacillus*.

## ANTECEDENTES

Citocromo oxidasa  $aa_3$  de bacterias.

Como ya se mencionó, la oxidasa bacteriana del tipo  $aa_3$  es la que más semejanza tiene con la enzima mitocondrial. Aunque no es la oxidasa con mayor ocurrencia entre las bacterias, es la que más atención ha recibido, probablemente por su semejanza a la enzima mitocondrial. A diferencia de esta última, la enzima bacteriana tiene una estructura más simple, 2 o 3 subunidades, comparada con las 7, o más subunidades de la mitocondrial. Por el contrario sus características espectroscópicas y funcionales son muy similares. Esto es, poseen las señales espectroscópicas de los hemo  $a$  y  $a_3$ , y oxidan a un citocromo  $c$  reduciendo el  $O_2$  a agua. En la mayoría de los casos estudiados las oxidasas bacterianas poseen capacidad de bombeo vectorial de protones, como la enzima mitocondrial.

El primer microorganismo del cual fueron examinados sus citocromos fue *B. subtilis* (27) revelando una banda de absorbancia a 603 nm indicativa de citocromo  $aa_3$ . esta oxidasa se presenta en una gran variedad de bacterias, coexistiendo (en la mayoría de ellas) con el citocromo  $c$ . Sin embargo, la oxidasa  $aa_3$ , se ha purificado y caracterizado a partir de solo algunas especies bacterianas.

A diferencia de que el donador natural de electrones de la citocromo oxidasa mitocondrial es el citocromo  $c$ , los citocromos  $aa_3$  bacterianos, que son acompañados frecuentemente por otras oxidasas, el punto de ramificación puede ser un citocromo  $b$  o uno

ε (por ejemplo en *Bacillus megaterium*, 16).

En la enzima mitocondrial, y en los sistemas bacterianos en los que se ha estudiado en detalle, los dos hemo  $a$  se encuentran en ambientes radicalmente diferentes. Uno de ellos (el hemo  $a_g$ ) reacciona en el estado ferroso con  $O_2$ , CO y otros ligandos, que se unen en la sexta posición axial, y en el estado férrico con cianuro. En la mitocondria, dos átomos de cobre son distinguibles por sus propiedades ópticas y magnéticas. Algunos de los primeros reportes sobre citocromos ' $aa_g$ ' bacterianos carentes de hemo  $a_g$  o cobre no se han corroborado en los reportes recientes de estudios con la enzima purificada.

Las principales características espectroscópicas de los citocromos  $aa_g$ , son sus bandas de absorción en el visible de la forma reducida de la enzima a 600-605 y 440-445 nm. En la enzima mitocondrial, la banda  $\alpha$  es debida principalmente al citocromo  $a$ , mientras que los citocromos  $a$  y  $a_g$  contribuyen igualmente a la banda de la región de Soret (27). Las propiedades ópticas del citocromo  $aa_g$  en *Thiobacillus* (19), *Nitrobacter* (27,34,10), especies de *Rhodopseudomonas* (11) y diversos termófilos son similares a los de *Paracoccus denitrificans* y de mitocondria (27). Sin embargo, las enzimas de la bacteria termófila PSE y *Thermus thermophilus* copurifican con un citocromo  $g$  con una absorbancia máxima a 550 nm en el estado reducido (22,34).

La forma oxidada de la enzima de *Nitrobacter agilis* y *P. denitrificans* muestran una débil y ancha banda a 640 nm, presumiblemente señal de cobre. En cultivos bacterianos en

condiciones limitantes de cobre, el contenido de oxidasa y la baja actividad de esta revelan la importancia del metal en la enzima (27).

La espectroscopia en EPR de la oxidasa mitocondrial en el estado oxidado, revela solamente el hemo  $a$ . El hemo  $a_g$  es indetectable y se cree que es porque está acoplado antiferromagnéticamente a su átomo de cobre asociado ( $Cu_D$  o  $Cu_a$ ). Resultados analogos se han reportado para varias citocromo oxidasas bacterianas (27,24).

En la tabla I se presentan las características de las oxidasas que se han purificado, a partir tanto de organismos gram negativos como *Paracoccus denitrificans* (30), *Thiobacillus novellus* (24), *Thermus thermophilus* (34), *Rhodopseudomonas sphaeroides* (11), *Nitrobacter agilis* (34,10) y *Pseudomonas AN1* (31), o de organismos gram positivos como P53 (bacteria termófila, posiblemente *Bacillus stearothermophilus*, 33), *Bacillus subtilis* (38,39) y *Micrococcus luteus* (2).

La actividad de las oxidasas  $a_g$  bacterianas purificadas se ha medido en una gran diversidad de condiciones. No obstante, dicha actividad es baja comparada con la enzima mitocondrial (24). Si las tres subunidades mayores de la enzima mitocondrial son las importantes en el mecanismo catalítico, posiblemente el resto de las subunidades sean regulatorias y confieran una mayor actividad, comparativamente a la enzima mitocondrial con respecto a las bacterianas, que a lo sumo poseen tres subunidades. A este respecto, las enzimas bacterianas purificadas, en general no

TABLA I. Características más importantes de las oxidasas bacterianas del tipo  $aa_3$  que se han reportado, comparadas con la enzima mitocondrial de  $\alpha$  corazo de bovino.

PROPIEDAD						
	No. sub. (esteq) <sup>1</sup> Mr <sup>2</sup>	Hemos	% Act <sup>3</sup>	cit c <sup>4</sup>	Bombeo H <sup>+</sup>	Inh./DCCD <sup>5</sup>
<b>BACTERIA:</b>	3					
<i>P. denitrificans.</i>	1:1:1 45, 28, 23	$aa_3$	30	Euca P.d. 40%	+	+
<i>T. novellus</i>	2 1:1 32, 23	$aa_3$	30	<i>C. krusei</i> <i>T. n.</i> 30%	n.r.	n.r.
<i>Th. thermophilus</i>	3 1:1:1 52, 37, 29	$caa_3$	20	n.r.	+	n.r.
PS3	3 1:1:1 56, 38, 21	$caa_3$	40	PS3, <i>Th. th.</i> PMS+Lev. 50% Euca 20%	+	+
<i>Rh. sphaeroides.</i>	3 1:1:1 45, 37, 35	$aa_3$	20	n.r.	-	n.r.
<i>N. agilis.</i>	2 1:1(?) 51, 31	$aa_3$	25	n.r.	-	n.r.
<i>B. subtilis.</i>	3 1:1:1 54, 37, 21	$aa_3$	40	Levadura Euca. 50%	+	n.r.
<i>Pseudomonas AM1</i>	2 1:1 50:30	$aa_3$	-	n.r.	-	n.r.
<i>M. luteus</i>	3 1:1:1 47, 31, 19	$aa_3$ (?)	n.r.	n.r.	-	n.r.
Eucaro.	17 1:1:1 . . . 35 a 5	$aa_3$	100	-	+	+

1. Estequiometría reportada. 2. Peso molecular relativo por electroforesis desnaturalizante. 3. Actividad relativa con respecto a la enzima mitocondrial. 4. Actividades relativas con el cit c indicado. Donde no aparece porcentaje se encuentra la actividad máxima. Los porcentajes indican la actividad relativa a esta condición. Abrev: Euca. = Cit c eucariótico, P. d. = *P. denitrificans*, C. = *Candida*, T. n. = *T. novellus*, Th. th. = *Th. thermophilus*, PMS = Fenazina metaculato, Lev. = Levadura. 5. Inhibición por DCCD (+) = se inhibe; (-) = no inhibe. n.r. = no reportado.

tienen mejor actividad con algún sustrato específico. Es decir, por ejemplo, el citocromo  $aa_3$  de *P. denitrificans*, muestra una máxima actividad cuando se ensaya con citocromo  $c$  de corazón de bovino como donador de electrones. Sin embargo, si se utiliza el citocromo  $c$  proveniente de la misma bacteria, la actividad es solo de un 40 % de la actividad con el donador mitocondrial (11). Por otro lado, la oxidasa de el bacilo termófilo P53, presenta la máxima actividad con el citocromo  $c$  de la misma bacteria, o de *Th. thermophilus*, el 50 % con cit  $c$  de levadura y solo un 10 % con el citocromo  $c$  de mamífero (3).

Generalmente, las oxidasas bacterianas purificadas requieren de la presencia de fosfolípidos o detergentes para su actividad, esto probablemente preserva en mejor estado la conformación catalítica de la enzima.

Desde la proposición de la teoría quimioosmótica de Mitchel, se planteó la importancia de la citocromo oxidasa como sitio de acoplamiento. Posteriormente en estudios basados en el coeficiente de crecimiento de las bacterias concordaba con dicha implicación energética de la oxidasa. Los estudios con células enteras indicaban que la adición de cianuro a bajas concentraciones, inhibía la actividad de la oxidasa  $aa_3$ , disminuyéndose proporcionalmente la síntesis de ATP. Sin embargo, la purificación y reconstitución de la enzima fue requerida para mayor evidencia del papel de ésta como bomba de protones. Dichos estudios se han efectuado solo para oxidasas de ocho especies bacterianas: *P. denitrificans*, *Th. thermophilus*, P53, *Rh. sphaeroides*, *N. agilis*, *B. subtilis*, *Pseudomonas AM1* y *M. luteus*, de las cuales solo cinco



han mostrado capacidad de bombeo de protones, a saber, *P. denitrificans*, *Th. thermophilus*, PS3, *B. subtilis* y *M. luteus*. Sería interesante hacer notar de que la enzimas de estos últimos microorganismos tienen 3 subunidades.

En la enzima mitocondrial las tres subunidades mayores, están codificadas por el DNA mitocondrial y son estas las subunidades que poseen los grupos prostéticos y como ya se mencionó, posiblemente en donde resida el sito catalítico. Pensando en un origen bacteriano de la mitocondria, desde hace tiempo se han comparado estas características entre las enzimas bacterianas con la mitocondrial. La bacteria que más semejanza se le ha atribuido con la mitocondria, es *P. denitrificans*. Esta bacteria sintetiza un sistema respiratorio muy semejante al mitocondrial, cuando se cultiva en medio aerobio. Sin embargo, la oxidasa  $a_3$ , purificada de esta bacteria se había reportado como una enzima de solo dos subunidades, siendo estas similares a las dos mayores de la enzima mitocondrial (35). Posteriormente la enzima bacteriana fue reconstituida en liposomas mostrando, aparentemente, capacidad de bombeo de protones (30). No obstante, la eficiencia en el bombeo de la oxidasa es muy baja comparada con la mitocondrial, de  $\approx 0.5$  contra  $> 1.5 H^+ / e^-$ , respectivamente (30). Aún más, esta relación se obtuvo tomando el valor máximo de bombeo de  $H^+$  (medido potenciométricamente) y la cantidad total de electrones transferidos, puntos que no coincidan en el tiempo (30). Lo cual nos podría indicar que la relación  $H^+ / e^-$  real es menor a 0.5. Por otro lado, el bombeo de protones por la enzima mitocondrial es

sensible a DCCD (asi como la oxidasa  $aa_9$  de *B. subtilis*, enzima de tres subunidades). El DCCD se une a la subunidad III de la enzima mitocondrial, a un residuo de glutámico (28). Inicialmente se reportó que la oxidasa de *P. denitrificans* no es inhibida por DCCD en su "capacidad" de bombeo de protones (29). Esto ponía en duda la implicación de la subunidad III mitocondrial en el bombeo de protones, aunque la unión del DCCD a este polipéptido no es prueba contundente que ese sea el sitio de inhibición. Posteriormente, se encontró el gen correspondiente a la subunidad III en el cromosoma de *P. denitrificans*. Muy recientemente la enzima con tres subunidades ha podido purificarse, y la tercera subunidad une DCCD lo que puede hablar de su papel en la traslocación de protones (12).

