

03081

Universidad Nacional Autónoma de México



Instituto de Fisiología Celular

Doctorado en Investigación Biomédica Básica

Sistema Respiratorio aeróbico de
Eikenella corrodens

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN INVESTIGACIÓN

BIOMÉDICA BÁSICA

P r e s e n t a :

M.C. Ruben Darío Jaramillo Lancho

Director de la tesis: Dr. José Edgardo Escamilla Marván

México, D. F.

2005

0350492



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

... Dirección General de Bibliotecas de la
... difundir en formato electrónico o impreso el
contenido de mi trabajo profesional.

NOMBRE: Ruben Jaramillo Lancho

FECHA: 24. Noviembre 2005

FIRMA: Ruben Jaramillo

SISTEMA RESPIRATORIO AEROBICO DE *Eikenella corrodens*

RUBEN DARIO JARAMILLO LANCHERO

Trabajo de tesis presentado para obtener el grado de
Doctor en Investigación Biomédica Básica (Bioquímica)

Director: JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVAN
Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS y HUMANIDADES

MEXICO, D.F., 2005

DEDICATORIA

A mi esposa Margarita Rosa
por su amor, ternura, valentía e inteligencia

A nuestras hijas Natali y Karen
por sus fiestas inagotable para descubrir la vida

A mi maestro y amigo Edgardo
por sus consejos, la confianza y amistad

A los que caminan por las profundas alamedas del conocimiento
para construir una sociedad nueva

EL AUTOR EXPRESA SUS AGRADECIMIENTOS A:

JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVAN, Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica), Investigador Titular C del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Director del trabajo, por sus asesorías, enseñanzas, consejos y confianza.

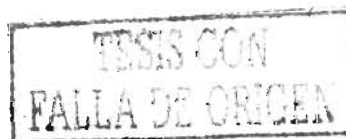
COLCIENCIAS, la Universidad Libre Seccional Barranquilla y al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por apoyar el desarrollo de los proyectos relacionados al transporte de electrones de *Eikenella corrodens*.

EL grupo de Investigación de Biomembranas (GIBIOM) de la Universidad Libre, al laboratorio del Dr. Edgardo Escamilla y todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización del presente trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	
<i>I) Composición y organización general de los sistemas respiratorios bacterianos</i>	1
<i>II) Quinonas bacterianas</i>	2
<i>III) Complejos respiratorios</i>	7
- <i>NADH: quinona oxidoreductasa</i>	7
- <i>Succinato: quinona oxidoreductasa</i>	8
- <i>Quinol: citocromo-c- oxidoreductasa</i>	9
- <i>Oxidasas terminales</i>	10
<i>IV) Inhibidores de la cadena respiratoria</i>	13
<i>V) Eikenella corrodens</i>	18
1. HIPÓTESIS	21
2. OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GENERAL	22
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	22
3. METODOS Y MATERIALES	23
3.1 <i>Eikenella corrodens</i>	23
3.2 MEDIO DE CULTIVO, CONTROL DE CRECIMIENTO Y RECOLECCIÓN	23
3.3 FRACCIONAMIENTO CELULAR Y OBTENCIÓN DE MEMBRANAS	23
3.4 ENSAYOS ENZIMÁTICOS	24
3.4.1 Oxidasas	24

3.4.2 Oxidorreductasas	25
3.4.3 Ensayo de la nitrato reductasa	26
3.5 ANÁLISIS ESPECTRAL DE LOS CITOCROMOS	26
3.6 EXTRACCION Y ANÁLISIS DE LOS CITOCROMOS DE TIPO <i>c</i> Y HEMOS	27
4. RESULTADOS	29
- Actividades de las oxidasas en membranas de <i>Eikenella corrodens</i> y efecto de los inhibidores respiratorios	29
- Los citocromos de la membrana citoplásmica de <i>E. corrodens</i>	33
- Espectro diferencial de monóxido de carbono y fotodisociación	36
- Análisis de los citocromos de tipo <i>c</i> y hemos	38
- Efecto de los análogos de quinona sobre la respiración de <i>Eikenella corrodens</i>	40
5. DISCUSION	46
- Esquema 1. Propuesta para el sistema respiratorio aeróbico de <i>Eikenella corrodens</i> ATCC 23834.	52
BIBLIOGRAFIA	53
ANEXOS	71



FIGURAS

	pág.
Figura 1. Esquema general en la composición y organización de las cadenas respiratorias bacterianas.	3
Figura 2. Estructura de las quinonas fisiológicas y sus análogos con sus respectivos potenciales de óxido reducción, redox (E0) en mV.	5
Figura 3. Efecto de los inhibidores del sitio II (A) y cianuro (B) sobre el transporte de electrones en membranas de <i>Eikenella corrodens</i> ATCC 23834.	31
Figura 4. Espectros diferenciales (reducidos menos oxidado) de membranas de <i>Eikenella corrodens</i> ATCC 23834 cultivadas por 20 horas en condiciones limitadas de oxígeno.	34
Figura 5. Efecto del mixotiazol y antimicina A sobre la reducción de los citocromos por succinato en membranas de <i>Eikenella corrodens</i> ATCC 23834.	37
Figura 6. Citocromos reactivos a CO en membranas de <i>Eikenella corrodens</i> ATCC 23834.	39
Figura 7. Hemos asociados a las proteínas unidas a membranas de <i>Eikenella corrodens</i> ATCC 23834.	41
Figura 8. Efecto de las quinonas juglona (○), plumbagina (●), menadiona (▲), menadiona bisufito (◆), lawsona (△), 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sodio (◇) y duroquinona (■) sobre la actividad de la NADH oxidasa en membranas nativas de células de <i>Eikenella corrodens</i> cultivadas en condiciones estáticas.	44

T A B L A S

	pág.
Tabla 1. Actividades respiratorias asociadas a partículas membranales de <i>Eikenella corrodens</i> cultivadas estáticamente.	30
Tabla 2. Efecto de los inhibidores del transporte de electrones sobre la respiración ^a con NADH y succinato en membranas de <i>Eikenella corrodens</i> ATCC 23834.	33
Tabla 3. Concentración y porcentaje de reducción de los citocromos asociados con la membrana de células de <i>Eikenella corrodens</i> ATCC 23834 cultivada con O ₂ estático en presencia de diferentes sustratos.	35
Tabla 4. Efecto de los análogos de quinona sobre la actividad de NADH y succinato: Quinona-DCPIP oxidorreductasas en membranas de <i>Eikenella corrodens</i> .	42

ANEXOS

Anexo A: Artículo publicado en el Can J. Microbiol. sobre "The aerobic electron transport system of *Eikenella corrodens*."

Anexo B: Resumen y Abstract del artículo-revisión aceptado para su publicación en Colombia Médica (Revista Online) 2005, titulado "*Eikenella corrodens*: Patogénesis y aspectos clínicos."

ABSTRACT

The electron transport system of the fastidious β -proteobacterium *Eikenella corrodens* grown in limited oxygen was studied; moreover the effect of inhibitors and quinone analogues on the respiration was analyzed. Membranes exhibited the highest oxidase activity with ascorbate plus tetrachlorohydroquinol (TCHQ), ascorbate plus *N, N, N', N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) or succinate and the lowest activity with NADH and formate. The presence of a *bc*₁-type complex was suggested by the inhibition exerted by 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide (HOQNO), myxothiazol, and antimycin A on respiration with succinate and by the effect of the latter two inhibitors on the succinate-reduced difference spectra. Respiration with succinate or ascorbate-TMPD was abolished by low KCN concentrations, suggesting the presence of a KCN-sensitive terminal oxidase. Cytochromes *b* and *c* were spectroscopically detected after reduction with physiological or artificial electron donors, whereas type *a* and *d* cytochromes were not detected. The CO difference spectrum of membranes reduced by dithionite and its photodissociation spectrum (77 K) suggested the presence of a single CO compound that had the spectral features of a cytochrome *o*-like pigment. High-pressure liquid chromatography analysis of membrane haems confirmed the presence of haem B; in contrast, haems A and O were not detected. Peroxidase staining of membrane type *c* cytochromes using SDS-PAGE revealed the presence of five bands with apparent molecular masses of 44, 33, 30, 26, and 14 kDa. Based on our results, a tentative scheme of the respiratory chain in *E. corrodens*, comprising (i) dehydrogenases for succinate, NADH, and formate, (ii) a ubiquinone, (iii) a cytochrome *bc*₁, (iv) a type-*cbb'* cytochrome *c* oxidase and (v) a dissimilatory nitrate reductase, is proposed. This respiratory system is resistant to inhibitors of NADH and succinate dehydrogenases, but is very sensitive to inhibitors of complex III and to KCN. Finally, TCHQ donates electrons very efficiently to the *bc*₁ complex.

Key words: *Eikenella corrodens*, respiratory chain, *bc*₁ complex, oxidase *cbb'*, inhibitor, quinone analogue.

RESUMEN

El sistema de transporte de electrones de la fastidiosa β -proteobacteria *Eikenella corrodens* cultivada en oxígeno limitado fue estudiado; asimismo, se analizó el efecto de los inhibidores respiratorios y análogos de quinona. Las membranas mostraron la actividad de oxidasa más alta con ascorbato más tetraclorohidroquinol (TCHQ), ascorbato más *N, N, N', N'*-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) o succinato y la actividad más baja con NADH y formiato. La presencia de un complejo tipo-*bc*₁ fue sugerida por la inhibición ejercida por el 2-heptil-4-hidroxi-quinolina-N-óxido (HQNO), mixotiazol y antimicina A sobre la respiración con succinato y por el efecto de los dos últimos inhibidores sobre el espectro diferencial reducido por succinato. La respiración con succinato o ascorbato-TMPD fue abolida por bajas concentraciones de KCN, sugiriendo la presencia de una oxidasa terminal sensible a KCN. Los citocromos tipo *b* y *c* fueron detectados espectrofotométricamente después de la reducción con donadores fisiológicos o artificiales, mientras los citocromos de tipo *a* y *d* no fueron detectados. El espectro diferencial de CO de las membranas reducidas por ditionita y su espectro de fotodisociación (77 K), sugiere la presencia de un compuesto simple de CO que tiene el rasgo espectral de un pigmento semejante a un citocromo *o*. El análisis de cromatografía líquida de alta presión de los hemos de membrana confirma la presencia de un hemo B; en oposición, los hemos A y O no fueron detectados. La tinción de peroxidasa de los citocromos-tipo *c* de membrana usando SDS-PAGE, reveló la presencia de cinco bandas con una masa de peso molecular aparente de 44, 33, 30, 26, y 14 kDa. Basado sobre estos resultados, un esquema tentativo de la cadena respiratoria en *E. corrodens* es propuesto, el cual comprende (i) deshidrogenasas para succinato, NADH y formiato, (ii) una ubiquinona, (iii) un citocromo *bc*₁, (iv) una citocromo oxidasa tipo-*cbb'* y (v) una nitrato reductasa disimilatoria. Este sistema respiratorio es resistente a los inhibidores de la NADH y succinato deshidrogenasa, pero es muy sensible a los inhibidores del complejo III y KCN. Finalmente, el TCHQ dona los electrones eficientemente al complejo *bc*₁.

Palabras claves: *Eikenella corrodens*, cadena respiratoria, complejo *bc*₁, oxidasa *cbb'*, inhibidor, análogo de quinona.

INTRODUCCION

Los organismos procarióticos existentes se caracterizan por su gran diversidad y plasticidad en su biología, fisiología, bioquímica; así ocurre con las cadenas respiratorias, todo como consecuencia del proceso de evolución que se inició hace aproximadamente 4 Gigas (4×10^9) años (1 – 4). Al inicio, las bacterias se desarrollaron en un ambiente anóxico donde predominaron el N_2 , CO_2 y CO (5), y la biosíntesis del ATP fue producto de los procesos de fermentación. El gran generador de O_2 en la biosfera es la fotosíntesis oxigénica, la cual presumiblemente se originó hace 2.7 Gigas de años en las cianobacterias. El oxígeno inicialmente liberado se gastó en la oxidación-precipitación del Fe^{+2} , abundante en los mares de esa época; además, el Fe^{+3} formado, poco soluble en agua se precipitó en densas capas y de ese evento hay registros geológicos en todos los mares del mundo. Hace 500 millones de años, aparece en la atmósfera el O_2 libre, que incrementa su porcentaje hasta alcanzar, hace alrededor de 400 millones de años, los niveles actuales (4). Por lo tanto, la aparición del O_2 hace posible la evolución del metabolismo aeróbico en los procariotes, los cuales adoptaron al O_2 como el aceptor final de electrones en la respiración. Este fenómeno se expresa en la multiplicidad estructural y funcional de las oxidasas bacterianas; en otras palabras, existen sistemas respiratorios en donde su organización y composición varía en respuesta a la tensión de O_2 .

1) Composición y organización general de los sistemas respiratorios bacterianos

Los sistemas respiratorios están constituidos por un conjunto diverso de flavoproteínas, proteínas de Fe-S, quinonas liposolubles y citocromos, organizados en la membrana. Estos grupos transfieren electrones y protones, y generan un gradiente protón motriz transmembranal que puede conducir a la formación de ATP vía F_1F_0 . Pueden existir distintas ramificaciones con múltiples deshidrogenasas

capaces de donar electrones directamente (sin mediación del NAD^+) a una o más cadenas respiratorias (6); del mismo modo, la salida de los electrones hacia el oxígeno puede estar mediada por diferentes citocromo oxidasas (7 - 11) que se diferencian por su afinidad al O_2 y su sensibilidad al cianuro (CN^-). De acuerdo a la naturaleza química del donador de electrones, las oxidasas bacterianas se agrupan en citocromo-*c* oxidasas y quinol oxidasas. En ausencia de O_2 , algunas bacterias pueden utilizar otros aceptores terminales de electrones como nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), trimetilamina N-óxido (TMAO), dimetil-sulfoxido (DMSO), fumarato y sulfatos (12). Para la utilización de otros aceptores, las bacterias facultativas inducen la síntesis de reductasas específicas

En general, los diversos sistemas respiratorios bacterianos pueden ser divididos en tres sectores funcionales (Figura 1): 1) La entrada de los sustratos endógenos, constituido por múltiples deshidrogenasas membranales para NADH, succinato, formato, etanol, glucosa, malato, lactato, H_2 (Hidrogenasa) y otros sustratos (12 - 16). 2) Un sector intermedio que puede ser una vía común, o dos vías paralelas, aquí se encuentran quinonas, centros de Fe-S, citocromos de tipo *b* y *c*, y en ocasiones metaloproteínas. 3) Finalmente, un sector de salida constituido por las oxidasas del tipo citocromo-*c* oxidasas y/o quinol oxidasas diferentes cuando el aceptor final es el O_2 (7 - 11). En la anaerobiosis, las bacterias facultativas y anaeróbicas pueden utilizar aceptores inorgánicos u orgánicos como el nitrato, nitrito, sulfato, DMSO, fumarato u otros aceptores, en donde una reductasa específica forma un complejo estructuro-funcional con citocromos de tipo *b* o *c* o *d* que la enlaza con los sectores previos de la cadena (12) y transforma al aceptor final.

II) Quinonas bacterianas

Las quinonas liposolubles se distribuyen en todos los sistemas biológicos y forman parte de los sistemas transportadores de electrones. Los procariotes contienen diferentes tipos de quinonas (17), entre las más frecuentes se hayan las

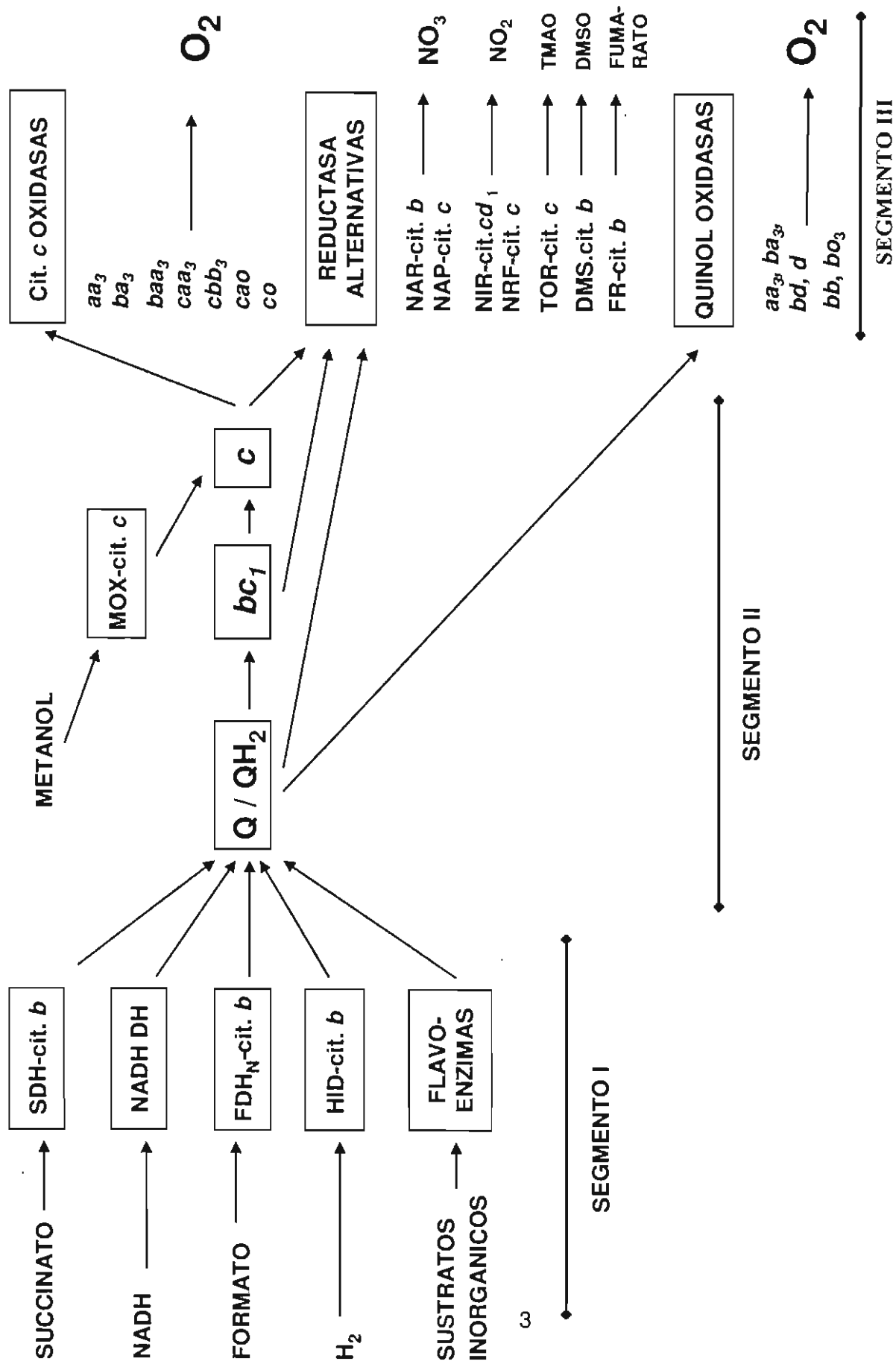
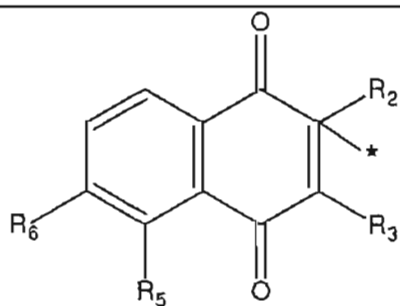


Figura 1. Esquema general en la composición y organización de las cadenas respiratorias bacterianas (Adaptado de la referencia 12).

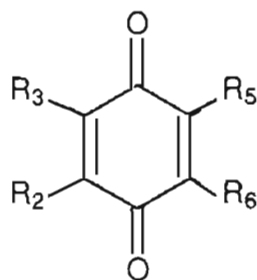
ubiquinonas, derivadas del 2,3 dimetoxi-5-metilbenzoquinona, en las que el derivado isoprenoide ocupa la posición 6. Además, existen las menaquinonas con la cadena isoprenoide en la posición 3. Dependiendo de la estructura (Figura 2) las quinonas respiratorias pueden ser divididas en dos grupos (17, 18): el primer grupo, incluye las benzoquinonas que comprende las plastoquinonas y las ubiquinonas (18); mientras, en el segundo grupo se encuentran las naftoquinonas, que son la filoquinona, menaquinona, desmetilmenaquinona (17) y las quinonas modificadas presentes en el dominio Archea (13).

Debido a las amplias variaciones estructurales que presentan las quinonas dentro de diferentes grupos taxonómicos y a la relativa facilidad con que pueden ser aisladas y caracterizadas, se han utilizado como herramientas taxonómicas (17). La mayoría de las bacterias Gram-positivas y anaeróbicas Gram-negativas contienen sólo menaquinona (MK), mientras que la mayoría de las bacterias Gram-negativas estrictamente aeróbicas sintetizan sólo ubiquinona (UQ). Las bacterias Gram-negativas anaeróbicas facultativas se pueden sintetizar ambos tipos de quinonas UQ y MK. Finalmente, es importante destacar que en algunas especies del dominio Archea (13) se sintetizan quinonas modificadas, como la caldariella quinona (CK), termoplasma quinona (TK), sulfolobus quinona (SK) y una quinona tricíclica (Tricicloquinona, TCK). En conclusión, se puede decir que la síntesis de una u otra quinona y/o combinaciones de ellas, está altamente influenciada por la tensión de oxígeno en el cultivo. La función de las quinonas bacterianas es análoga a la de UQ en la mitocondria, donde actúa como transportador móvil de electrones y protones (H^+) en el plano de la membrana citoplásmica, conectando el sector de las deshidrogenasas con el de los citocromos.

Los procariotes facultativos sintetizan mezclas de UQ, MK y DMK. Cuando *Escherichia coli* crece aeróbicamente sintetiza mucha mayor cantidad de UQ-8 que de MK-8 y DMK-8 (19, 20), pero a muy baja tensión de O_2 se reduce en forma dramática el nivel de UQ y se incrementa la síntesis de MK (17). Las bacterias Gram-



NAFTOQUINONA



UBIQUINONA

DERIVADO	SUSTITUYENTE				E' ₀ (Mv)
	R ₂	R ₃	R ₅	R ₆	
Naftoquinonas					
Menaquinona -7 (MK-7)	CH ₃	(Isop) ^a H	H	H	-74
MK -4	CH ₃	(Isop) ^a H	H	H	-70
1,2-NaftoQ-4-sulfonato-Na	=O	R ₄ = SO ₃ -Na	H	H	+217
Filoquinona	CH ₃	(Isop ^a)-(CH ₂)-(Isop ^a sat) ₃ H	H	H	
Metionaquinona	SCH ₃	[(Isop ^a)-(CH ₂)] ₅ -CH ₂ (Isop ^a sat) ₂ H	H	H	
Clorobiumquinona	CH ₃	COCHCCH ₂ -(Isop ^a) ₆ H	H		
Menadiona (MK ₀)	CH ₃	H	H	H	≈0
MK ₀ -bisulfito	CH ₃	H	H	H	+ 63
	*SO ₃				
Lawsona	OH	H	H	H	-152
Plumbagina	CH ₃	H	OH	H	-39
Juglona	H	H	OH	H	+30
Ubiquinonas (UQ)					
UQ ₈	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	Isop ^a	
Plastoquinona	CH ₃	CH ₃	H	Isop ^a	
UQ ₀	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	+162
UQ ₁₀	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	Isop ^a	+112
DuroQ	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	+50

^a Isop = Isoprenoide = (CH₂-CH=CCH₃CH₂)-
sat = saturado

Figura 2. Estructura de las quinonas fisiológicas y sus análogos con sus respectivos potenciales de óxido reducción, redox (E⁰) en mV.

positivas (17) casi siempre sintetizan MK-n y su radical poli-isoprenoide tiene un $n = 7$ a $n = 18$; además, el genero *Bacillus* (21) fundamentalmente sintetiza la MK-7, pero el *B. thurengiensis* produce MK-8 en adición a MK-7 (21). Asimismo, en *B. subtilis* la MK es un componente obligatorio de la respiración dependiente de NADH (22, 23) y succinato (24); sin embargo, al parecer la MK es mas selectiva y acepta los electrones principalmente de las deshidrogenasas de NADH, glicerol fosfato, H_2 y formato (25), mientras que la menaquinona en la respiración anaeróbica involucra al fumarato, DMSO o TMAO como aceptor final de electrones (18); igualmente, es primordial para la reducción de formato dependiente de nitrito (26).