#### Citocromo $aa_9$ de *Bacillus cereus*.

Desde hace aproximadamente 15 años se sabe que *B. cereus* posee una oxidasa tipo  $aa_9$  (21,9), posteriormente se corroboró la presencia de esta oxidasa coexistiendo con cit  $o$  y  $d$  (5). El nivel de estas oxidasas depende de la tensión de oxígeno y del nivel de represión catabólica por fuentes de carbono fermentables (7). Parece ser que la oxidasa  $o$  es constitutiva mientras que  $d$  se expresa en condiciones de baja concentración de oxígeno o en fuentes de carbono de lenta utilización (7). Con respecto a la oxidasa  $aa_9$ , esta es regulada fuertemente por la concentración de oxígeno y por la concentración de sustratos no fermentables. Por una parte la expresión es máxima en un medio con nutrientes no

fermentables (ácidos orgánicos, aminoácidos no fermentables), con alta aereación, mientras que en medio anaeróbico fermentable la cantidad de  $aa_9$  detectable es mínima (7). (Ver tabla II).

TABLA II.<sup>1</sup> Concentración de citocromos presentes en membranas de *B. cereus* cultivadas en diferentes condiciones.

	MEDIO				
	Aeróbico		$O_2$ limitado	Anaeróbico	
	$G^3$	CASS <sup>4</sup>	G	G -NO <sub>3</sub> <sup>(5)</sup>	G +NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>
Citocromo <sup>2</sup>					
b	0.12	0.29	0.18	0.14	0.13
c	0.05	0.15	0.02	0.02	0.02
$aa_9$	0.072	0.21	0.03	0.01	0.02
$d^3$	n. d.	0.01	0.013	0.013	n. d.
o	0.044	0.154	0.066	0.08	0.08

(1). Tomada de la referencia 7.

(2). La concentración de citocromos está dada como nmol/mg de proteína membranar) calculada de los espectros diferenciales (reducido con ditionita menos oxidado con persulfato) & (reducido con ditionita + CO menos reducido con ditionita) a temperatura ambiente.

(3). Medio G: Sacarosa + extracto de levadura.

(4). Medio CASS: Hidrolizado de caseína.

(5). Nitrato. El medio fue suplementado (+) & no(-) con nitrato de potasio.

n. d. No detectado.

Para detalles de la determinación ver ref.7.

Además de las evidencias espectrales de estas oxidasas, se tienen datos cinéticos que arrojan información sobre estas oxidasas. Por una parte el efecto del oxígeno sobre la actividad de citocromos oxidasas (utilizando TMPD + ascorbato como donador de electrones que cede a nivel de las oxidasas) sobre membranas

aisladas de *B. cereus*, muestra una inhibición fuerte a bajas concentraciones de cianuro (hasta 50  $\mu\text{M}$ ) y una cierta resistencia a concentraciones más altas del inhibidor (de 0.05 a 0.5 mM) (7). Se sabe que las oxidasas tipo  $\text{aa}_g$  son muy sensibles a la inhibición con cianuro, entonces la parte más rápidamente inhibida se refiere a la contribución de  $\text{aa}_g$  en la oxidación del TMPD, la actividad con menos sensibilidad es catalizada, por lo tanto, por la oxidasa  $g$  (ver fig.1). En apoyo a estos resultados se ha determinado la cinética de saturación por oxígeno del sistema respiratorio completo (usando NADH como sustrato) y la cinética de inhibición por monóxido de carbono (22). En la figura 2 se muestra la cinética de reacción con oxígeno durante la oxidación del NADH. Como se puede observar aparece una cinética bifásica revelando cuando menos dos oxidasas con afinidades distintas. Cuando se agrega cianuro a una concentración suficiente para inhibir la oxidasa  $\text{aa}_g$ , la cinética se modifica mostrándose solamente la componente de alta afinidad. (8). Por otro lado, en la figura 3, se muestra la cinética de inhibición por monóxido de la actividad de TMPD-oxidasa. En este caso también se observan dos sensibilidades al inhibidor.

Por lo tanto, se ha concluido que la oxidasa  $\text{aa}_g$  de *B. cereus* es muy sensible a cianuro y a monóxido de carbono ( $K_i = 0.96 \mu\text{M}$  y 10 % respectivamente) con una afinidad por oxígeno de  $7.7 \mu\text{M}$ .

No obstante se tienen buenos datos de la oxidasa *in situ*, surge la necesidad de hacer las mediciones en la enzima aislada y purificada y aprovechar para descubrir las características de esta

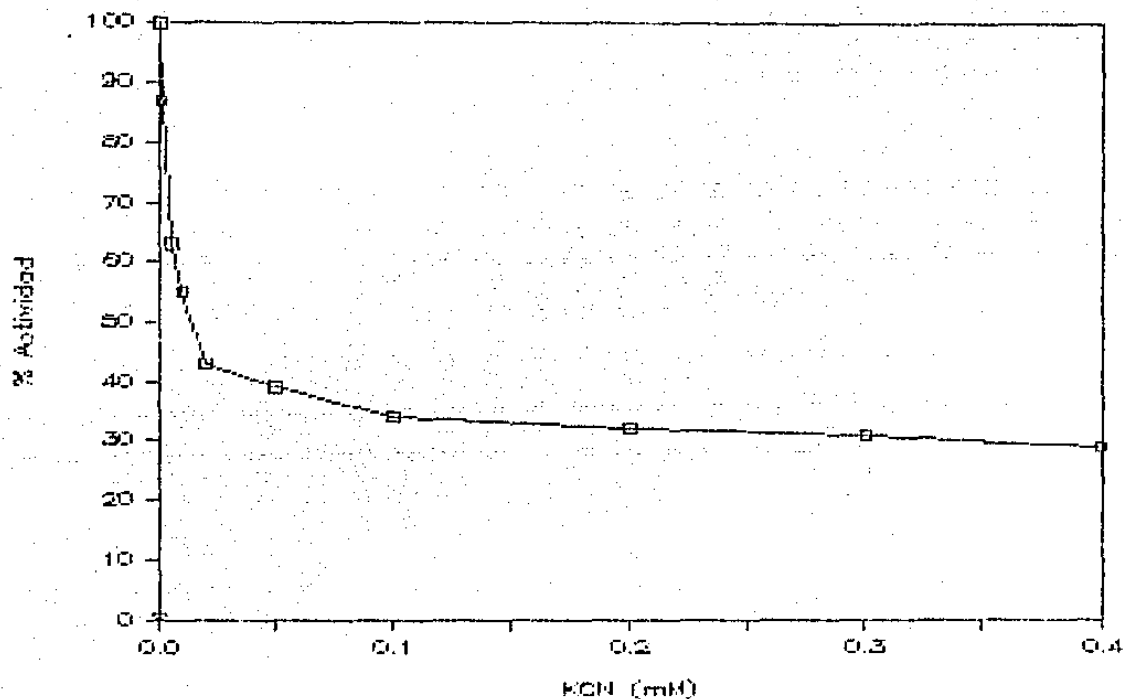


Figura 1. Efecto del cianuro sobre la actividad de TMPD-oxidasa de membranas de *B. cereus* cultivado aeróbicamente en un medio de sacarosa/extracto de levadura (Medio G, ver *Material y Métodos*). Las membranas se preincubaron con la concentración de KCN indicada por 3 min a 30°C. La reacción se inició con la adición de sustrato. La actividad se midió polarográficamente (ver *Material y Métodos*). Tomada de la referencia 7.

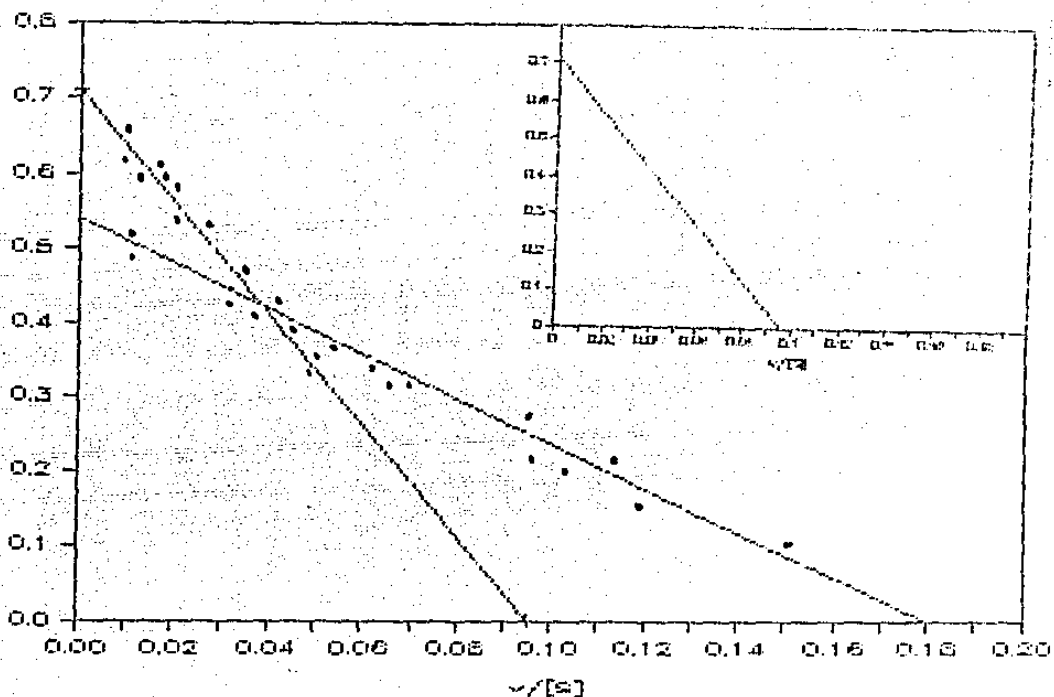


Figura 2. Curvas de Eadie-Hofstee de la cinética de saturación por oxígeno de la NADH oxidasa de membranas de *B. cereus* cultivados en medio G (ver *Material y Métodos*) aeróbicamente. Las membranas (0.21 mg de proteína) se incubaron en 3 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH=7.4) a 30°C a la concentración de oxígeno dada y la reacción se inició inmediatamente con la adición de NADH (conc. final 50  $\mu$ M). La velocidad está dada como  $\Delta$  de Absorbancia/2 min/10  $\lambda$  membranas y la concentración de oxígeno como % de saturación. Tomada de la referencia 22. En el recuadro se presenta el mismo experimento con 1mM de KCN.

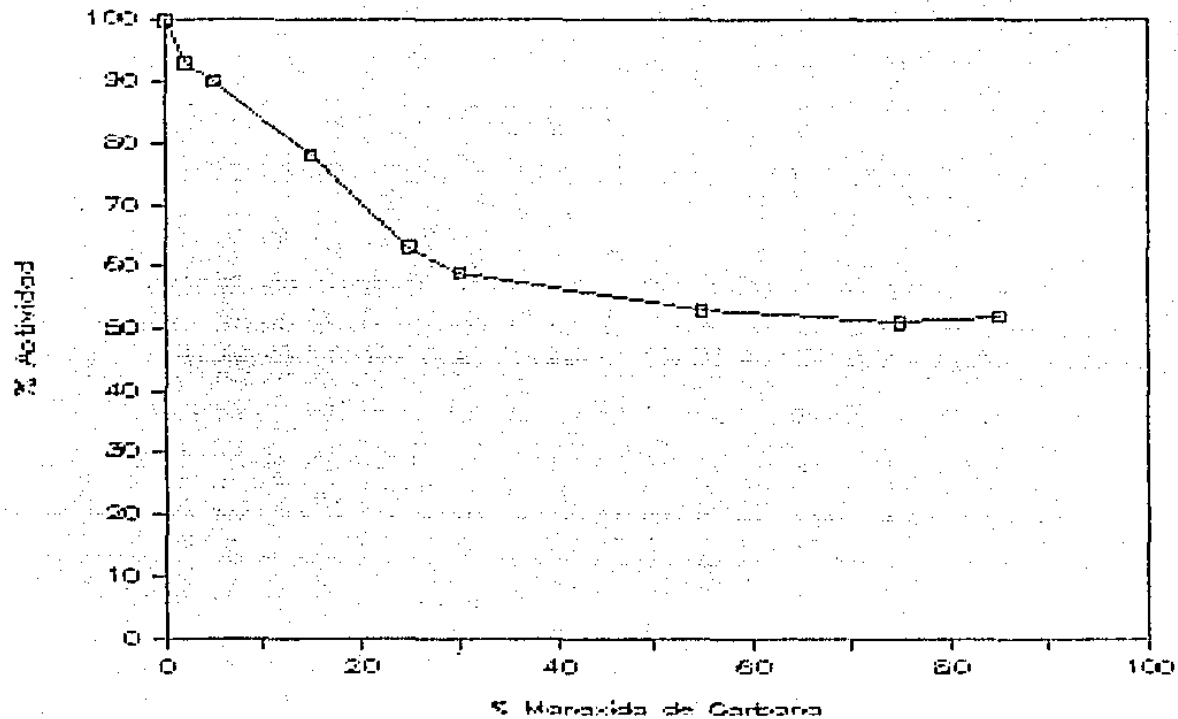


Figura 3. Efecto del monóxido de carbono (CO) sobre la actividad de TMPD-oxidasa de membranas cultivadas aeróbicamente en medio G. La actividad se midió polarográficamente en 3 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M a 30°C a las concentraciones de inhibidor que se indican, la reacción se inició con la adición de sustrato. Tomada de la referencia 22.

enzima. Existe también el dato de que a pesar de que se exponen las membranas a altas concentraciones de CO, la inhibición nunca llega a ser del 100 % (ver fig. 3), esto no se ha podido explicar (22).

Por otro lado, se obtuvo en el laboratorio una mutante carente de citocromo aa<sub>3</sub>, de la cual no se ha caracterizado la mutación, si reside en la síntesis del hemo o en la síntesis de la apoenzima. Con anticuerpos anti-aa<sub>3</sub>, puede verificarse la presencia de la proteína en la células de la mutante.



## MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo se utilizó una cepa de *B. cereus* aislada y caracterizada por Andreoli (1).

### CULTIVO DE LA BACTERIA.

El medio de cultivo que se utilizó fue el medio G modificado (13), el cual contenía sacarosa 0.2 %,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.4 %,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 %,  $\text{MgSO}_4$  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 %.

Las bacterias se cultivaron en un fermentador de 20 litros (Centro de Instrumentos-UNAM) a 30°C con agitación (200' RPM) y aereación vigorosa (10 litros de aire/min). El cultivo se inició con 4 litros de inóculo, procedente de cuando menos 4 transferencias. Con esto aseguramos la sincronía del cultivo en un 95 %. Las células se cosecharon dos horas después de haber concluido el crecimiento vegetativo, momento en el cual la expresión de los citocromos es máxima (6,7). Para esto se usó una centrifuga de flujo continuo Sharples Mod T1, la pastilla de células se lavó 2 veces con amortiguador de Tris-HCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  5mM y  $\text{CaCl}_2$  5 mM (Amortiguador TCM). Las células se guardaron en pastilla húmeda a -70°C hasta su utilización.

### FRACCIONAMIENTO CELULAR.

Las células resuspendidas en amortiguador TCM se rompieron en

un fraccionador DYNO-MILL (Type KDL) con perlas de vidrio de 0.1 a 0.2 mm de diámetro por 45 seg (ciclos de 15 seg) en presencia de PMSF (inhibidor de proteasas) 0.1 mM. El homogenado se filtró para eliminar las perlas de vidrio, y se centrifugó a 10,000xg aproximadamente, en una centrifuga Sorvall (Mod.RC-5B) para eliminar la pared celular. El sobrenadante se centrifugó a 186,000xg en una ultracentrifuga Beckman (Mod.L7-55). La pastilla de membranas se lavó dos veces con amortiguador TCM y se resuspendió en el mismo amortiguador a una concentración de 10 mg/ml aproximadamente.

#### ENSAYOS ENZIMATICOS.

Ancorbato-TMPD oxidasa. La actividad se midió polarográficamente en un oxímetro Yellow-Springs (Mod.53) a 30°C en 2.5 ml de una mezcla que contenía 100 mM de fosfato de potasio (pH=6.8), 10 mM de ascorbato de sodio más 0.1 mM de TMPD, se registró la autooxidación del TMPD y se arrancó la reacción con la adición de enzima.

#### ANALISIS ESPECTRAL.

La fracción enzimática se resuspendió en amortiguador TCM con glicerol 50 % (V/V) (fracciones membranales) o amortiguador sin glicerol (fracciones solubilizadas) y se analizó en un espectrofotómetro SLM-Aminco (Mod.DW-20 II) a temperatura ambiente (1 cm de paso óptico) o a 77 K (2 mm). Las concentraciones de citocromos se determinaron de los espectros

diferenciales (reducido con ditionita menos oxidado con persulfato o reducido con ditionita + CO menos reducido con ditionita) de los fracciones a temperatura ambiente. Los coeficientes de absorptividad molar usados fueron: citocromo  $a_a$ ,  $16.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , 603-630 nm (40); citocromo  $b$ ,  $20 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , 563-575 (40); citocromo  $c$ ,  $19 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , 550-540 (40); citocromo  $a_a$ -CO,  $8.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , 590-605 (5); citocromo  $o$ -CO,  $145 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , 415-430 (5).

#### ELECTROFORESIS.

La electroforesis se realizó en una cámara Hoefer (Mighty Small II SE 250) con refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ ) de acuerdo con el método de Laemmli (20). La electroforesis se corrió en geles de poliacrilamida al 10 o 12 % con Lauril sulfato de litio (o de sodio) al 1 % a 1.5 mA por carril usando azul de bromofenol para marcar el frente. La bandas de proteína fueron tenidas con azul de Coomassie.

#### DETERMINACION DE PROTEINA.

Se utilizó el método de Lowry (23), modificado por Markwell y cols. (25), utilizando SDS para eliminar los efectos de detergentes y fosfolípidos.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### PURIFICACION.

La purificación de citocromos oxidasas bacterianas, así como de otras proteínas intrínsecas de membrana, generalmente es problemática, especialmente (a) en la obtención de especies solubles que retengan su actividad biológica y su estructura nativa y (b) para la prevención de agregaciones (o dispersiones) artefactuales de los complejos solubilizados, cuya asociación (o dispersión) no tiene relevancia biológica (3). Tales observaciones nos llevan a tener cuidado en el método o el tipo de detergente a utilizar en la solubilización de una enzima membranal.

Se han publicado las propiedades de casi todos los surfactantes usados en Biología (3). Generalmente se recomiendan los detergentes no iónicos o switteriónicos en los procesos de solubilización, pues no interfieren con los pasos de purificación por cromatografía de intercambio iónico. Los derivados del éter de polioxietileno (de la serie Triton X o Erij, por ejemplo), se han usado mucho puesto que proporcionan solubilización y retención de la actividad catalítica. Desafortunadamente, no rompen fácilmente las interacciones proteína-proteína, de aquí el peligro de agregaciones artefactuales (3). Además, los productos comerciales frecuentemente son impuros, y difíciles de purificar, contienen cantidades variables de aditivos, varían de lote a lote o después de almacenamiento prolongado. La composición de los detergentes

líquidos no iónicos puede ser heterogénea. Una desventaja especial en la purificación de proteínas membranales es que éstos detergentes son extremadamente difíciles de separar de las proteínas aisladas. Esto se debe en parte a su baja concentración micelar crítica (CMC), y en parte a su gran afinidad que tienen por las proteínas de membrana (4). Un valor alto de CMC es deseable cuando se requiere una rápida remoción del detergente por diálisis. En experimentos de filtración molecular, el tamaño de la micela es importante puesto que la separación de diferentes proteínas membranales, de acuerdo a su peso, es más fácil con un detergente de tamaño micelar pequeño (14). A pesar de estas limitaciones, el Tritón X-100 se usa con éxito considerable para oxidasas bacterianas (3,32).

Nosotros decidimos utilizar el Tritón X-100. Métodos que involucran este detergente se han utilizado para la solubilización de las oxidasas de *P. denitrificans*, P53, *Rh. sphaeroides*, *Th. thermophilus*, entre otras (27). Específicamente, nos basamos en el método publicado por Song y Yanagita (32) y por Barnes y Poole (3) para la purificación de citocromo  $a_3$  y  $a$  del bacilo termófilo P53. Este consistió en tres pasos comunes: (I) un tratamiento con sales biliares (II) un tratamiento con cloruro de litio y (III) la extracción de las membranas con Tritón X-100.

El procedimiento fue el siguiente: Las membranas se resuspendieron en una solución de sodio de sodio 2 M, bicarbonato de sodio 0.1 M,  $\text{CaCl}_2$  0.1 M, Tritón  $10^{-4}$  M, EDTA 10<sup>-4</sup> M y DTT 0.5 mM. El nos genodo se separa por 10 min (6) a 10000 rpm.

Las membranas se sedimentaron a 186,000xg. La pastilla se resuspendió en una solución de LiCl 2.5 M y se sonico por 10 min. Las membranas se sedimentaron. Antes de seguir con el proceso de solubilización se decidió analizar la actividad en las fracciones resultantes. En la figura 4 se muestran las actividades en los extractos durante los tratamientos con sales biliares y con cloruro de litio. Como se puede observar, la actividad de TMPD-oxidasa de las membranas después del tratamiento con sales biliares sin sonicar, no se modifica con respecto a la actividad original en las membranas en amortiguador TCM (barras 2 y 1 respect.), la actividad en el sobrenadante de este tratamiento es mínima (barra 3). Después de la sonicación, la actividad específica de las membranas se duplica (barra 4), mientras que la actividad que pasa al sobrenadante (barra 5), aunque un poco mayor a la que se obtiene en el sobrenadante sin sonicación, sigue siendo mucho menor que la membranaral. Cuando las membranas son tratadas con cloruro de litio, sin sonicar, la actividad específica decae en un 60 % (barra 6). Esta actividad decae aún más si se incluye la sonicación en el tratamiento (barra 8).

De acuerdo con estos resultados se decidió efectuar sólo el tratamiento con sales biliares eliminando el paso con cloruro de litio, puesto que en éste último se pierde la mayor parte de la actividad, aún después de haber lavado las membranas con amortiguador TCM.