La participación de las quinonas UQ, MK y DMK en el transporte de electrones en bacterias, ha sido demostrada utilizando las siguientes estrategias experimentales: a) Extracción de la quinona de membranas con n-pentano; b) destrucción de la quinona con luz ultravioleta cercana (360 nm) y c) eliminación de la quinona por mutación genética, de manera que no se afecten las actividades de las deshidrogenasas, oxidasas y/o reductasas vecinas. La utilización de cualquiera de estas estrategias permite comprobar la función por medio de experimentos de reconstitución principalmente con análogos ó con quinonas endógenas (23, 27 - 35).

El efecto de análogos de quinonas se ha evaluado en experimentos de reconstitución en mitocondrias (36, 37). La menadiona, la plumbagina, la juglona y la lawsona (Figura 2) son análogos estructurales de la menaquinona con potenciales redox de 0, -39, +30 y -152 mV, respectivamente; además, todas tienen un hidrógeno en lugar de la cadena isoprenoide (R_3) de la MK-7 ($E'_0 = -74$ mV). Por otro lado, juglona y lawsona tienen como R_2 un H y OH, respectivamente; mientras que la plumbagina y juglona tienen como R_5 un OH. Por otro lado, se utilizan análogos hidrofílicos de la ubiquinona (36, 37) para estudiar sus efectos en la respiración y/o en los complejos en forma individual, con sustituyentes pequeños en R_6 (Figura 3), de tal manera que el coeficiente de partición (38) en ciclohexano/agua de la UQ-0, duroquinona (DQ), 2'-propenilquinona, propilquinona y UQ-1 fue de 0.4, 0.7, 1.3, 2.3 y 2.6, respectivamente; igualmente sus potenciales redox son mayores que 0 mV y su

efecto sobre los complejos I, II y III de la cadena respiratoria son diferentes, aún en un mismo complejo.

III) Complejos respiratorios

NADH: quinona oxidoreductasa

El complejo I, también llamado NADH: quinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa (NDH), es el complejo de mayor tamaño en los sistemas de transporte de electrones en procariones (39, 40) como en eucariotes (41 - 44), y uno de los principales donadores de electrones a la poza de quinonas de la cadena respiratoria. En los procariones, la composición oligomérica del complejo I comprende de 13 a 14 subunidades (39), mientras que en los eucarióticos puede incluir entre 32 a 43 subunidades (42 - 44). Siete subunidades están codificados por el DNA mitocondrial; del mismo modo, es importante mencionar que en muchas enfermedades mitocondriales humanas (45, 46) están involucrados defectos estructurales y funcionales del complejo I.

Las NADH quinona oxidoreductasas de los procariones pueden dividirse en por lo menos tres grupos (39, 47); el primer grupo denominado NDH-1, lo representa la NADH-quinona oxidoreductasa translocadora de H^+ y/o Na^+ (39, 48 - 56); el segundo grupo, NDH-2, lo constituye la NADH-Q oxidoreductasa que carece de un sitio de acoplamiento energético (40, 47, 57), y el tercer grupo NQR- Na^+ o NDH- Na^+ lo constituye la NADH-quinona reductasa translocadora de Na^+ a través de la membrana contribuyendo al potencial electroquímico (58 - 63). La NDH-1 es un complejo de 13-14 subunidades que tiene un FMN unido no covalentemente y al menos 5 centros de Fe-S detectados por EPR; la NADH-2 está constituida por un FAD unido no covalentemente, uno o dos FMN unidos covalentemente (47, 64) y un solo polipéptido; finalmente, la Na^+ -NDH tiene un FAD unido en forma no covalente y posiblemente un FMN y un centro de Fe-S (detectado por EPR), y está formado por 4 a 6 subunidades. Para la NDH-1 se ha descrito su composición polipeptídica y se ha

obtenido la secuencia completa del operón o grupos de genes de aproximadamente 20 bacterias, entre las cuales se encuentran *Rhodobacter capsulatus*, *Paracoccus denitrificans*, *E. coli*, *Thermus thermophilus*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* (39, 40, 48, 50, 56). La NDH-2 se ha descrito en bacterias como *B. subtilis*, *E. coli*, *B. stearothermophilus*, *T. thermophilus*, *Thermus aquaticus* y *Sulfolobus acidocaldarius* (40, 47, 57), así como en mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* (65), *Yarrowia lipolytica* (66) y *Neurospora crassa* (67). La NQR- Na^+ se ha descrito en *Vibrio alginolyticus* (62), *Vibrio harveyi* (61) y *V. cholerae* (58) y la secuencia del operón es conocida para algunos microorganismos que incluyen *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia pestis*, *Shewanella putrefaciens*, *P. aeruginosa* y *Porphyromonas gingivalis* (60).

Succinato: quinona oxidorreductasa

La superfamilia de las succinato: quinona oxidorreductasas (68-72) cataliza la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs y dona los electrones para la reducción de quinona a quinol, como también la reacción inversa, la oxidación de quinol para la reducción de fumarato. Dependiendo de la dirección de la reacción in vivo, las succinato: quinona oxidorreductasas pueden ser diferenciadas como Succinato: Quinona oxidorreductasas (SQR) presentes en la respiración aeróbica (70, 72), y Quinol: Fumarato Reductasas (QFR), sintetizadas para la respiración anaeróbica, en donde el fumarato es el aceptor final de electrones (69, 71, 73, 74).

La SQR (68 - 70) por lo general está constituida por las subunidades hidrofílicas A y B, y las subunidades transmembranales C y D; sin embargo, la mayoría de las SQR de las bacterias Gram-positivas y QFR de las ϵ -proteobacterias (69, 75, 76) contienen un solo polipéptido hidrofóbico (C), que posiblemente proviene de la fusión de los genes de C y D. El dominio periférico, en el cual se localiza el sitio de interacción del succinato, está formado por una flavoproteína (FP; 64-67 kDa),

con un FAD unido covalentemente y una proteína de hierro no hémico y azufre ácido-lábil (IP; 27-31 kDa) integrado por tres centro de Fe-S: Un centro de [2Fe-2S] denominado S1(en SQR) o FR1 (en QFR), un centro [4Fe-4S] designado S2 o FR2, y un centro [3Fe-4S] indicado S3 o FR3 (69 - 71)]. EL dominio transmembranal lo integran las subunidades FP y IP a la bicapa y es requerido para la reducción y oxidación de la quinona, con un polipéptido de peso molecular (23-30 kDa) o dos subunidades de menor peso molecular (13-18 y 11-16 kDa;); asimismo, tienen uno o dos protohemo IX con un hierro hexacoordinado o no presentan grupos hemo (75).

Por la composición del dominio hidrofóbico y el contenido de hemo (70, 75, 76) las SQRs pueden ser agrupadas en cinco clases (68, 77). **Tipo A**, está constituido por dos subunidades hidrofóbicas y dos grupos hemo, como en la SQR de *Natronomonas pharaonis* y *Thermoplasma acidophilum*; **tipo B** contiene un polipéptido hidrofóbico y dos hemos, como sucede en *Paenibacillus macerans*, *B. subtilis* y *Rhodothermus marinus*, y en la QFR de *Campylobacter jejuni*, *H. pylori*, *Wolinella succinogenes* y *Desulfovibrio gigas*; pero, las SQRs de **tipo C**, que conservan dos subunidades hidrofóbicas y un grupo hemo, por ejemplo en mitocondrias, *P. denitrificans*, además de la SQR en *E. coli*. Las **Tipo D**, con una composición de dos polipéptidos hidrofóbicos y un grupo hemo; la QFR de *E. coli* se ubica en este grupo; finalmente, las de **tipo E** con dos subunidades hidrofóbicas SdhE y SdhF (77) y no contienen grupo hemo, que se expresan en *Acidianus ambivalens*, *S. acidocaldarius*, *C. jejuni* y cianobacterium *Synechocystis*.

Quinol: citocromo-c- oxidorreductasa

El sistema **bc₁** es un complejo oligomérico transmembranal del sistema respiratorio mitocondrial (41, 42, 78, 79) y de un número muy importante de bacterias (12, 80, 81) que tienen como aceptor terminal de electrones al O₂, nitrato, tiosulfato y sulfito; asimismo, existe un complejo semejante, **b₆f**, que está asociado con la fotosíntesis en cianobacterias y en cloroplastos de plantas superiores (78, 80). El complejo **bc₁** clásico de bacterias es un complejo transmembranal que contiene

tres polipéptidos y cuatro centros redox (12, 41, 80, 82). El citocromo **b**, tiene dos grupos hemo **b**, uno de bajo potencial denominado **b_L** ($E_m = -90$ a -30 mV) y el otro de alto potencial **b_H** ($E_m = 40$ a 90 mV), unidos no covalentemente a histidinas conservadas en las hélices transmembranales II y IV. La proteína Fe-S (IPS) de Rieske contiene un centro de 2Fe-2S ($E_m = 280$ mV), que está unido mediante enlaces coordinados a dos cisteínas y dos histidinas conservadas en su secuencia, con una señal característica de EPR $g = 1.90$ (82). La tercera subunidad típica del complejo es el citocromo **c₁** ($E_m = 225$ a 250 mV), proteína ácida que contiene un hemo de tipo **c** de bajo espín unido covalentemente a dos residuos de cisteína, y los residuos de histidina y metionina se ligan en forma axial al grupo hemo. Finalmente, es importante mencionar que las especies del género *Bacillus* se manifiesta otra variación muy interesante en la subunidad del citocromo **b**, que lo hace diferente al citocromo **b** del complejo **bc₁**, de tal manera se puede plantear un tercera clase de complejo tipo **bc**, distinto a las clases **bc₁** y **b₆f** (83, 84).

El mecanismo del flujo de electrones y protones en el complejo III se da a través del Ciclo Q modificado (78, 80, 82, 85), el cual requiere de las tres subunidades catalíticas, un citocromo **b** di-hémico, un citocromo **c₁** y la proteína de Rieske. Sin embargo se requieren dos vías internas separadas para la transferencia de los electrones de los tres sitios catalíticos, que catalizan la oxidación y reducción de la poza de quinona endógena y la reducción de un citocromo de tipo **c**.

Oxidasas terminales

La síntesis de las oxidasas bacterianas depende de las condiciones de crecimiento y del estadio de desarrollo; sin embargo, la tensión de O₂ es el factor regulador más importante (11); por ejemplo, *E. coli* tiene dos oxidasas respiratorias, en donde la citocromo oxidasa **bd** tiene una afinidad muy alta por O₂, mayor que la **bo₃**; además, la oxidasa **bd** es expresada a altos niveles en los cultivos microaerófilos y anaeróbicos. La mayoría de las oxidasas respiratorias de procariones

pertenecen a la super-familia de las hemo-cobre oxidasas (8, 86 - 90), la cual es bastante diversa en términos de sus donadores de electrones, afinidad por el O₂, composición polipeptídica y tipos de hemos y metales, pero se caracterizan por la presencia de una subunidad homóloga a la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa mitocondrial, y contiene un hemo de bajo spin hexacoordinado y un centro bimetalico o binuclear, donde el oxígeno es reducido a agua (8). Dicho centro está compuesto de un hemo de alto spin con un hierro pentacoordinado, en donde la quinta posición está ocupada por una histidina y un ión cobre, Cu_B. Según su donador inmediato, las hemo-cobre oxidasas (87 - 90) se pueden agrupar en dos subgrupos: las citocromos *c* oxidasas que tienen como sustrato al citocromo *c* y pueden ser del tipo *aa*₃, *baa*₃, *ba*₃, *caa*₃, *cbb*₃, *cao*₃ y *co*₃ y las quinol oxidasas, que tienen como sustrato al quinol y pueden ser de tipo *bo*₃, *bb*₃, *ba*₃ y *aa*₃. La oxidasa *bd* (11) es una quinol oxidasa que no se ubica dentro de las hemo-cobre oxidasas, ya que su centro catalítico no contiene cobre activo y se constituye con dos hemos de alto espín, el hemo *b*₅₉₅ y el hemo *d*. El complejo *bd* (11, 91 - 99) se ha purificado y/o se han secuenciado sus genes en *E. coli*, *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Photobacterium phosphoreum*, *B. stearothermophilus*, *B. firmus* OF4, *B. subtilis*, *Shigella flexneri*, *Corynebacterium glutamicum*, *Mycobacterium smegmatis*, *C. jejuni*, *D. gigas*, *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803, y en algunas archaeobacteria (96); este complejo está formado por las subunidades I y II con pesos moleculares de 48-54 y 35-43 kDa, respectivamente. En *E. coli* (11) la biosíntesis de la quinol oxidasa *bd* está regulada en forma negativa por el O₂, y la mayor concentración se observa cuando crece microaerófilicamente y en condiciones anaeróbicas, con una K_m de 5 nM.

Las reductasas de oxígeno de la superfamilia de las hemo-cobre oxidasas se han identificado de diferentes formas (7, 8, 86, 87) de acuerdo a las propiedades bioquímicas, espectroscópicas, biofísicas y secuencia de aminoácidos de las subunidades. Pereira et al. (86) han propuesto una clasificación de las oxidasas que tiene en cuenta, tanto los datos anteriores así como los residuos específicos comprometidos en la unión de los grupos prostéticos y los que forman parte de los

diferentes canales de protones de la subunidad I. Esta propuesta permite clasificar las oxidasas en tres familias: A, B y C. La familia A tiene canales de protones denominados canales D y K y puede ser dividida en dos grupos de acuerdo a los residuos de la hélice VI en el extremo hidrofóbico del canal D de la subunidad I: primero, Clase A1, en donde sus miembros se componen de dos o tres subunidades y comprende a las oxidasas con un residuo de glutamato en el motivo -X²⁷⁴GHPEV²⁷⁹- (por ejemplo, las oxidasas **aa**₃ de *P. denitrificans* y *H. halobium*, **caa**₃ de *B. subtilis*, quinol oxidasa **bo**₃ de *E. coli*, la **bb**₃ (**ba**₃) en *Bovis taurus*, *M. tuberculosis*, *Aeropyrum pernix 1*, *S. Acidocaldarius SoxM* y *Pyrobaculum aerophilum*), y la Clase A2, que tienen una tirosina (Y) y una serina (S) en el motivo alterno -YSHPXV- (por ejemplo las oxidasas **caa**₃ de *R. marinus*, *T. thermophilus* y *Deinococcus radiodurans*, oxidase 1 de *A. aeolicus* y las oxidasas de cianobacteria).

La familia B se caracteriza porque los residuos de aminoácidos que hacen parte de los canales D y K en las oxidasas de la familia A no son conservados, y comprende las oxidasas de *A. Aeolicus* y *Aeropyrum pernix*, **ba**₃ de *T. thermophilus* y *N. pharaonis*, **ba(o)**₃ de *B. stearothermophilus*, SoxB de *S. acidocaldarius*, y **aa**₃ de *A. ambivalents*. La familia C está formada por las oxidasas **cbb**₃, las cuales parecen tener conservado solamente parte del canal K y ninguno de los residuos importantes del canal D está presente; no obstante, hay una tirosina en todas las oxidasas **cbb**₃, con la excepción de la de *H. pylori*, en la misma posición del motivo YS de las oxidasas de la clase A2, la cual puede ser parte de una vía de protones (86). La oxidasas **cbb**₃ se caracteriza por una alta afinidad por el oxígeno ($k_m \sim 7$ nM) y mantiene la facultad de bombear protones, por lo que se propone un papel en el metabolismo microaerófilico bacteriano (90); además, ha sido purificada en *P. denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides*, *R. capsulatus*, *Bradyrhizobium japonicum* y *Pseudomonas stutzeri* (90). Se han identificado genes homólogos de *R. capsulatus*, *Azorhizobium caulinodans* y un cierto número de bacterias patógenas de humanos, como la *C. jejuni*, *H. pylori*, *P. aeruginosa*, y *V. cholerae*, donde presumiblemente juegan un papel en la colonización de los tejidos anóxicos.

IV) Inhibidores de la cadena respiratoria

Para la investigación de la composición, organización y función de la cadena transportadora de electrones es útil usar moléculas que puedan afectar de manera específica el funcionamiento de uno o más complejos enzimáticos del sistema respiratorio.

En la actualidad los distintos compuestos que inhiben el complejo I (NADH-Deshidrogenasa) se pueden agrupar en más de 60 familias, aunque hay dificultades para clasificarlos en términos químicos (100 – 105). Degli Esposti (100) distribuye los inhibidores en compuestos naturales y sintéticos, y su potencia está relacionada a la de rotenona; asimismo, los clasifica en forma funcional en tres tipos: los del tipo **A** son antagonistas del sustrato ubiquinona (Piericidina A primer sitio, Rolliniastatina-2, Idebenona y otros); tipo **B**, tiene la propiedad de desplazar el Intermediario ubisemiquinona (Rotenona, piericidina A segundo sitio, amital, quinolonas y otros); tipo **C** son antagonistas en la formación o liberación del ubiquinol (Q-2 reducido, mixotiazol, capsaicina, 4-nonilfenol, dinitrofenol y otros). La relación estructura-actividad de los inhibidores y su interacción con el complejo I (101, 102) se han estudiado más profundamente en mitocondrias y en algunos procariones.

Las actividades de NDH-1 son inhibidas por rotenona, piericidina A, DCCD, capsaicina, Rolliniastatina-1, bullatacina y piridabeno, etc. (39, 40, 106); también, se han descrito efectos inhibitorios de tres taninos sobre el complejo I mitocondrial de corazón de bovino (105), de los cuales el compuesto sanguin H-11 es el inhibidor más potente, con un comportamiento no-competitivo con respecto a NADH, ubiquinona-1 y menadiona. Las moléculas de rotenona, amital, dicoumarol, piericidina y capsaicina a concentraciones de 0.025 μM a 500 μM inhiben la respiración con diferentes I_{50} y/o K_i en membranas y/o células de las bacterias *N. meningitidis* (107), *N. gonorrhoeae* (108), *E. coli* (109), *Enterobacter cloacae* (110), *P. denitrificans* (40) *T. thermophilus* (40), *Aerobacter aerogenes* (111), *Micrococcus luteus* (112), *Zymomonas mobilis* (113), *Rhizobium phaseoli* de vida libre (114) y en

mitocondrias de *Leishmania mexicana* (115), etc. El efecto de estos inhibidores sobre los diferentes organismos puede explicarse por la estructura del complejo NDH-1 y en especial por la diferencia en el sitio de interacción de los inhibidores.

La oxidación de NADH en *Halobacterium salinarum* (116) es inhibida por el ácido 7-iodo carboxílico, lo que indica la presencia de NDH-2 y se muestra claramente al no ser inhibida por rotenona y annonina; además; se ha descrito la flavona como un inhibidor de la actividad NDH-2 en *Arum maculatum* y *S. cerevisiae* (40); igualmente, se purificó y caracterizó la NDH-2 en membranas de *Methylococcus capsulatus* (117), la cual no es inhibida por rotenona ni flavona y el amital a altas concentraciones causa una inhibición parcial. Por otro lado, la NQR- Na^+ de *V. alginolyticus* (59, 118) es muy sensible a HQNO, pero la NADH deshidrogenasa medida con menadiona como aceptor de electrones no requiere Na^+ y es insensible a HQNO, pero es fuertemente inhibida por Ag^+ ; también, se ha demostrado que el antibiótico korormicina (59) inhibe la actividad NQR que requiere Na^+ .

La actividad de la SQR es inhibida por reactivos de tipo tiol, y otros compuestos como fumarato, malonato, oxalacetato, tenoiltrifluoroacetona (TTFA), carboxanilidas y HQNO (69 – 73, 119, 120). El TTFA y las carboxanilidas son potentes inhibidores lipofílicos de las actividades de la succinato oxidasa, succinato-citocromo *c* y SQR de diferentes tipos de eucariotes y procariotes; asimismo, las señales de EPR indican que el sitio de acción de la carboxina (5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxathiina-3-carboxanilida) y sus análogos y el TTFA se encuentra entre el centro S-3 [3Fe-4S] y la poza de quinona (70, 71, 121 - 124). EL efecto del HQNO sobre la actividad de la SQR ha sido estudiado con profundidad en *B. subtilis* (70, 119, 122, 125), y se postula que el HQNO interactúa con el sitio de unión de la menasemiquinona que se encuentra cerca al hemo de bajo potencial; sin embargo, en *E. coli* el sitio de unión del HQNO en la QFR esta próximo al lado citoplásmico (121, 126).

El TTFA, la 3'-metil-octoxicarbixina y la 3'-octoxicarboxina afectan fuertemente la SDH en mitocondrias de células cardíacas de res (71), pero prácticamente no

inhiben el complejo II en mitocondrias del parásito de la malaria *Plasmodium falciparum* (127, 128) ni la actividad de la SQR de *S. cerevisiae* (129); sin embargo, el TTFA inhibe la SDH de la larva infectiva L3 de *Strongyloides ratti* (130). Por otro lado, las atpeninas (120) son inhibidores específicos para la SQR de mitocondrias de mamífero y más potentes que la carboxina, TTFA y HQNO, con una I_{50} de 0.011 μM y 0.0036 μM para atpenina A4 y atpenina A5, respectivamente; sin embargo, en mitocondrias de *Ascaris summa* la I_{50} de las atpeninas anteriores es de 0.22 μM y 0.032 μM , respectivamente. La metil-carboxina y TTFA inhiben con diferente sensibilidad la respiración en *E. coli* (72), *P. denitrificans* (72), *A. vinelandii* R₃ (131), *R. phaseoli* (27). Por el contrario en *B. cereus* (27) y *B. subtilis* (125) no observo efecto del TTFA sobre la respiración con succinato. En la archaeobacteria termoacidófila *S. acidocaldarius* (132) la SDH fue inhibida fuertemente por tetraclorobenzoquinona. La SQR de ϵ -proteobacteria (Campylobacteraceae, Helicobacteraceae y el género *Dehalospirillum*), en especial en *H. pylori*, es inhibida en forma competitiva por el oxantel y también se ha sugerido como inhibidores el morantel y tiabendazole (69). Por otro lado, en *B. subtilis* y en otras bacterias que usan MK como la quinona respiratoria, la actividad de succinato oxidasa y succinato: menaquinona oxidorreductasa fueron inhibidas por el desacoplante CCCP o por agentes como valinomicina, que disipan el potencial de membrana (133).