El siguiente paso consistió en probar la solubilización de las proteínas de las membranas. Se decidió probar inicialmente si

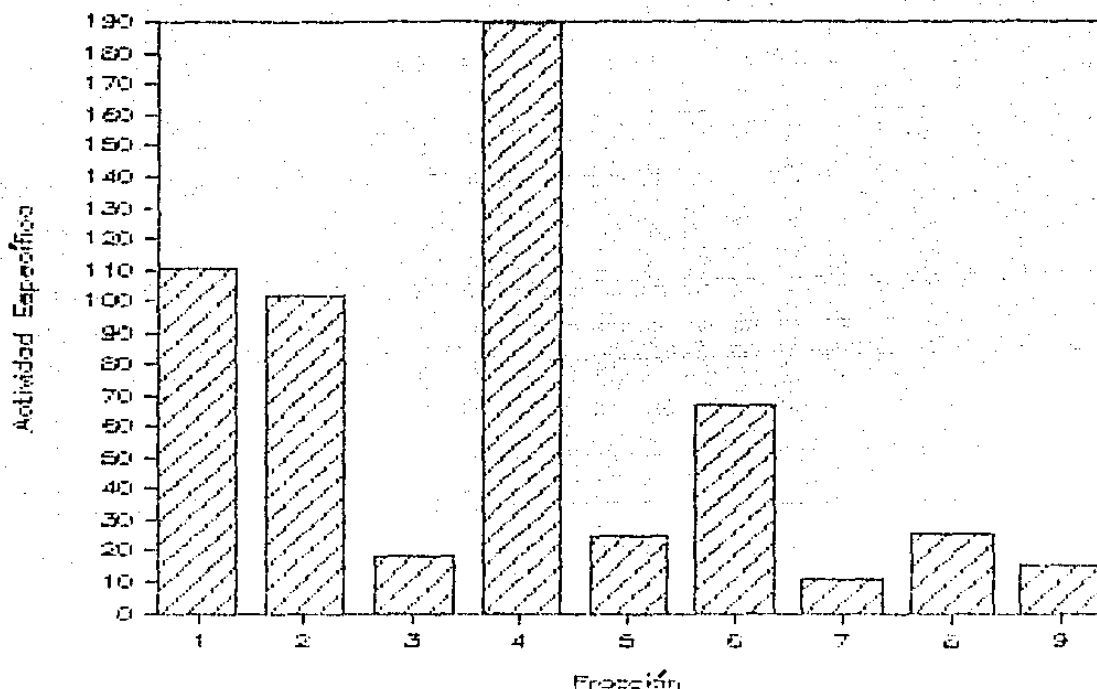


Figura 4. Actividad de TMPD-oxidasa de las fracciones obtenidas por el tratamiento con sales biliares y cloruro de litio (ver texto). La actividad se midió en 0.1 mg de proteína aproximadamente de acuerdo a la técnica especificada en sección de *Material y Métodos*. Fracciones: 1.- Membranas iniciales resuspendidas en amortiguador TCM. 2.- Las membranas iniciales se sedimentaron y se resuspendieron en amortiguador de colato-desoxicolato, se volvieron a sedimentar y la actividad se midió en la pastilla resuspendida en amortiguador TCM. 3.- Sobrenadante resultante en el proceso anterior. 4.- Igual que en el caso de la barra 2 a diferencia de que las membranas resuspendidas en sales biliares se sonicaron 10 min. 5.- Sobrenadante del paso anterior. 6.- Las membranas resultante del tratamiento de sales biliares con sonicación, se sedimentaron y se resuspendieron en solución de LiCl, se volvieron a sedimentar y la actividad se midió en la pastilla resuspendida en amortiguador TCM. 7.- Actividad medida en el sobrenadante del paso anterior. 8.- Igual que en el caso de la barra 6 más sonicación de 10 min. 9.- Actividad en el sobrenadante del paso anterior. La actividad está dada en  $\mu\text{moles O}_2/\text{min}/\text{mg}$  proteína.

la actividad no se afectaba con el detergente. Entonces, preliminarmente se midió el efecto sobre la actividad membranal en función de la concentración de detergente (fig.5). Se utilizaron tanto Triton X-100 como Sarkosyl (N-Lauroilsarcosina). Se pensó en éstos pues, como ya se menciona, el Triton X-100 se ha usado en la purificación de la mayoría de las oxidasas, sin embargo el Sarkosyl también se ha utilizado para purificar complejos respiratorios de *Escherichia coli* (18). Como se puede apreciar (fig.5) la actividad de TMPD-oxidasa no es sensible a Triton X-100, mientras que es inhibida por Sarkosyl, a 0.5 % del detergente la actividad de la oxidasa disminuye casi en un 50 % . Por lo tanto se decidió utilizar el Triton X-100 para ensayar la solubilización.

Subsecuentemente, se determinó la concentración de detergente necesaria para obtener la máxima solubilización de la actividad de oxidasa. Para esto, las membranas rasuradas con sales biliares se sedimentaron y se resuspendieron en un amortiguador de Tris-HCl 50 mM (pH=8) NaCl 50 mM con varias concentraciones de Triton X-100 (fig.6). Como se puede observar la actividad solubilizada aumenta casi proporcionalmente hasta una concentración de 4 % (P/V) del detergente después aumenta un poco más obteniéndose el máximo de solubilización a 6 % . La actividad solubilizada recuperada a esta concentración de detergente fue buena (mayor del 90 %). por lo tanto se decidió usar esta concentración para la solubilización de la oxidasa. La actividad específica a esta concentración de Triton no disminuye.



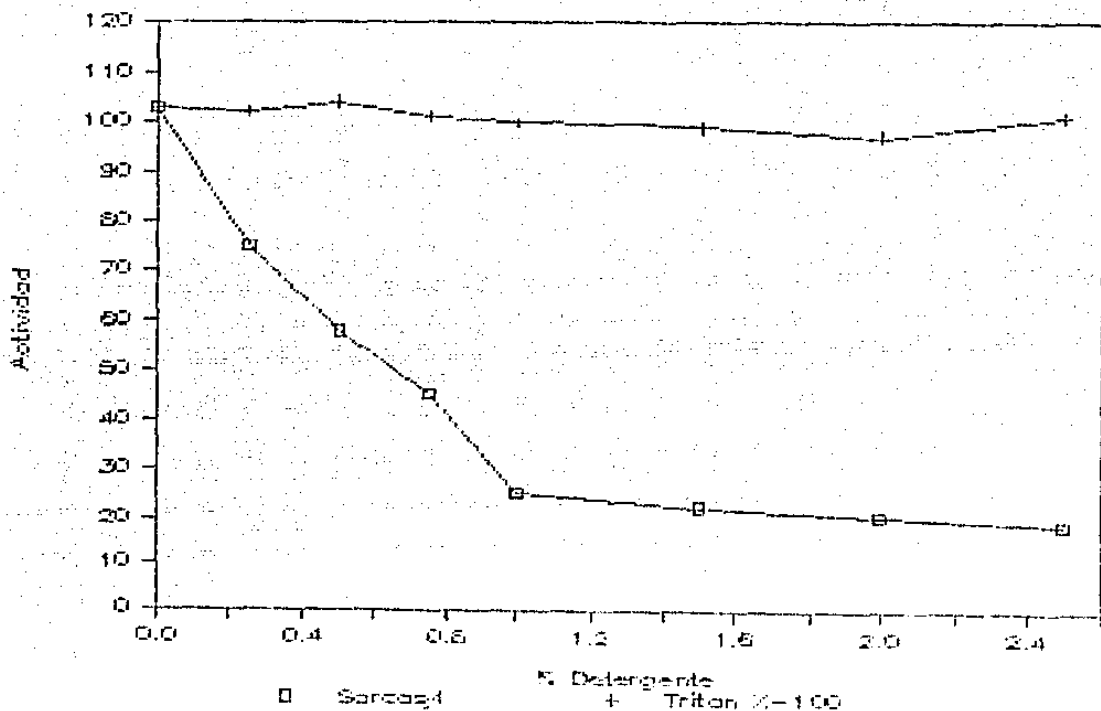


Figura 5. Sensibilidad de la actividad de TMPD-oxidasa a Triton X-100 y Sarkosyl de membranas aisladas de *B. cereus*. La actividad de TMPD-oxidasa se midió como lo descrito en la sección de *Material y Métodos*. Las membranas se preincubaron en un amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH=6.8) con las concentraciones de detergente indicadas, por 3 min a 30°C, la reacción se inició con la adición de sustrato.

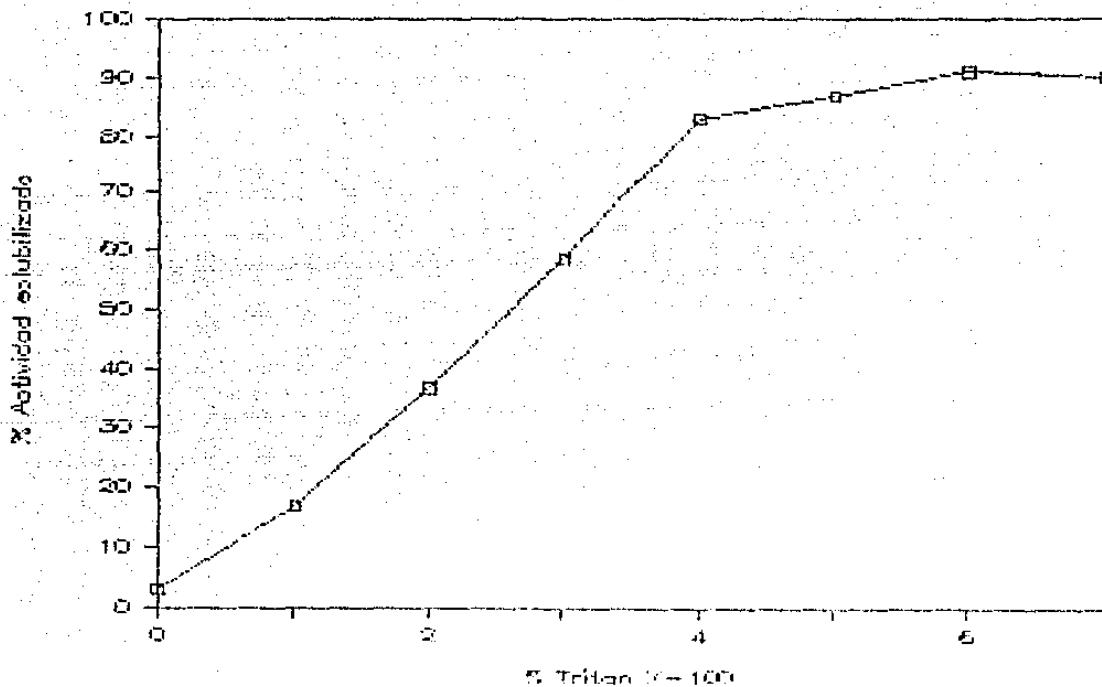


Figura 6. Rendimiento de la solubilización de la actividad de TMPD-oxidasa de membranas de *B. cereus* tratadas con sales biliares, por Triton X-100. Las membranas se sedimentaron, se resuspendieron en un amortiguador (ver texto) con las concentraciones de detergente indicadas, se agitaron por 20 min a 4°C. El homogenado se sedimentó y la actividad se midió en el sobrenadante y en las membranas. La actividad que se expresa es el % de actividad total recuperado en el sobrenadante. La actividad total se refiere a la suma de la actividad total en el sobrenadante más la de la fracción membranar.

Posteriormente, se registro el espectro de absorción del extracto membranal con Triton X-100 y se comparó con el espectro de las membranas iniciales así como con el de las membranas después de la extracción (Fig.7). Como se puede observar en la figura, en donde aparecen los espectros reducido con ditionita menos oxidado con persulfato, la proporción de los citocromos no varía apreciablemente, mientras que la cantidad específica de citocromos se duplica. Esto es consistente con la duplicación de la actividad específica de TMPD-oxidasa.

Una vez que pudimos obtener una buena solubilización de la actividad en un extracto que prácticamente tenía todos los citocromos en una proporción muy parecida a la encontrada *in situ* en la membrana, el siguiente paso consistía en separar la actividad enzimática del resto de la proteína. Las técnicas que se han aplicado para separar este tipo de extractos solubles de citocromos se basan en la cromatografía de intercambio iónico. No obstante también se han usado otros métodos, como la precipitación con sulfato de amonio, la cromatografía de absorción, etc. Decidimos ensayar la cromatografía en DEAE que se usó para la separación de las oxidasas de PS3 (3). El protocolo original consistía en diluir el extracto soluble de Triton, tres veces y aplicar a una columna de DEAE-celulosa. En este paso, en el caso de PS3, la oxidasa  $aa_3$  no tiene afinidad por la resina. Por otro lado, el citocromo  $b$  es absorbido en la columna, además de la mayoría del los citocromos  $b$ , por lo tanto aquí se puede tener una separación de estas oxidasas. Entonces nuestro extracto de

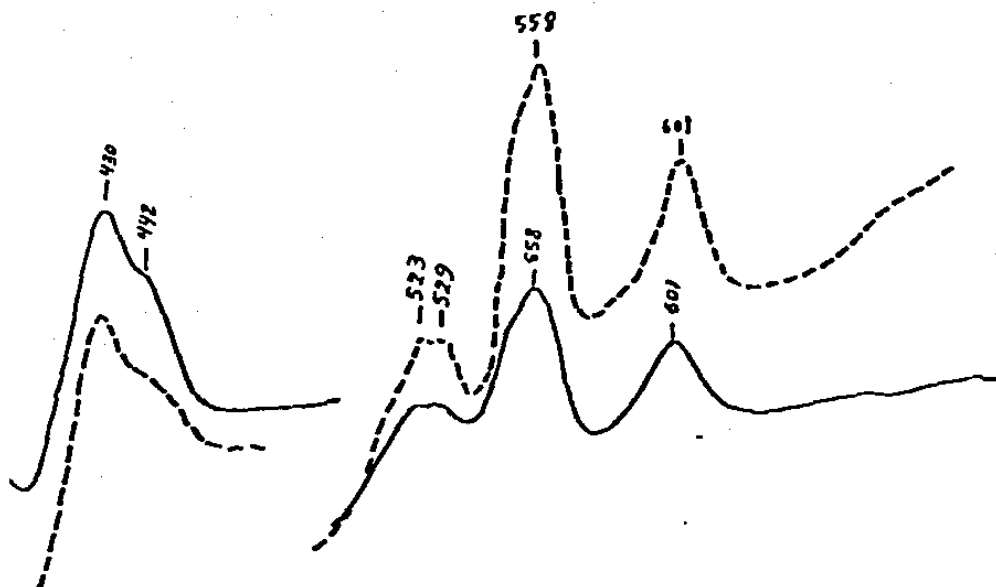


Figura 7. Espectro de absorción del extracto de citocromos con Triton X-100 comparado con el extracto membranar. Los espectros (reducido con ditionita menos oxidado con persulfato) fueron registrados a 30°C como se explica en *Material y Métodos*. El trazo continuo se refiere a las membranas. El trazo discontinuo se refiere al extracto de Triton.

citocromos se diluyó tres veces con solución de Tritón X-100 al 0.5 % y se aplicó a una columna de DEAE-Celulosa (Whatman DE-22) de 15 cm x 2.5 cm, equilibrada con Tritón X-100 0.5 %, Tris-HCl 50 mM (pH=8). Una vez absorbida la muestra, la columna se lavó con el amortiguador de equilibración (1 volumen) y con agua desionizada (10 volúmenes). Posteriormente se aplicó un gradiente de NaCl de 0 a 300 mM de la sal disuelta en el mismo amortiguador. Se registró la absorbancia del material de salida a 405 nm (señal de citocromos) de forma continua con un registrador (LKB 2239 Uvicoro SII). La actividad se midió en 200  $\mu$ l de cada fracción de 6 ml. Los resultados se muestran en la figura 8.

Como se observa en la figura 8, inicialmente se detectó una fracción con señal de citocromos y con actividad de TMD-oxidasa que no tenía afinidad por la resina (Fracción 1). Cuando se aplicó el gradiente de NaCl aproximadamente a 100 mM de la sal apareció un pico de actividad y de citocromos (Fracción 2). Se analizaron espectrofotométricamente las fracciones 1 y 2, los espectros aparecen en la figura 9. En la fracción 1, se detectaron la señales de todos los citocromos inclusive de cit a. Por otro lado en la fracción 2 se registró la presencia de citocromo a<sub>3</sub>, esto es, picos a 443 y 601 nm, mientras que poca señal de citocromo c (550 nm) y citocromos b (555-562 nm). En esta fracción obtuvimos entonces una preparación de oxidasa a<sub>3</sub> con una contaminación de otros citocromos de menos del 10 % (ver más adelante). El espectro de monóxido de carbono también revela la presencia de a<sub>3</sub> (valle a 444 nm) no observándose señal de cit c (valle a 429-430 nm).

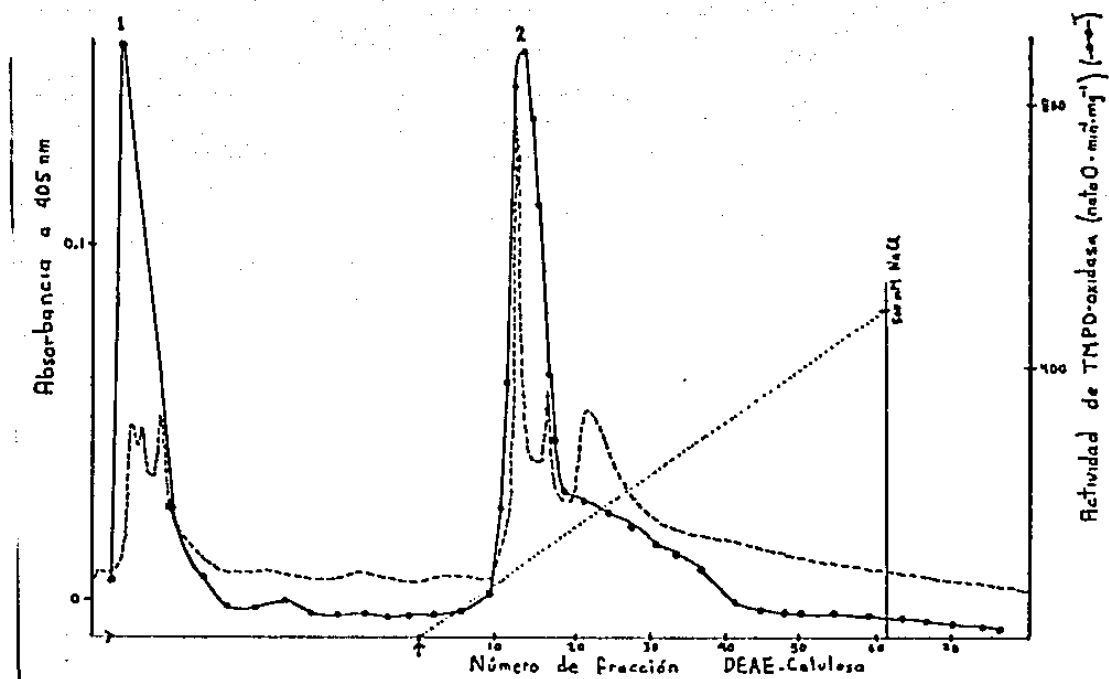


Figura 8. Cromatografía del extracto de citocromos en DEAE-Celulosa (DE-22). La línea punteada indica la concentración estimada de NaCl durante el gradiente de elución. La cromatografía se corrió a 4°C.

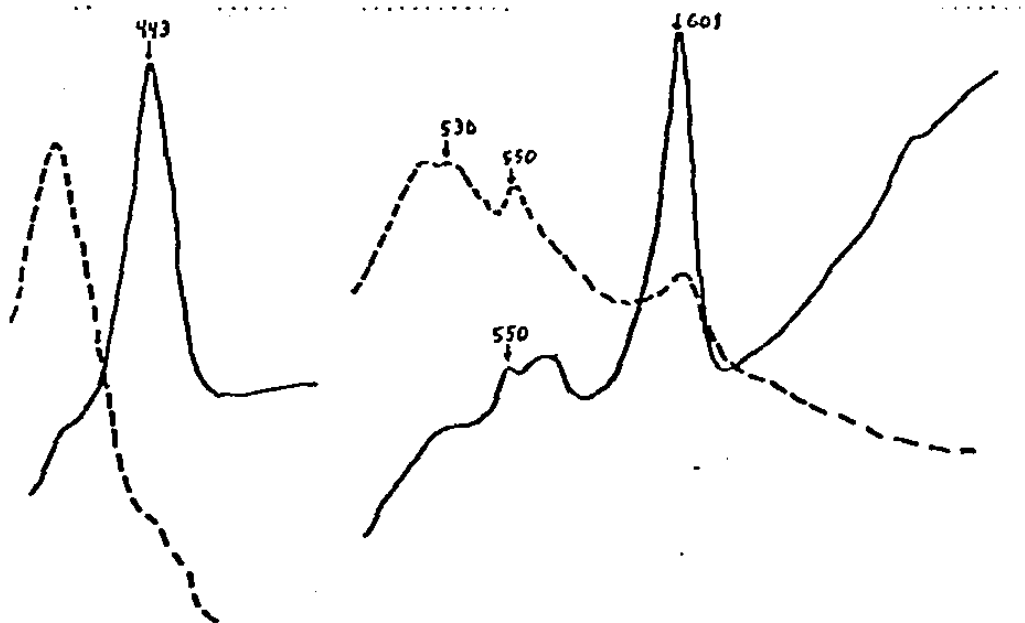


Figura 9. Espectros de las fracciones 1 (---) y 2 (—) procedentes de la cromatografía en DEAE-Celulosa. Los espectros reducido con ditionita menos oxidado con persulfato, fueron registrados como se indica en *Materiales y Métodos*.

La pregunta que surgió aquí fue sobre el porqué no toda la señal de  $a_{29}$  se retenía en la columna, sino que parte de esta eluye desde el principio de la cromatografía. En el caso de PSS, Sone y Yanagita (32) señalan que en ocasiones si la concentración de detergente baja de 0.5 % material proteico se puede precipitar en la columna, sin embargo si la columna se lava solo con el amortiguador de equilibración (0.5 % de Tritón X-100) los resultados son muy semejantes.

Se decidió tratar de separar los citocromos de la fracción 1 obtenidos del paso anterior. Para esto se decidió diluir la fracción a 2 volúmenes y aplicar a una segunda columna de DEAE con mayor capacidad, equilibrada con Tritón X-100 0.25 %, Tris-HCl (pH=8). En la figura 10 se presenta el perfil de elución de esta cromatografía en DEAE-Biogel. Inicialmente eluye una fracción que tiene señal de citocromos pero que no presenta actividad de oxidasa (Fracción a). Después de lavar la columna con amortiguador de equilibración, se lava con el mismo amortiguador más NaCl 100 mM. En este lavado se eluye un pico de citocromos y de actividad (Fracción b).

Al hacer el análisis espectroscópico de las fracciones en esta última cromatografía, se encontró que la fracción a, que no tiene afinidad por la resina, está constituida prácticamente de citocromos tipo  $b$ , baja cantidad de cit  $c$ , y prácticamente sin cit  $a$ . Por otro lado, la fracción b tiene señal tanto de citocromo  $c$  (548 y 414 nm) como de  $a_{29}$  (444 y 604 nm) (ver figura 11)



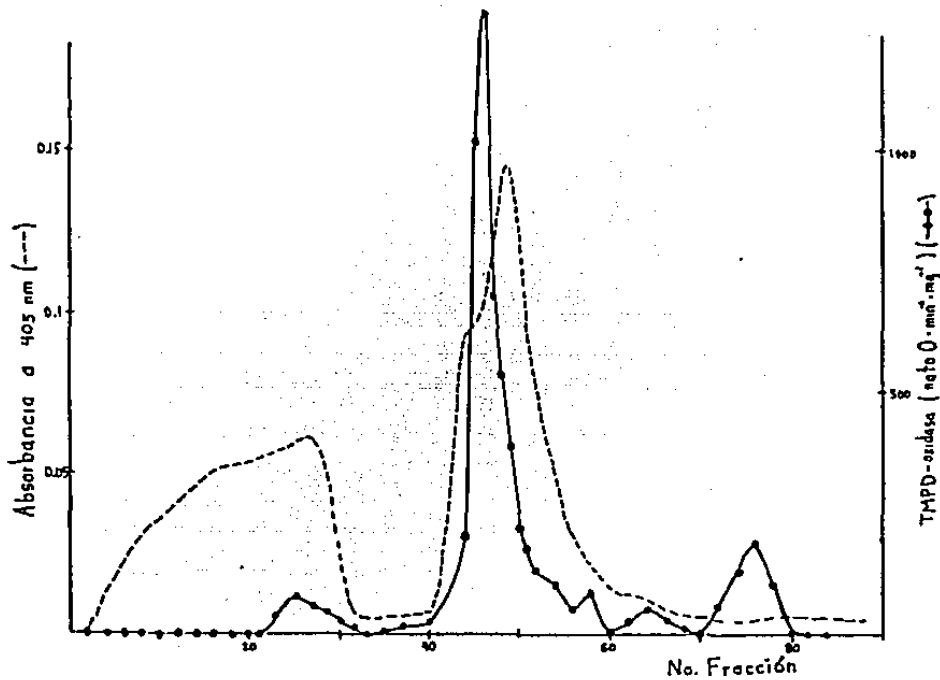


Figura 10. Cromatografía de la Fracción 1 en DEAE-Biogel. En la gráfica se presenta Actividad de TMPD-oxidasa (neto 0/min/mg prot) y Absorbancia a 405 nm.