En mitocondrias y en células procarióticas, los inhibidores que actúan sobre el complejo **bc₁**, se han clasificado en tres grupos, de acuerdo con su sitio de acción (78, 80, 134). El grupo I (Mixotiazol, estrobilurinas, oudemansinas) contienen la estructura *E*- β -methoxycrylate (MAO), que se parece a la ubiquinona; se unen al sitio Q_o y al mismo tiempo bloquean la reducción del Centro de Fe-S y del cit. **b_L** vía el sitio Q_o (134, 135). El mixotiazol inhibe la reducción de la proteína de Fe-S (ISP) por ubiquinol y cambia la resonancia g_x en el espectro de EPR de la ISP de $g = 1.79$ a 1.76 (136).

Los inhibidores del grupo II (UHDBT [5-*n*-undecil-6-hidroxi-4,7-dioxobenzo-

tiazole], PHDBT; UHNQ y HMQQ) tienen como estructura común la 6-hidroxi-quinona, con diferentes sustituyentes en las posiciones 2 y 3 (134); el sitio de unión se encuentra cercano al centro de Fe-S de la ISP de Rieske (134, 137 - 139), lo que impide la re-oxidación del centro de Fe-S e inhibe la reducción del cit. b_L , de tal manera que bloquea la transferencia de electrones del centro de Fe-S al cit. c_1 (140). Finalmente, el grupo III de los inhibidores bloquea la reducción de la quinona (oxidación del centro b_H) no muestra una analogía estructural con respecto a los inhibidores de los otros dos grupos, y está constituido por Antimicina A, HQNO y NQNO (134). El sitio de interacción de los inhibidores de este grupo se encuentra en el sitio Q_i , el cual se ubica en el centro de la membrana, diferente al sitio de unión de los inhibidores del grupo I y II. En este sentido cuando se agrega mixotiazol sólo bloquea la reducción del cit. b_L vía el sitio Q_o , y la antimicina detiene la oxidación del centro b_H . Cuando la antimicina se agrega simultáneamente con mixotiazol, se inhibe la reducción de citocromo b y c_1 ; este efecto se denomina doble inhibición (double-kill effect) porque interrumpe el flujo de electrones en forma combinada a través del sitio Q_o y Q_i (80, 134, 136).

En las proteobacterias se han realizado estudios bioquímicos, cinéticos, con diferentes estrategias biofísicas y de biología molecular sobre los sitios y mecanismos de acción de los inhibidores del complejo III; las investigaciones más extensas y profundas se han realizado en *R. sphaeroides* (135, 137, 141 - 143), *R. capsulatus* (143 - 147) y *Rhodovulum sulfidophilum* (148). También se han realizado estudios de inhibición con HQNO, antimicina A y mixotiazol con un efecto diferencial sobre la respiración en membranas de las β -proteobacteria *N. meningitidis* (107) y *N. gonorrhoeae* (108), *Mycobacterium phlei* (149, 150), *B. megaterium* (31), *B. subtilis* (119, 125, 151, 152), *B. cereus* (27), *Proteus rettgeri* (153), *P. denitrificans* (154), *V. succinogenes* (155), *Bacteroides ruminicola* (156), *Bacteroides fragilis* (157), *M. luteus* (112, 158), *Rhizobium japonicum* (159, 160), *Alcaligenes eutrophus* H16 (161), de *Alcaligenes latus* (162), *A. vinelandii* (163), *Z. mobilis* (113), *Sulfolobus* sp. cepa 7 (164), α -proteobacteria *Azospirillum brasilense* (165).

Para las citocromo *c* oxidasas y quinol oxidasas se han reportado como inhibidores importantes al cianuro, la azida de sodio (NaN₃), el HQNO, el ácido salicilhidroxámico (SHAM) y otros análogos de quinona. El CN⁻ y la azida interfieren el flujo de electrones al oxígeno por reaccionar con la citocromo oxidasa, en particular con el hemo *a*₃ en el estado férrico. Se ha estudiado el efecto de KCN, azida, CO y SHAM sobre la oxidación de NADH, succinato y otros sustratos endógenos como también en presencia de ascorbato y TMPD en las β-proteobacterias *N. meningitidis* (107) y *N. gonorrhoeae* (108), en el genero *Bacillus* (166 – 169), , *H. pylori* (170), *A. vinelandii* (171), *P. aeruginosa* (172), *P. stutzeri* (173), *Magnetospirillum magnetotacticum* (174), *R. sphaeroides* (175), *R. phaseoli* (114), *Acetobacter diazotrophicus* PAL5 (176), *Acetobacter aceti* (177), *Acetobacter methanolicus* (178), *R. japonicum* (160), *Z. mobilis* (113), *Staphylococcus aureus* (179), *A. aerogenes* (111), *A. latus* (162), archaea *Sulfolobus* sp. cepa 7 (164) y *Vibrio succinogenes* (180).

0

Se han reportado diferentes inhibidores para la quinol oxidasa tipo *bd* que se agrupan en dos clases: ligandos del hemo tales como el KCN que actúan en el sitio de unión del oxígeno y compuestos conocidos como antagonistas del quinol (10). La interacción del inhibidor con el sitio de unión tiende a ser débil y se ha señalado una resistencia relativamente alta del complejo *bd* al KCN con valores de K_i entre 10 μM y 100 μM (10), al igual que ocurre con la mayoría de inhibidores del sitio Q de la cit. *bd*, como piericidina A, HQNO, antimicina A, UHDBT (10, 181 - 183). Las quinolonas aurachin A, C y D y sus derivados alquil son inhibidores mucho más potentes (177, 184 - 186). En *B. stearothermophilus* (93) la oxidasa *bd* fue sensible a ZnCl₂, *p*-benzoquinona y 2,6-dimetil-*p*-benzoquinona y también fue inhibida por NaCN y NaN₃, pero en la anaeróbica 'estricta' *D. gigas* (98) la citocromo *bd* es relativamente insensible a cianuro. En membranas de *C. glutamicum* la NADH oxidasa fue inhibida por NaCN (94). En *E. coli* el UHDBT y el NQNO inhiben el flujo de electrones en el complejo *bo*₃ (187). Por otro parte, la quinol oxidasa del complejo *bo*₃, purificado de las bacterias *A. methanolicus* (188) y archaeobacteria *Thermoplasma acidophilum* (189) fue fuertemente inhibida por el HQNO. Por otro lado, se ha descrito al SHAM como inhibidor de las quinol oxidasas de eucariotes (190 – 193) y muy poco en

procariotes (107, 194); además, en *N. meningitidis* (107) la actividad de la succinato y ascorbato -TMPD oxidasa fueron inhibidas por el SHAM en menos de un 5% y 1%, respectivamente, y la NADH oxidasa en un 21%.

Los conocimientos obtenidos hasta el momento, identifican los mecanismos moleculares de interacción de los diferentes inhibidores sobre los complejos respiratorios en eucariotes y en algunos procariotes como *E. coli*, *B. subtilis*, *P. denitrificans*, *R. capsulatus* y *R. sphaeroides*. En otros procariotes se ha avanzado en la caracterización cinética de la acción de los inhibidores en la membrana citoplásmica y en algunos complejos purificados del sistema respiratorio, los cuales muestran valores muy distintos para cada especie de microorganismos. Se necesita profundizar más en la caracterización cinética, sitios, mecanismos de acción y relación estructura-actividad de los inhibidores en el sistema transportador de electrones en membranas y en los complejos respiratorios purificados y caracterizados, en especial en la cadena respiratoria de las especies de la familia *Neisseriaceae* de la subdivisión β -proteobacterias, porque los estudios son escasos (*N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*) y solamente se han desarrollado en membranas aisladas de no en los complejos respiratorios purificados.

V) *Eikenella corrodens*

Bacilo gram negativo, anaeróbico facultativo, pertenece al genero *Eikenella* de la familia *Neisseriaceae* de la subdivisión β -proteobacterias; en esta familia también están los géneros *Neisseria*, *Kingella*, *Microvirgula*, *Simonsiella*, *Vogesella* y el grupo *Chromobacterium*. *E. corrodens* es un habitante normal de la cavidad oral humana, con un carácter de patógeno oportunista que se ha asociado a infecciones orales y no orales usualmente como parte de un consorcio microbiano (195 - 198). Las cepas de *E. corrodens* tiene un porcentaje de 57% a 58% por mol de GC en su DNA (199, 200). Los diferentes componentes de la superficie bacteriana de *E. corrodens*, pueden considerarse como factores de virulencia, entre los cuales se encuentran los lipopolisácaridos, exopolisacáridos, proteínas de membrana externa y adhesinas

(198, 201- 204). Otros factores relacionados con sus mecanismos de patogénesis, características morfológicas de colonia, factores de agregación, actividades enzimáticas, interacciones con otras especies y la diversidad clonal (205 - 207) han sido caracterizado. También se ha avanzado en la característica del sistema genético (206, 208) y en el mapa molecular de su metabolismo (209 - 212).

La caracterización bioquímica indica que *E. corrodens* es una bacteria con actividad positiva para oxidasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, prolina iminopeptidasa, carboxipeptidasa para glutamato, azocaseinasa, fosfatasa alcalina y ácida, fosfoamidasa, esterasa y esterasa de lípidos (198, 199, 210 – 212); también, tiene actividad variable de catalasa, trazas de sulfuro de hidrógeno (H₂S); pero, carece de ureasa, indol, gelatinasa y esculina (199). Se caracteriza por ser una bacteria asacarolítica que no produce ácido ni gas a partir de glucosa, xilosa, manitol, lactosa, sacarosa ó maltosa, pero sí reduce el nitrato a nitrito (199, 211). La producción de energía de *E. corrodens* (210) parece estar ligada, en forma parcial o total a la desaminación oxidativa de prolina, glutamato, serina y glutamina en donde el nitrato actúa como último aceptor de electrones.

En términos generales es muy poco lo que se ha avanzado en los aspectos bioenergéticos de *E. corrodens*. Solamente se ha postulado al nitrato como aceptor de electrones de la cadena respiratoria y a la ubiquinona como intermediaria; sin embargo, la función de tales compuestos en el transporte de electrones como la presencia de los sustratos endógenos y los complejos del sistema respiratorio de *E. corrodens* no ha sido estudiado; es decir, la composición y organización de la cadena transportadora de electrones como su relación con su fisiología, a los procesos de patogénesis en la cavidad oral y sitios de infección extra-oral aún no se ha comprendido. Lo anterior permitirá profundizar en la composición, organización y función de los sistemas respiratorios en la familia *Neisseriaceae* de la subdivisión β -proteobacterias, en consecuencia se ahonda en la diversidad de su fisiología, la bioquímica y la bioenergética como en la plasticidad de la cadena transportadora de electrones; por lo tanto es importante dar respuestas a las siguientes preguntas:

- ¿Cuáles son los sustratos fisiológicos que alimentan el sistema respiratorio de *E. corrodens* en condiciones aeróbicas?
- ¿Qué tipos de citocromos se sintetizan en condiciones de crecimiento con oxígeno limitado?
- ¿Cuál(es) es (son) la(s) oxidasa(s) y/o reductasa(s) que se expresan en estas condiciones de crecimiento?
- ¿Cómo están organizados los componentes del sistema respiratorio?
- ¿Cuál es el efecto de los inhibidores respiratorios sobre el transporte de electrones?
- ¿Pueden estimular la velocidad de respiración los análogos de quinonas?

1. HIPÓTESIS

Si *E. corrodens* es capaz de crecer en condiciones de baja oxigenación, entonces podemos postular que esta bacteria posee un sistema respiratorio que le permite utilizar el oxígeno como aceptor terminal de electrones.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Definir la composición y organización del sistema respiratorio de *Eikenella corrodens* cultivada en condiciones de oxígeno limitado (cultivo estático).

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar los sustratos endógenos de la cadena respiratoria en membranas de *Eikenella corrodens* obtenidas a partir de células cultivadas en condiciones estáticas.
- Identificar los pigmentos respiratorios (citocromos) en membranas de *Eikenella corrodens* de células cultivadas en condiciones limitadas de oxígeno.
- Definir el efecto de diversos inhibidores respiratorios sobre la respiración evocada por distintos donadores de electrones en membranas de *Eikenella corrodens*.
- Definir el efecto de análogos de naftoquinona y ubiquinona sobre la respiración evocada por distintos sustratos en membranas de *Eikenella corrodens*.

3. METODOS Y MATERIALES

3.1 *Eikenella corrodens*

Se utilizó una cepa silvestre de *Eikenella corrodens* 23834 de la ATCC (American Type Culture Collection), Manassas, Virginia, U.S.A., la cual se activó en agar GC y medio líquido GC, recomendado por ATCC.

3.2 MEDIO DE CULTIVO, CONTROL DE CRECIMIENTO Y RECOLECCIÓN

La cepa fue mantenida por cultivo semanal en agar sangre triptosa (216) suplementado con sangre de cordero desfibrinada al 5% y se cultivó en una atmósfera de CO₂ 10% más 90% de aire a una temperatura de 34 °C - 37 °C o en su defecto se obtuvieron colonias cultivadas en agar GC a 34 °C por 2 a 3 días. Para cultivo líquido, se utilizaron fragmentos de agar para inocular 50 ml de medio basal de extracto de levadura BY (216), el cual fue modificado y se le denominó medio MEC, donde se le adicionó, por litro, 15 g de hidrolizado de caseína, 1 g de formiato de sodio, 1 g de serina y prolina, 0.5 g de cisteína, 0.4 g de triptófano y 0.25 g de metionina, 4 mg de cloruro de manganeso, 15 mg molibdato de sodio, 1 mg de tiamina-HCl y 1 mg de ácido nicotínico. Luego, se hicieron transferencias sucesivas hasta un volumen final de 1 L en un matraz de 2 L. En forma rutinaria se analizó la pureza del cultivo en el microscopio, usando la tinción de Gram.

Los cultivos fueron incubados sin agitación a 34 - 37 °C por 20 - 24 horas, luego las células fueron recolectadas por centrifugación a 15.300 X g por 10 min a 4 °C (Centrífuga Beckman, Avanti J-25), y el paquete celular se lavó de dos a tres veces con amortiguador de Tris-HCL 50 mM + EDTA 5 mM + NaCl 200 mM pH 7.5 (TEN). Las células se fraccionaron inmediatamente o se almacenaron a - 70 °C.

3.3 FRACCIONAMIENTO CELULAR Y OBTENCIÓN DE MEMBRANAS

Las células (0.5 g de células por ml) se resuspendieron y homogenizaron en el amortiguador TEN, y se le adicionó el inhibidor de proteasas PMSF. Esta suspensión fue incubada con lisozima por 30 min a 4 °C, seguido por 30 min a 37 °C;

posteriormente, la suspensión fue sometida a sonicación con un ultrasonificador (20 kHz, Model 250, Branson, Sonic Power Co., Dambury, Conn., U.S.A.) por un tiempo total de 25 min a 4°C. Las células enteras fueron eliminadas por centrifugación a 10.000 X g por 10 min a 4°C; el sobrenadante obtenido se centrifugó a 75.000 X g por 3 horas a 4°C y el sedimento (membranas) fue lavado dos veces con fosfato 100 mM, pH 7.4; finalmente, las membranas fueron utilizadas inmediatamente o almacenadas a -70°C. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Lowry-SDS (217) y se usó la albúmina como estándar.

3.4 ENSAYOS ENZIMÁTICOS

3.4.1 Oxidasas

3.4.1.1 Las actividades de oxidasa fueron determinadas por el método polarográfico utilizando un electrodo tipo Clark como fue descrito por Escamilla et al. (218).. El medio de reacción, en un volumen final de 2.8 ml, contiene 1.0 mg de proteínas de membranas celulares, fosfato de potasio 100 mM pH 7.4 para los ensayos de NADH y succinato oxidasa y pH 6.8 para Ascorbato-TMPD oxidasa. Los ensayos se realizaron a 34°C y las actividades se expresan como átomos ngramo de O₂ / min / mg proteína). La reacción de NADH oxidasa se inicia con la adición del sustrato NADH a concentración final de 0.5 mM. Para medir la actividad de succinato oxidasa, a la mezcla de reacción se le agregó 15 µl de succinato 0.6 M, seguido por incubación durante 5 min y se inició la reacción con succinato a una concentración final de succinato 40 mM. En los sistemas que transfieren directamente los electrones al citocromo *c*, la actividad se midió utilizando una mezcla final de TMPD 0.1 mM y ascorbato de sodio 10 mM a pH 6.8 (218); además, fueron realizado los ensayos con NADH 0.5 mM más TMPD 0.1 mM ó DCPIP 0.08 mM; finalmente, se midió la actividad en presencia de tetraclorohidroquinol (TCHQ) 3.5 mM + ascorbato 10 mM y TCHQ solo. A la actividad resultante se le restó el pequeño consumo de O₂ que ocurre en ausencia de membranas, debido a la auto-oxidación del ascorbato y TMPD.

3.4.1.2 Análogos de quinona e inhibidores. Se siguió el mismo procedimiento usado para las oxidasas, donde se agrega el análogo de quinona al medio de reacción que contiene fosfato 100 mM, pH 6.8 y 1.0 mg de proteína membranal y se inicia la reacción con el sustrato. Por otro lado, los inhibidores se incubaron por 3 min con 1.0 mg de proteína membranal. Luego se midió la actividad con el sustrato indicado; para los experimentos con los análogos de quinona, se incubó primero con el inhibidor y luego se adicionó la quinona. Los análogos de quinona fueron disueltos en etanol absoluto. Los inhibidores se prepararon de la siguiente manera: KCN y quinacrina en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.0; dicumarol en KOH 30 mM; rotenona, flavona, antimicina A, HQNO, mixotiazol, capsaicina, DCCD y 2,4-dinitrofenol en DMSO. Las cantidades utilizadas de los diferentes solventes para aplicar los inhibidores no tuvieron efecto sobre las actividades de las oxidasas medidas.

3.4.2 Oxidorreductasas

Las actividades de las oxidorreductasas en las membranas celulares fueron determinadas por un método espectrofotométrico a temperatura ambiente (27, 218). Se utilizó el DCPIP que cambia a leuco cuando se le reduce. La reducción del DCPIP se midió a 600 nm (coeficiente de extinción de $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para medir la actividad de la NADH deshidrogenasa, la mezcla de reacción contiene fosfato de potasio 100 mM, pH 7.4, DCPIP 0.08 mM, NADH 0.2 mM y se inició la reacción con la adición de membranas (0.1 mg proteína) para un volumen total de 1.0 ml. Para determinar la actividad la succinato deshidrogenasa, la mezcla de reacción contiene fosfato de potasio 100 mM, pH 7.4, succinato 42 mM, membranas (0.1 mg proteína), se pre-incubó durante cinco min. y se inició la reacción con PMS 1.0 mM y DCPIP 0.08 mM para un volumen total de 1.0 ml. La actividades se expresaron en nanomoles de DCPIP reducidos / min / mg de proteína.

3.4.3 Ensayo de la nitrato reductasa

La actividad de la nitrato reductasa fue determinada a temperatura ambiente siguiendo espectrofotométricamente la oxidación de metil viológeno por el nitrato en celdas especiales para anaerobiosis (219). La mezcla de reacción (2.5 ml) contiene fosfato 0.1 mM pH 7.4 saturado con nitrógeno, metil viológeno 1 mM, nitrato 2 mM y 0.1 mg de proteína membranal; el metil viológeno fue reducido por ditionita y la reacción fue iniciada por adición de nitrato. La oxidación de metil viológeno fue medida a 600 nm y se usó un coeficiente de extinción de $11.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (219).

3.5 ANÁLISIS ESPECTRAL DE LOS CITOCROMOS

Los espectros diferenciales de los citocromos fueron determinados en un espectrofotómetro DU 640 Beckman (Beckman Instruments Inc, U.S.A) a temperatura ambiente en una celda de cuarzo de 1.0 mm de paso de luz. Los espectros a temperatura de nitrógeno líquido (77 K) se realizaron en celdas de paso de luz de 2 mm en un espectrofotómetro de doble longitud de onda SLM DW2000 (SLM Instruments Inc, Urbana, Ill, U.S.A.). Las preparaciones fueron diluidas en glicerol al 50%, para evitar la sedimentación. La oxidación total de las membranas en la celda de referencia se logró mediante la adición de unos cristales de persulfato de amonio o agitación vigorosa y su reducción total se obtuvo con unos cristales de hidrosulfito de sodio (ditionita). Las concentraciones finales de los sustratos usados fueron NADH 2.5 mM, succinato 30 mM, formato 40 mM y ascorbato 10 mM + TMPD 0.1 mM; asimismo, sus espectros respectivos fueron registrados a los 60 min de incubación, tiempo suficiente para lograr condiciones anóxicas. Para obtener los aductos ferrocitocromo-CO, las muestras reducidas con ditionita fueron burbujeadas con CO por 3 min a temperatura ambiente y los espectros fueron registrados usando como referencia la preparación reducida con ditionita. Las concentraciones de los citocromos fueron calculadas del espectro diferencial reducido menos oxidado (ditionita o sustrato) y ditionita + CO menos ditionita de las membranas, a temperatura ambiente. Los pares de longitudes de onda en nm y los coeficientes de

extinción usados fueron para citocromo **b**, ($\epsilon_{562-575}$) = 22 mM⁻¹ cm⁻¹; citocromo **c** ($\epsilon_{550-540}$) = 19.1 mM⁻¹ cm⁻¹; y citocromo **c**-CO ($\epsilon_{415-430}$) = 145 mM⁻¹ cm⁻¹ (176, 218).

Para los espectros de fotodisociación a baja temperatura (77 K) del complejo hemo-CO reducido, las membranas fueron homogenizadas en amortiguador de fosfato 50 mM, pH 7.0, y se agregó etilenglicol a una concentración final de 30% v/v. La reducción anóxica de la preparación fue inducida por la adición de una pequeña cantidad de ditionita, y después burbujeada con CO por 5 min. La celda anóxica (2 mm de paso de luz) fue congelada en un baño de etanol – hielo seco (CO₂ sólido) a 195 K, donde fue mantenida por al menos 5 min en la oscuridad antes de congelarla a 77 K en el compartimiento de la muestra del espectrofotómetro de doble longitud de onda SLM DW2000. Las muestras fueron escaneadas dos veces entre 400 y 750 nm (usando 500 nm como la longitud de onda de referencia) y la diferencia graficada para obtener la línea basal; inmediatamente, a la muestra se le aplicó un proceso de fotólisis con tres destellos de luz desde un flash fotográfico colocado a pocos centímetros de la ventana de la celda, y entonces el espectro diferencial post-fotólisis fue registrado. El espectro diferencial de fotodisociación compuesto hemo-CO fue obtenido por sustracción del espectro de pre-fotólisis del espectro post-fotólisis (220).

3.6 EXTRACCION Y ANÁLISIS DE LOS CITOCROMOS DE TIPO **c** Y HEMOS

El método de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) reportado por Schägger y von Jagow (221) fue usado en placas de 16 X 14 cm con un gel concentrador al 5% y un gel separador al 10%. Los citocromos de tipo **c** fueron revelados por su actividad de peroxidasa, como fue reportado por Miranda-Ríos et al. (222). El citocromo **c** de caballo comercial y el de *Bacillus cereus* (223) caracterizado previamente fueron usados como controles positivos para la tinción (dato no mostrado).

Los grupos hemo fueron identificados en columnas (2 X 150 mm) de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa (223), en un sistema de cromatografía (Waters Associates, Milford, Mass) equipado con un Delta-Pak HPI

Cl18 300 Å. Los hemos fueron extraídos de las membranas (30-40 mg de proteínas) en acetona / HCl; posteriormente, los hemos en acetona / HCl fueron extraídos en éter, luego se agregó agua; la fase éter conteniendo los hemos fue removida y el éter fue evaporado con una corriente de nitrógeno como lo describe Puustinen y Wikström (224). Los hemos fueron disueltos en una solución de acetonitrilo - ácido trifluoroacético 0.5% y colocados en una columna previamente equilibrada con ácido trifluoroacético 0.5% – acetonitrilo 25% en agua; posteriormente, los hemos fueron eluidos mediante un gradiente de acetonitrilo en agua, conteniendo ácido trifluoroacético 0.5%. La posición de los hemos se detectó espectrofotométricamente a 405 nm como lo describió Lübben y Monrand (225). Los siguientes estándares fueron utilizados: los hemos B y O extraídos de las membranas de *B. cereus* (223), los hemos B y A de partículas mitocondriales de corazón de bovino, y los protohemos IX de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo).

4. RESULTADOS

Actividades de las oxidasas en membranas de *Eikenella corrodens* y efecto de los inhibidores respiratorios

Las membranas obtenidas a partir de células de *E. corrodens* cultivadas en condiciones estáticas catalizan el consumo de O₂ en presencia de succinato, NADH, formiato y sustratos artificiales que transfieren directamente los electrones al citocromo *c*. Las actividades específicas con cada uno de los sustratos anteriores fue determinada (Tabla 1). La mayor actividad específica registrada (680 átomos-ng O₂·min⁻¹·mg de proteína⁻¹) fue para la oxidasa de TCQH-ascorbato y fue 2.5, 6.8, 21, 68, y 28 veces mayor que con ascorbato-TMPD, succinato, NADH, formiato y ascorbato solo, respectivamente. De los sustratos fisiológicos, el succinato fue el mejor, oxidándose a velocidades 3 y 10 veces superiores con respecto a NADH y formiato, respectivamente. Las actividades específicas para las deshidrogenasas también fueron determinadas. En el caso de la succinato y NADH deshidrogenasas (Tabla 1) la actividad fue de 200 y 235 nmoles de DCPIP reducidos / min / mg de proteína, respectivamente; sin embargo, la succinato: UQ endógena-DCPIP oxidorreductasa fue de 35. El ensayo de succinato deshidrogenasa utiliza PMS-DCPIP como aceptor a diferencia del segundo ensayo que utiliza solo al DCPIP como aceptor y por tanto tiene que recibir los electrones de algún componente de la cadena respiratoria que puede ser la NADH deshidrogenasa o la UQ endógena o algún citocromo de tipo-*c*. Habitualmente el PMS es considerablemente más eficiente como aceptor directo de electrones para la succinato deshidrogenasa. Por otro lado, la actividad específica de la nitrato reductasa en membranas de *E. corrodens*, se determinó en presencia de metil viológeno reducido por ditionita como donador de electrones y la actividad fue de 230 nmoles de metil viológeno oxidado / min / mg de proteína. En resumen, los datos anteriores indican que el succinato es el mejor sustrato fisiológico de la cadena respiratoria de *E. corrodens* cuando las células fueron cultivadas en condiciones limitadas de oxígeno; asimismo, los resultados indican la presencia de la nitrato reductasa; finalmente, resulta interesante que el TCHQ, que tiene una estructura parecida a la ubiquinona endógena de *E. corrodens*

(220), se oxida a una velocidad que resultó casi 7 veces mas alta que la respiración con succinato, el mejor sustrato fisiológico.

Tabla 1. Actividades respiratorias asociadas a partículas membranales de *Eikenella corrodens* cultivadas estáticamente.

Sustratos	Oxidasa ^a	Oxidorreductasa ^b
Succinato	100	200
NADH	32	235
Formiato	10	----
NADH-TMPD	260	----
Ascorbato-TMPD	270	----
Ascorbato	24	----
TCHQ + Ascorbato	680	----
Nitrato reductasa	-----	230 ^c

^a Las oxidasas fueron medidas polarográficamente con un electrodo de Clark como se describe en métodos y materiales. La actividad se expresa como átomos-ng de O₂-min⁻¹·mg de proteína⁻¹.

^b La actividad se expresa como nmoles de DCPIP reducidos·min⁻¹·mg de proteína⁻¹.

^c La actividad se expresa como nmoles de metil viológeno oxidado·min⁻¹·mg de proteína⁻¹.

La respiración dependiente de succinato fue titulada con inhibidores del sitio II (Figura 3A). La actividad de la succinato oxidasa fue inhibida en un 50% por antimicina A 20 μM y HQNO 40 μM; a 100 μM de ambos inhibidores aún se observa el 30-40% de la actividad. El mixotiazol fue un inhibidor más potente, ya que la oxidación de succinato fue inhibida en un 50% a 1.7 μM y un 90% con 10 μM (Figura 3A). Este resultado sugiere que la cadena transportadora de electrones de *E. corrodens* contiene un complejo *bc*₁ más sensible a mixotiazol que a antimicina y HQNO. El TTFA y DCCD fueron inhibidores pobres (Figura 3A) y el 2,4 dinitrofenol no afecta la velocidad de oxidación del succinato. Por otro lado, el cianuro sobre las actividades de la succinato, ascorbato-TMPD y NADH-DCPIP oxidasas (Figura 3B), muestra una inhibición monofásica para los tres casos. La oxidación de succinato fue inhibida en un 50% por KCN 3 μM y prácticamente abolida por KCN 30 μM. La respiración con

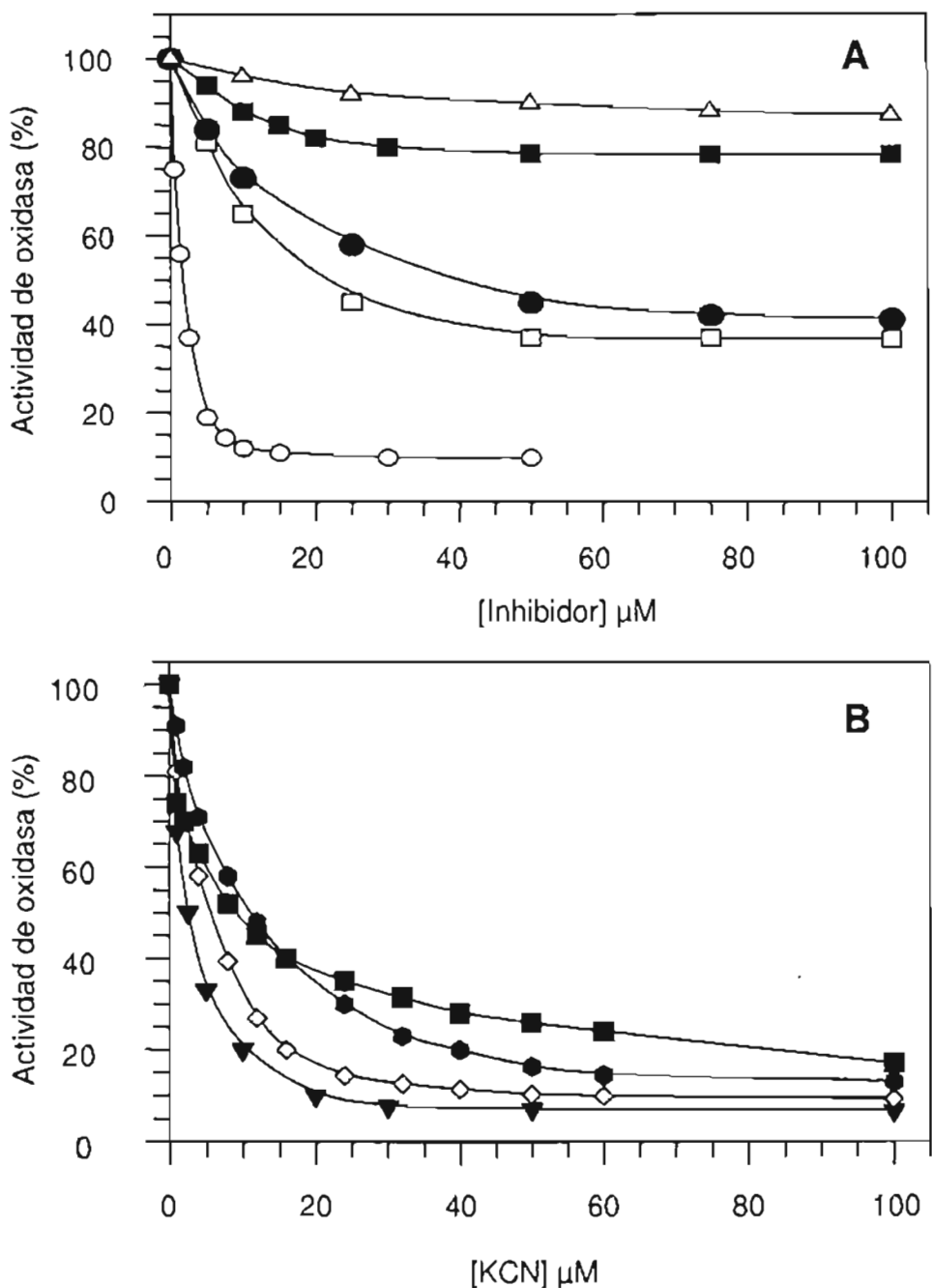


Figura 3. Efecto de los inhibidores del sitio II (A) y cianuro (B) sobre el transporte de electrones en membranas de *Eikenella corrodens* ATCC 23834. A) Efecto del mixotiazol (○), antimicina A (□), HQNO (●), DCCD (■) y TTFA (△) sobre la actividad de la succinato oxidasa. B) Inhibición de la succinato (▼), ascorbato-TMPD (◇), TCHQ (■) y NADH-DCPIP (●) oxidasa por KCN. La actividad específica registrada en la ausencia del inhibidor fue de 90 ± 10 , 260 ± 20 , 181 ± 10 , 110 ± 10 átomos-ng de $\text{O}_2 \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para succinato, ascorbato-TMPD, TCHQ y NADH-DCPIP oxidasa, respectivamente. Los ensayos fueron realizados según lo descrito en Métodos y Materiales.

ascorbato-TMPD fue inhibida en un 50% por KCN 6 μM y a una concentración de KCN 30 μM se afectó en un 85% el consumo de O_2 ; además, la respiración con NADH en presencia de DCPIP fue inhibida en un 50% por KCN 11 μM y se inhibió en un 85% por KCN 100 μM ; asimismo, la actividad de la NADH-TMPD oxidasa, que realiza un "by pass" del complejo I al citocromo *c* y/o citocromo oxidasa, fue inhibida en un 80% por KCN 100 μM . Bajo todas las condiciones ensayadas se detecta una oxidasa terminal muy sensible a cianuro. Una fracción muy baja de la respiración ($\leq 20\%$) es resistente a concentraciones bajas de cianuro (100 μM).

Los inhibidores clásicos de la NDH-1 (Tabla 2) como quinacrina, dicumarol y rotenona afectan la actividad de la NADH oxidasa de un 35% al 40%, mientras la flavona (Tabla 2), inhibidor de la NDH-2 en algunos organismos (40), inhibe el 30% de la respiración. Así, el complejo I de *E. corrodens* no tuvo un comportamiento definido frente a los inhibidores que habitualmente sirven para distinguir ente NDH-1 y NDH-2, simplemente fue parcialmente sensible a ambos. El HQNO, antimicina A y mixotiazol fueron inhibidores pobres en la respiración con NADH (Tabla 2), ya que inhiben entre un 16 - 31%. Se obtuvo una respuesta semejante cuando se realizó el experimento con antimicina más mixotiazol, condición de doble inhibición, "double kill" (80); además, se obtuvo un resultado parecido en presencia de cianuro. Sin embargo, es importante mencionar que la actividad basal de la NADH oxidasa fue cuatro veces menor que la succinato oxidasa, lo cual puede ser reflejo de que la UQ endógena no es un mediador óptimo en el transporte de electrones entre la NADH deshidrogenasa y el sector de oxidasas; es decir, esta etapa es el factor limitante para la velocidad de transporte de electrones, de tal manera que en toda condición de titulación con los inhibidores del sitio II y el KCN, no se inhibe el transporte de electrones en forma semejante a la respiración con succinato.

La velocidad de oxidación del TCQH fue más alta que para cualquiera de los sustratos fisiológicos y/o artificiales utilizados (Tabla 1); sin embargo, la actividad con TCHQ fue inhibida en un 90% por KCN 100 μM , resultado muy semejante a los obtenidos en la figura 3B. Por lo tanto, se sugiere que el flujo de electrones producto

Tabla 2. Efecto de los inhibidores del transporte de electrones sobre la respiración^a con NADH y succinato en membranas de *Eikenella corrodens* ATCC 23834.

Inhibidor	Concentración (μM)	Inhibición (%)	
		NADH	Succinato
Quinacrina	300	36	---
Dicumarol	250	38	---
Rotenona	300	41	---
Flacona	300	32	---
TTFA	100	---	13
DCCD	50	---	22
HQNO	100	31	59
Antimicina A	100	16	63
Mixotiazol	25	18	90
KCN	50 o 100	16	90
Antimicina A + Mixotiazol	100 / 25	20	---

^a La actividad de la NADH y succinato oxidasa sin el inhibidor fue de 21 y 100 átomos-ng de $\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, respectivamente.

de la oxidación del TCHQ llega a la citocromo oxidasa más sensible a cianuro.

Los citocromos de la membrana citoplásmica de *E. corrodens*

Las membranas obtenidas a partir de células que crecieron bajo condiciones limitadas de O_2 fueron reducidas con algunos de los siguientes sustratos: ditionita, succinato, NADH, formiato, ascorbato-TMPD ó ascorbato solo (Figura 4). El espectro diferencial reducido con ditionita menos oxidado-aire (espectro a) indica la presencia de citocromos de tipo **b** con máximos a 428, 530 y 558 nm y un ligero hombro a 562 nm. La presencia de citocromo **c** fue señalada por un hombro a 550 nm y absorción a 424 nm. Es importante subrayar que las señales espectrales típicas para los citocromos **aa₃** (445 y 605 nm) y **d** (630-637 nm) no fueron detectadas. Este resultado descarta a las oxidasas **aa₃** y **bd** como oxidasas terminales del sistema respiratorio de *E. corrodens*. Los espectros obtenidos en presencia de succinato, NADH y

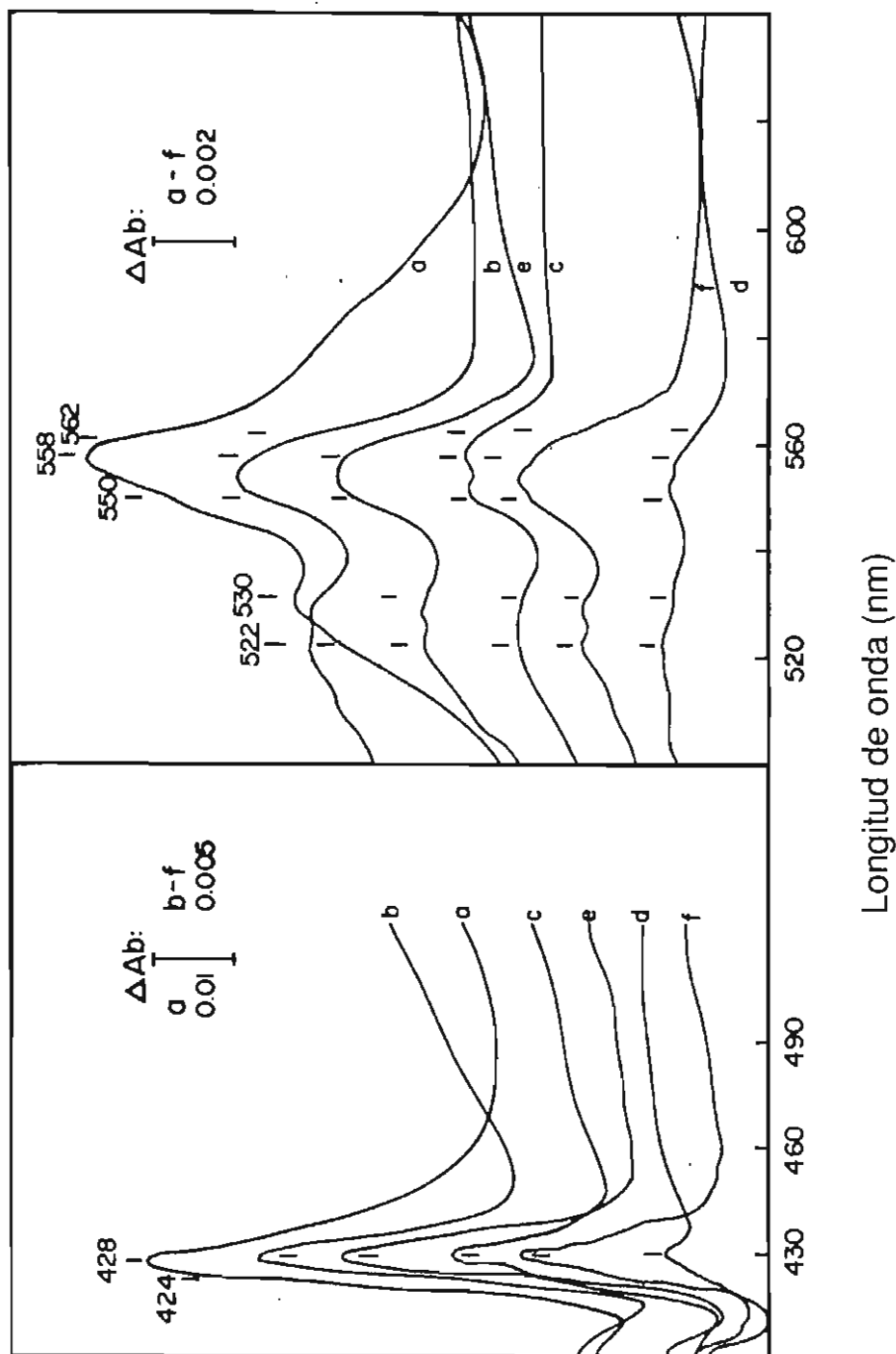


Figura 4. Espectros diferenciales (reducidos menos oxidado) de membranas de *Eikenella corrodens* ATCC 23834 cultivadas por 20 horas en condiciones limitantes de oxígeno. Las membranas (6.7 mg de proteínas ml⁻¹) fueron reducidas con ditionita (trazo a), succinato 40 mM (trazo b), NADH 5 mM (trazo c), formiato 40 mM (trazo d), ascorbato 10 mM + TMPD 0.1 mM (trazo e), o ascorbato 10 mM (f). Para los trazos b - e, las membranas fueron incubadas con los sustratos por 60 min antes de que fueran registrados los espectros. En todos los espectros, fueron usadas las referencia oxidado-aire (temperatura ambiente)

formiato (Figura 4, trazos b, c y d, respectivamente) muestran las mismas características espectrales, si bien los niveles de reducción alcanzados para todos los citocromos fueron menores que los inducidos por ditionita (Tabla 3). El orden de eficacia para estos tres los donadores de electrones probados fue: succinato > NADH > formiato. La reducción con ascorbato-TMPD y ascorbato solo (Figura 4, trazos e y f, respectivamente) produce picos a 428, 524, 530, 554 y 558 nm y hombros a 424, 550 y 560-564 nm. La reducción importante del componente a 554 nm inducida por ascorbato solo (Tabla 3) indica que hay un citocromo *c* localizado sobre el lado de alto potencial del sistema respiratorio. Ha sido sugerido (226, 227) que el ascorbato puede ser usado para identificar citocromo oxidasas que usan un citocromo *c* como donador de electrones; por ejemplo, la citocromo oxidasa *caa*₃ en *B. subtilis*. En nuestro caso, el ascorbato reduce en forma sobresaliente sólo a un citocromo *b*; por consiguiente, parecería que un citocromo *c* y un citocromo *b* están en la vía de reducción y/o forman parte del centro catalítico de la oxidasa terminal.

Los niveles de reducción de los citocromos por los sustratos utilizados (Figura 4) fueron calculados (Tabla 3). Después de ditionita, los niveles de reducción más

Tabla 3. Concentración y porcentaje de reducción de los citocromos asociados con la membrana de células de *Eikenella corrodens* ATCC 23834 cultivada con O₂ estático en presencia de diferentes sustratos.

Sustratos	Citocromo ^a (nmol [mg de proteína] ⁻¹)			
	<i>B</i>	% reducido	<i>C</i>	% reducido
Ditionita	0.32	100	0.2	100
Succinato	0.17	53	0.15	75
NADH	0.12	37	0.10	50
Formiato	0.025	8	0.04	20
Ascorbato-TMPD	0.23	72	0.18	90
Ascorbato	0.15	47	0.14	70
<i>o</i> '-CO o <i>b</i> -CO	0.22	69	----	----

^a La concentración de los citocromos fue calculada a partir de los espectros diferenciales de reducción con los sustratos indicados, como se describe en métodos y materiales, a temperatura ambiente.

altos para los citocromos *b* y *c* fueron obtenidos con ascorbato-TMPD seguido por succinato, ascorbato solo, NADH y formiato. Estos datos son consistentes con su eficiencia como donadores de electrones a la cadena respiratoria de *E. corrodens*, como se observa en la Tabla 1 y Figura 4.

El sitio de acción de los inhibidores del sitio II fue determinado en membranas reducidas por succinato (Figura 5). Un experimento preliminar demostró que el nivel de reducción máximo con succinato se alcanzaba a los 30 min; por lo tanto, el espectro fue registrado después de los 30 min de incubación. Con succinato (Figura 5, trazo a), las señales espectrales en la región α - β corresponden a 524, 530, 550, 558 y 562 nm. En presencia de mixotiazol 50 μ M (trazo b), la reducción de los citocromos de tipo *b* (delta de absorbencia, $\Delta Ab_{558-575}$) por succinato disminuyó en un 36%, mientras la reducción de los citocromos *c* ($\Delta Ab_{550-540}$) decreció en un 60%, con respecto al espectro con succinato solo (trazo a). Estos resultados están de acuerdo con lo postulado para el mecanismo de acción de mixotiazol sobre el complejo bc_1 , en donde el mixotiazol interactúa con la subunidad de Fe-S del complejo bc_1 para bloquear la reducción del citocromo c_1 . Esto permite la reducción de citocromos *b*, al actuar en sentido de la vía sensible a antimicina (80). Cuando la antimicina se ensayó en combinación con mixotiazol (trazo c), se produjo la condición denominada de "double kill" (80); en este caso, la reducción de ambos tipos de citocromos (*b* y *c*) fue inhibida en un 65%.