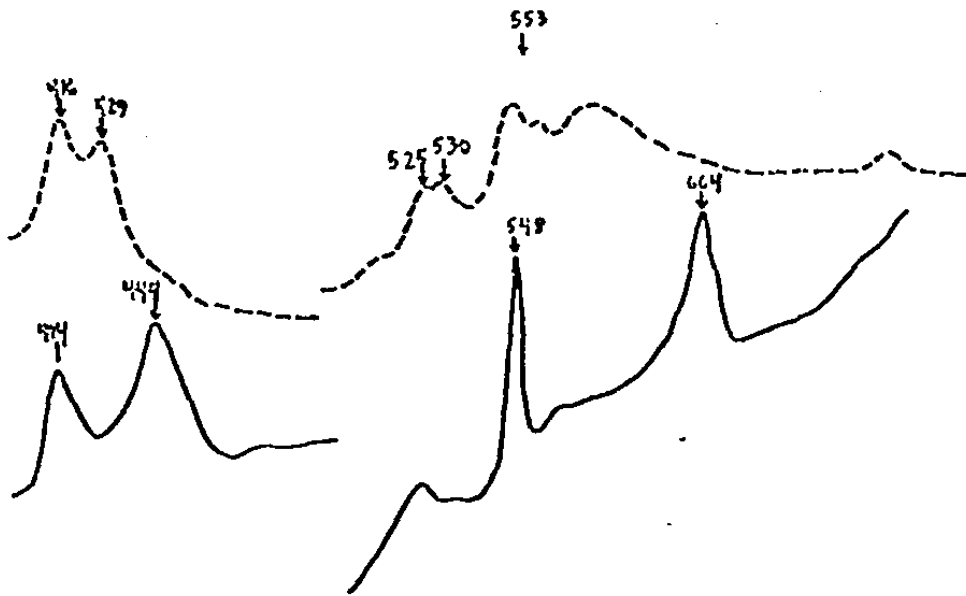


Figura 11. Espectros de absorción de las fracciones a (---) y b (—) de la cromatografía en DEAE-Biogel. Los espectros se registraron a 30°C como lo indicado en *Materiales y Métodos*.

Por los datos de la electroforesis (Fig.12) la cantidad específica de hemo a (ver adelante), y la actividad específica tenemos, hasta este paso, de 6 a 10 veces de purificación de aa<sub>9</sub> y del complejo caa<sub>9</sub>. Por lo tanto se decidió aumentar los pasos de purificación.

Se ensayó la precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Para esto, las fracciones 2 (aa<sub>9</sub>) y b (caa<sub>9</sub>) se dializaron contra amortiguador Tris-HCl 50 mM, Triton X-100 0.5 % y se concentraron 10 veces cubriendo las bolsas de diálisis con sacarosa. Se hizo la precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10, 20, 30 y 40 % de saturación. La actividad se concentró en el levitado de 40 % de saturación. Para el caso del cit aa<sub>9</sub> la actividad específica no aumenta más que en un 15 % aprox (Tabla III). Sin embargo la cantidad específica de hemo a aumenta en un 50 % (4 nmol hemo a/mg prot ver Tabla III). Para el caso del complejo caa<sub>9</sub> la actividad aumenta en un 15 % y la cantidad del hemo a en un 50 % como en el caso de aa<sub>9</sub> (Tabla III).

Se pensó en aumentar un paso más de filtración molecular. Sin embargo, se enfrentó el problema de separar el detergente de la preparación. Como ya se mencionó el Triton tiene una CMC muy baja (0.24 mM) y un tamaño micelar grande (PM prom. 90,000) (3). Por lo que podría resultar problemático en la técnica de filtración molecular. Como no se podía eliminar el detergente por diálisis, se pensó en pasar el extracto enzimático por una columna de DEAE lavar con amortiguador sin Triton y eluir con el mismo amortiguador que contenga un detergente de CMC más alta.

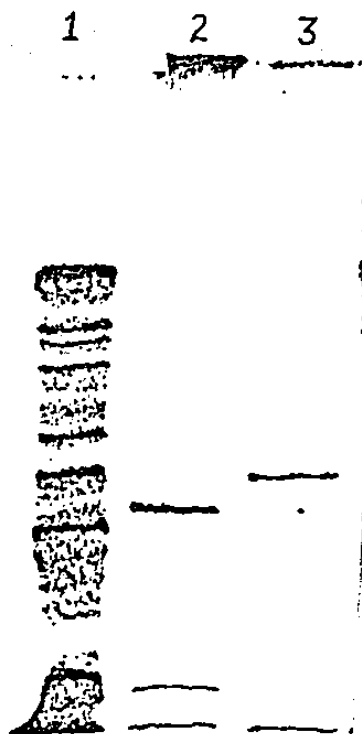


Figura 12. Electroforesis de las preparaciones de  $\alpha\alpha_9$  (Carril 2) y  $\alpha\alpha_9$  (Carril 3) después del fraccionamiento en DEAE comparando con el patrón electroforético de las membranas íntegras (Carril 1), corrida en geles de acrilamida 10 % en presencia de LDS (1%), según lo indicado en la sección de *Materiales y Métodos*.

El detergente utilizado fue el Sarkosil (N-lauril,sarcosina). Se ha utilizado este detergente en situaciones similares a bajas concentraciones (0.05 %). A esta concentración de detergente la actividad de la oxidasa no se afecta (Fig.5) , y nos encontramos abajo de su CMC. Entonces, los extractos de la precipitación con sulfato de amonio (tanto aa<sub>g</sub> como caa<sub>g</sub>) se dializaron contra amortiguador Tris-HCl 10 mM (pH=8) y se diluyeron 5 veces con el mismo amortiguador. Se aplicaron (por separado) a una columna de DEAE-Celulosa (Whatman DE-22, 5 x 1 cm). La columna se lavó con Tris-HCl 10 mM (15 vols.) con Tris-HCl 10 mM, Sarkosyl 0.05 % (15 vols.) y se eluyó con Tris HCl 10 mM, Sarkosyl 0.05 % y NaCl 150 mM (todo a pH=8). En este paso la actividad específica se eleva ligeramente para los dos casos (aa<sub>g</sub> y caa<sub>g</sub>, ver Tabla III). Posteriormente las fracciones se pasaron por una columna de filtración molecular (Ultrogel AcA-34, LMB 20,000 a 350,000), equilibrada con Tris-HCl 10 mM (pH=8), NaCl 100 mM y Sarkosyl 0.05 % (ver Fig. ). En este paso, la actividad específica no se modificó con respecto al paso anterior, sin embargo la cantidad específica de hemo a aumentó en un 30 % (Tabla III).

En la figura 13 se muestra el gel de electroforesis en poliacrilamida en presencia de LDS (ver métodos). Se observa que la banda correspondiente a la enzima está casi limpia.

Tabla III. Purificación de citocromo  $\alpha_3$  y  $caa_3$  de *Bacillus cereus*.

PASO	Proteína (mg)	Actividad específica <sup>1</sup>	Actividad total <sup>2</sup>	Citocromo <sup>3</sup> a
Membranas	2,732	55 (0) <sup>4</sup>	153,000 (100) <sup>5</sup>	0.35
Tratamiento colato	994	85 (1.5)	84,560 (55)	0.43
Extracto Tritón	126	210 (3.8)	26,460 (17)	0.69
DEAE-Cel. Frac. 2 ( $\alpha_3$ )	15	829 (15)	12,435 (8)	1.69
$\alpha_3$ pp. sulf. amonio.	11	919 (16.7)	10,235 (6.7)	3.5
Cambio a Sarkosyl $\alpha_3$	8	1,025 (18.6)	8,520 (5.5)	-
$\alpha_3$ Aca-34	6	1,100 (20)	6,215 (4)	8.1
DEAE-Biogel Frac. b ( $caa_3$ )	9	1,250 (22.7)	11,560 (7.5)	1.7
$caa_3$ pp. sulf. amonio.	6	1,520 (27.6)	9,420 (6.1)	-
Cambio a Sarkosyl	4	1,620 (29.5)	6,230 (4)	3.7
$caa_3^6$ Aca-34	3	1,590 (29)	5,100 (3.3)	8.9

(1) nato O/min/mg prot. (2) nato O/min . (3) nmol hemo a/mg prot. (4) (veces de purificación). (5) (% rendimiento). (6) Cantidad de hemo c: 8.2 nmol hemo g/mg prot.

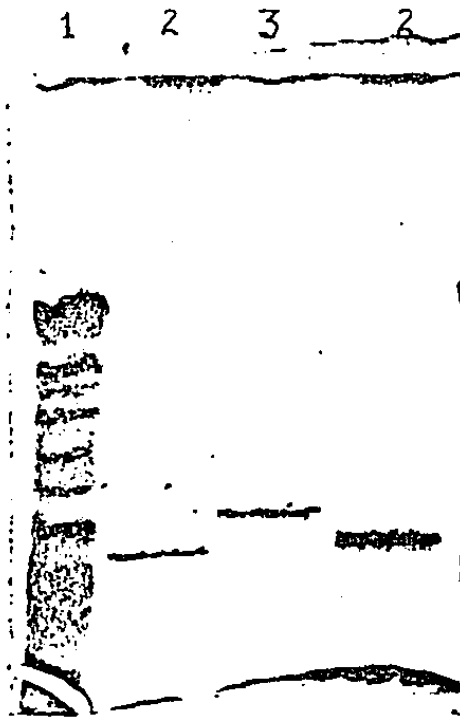


Figura 13. Electroforesis de los citocromos  $\text{aa}_3$  (Carril 2) y  $\text{caa}_3$  (Carril 3) después de la precipitación con sulfato de amonio, el lavado del triton y la filtración molecular, comparando con el patron electroforético de las membranas íntegras (Carril 3). Mismas condiciones de la figura 12.

## PROPIEDADES DE LOS CITOCROMOS $aa_9$ Y $caa_9$ .

**Peso molecular.** Para determinar el peso molecular de las enzimas purificadas se realizó una electroforesis en poliacrilamida en presencia de LDS. Se corrieron varios marcadores de peso molecular. En la figura 14 se presenta el gel de la electroforesis y en la figura 15 se presenta la gráfica donde se interpolan los  $R_f$  del cit  $aa_9$  y del cit  $caa_9$ . De esta gráfica obtenemos los pesos de 71 kDa para  $aa_9$  y de 90 kDa para  $caa_9$ . Estos pesos son congruentes para las oxidasas de este tipo de otros microorganismos (ver Tabla I).