Espectro diferencial de monóxido de carbono y fotodisociación

El espectro diferencial de CO (Figura 6A) de membranas reducidas por ditionita a 77 K, generó un espectro parecido al que se obtiene con el aducto de citocromo o^1 -CO en *E. coli* (220). En el mismo espectro se destaca la ausencia de señales para complejos de citocromo a_3 -CO y d -CO. La ausencia de aductos de CO para estos dos citocromos está de acuerdo con los espectros diferenciales de reducción donde tampoco se observaron señales para estos dos citocromos (ver Figura 4). Las

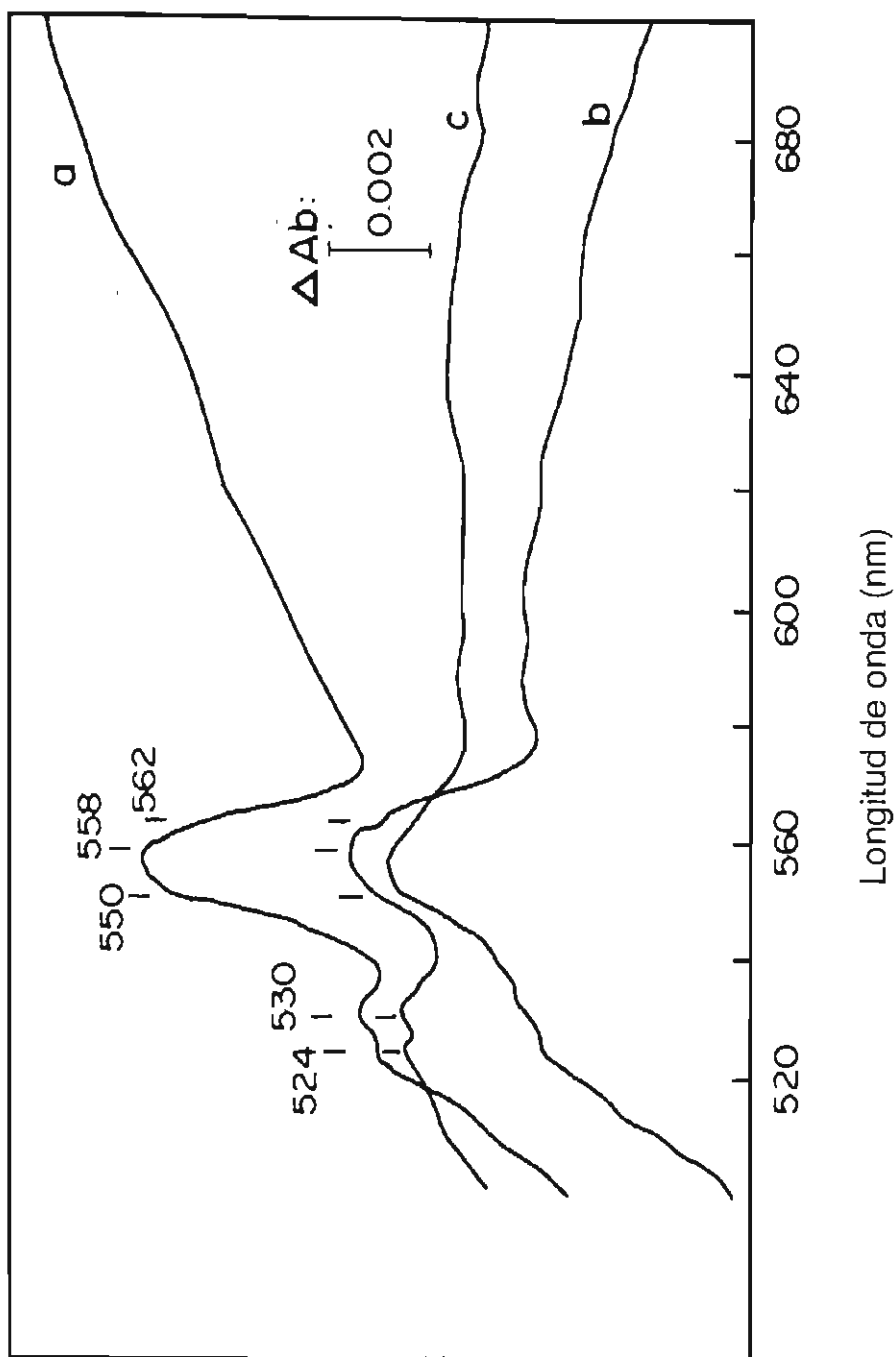


Figura 5. Efecto del mixotriazol y la antimicina A sobre la reducción de los citocromos mediada por succinato en membranas de *Eikenella corrodens* ATTC 23834. Los espectros diferenciales fueron registrados para succinato 40 mM (trazo a), succinato 40 mM en presencia de mixotriazol 50 μ M (trazo b), y succinato 40 mM en presencia de mixotriazol 50 μ M + antimicina A 100 μ M (trazo c). Para los diferentes trazos las preparaciones de membranas (5 mg de proteína) fueron incubadas a temperatura ambiente y los espectros fueron registrados después de 30 min de reducción.

señales espectrales principales obtenidas fueron: un máximo a 417 nm, un mínimo a 429 nm. Además, en las regiones α - β del espectro se observaron picos a 540 y 570 nm y un mínimo a 557 nm. La concentración del supuesto complejo citocromo σ -CO en *E. corrodens* (Tabla 3) fue calculada del espectro diferencial de CO, reducido con ditionita, a temperatura ambiente (no mostrado), la concentración calculada corresponde a un 69% del contenido total de citocromo de tipo **b**.

El espectro diferencial de monóxido, como en la Figura 6A, muestra todas las hemoproteínas reactivas a CO, en donde se incluyen las hidroperoxidasas y globinas, como también las presuntas oxidasas. Para identificar las oxidasas que por lo general exhiben una cinética lenta de recombinación con CO a temperaturas subcero, se registró un espectro de fotodisociación a 77 K. El aducto formado con CO en condiciones anóxicas fue congelado a 77 K y expuesto a luz actínica, el CO unido fue fotodisociado, y el espectro de fotodisociación (postfotólisis menos pre-fotólisis, Figura 6B) fue registrado. Se observó un pico sobresaliente en la región Soret a 432 nm y también se detectó un segundo pico a 558 nm. Esta absorbencia máxima es producto del citocromo reducido que se genera de la disociación del CO. Los rasgos espectrales descritos son parecidos al espectro diferencial de fotodisociación del citocromo σ' de *E. coli* (220), y para confirmar su identificación se hizo el análisis de grupos hemo que a continuación se describe.

Análisis de los citocromos de tipo *c* y hemos

La identidad de los citocromos **c** detectados espectrofotométricamente fue investigada. Para este estudio, las membranas fueron analizadas por SDS-PAGE, para ser teñidas por el método de la peroxidasa y así descubrir las bandas que contienen hemo unido covalentemente (ver Métodos y materiales). En la Figura 7A se observan al menos cinco bandas principales, con un peso molecular aparente de 44, 33, 30, 26 y 14 kDa; asimismo, aparecen diferentes bandas menores, que probablemente resultaron de un artificio provocado por asociaciones no específicas de hemos con proteínas (228). El citocromo **c** de peso molecular aparente de 14 kDa

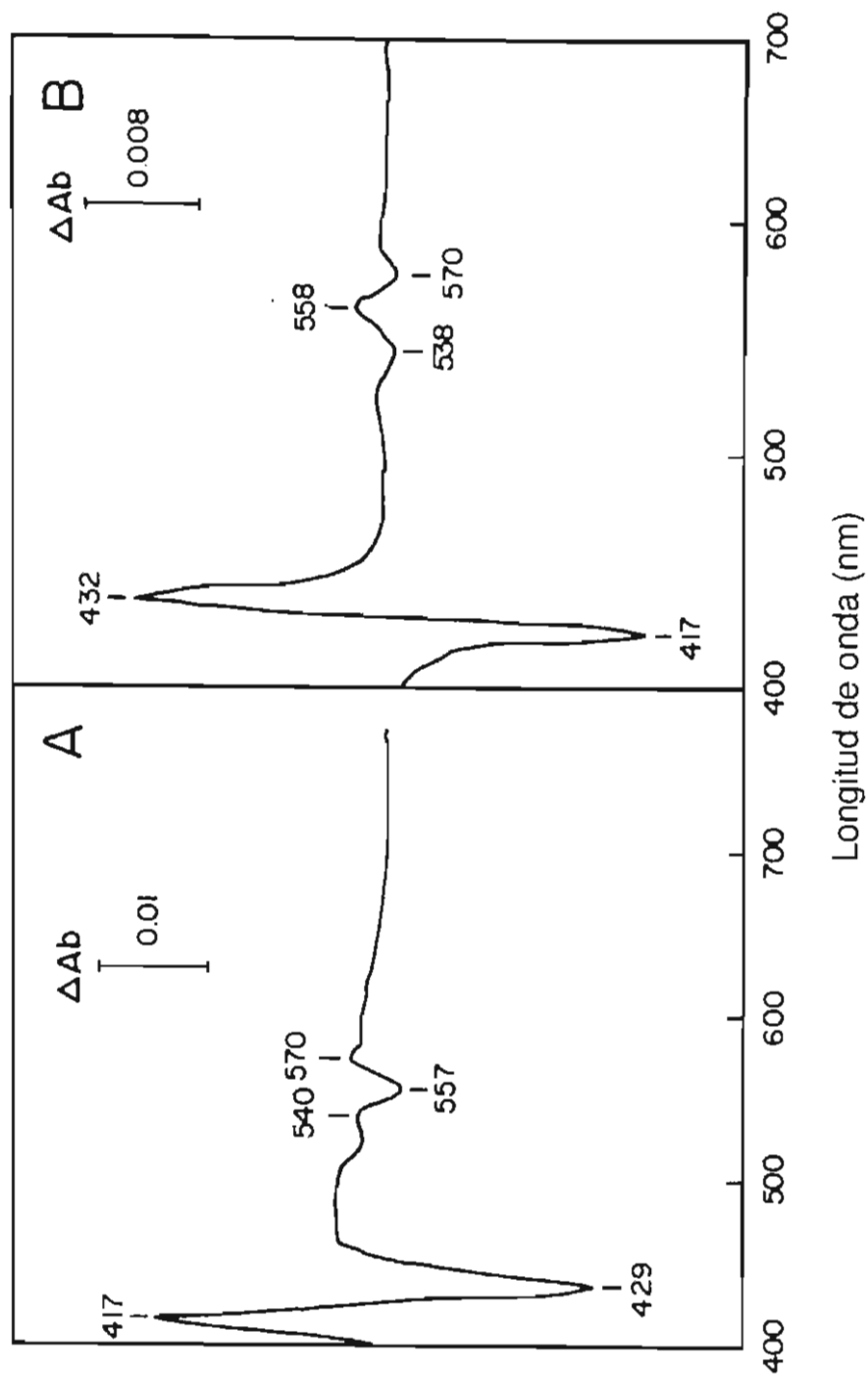


Figura 6. Citocromos reactivos a CO en membranas de *Eikenella corrodens* ATTC 23834. (A) Espectro diferencial de CO a 77 K de membranas (6.7 mg de proteínas min^{-1}) reducidas por ditionita. (B) Espectro de fotodisociación a 77 K del aducto de CO mostrado en A. Los procedimientos para obtener el diferencial de CO y espectro de fotodisociación fueron descritos en Métodos y Materiales.

podría ser un buen candidato para recibir los electrones del complejo *bc*₁ funcional y donarlo a la citocromo oxidasa sensible a cianuro,

Los grupos hemos extraídos y purificados (224) de las membranas de *E. corrodens* en acetona / HCl, fueron analizados por HPLC- fase reversa (Figura 7B). Para la referencia, la columna fue calibrada con los hemos A, B y O. Las muestras purificadas de membranas de *E. corrodens* muestran un pico principal con un tiempo de retención característico del hemo B (24.8 min); por otra parte, las señales para hemo A (tiempo de retención 30 min) y hemo O (tiempo de retención 32.4 min) no fueron detectadas. Por consiguiente, se sugiere que el citocromo tipo *b* reactivo con CO mostrado en la Figura 6 corresponde a un citocromo *b* de alto potencial y no a un citocromo *o* como se había pensado inicialmente.

Efecto de los análogos de quinona sobre la respiración de *Eikenella corrodens*

Dado que el TCHQ resultó ser mejor mediador que la UQ endógena en su capacidad para mediar el transporte de electrones, se decidió probar otros análogos de UQ. En este estudio se seleccionaron los análogos de las naftoquinonas lawsona, plumbagina, menadiona, juglona, menadiona bisulfito y 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sodio (NQSN), porque presentan un rango de potencial redox entre -200 a +100 mV, como también diferentes sustituyentes en la posición 2 y 5 sobre la estructura de la naftoquinona (Figura 2); asimismo, se utilizaron los análogos de las benzoquinonas duroquinona y 2,3-dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzoquinona (decilubiquinona, DB), que tiene una estructura muy diferente a las naftoquinonas. Las distintas estructuras de los análogos de quinona y sus potenciales redox (Figura 2), permitirían un análisis más racional de su capacidad para sustituir a la UQ endógena como mediadores en el transporte de electrones.

Las actividades de la NADH y la succinato Quinona-DCPIP oxidorreductasas fueron determinadas en presencia de diferentes análogos de quinona hidrosolubles

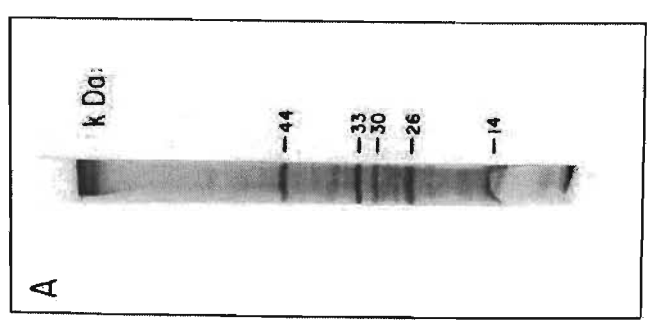
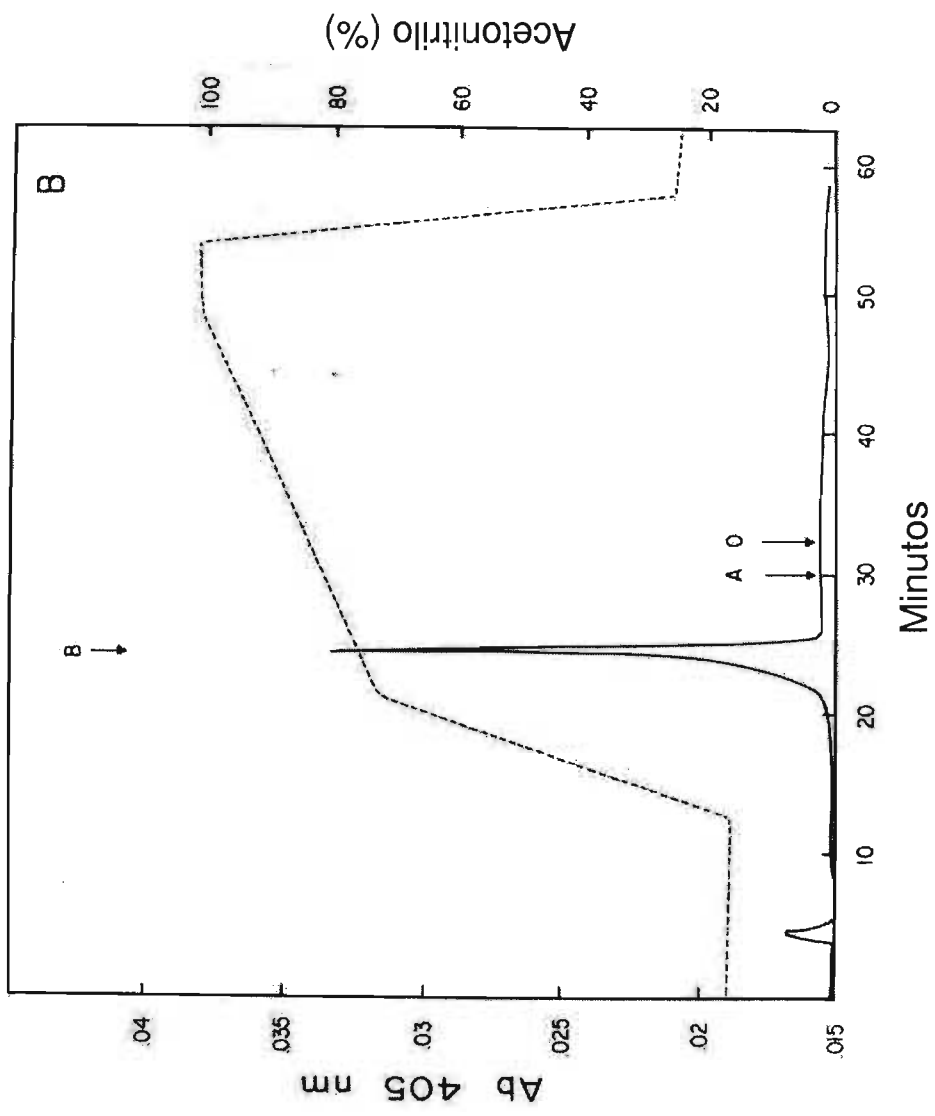


Figura 7. Hemos asociados a las proteínas unidas a membranas de *Eikenella corrodens* ATTC 23834. (A) Tinción de la actividad de peroxidasa de las proteínas de membranas (1 mg) separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida 10% en presencia de SDS 1%. (B) Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa de los hemos extraídos con acetona ácida de las membranas (40 mg de proteína). El tiempo de retención para los estándares fueron como sigue: hemo B (24.8 min), hemo A (30 min) y hemo O (32.4 min).

(Tabla 4). La actividad de la NADH: juglona, plumbagina y menadiona-DCPIP oxidoreductasa se incrementaron en 3, 2 y 1.5 veces, respectivamente con relación a la actividad con la ubiquinona endógena, mientras que la succinato: juglona-DCPIP oxidoreductasa duplicó la actividad de la succinato: ubiquinona endógena-DCPIP oxidoreductasa. Por lo tanto, la juglona fue el mejor aceptor de electrones para la NDH y la SDH. La plumbagina y la menadiona fueron un poco menos eficientes con la NDH y a la vez, no mejoraron la velocidad de respiración con succinato. La diferente capacidad de las tres naftoquinonas como aceptores de electrones por las dos deshidrogenasas, puede ser consecuencia de la estructura química de los análogos de las quinonas y de su potencial redox.

Tabla 4. Efecto de los análogos de quinona sobre la actividad de NADH y succinato: Quinona-DCPIP oxidoreductasas en membranas de *Eikenella corrodens*.

[Quinona] 300 μ M	Actividad Quinona-DCPIP Oxidoreductasa ^a			
	NADH deshidrogenasa	%	Succinato deshidrogenasa	%
Ninguna	235	100	35	100
Juglona	725	308	70	200
Plumbagina	490	208	35	100
Menadiona	370	157	35	100
Lawsona	220	94	35	100
Duroquinona	250	106	42	120

^a La actividad se expresa como nmoles de DCPIP reducido / min / mg de proteína. La actividad de la succinato: Quinona endógena-DCPIP oxidoreductasa fue medida sin PMS. La actividad de la succinato deshidrogenasa en presencia de PMS-DCPIP fue de 190 ± 10 nmoles de DCPIP reducido / min / mg de proteína.

La actividad basal de la NADH oxidasa se estimuló por los análogos de quinona (Figura 8) como juglona, plumbagina, menadiona y duroquinona (Tetrametil-1,4-benzoquinona), con un incremento en la actividad respiratoria de 54, 43, 12, y 8 veces, respectivamente. Los análogos fueron usados a concentraciones finales hasta de 300 μ M. En presencia de la menadiona bisulfito y la lawsona se estimuló 5 y 2 veces, respectivamente; sin embargo, la NQSN 150 μ M estimuló la respiración 11

veces, la estimulación disminuyó a concentraciones mayores, probablemente por el efecto del sulfonato. Cuando se agregó la DB 1 mM a las membranas, la actividad basal de la NADH oxidasa aumentó al doble. Los valores de K_m aparentes calculados para la plumbagina, juglona y menadiona fueron de 21, 49 y 74 μM , respectivamente. La cinética de activación de los análogos de naftoquinona es semejante a lo reportado anteriormente en *B. cereus* (27, 229) y *B. subtilis aro D* (23, 29). Además, la actividad reconstituida de la NADH oxidasa en membranas de *B. subtilis aroD* (mutante deficiente en menaquinona) en presencia de menadiona fue inhibida a la misma extensión como en membranas de la cepa nativa por amital, HQNO, antimicina A, cianuro y azida (29).

Para descartar la posibilidad de que un porcentaje importante del consumo de oxígeno inducido por plumbagina, juglona y menadiona fuera la consecuencia de la reacción espuria entre la quinona reducida y el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno, se esperó que se consumiera el oxígeno hasta un 3 al 5% de saturación en la celda del oxímetro, posteriormente se agregó catalasa, sin que se observara la formación de oxígeno, lo que no indica en forma definitiva la ausencia de superóxido y peróxido de hidrógeno (no detectado por esta técnica); para confirmar la actividad de la catalasa, se agregó a la misma celda H_2O_2 2.7 mM e inmediatamente se observó la formación de O_2 . Se evaluó la actividad basal de la succinato oxidasa y de la succinato: quinona – DCPIP oxidorreductasa, con los mismos análogos de quinonas a concentraciones entre 1 y 400 μM . No se observó prácticamente ningún estímulo sobre estas actividades, a excepción de la juglona que duplica la actividad de la SDH.

Los resultados anteriores indican que los análogos de las naftoquinonas juglona, plumbagina y menadiona son mejores aceptores de electrones para la NADH deshidrogenasa (en presencia de NADH) que la propia quinona endógena. Probablemente las diferencias sean debido a las deficiencias en sus estructuras químicas, tal como ha sido sugerido por diferentes investigadores en los estudios sobre la especificidad de los análogos de quinonas en bacterias y partículas submito-

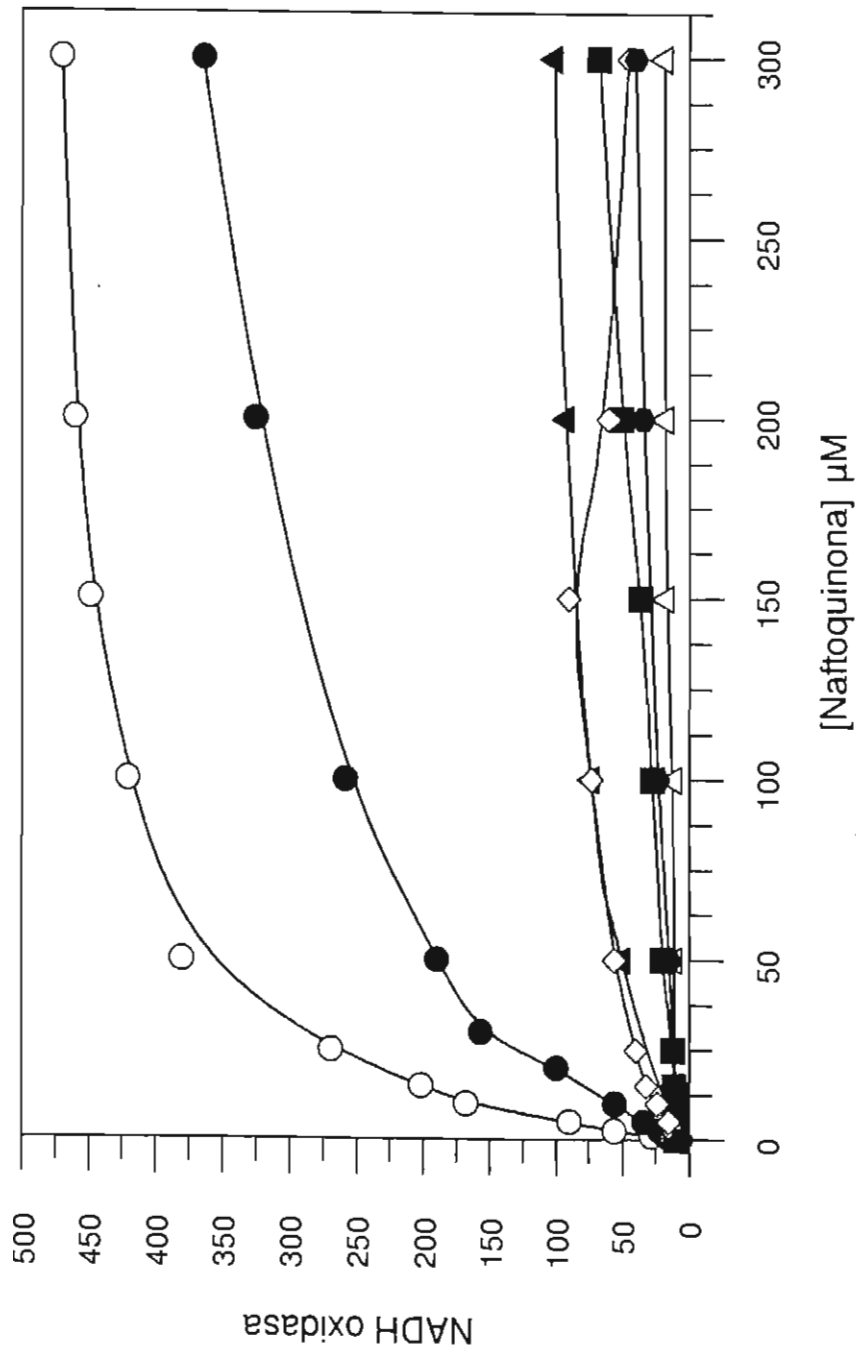


Figura 8. Efecto de las quinonas juglona (○), plumbagina (●), menadiona (▲), menadiona bisulfito (●), lawsona (Δ), 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sodio (◇) y duroquinona (■) sobre la actividad basal de la NADH oxidasa en membranas de células de *Eikenella corrodens* cultivadas en condiciones estáticas. La actividad específica de la NADH oxidasa basal fue de 8.5 ± 2.5 átomos de O_2 / min / mg de proteína. Los ensayos fueron realizados según lo descrito en Métodos y Materiales.

tocondriales (33-38, 230, 231). Asimismo, estos resultados indican que la actividad de la NADH oxidasa (consumo de oxígeno) estimulada por los análogos de naftoquinonas, al parecer no es producto de la formación de H_2O_2 ; sin embargo, no se descarta la generación superóxido y H_2O_2 que pueden ser detectado por métodos más sensibles (232, 233), como también la formación de semiquinona de juglona, plumbagina ó menadiona que donen su electrón al oxígeno. Se reporto para las cepas silvestre y mutante de *E. coli* (232, 233), que la NDH-1, quinonas respiratorias y citocromo oxidadas no forman sustancialmente H_2O_2 y superóxido, pero la NDH-2 si interviene en forma importante en la formación de superóxido y H_2O_2 ; sin embargo, los resultados anteriores y de inhibición en membranas de *E. corrodens* no permite distinguir que tipo NDH predomina en nuestras condiciones de crecimiento y experimentales, y su relación con los análogos de naftoquinona y la ubiquinona endógena.

La quinona reducida TCHQ ha sido utilizada para medir la actividad de la quinol oxidasa de tipo *d* y *a*₁ en membranas de *A. diazotrophicus* (176) así como de la quinol oxidasa *bo*₃ purificada de membranas de *B. cereus* PYM1 (234). Sin embargo, en membranas de *E. corrodens* la TCHQ que es una benzoquinona al igual que la ubiquinona endógena (215), se comporta de una manera más coherente (fisiológica), y su oxidación ocurre posiblemente vía el complejo *bc*₁ y/o la citocromo *c* oxidasa sensible a KCN, con la mayor actividad de oxidación con respecto a todos los sustratos utilizados (Tabla 1). Finalmente, la respiración con NADH en presencia de menadiona, juglona, plumbagina, lawsona ó duroquinona, fue inhibida parcialmente hasta porcentajes semejantes a los obtenidos en membranas nativas (Tabla 2) por quinacrina, rotenona, dicumarol, capsaicina, flavona, inhibidores del sitio II y KCN (datos no mostrados).

5. DISCUSION

Los datos publicados sobre la composición, organización y función de la cadena respiratoria de la familia *Neisseriaceae* de la subdivisión β -proteobacterias son escasos. En membranas de *N. meningitidis* (107) se identificaron citocromos de tipo **b**, **c** y posiblemente **a**; además, el efecto de los inhibidores respiratorios sugiere un sistema ramificado de transporte de electrones. Igualmente, *N. gonorrhoeae* (108, 235) parece tener una cadena respiratoria con citocromos **b** y **c**, entre los cuales puede haber una oxidasa -probablemente una oxidasa **ccb₃**-, asimismo citocromos de tipo **a** y **d**. Puede existir una cadena corta a través de la cual el succinato y el malato serían oxidados directamente por una vía sensible a KCN. Por otro lado, la secuencia completa del genoma de *N. meningitidis* fue liberada en el año 2000 (218), y contiene marcos de lectura abierta para un presunto complejo **bc₁**, cuatro presuntos citocromos de tipo **c**, y un posible complejo **cbb₃**. Un análisis comparativo preliminar de la secuencia completa del DNA de *N. gonorrhoeae* (219) con el de *N. meningitidis* sugiere que los componentes del sistema respiratorio identificados por su secuencia de genes son similares

La revisión bibliográfica realizada sobre el metabolismo, la bioenergética y la respiración de *E. corrodens*, indica que nuestro estudio es el primero que se realiza sobre el sistema respiratorio de este bacilo. Nuestros resultados están de acuerdo con los datos genéticos de la familia *Neisseriaceae*. Un sistema respiratorio, donde al menos el succinato, el NADH y el formiato son sustratos naturales de la respiración, y su eficiencia como donadores fisiológicos tienen el mismo orden decreciente (Tabla 1). La respiración con succinato fue inhibida pobremente por TTFA y DCCD, mientras que el 2,4-dinitrofenol no tuvo efecto sobre la velocidad de respiración. Estos datos sugieren que la oxidación de succinato es resistente a los inhibidores clásicos de la succinato deshidrogenasa. Por otra parte, la actividad de la NADH deshidrogenasa es inhibida parcialmente por dicumarol, rotenona, flavona y HQNO y es afectada ligeramente por la

quinacrina (Tabla 5). Nuestros resultados muestran menor inhibición que los observados para la NADH oxidasa de *N. gonorrhoeae* por rotenona y HQNO (108); en contraste, en membranas de *N. meningitidis* (107) la rotenona fue un inhibidor mucho menos efectivo y el HQNO fue más eficiente que en *E. corrodens*. Así, dentro de la misma familia, encontramos una sensibilidad variable a los inhibidores de sitio 1, lo que debe explicarse por diferencias en la fuerza de la interacción con su sitio de acción en cada caso. Por otro lado, la cinética de la nitrato reductasa medida en presencia de metil viológeno reducido (224) demuestra claramente que *E. corrodens* utiliza el nitrato como un aceptor alternativo de electrones y explica el porqué, la presencia de nitrato tiene un efecto positivo sobre el crecimiento en condiciones anaeróbicas y aeróbicas (209 – 212, 221). Este resultado es interesante, pues en otras bacterias como *E. coli*, el sistema de la nitrato reductasa se expresa sólo en ausencia de O₂ y en presencia de nitrato como aceptor alternativo de electrones.

La presencia de un complejo *bc*₁ en *E. corrodens* es fuertemente sugerida por diferentes evidencias: (1) La identificación de los citocromos de tipo *b* y *c* en los espectros diferenciales. (2) La presencia de banda positiva al ensayo de peroxidasa en SDS-PAGE, con peso molecular en el rango de 26 – 33 kDa, esperado para un citocromo *c*₁ característico de un complejo *bc*₁ (80). (3) Una disminución muy importante en el transporte de electrones ejercida por los inhibidores mixotiazol, antimicina A y HQNO sobre la actividad de la succinato oxidasa. (4) El efecto inhibitorio diferencial de mixotiazol sobre la reducción dependiente de succinato de los centros *b* y *c*₁ del mismo complejo y (5) el efecto “doble inhibición” de la antimicina A combinada con mixotiazol usando succinato como sustrato. Sin embargo, es importante mencionar que la NADH oxidasa fue más resistente a los inhibidores del sitio II (Tabla 2), en la condición de doble inhibición y antimicina + mixotiazol + KCN (triple inhibición). Además, hay que hacer notar que la actividad específica de la NADH-oxidasa fue cuatro veces menor que la de succinato oxidasa y por tanto, en toda condición de titulación con inhibidores, la baja actividad específica de la NADH deshidrogenasa, resulta el

factor limitante para la velocidad de transporte de electrones. Los resultados obtenidos con antimicina A y HQNO son semejantes a los reportados en *N. meningitidis* (107) y *N. gonorrhoeae* (108), con excepción de que en *N. gonorrhoeae* aparentemente el HQNO no inhibe a la succinato oxidasa (108).

El KCN inhibe fuertemente la respiración con succinato ó con las mezclas de sustratos artificiales que alimentan preferentemente la parte terminal de la cadena respiratoria (ascorbato-TMPD y ascorbato-TCQH) y, con un poco menos eficiencia, las mezclas de sustratos que abren un bypass desde la NADH deshidrogenasa (NADH-DCPIP y NADH-TMPD). Esto sugiere fuertemente que la oxidasa sensible a CN^- es dominante en el sistema respiratorio de *E. corrodens*.

El espectro diferencial con CO de membranas reducidas por ditionita y su correspondiente espectro de fotodisociación (77 K) muestra un componente con características espectrales de un complejo semejante a citocromo *o*-CO. En contraste, el análisis por HPLC de los hemos extraídos de membranas no reveló la presencia de hemo O. Con estos datos es razonable concluir que la oxidasa terminal de *E. corrodens* contiene un hemo B de alto potencial en el sitio catalítico. Esta oxidasa es reducida por ascorbato (Figura 1, trazo f) y su actividad catalítica fue la más alta con ascorbato-TCHQ y ascorbato-TMPD como sustratos. Los resultados anteriores permiten postular dos posibles interpretaciones: (i) el TMPD reduce directamente a una oxidasa tipo *cbb*₃ o (ii) a un citocromo *c* libre y éste, a su vez, reduciría a una oxidasa tipo *cbb*₃ o a una *bb*₃. En cuanto al TCHQ como donador de electrones, es probable que esta quinona done los electrones directamente al complejo *bc*₁, tal y como lo haría la propia UQ endógena, y en este caso los electrones pasarían del *bc*₁ a un cit *c* libre. Aunque sería necesario purificar la oxidasa en cuestión y/o clonar y secuenciar los genes que la codifican para definir la identidad de nuestra oxidasa, podemos especular y favorecer la idea de que se trate de una oxidasa *cbb*₃. En apoyo a esta conclusión, es

importante mencionar que la secuencia del genoma de *Neisseria sp.* indica la presencia de una oxidasa *cbb*₃ (218, 219)

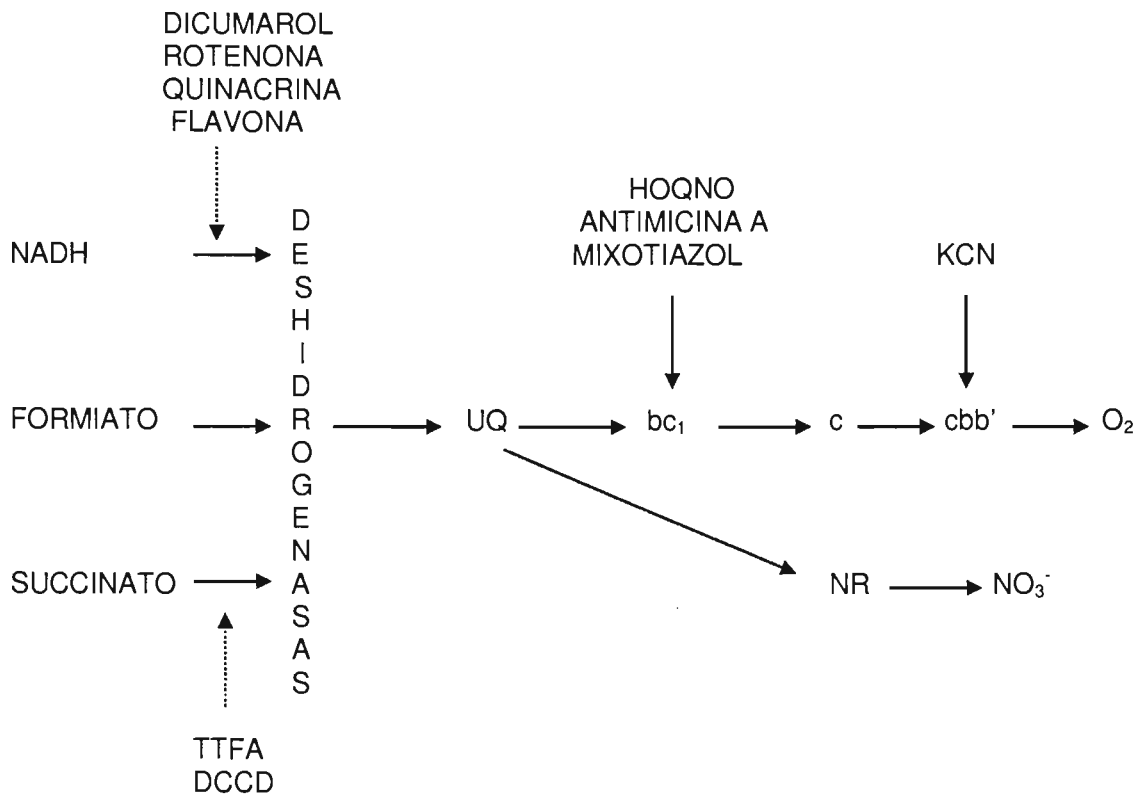
La actividad basal de la NADH oxidasa fue tres veces menor que la oxidación de succinato, de tal manera que los inhibidores del sitio II y el KCN no inhiben el transporte de electrones en forma semejante para las dos vías. Las actividades de la NADH-TMPD y -DCPIP oxidasa (TMPD y DCPIP donan electrones directamente a la oxidasa), así como la oxidación del TCHQ fueron muy sensibles al KCN. Aun así, siempre queda un remanente de actividad (20 a 50 átomos-ng de O₂ / min / mg de proteína) insensible al KCN. En este mismo orden de ideas, la respiración basal con NADH fue fuertemente estimulada (i.e. 54, 43 y 12 veces) por los análogos de naftoquinonas como juglona, plumbagina y menadiona, respectivamente. Esta elevada reactividad con la NADH deshidrogenasa ocurre a pesar de que las quinonas mencionadas tienen estructuras que son muy diferentes a la ubiquinona endógena; además, el consumo de oxígeno no es producto de la formación de peróxido de hidrógeno, lo cual sugiere que el flujo de electrones es a través de la cadena respiratoria, y la diferencia de afinidad entre las naftoquinonas por la NADH deshidrogenasa puede estar relacionada con el sustituyente en R₂, R₅ y los potenciales redox entre -40 y 40 mV, como ha sido demostrado en células procarióticas y/o en mitocondrias (23, 24, 236 - 238). La actividad medida con el TCHQ no representaría la actividad potencial máxima del transporte de electrones en el sistema respiratorio de *E. corrodens*. Entonces es claro que la UQ endógena no es un mediador óptimo en el transporte de electrones entre las deshidrogenasas y el sector de oxidasas, esto es especialmente crítico en el caso de NADH y formiato deshidrogenasas (ver tabla 1). La velocidad de oxidación del TCHQ indica posiblemente una interacción muy eficiente con el complejo *bc*₁, como con la ubiquinona endógena cuando es reducida por la SDH a velocidad muy superior a la que ocurre cuando el sustrato es el NADH, al parecer la NDH es menos reactiva con la ubiquinona endógena. Esto último es fuertemente sugerido por el hecho de que la actividad de NADH: DCPIP-aceptor reductasa da un valor máximo de aproximadamente 200 nmol /

min / mg proteína, que se considera la actividad máxima potencial de entrada de los electrones a la cadena respiratoria. Así, parecería que los análogos de quinona mencionados son mejores aceptores de electrones para la NDH que la propia UQ endógena

En resumen, los resultados en su conjunto señalan que la composición y organización del sistema respiratorio de *E. corrodens* ATCC 23834 cultivada en condiciones limitadas de O₂ (Esquema 1), consiste de una cadena transportadora de electrones sencilla que tiene como sustratos fisiológicos al succinato, el NADH y el formiato, con sus respectivas deshidrogenasas. Por analogía con otras bacterias (16, 69 – 72), las deshidrogenasas para succinato y formiato de *E. corrodens* deberían formar un complejo con un citocromo de tipo **b**. Por otra parte, la ubiquinona ha sido reportada en las membranas de α -, β - y γ -proteobacterias (17, 81) y para *E. corrodens* en condiciones limitadas de oxígeno (220). Por consiguiente, se postula a la ubiquinona como el aceptor común para electrones provenientes de las deshidrogenasas; el ubiquinol resultante dona los electrones a un complejo **bc**₁ y la oxidasa terminal podría ser un citocromo **cbb**₃ o **bb**₃. En cualquier situación, el complejo **bc**₁ necesitaría de un citocromo **c** soluble para reducir a la oxidasa terminal. Además, estudios previos (210 - 212, 221) indican que el metabolismo de prolina, glutamato y serina en *E. corrodens* está acoplado a la respiración con nitrato como aceptor alternativo de electrones, y los resultados presentados en este trabajo donde se demuestra la actividad de metil viológeno - nitrato reductasa indican la presencia de una nitrato reductasa disimilatoria. El sistema respiratorio propuesto para *E. corrodens* es resistente a los inhibidores de la NDH y SDH, pero es muy sensible a los inhibidores del complejo **bc**₁ y al KCN. La TCHQ, que es una benzoquinona al igual que la ubiquinona endógena, dona los electrones muy eficientemente al complejo **bc**₁.

Las futuras investigaciones deben dirigirse a profundizar sobre la presencia de otros sustratos fisiológicos y de los citocromos de la cadena respiratoria de *E. corrodens* propuesta en este trabajo, como también estudiar el efecto de

diferentes análogos de benzoquinonas sobre la respiración, Se debe iniciar el estudio del sistema transportador de electrones en condiciones anaeróbicas. Asimismo, es importante la purificación y caracterización de los diferentes complejos respiratorios, lo cual suministraría información, tanto sobre la naturaleza de cada uno de ellos y sobre el funcionamiento del sistema respiratorio de *E. corrodens* en diferentes tensiones de oxígeno. Finalmente, la disponibilidad de las secuencias del genoma para *Neisseria sp.* podría facilitar el diseño de vectores genómicos para clonar genes análogos de *Eikenella corrodens*.



Esquema 1. Modelo del sistema respiratorio aeróbico de *Eikenella corrodens* ATCC 23834. Dicumarol, rotenona, quinacrina y flavona son inhibidores pobres (línea discontinua) de la oxidación del NADH. El TTFA y DCCD son inhibidores pobres para la succinato deshidrogenasa (línea discontinua). Citocromo bc_1 es inhibido por mixotiazol, antimicina A y HOQNO (flecha sólida). El Citocromo cbb' es la oxidasa terminal sensible a cianuro. Alternativamente, ha sido reportado (210) que *E. corrodens* puede usar para su crecimiento el NO_3^- como aceptor terminal de electrones y este estudio se demostró la presencia de la nitrato reductasa (NR), usando el ubiquinol como el donador de electrones.

BIBLIOGRAFIA

1. CALDWELL, D.R. 1995. Microbial Physiology & Metabolism. pp. 55-71. Wm. C. Brown Publishers. Dubuque, Iowa, USA.
2. WHITE, D. 2000. The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes. pp. 37-65. Second edition. Oxford University Press.
3. SINGLETON, P. 1999. Bacteria In Biology, Biotechnology and Medicine. pp. 67-88. 5th Edition. John Wiley & Sons, Inc. Chichester.
4. UNDEN, G. 1999. Aerobic respiration and regulation of aerobic / anaerobic metabolism In Biology of the prokaryotes, pp. 261-277. Edited by Lengeler, J.W., Drews, G. and Schelegel, H.G. Blackwell Science Ltd., New York.
5. KASTINS, J.F. 1993. Earth's early atmosphere. Science. 259: 920-922.
6. KNOWLES, C.J. Ed. 1980. Diversity of bacterial respiratory systems. vol.:I, II. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
7. ANRAKU, Y. 1988. Bacterial electron transport chains. Annu. Rev. Biochem. 57:101- 32
8. GARCIA-HORSMAN, J.A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J. and Gennis R.B. 1994. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. J. Bacteriol. 176: 5587-5600.
9. IWATA, S. 1998. Structure and function of bacterial cytochrome c oxidase. J. Biochem. 123: 369-375.
10. JUNEMANN, S. 1997. Cytochrome *bd* terminal oxidase. Biochim. Biophys. Acta. 1321: 107-127.
11. ESCAMILLA, E., Contreras, M., Flores-Encarnación, M. and Flores L.M. 1999. Los sistemas respiratorios bacterianos. Mensaje Bioquímico. XXIII: 67-103
12. THÖNY-MEYER, L. 1997. Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. Microbiol Mol. Biol. Rev. 61 (3): 337-376.
13. SCHÄFER, G., Englehard, M. and Müller, V. 1999. Bioenergetics of the *Archea*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63 (3): 570-620.
14. BAKER, S.C., Ferguson, S.J., Ludwig, B., Page, M.D., Richter, O-M. H. and van Spanning, R.J.M. 1998. Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: Metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. Microbiol Mol. Biol. Rev. 62 (4): 1046-1078.
15. MATSHUSITA, K., Toyama, H. and Adachi, O. 1994. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. Adv. Microb. Physiol. 36: 247-297.

16. SAWERS, G. 1994. The hydrogenase and formate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 66: 57-88.
17. COLLINS M.D. and Jones, D. 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol. Rev.* 45: 316-354.
18. SØBALLE, B. and Poole, R.K. 1999. Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiol.*1999. 145:1817-1830.
19. SHESTOPALOV, A.I., Bogachev, A.V., Murtazina, R.A., Viryasov, M.B. and Skulachev, V.P. 1997. Aeration-dependent changes in composition of the quinone pool in *Escherichia coli* : evidence of post-transcriptional regulation of the quinone biosynthesis. *FEBS Lett.* 307: 272-274.
20. MEGANATHAN, R. 1996. Biosynthesis of the isoprenoid quinones menaquinone (vitamin K₂) and ubiquinone (coenzyme Q). In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. 642-656. Edited by F.C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology
21. HESS, A., Holländer, R. and Mannheim, W. 1979. Lipoquinones of some spore-forming rods, lactic-acid bacteria and Actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* 115: 247-252.
22. KRÖGER, A. and Uden, G. 1985. The function of menaquinone in bacterial electron transport. In *Coenzyme Q*, pp. 285-290. Edited by G. Lenaz. John Wiley & Sons Lth., New York.
23. BERGSMA, J., Meihuizen, K.E., Oeveren, W.V., Koning, W.N. 1982. Restoration of NADH oxidation with menaquinones and menaquinone analogues in membranes vesicles from the menaquinone-deficient *Bacillus subtilis aroD*. *Eur. J. Biochem.* 125: 651-657.
24. LEMMA, E., Uden, G. and Kröger, A. 1990. Menaquinone is an obligatory component of the chain catalyzing succinate respiration in *Bacillus subtilis*. *Arch. Microbiol.* 155: 62-67.
25. GENNIS, R. and Stewart, V. 1996. Respiration. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, Vol. 1. (Neidhardt, F.C., ed.), pp. 217-261, ASM press. Washington D.C.: American Society for Microbiology.
26. TYSON, K., Metheringham, R., Griffiths, L. and Cole, J. 1997. Characterisation of *Escherichia coli* K-12 mutants defective in formate-dependent nitrite reduction: essential roles for *hemN* and the *memFDBCE* operon. *Arch. Microbiol.* 168: 403-411.
27. JARAMILLO, L., R.D., 1989. Transporte de electrones por la vía de NADH y succinato en la cadena respiratoria de *Bacillus cereus*. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Biomédicas (Bioquímica). Postgrado de la facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), D.F., México.
28. ESCAMILLA J.E. and Benito, M.C. 1984. Respiratory system of vegetative and sporulating *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 160: 473-477.