A partir de los datos de filtración molecular, se corrieron estándares en la columna de AcA-34 para hacer una curva de calibración de peso molecular. En la figura 16 se presenta la gráfica de la calibración de peso molecular por filtración molecular. Como puede observarse el peso molecular obtenido por esta técnica es más del doble del obtenido por electroforesis, 165 kDa para  $aa_9$  y 195 kDa para  $caa_9$ . Se pensó que las enzimas se encontraban formando multímeros para lo cual se diluyó 10 veces la muestra y se volvió a correr la cromatografía de exclusión. En la figura 17 se presentan los patrones de elución en AcA-34 de las enzimas. Como puede observarse en el trazo 1 se presenta el trazo para el cit  $aa_9$  concentrado (500  $\mu\text{g/ml}$ ) y en el trazo 2 el correspondiente al mismo citocromo diluido 10 veces (50  $\mu\text{g/ml}$ ). El volumen de elución para estas dos fracciones no cambia, lo que hace pensar que si la enzima se encuentra formando multímeros, estos no pueden ser disociados a las concentraciones usadas. Por



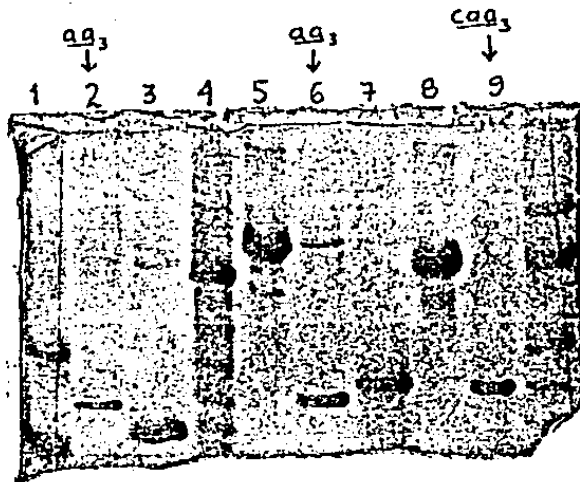


Figura 14. Electroforesis en poliacrilamida realizada como se indica en la sección de *Material y Métodos*, de la oxidasa  $aa_3$  y  $caa_3$  y estándares de peso molecular conocido. Carril 1: hemoglobina. Carril 2: cit  $aa_3$ . Carril 3: lisozima. Carril 4: alcohol deshidrogenasa. Carril 5: Glutamato deshidrogenasa. Carril 6: cit  $aa_3$ . Carril 7: apoferritina. Carril 8: albúmina bovina. Carril 9 Cit.  $caa_3$ .

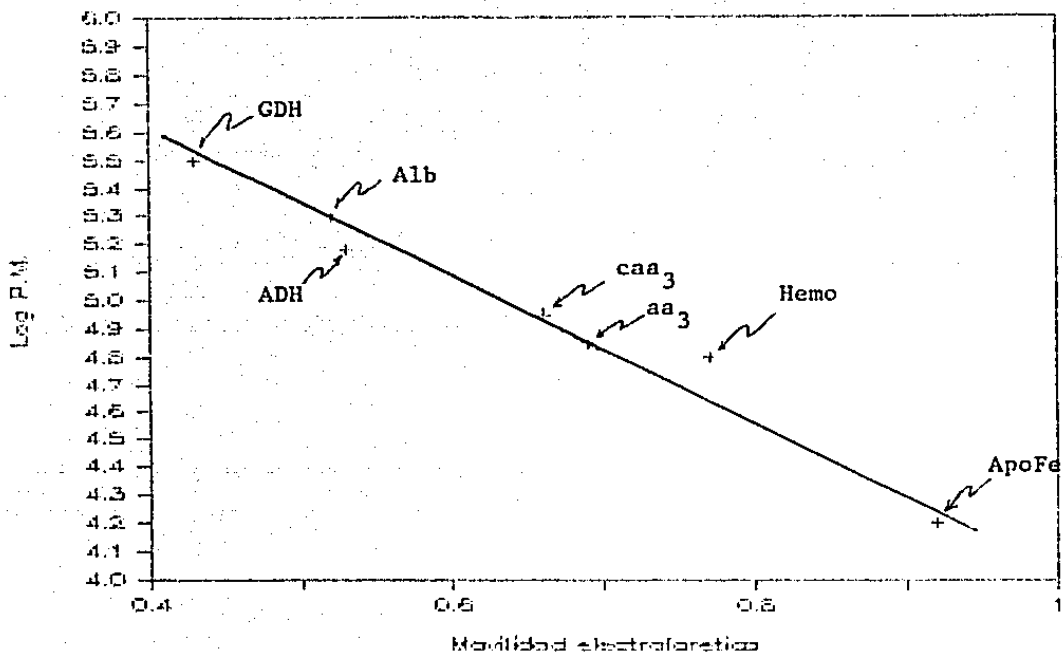


Figura 15. Curva de calibración de peso molecular de la electroforesis en poliacrilamida (Fig.14). La movilidad electroforética se refiere al Rf de las proteínas en el gel.

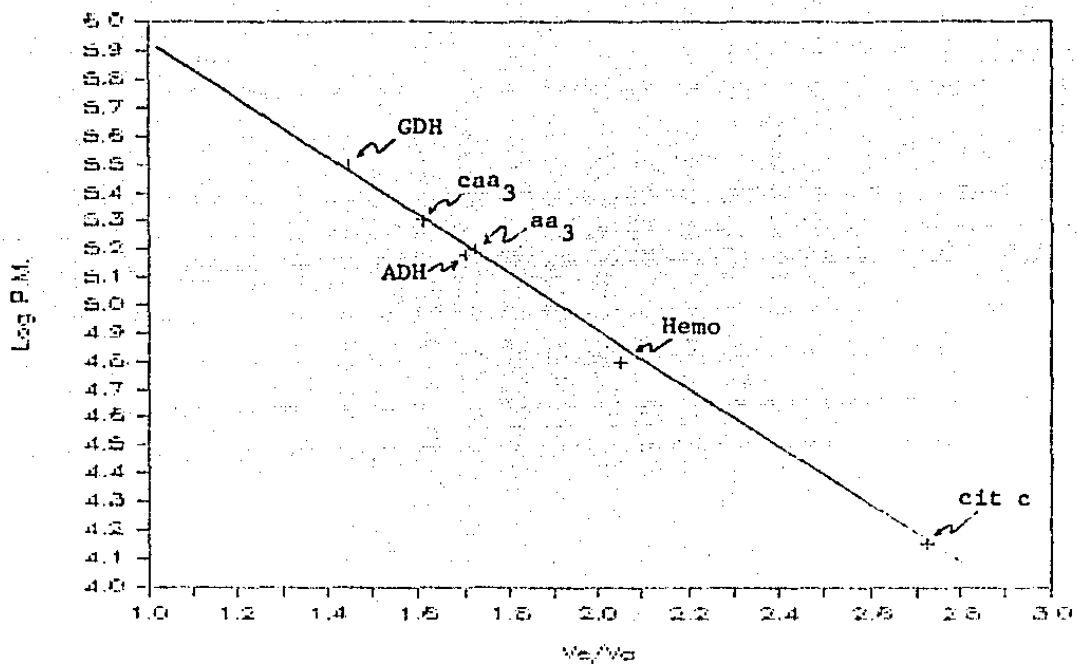


Figura 16. Curva de calibración de peso molecular por cromatografía en exclusión molecular en Ultrogel AcA-34 (ver texto). Se grafica el log del peso molecular contra el cociente volumen de exclusión de la proteína : volumen de exclusión ( $V_e/V_o$ ).

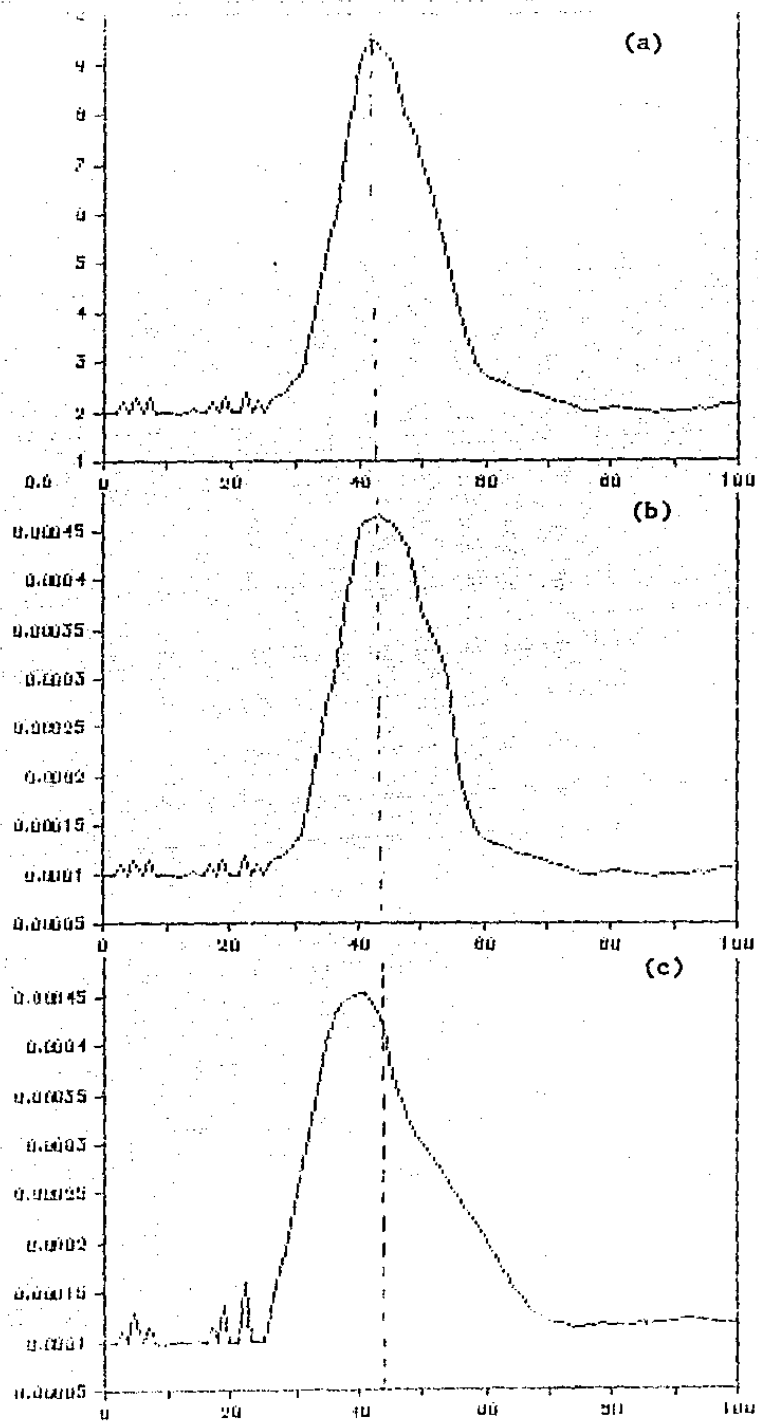


Figura 17. Patrón de elusión del cit  $aa_9$  y  $caa_9$  en Ultragel AcA-34 (ver texto). Trazo (a). cit  $aa_9$  500  $\mu g/ml$ , (b) y 50  $\mu g/ml$ . (c) Cit  $caa_9$  500  $\mu g/ml$ .

otro lado se cree que todavía se encuentran moléculas de Tritón interaccionando fuertemente con la enzima, puesto que los pesos moleculares obtenidos por este método no son múltiplos de los datos obtenidos por electroforesis, los cuales consideramos más confiables.

**Composición polipeptídica.** Como ya hemos visto, la mayoría de las oxidasas del tipo  $aa_3$  bacterianas, están constituidas por 2 ó 3 subunidades. En el caso de *B. cereus* resultó interesante investigar la composición polipeptídica de la enzima. En la figura 18 se presenta un gel de electroforesis en poliacrilamida 12 % en presencia de SDS. Como puede apreciarse aparecen 3 bandas en la tinción con azul de Coomassie. Estas subunidades tienen los siguientes pesos moleculares: 45, 23 y 13 kDa. Sumando los pesos de las tres subunidades nos da un total de 81 kDa, contra el dato de 71 kDa de los gels con LDS. Sin embargo, consideramos que esta disparidad no constituye una gran diferencia. Aun más, se ha reportado que las subunidades 2 y 3 de varias oxidasas tienen un corrimiento anómalo en electroforesis con SDS (24).

**Efecto de lípidos y detergentes.** La mayoría de las oxidasas tipo  $aa_3$  bacterianas requieren de fosfolípidos o detergentes para su actividad. El caso de la oxidasa  $aa_3$  de *B. cereus* no resultó una excepción en este sentido. En la Tabla IV se presentan los datos de la actividad de la oxidasa  $aa_3$  y del complejo  $caa_3$  en presencia de Tritón X-100 y azolectina de soya. La actividad basal se midió en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 6.8 partiendo de una preparación enzimática con Tris-HCl 50 mM pH 8 y sacosil 0.05%.



Figura 18. Electroforesis en poliacrilamida al 12 % con SDS del citocromo  $c_2$ . La electroforesis se corrió como se indica en la sección de *Materiales y Métodos*. En los dos carriles se corrieron 50  $\mu$ g de proteína.

Se observa que la actividad de TMPD-oxidasa depende fuertemente de la presencia de Tritón en el medio de reacción. En presencia de 0.1 % de Tritón X-100 la actividad se estimula unas 10 veces. Por otro lado, parece que la actividad no se activa la presencia de fosfolípidos en el medio. La actividad no cambia sobre la adición de asolectina de soya. Datos preliminares recientes indican que en amortiguador HEPES 50 mM (pH 7.2), la actividad aumenta y se vuelve sensible ahora a Tritón.

Tabla IV. Dependencia de Tritón X-100 y asolectina de soya sobre la actividad de TMPD-oxidasa de citocromo  $aa_3$  y  $caa_3$ .

Condición	Actividad de TMPD-oxidasa <sup>1</sup> (n=2) <sup>2</sup>	
	$aa_3$	$caa_3$
Sin adición	95	140
Tritón X-100 0.1 %	1,100	1,590
Asolectina de soya 35 $\mu$ g/ml	85	220

(1) nato O/min/mg proteína. (2) Los datos representan un promedio de dos mediciones.

El ensayo se realizó como se indica en *Materiales y Métodos*. La enzima se preincubó 15 min con las adiciones indicadas.

**Actividad con citocromo  $c$ .** Como ya se mencionó las diferentes oxidasas tipo  $aa_3$  bacterianas tienen afinidad por diferentes citocromos  $c$ , presentando diferente actividad dependiendo de la fuente del sustrato (ver Tabla I). Por lo tanto, resulta interesante determinar la actividad de nuestra enzima con al menos los citocromos tipo  $c$  de los cuales disponíamos. Se comparó la

actividad de TMPD-oxidasa del cit  $aa_9$  y del  $caa_9$  de *B. cereus*, en presencia de citocromo  $c$  de corazón de bovino (SIGMA type 11) o del citocromo de *Sacharomices cereviceae* (SIGMA type 1). Como se puede observar en la tabla V la actividad del cit  $aa_9$  no se modifica en presencia de cit  $c$  de mamífero, mientras que con el cit  $c$  de levadura la actividad se incrementa en un 85%. Por otro lado, el complejo  $caa_9$  presenta la misma actividad con los dos citocromos probados. En el caso de  $aa_9$  la mejor actividad con sustrato de levadura quizá se deba a la cercana filogenética con la bacteria, comparando con el citocromo  $c$  de mamífero, sin embargo esto es mera especulación. En el caso del complejo  $caa_9$ , que tiene una actividad mayor con respecto al cit  $aa_9$  usando TMPD como sustrato, no se modifica por la adición de cit  $c$  exógeno, probablemente porque el complejo posee un citocromo  $c$  en el complejo que no es un buen aceptor para otros citocromos  $c$ , posiblemente porque tiene baja afinidad por estos.

Tabla V. Actividad de TMPD-oxidasa del citocromo  $aa_9$  y  $caa_9$  en presencia de citocromo  $c$  de corazón de bovino o de levadura.

Condición	% Actividad <sup>1</sup>	
	$aa_9$	$caa_9$
Control	100	100
Cit c Bovino	104	95
Cit c Levadura	185	101

(1) Actividad control para  $aa_9$  1,152 y para  $caa_9$  1,530 nmo U/min/mg proteína.

A los datos reportados se les restó la autooxidación del cit  $c$ . El experimento se realizó en una cubeta que contenía 2.5 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH=8), 10 mM de ascorbato 0.1 mM de TMPD, 50  $\mu$ g de citocromo  $c$ , se registró la autooxidación y se agregó de 25-50  $\mu$ g de enzima.



## CONCLUSIONES

Se logró purificar la citocromo oxidasa  $aa_3$  de *Bacillus cereus*. Pensamos que la proteína se encuentra bastante pura. Sin embargo, la actividad en las últimas fracciones no es tan alta como se esperaba, no obstante la cantidad de hemo presente aumenta casi 100 veces en los últimos tres pasos (ver tabla III). Esto tanto para  $aa_3$  como para el complejo  $caa_3$ . Pensamos que existe una población de enzima que no es capaz de catalizar la transferencia de electrones desde el sustrato hasta el oxígeno, sin embargo parte de esa población posee los grupos hemo que dan señal al ser reducidos con un reductor fuerte como la ditionita. Se ha reportado que, la cantidad de hemo presente para diferentes oxidasas  $aa_3$  bacterianas está entre 10-16 nmol/mg proteína. Nosotros obtuvimos un valor de 8.9 nmol/mg proteína que es un dato satisfactorio. (27).

Con respecto al peso molecular, se obtuvo por electroforesis un valor de 71,000 Da para  $aa_3$  y 90,000 Da para  $caa_3$ . Estos pesos están dentro del promedio reportado para estas oxidasas (27). Sin embargo, el peso molecular de nuestras enzimas usando los datos de la filtración molecular, obtenemos un valor de 165,000 y 195,000 Da que no coincide con los datos anteriores de los geles. Pensamos que posiblemente están formándose dímeros, no obstante los datos de filtración molecular no son el doble de los de electroforesis, puesto que se cree que las proteínas tienen moléculas de Triton fuertemente unidas. Sin embargo, el patrón de elución de  $aa_3$  no

cambia si la cromatografía se corre utilizando la enzima diluida 10 veces. No obstante, no se descarta la posibilidad de agregación.

La mayoría de las oxidasas  $\alpha_2$  bacterianas poseen 2 ó 3 subunidades. En el caso de *Bacillus cereus*, parece ser que la enzima tiene 3 subunidades. Sin embargo, no estamos seguros de que no haya degradación proteolítica puesto que solamente en el paso de aislamiento de membranas se utiliza inhibidor de proteasas. Por otro lado la suma de los pesos moleculares de las subunidades es mayor que el peso de la enzima completa. Al respecto se ha reportado corrimientos anómalos de las subunidades de otras oxidasas (3,27).

Como se demostró, la enzima requiere de la presencia de Tritón para presentar actividad. No requiere de fosfolípidos, al menos de los probados, para su actividad. Se probaron también concentraciones de asolectina de 70 y 140  $\mu\text{g/ml}$  y no tuvieron efecto en la actividad (datos no mostrados).

Con respecto a la actividad con citocromo  $c$  exógeno, la enzima mostró estimulación con cit  $c$  de levadura, mientras que con el de mamífero no tuvo cambios. Se puede especular que la activación por el cit  $c$  de levadura se debe a su cercana filogenética.

Se piensa seguir investigando sobre las propiedades y función de la enzima. Por un lado, se cree conveniente tratar de explicar la unión con citocromo  $c$  del complejo. Si este se puede disociar y separar para comparar la actividad del cit  $\alpha_2$  resultante con la

actividad y propiedades de la enzima  $aa_9$  purificada por separado. Por otro lado, investigar a que subunidad está unido el hemo  $c$ , o si está en una subunidad por separado. También, resultaría interesante investigar si en una mutante aislada en el laboratorio con fenotipo  $aa_9^-$ , posee la apoenzima. Esto podría demostrarse con el uso de anticuerpos anti  $aa_9$ .

En este trabajo se describe la purificación de la oxidasa  $aa_9$  de una bacteria del género *Bacillus*. Solo se conoce la enzima de otra bacteria del género (*B. subtilis*), y tiene características parecidas, esta última también posee 3 subunidades con pesos moleculares semejantes, aunque se aísla como  $aa_9$  sin cit  $c$  unido (40).

## BIBLIOGRAFIA

1. Andreoli, A.J., Suehiro, S., Sakiyama, D., Takemoto, J., Vivanco, E., Lara, J.C. y Klüte, M.C. (1973) *J. Bacteriol.* 115, 1159.
2. Artzatbanov, V. Müller, M. y Azzi, A. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 257, 476.
3. Baines, B.S. y Poole, R.K. (1985) En "Microbial Gas Metabolism: Mechanistic, Metabolic and Biotechnological Aspects" (Poole, R.K. y Baines, B.S. eds) Soc. Gen. Microbiol. pp. 63.
4. Baron, C. y Thompson, T.E. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 382, 276.
5. Escamilla, J.E. y Benito, M.C. (1984) *J. Bacteriol.* 160, 473.
6. Escamilla, J.E., Ramírez, R., del Arenal, F. y Aranda A. (1986) *J. Bacteriol.* 167, 544.
7. Escamilla, J.E., Ramírez, R., del Arenal, F., Zarzoza, G. y Linares, V. (1987) *J. Gen. Microb.* 133, \_\_\_\_.
8. Escamilla, J.E. y cols. (1987) Datos no publicados.
9. Felix, J.A., Lundgren, D.G. (1973) *J. Bacteriol.* 115, 552.
10. Fukumori, Y. y Yamanaka, T. (1984) *FEBS Lett.* 170, 301.
11. Gennis, R.B., Casey, R.F., Azzi, A. y Ludwig, B. (1982) *Eur. J. Biochem.* 125, 189.
12. Haltia, T., Puustinen, A. y Finel, M. (1988). *Eur. J. Biochem.* 172, 543-546.
13. Hanson, R.S., Srinivasan, V.R. y Halvorson, H.O. (1963) *J.*

- Bacteriol.* 85, 451.
14. Helenius, A., McLashin, D.R., Fries, E. y Tanford, C. (1979) *Meth. Enzymol.* 56, 134.
  15. Hüdig, H. y Drews, G. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 765, 171.
  16. Jones, C.W. (1977) En "Microbial energetics" (Haddock, B.A. y Hamilton, W.A., eds.) pp. 23. Cambridge University Press, Cambridge.
  17. Kita, K., Konishi, K. y Anraku, Y. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3375.
  18. Kita, K., Konishi, K. y Anraku, Y. (1986) *Meth. Enzymol.* 126, 94.
  19. Kula, T.J., Aleem, M.I.H. y Wilson, D.F. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 680, 142.
  20. Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680.
  21. Lang, D.R., Felix, J.A., Lundgren, D.G. (1972) *J. Bacteriol.* 110, 968.
  22. Linares, V. (1987) Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias UNAM.
  23. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.S. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
  24. Ludwig, B. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 594, 177.
  25. Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Tolbert, N.E. y Bieber, L.L. (1981) *Meth. Enzymol.* 72, 296.
  26. Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O. Ameyama, M. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 894, 304.
  27. Poole, R.K. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 726, 205.
  28. Prochaska, L.J., Bisson, R., Capaldi, E., Steffens, G.C.M. y Euse, G. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 637, 380.

29. Püttner, I., Solioz, M., Carafoli, E. y Ludwig, B. (1983) *Eur. J. Biochem.* 134, 33.
30. Solioz, M., Carafoli, E. y Ludwig, B. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 1579.
31. Sone, M., Sekimachi, M., Fukumori, Y. y Yamanaka, T. (1987) *J. Biochem (Tokio)*, 102, 481.
32. Sone, N. y Yanagita, Y. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 682, 216.
33. Sone, N. y Yanagita, Y. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 1405.
34. Sone, N., Yanagita, Y., Han-Nami, K. y Yamanaka, T. (1983) *FEBS Lett.* 155, 150.
35. Steffens, G.C.M., Buse, G., Oppliger, W. y Ludwig, B. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 335.
36. White, D.C. y Sinclair, F.C. (1971) *Adv. Microbial. Physiol.* 5, 173.
37. de Vrij, W., Azzi, A. y Konings, W.N. (1983) *Eur. J. Biochem.*, 131, 97.
38. de Vrij, W., Driessen, A.J.M., Hellingwerf, K.S. y Konings, W.N. (1986) *Eur. J. Biochem.* 156, 431.
39. de Vrij, W. y Konings, W.N. (1987) *Eur. J. Biochem.* 166, 581.
40. de Vrij, W., van den Burg, D. y Konings, W.N. (1987) *Eur. J. Biochem.* 166, 587.