29. BISSCHOP, A. and Konings, W.N. 1976. Reconstitution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase activity with menadione in membrane vesicles from the menaquinone-deficient *Bacillus subtilis* Aro D. *Eur. J. Biochem.* 67: 357-365.
30. KNOOK, D.L. and Planta, R.J. 1971. Restoration of electron transport in ultraviolet-irradiated membranes of *Aerobacter aerogenes*. *FEBS Lett.* 14: 54-56.
31. KRÖGER, A. and Dadák, V. 1969. On the role of quinones in bacterial electron transport. The respiratory system of *Bacillus megaterium*. *Eur. J. Biochem.* 11: 328-340.
32. ROTHERY R.A., Chatterjee, I., Kiema, G., Mcdermott, M.T. and Weiner, J.H. 1998. Hydroxylated naphthoquinones as substrates for *Escherichia coli* anaerobic reductases. *Biochem. J.* 332: 35-41.
33. LEMMA, E., Hägerhäll, C., Geisler, V., Brandt, U., von Jagow, G., Kröger, A. 1991. Reactivity of the *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase complex with quinones. *Biochim. Biophys. Acta.* 1059: 281-285.
34. GÄRTNER, P. 1991. Characterization of quinole-oxidase activity in crude extracts of *Thermoplasma acidophilum* and isolation of an 18-kDa cytochrome. *Eur. J. Biochem.* 200: 215-222.
35. WISSENBACH, U., Kröger, A. and Uden, G. 1990. The specific functions of menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic respiration with fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate by *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 154: 60-66.
36. CHEN, M., Liu, B-I., Gu, L-Q. and Zhu, Q-S. 1986. The effects of ring substituents on the mechanism of interaction of exogenous quinones with the mitochondrial respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta.* 851: 469-474.
37. GU, L-Q., Yu, L. and Yu, C-A. 1990. Effects of substituents of the benzoquinone ring on electron-transfer activities of ubiquinones derivatives. *Biochim. Biophys. Acta.* 1015: 482-492.
38. DEGLI ESPOSTI, M., Ngo, A., McMullen, G.L., Ghelli, A., Sparla, F., Benelli, B., Ratta, M. and Linnane, A.W. 1996. The specificity of mitochondrial complex I for ubiquinones. *Biochem. J.* 313: 327-334.
39. YAGI, T., Yano, T., Di Bernardo, S. and Matsuno-Yagi, A. 1998. Procaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364: 125-133.
40. YAGI, T. 1991. Bacterial NADH-quinone oxidoreductases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 23: 211-225.
41. SCHULTZ, B.E, Chan, S.I. 2001. Structures and Proton-Pumping Strategies of Mitochondrial Respiratory Enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30: 23-65.
42. HATEFI, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 1015-1069.

43. VIDEIRA, A. 1998. Complex I from the fungus *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364: 89-100.
44. RASMUSSEN, A., Heiser, V., Zabaleta, E. and Brennicke, A. 1998. Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364: 101-111.
45. SCHAPIRA, A.H.V. 1998. Human complex I defects in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364: 261-270.
46. ROBINSON, B.H. 1998. Human complex I deficiency: Clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364: 271-286.
47. MELO, A.M.P, Bandejas, T.M. and Teixeira, M. 2004. New insights into type II NAD(P)H: quinone oxidoreductases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 603-616.
48. FRIEDRICH, T. 1998. The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364: 134-146.
49. DUPUIS, A., Prieur, I. and Lunardi, J. 2001. Toward a characterization of the connecting module of complex I. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33: 159-168.
50. ComplexI/ NDH-1. <http://www.Scripps.edu/mem/Biochem/CI/research.htm>
51. GEMPERLI, A.C., Dimroth, P. and Steuber, J. 2003. Sodium ion cycling mediates energy coupling between complex I and ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 839-844.
52. HIRST, J. 2003. The dichotomy of complex I: A sodium ion pump or a proton pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 773-775.
53. GEMPERLI, A.C., Dimroth, P. and Steuber, J. 2002. The respiratory complex I (NDH I) from *Klebsiella pneumoniae*, a sodium pump. *J. Biol. Chem.* 277: 33811-33817.
54. STEUBER, J. 2001. The Na⁺-translocating NADH: quinone oxidoreductase (NDH I) from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*: Implications for the mechanism of redox-driven cation translocation by complex I. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33: 179-185.
55. STEUBER, J. 2001. Na⁺ translocation by bacterial NADH: quinone oxidoreductase: an extension to the complex-I family of primary redox pumps. *Biochim. Biophys. Acta.* 1505: 45-56.
56. DUPUIS, A., Chevallet, M., Darrouzet, E., Duborjal, H., Lunardi, J., and Issartel, J.P. 1998. The complex I from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim Biophys Acta.* 1364: 147-65.
57. BJÖRKLÖF, K., Zickermann, V. and Fishel, M. 2000. Purification of the 45 kDa, membrane bound NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* (NDH-2) and analysis of its interaction with ubiquinone analogues. *FEBS Lett.* 467: 105-110.

58. BARQUERA, B., Hellwig, P., Zhou, W., Morgan, J.E., Häse, C.C., Gosink, K.K., Nilges, M., Bruesehoff, P.J., Roth, A., Lancaster, C.R. and Gennis, R.B. 2002. Purification and characterization of the recombinant Na⁺-translocating NADH: quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*. *Biochem. J.* 41: 3781-3789.
59. HAYASHI, M., Nakayama, Y. and Unemoto, T. 2001. Recent progress in the Na⁺-translocating NADH-quinone reductase from the marine *Vibrio alginolyticus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1505: 37-44.
60. HÄSE, C. and Barquera, B. 2001. Role of sodium bioenergetics in *Vibrio cholerae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1505: 169-178.
61. ZHOU, W., Berstova, Y.V., Feng, B., Tsatsos, P., Verkhovskaya, M.L., Gennis, R.B., Bogachev, A.V. and Barquera, B. 1999. Sequencing and preliminary characterization of the Na⁺-translocation NADH: ubiquinone oxidoreductase from *Vibrio harveyi*. *Biochem. J.* 38: 16246-16252.
62. NAKAYAMA, Y., Hayashi, M. and Unemoto, T. 1998. Identification of six subunits constituting Na⁺-translocation NADH-quinone reductase from the marine *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Lett.* 422: 240-242.
63. HAYASHI, M., Nakayama, Y. and Unemoto, T. 1996. Existence of Na⁺-translocating NADH-quinone reductase in *Haemophilus influenzae*. *FEBS Lett.* 381: 174-176.
64. HAYASHI, M., Nakayama, Y., Yasui, M., Maeda, M., Furuishi, K. and Unemoto, T. 2001. FMN is covalently attached to a threonine residue in the NqrB and NqrC subunits of Na⁺-translocating NADH-quinone reductase from *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Lett.* 448: 5-8.
65. LUTTIK, M.A.H., Overkamp, K.M., Kötters, P., de Vries, S., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenase catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J. Biol. Chem.* 273: 24529-24534.
66. KERSCHER, S.J., Eschemann, A., Okun, J.G. and Brandt, U. 2001. External alternative NADH: ubiquinone oxidoreductase redirected to the internal face of the mitochondrial inner membrane rescues complex I deficiency in *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell. Sci.* 114: 3915-3921.
67. MELO, A.M.P., Duarte, M. and Videira, A. 1999. Primary structure and characterisation of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1412: 282-287.
68. LANCASTER, C.R.D. 2002. Succinate: quinone oxidoreductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553: 1-6.
69. LANCASTER, C.R.D. and Simon, J. 2002. Succinate: quinone oxidoreductase from ϵ -proteobacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553: 84-101.
70. HÄGERHÄLL, C. 1997. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta.* 1320: 107-141.

71. ACKRELL, B.A.C, Johnson, M.K, Gunsalus, R.P. and Cecchini, G. 1992. Structure and function of succinate dehydrogenase and fumarate reductase. In Chemistry and biochemistry of flavoenzymes, Volume III, pp. 230-297. Edited by Frnaz Müller, F. CRC Press, Boca raton, Florida.
72. JARAMILLO, R.D. and Escamilla J.E. 1990. Complejo II de la cadena respiratoria de bacterias. Rev Lat-Amer Microbiol. 32 (3): 229-248.
73. KRÖGER, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Unden, G. and Lancaster, C.R.D. 2002. Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism. Biochim. Biophys. Acta. 1553: 23-38.
74. LANCASTER, C.R.D. 2001. Succinate:quinone oxidoreductases – what can we from *Wolinella succinogenes* quinol:fumarate reductase?. FEBS Lett. 504: 133-141.
75. HÄGERHÄLL, C. and Hederstedt, L. 1996. A structural model for the membrane-integral domain of succinate:quinone oxidoreductases. FEBS Lett. 389: 25-31.
76. HEDERSTEDT, L. 1999. Respiration without O₂. Science 284:1941-1942.
77. LEMOS, R.S., Fernandes, A.S., Pereira, M.M., Gomez, C.M. and Teixeira, M. 2002. Quinol:fumarate oxidoreductases and succinate: quinone oxidoreductases: phylogenetic relationships, metal centres and membrane attachment. Biochim. Biophys. Acta. 1553: 158-170.
78. CROFTS, A.R. and Berry, E.A. 1998. Structure and function of the cytochrome *bc*₁ complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. Curr. Opin. Struct. Biol. 8: 501-509.
79. TRUMPOWER, B.L. 1994. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reaction to transmembrane proton translocation. Annu. Rev. Biochem. 63: 675-716.
80. TRUMPOWER, B.L. 1990. Cytochrome *bc*₁ complex of microorganisms. Microbiol Rev. 54: 101-129.
81. SCHÜTZ, M., Brugna, M., Lebrun, E., Bayman, F., Huber, R., Stetter, K-O. et al. 2000. Early evolution of cytochrome *bc* complexes. J. Mol. Biol. 300: 663-675.
82. BERRY, E.A., Guergova-Kuras, M. and Crofts, A.R. 2000. Structure and function of cytochrome *bc* complexes. Annu. Rev. Biochem. 69: 1005-1075.
83. YU, Y. and Le Bruns, N.E. 1998. Studies of the cytochrome subunits of menaquinone: cytochrome *c* reductase (*bc* complex) of *Bacillus subtilis*. Evidence for the covalent attachment of heme to the cytochrome *b* subunit. J. Biol. Chem. 273: 8860-8866.
84. YU, J., Herderstedt. L., and Piggot, P. 1995. The cytochrome *bc* complex (menaquinone cytochrome *c* reductase) in *Bacillus subtilis* has a nontraditional subunit organization. J. Bacteriol. 177: 6751-6760.
85. COMPLEX *bc*₁. www.life.uiuc.edu/crofts/bc-complex_site/

86. PEREIRA, M.M., Santana, M. and Teixeira, M. 2001. A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1505: 185-208.
87. van der OOST, J., de Boer, A.P.N., de Gier, J.W.L., Zumft, W.G., Stouthamer, A.H. and van Spanning, R.J.M. 1994. The heme-copper oxidase family consists of three distinct types of terminal oxidases and is related to nitric oxide reductase. *FEMS Microbiol. Lett.* 121: 1-10.
88. MUSSER, S.M., Stowell, M.H.B. and Chan, S.I. 1993. Comparison of ubiquinol and cytochrome *c* terminal oxidases. An alternative view. *FEBS Lett.* 1993. 327: 131-136.
89. SOULIMANE, T., Buse, G., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R. and Than, M.E. 2000. Structure and mechanism of the aberrant ba_3 -cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* 19: 1766-1776.
90. PITCHER, R.S., Brittain, T. and Watmough, N.J. 2002. Cytochrome *ccb₃* and bacterial microaerobic metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 663-658
91. WINSTEDT, L., Yoshida, K.-I., Fujita, Y. and von Wachtenfeldt, C. 1998. Cytochrome *bd* biosynthesis in *Bacillus subtilis*: Characterization of the *cydABCD* operon. *J. Bacteriol.* 180: 6571-6580.
92. WAY, S.S., Sallustro, S., Magliozzo, R.S. and Goldberg, M.B. 1999. Impact of either elevated or decreased levels of cytochrome *bd* expression on *Shigella flexneri* virulence. *J. Bacteriol.* 181: 1229-1237.
93. SAKAMOTO, J., Koga, E., Mizuta, T., Sato, C., Noguchi, S. and Sone, N. 1999. Gene structure and quinol oxidase activity of a cytochrome *bd*-type oxidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1411: 147-158.
94. KUSUMOTO, K., Sakiyama, M., Sakamoto, J., Noguchi, S. and Sone, N. 2000. Menaquinol oxidase activity and primary structure of Cytochrome *bd* from the aminoacid fermenting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 173: 390-397.
95. OELZE, J. 2000. Respiratory protection of nitrogenase in *Azobacter* species: is a widely held hypothesis supported by experimental evidence?. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 321-333.
96. SMITH, M.A., Finel, M., Korolik, V. and Mendz, G.L. 2000. Characteristics of the aerobic respiratory chains of the microaerophiles *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Arch. Microbiol.* 174: 1-10.
97. KANA, B.D., Weinstein, E.A., Avarbock, D., Dawes, S.S., Rubin, H. and Mizrahi, V. 2001. Characterization of the *cydAB*-encoded cytochrome *bd* oxidase from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 183: 7076-7086.
98. LEMOS, R.S., Gomes, C.M., Santana, M., Legall, J., Xavier, A.V. and Teixeira, M. 2001. The 'strict' anaerobic *Desulfovibrio gigas* contains a membrane-bound oxygen-reducing respiratory chain. *FEBS Lett.* 496: 40-43.

99. SCHNEIDER, B.S., Vermaas, W.F. and Rögner, M. 2002. Electron transport routes in whole cells of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803: the role of the cytochrome *bc_L*-type oxidase. *Biochem.* 41: 3422-3429.
100. DEGLI Esposti, M. 1998. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim Biophys Acta.* 1364: 222-235.
101. MIYOSHI, H. 1998. Structure-activity relationship of some complex I inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 1364: 236-244.
102. LÜMMEN, P. 1998. Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. *Biochim Biophys Acta.* 1364: 287-296.
103. KURKI, S., Zickermann, V., Kervinen, M., Hassinene, I. and Finel, M. 2000. Mutagenesis of three conserved Glu residues in a bacterial homologue of the ND1 subunit of complex I affects ubiquinone reduction but not inhibition by dicyclohexylcarbodiimide. *Biochem.* 39: 13496-13502.
104. YAGI, T. 1990. Inhibition by capsaicin of NADH-quinone oxidoreductase is correlated with the presence of energy-coupling site 1 in various organisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 281: 305-311.
105. KONISHI, K. and Tanaka, T. 1999. Inhibitory effects of tannins on the NADH dehydrogenase activity of bovine heart mitochondrial complex I. *Biol. Pharm. Bull.* 22: 240-243.
106. SCHULER, F., Yano, T., Di Bernardo, S., Yagi, T., Yankovskaya, V., Singer, T.P. and Casida, J.E. 1999. NADH-quinone oxidoreductase: PSST subunit couples electron transfer from iron-sulfur cluster N2 to quinone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 4149-153.
107. YU, E.K.C. and DeVoe, I.W. 1980. Terminal branching of the respiratory electron transport chain in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* 142: 879-887.
108. KENIMER, E. and Lapp, D.F. 1978. Effects of selected inhibitors on electron transport in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 134: 537-545.
109. HAYASHI, M., Hasegawa, K., Oguni, Y. and Unemoto, T. 1990. Characterization of FMN-dependent NADH-quinone reductase induced by menadione in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1035: 230-236.
110. KODER, R.L. and Miller, A.F. 1998. Steady-state kinetic mechanism, stereospecificity substrate and inhibitor specificity of *Enterobacter cloacae* nitroreductase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1387: 395-405.
111. KNOOK, D.L. and Planta, R.J. 1971. Function of ubiquinone in electron transport from reduced nicotinamide adenine dinucleotide to nitrate and oxygen in *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* 105: 483-488.
112. ERICKSON, S.K. and Parker, G.L. 1969. The electron-transport system of *Micrococcus lutea* (*Sarcina lutea*). *Biochim. Biophys. Acta.* 180: 56-62.

113. KIM, Y.J., Song, K-B. and Rhee, S-K. 1995. A novel aerobic respiratory chain-linked NADH oxidase system in *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 117: 5176-5178.
114. BARQUERA, B., Garcia-Horsman, A. and Escamilla, J.E. 1991. An alternative non-cytochrome containing branch in the respiratory system of free living *Rhizobium phaseoli*. Arch microbiol. 155: 428-435.
115. BERMUDEZ, R., Dagger, F., D'Aquino, J.A, Benaim, G. and Dawidowicz, K. 1997. Characterization of mitochondrial electron-transfer in *Leishmania mexicana*. Mol. Biochem. Parasitol. 90: 43-54.
116. SREERAMULU, K., Schmidt, C.L., Schäfer, G. and Anemüller, S. 1998. Studies of the electron transport chain of the euryarcheon *Halobacterium salinarum*: indications for a type II NADH dehydrogenase and a complex III analog. J. Bioenerg. Biomembr. 30: 443-453.
117. COOK, S.A. and Shiemke, A.K. 2002. Evidence that a type-2 NADH: quinone oxidoreductase mediates electron transfer to particulate methane monooxygenase in *Methylococcus capsulatus*. Arch. Biochem. Biophys. 398: 32-40.
118. HAYASHI, M. and Unemoto, T. 1984. Characterization of the Na⁺-dependent respiratory chain NADH: quinone oxidoreductase of the marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, in relation to the primary Na⁺-pump. Biochim. Biophys. Acta. 767: 470-478.
119. SMIRNOVA I A, Hägerhäll, Konstantinov A A, Hederstedt L. 1995. HQNO interaction with cytochrome *b* in succinate: menaquinone oxidoreductase from *Bacillus subtilis*. FEBS Letters. 359: 23-26.
120. MIYADERA, H., Shiomi, K., Ui, H., Yamaguchi, Y., Masuna, R., Tomoda, H., Miyoshi, H., Osanai, A., Kita, K. and Omura, S. 2003. Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 473-477.
121. YANKOVSKAYA, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C. Miyoshi, H., Léger, Ch., Byrne, B. Cecchini, G. and Iwata, S. 2003. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. Science. 299: 700-704.
122. HEDERSTEDT, L. 2002. Succinate: quinone oxidoreductase in the bacteria *Paracoccus denitrificans* and *Bacillus subtilis*. Biochim. Biophys. Acta. 1553: 74-83.
123. MATSSON, M. and Hederstedt, L. 2001. The carboxin-binding site on *Paracoccus denitrificans* succinate: ubiquinone reductase identified by mutations. J. Bioenerg. Biomembr. 33: 99-105.
124. MATSSON, M. Ackrell, B.A., Cochran, B. and Hederstedt, L. 2001. Carboxin resistance in *Paracoccus denitrificans* conferred by a mutation in the membrane-anchor domain of succinate: ubiquinone reductase. Arch. Microbiol. 170: 27-37.

125. HÄGERHÄLL, C., Fridén, H., Aasa, R. and Hederstedt, L. 1995. Trans-membrane topology and axial ligands in the cytochrome *b* subunit of *Bacillus subtilis* succinate: menaquinone oxidoreductase. *Biochem.* 34: 11080-11089.
126. CECCHINI, G., Schröder, I., Gunsalus, R.P. and Maklashima, E. 2002. Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553: 140-157.
127. SURAVERATUM, N., Krungkrai, S.R., Leangaramgul, P., Prapunwattana, P. and Krungkrai, J. 2000. Purification and characterization of *Plasmodium falciparum* succinate dehydrogenase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105: 215-222.
128. KITA, K., Hirawake, H., Miyadera, H., Amino, H. and Takeo, S. 2002. Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553: 123-139.
129. LEMIRE, B.D. and Oyedotun, K.S. 2002. The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate: ubiquinone oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553: 102-116.
130. ARMSON, A., Grubb, W.B. and Mendis, H.W. 1995. The effect of electron transport (ET) inhibitors and thiabendazole on the fumarate reductase (FR) and succinate dehydrogenase (SDH) of *Strongyloides ratti* infective (L3) larvae. *Internat. J. Parasitol.* 25: 261-263.
131. JURTSCHUK, P., May, A.K., Pope, L.M. and Aston, P.R. 1969. Comparative studies on succinate and terminal oxidase activity in microbial and mammalian electron-transport systems. *Can. J. Microbiol.* 15: 797-807.
132. MOLL, R. and Schäfer, G. 1991. Purification and characterisation of an archaebacterial succinate dehydrogenase complex from the plasma membrane of the thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur. J. Biochem.* 201: 593-600.
133. SCHIRAWSKI, J. and Uden, G. 1998. Menaquinone dependent succinate dehydrogenase of bacteria catalyzes reversed electron transport driven by the proton potential. *Eur J. Biochem* 257: 210-215.
134. von JAGOW, G. and Link, T.A. 1986. Use of specific inhibitors on the mitochondrial *bc₁* complex. *Methods Enzymol.* 126: 253-271.
135. MEINHARDT, S. W. And A. R. Crofts. 1982. The site and mechanism of action of myxothiazol as an inhibitor of electron transfer in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *FEBS Lett.* 149: 217-222.
136. von JAGOW, G., Ljungdahl, P.O., Graf, P., Ohnishi, T. and Trumpower, B.L. 1984. An inhibitor of mitochondrial respiration which binds to cytochrome *b* and displaces quinone from the iron-sulfur protein of the cytochrome *bc₁* complex. *J. Biol. Chem.* 259: 6318-6326.
137. CROFTS, A.R., Hong, S., Ugulava, N., Barquera, B., Gennis, R., Guergova-Kuras, M. and Berry, E.A. 1999. Pathways for proton release during ubihydroquinone oxidation by the *bc₁* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 10021-10026.

138. BOWYER, J.R., Edwards, C.A., Ohnishi, T. and Trumpower, B.L. 1982. An analogue of ubiquinone which inhibits respiration by binding to the iron-sulfur protein of the cytochrome *b-c₁* segment of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 257: 8321-8330.
139. YANG, F-D., YU, L. and Yu, Ch-A. 1989. The nature of the inhibition of 4,7-Dioxobenzothiazole derivatives on mitochondrial ubiquinol-cytochrome *c* reductase. *J. Biol Chem.* 264: 891-898.
140. ZHANG, L., Tai, Ch-H., Yu, L. and Yu, Ch-A. 2000. pH-induced intramolecular electron transfer between the iron-sulfur protein and cytochrome *c₁* in bovine cytochrome *bc₁* complex. *J. Biol. Chem.* 275: 7656-7661.
141. SHINKAREV, V.P., Kolling, D.R., Miller, T.J. and Crofts, A.R. 2002. Modulation of the midpoint potential of the [2Fe-2S] Rieske iron sulfur center by Q_o occupants in the *bc₁* complex. *Biochem.* 41: 14372-13482.
142. SAMOILOVA, R. I., Kolling, D.R., Uzawa, T., Iwasaki, T., Crofts, A.R. and Dikanov, S.A. 2002. The interaction of the Rieske iron-sulfur with occupants of the Q_o-site of the *bc₁* complex, probed by electron spin echo envelope modulation. *J. Biol. Chem.* 277: 4605-4608.
143. GENNIS, R.B., Barquera, B., Hacker, B., Van Doren, S.R., Arnaud, S., Crofts, A.R., Davidson, E., Gray, K.A. and Daldal, F. 1993. The *bc₁* complex of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bioenerg. Biomemb.* 25: 195-209.
144. DARROUZE, E., Valkova-Valchanova, M. and Daldal, F. 2002. The [2Fe-2S] cluster E_m as an indicator of the iron sulfur subunit position in the ubihydroquinone oxidation site of the cytochrome *bc₁* complex. *J. Biol. Chem.* 277: 3464-3470.
145. DARROUZE, E., Valkova-Valchanova, M., Mosser, C.C., Dutton, P.L. and Daldal, F. 2000. Uncovering the [2Fe-2S] domain movement in cytochrome *bc₁* and its implications for energy conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 4567-4572.
146. SHARP R.E., Palmitessa, A., Gibney, B.R., White, J.L., Moser, C.C., Daldal, F. and Dutton, P.L. 1999. Ubiquinone binding capacity of the *Rhodobacter capsulatus* cytochrome *bc₁* complex: effect of diphenylamine, a weak binding QO site inhibitor. *Biochem.* 38: 3440-3446.
147. RICHARDSON, D.J. , D. J. Kelly, J. B. Jackson, S. J. Ferguson, and K. Alef. 1986. Inhibitory effects of myxothiazol and 2-n-heptil-4-hidroxi-quinoline-N-oxide on the auxiliary electron transport pathways of *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.* 146: 159-165.
148. BRUGNA, M., Rodgers, S., Schricker, A., Montoya, G., Kazmeier, M., Nitschke, W. and Sinning, I. 2000. A spectroscopic method for observing the domain movement of the Rieske iron-sulfur protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 2069-2074.
149. ASANO, A. and Brodie A.F. 1964. Oxidative phosphorylation in fractionated bacterial systems. XIV. Respiratory chains of *Mycobacterium phlei*. *J. Biol. Chem.* 239: 4280-4291.

150. COHEN, N.S. and Brodie, A.F. 1975. Multiple forms of Cytochrome *b* in *Mycobacterium phlei*: kinetics of reduction. J. Bacteriol. 123: 162-173.
151. BISSCHOP, A., Boonstra, J., Sips, H.J. and Konings, W.N. 1975. Respiratory chain linked ferricyanide reduction drive active transport in membrane vesicles from *Bacillus subtilis*. FEBS Lett. 60: 11-16.
152. HEDERSTEDT, L. 1980. Cytochrome *b* reducible by succinate in an isolated succinate dehydrogenase-cytochrome *b* complex from *Bacillus subtilis* membranes. J. Bacteriol. 144: 933-940.
153. KRÖGER, A., Dadák, V., Klingerberg, M. and Diemer, F. 1971. On the role of quinones in bacterial electron transport. Differential roles of ubiquinone and menaquinone in *Proteus rettgeri*. Eur. J. Biochem. 21: 322-333.
154. VIGNAIS, P.M., Henry, M-F., Sim, E. and Kell, D.B. 1981. The electron transport system and hydrogenase of *Paracoccus denitrificans*. Current topics in Bioenergetics. 12: 115-140.
155. KRÖGER, A. and Innerhofer, A. 1976. The function of the *b* cytochrome in the electron transport from formate to fumarate of *Vibrio succinogenes*. Eur. J. Biochem. 69: 497-506.
156. MOUNTFORT, D.O. and Robertson, A.M. 1977. The role of menaquinone and *b*-type cytochrome in anaerobic reduction of fumarate by NADH in membrane preparations from *Bacteroides ruminicola* strain B14. J. Gen. Microbiol. 100: 309-317.
157. HARRIS, M.A. and Reddy, C.A. 1977. Hydrogenase activity and the H₂-fumarate electron transport system in *Bacteroides fragilis*. J. Bacteriol. 131: 922-928.
158. ARTZATBANOV, V.Y. and Ostrovsky, D.N. 1990. The distribution of electron flow in the branched respiratory chain of *Micrococcus luteus*. Biochem. J. 266: 481-486.
159. O'BRIAN, M.R. and Maier, R.J. 1985. Role of ubiquinone in hydrogen-dependent electron transport in *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 161: 775-777.
160. O'BRIAN, M.R. and Maier, R.J. 1982. Electron transport involved in hydrogen-oxidation in free-living *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 152: 422-430.
161. PODZUWEIT, H-G., Arp, D.J., Schlegel, H.G. and Schneider, K. 1986. Investigation of the H₂-oxidizing activities of *Alcaligenes eutrophus* H16 membranes with artificial electron acceptors, respiratory inhibitors and redox-spectroscopic procedures. Biochimie. 68: 103-111.
162. PODZUWEIT, H-G. and Arp, D.J. 1987. Evidence for a branched respiratory system with two cytochrome oxidases in autotrophically grown *Alcaligenes latus*. Arch. Microbiol. 146: 332-337.
163. WONG, T-Y. and Maier, R.J. 1984. hydrogen-oxidizing electron transport components in nitrogen-fixing *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 159: 348-352.

164. IWASAKI, T., Matsuura, K. and Oshima, T. 1995. Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. I. The archaeal terminal oxidase supercomplex is a functional of respiratory complexes III and IV no *c*-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* 270: 30881-30892.
165. ALEXANDRE, G., Greer, S.E. and Zhulin, I.B. 2000. Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 182: 6042-6048
166. GARCÍA-HORSMAN, J.A., Barquera, B., González-Halphen, D. and Escamilla, J.E. 1991. Purification and characterization of two-subunit cytochrome *aa*₃ from *Bacillus cereus*. *Microbiol.* 5: 197-205.
167. GARCÍA-HORSMAN, J.A., Barquera, B. and Escamilla, J.E. 1991. Two-different *aa*₃-type cytochromes can be purified from the bacterium *Bacillus cereus*. *Eur. J. Biochem.* 199: 761-768.
168. SAKAMOTO, J., Handa, Y. and Sone N. 1997. A novel cytochrome *b(o/a)*₃-type oxidase from *Bacillus stearothermophilus* catalyzes cytochrome *c*-551 oxidation. *J. Biochem.* 122: 764-771.
169. AZARKINA, N., Siletsky, S., Borisov, V., von Wachenfeldt, C., Hederstedt, L. and Konstantinov, A.A. 1999. A cytochrome *bb'*-type quinol oxidase in *Bacillus subtilis* strain 168. *J. Biol. Chem.* 274: 32810-32817.
170. NAGATA, K., Tsukita, S., Tamura, T. and Sone, N. 1996. A *cb*-type cytochrome-*c* oxidase terminates the respiratory chain in *Helicobacter pylori*. *Microbiol.* 142: 1757-1763.
171. JURTSCHUK, P. Jr., Mueller, T.J. and Wong, T.Y. 1981. Isolation and purification of the cytochrome oxidase of *Azotobacter vinelandii*. *Biochim. Biophys. Acta.* 637: 374-382.
172. YANG, T. 1982. Tetramethyl-p-phenylenediamine oxidase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.* 121: 335-341.
173. PITCHER, R.S., Cheesman, M.R. and Watmough, N.J. 2002. Molecular and spectroscopic analysis of the cytochrome *ccb*₃ oxidase from *Pseudomonas stutzeri*. *J. Biol. Chem.* 277: 31474-31483.
174. TAMEGAI, H. and Fukumori, Y. 1994. Purification, and some molecular and enzymatic features of a novel *ccb*-type cytochrome *c* oxidase from microaerobic denitrifier, *Magnetospirillum magnetotacticum*. *FEBS Lett.* 347: 22-26.
175. DALDAL, F., Mandaci, S., Winterstein, C., Myllykallo, H., Duyck, K. and Zannoni, D. 2001. Mobile cytochrome *c*₂ and membrane-anchored cytochrome *c*_γ are both efficient electron donors to the *ccb*₃- and *aa*₃-type cytochrome *c* oxidases during respiratory growth of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 183: 2013-2024.
176. FLORES-ENCARNACION, M., Contreras-Zentella, M., Soto-Urzuá, L., Aguilar, G.R., Baca, B.E. and Escamilla, J.E. 1999. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. Bacteriol.* 181: 6987-6995.

177. MATSUSHITA, K., Ebisuya, H., Ameyama, M. and Adachi, O. 1992. Change of the terminal oxidase from cytochrome *a₁* in shaking cultures to cytochrome *o* in static cultures of *Acetobacter aceti*. J. Bacteriol. 174: 122-129.
178. CHAN, H.T.C. and Anthony, C. 1991. The *o*-type oxidase of the acidophilic methylotroph *Acetobacter methanolicus*. J. Gen. Microbiol. 137: 693-704.
179. ARTZATBANOV, V.Y. and Petrov, V.V. 1990. Branched respiratory chain in aerobically grown *Staphylococcus aureus* – oxidation of ethanol by cells and protoplasts. Arch. Microbiol. 153: 580-584.
180. KRÖGER, A., Winkler, E., Innerhofer, A., Hackenberg, H. and Schägger, H. 1979. The formate dehydrogenase involved in electron transport from formate to fumarate in *Vibrio succinogenes*. Eur. J. Biochem. 94: 465-475.
181. ZHANG, J., Oettmeier, W., Gennis, R.B. and Hellwig, P. 2002. FTIR spectroscopic evidence for the involvement of an acidic residue in quinone binding in cytochrome *bd* from *Escherichia coli*. Biochem. 41:4612-4617.
182. KOLONAY, J.F., Jr. and Maier, R.J. 1997. Formation of pH and potential gradients by the reconstituted *Azotobacter vinelandii* cytochrome *bd* respiratory protection oxidase. J. Bacteriol. 179: 3813-3817.
183. JÜNEMANN, S. and Wrigglesworth, J.M. 1994. Antimycin inhibition of the cytochrome *bd* complex from *Azotobacter vinelandii* indicates the presence of a branched electron transfer pathway for the oxidation of ubiquinone. FEBS Lett. 345: 198-202.
184. MIYOSHI, H., Takegami, K., Sakamoto, K., Mogi, T. and Iwamura, H. 1999. Characterization of the ubiquinol oxidation site in cytochromes *bo* and *bd* from *Escherichia coli* using aurachin C analogues. J. Biochem (Tokyo). 125: 138-142.
185. JÜNEMANN, S., Wrigglesworth, J.M. and Rich, P.R. 1997. Effects of decyl -aurachin D and reverse electron transfer in cytochrome *bd*. Biochem. 36: 9323-9331.
186. MEUNIER, B., Madgwick, S.A., Reil, E., Oettmeier, W. and Rich P.R. 1995. New inhibitors of the quinol oxidation sites of bacterial cytochromes *bo* and *bd*. Biochem. 34: 1076-1083.
187. MUSSER S.M., Stowell, M.H., Rumbley, J.N. and Chan, S.I. 1997. Uncompetitive substrate inhibition and noncompetitive inhibition by 5-n-undecyl-6-hydroxy-4,7-dioxobenzothiazole (UHDBT) and 2-n-nonyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide (NQNO). Is observed for the cytochrome *bo3* complex: implications for a Q(H₂)-loop proton translocation mechanism. Biochem. 36: 894-902.
188. MATSUSHITA, K., Takahashi, K., Takahashi, T., Ameyana, M. and Adachi, O. 1992. Methanol and ethanol oxidase respiratory chains of the methylotrophic acetic acid bacterium, *Acetobacter methanolicus*. J. Biochem. 111: 739-747.
189. GÄRTNER, P. 1991. Characterization of a quinole-oxidase activity in crude extracts of *Thermoplasma acidophilum* and isolation an 18-kDa cytochrome. Eur. J. Biochem. 200: 215-222.

190. REYES-PRIETO, A., Ei-Hafidi, M., Moreno-Sanchez, R. and González-Halpen, D. 2002. Characterization of oxidative phosphorylation in the colorless chlorophyte *Polytomella* sp. Its mitochondrial respiratory chain lacks a plant-like alternative oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1554: 170-179.
191. AJAYI, W.U., Chaudhuri, M. and Hill, G.C. 2002 Site-directed mutagenesis reveals the essentiality of the conserved residues in the putative diiron active site of the trypanosome alternative oxidase. *J. Biol. Chem.* 277: 8187-8193.
192. MILLENAAR, F.F., Benschop, J.J., Wagner, A.M. and Lambers, H. 1998. The role of the alternative oxidase in stabilizing the in vivo reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase. *Plant Physiol.* 118: 599-607.
193. JOSEPH-HORNE, T., Wood, P.M., Wood, C.K., Moore, A.L., Headrick, J. and Hollomon, D. 1998. Characterization of a Split Respiratory Pathway in the Wheat "Take-all" Fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Biol. Chem.* 273: 11127-11133.
194. BOGDANOV, P., Albasa, I., Sperandeo, N.R., Luna, C. and de Bertorello, M.M. 1996. Antibacterial effect of 2-hydroxy-N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-1, 4-naphthoquinone-4-imine on *Staphylococcus aureus*. *Experientia.* 52: 600-604.
195. MAGER, D.L., Ximenez-Fyvie, L.A, Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. 2003. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J. Clin. Periodontol.* 30: 644-654.
196. SHENG, W.S., Hsueh, P.R., Hung, C.C., Teng, L.J., Chen, Y.C. and Luh, K.T. 2001. Clinical features of patients with invasive *Eikenella corrodens* infections and microbiological characteristic of the causative. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20: 231-236.
197. JARAMILLO L., R.D., Barraza A., B. and Polo B., A. 1999. *Eikenella corrodens*: Un modelo biológico de interés para la investigación clínica, biomédica y básica. *Biociencias.* 2: 25-28.
198. CHEN, C.K.C. and Wilson, M.E. 1992. *Eikenella corrodens* in human oral and non-oral infections: a review. *J. Periodontol.* 63: 941-953.
199. JACKSON, F.L. and Goodman, Y.E. 1972. Transfer of the facultatively anaerobic organism *Bacteroides corrodens* Eiken, to a new genus, *Eikenella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 22: 73-77.
200. JACKSON, F.L. and Goodman, Y.E. 1978. *Bacteroides ureolyticus*, a new species to accommodate strains previously identified as "*Bacteroides corrodens*, anaerobic." *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28: 197-200.
201. VILLAR, M.T., Hirschberg, R.L. and Schaefer, M.R. 2001. Role of the *Eikenella corrodens* pilA locus in pilus function and phase variation. *J. Bacteriol.* 183: 55-62.
202. YUMOTO, H., Azakami, H., Nakae, H., Matsuo, T. and Ebisu, S. 1996. Cloning, sequencing and expression of an *Eikenella corrodens* gene encoding a component protein of the lectin-like adhesin complex. *Gene.* 183: 115-121.

203. TUFANO, M.A., Sommesse, L. and Galdiero, F. 1986. Some biological activities of *Eikenella corrodens* major outer membrane proteins. Eur. J. Epidemiol. 2: 305-311.
204. PROGULSKE, A., Mishell, R., Trummel, C. and Holt, S.C. 1984. Biological activities of *Eikenella corrodens* outer membrane and lipopolysaccharide. Infect. Immun. 43:178-182.
205. YOUNG, K.A, Allaker, R.P., Hardie, J. M. and Whiley, R.A. 1996. Interactions between *Eikenella corrodens* and *Streptococcus milleri*-group organisms: possible mechanisms of pathogenicity in mixed infections. Antonie van Leeuwenhoek. 69: 371-373.
206. CHEN, C., Ashimoto, A. 1996. Clonal diversity of oral *Eikenella corrodens* within individual subjects by arbitrarily primed PCR. J. Clin. Microbiol. 34: 1837-1839.
207. EBISU, S., Nakae, H., Fukuhara, H. and Okada, H. 1992. The mechanisms of *Eikenella corrodens* aggregation by salivary glycoprotein and the effect of the glycoprotein on oral bacterial aggregation. J Periodont Res. 27: 615 - 622.
208. SELBY, T., Allaker, R.P. and Dymock, D. 2003. Characterization and expression of adjacent proline iminopeptidase and aspartase genes from *Eikenella corrodens*. Oral Microbiol. Immunol. 18: 256-259.
209. GULLY, N.J. and Rogers, A.H. 2001. The characterization of a (nutritionally important) proline iminopeptidase from *Eikenella corrodens*. Oral Microbiol. Immunol. 16:370-375.
210. GULLY, N.J. and Rogers, A.H. 1996. Energy production and peptidase activity in *Eikenella corrodens*. FEMS Microbiol Letts. 139: 209-213.
211. GULLY, N.J. and Rogers, A.H. 1995. Some observations on the nutritional requirements of *Eikenella corrodens* ATCC 23834^T grown in continuous culture. Oral Microbiol Immunol. 10: 115-118.
212. ALLAKER, R.P., Young, K.A. and Hardie, J.M. 1994. Production of hydrolytic enzymes by oral isolates of *Eikenella corrodens*. FEMS Microbiol. Lett. 123: 69-74.
213. PARKHILL, J., Achtman, M., James, K. D., Bentley, S. D., Churcher, C. et al. 2000. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. Nature (London), 404: 502-506.
214. ROE, B., Song, L., Lin, S.P., Yuan, X.L., Clifton, S., Ducey, T., Lewis, L. and Dyer, D. 2000. *Neisseria gonorrhoeae* strain FA 1090 genome sequencing data [online]. University of Oklahoma. Available from <http://www.ftp.genome.ou.edu/gono.html> [Revisado 5 de Julio de 2003; citado el 5 de Agosto de 2003].
215. HOLLÄNDER, R. and Mannhein, W. 1975. Characterization of hemophilic and related bacteria by their respiratory quinone and cytochromes. Int. J. Syst. Bacteriol. 25: 102-107.
216. PROGULSKE, A. and Holt, S.C. 1987. Studies on the growth of *Eikenella corrodens* strain 23834. Oral Microbiol Immunol. 2: 2-9.

217. MARKWELL, M.A.K, Hass, S.M., Tolbert, N.E. and Bieber, L.L. 1981. Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Methods Enzymol.* 72: 296-303.
218. ESCAMILLA, J.E., Ramírez, R., Del Arenal, I.P., Zarzoza, G. and Linares, V. 1987. Expresion of cytochrome oxidases in *Bacillus cereus*: effects of oxigen tension and carbon source. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3549-3555.
219. KUČERA, I. 2003. Passive penetration of nitrate through the plasme membrane of *Paracoccus denitrificans* and its potentiation by the lipophilic tetraphenylposphonium cation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1557: 119-124.
220. POOLE, R.K., Salmon, I. and Change, B. 1994. The high-spin cytochrome *o'* component of the cytochrome *bo*-type quinol oxidase in membranes from *Escherichia coli*: formation of the primary oxygenated species at low temperature is characterized by a slow "on" rate and low dissociation constant. *Microbiology (Reading, England).* 140: 1027-1934.
221. SCHÄGGGER, H. and von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
222. MIRANDA-RIOS, J., Morena, C., Taboada, H., Dávalos, A., Encarnación, S., Mora, J. and Soberón, M. 1997. Expression of thiamin biosynthetic genes (*thiCOGE*) and production of symbiotic terminal oxidase *cbb₃* in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 179: 6887-6893.
223. DEL ARENAL, I.P., Contreras, M.L., Svlateorova, B.B., Rangel, P., Lledías, F.L., Dávila, J.R. and Escamilla J.E. 1997. Haem *O* and a putative cytochrome *bo* in a mutant of *Bacillus cereus* impaired in the synthesis of haem A. *Arch Microbiol.* 167: 24-31.
224. PUUSTINEN, A. and Wikström, M. 1991. The heme groups of cytochrome *o* from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 6122-6126.
225. LÜBBEN, M. and Morand, K. 1994. Novel prenylated hemes and cofactors of cytochrome oxidases. *Archaea* have modified hemes A and O. *J. Biol. Chem.* 269: 21473-21479.
226. van der OOST, J., von Wachenfeld, C., Hederstedt, L., and Saraste, M. (1991). *Bacillus subtilis* cytochrome oxidase mutants: biochemical analysis and genetic evidence for two *aa₃*-type oxidases. *Mol. Microbiol.* 5: 2063-2072.
227. CONTRERAS, M.L., Escamilla, J.E., Del Arenal, I.P., Dávila, J.R., D'mello, R. and Poole, R.K. (1999). An unusual cytochrome *o'*-type cytochrome *c* oxidase in a *Bacillus cereus* cytochrome *a₃* mutant has a very high affinity for oxygen. *Microbiol.* 145: 1563-1573.
228. THOMAS, E.P., Ryan, D. and Levin, W. 1976. An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of citochrome P-450 on the sodium sulfate pollacrylamide gels. *Anal. Bicohem.* 75: 168-176.

229. ESCAMILLA, J.E., Barquera, B., Ramírez, R., Garcia-Horsman, A. and Del Arenal, P. 1988. Role of menaquinone in inactivation and activation of the *Bacillus cereus* forespore respiratory system. *J. Bacteriol.* 170: 5908-5912.
230. LENAZ, G. 1998. Quinone specificity of complex I. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364: 207-221.
231. SAKAMOTO, K., Miyoshi, H., Ohshima, M., Kuwabara, K., Kano, K., Akagi, T., Mogi, T. and Iwamura H. 1998. Role of the isoprenyl tail of ubiquinone in reaction with respiratory enzymes: studies with bovine heart mitochondrial complex I and *Escherichia coli* bo-type ubiquinol oxidase. *Biochem.* 1998 37:15106-15113.
232. MESSNER, K.R. and Imlay, J.A. 1999. The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274: 10119-10128.
233. SØBALLE, B. and Poole, R.K. 2000. Ubiquinone limits stress in *Escherichia coli*. *Microbiol. G.B.* 125: 787-796.
234. Contreras-Zentella, M., Mendoza, G., Membrillo-Hernandez, J. and Escamilla JE. 2003. A novel double heme substitution produces a functional bo3 variant of the quinol oxidase aa₃ of *Bacillus cereus*. Purification and partial characterization. *J Biol Chem.* 278:31473-31478.
235. WINTER, D.B. and Morse, S.A. 1975. Physiology and metabolism of pathogenic *Neisseria*: partial characterization of the respiratory chain of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 123: 631-636.
236. NAKANE, H., Iwaki, M., Satoh, K. and Itoh, S. 1991. Artificial quinones replaces the function of quinone electron acceptor (Q_A) in the isolated D1-D2-cytochrome b₅₅₉ photosystem II reaction center complex. *Plant Cell Physiol.* 32 (8): 1165-1171.
237. ZHU, Q.S. and Beattie, D.S. 1988. The interaction of quinone analogues with wild-type and ubiquinone-deficient yeast mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta.* 934: 303-313.
238. YU, Ch-A., Gu, L., Lin, Y. and Yu, L. 1985. Effect of alkyl side chain variation on the electron-transfer activity of ubiquinone derivatives. *Biochem.* 24: 3897-3902.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN