



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO b_6c DE *Bacillus subtilis* POR
MEDIO DE LA SOBREENPRESIÓN DEL EXTREMO SOLUBLE DEL
CITOCROMO C_{550}**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ANA PAULA GARCÍA GARCÍA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOS MADRID
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO VELASCO GARCÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO b_6c DE *Bacillus subtilis* POR
MEDIO DE LA SOBREENPRESIÓN DEL EXTREMO SOLUBLE DEL
CITOCROMO C_{550}**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ANA PAULA GARCÍA GARCÍA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOS MADRID
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO VELASCO GARCÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 09 de septiembre de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GARCÍA GARCÍA ANA PAULA**, con número de cuenta 406012210, con la tesis titulada "**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO b6c DE *Bacillus subtilis* POR MEDIO DE LA SOBREENPRESIÓN DEL EXTREMO SOLUBLE DEL CITOCROMO c550.**", realizada bajo la dirección de la **DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOS MADRID**:

Presidente: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
Vocal: DR. HUGO VIRGILIO PERALES VELA
Secretario: DR. ROBERTO VELASCO GARCÍA
Suplente: DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO
Suplente: DRA. MARTHA OFELIA SALCEDO ÁLVAREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de noviembre de 2013.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

- Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- A los apoyos recibidos por la beca CONACyT con número de becario 254409, apoyo al Proyecto de Investigación DGAPA-PAPIIT 1N221611, apoyo al Proyecto de Investigación CONACyT 102102 y la beca COMECyT con número de registro 13BTM2356.
- A los miembros de mi Comité Tutor: Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid (Tutora Principal), Dr. Roberto Velasco García y al Dr. José de Jesús García Trejo, por guiarme y aconsejarme durante todo este tiempo.

A título personal

Al Dr. Claes von Wachenfeldt por la donación de la cepa *B. subtilis* LUW196.

Al Dr. Carlos Gómez Lojero y la M. en C. Lourdes Elizabeth Leyva Castillo por la miles donaciones de la FNR de *Fremyella diplosiphon*.

Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman por el préstamo de BAME y por ayudarme a resolver problemas difícilísimos de proteasas.

A la Srita. Lilia Judith Espinosa Sánchez, al Dr. Ernesto Armando Rodríguez Reyes y la Srita. Lilia Jiménez Solís, por su gran disposición y buen trato a pesar de las complicaciones causadas.

A la Srita. Georgina García Morán (Gina) por recibirme siempre, incluso fuera de su horario de trabajo, y ayudarme tanto en todos los trámites administrativos, aún cuando no estuviera presente “el guapo” ☺.

A mi tutora, la Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid por la paciencia, dedicación y confianza. Por instruirme cada día y seguir apoyándome a pesar de mis errores. Por las grandes lecciones de vida, buenas y malas, que me ha tocado aprender a su lado, y porque aún sigo aprendiendo de ella.

A la M. en C. Tecilli Cabellos Avelar por sacarme de apuros, sobre todo en las largas jornadas de trabajo con metodologías de biología molecular☺.

A mis compañeros, que me enseñan cada día desde que los conozco: Led por su gran paciencia (que a veces llegaba a alterarme), Gerardo por enseñarme a querer y ser tolerante, Viri por su fortaleza para seguir adelante, Obed por demostrarme el valor de siempre estar unidos, Laura por enseñarme a tratar a las personas, Enrique por hacerme ver que la empatía es importante, Dulce por ser TAN honesta y directa siempre, y Ale por reflejar su enorme dedicación día tras día. Gracias chicos, por su apoyo y amistad sincera.

A Cuchis y Joyce mis amigas, por sacarme del laboratorio de vez en cuando y recordarme que hay un mundo afuera esperando por mi☺. Porque juntas hemos aprendido a lidiar con diferentes alegrías y tristezas en el camino. Gracias niñas por estar en mi vida.

Y sobre todo a mi hermana que (aunque ya no la veo tan seguido porque la explotan en su trabajo), cuando se entera de mis logros siempre se enorgullece, aunque la mayoría de las veces no sepa de que le hablo ☺. Gracias fea, por ayudarme a estudiar aunque te duermas a la mitad, y aunque a veces me hagas enojar mucho se que puedo contar contigo siempre (y con tu ropa jajaja). Y porque aunque no me lo digas, se que me amas por ser la mejor hermana del mundo ☺. Gracias por alegrarme la vida.

Dedicatoria

A las dos personas que siempre he admirado, mis padres. Quienes me dieron las herramientas para salir adelante y poder valerme por mi misma. Por ayudarme a encontrar mi camino y siempre respetar y apoyar cada decisión, buena ó mala, que he tomado. Por esta vida, que con su ayuda y hasta el momento, ha sido satisfactoria y llena de alegrías.

A mi papirito, quien nos brindó la oportunidad a mi hermana y a mí de estudiar una carrera. Quien día tras día me comparte un mar de conocimientos, y por que no importa cuanto estudie, me sigue sorprendiendo. Quien con su fuerte carácter forjó el mío. Gracias por hacerme fuerte papi y por enseñarme a trabajar duro para alcanzar lo que quiero. Por iniciarme a ser tu chalán y enseñarme ahora a construir mi propia casa 😊.

A mi mami, por sacrificar tantas cosas para sacarnos adelante a mi hermana y a mí. Por que siempre me haz soportado sobre todo en mis momentos de histeria y desesperación. Porque me escuchas y me guías para resolver todos los problemas, por muy pequeños que sean. Gracias mami por la grandísima paciencia que me haz tenido, y en lugar de desesperarte enfocar mi hiperactividad para lograr cosa grandes. Por ser mi corazón y mi cordura.

Índice general

	Pág.
Lista de Figuras.....	II
Lista de Tablas.....	V
Lista de Abreviaturas.....	VI
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
1. La cadena respiratoria de <i>B. subtilis</i>	4
1.1 NADH deshidrogenasa tipo 2 (NADH-DH2). Una NADH.....	4
1.2 Succinato deshidrogenasa (SDH).....	5
1.3 Complejo <i>b₆c</i>	5
1.4 Citocromo <i>c</i> oxidasa (tipo <i>caa₃</i>).....	5
1.5 Oxidasas alternas.....	6
2. Complejos bc.....	7
2.1 Ciclo Q.....	9
2.2 Quinonas.....	10
3. El citocromo <i>c₅₅₀</i> de <i>Bacillus subtilis</i>	11
3.1 El citocromo <i>c₅₅₀</i> de <i>B. subtilis</i> vs citocromo <i>c</i> mitocondrial.....	12
4. Antecedentes.....	14
Objetivo.....	19
Materiales y métodos.....	20
Resultados.....	36
Discusión.....	67
Conclusiones.....	77
Perspectivas.....	78
Apéndice I.....	79
Bibliografía.....	83
Referencias de Internet.....	92

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>B. subtilis</i>	3
Figura 2. Cadena respiratoria de <i>B. subtilis</i>	4
Figura 3. Comparación de las subunidades redox de los complejos <i>bc</i>	8
Figura 4. Ciclo Q.....	10
Figura 5. Estructura de ubiquinonas y menaquinonas.....	11
Figura 6. Hemo <i>c</i> , unión covalente, secuencia CXXCH. Citocromo <i>c</i> ₅₅₀ de <i>B. subtilis</i>	12
Figura 7. Alineamiento de las secuencias y comparación de distribución de cargas del citocromo <i>c</i> de corazón de caballo con el <i>c</i> ₅₅₀ de <i>B. subtilis</i>	13
Figura 8. Potenciales electrostáticos de citocromo <i>c</i> del complejo <i>b</i> ₆ <i>c</i> , citocromo <i>c</i> ₅₅₀ y la oxidasa <i>caa</i> ₃ de <i>B. subtilis</i>	14
Figura 9. Plásmido pHP13.....	17
Figura 10. Esquema de la obtención de <i>B. subtilis</i> pHP13 y <i>B. subtilis</i> pHP13- <i>C</i> ₅₅₀	18
Figura 11. Plásmido pHP13- <i>c</i> ₅₅₀ extraído de <i>B. subtilis</i> 168.....	36
Figura 12. Plásmidos extraídos de <i>E. coli</i> DH5α.....	37
Figura 13. Obtención de competentes de <i>B. subtilis</i> 168 y LUW196.....	38
Figura 14. Clonas LUW196 transformadas con el plásmido pHP13 <i>c</i> ₅₅₀	39
Figura 15. Gel por el método de lisado.....	39
Figura 16. Análisis de clonas pHP13- <i>c</i> ₅₅₀ por digestión y PCR.....	40
Figura 17. Clonas LUW196 transformadas con el plásmido pHP13.....	40
Figura 18. Selección de clonas positivas.....	41
Figura 19. Gel por el método de lisado.....	41
Figura 20. Análisis de clonas pHP13 por digestión y PCR.....	42
Figura 21. Selección de medio para <i>B. subtilis</i> LUW168 pHP13- <i>C</i> ₅₅₀	43
Figura 22. Espectros diferenciales de absorción de las membranas de LUW196 pHP13- <i>C</i> ₅₅₀ en los medios de crecimiento.....	43

Figura 23. Curvas de crecimiento de LUW196, LUW196 pHP13 y LUW196 pHP13- <i>C₅₅₀</i>	44
Figura 24. Células cosechadas de LUW196, LUW196 pHP13 y LUW196 pHP13- <i>C₅₅₀</i>	44
Figura 25. Espectros diferenciales de las membranas obtenidas de las cepas LUW196, LUW196 pHP13 y LUW196 pHP13 <i>C₅₅₀</i>	45
Figura 26. Geles de poliacrilamida SDS. Tripsinización con 100U	46
Figura 27. Espectros diferenciales de absorción. Doble proteólisis con 100U ..	47
Figura 28. Espectros diferenciales de absorción. Doble proteólisis 100/400U ..	48
Figura 29. Gel de poliacrilamida SDS. Liberación del fragmento soluble	48
Figura 30. Espectro diferencial de absorción. Membranas de LUW196 pHP13 <i>C₅₅₀</i>	49
Figura 31. Espectros de absorción. Primera proteólisis con 100U de tripsina ..	50
Figura 32. Perfil cromatográfico, resina DEAE Biogel A	51
Figura 33. Espectros diferenciales de absorción. Fracciones obtenidas	52
Figura 34. Gel de poliacrilamida SDS. Fracciones obtenidas	52
Figura 35. Perfil cromatográfico, resina Sephadex G-50 fina	53
Figura 36. Gel de poliacrilamida SDS. Fracciones obtenidas	54
Figura 37. Fragmento purificado del citocromo <i>C₅₅₀</i> de <i>B. subtilis</i>	54
Figura 38. Espectro diferencial de absorción. Membranas solubilizadas de LUW196 pHP13- <i>C₅₅₀</i> tripsinizadas	55
Figura 39. Espectros de absorción. Naftoquinonas seleccionadas	57
Figura 40. Espectros de absorción. Nuevas naftoquinonas	58
Figura 41. Espectros diferenciales de absorción. Reductores de citocromo <i>c</i> ..	59
Figura 42. Seguimiento de la auto-oxidación del NADPH	60
Figura 43. Actividad de FNR con 5, 15 y 30 μ M de NADPH	60
Figura 44. Reducción de 5, 10 y 15 μ M de quinonas con FNR y NADPH	60
Figura 45. Reducción de 5, 10 y 15 μ M de citocromo <i>c</i> de corazón de caballo con NADPH y FNR	61
Figura 46. Control, reducción química NADPH \rightarrow Q	61

Figura 47. Ensayo NADPH → FNR → Q.....	61
Figura 48. Ensayo NADPH → FNR → Q → Membranas (Complejo b_6c) → cit <i>c</i> de corazón de caballo	63
Figura 49. Control de reducción química NADPH → FNR → Q → cit <i>c</i> de corazón de caballo.....	63
Figura 50. Comparación de reducción de citocromo <i>c</i> mitocondrial y fragmento soluble en presencia de Juglona	64
Figura 51. Comparación de reducción de citocromo <i>c</i> mitocondrial y fragmento soluble en presencia de Menadiona	65
Figura 52. Alineamiento de las secuencias <i>ctaC</i> y <i>c₅₅₀</i>	68
Figura 53. Estructura primaria del citocromo <i>c₅₅₀</i>	69
Figura 54. Alineamiento de las secuencias QcrC y <i>c₅₅₀</i>	70
Figura 55. Medición por el sistema succinato: citocromo <i>c</i> reductasa.....	71
Figura 56. Medición por el sistema FNR: citocromo <i>c</i> reductasa	72
Figura 57. Comparación de los potenciales redox.....	73
Figura 58. Geles de poliacrilamida, 1ª y 2ª dimensión. Tinción con TMBZ.....	79
Figura 59. Geles de poliacrilamida, 1ª y 2ª dimensión. Comparación entre LUW196 pHP13- <i>c₅₅₀</i> y LUW196 pHP13- <i>c₅₅₀</i> tripsinizada. Tinción con TMBZ	79
Figura 60. Geles de poliacrilamida, 1ª y 2ª dimensión. Tinción con Azul de Coomassie	82

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Información de los reactivos utilizados.....	35
Tabla 2. Información de las quinonas utilizadas.....	35
Tabla 3. Comparación de citocromos de membranas LUW196, LUW196 pHP13 y LUW196 pHP13 <i>c</i> ₅₅₀	45
Tabla 4. Contenido de proteína y estequiometria de citocromos de membranas LUW196 pHP13 <i>c</i> ₅₅₀	49
Tabla 5. Contenido de proteína y estequiometria de citocromos de membranas LUW196 pHP13 <i>c</i> ₅₅₀ tripsinizadas.	55
Tabla 6. Rendimiento durante la purificación del dominio soluble del citocromo <i>c</i> ₅₅₀ de <i>B. subtilis</i>	56
Tabla 7. Actividad específica de naftoquinonas seleccionadas	56
Tabla 8. Porcentaje y concentración μM de citocromo <i>c</i> reducido con diferentes reductores.	59
Tabla 9. Velocidad total de reducción. Ensayo NADPH \rightarrow FNR \rightarrow Q menos control de reducción química NADPH \rightarrow Q.	62
Tabla 10. Velocidad total de citocromo <i>c</i> de corazón de caballo reducido por minuto. Ensayo completo Q \rightarrow <i>b</i> ₆ <i>c</i> \rightarrow cit <i>c</i> menos control de reducción química Q \rightarrow cit <i>c</i> y control Q \rightarrow <i>b</i> ₆ <i>c</i>	64
Tabla 11. Comparación de la velocidad de reducción. Citocromo <i>c</i> de corazón de caballo vs fragmento soluble del citocromo <i>c</i> ₅₅₀ de <i>B. subtilis</i> y Juglona.	65
Tabla 12. Comparación de la velocidad de reducción. Citocromo <i>c</i> de corazón de caballo vs fragmento soluble del citocromo <i>c</i> ₅₅₀ de <i>B. subtilis</i> y Menadiona.	66
Tabla 13. Comparación de la velocidad de reducción del fragmento soluble del citocromo <i>c</i> ₅₅₀ de <i>B. subtilis</i> . Juglona vs Menadiona.....	66

Lista de Abreviaturas

AEBSF - 4-(2- Aminoetil) benzenesulfonil fluórido hidrocloreto

BAME – Na-Benzoyl-L-Arginine Methyl Ester

BSA – Albumina sérica de bovino

Cm – Cloranfenicol

CQ – Caldarielaquinona

CO – Monóxido de carbono

DMN – 2,3-Dimetil-1,4-naftoquinona

DQ – Duroquinona

DTT – Ditiotreitól

DDM – Dodecil maltósido

ϵ – Coeficiente de extinción molar

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

Em – Eritromicina

FCN – Ferricianuro

Fe-S – Hierro azufre

Fle – Fleomicina

FQ – Filoquinona

FMN – Flavin mononucleótido

FNR – Ferredoxina NADP⁺ reductasa

JN – Juglona

MD – Menadiona

MDH – Malato deshidrogenasa

MQ – Menaquinona

MM – Medio Mínimo

MSR – Medio Súper rico

ON – Overnight (toda la noche)

PQ – Plastoquinona

PSA – Persulfato de amonio

RQ – Rodoquinona

TCA – Ácido tricloroacético

TCA – Ciclo de ácidos tricarboxílicos

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiamina

Tet – Tetraciclina

TMBZ – Tetrametilbencidina

TPCK – L-1-Tosilamida-2-feniletíl clorometil cetona

Trp – Triptofano

UQ – Ubiquinona

UQH₂ – Ubiquinol

Resumen

Bacillus subtilis es una bacteria aerobia facultativa, Gram positiva de bajo contenido G+C, su amplio estudio la ha convertido en un instrumento para expresar proteínas de interés humano, principalmente para la industria alimenticia y agrícola. Además, se han realizado innumerables estudios para entender su metabolismo energético, específicamente su cadena respiratoria. Su complejo b_6c comparte características de complejos bc_1 y fotosintéticos b_6f , y puede ser considerado como una tercer clase de complejos tipo bc (Yu, et.al., 1995; Yu y Le Brun, 1998). Anteriormente se trató de caracterizar funcionalmente al complejo b_6c , usando diferentes naftoquinonas y el citocromo c de corazón de caballo, obteniendo bajas actividades (menor de 155.49 nmoles citocromo c reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína). Estos valores bajos, posiblemente pudieran deberse a las diferencias estructurales entre el citocromo de caballo y el c_{550} de *B. subtilis*, provocando una interacción no óptima entre la proteína y el complejo b_6c .

Debido a lo anterior, se decidió purificar el fragmento soluble del citocromo c_{550} de *B. subtilis*, con el fin de hacer más específico el ensayo. Se realizó una proteólisis temporal con tripsina de la cepa LUW196 (carente de citocromo c oxidasa) previamente transformada con el gene *cccA* que codifica para el citocromo c_{550} , clonado en el plásmido pHP13. Con este fragmento soluble se realizaron mediciones de actividad con la Ferredoxina: NADP⁺ reductasa (FNR) de *Fremyella diplosiphon*, que se compararon con las obtenidas utilizando el citocromo c de caballo. La mayor velocidad de reducción se obtuvo con la naftoquinona Juglona, tanto con el c_{550} como con el citocromo mitocondrial (2.8 y 6 nmoles cit c red min^{-1} respectivamente). Los potenciales redox de los diferentes componentes son discutidos en este trabajo para entender la transferencia de electrones de este complejo.

Abstract

Bacillus subtilis is a facultative aerobic, Gram-positive low G+C bacterium. Its extensive study has made this bacterium an instrument to express proteins of human interest mainly for food and agriculture industry. Also, many studies to understand their energy metabolism, specifically its respiratory chain have been reported. Its b_6c complex (menaquinol:cytochrome c reductase) shares characteristics of both the bc_1 complexes and the photosynthetic b_6f complexes, and can be viewed as a third group in the classification of bc -type complexes (Yu, et.al., 1995; Yu y Le Brun, 1998). By using different naphthoquinones and horse heart cytochrome c , we obtained low activities for the complex (between 10 and 155.49 nmols cytochrome c min^{-1} mg^{-1} protein). This low activity values could be attributed to differences of surface between the horse heart cytochrome and *B. subtilis* c_{550} that could misdirect the mammalian cytochrome to the surface of the b_6c complex.

We decided to purify the soluble fragment of cytochrome c_{550} from *B. subtilis*, to make a more specific activity assay. A temporal proteolysis with trypsin was performed to the strain LUW196 (lacking cytochrome c oxidase) and transformed with gene *cccA* that codes for cytochrome c_{550} cloned in plasmid pHP13. We measured activities using Ferredoxin: NADP⁺ reductase (FNR) from *Fremyella dyplosiphon*, to reduce several quinones and we compared them to those obtained with horse heart cytochrome c . The highest activity was obtained with the naphthoquinone Juglone, with both the soluble c_{550} and the mitochondrial cytochrome (2.8 y 6 nmols cit c min^{-1} respectively). The redox potentials of the different components are discussed in this work to understand electron transport in this complex.

Introducción

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva que vive principalmente en el suelo y está asociada a fuentes de agua (Fig. 1). Está expuesta a frecuentes cambios de condiciones ambientales, por lo que puede desarrollar un estado fisiológico casi inanimado conocido como endospora, desencadenado por la escasez de alimento y el estrés ambiental (Moreno-Campuzano, 2006). *B. subtilis* es la bacteria mejor caracterizada del grupo de las bacterias Gram positivas. Generalmente respira utilizando O_2 como aceptor final de electrones, pero en condiciones anóxicas puede realizar metabolismo fermentativo (produciendo a partir de piruvato, 2,3- butanodiol, lactato, etanol, acetato y succinato) o respiratorio usando nitrato o nitrito como aceptores finales (Nakano, 1998; Nakano, 1997). Diferentes sustratos son oxidados por deshidrogenasas asociadas a la membrana (como la Succinato: quinona oxidoreductasa, la NADH deshidrogenasas y la Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa independiente de NAD). Estas deshidrogenasas reducen la menaquinona-7 a menaquinol (Sonenshein, *et al.*, 2002). Desde este punto se pueden seguir dos rutas: la ruta de las “Quinol oxidasas”, donde el menaquinol puede ser oxidado por al menos tres quinol oxidasas (tipo aa_3 , tipo bb y tipo bd). La segunda vía, es la ruta de los “citocromos”, donde el menaquinol puede ser oxidado por la citocromo *c* oxidasa (caa_3), vía el complejo menaquinol citocromo *c* oxidoreductasa y citocromos *c* anclados a membrana (Fig. 2) (Azarkina *et al.*, 1999).



Figura 1. *B. subtilis*, izquierda- microscopía electrónica de barrido (tomada de <https://www.morebooks.de/store/es/book/funktionale-charakterisierung-des-yhbdef-operons-aus-bacillus-subtilis/isbn/978-3-639-34105-8>); derecha, endospora indicada con una flecha (Tomada de http://www.allposters.es/-sp/Endospores-in-Bacillus-Subtilis-Bacteria-TEM-Posters_i8990236_.htm).

1. La cadena respiratoria de *B. subtilis*

El conocimiento a nivel molecular de los componentes respiratorios de esta bacteria se ha expandido rápidamente durante los últimos años. Se ha revelado una complejidad importante en estudios bioquímicos y genéticos (von Wachenfeldt y Hederstedt, 1992). A continuación se describirán brevemente los complejos respiratorios.

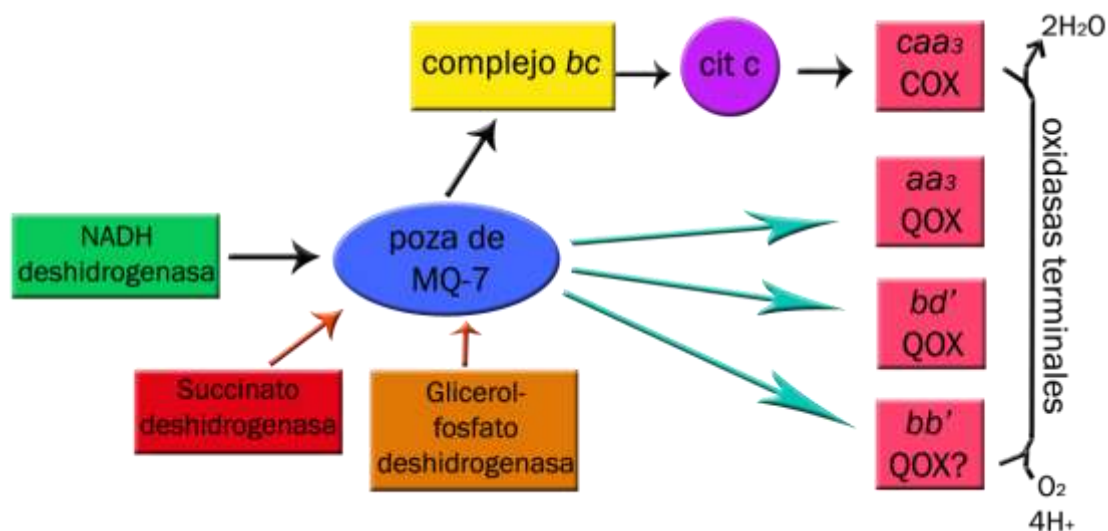


Figura 2. Cadena respiratoria de *B. subtilis*. Ruta "Citocromos" en flechas negras y ruta "Quinol oxidasas" en flechas azules. Modificado de Azarkina *et al.*, 1999.

1.1 NADH deshidrogenasa tipo 2 (NADH-DH₂). Una NADH deshidrogenasa de tipo 2 es la principal reductora de la MQ-7, consiste de un solo polipéptido extrínseco de membrana, de masa molecular predicha de 49 kDa, carente de centros fierro azufre y con un FAD⁺⁺ no covalentemente unido como grupo prostético, muy afín al NADH (Km 60 μ M). Además, no bombea protones a través de la membrana (Bergsma *et al.*, 1982; Yagi, 1993).

1.2 Succinato deshidrogenasa (SDH) ó succinato: quinona oxidoreductasa (codificado por el operón *sdhCAB*), cataliza la oxidación del succinato al fumarato en el ciclo del ácido cítrico y dona los equivalentes reductores a la MQ-7 (Hägerhäll *et al.*, 1992). Está formado por tres subunidades: SdhA, la flavoproteína de 65 kDa que contiene un FAD⁺⁺ unido covalentemente; SdhB, la subunidad de proteína hierro azufre que contiene tres centros Fe-S, un [2Fe-2S], uno [3Fe-4S] y uno [4Fe-4S], respectivamente. La subunidad SdhC citocromo *b*-558 de 23 kDa que contiene dos moléculas protohemo IX (von Wachenfeldt, 1992). Estudios anteriores han demostrado que esta enzima puede funcionar también en dirección opuesta oxidando el Fumarato vía el menaquinol, probablemente reducido por la NADH deshidrogenasa (Schnorpfeil *et al.*, 2001).

1.3 Complejo *b*₆*c* ó menaquinona: citocromo *c* oxido-reductasa, es una proteína integral de membrana (codificada por el operón *qcrABC*) que transfiere los electrones de la MQ-7 a un citocromo *c* (*C*₅₅₀). Su descripción se detallará más adelante (Yu y Le Brun, 1998).

1.4 Citocromo *c* oxidasa (tipo *caa*₃): codificada por el operón *ctaBCDEF*, las letras corresponden a las subunidades II, I, III y IVB respectivamente. La subunidad I contiene las histidinas del centro bimetálico citocromo *a*₃/CuB y el bis-imidazol citocromo hemo *a*, importantes para la translocación de protones. Se expresa durante el crecimiento (fase exponencial) y en presencia de sustratos no fermentables como el succinato, es una típica oxidasa hemo-cobre que bombea protones. Su principal característica es la de poseer un citocromo *c* fusionado a la subunidad II (*ctaC*), razón por la cual es capaz de utilizar TMPD como donador de electrones (Lauraeus *et al.*, 1991).

Muestra dos picos de absorción, a los 605 nm y los 551 nm de longitud de onda. Este último corresponde al citocromo *c* (Azarkina *et al.* 1999; Santana *et al.*, 1992). La subunidad IVB es una proteína pequeña que posee tres cruces transmembranales y un centro de residuos invariables en dos de ellos (Saraste *et al.*, 1991).

1.5 Oxidasas alternas. *B. subtilis* contiene por lo menos tres diferentes oxidasas terminales para la transferencia de electrones al oxígeno molecular (Zamboni y Sauer, 2003). Las principales son 2: la tipo *aa₃* y la tipo *bd*. La quinol oxidasa tipo *aa₃* está codificada por el operón *qoxABCD* que contiene cuatro polipéptidos (QoxA, -B, -C, y -D respectivamente), se expresa en medios ricos y en todos los estados de crecimiento en condiciones bien aireadas. Pertenece a la superfamilia hemo-cobre y transloca dos protones por electrón transferido al oxígeno; además tiene un pico de absorción espectral que se encuentra a los 600 nm (Azarkina *et al.*, 1999; Santana *et al.*, 1992; Zamboni y Sauer, 2003).

La quinol oxidasa tipo *bd* codificada por el operón *cydABCD* no contiene átomos de cobre ni de hierro, los últimos dos genes *cydC* y *cydD* codifican para un posible transportador ABC (Winstedt y von Wachenfeldt, 2000). Contiene dos subunidades integrales de membrana en donde se encuentran tres hemos: *b₅₅₈*, *b₅₉₅* y *d*, los hemos *b₅₉₅* y *d* forman el sitio di-hemo para la reducción del O₂. Esta quinol oxidasa genera una fuerza protón motriz, además es insensible a cianuro (Borisov *et al.*, 2011). Se expresa principalmente en presencia de glucosa o en tensiones bajas de oxígeno y en condiciones aireadas con glucosa limitada, transloca un protón por electrón transferido al oxígeno. En el genoma se identificó a los genes *ythAB*, que posiblemente codifiquen para una segunda quinol oxidasa de tipo *bd*, similar en tamaño a *cydB* y en perfiles hidropáticos (Azarkina *et al.*, 1999; Winstedt *et al.*, 1998; Zamboni y Sauer, 2003).

Análisis anteriores de las membranas aisladas de *Bacillus* utilizando espectros diferenciales con monóxido de carbono (CO) revelaron la presencia de una tercer quinol oxidasa que contiene dos citocromos tipo *b* como componentes, por lo que se le denominó *bb'*, no bombea protones y tiene una mayor afinidad por el CO, además es insensible al cianuro (Azarkina *et al.*, 1999; Santana *et al.*, 1992). Cualquier quinol oxidasa, pero no la citocromo *c* oxidasa, es completamente capaz de soportar sola el crecimiento, razón por la cual, la *caa₃* se expresa hasta la fase estacionaria (Zamboni y Sauer, 2003).

2. Complejos *bc*

El complejo *bc* de *B. subtilis*, puede considerarse una tercera clase de complejos tipo *bc*, distinta de las clases *bc₁* y *b_{6f}*, ya que comparte características tanto respiratorias como fotosintéticas (a pesar de no ser una bacteria fotosintetizadora) (Yu y Le Brun, 1998).

Los tres tipos de complejos tienen tres subunidades redox, la proteína Fe-S que contiene un centro [2Fe-2S] de alto potencial con uniones a residuos de histidina y cisteína. En los complejos *bc₁* (generalmente de organismos respiratorios), su citocromo *b* es de ~400 residuos de aminoácidos organizados en 8 hélices transmembranales, contiene dos hemos tipo *b* de bajo spin (*b_L* y *b_H*), ambos con ligación bi-histidina. Finalmente, un citocromo *c₁* conteniendo un hemo tipo *c* unido covalentemente a dos cisteínas y con ligación axial histidina/metionina. En los complejos *b_{6f}* (fotosintéticos), el citocromo *b* está escindido en dos subunidades, una de aproximadamente 220 residuos de aminoácidos, organizados en 4 hélices transmembranales, con dos hemos tipo *b* de bajo spin, *b_L* y *b_H*. Además posee un tercer hemo denominado *x* adyacente al hemo *b_H* y unido covalentemente por ligación tioéter a una sola cisteína y sin algún tipo de ligación axial. La segunda subunidad es llamada subunidad IV, de aproximadamente 160 residuos de aminoácidos contenidos en tres hélices transmembranales. Finalmente tienen un citocromo *f* conteniendo un hemo tipo *c* con ligación axial histidina/tirosina. El complejo *b_{6c}* de *Bacillus subtilis* está codificado por el operon *qcrABC*, donde QcrA es una proteína Fe-S que contiene un centro [2Fe-2S] de alto potencial con ligaciones

axiales de histidina y cisteína. QcrB es un citocromo *b* similar al fotosintético de aproximadamente 224 residuos de aminoácidos organizados en 4 hélices transmembranales, que contiene dos hemos tipo *b* de bajo spin, *b_L* y *b_H*, ambos con ligación bi-histidina no covalente pero con diferentes propiedades electroquímicas. Además tiene el hemo denominado *x* covalentemente unido únicamente por un enlace tioéter (De Vitry *et al.*, 2004; Stroebel, *et al.*, 2003). Finalmente, QcrC, es una fusión del equivalente de la subunidad IV fotosintética y un citocromo *c* conteniendo un hemo tipo *c* con ligación axial histidina/metionina (Fig. 3) (Berry *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2004; Stroebel *et al.*, 2003; Yu y Le Brun, 1998).

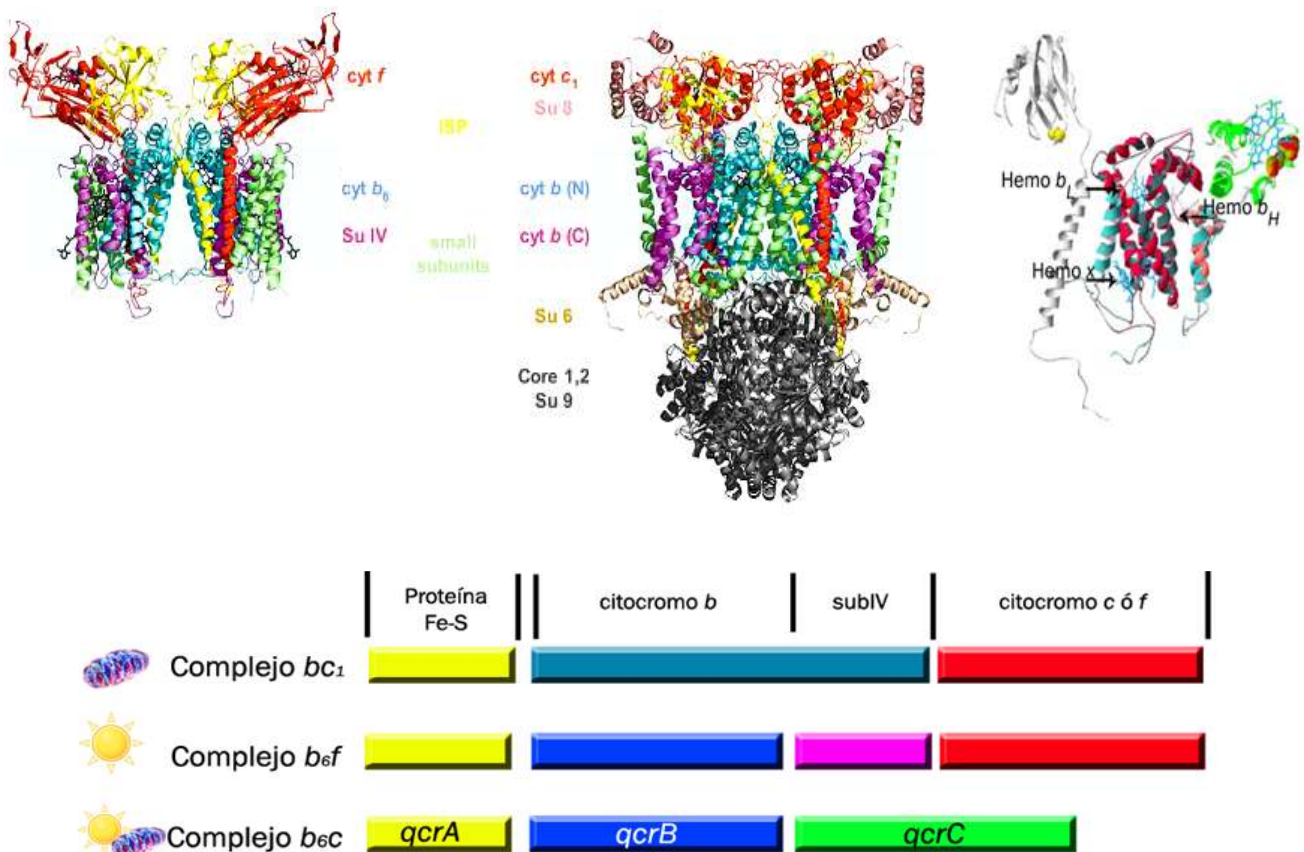
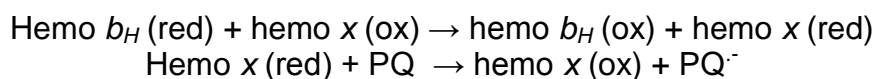


Figura 3. Comparación de las subunidades redox de los diferentes tipos de complejos *bc*. En la parte superior se muestran, de izquierda a derecha, los modelos tridimensionales de complejos *b₆f*, *bc₁* y el posible modelo del monómero del complejo *b₆c*. En la parte inferior, la diferencia en organización de sus subunidades redox. Modificadas de Smith *et al.*, 2004 y Yu *et al.*, 1995.

2.1 Ciclo Q

Acoplado a la transferencia de electrones, los complejos *bc* translocan protones a través de la membrana, proceso conocido como "ciclo Q". Poco se sabe en organismos fotosintéticos, aunque por el potencial redox del hemo *x* (-30 mV) se asume que participa de la siguiente manera:



Donde Q puede ser plastoquinona ó ubiquinona (Zhang *et al.*, 2004).

Para los complejos *bc*₁ el ciclo Q si está bien descrito: el ubiquinol (QH₂) es oxidado en el centro P (positivo) en una reacción concertada en la cual un electrón es transferido a la proteína hierro azufre, para formar un anión ubisemiquinona (Q_p⁻), el cual inmediatamente reduce al hemo *b*_L. Esta oxidación deposita dos protones en el lado positivo de la membrana. Posteriormente el electrón transferido a la proteína hierro azufre es transferido al citocromo *c*₁ y finalmente al citocromo *c*. El segundo electrón del ubiquinol se recicla a través del hemo *b*_L al hemo *b*_H que reduce una ubiquinona (Q) a anión ubisemiquinona (Q_n⁻) en el lado N (negativo). Hasta este punto sólo la mitad del ciclo se ha completado, ya que sólo un electrón del ubiquinol ha sido transferido hasta el citocromo *c*. Para completar el ciclo una segunda molécula de ubiquinol es oxidada por la proteína hierro azufre, transfiriendo el electrón al citocromo *c*₁, y éste al citocromo *c*, de nuevo formando el anión ubisemiquinona, Q_p⁻, y depositando dos protones en el lado positivo de la membrana. Q_p⁻ reacciona de la misma manera antes descrita, transfiriendo el electrón al hemo *b*_L y *b*_H, en donde este último reduce la previamente formada ubisemiquinona Q_n⁻ a ubiquinol en el centro N y consumiendo dos protones del lado negativo de la membrana. En general dos protones son translocados del lado negativo al lado positivo por cada par de electrones transferidos (Fig. 4) (Crofts, 2004; Snyder *et al.*, 1999; Trumpower, 1990^b).

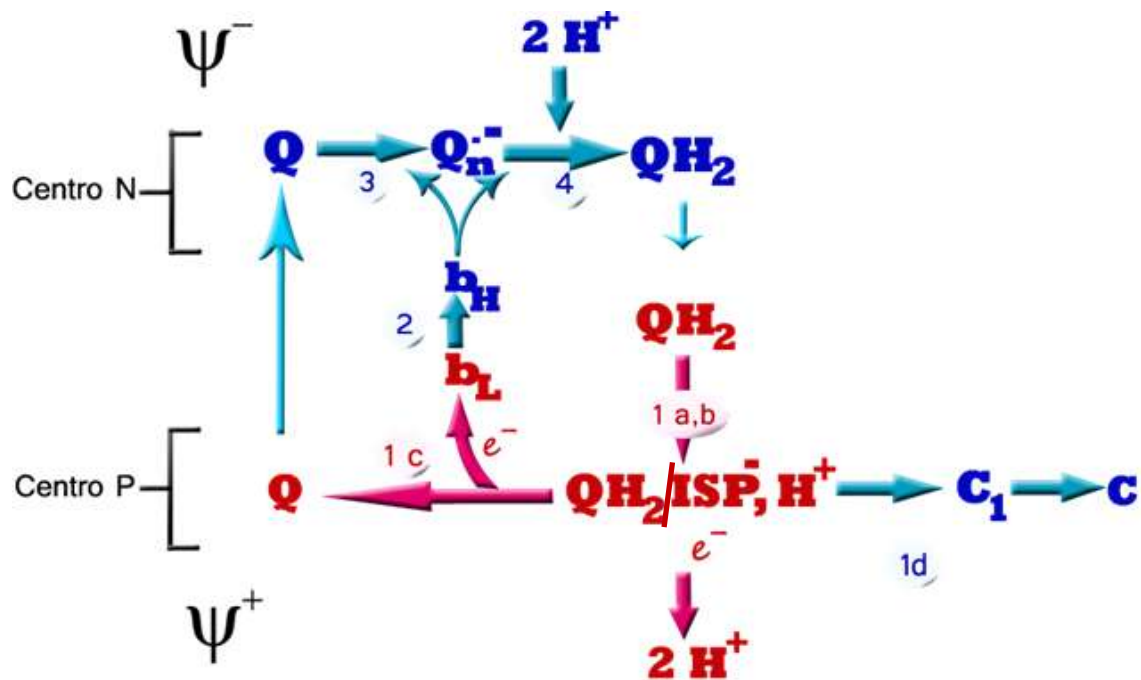


Figura 4. Ciclo Q. Transferencia de electrones y el mecanismo de la translocación de protones en el complejo del citocromo *bc₁*. Los círculos numerados muestran la secuencia de transferencia de electrones, Tomada de Snyder *et al.*, 2000.

2.2 Quinonas

El transporte de los electrones no se podría llevar a cabo sin la difusión a través de la bicapa lipídica de las quinonas, pequeñas moléculas lipofílicas. La difusión electroquímica que conecta las enzimas redox es mediada por la poza de quinonas. En general las quinonas se pueden dividir en dos grandes grupos, las benzoquinonas (al que pertenece la ubiquinona mitocondrial) y las naftoquinonas (como la MQ). La ubiquinona consiste de un anillo bencénico modificado con una cola isoprenil hidrofóbica que contiene de 6-10 unidades de isoprenos, dependiendo el organismo. La menaquinona consiste en dos anillos bencénicos donde el C3 puede contener de 4-9 unidades de isopreno; todas las unidades de isoprenos pueden mostrar geometría *trans* ó mono *cis* y pueden incluir un número variado de dobles enlaces (Fig. 5) (Dunphy *et al.*, 1971; Schoepp-Cothenet *et al.*, 2009). Diferentes tipos de quinonas como las UQ, PQ, MQ, RQ y CQ han sido identificadas en diferentes especies o coexistiendo en un mismo organismo. La menaquinona es la más ampliamente distribuida en los filos arquea y bacteria. Por otro lado, las quinonas más

recientes evolutivamente (benzoquinonas) tienen un potencial redox significativamente más positivo (150 mV) que la MQ (~ -70 mV).

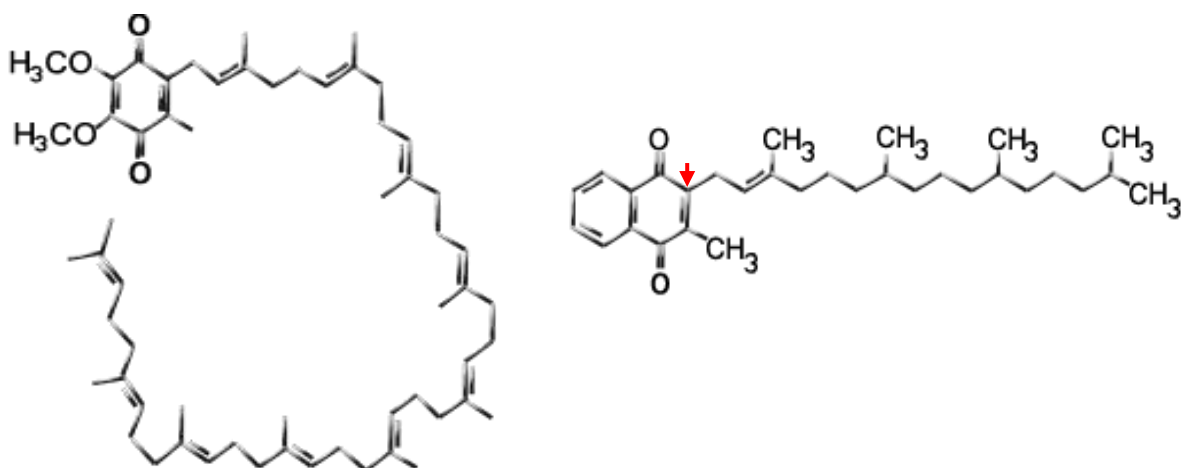


Figura 5. Izquierda- ubiquinona y derecha- menaquinona. La flecha roja indica el C3 del anillo bencénico.

3. El citocromo *c*₅₅₀ de *Bacillus subtilis*

El citocromo *c*₅₅₀ es una proteína de 13 kDa con un segmento transmembranal de α hélice de aproximadamente 30 residuos y un dominio hemo de aproximadamente 74 residuos de aminoácidos (Fig. 6B). Contiene una protoporfirina férrica IX covalentemente unida por dos enlaces tioéter, entre los grupos vinil del hemo y los residuos de cisteína de la proteína encontrados en un motivo C-X-X-C-H (Fig. 6A) (Allen *et al.*, 2003). El dominio soluble está localizado en la superficie exterior de la membrana citoplásmica. Tiene un potencial redox medio de +178 mV a pH 7.0. Bajo algunas condiciones de crecimiento este citocromo es el más abundante, aunque no es esencial para la supervivencia de la bacteria (Bengtsson *et al.*, 1999).

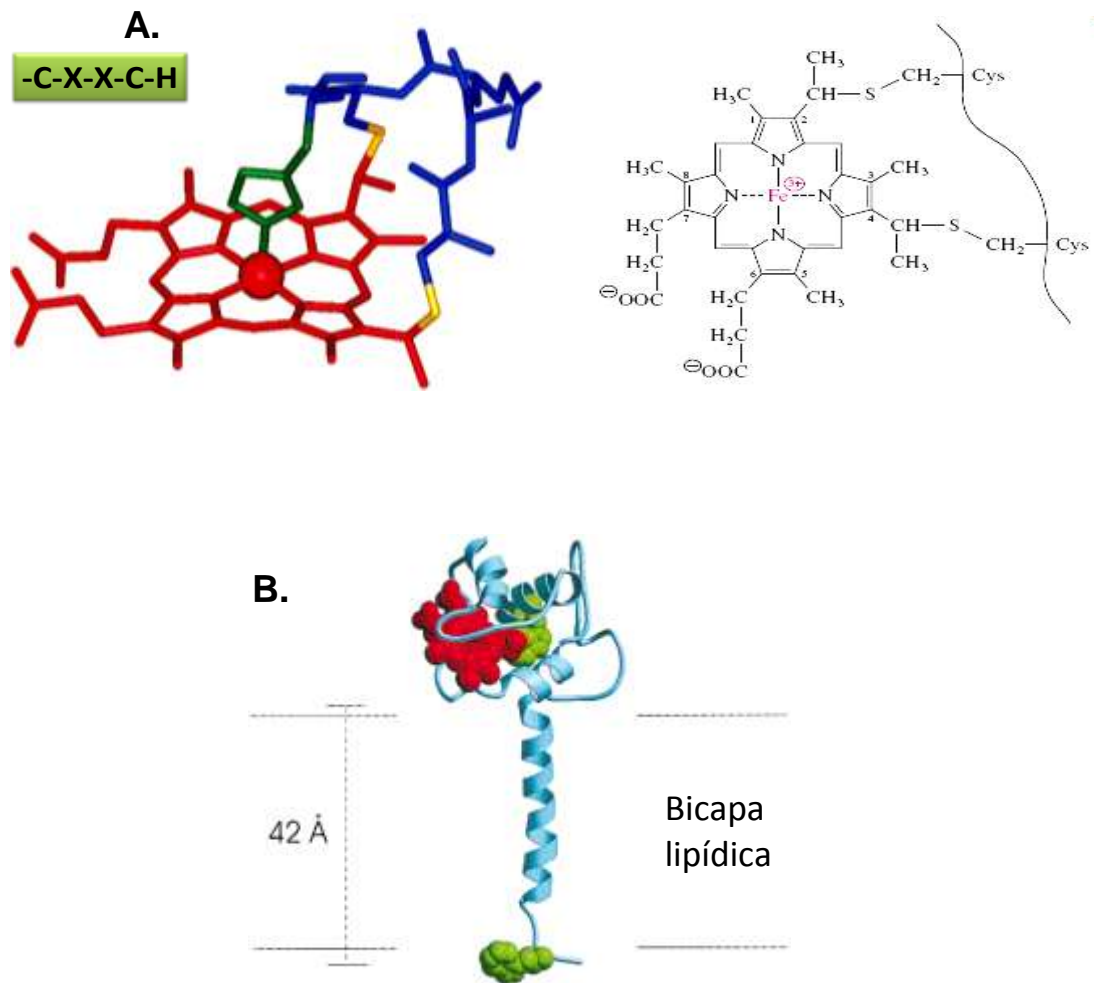


Figura 6. A. Hemo *c*, Derecha: unión covalente a la proteína por medio de residuos de cisteína de la apoproteína. Izquierda: secuencia motivo característica (CXXCH) de este tipo de hemos, amarillo-residuos de cisteína, azul- residuos de aminoácidos variables, verde- residuo de histidina. B. Citocromo *c*₅₅₀ de *B. subtilis*, el grupo hemo se muestra en rojo y dos residuos de triptófano en verde (David *et al.*, 2000).

3.1 El citocromo *c*₅₅₀ de *B. subtilis* vs citocromo *c* mitocondrial

El citocromo *c* mitocondrial es soluble y tiene un peso aproximado de 12 kDa, tiene una abundancia de residuos de lisina lo que le da un carácter altamente básico. La distribución de estos residuos en su superficie le confiere un momento dipolar que es importante en la orientación funcional en la transferencia de electrones entre el citocromo *c* y el complejo *bc*₁ y entre el citocromo *c* y el complejo citocromo *c* oxidasa. Estos complejos poseen una superficie conservada, cargada negativamente que se complementa con los residuos de lisina del citocromo *c*, formando un complejo electrostático (David *et al.*, 1999).

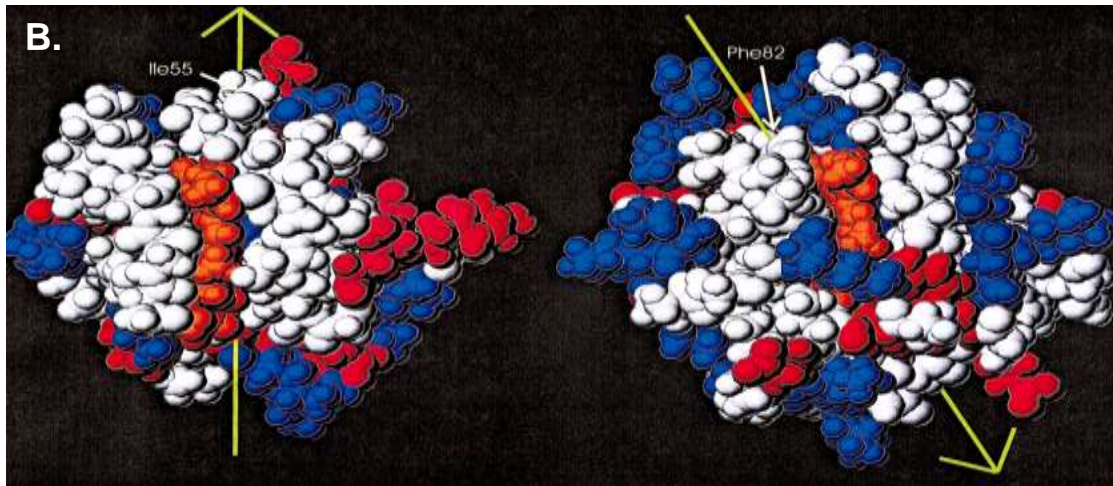
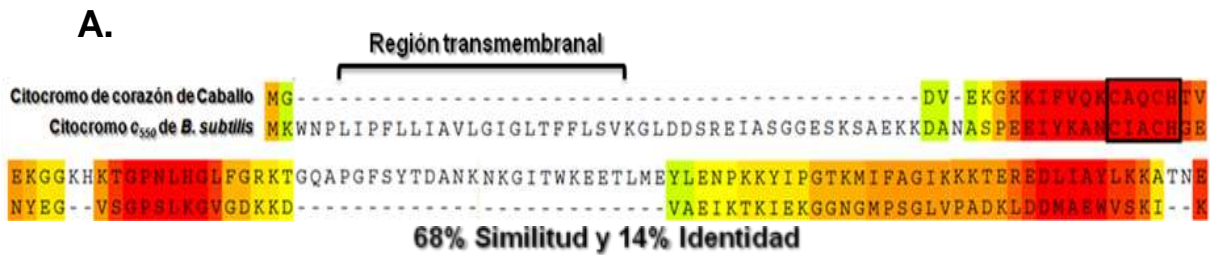


Figura 7. A: alineamiento de las secuencias del citocromo *c* de corazón de caballo con el c_{550} de *B. subtilis*. B: comparación de la distribución de cargas del citocromo c_{550} de *B. subtilis* (a la izquierda) con el citocromo *c* mitocondrial de corazón de atún (a la derecha). El grupo hemo se muestra de color dorado, los residuos básicos son azules y los ácidos son rojos, el momento dipolar está dibujado con una línea amarilla con el lado positivo en la cabeza de la flecha. El lado positivo en el citocromo de *B. subtilis* se encuentra en la Ile55, mientras que el lado negativo del citocromo *c* mitocondrial se encuentra en la Phe82. Tomada de David *et al.*, 2000.

Un alineamiento entre el citocromo *c* de *B. subtilis* y el citocromo *c* mitocondrial de corazón de caballo reveló que son idénticos en un 14 % (Fig. 7). El citocromo c_{550} de *B. subtilis* tiene un balance alterado de aminoácidos cargados, que le confieren un punto isoeléctrico ácido de 5.44 (comparado con el mitocondrial de 9.59). Esto es de particular interés para la transferencia de electrones, ya que el papel del reconocimiento de los residuos de lisina de la superficie del citocromo *c* que entran en contacto con el complejo b_6c cambia (Fig. 8) (David *et al.*, 1999).

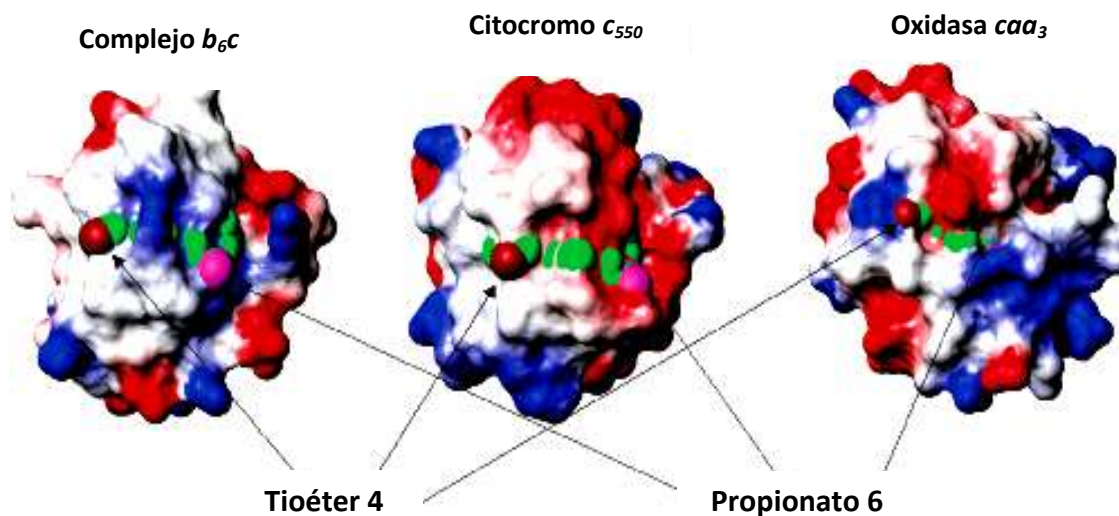


Figura 8. Potenciales electrostáticos en la superficie (rojo = carga negativa, azul = carga positiva) basado en modelos estructurales de los dominios de citocromo *c* del complejo *b₆c*, citocromo *c₅₅₀* y la oxidasa *caa₃* de *B. subtilis*. Los átomos del hemo se muestran como esferas verdes, excepto por el carbón del tioéter 4 que se muestra en café y el oxígeno del propionato 6 que se muestra en magenta. Tomada de Bertini *et al.*, 2006.

4. Antecedentes

Diversos estudios han reportado la medición de actividad enzimática con el uso de quinonas:

En 1987 Sone *et al.*, encontraron que el complejo *bc₁* y la citocromo *c* oxidasa forman un supercomplejo en la bacteria termofílica *Bacillus* PS3, lo purificaron y le midieron actividad de citocromo *c* oxidasa por medio de consumo de oxígeno utilizando citocromo *c* de *Candida krusei* y TMPD, además de actividad de quinol citocromo *c* reductasa utilizando duroquinol (reducido con la actividad de la malato deshidrogenasa) y el mismo citocromo *c*. Reportaron una *K_m* de 12 μM para la reductasa y 3.7 μM para la oxidasa, pero no mencionan nada de la reducción química del citocromo *c*.

Kutoh y Sone en 1988, reportaron la purificación y las propiedades del complejo *bc₁(b₆f)* de *Bacillus* PS3 midiendo la reducción de citocromo *c* dependiente de quinol; reduciendo diferentes quinonas utilizando a la malato

deshidrogenasa, encontraron que el número de recambio a pH 6.8 fue de 5 s^{-1} a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ y de 50 s^{-1} a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, sin embargo no reportan nada sobre la reducción química del citocromo.

En 1991 Lauraeus *et al.*, reportaron la expresión de dos diferentes oxidasas (caa_3 y aa_3) en *B. subtilis*, purificándolas y midiendo consumo de oxígeno con citocromo *c* y diferentes quinonas (duroquinona, menadiona, decilbenzoquinona y 2-hidroxi, 1,4-naftoquinona) reducidas con borohidruro ó TMPD más ascorbato, además de usar amortiguador 50 mM succinato de potasio pH 5.5 para minimizar la auto oxidación. Sin embargo, tampoco reportaron nada sobre la reducción química observada. Posteriormente, en 1993 Lauraeus y Wikström analizaron la cadena respiratoria de *B. subtilis* en fase estacionaria y logarítmica en condiciones similares.

En ese mismo año, Lemma *et al.*, purificaron la quinol oxidasa tipo aa_3 de *B. subtilis* W23, y midieron actividad respiratoria por medio de oximetría, utilizando NADH y D,T diaforasa para reducir diferentes quinonas (2,3-Dimetil-1,4-naftoquinona, menadiona, 1,4-Naftoquinona, Duroquinona y 2,3-Dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona), además compararon la actividad obtenida utilizando membranas aisladas. Encontraron que los 3 naftoquinoles tenían una alta velocidad de auto oxidación relacionada con el incremento del pH (datos no mostrados), y para disminuir un poco la auto oxidación las actividades se realizaron a pH 6.5. Aún así la mayor velocidad fue obtenida con DMN.

En 2000 Kusumoto, *et al.* clonaron, purificaron y caracterizaron la actividad de menaquinol oxidasa de la quinol oxidasa tipo *bd* de *Corynebacterium glutamicum*, utilizando tanto naftoquinonas (DMN, MQ-1, MQ-2 y MQ-3 y Menadiona) como benzoquinonas (UQ-1 y UQ-2) reduciéndolas con hidrosulfito de sodio, encontrando mayor especificidad de activación con las MQs, aunque también fueron altamente auto oxidables (datos no mostrados) (Kusumoto, *et al.*, 2000).

En el 2010 Yi *et al.*, aislaron la menaquinol oxidasa aa_3 de *B. subtilis* y midieron la actividad respiratoria utilizando 2,3-dimetil-1,4-naftoquinona, reducida con NADH y D,T diaforasa; ellos demostraron que posee un sitio de unión para la MQ-7, pero no reportan datos de reducción química.

Finalmente, en 2013, Kabashima *et al.*, clonaron y purificaron la MDH de *Bacillus* PS3, caracterizaron su actividad de malato: quinona oxidoreductasa, utilizando menadiona que fue reducida por la MDH y como aceptor final de electrones DCPIP. Reportaron una especificidad de K_m de 5.3 mM y una $V_{m\acute{a}x}$ de $312.9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, pero nada de la reducción química obtenida.

En relación a la purificación del citocromo c_{550} de *B. subtilis* se reportó:

En 1990 se determinó la presencia de diferentes citocromos *c* anclados en las membranas de *B. subtilis*, y se logró sobreexpresar el citocromo c_{550} , utilizando el plásmido pHP13 (von Wachenfeldt y Hederstedt, 1990). Posteriormente y como primer paso para determinar la estructura tridimensional, en 1993, los mismos autores describieron dos métodos para purificar tanto el citocromo completo en presencia de Tritón X-100 (con una masa de 12 kDa), como el dominio hemo en su forma soluble (con una masa de 6.2 kDa).

En 1999 se logró sobreexpresar y purificar el citocromo c_{550} en micelas detergente-proteína de una cepa de *B. subtilis* transformada con la construcción pHP13-*cccA* y modificada por PCR mutagénico (añadiendo una etiqueta de histidinas en el carboxilo terminal) con el fin de analizar su expresión y características espectrales (David *et al.*, 1999). Un año después, se construyó un modelo estructural del citocromo pudiéndose demostrar la importancia de la carga negativa en sus interacciones (David *et al.*, 2000).

Para lograr la sobreexpresión del citocromo c_{550} , en el laboratorio ya se contaba con la cepa *B. subtilis* 168 que había sido transformada con el plásmido pHP13 y la construcción pHP13- c_{550} completa, diseñada con anticipación en el laboratorio (Becerra Rivera y Gutiérrez-Cirlos, 2012). En la figura 9 se muestra el plásmido pHP13, y en la Fig. 10 un esquema de cómo se logró dicha construcción.

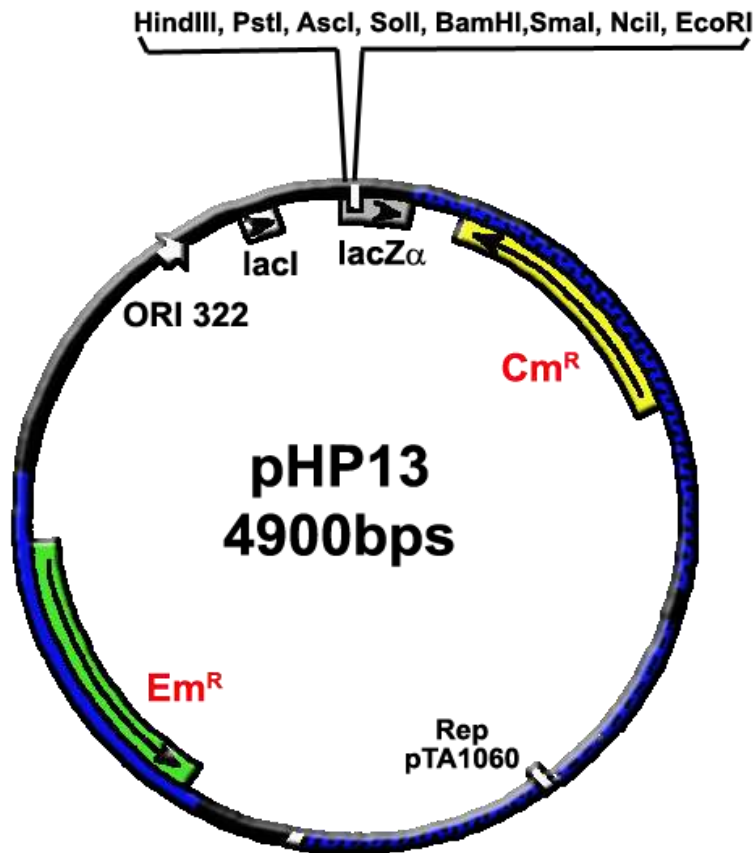


Figura 9. Plásmido pHP13 con un tamaño de 4900 pb, se pueden observar sus dos casetes de resistencia a Em y Cm, así como su zona de multiclonaje interrumpiendo el gen lacZ.

Con lo anterior, y sabiendo que era posible purificar el fragmento soluble del citocromo *c*₅₅₀, se pensó que éste posiblemente podría ayudar a entender mejor el complejo *b*₆*c* de *B. subtilis*.

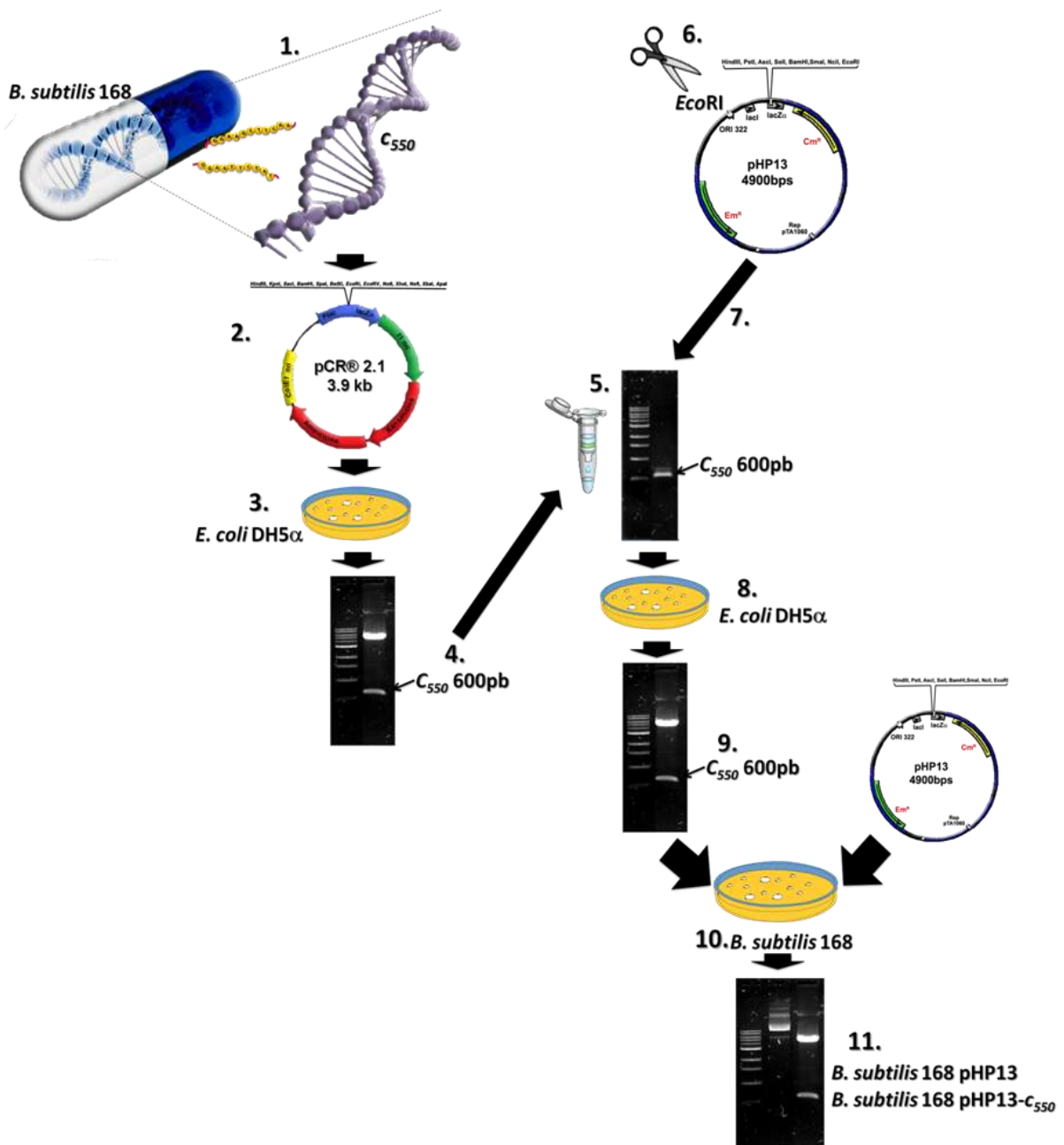


Figura 10. Esquema de la obtención de *B. subtilis* pHP13 y *B. subtilis* pHP13-*c*₅₅₀. 1 amplificación del gene del citocromo *c*₅₅₀ por medio de PCR con el uso de oligonucleótidos específicos y del DNA cromosómico de *B. subtilis* 168 como templado (Kunst *et al.*, 1997). 2 Ligación del producto de PCR al plásmido pCR® 2.1 (Invitrogen). 3 Transformación de *E. coli* DH5α con la construcción anterior. 4. Extracción del DNA plasmídico de clonas positivas (colonias blancas) y confirmación de la construcción por gel de agarosa y digestión con *Eco*RI. 5 Purificación de la banda del *c*₅₅₀ con el kit QIAquick Gel Extraction y confirmación por gel de agarosa. 6 Digestión del plásmido pHP13 con *Eco*RI por 12 hrs. 7 Ligación del *c*₅₅₀ puro al plásmido pHP13 con T4 DNA ligasa. 8 Transformación de *E. coli* DH5α con la construcción anterior. 9 Extracción del DNA plasmídico de clonas positivas (colonias blancas) y confirmación por gel de agarosa y digestión con *Eco*RI. 10 Transformación de *B. subtilis* 168 con la construcción pHP13-*c*₅₅₀ o con el vector pHP13. 11 Extracción del DNA plasmídico y confirmación de la transformación por gel de agarosa y doble digestión con *Eco*RI/*Bam*HI.

Objetivo

Caracterizar la actividad del complejo b_6c en membranas aisladas de *Bacillus subtilis* utilizando el fragmento soluble del citocromo c_{550} y diferentes naftoquinonas.

Objetivos particulares

- Sobreexpresar el fragmento soluble del citocromo c_{550} de *B. subtilis* y purificar la proteína resultante.
- Medir la actividad de quinol: citocromo c reductasa en membranas aisladas de *B. subtilis* utilizando la fracción soluble purificada del citocromo c_{550} y la Ferredoxina: NADP⁺ Reductasa (FNR) de *Fremyella diplosiphon*.
- Comparar la actividad obtenida con la actividad medida en presencia de citocromo c de corazón de caballo y diferentes naftoquinonas a pH de 6.8 y 7.0 en condiciones aeróbicas.

Materiales y métodos

Extracción de los plásmidos pHP13 y pHP13-*c*₅₅₀ de *Bacillus subtilis* 168.

La cepa de *Bacillus subtilis* 168 se obtuvo del *Bacillus* Genetic Stock Center (Ohio State University). Con un inóculo de las bacterias *B. subtilis* 168 (pHP13) y *B. subtilis* 168 (pHP13-*c*₅₅₀), se inocularon 3.5 ml de medio LB (10 g/L de peptona de caseína, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl, todo esterilizado a 120 libras de presión por 20 min (Sambrook y Russell, 2006)) adicionando 5 µg/ml de Cm y se incubaron durante toda la noche (ON) a 200 rpm y 37°C. Al día siguiente y en esterilidad, 10 ml de medio LB con Cm 5 µg/ml se inocularon con 100 µl de cada cultivo en matraces estériles de 50 ml los cuales se incubaron a 37 °C y 200 rpm. Se monitoreó su crecimiento midiendo cada hora la D.O._{600 nm} en el espectrofotómetro BioMate 3 Thermo Scientific, Rochester, NY, haciendo diluciones 1:10, hasta que los cultivos alcanzaran una absorbancia a 600 nm de entre 0.8-1.2.

Las células se cosecharon centrifugando a 4000 rpm por 10 min a 4 °C en una centrífuga Hermle Z383K, y se procedió a purificar los plásmidos utilizando el kit Spin Miniprep QIAprep® Holanda ó el NucleoSpin® Plasmid de Machery-Nagel, Alemania, con la única modificación para ambos protocolos de agregar lisozima a una concentración final de 1 mg/ml e incubar por 10 min a 37 °C después de resuspender las pastillas con el amortiguador de lisis (P1 ó A1 respectivamente).

Determinación de la concentración DNA plasmídico (Sambrook y Russell, 2006)

Se tomaron 10 µl de cada DNA plasmídico extraído y se disolvieron en tubos Eppendorf estériles que contenían 590 µl de H₂O dd estéril; se midió en el espectrofotómetro BioMate 3 Thermo en una relación de absorbancias de 260-280 nm, y la concentración se determinó considerando que una absorbancia de 1 a 260 nm tendrá una concentración de DNA de 50 µg/ml.

Digestiones y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR's)

Se realizaron dobles digestiones para los plásmidos pHP13 y la construcción pHP13-*C*₅₅₀, utilizando con respecto al volumen final de la reacción: 10 % de amortiguador "E", 1 % BSA acetilado, 1 µl de cada enzima (12 U *Eco*RI y 10 U *Bam*HI) y 0.5 - 1 µg pHP13-*C*₅₅₀ ó 0.1 µg pHP13. Las reacciones se incubaron a 37 °C por 2 hrs y finalmente se cargaron 20 µl en un gel de agarosa (como se describe más adelante).

Para las PCR's se utilizaron los siguientes oligonucleótidos que amplifican todo el citocromo *C*₅₅₀ de *B. subtilis*:

Forward– 5'GGAAGCTTCAAATCTAATTCCATATTTTCTATTGTAAG 3'

Reverse– 5'GGAATTCTATTTAATTTTGACACCCACTCTGCCATA 3'

En tubos Eppendorf estériles, se agregaron los siguientes componentes de la mezcla de PCR, en las concentraciones finales que se mencionan: 1.5 mM amortiguador 10X, 300 µM de dNTP's, 0.6 µM de cada oligonucleótido, 0.05 U de Taq polimerasa y 0.1-1 µg de DNA plasmídico en un volumen final de 50 µl. Se colocaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler personal, Brasil y se corrieron 30 ciclos a 90 °C, 65 °C y 72 °C para desnaturalizar, alinear y polimerizar el DNA respectivamente, para después analizarlo en un gel de agarosa, esperando un amplificado de 600 pb.

Gel de agarosa para DNA (Eguiarte *et al.*, 2007)

Se preparó un gel agarosa al 1 % en amortiguador TBE 0.5X (solución madre 5X: 0.44 M Tris base, 0.44 M ácido bórico y 25 M EDTA pH 8.0), la solución se calentó en el horno de microondas hasta que se disolvió y quedó completamente transparente y sin grumos. Las muestras (~1 µg para digestiones y 0.1 µg para PCR's) se trataron con 5 µl de amortiguador de carga (0.25 % azul de bromofenol y 40 % (w/v) sacarosa en H₂O) se utilizó el marcador de masa molecular BioLabs que tiene un intervalo de 250/253 a 10 000 pbs. El gel corrió por 40 min a 150 mA y 90 V con amortiguador TBE 1X. Posteriormente se incubó en oscuridad en H₂O dd por 30 min con 4 µl de Cibergreen (Invitrogen San Diego, CA), ó Midori (Nippon Genetics, Europa).

Finalmente, se fotografió en un fotodocumentador Biotop Biosens SC-645 Gel Documentation System (Shanghai, China).

Transformación de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (Samaniego, 2007)

Todo el procedimiento se realizó en condiciones estériles. La cepa *E. coli* DH5 α ElectroMAX (Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17* *r_k⁻*, *m_k⁺*) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ) se obtuvo de Invitrogen, Carlsbad, California EU. A dos tubos de células competentes (catálogo 18265-017) mantenidos en hielo, se les agregó 1 μ g de los plásmidos pHP13 y pHP13-*c₅₅₀* extraídos previamente de *B. subtilis* 168. Se mezclaron bien y se dejaron incubando por 40 min en hielo. Después se les dio un choque térmico 90 seg en un bloque térmico con baño maría a 42-43 °C, y se regresaron al hielo por 2 min. Posteriormente se les agregaron 500 μ l de medio Psi Broth (Medio LB, 4 mM MgSO₄, 10 mM KCl) y se incubaron por 90 min a 37 °C y 150 rpm. Al término de ese tiempo, los tubos se mezclaron bien y se tomaron 100 μ l de las células transformadas para sembrarlas en cajas de LB agar que contenían 5 μ g/ml Cm. Las clonas crecidas se re-estriaron dos veces más en cajas LB agar que contenían 5 μ g/ml Cm, para descartar las clonas falsas positivas.

Extracción de plásmidos pHP13 y pHP13-*c₅₅₀* de *E. coli* DH5 α

En esterilidad y en dos tubos de vidrio de 20 ml, se inocularon 3.5 ml de medio LB que contenía 5 μ g/ml Cm con una colonia de *E. coli* DH5 α pHP13 y *E. coli* DH5 α pHP13-*c₅₅₀*, y se dejaron incubando ON a 200 rpm y 37°C. Al día siguiente las células se cosecharon centrifugando a 4000 rpm por 10 min a 4 °C en una microcentrífuga 5418 Eppendorf, y se procedió utilizando el kit Spin Miniprep QIAprep®.

Obtención de células competentes y transformación de *Bacillus subtilis*

La cepa mutante de *B. subtilis* LUW196 (Δ *ctaCD::ble*, Δ *cydABCD::cat*, Δ *yth::tet*) fue donada por el Dr. Claes von Wachenfeldt de la Universidad de Lund, Suecia, (Winstedt y Von Wachenfeldt, 2000) y mantenida en glicerol a -70 °C hasta su uso. Todo el procedimiento se realizó en esterilidad. Se

prepararon los siguientes medios de cultivo: 10X Medio base A (10 g extracto de levadura, 2 g casaminoácidos, 800 ml H₂O di-destilada (dd) y 200 ml glucosa al 25 % (esta última esterilizada por filtración) y 10X sales de *Bacillus* (para 1 L – 20 g (NH₄)₂SO₄, 183 g K₂HPO₄ ·3H₂O, 60 g KH₂PO₄, 10 g citrato Na y 2 g MgSO₄ ·7H₂O). Los medios se esterilizaron a 120 libras de presión por 20 min en autoclave Felisa.

B. subtilis 168 y LUW196 se estriaron en cajas de LB agar, sin antibiótico y/o con 0.6 µg/ml Fle, 15 µg/ml Tet, 5 µg/ml Cm respectivamente e incubaron a 37 °C ON. Al día siguiente se preparó medio A (para 100 ml: 10 ml de 10X Medio base A, 9 ml 10X Sales de *Bacillus* y H₂O dd estéril) y se vaciaron 10 ml en dos tubos Falcon (con los antibióticos a las concentraciones antes mencionadas). Posteriormente se tomó una azada de colonia de cada cepa y se inocularon, tomando 600 µl de cada cultivo se midió la D.O._{650nm} en el espectrofotómetro BioMate 3 Thermo. Los cultivos se ajustaron hasta obtener una D.O. de 0.1 para ambos. Los 10 ml de cada cultivo se vertieron en matraces de 50 ml y puestos a incubar a 37 °C y 200 rpm; el crecimiento se monitoreo cada hora midiendo la D.O._{650 nm} y obteniendo una gráfica de D.O. vs tiempo. Cuando se alcanzó la fase logarítmica y pasó a la fase estacionaria temprana (tiempo 0 ó T0 en la genética de *Bacillus*) se midió la D.O. a la media hora para confirmar que ya estuviese en fase estacionaria, desde ese punto los cultivos se dejaron crecer 90 min más.

Transcurrido ese tiempo se transfirieron 0.05 ml de cada cultivo en 0.45 ml de medio B (10 ml medio A, 0.1 ml 50 mM CaCl₂ ·2H₂O, 250 nM MgCl₂ ·6H₂O- los dos últimos esterilizados con filtros Corning de 0.2 µm), considerando 3 tubos para la cepa 168 y 3 para la LUW196; se incubaron por 90 min más a 37 °C y 200 rpm.

Pasados los 90 min las bacterias son altamente competentes por lo que se añadió 1 µg de DNA plasmídico para cada cepa y para cada plásmido, además de otra transformación control sin DNA; enseguida se dejó incubando a 37 °C y 150 rpm por 30 min. Finalmente se estriaron 100 µl de cada transformación en cajas LB agar conteniendo 20 µg/ml Trp y 1.5 µg/ml Em como antibiótico de selección del plásmido, y se dejaron incubar ON a 37 °C. Al siguiente día, el resto de la transformación se estrió en cajas LB agar con Trp más Em a las

mismas concentraciones, y se dejaron incubando a 37 °C hasta el día siguiente.

Selección de clonas

Las clonas transformadas con el plásmido pHP13 y la construcción pHP13-*c550* se estriaron en cajas de LB agar con 3 µg/ml de Em, y se dejaron crecer ON a 37 °C. Se realizaron dos pases extras a cajas LB agar con 3 µg/ml de Em para mantener la selección del vector.

Una vez seleccionadas las clonas positivas se estriaron en cajas LB agar con los 4 antibióticos para la mutante LUW196: 3 µg/ml Em, 0.6 µg/ml Fle, 5 µg/ml Cm y 15 µg/ml Tet, para confirmar la transformación.

Método de lisado rápido de células de *B. subtilis* para observar en gel “gel cracking” (Holmes y Quigley, 1981)

Se realizó todo en esterilidad. En un tubo de vidrio de 20 ml se inocularon 2.5 ml de medio LB conteniendo 3 µg/ml Em y se dejó en incubación ON a 37 °C y 200 rpm. Al día siguiente, 1.2 ml del cultivo se centrifugaron en una microcentrífuga Eppendorf 5418 a 10,000 rpm por 1 min. Se removió el sobrenadante, y la pastilla se resuspendió en 1.2 ml de amortiguador TSE (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl y 10 mM EDTA) y centrifugada nuevamente de igual manera. El SN se retiró y la pastilla se resuspendió en 175 µl de amortiguador STET (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 8 % (w/v) sacarosa y 2 % (v/v) Tritón x-100). Posteriormente se añadieron y mezclaron 12.5 µl de una solución de lisozima preparada a 20 mg/ml en amortiguador TE (10 mM Tris/HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA), y se dejó incubar por 10 min a 37 °C. A continuación las mezclas se tornaron viscosas, se calentaron por 90 seg en agua hirviendo para desnaturalizar el DNA. Una vez a temperatura ambiente se añadieron 100 µl de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1) y se agitaron en vortex por 10 seg. Finalmente se centrifugó por 4 min a 10,000 rpm para separar las fases y se colectó la fase superior manteniéndola en hielo, de la cual se cargaron de 10-30 µl en el gel de agarosa con 5 µl de amortiguador de carga.

Selección del medio de crecimiento para la cepa *B. subtilis* LUW196-pHP13 *c*₅₅₀

La cepa de *B. subtilis* LUW196 pHP13-*c*₅₅₀ se creció en una caja fresca de medio LB agar que contenía 0.3 µg/ml Fle, 2.5 µg/ml Cm, 7.5 µg/ml Tet y 1.5 µg/ml Em, después una colonia se creció por 23 hrs a 37 °C y 200 rpm en 3 ml de dos medios:

- MSR que contenía 2.5 % bactotripton, 2 % extracto de levadura, 0.3 % K₂HPO₄ y 3 % succinato de sodio pH 7.5, suplementado con 300 µl/L de solución de micronutrientes (2.2 % MnCl₂, 0.5 % ZnSO₄·7H₂O, 0.5 % H₃BO₃, 0.016 % CuSO₄·5H₂O, 0.46 % Co(NO₃)₂·6H₂O y 0.5 % (v/v) H₂SO₄ concentrado) y sus respectivos antibióticos a las mismas concentraciones antes mencionadas.
- MM que contenía 0.5 µg/ml Trp, 62 mM K₂HPO₄, 44 mM KH₂PO₄, 11.4 mM K₂SO₄, 3.4 mM citrato de sodio, 0.8 mM MgSO₄, 50 µM CaCl₂, 24 µM FeCl₃, 13 µM ZnCl₂, 3 µM NaMoO₄, 2.5 µM CuCl₂, 2.5 µM CoCl₂, 1.32 µM MnSO₄, suplementado con 0.5 % de glucosa y sus respectivos antibióticos a las mismas concentraciones antes mencionadas (Winstedt y von Wachenfeldt, 2000).

Al día siguiente con esos cultivos se inocularon 1L de cada medio, se colectaron alícuotas de 15 ml a las 5, 9 y al término de las 23.5 hrs de crecimiento, para poder seleccionar el mejor tiempo y medio en contenido de citocromos.

Las células se cosecharon, centrifugando por 20 min a 5000 rpm y 4 °C en el rotor GSA centrífuga Sorvall Evolution. El SN se decantó y la pastilla se resuspendió con amortiguador 100 mM de fosfatos de potasio pH 6.6, la pastilla resuspendida se centrifugó por 10 min a 11 000 rpm y 4 °C. El SN resultante se decantó nuevamente y se determinaron los gramos de células obtenidas en el sedimento (Konings y Freese, 1972).

Preparación de membranas de *Bacillus subtilis* (Hägerhäll et al., 1992).

Se prepararon membranas disolviendo las células a una concentración de 30 g/L en amortiguador 50 mM de fosfatos de potasio pH 8.0, y se les agregó 0.1

mM final de AEBSF, 0.3 g/L de lisozima, 10 mg/L de DNAsa y RNAsa, todas las enzimas disueltas en el mismo amortiguador. Las células se incubaron 15 min a 140 rpm y 37 °C, después se les agregó 10 mM MgSO₄ y mezcla de inhibidores de proteasas (250 mM ε-aminocaproico y 100 mM EDTA) en una proporción de 10 ml por cada 500 ml de cultivo dejando incubar 30 min más a 37 °C y 140 rpm. Pasados los 30 min se agregó EDTA pH 7.4 a una concentración final de 15 mM y se incubó por dos minutos más. A continuación se agregó 1 M MgSO₄ para incrementar la concentración final a 20 mM (tomando en cuenta la concentración inicial).

Lo siguiente se realizó a 4 °C: se centrifugó a 5000 rpm por 20 min en la centrífuga Sorvall Evolution rotor GSA, todos los SN se centrifugaron a 11 000 rpm por 42 min con el rotor GSA. El SN se decantó y la pastilla se resuspendió con amortiguador 100 mM fosfatos de potasio pH 6.6, llevando cada tubo a 40 ml aproximadamente con el mismo amortiguador y centrifugado a 15,000 rpm por 15 min en el rotor SS-34. Finalmente la pastilla se resuspendió en el volumen mínimo del mismo amortiguador de fosfatos pH 6.6 y pasada a un tubo cónico de plástico limpio, donde se les agregó un volumen igual de glicerol, AEBSF a una concentración de 1 mM final y mezcla de inhibidores de proteasas en la misma proporción mencionada. Las membranas se almacenaron a -20 °C.

Análisis de las cepas LUW196, LUW196 pHP13 y LUW196 pHP13-c₅₅₀

Con el medio seleccionado, se realizaron curvas de crecimiento hasta las 23.5 hrs, de las cepas LUW196, LUW196 pHP13 y LUW196 pHP13-c₅₅₀, inoculando 100 ml del medio adicionados con sus respectivos antibióticos (si lo requerían), e incubando a 200 rpm y 37 °C.

Posteriormente, una colonia de cada cepa: LUW196, LUW196 pHP13 y LUW196 pHP13-c₅₅₀, se crecieron por 23 hrs a 37 °C y 200 rpm en 3 ml de MSR suplementado con 300 µl/L de solución de micronutrientes y sus respectivos antibióticos. Al día siguiente con ese cultivo se inoculó 1L del mismo medio y bajo las mismas condiciones, al término de las 23 hrs de crecimiento se revisó la D.O. a 600 nm que fuese igual a 4, realizando una

dilución 1:10 (**Henning et al., 1995**), y se procedió a cosechar, preparar membranas y determinar la concentración de citocromos como se describe más adelante.

Cuantificación de proteína

□ Lowry, 1951; Markwell, 1978

Con una solución 100 µg/ml de BSA se preparó una curva patrón por duplicado de un intervalo de concentración de 0 a 200 µl; a cada tubo se le agregó 1 ml de una mezcla de: 99 partes de "A" (2 % Na₂CO₃, 0.4 % NaOH, 0.2 % KNaC₄H₄O₆-4H₂O y 1 % SDS) y 1 parte de "B" (4 % CuSO₄ -5H₂O), y se incubó por 10 min. Después a cada tubo se le agregó 100 µl de Folin-Ciocalteau fenol diluido 1:1 con agua y se dejaron incubar por 30 min más.

Las membranas se diluyeron 1:100 con agua bi destilada y se colocaron por duplicado 20, 40 y 80 µl, agregando de igual manera solución A+B y Folin diluido. Todas las muestras se leyeron a 750 nm en el espectrofotómetro BioMate 3 Thermo, tomando como blanco uno de los tubos de la curva con la cantidad de 0 µl de BSA. Las absorbancias de las membranas se interpolaron a los obtenidos de la curva patrón obteniendo así la concentración de proteína de membrana en µg/µl.

□ Determinación alterna de la concentración de proteína por su absorbancia a 280 nm (U.V.) (Glick y Pon, 1995)

10 µl de las membranas se disolvieron en 990 µl de una solución 0.6 % SDS en H₂O dd, la mezcla se agitó fuertemente y se centrifugó a 13 000 rpm por 3 min a 4 °C. Para calcular la concentración, el sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro BioMate 3 Thermo a 280 nm, considerando que a una absorbancia de 0.12 la concentración será de 10 mg/ml.

Determinación de la concentración de citocromos en membranas de *Bacillus subtilis*

Se realizaron espectros de absorción en un rango de 400-650 nm en un espectrofotómetro con doble haz de luz marca Aminco DW2 con modernización OLIS (Bogart, GA). Se utilizó el modo SPLIT (un haz de luz de cierta longitud

de onda pasa por las celdillas de referencia y muestra) y una apertura o ancho de haz de 3 nm. Se colocó amortiguador 100 mM de fosfatos de potasio pH 6.6 en ambas celdillas y se calibró a 0 de absorbancia para obtener una línea base. Posteriormente se colocó una dilución 1:5 de las membranas aisladas en la celdilla de muestra, de la que se obtuvo el espectro de absorción oxidado. A continuación se le agregaron unos granos de hiposulfito de sodio (ditionita de sodio) frescos y se obtuvo el espectro de absorción de las membranas reducidas con ditionita. Finalmente restando el espectro reducido menos el oxidado, se obtuvo el espectro diferencial, a partir del cual se sacaron los datos de absorbancia de los valles y picos alfa de los citocromos: $a = 600$ nm, $b = 560$ nm y $c = 550$ nm; utilizando la Ley de Lambert-Beer y los ϵ de cada citocromo ($a = 16.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $b = 20 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $c = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (de Vrij *et al.*, 1987)) se calculó la concentración. Usando estos datos y la concentración de proteína promediada obtenida por Lowry/UV se obtuvo la concentración de nmoles de citocromo por mg^{-1} de proteína de cada citocromo.

Proteólisis de Metil éster de Na-Benzoil-L-Arginina (BAME)
<http://www.sigmaaldrich.com>

Se preparó una solución madre de 0.56 mM de BAME en amortiguador 67 mM de fosfatos de sodio pH 7.6, se disolvieron 0.01 g de tripsina tratada con TPCK, Sigma en 10 ml de 1 mM HCl. Ambas soluciones se mantuvieron en hielo.

Se realizaron las siguientes mezclas a temperatura ambiente en 3.2 ml, la tripsina se agregó al final, después la mezcla se agitó con vortex por 3 seg y vertió en una celdilla de cuarzo, para monitorear la cinética por 5 min a una absorbancia de 253 nm, en un espectrofotómetro BioMate 3 Thermo.

	Bco	100 U tripsina	200 U tripsina	400 U tripsina
BAME (stock)	0.67 ml stock + 2.33 ml amortiguador fosfatos sodio			
1 mM HCl	0.2 ml	-	-	-
Solución de tripsina	-	6.5 μl solución + 193.5 μl HCl	13 μl solución + 187 μl HCl	26 μl solución + 174 μl HCl

Se obtuvo la pendiente como ΔA_{253} nm/minuto y se determinaron las Unidades de BAME liberadas por ml de enzima utilizada:

$$\text{Unidades BAME /ml enzima} = \frac{(\Delta A_{253\text{nm}}/\text{min Muestra} - \Delta A_{253\text{nm}}/\text{min Bco}) (df)}{(0.001)(V_E)}$$

Donde:

df = factor de dilución

0.01 = cambio en A253 nm/min por unidad de tripsina

V_E = volumen de la enzima usada en ml

Obtención del fragmento soluble del citocromo c_{550} (modificado de von Wachenfeldt y Hederstedt, 1993)

Las membranas aisladas de *B. subtilis* LUW196 pHP13- c_{550} , se lavaron (para retirar los inhibidores de proteasas) con amortiguador 0.1 M fosfatos de potasio pH 6.6, en una relación 1:1 (v/v), centrifugando a 15,000 rpm por 15 min y 4 °C en una centrífuga Beckman Coulter, modelo AVANTI J26XPI y rotor JA-25.5. La pastilla se resuspendió en el volumen inicial de membranas con el mismo amortiguador, y después se diluyeron en amortiguador 50 mM Na-Mops/Cl pH 7.6 a un volumen final de 210 ml por g de proteína. Se agregó tripsina tratada con TPCK a temperatura ambiente, en una relación de 100 U de tripsina por 5.2 nmoles citocromo c que equivalen a 3.7 mg proteína de membrana, se mezcló bien y se dejó incubar por 20 min a 30 °C. Posteriormente se centrifugó por 45 min a 4 °C y 20 000 rpm en la misma centrífuga y rotor. El sobrenadante se decantó cuidadosamente, se le realizó un espectro de absorción, y en base a la cantidad de nmoles de citocromo c , se agregaron 400 U más de tripsina tratada con TPCK. La mezcla se incubó por 25 min a 30 °C y al término se detuvo la proteólisis agregando 1 mM AEBSF.

El sobrenadante se precipitó con 20 % de TCA, con respecto al volumen final de la muestra a precipitar a partir de una solución al 100 % TCA, después de incubar por 30 min en hielo se centrifugó en tubos de vidrio por 30 min a 4000 rpm y 4 °C en una centrífuga Hermle Z383K. La pastilla se resuspendió en 1 ml de 73 % acetona pre-enfriada a -20 °C para remover el ácido. En tubos de 1.5ml de plástico, la muestra se centrifugó por 15 min a 13 000 rpm y 4 °C en una microcentrífuga 5418 Eppendorf. Finalmente el sobrenadante se removió,

se dejó airear el tubo en el hielo para evaporar el resto de la acetona y la pastilla se resuspendió en 1 ml de amortiguador 20 mM MOPS-Na pH 7.4.

El citocromo concentrado se cargó en una resina de intercambio iónico DEAE Biogel A (columna de 2.8 cm de diámetro x 16 cm de altura), equilibrada con 50 mM Tris/HCl pH 8.6 a 4 °C. La cromatografía se lavó con un volumen de columna de 10 mM NaCl seguida por un gradiente de 10–500 mM NaCl de tres volúmenes de columna. Las fracciones que contenían el fragmento soluble del citocromo se concentraron utilizando unidades de filtración Millipore Amicon® Ultra 3K. Este concentrado se cargó en otra columna con la resina de filtración en gel Sephadex G-50 fina (2.8 x 16 cm) equilibrada con 50 mM Tris/HCl pH 8.6, y nuevamente las fracciones que contenían el fragmento soluble del citocromo se concentraron utilizando unidades de filtración Millipore Amicon® Ultra 3K. El citocromo c soluble se almacenó con 1 mM AEBSF a -70 °C hasta su uso.

Análisis de las fracciones obtenidas por medio de geles de poliacrilamida SDS (Laemmli, 1970)

Se corrieron electroforesis en geles de placa (16 x 16 cm y 1.5 mm de grosor). El gel separador se preparó con 14 % de acrilamida más 0.37 % bis-acrilamida, 0.38 M Tris pH 8.3 más 0.1 % SDS, 0.036 % PSA y 0.04% TEMED todo en un volumen final de 10 ml (aforado con H₂O bi-destilada). El gel condensador de 5 % de acrilamida más 0.13 % bis-acrilamida, 0.125M Tris pH 6.8 más 0.1 % SDS, 0.036 % PSA y 0.04 % TEMED en un volumen final de 5 ml (aforado con H₂O bi-destilada). El amortiguador de corrida 5X contenía 0.12 M Trizma, 0.95 M Glicina y 17.33 mM SDS. Se utilizaron marcadores pre-teñidos Nippon Genetics con un rango de 175 a 15 kDa y se les agregó 0.2 nmoles de citocromo c de corazón de caballo. Para las muestras se utilizaron 0.2 nmoles de citocromo c y se les añadió amortiguador de carga (10 % glicerol, 2.3 % SDS, 62.5 mM Tris/Cl pH 6.8, 5 % β-Mercaptoetanol ó 0.1 M ditiotreitól (DTT) y 0.001 % azul de bromofenol) en relación 1:4. Los geles se corrieron a 50 V durante 40 minutos, y después a 120 V por 1.15 hrs vigilando que no se saliera el frente del gel.

Análisis de las fracciones obtenidas por medio de geles Tricina SDS-poliacrilamida (Schägger y von Jagow, 1987)

Se corrieron electroforesis en geles de poliacrilamida (16 x 16 cm, y 1.5 mm de grosor) con gel separador de 16 % de acrilamida más 0.48 % bis-acrilamida, 0.93 M amortiguador de geles (3 M tris/HCl pH 9.0), glicerol 9.6 % final, PSA 0.033 % final y TEMED 0.04 % final. El gel condensador de 4 % de acrilamida más 0.18 % bis-acrilamida, 0.75 M amortiguador de geles, PSA 0.33 % final y TEMED 0.05 % final, todo en un volumen final de 8 ml (aforado con H₂O di-destilada). El amortiguador superior contenía 0.1 M Tris, 0.1 M Tricina y 0.1 % SDS y el inferior 0.2 M Tris/HCl pH 8.9. Se utilizaron marcadores pre-teñidos Nippon Genetics con un intervalo de 170 a 15 kDa y se les agregó 0.2 nmoles de citocromo c de corazón de caballo. Se utilizaron 0.2 nmoles de citocromo c de membranas tratadas con solución digestora que contenía 100 mM Tris/HCl pH 6.8, glicerol 30 % y pizca de azul de bromofenol más 2.5 % de SDS para 0.1 nmoles de membranas, 5 % de SDS y sin SDS para las fracciones tripsinizadas para evitar su desnaturalización. Las muestras se calentaron por 5 min a 60-75 °C para proteínas solubles y a cada muestra se les agregó AEBSF a una concentración final de 0.1 mM antes de cargar al gel. Finalmente los geles se corrieron a 50 V por 3 hrs y después a 120 V por 16 hrs a temperatura ambiente.

Análisis de las fracciones obtenidas por medio de geles Tricina-SDS con gradiente del 10-14 % (Schägger y von Jagow, 1987)

Se corrieron electroforesis en geles de gradiente de poliacrilamida (16 x 16 cm, y 1.5 mm de grosor) utilizando dos soluciones para el gel separador: una conteniendo 10 % acrilamida más 0.3 % bis-acrilamida, 0.93 M amortiguador de geles, 9.6 % glicerol, 0.033 % PSA y 0.04 % TEMED final; la segunda contenía 14 % acrilamida más 0.4 % bis-acrilamida, 0.93 M amortiguador de geles, 9.6 % glicerol, 0.033 % PSA y 0.04 % TEMED. El gel condensador se preparó con 4 % de acrilamida más 0.18 % bis-acrilamida, 0.75 M amortiguador de geles, PSA 0.33 % final y TEMED 0.05 % final, todo en un volumen final de 8 ml (aforado con H₂O bi-destilada). Los amortiguadores superior e inferior son los mismos antes mencionados y las muestras procesadas de la misma

manera, utilizando los marcadores pre-teñidos Nippon Genetics con un intervalo de 170 a 15 kDa. Los geles se corrieron a 50 V por 3 hrs y después a 120 V por 16 hrs a temperatura ambiente

Análisis de las membranas obtenidas por medio de Geles Claros Nativos de alta resolución (1D) (Wittig *et al.*, 2007):

A 4 °C se tomó 1 ml de membranas de cada cepa y se les agregó a cada una 3 ml de amortiguador 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.1 % azida de sodio, 0.2 M NaCl y 0.1 mM AEBSF, se mezcló bien y se centrifugó a 45 000 rpm por 25 min y a 4 °C en una centrífuga Sorvall Ultra Pro 80, usando el rotor T875. La pastilla se resuspendió en el amortiguador de muestra: 50 mM NaCl, 50 mM Imidazol/HCl, 2 mM ácido aminocaproico y 1 mM EDTA pH 7.0, en una relación de 400 µl por 4 mg proteína. En un frasco vial y a 4 °C se incubó en agitación durante 30 min cada muestra con 0.6 mg DDM/mg proteína, y 0.1 mM AEBSF. Se centrifugó cada muestra a 40 000 rpm por 10 min y 4 °C. Inmediatamente después los sobrenadantes se recuperaron, se les agregó 1 mM AEBSF y se les realizaron espectros de diferenciales de absorción (ditionita menos oxidado).

Se corrieron electroforesis en placa (16 x 16 cm y 1.5mm de grosor). El gel separador se preparó con un gradiente del 4% al 13 % de poliacrilamida, la solución al 4 % contenía 0.12 % Bis-acrilamida, 6 ml amortiguador de gel 3x (pH 7.0, 50 mM ácido aminocaproico y 15 mM Bis-Tris), 0.03 % PSA y 0.03 % TEMED, todo en un volumen final de 18 ml. La mezcla del 13 % contenía además 5 ml amortiguador de gel 3x, 21.3 % glicerol, 0.03 % TEMED y 0.03 % PSA en un volumen final de 14 ml (aforado con H₂O dd). El gel condensador se preparó al 4 % acrilamida, 0.12 % Bis-acrilamida, 3.33 ml amortiguador de gel 3x, 0.066 % TEMED y 0.053 % PSA en un volumen final de 8 ml. El amortiguador superior a pH 7.0 contenía 50 mM Tricina, 15 mM Bis-Tris, 0.02 % DDM y 0.05 % desoxicolato, y el amortiguador inferior a pH 7.0 contenía 15 mM Bis-Tris. A las muestras solubilizadas se les agregó rojo de Ponceau S como frente y 8.3 % glicerol. Se utilizaron los marcadores de peso molecular pre-teñidos Nippon Genetics con un rango de 170-15 kDa; el gel se cargó a 4

°C y se corrió a 100 V, 20 mA y 250 W por 90 min, y después a 500 V, 20 mA y 250 W por 180 min.

Análisis de 2D de los geles claros nativos por medio de geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS) (Schägger *et al.*, 1994)

Los geles de primera dimensión se retiraron de las placas y se cortaron en tiras correspondiendo a cada carril del gel, después se incubaron a temperatura ambiente y en agitación durante 1 hr en el amortiguador de incubación (2.5 % dodecil sulfato de sodio, 10 % glicerol, 62.5 mM Trizma base y 10 mM DTT). Posteriormente las tiras se secaron de 10-20 min sobre las placas de vidrio (16 x 16 cm), y se procedió a preparar el gel separador que contenía 14 % acrilamida, 0.4 % bis-acrilamida, 996.3 mM Tris pH 8.45, 0.3 % SDS, 79.5 % glicerol, 0.033% TEMED y 0.033 % PSA. El gel condensador contenía 4 % acrilamida, 0.13 % bis-acrilamida, 745 mM Tris pH 8.45, 0.3 % SDS, 0.066 % TEMED y 0.066 % PSA. Se utilizaron los marcadores de peso molecular preteñidos Nippon Genetics con un rango de 170-15 kDa; finalmente los geles se corrieron a temperatura ambiente a 45 V por 3 hrs y después a 120 V por 12 hrs.

Tinción de geles para grupos hemo unidos covalentemente (Thomas *et al.*, 1976)

Se mezclaron 3 partes de una solución fresca de 6.3 mM TMBZ en metanol con 7 partes de 0.25 M acetato de sodio pH 5.0. Cuando los geles terminaron de correr, se sumergieron en esta mezcla en agitación de 50 rpm y se cubrieron con aluminio por 1 hr. Posteriormente se les agregó 30 mM peróxido de hidrógeno y la tinción se monitoreó a los 3, 5 y 30 min. Pasado este tiempo se lavaron con una mezcla de isopropanol – 0.25 M acetato de sodio en proporción 3:7, y se capturaron sus imágenes digitales en un escáner HP Scanjet 4070 Photosmart, España.

Tinción con azul de Coomassie (Laemmli, 1970)

Después de digitalizar los geles revelados con TMBZ, los geles se sumergieron en una solución de azul de Coomassie R250 (50 % metanol, 10 % ácido

acético y 0.25 % azul brillante de Coomassie) durante 1 hr en agitación de 50 rpm. Posteriormente se lavaron con una solución 50 % metanol 50 % H₂O dd por 30 min en agitación, y revelados con una solución desteñidora que contenía 25 % etanol, 7 % ácido acético y H₂O dd en agitación hasta que el fondo estuviese claro. De igual manera se digitalizaron en un escáner HP Scanjet 4070 Photosmart.

Ensayos de actividad del complejo *b₆c* por medio por medio del uso de la Ferredoxina: NADP⁺ reductasa (FNR) de *Fremyella diplosiphon*

Para medir la actividad del complejo *b₆c* de *B. subtilis*, era necesario encontrar una manera alterna sin utilizar a la succinato deshidrogenasa para reducir a las naftoquinonas utilizadas. Con este objetivo, se utilizó la FNR de *Fremyella diplosiphon* (previamente purificada y donada por el Dr. Carlos Gómez Lojero del CINVESTAV-Zacatenco). Los ensayos se realizaron utilizando un espectrofotómetro de doble haz, doble longitud de onda Aminco DW2 con modernización OLIS (Bogart, GA EUA), con un paso de luz de 3 nm.

Utilizando el modo SPLIT (una longitud de onda específica, 340 nm pasa a través de las celdillas de referencia y muestra), se realizaron los siguientes experimentos. a) Reducción de quinonas con la siguiente secuencia: NADPH → FNR → Q y b) un control de reducción química NADPH → Q. En una celdilla de 1.2 ml de capacidad y un cm de paso de luz, se colocó amortiguador de actividad (250 mM de sacarosa, 0.01 % Tween-20, 1 mM NaN₃ y 50 mM de fosfatos de potasio pH 7.0 ó 6.8). Se añadieron los reactivos en el siguiente orden: 0.14 U FNR, 15 μM quinonas y NADPH separados por lapsos de 15-20 seg.

Se monitoreó la reducción del citocromo *c* en el modo DUAL, es decir, utilizando dos longitudes de onda 550 y 540 nm que pasan a través de la celdilla de muestra. De igual manera se realizaron controles de reducción química, en este caso 2: 1) NADPH → FNR → Q → citocromo *c* y 2) NADPH → FNR → Q → *b₆c*. Y el ensayo completo contenía NADPH → FNR → Q → *b₆c* (membranas) → citocromo *c*. En una celdilla de 1.2 ml de capacidad y un cm de paso de luz, se colocó amortiguador de actividad pH 7.0 ó 6.8 (según sea el caso) y se calibró a 0 de absorbancia. Después se arrancó la reacción y

se añadieron los reactivos en el siguiente orden: 0.14 U FNR, 15 μ M quinona, 0.3 mg membranas (dilución 1:3 con amortiguador de actividad e incubadas en hielo por 30 min), 15 μ M citocromo *c* y 15 μ M NADPH separados por lapsos de 15 seg. Para el control de reducción química 1) se colocó en el siguiente orden: 0.14 U FNR, 15 μ M quinona, 15 μ M citocromo *c* y 15 μ M NADPH separados por lapsos de 15 seg; para el control de reducción química 2) se colocó: 0.14 U FNR, 15 μ M quinona, 0.5 mg membranas (dilución 1:3 con amortiguador de actividad e incubadas en hielo por 30 min) y 15 μ M NADPH separados por lapsos de 15 seg. En la parte de abajo se muestran los solventes utilizados para cada reactivo, así como sus ϵ utilizados para determinar la concentración.

Tabla 1. Información de los reactivos utilizados.

REACTIVO	ADQUIRIDO	SOLVENTE	PICO ABS. (nm)	ϵ OXIDADO ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	REFERENCIA
NADPH	Fluka	50mM Tris pH 8.0	340	6.22	Ansari <i>et al.</i> , 2008
Citocromo <i>c</i> corazón de caballo	Sigma	H ₂ O dd	550	21.5	Covian y Trumpower, 2009
Citocromo <i>c</i> ₅₅₀	Purificado	Amortiguador de actividad pH 7.0	550	19	De Vrij <i>et al.</i> , 1987

Las naftoquinonas utilizadas para la caracterización fueron: 2-Metil-3 Fitol- 1,4 Naftoquinona (Filoquinona), 2- Metil- 1,4 Naftoquinona (Menadiona), 5-Hidroxi- 1,4 Naftoquinona (Juglona), 5-8 Dihidroxi- 1,4 Naftoquinona (Naftazarina) y Tetrametil p-benzoquinona (Duroquinona), en la siguiente tabla se indica el solvente en el que se encuentran y sus ϵ utilizados para determinar la concentración.

Tabla 2. Información de las quinonas utilizadas.

QUINONA	ADQUIRIDO	SOLVENTE	PICO ABS. (nm)	ϵ OXIDADO ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	REFERENCIA
Naftazarina	Fluka	DMSO	273	17.4	Bergsma <i>et al.</i> , 1982
Juglona	Sigma	ETOH	270	11.3	Bergsma <i>et al.</i> , 1982
Menadiona	Sigma	ETOH	262	19	Inouye <i>et al.</i> , 1999
Filoquinona	Donado	ETOH	245	15.4	Inouye <i>et al.</i> , 1999
Duroquinona	Sigma	ETOH	263	21.64	Merker <i>et al.</i> , 2006

Resultados

□ Extracción de los plásmidos pHP13 y pHP13-*c*₅₅₀ de *B. subtilis* 168

Se procedió a extraer los plásmidos de *B. subtilis* 168-pHP13 y *B. subtilis* pHP13-*c*₅₅₀. En la figura 11 se muestra un gel de agarosa al 1 % en TBE, de la doble digestión con las enzimas *Eco*RI y *Bam*HI, y el producto de PCR de la construcción pHP13-*c*₅₅₀, donde se pudo observar el tamaño del inserto y el amplificado esperado, de 600 pb.

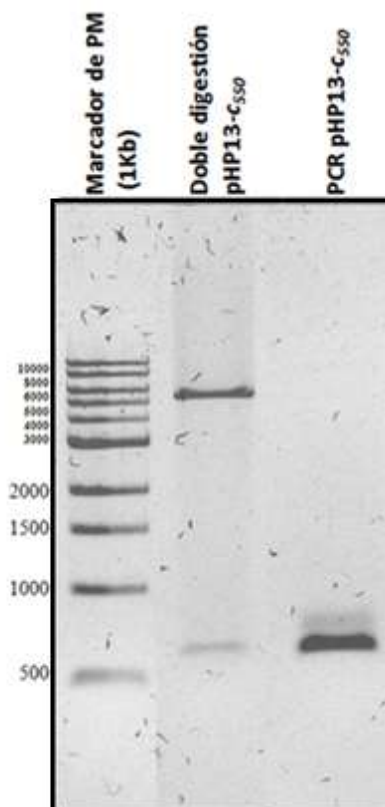


Figura 11. Plásmido pHP13-*c*₅₅₀ extraído de *B. subtilis* 168. Carril 1. Marcador de peso molecular 0.25 µg, Carril 2. Doble digestión con *Eco*RI/*Bam*HI ~1 µg, 3. PCR 0.1 µg DNA como templado.

□ Transformación de *E. coli* DH5α con los plásmidos pHP13 y pHP13-*c*₅₅₀

Debido a que el plásmido pHP13 es de bajo número de copias en *B. subtilis*, se transformó a *E. coli* DH5α para multiplicar la cantidad de plásmido, y

transformar a la mutante *B. subtilis* LUW196. En la Fig. 12 se muestra el análisis de los plásmidos purificados de *E. coli* DH5 α transformada.

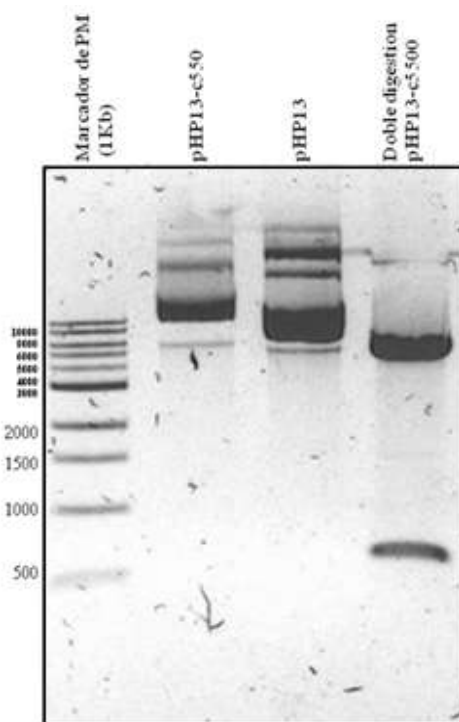


Figura 12. Gel de agarosa 1% en TBE. Carril 1. Marcador de peso molecular 0.25 μ g, Carril 2. Plásmido pHP13-*c550* sin digerir (\sim 0.1 μ g), Carril 3. Plásmido pHP13 sin digerir (\sim 0.1 μ g), Carril 4. Doble digestión con *EcoRI/BamHI* (\sim 1 μ g).

□ Células competentes y transformación de *B. subtilis* LUW196 con los plásmidos pHP13 y pHP13-*c550*

B. subtilis LUW196 posee un genotipo Δ *ctaCD::ble*, Δ *cydABCD::cat* y Δ *ythAB::tet* (resistencia a Fle, Cm y Tet respectivamente) por lo que antes de transformarla con el plásmido se estabilizó en presencia de los tres antibióticos. Primero se creció en cajas con la mitad de las concentraciones reportadas (0.3 μ g/ml Fle, 2.5 μ g/ml Cm y 7.5 μ g/ml Tet), y después con el doble de estas concentraciones.

La competencia de *Bacillus* ocurre a principios de la fase estacionaria por un cambio descendente nutricional, en la figura 13 se muestra la curva de crecimiento y se indica la D.O. a la cual se alcanza aproximadamente dicha competencia, también conocida como tiempo 0 (T₀).

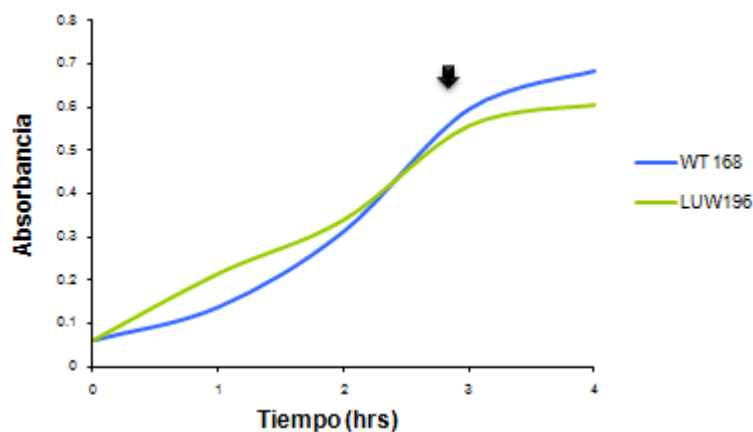


Figura 13. Curvas de crecimiento de las cepas 168 en azul y LUW196 en verde de *B. subtilis*, en las que se indica el momento en el que se obtuvo la competencia. Partiendo de inóculos con una absorbancia inicial de ~ 0.1 a 600nm, se inocularon cultivos de 50 ml y se monitoreó su crecimiento cada hora.

Al final de la transformación, las cepas 168 y LUW196, con pHP13 y pHP13 *C550* se crecieron en cajas con 3 µg/ml Em (para la selección del plásmido) más Trp 20 µg/ml. Las transformantes crecidas se estiraron dos veces en nuevas cajas con antibióticos: cajas con Em 3 µg/ml y cajas con los 4 antibióticos a bajas (Em 1.5, Fle 0.3, Cm 2.5 y Tet 7.5 µg/ml) y altas concentraciones (Em 3, Fle 0.6, Cm 5 y Tet 15 µg/ml) para eliminar posibles falsos positivos. Para la mutante LUW196 pHP13-*C550* se obtuvieron 18 clonas, 10 de las cuales (Fig. 14) se analizaron por medio de un gel tipo cracking (clonas lisadas y calentadas), para observar la presencia y tamaño de los plásmidos (Fig. 15). Se observó que todas las clonas (carriles 1-5 y 9-13) presentaron una banda que coincide con uno de los tamaño de los plásmidos pHP13 y pHP13 *C550* super-enrollados extraídos de *E. coli* DH5α considerados como control.

De las 10 clonas analizadas, tres se seleccionaron para determinar la identidad del plásmido por digestiones con *EcoRI/BamHI* y por reacciones de PCR (Fig. 16). La clona 3 mostró el fragmento de 600 pb correspondiente al inserto del *C550*, sin embargo no se obtuvo amplificado del mismo tamaño en el PCR. La clona 11 mostró el fragmento de 600 pb por digestión así como el amplificado del tamaño esperado. La clona 13 no mostró ni liberación del fragmento ni amplificación.



Figura 14. Cajas de LB- Em 3µg/ml con las bacterias crecidas por segunda vez mostrando las 10 clonas seleccionadas.

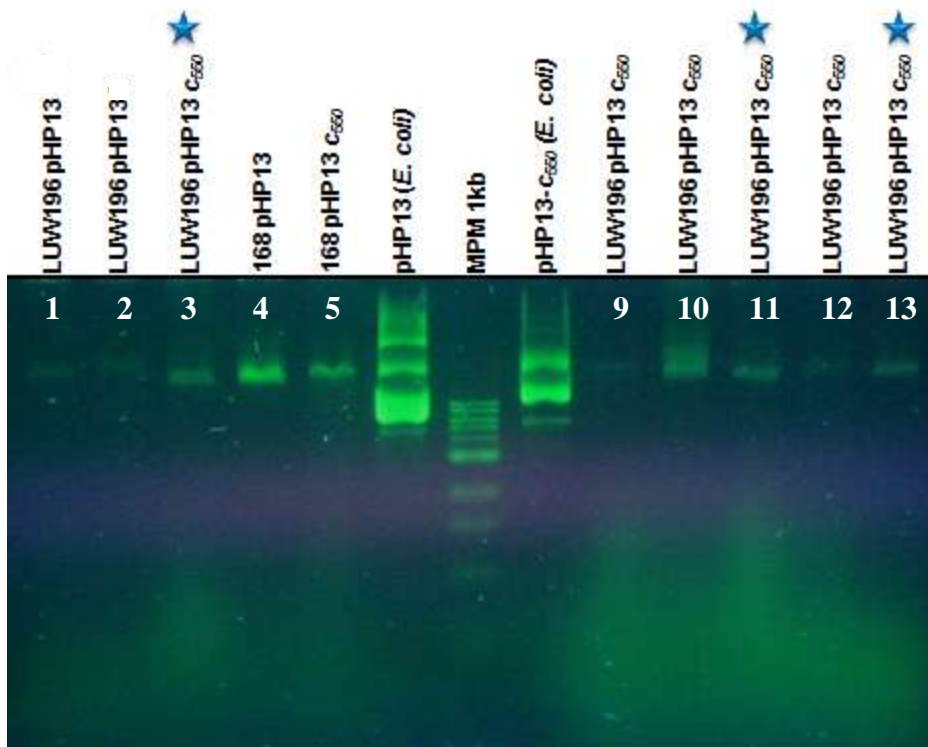


Figura 15. Gel de agarosa al 1% en TBE por el método de lisado de las clonas transformadas. Carriles 6, 7 y 8: plásmido pHP13 extraído de *E. coli* DH5 α , el marcador de peso molecular de 1kb y el plásmido pHP13 C_{550} extraído de *E. coli* DH5 α (respectivamente) utilizados como controles. En los primeros y últimos 5 carriles se muestran las 10 clonas seleccionadas, numeradas de izquierda a derecha. Las estrellas azules marcan las posibles clonas positivas que se eligieron para seguir el análisis.

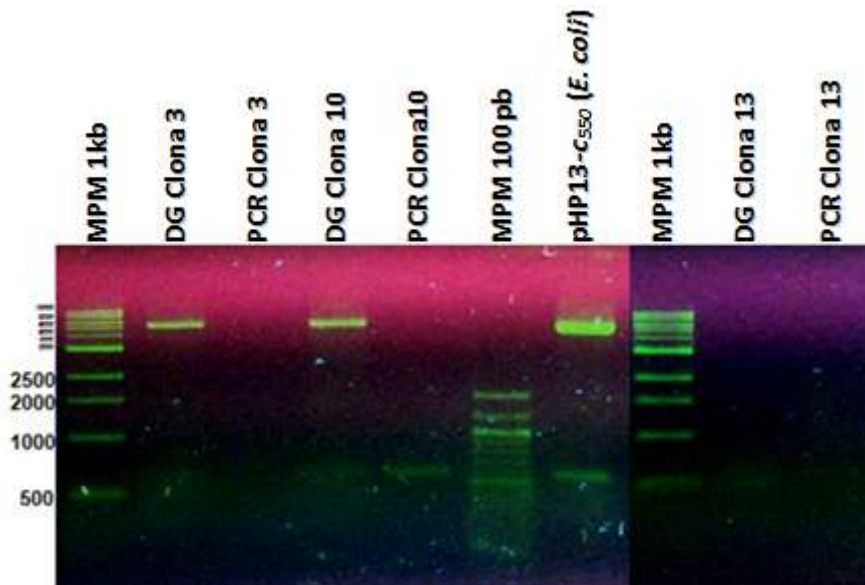


Figura 16. Gel de agarosa al 1% en TBE. 1. Marcador de peso molecular 1kb; 2 y 3. Doble digestión y PCR de la clona 3 LUW196 pHP13 *C550*; 4 y 5. Doble digestión y PCR de la clona 8 LUW196 pHP13 *C550*; 6. Marcador de peso molecular de 100pb; 7. Doble digestión del plásmido pHP13 *C550* extraído de *E. coli*, tomado como control; 8. Marcador de peso molecular 1kb; 9 y 10. Doble digestión y PCR de la clona 10 LUW196 pHP13 *C550*.

Para la transformación de LUW196 con el plásmido pHP13 se obtuvieron 45 clonas, de las cuales solo 14 de ellas mantuvieron su crecimiento después de dos pases en cajas con 3 µg/ml Em (Fig. 17). En presencia de los 4 antibióticos a bajas y altas concentraciones (Fig. 18).

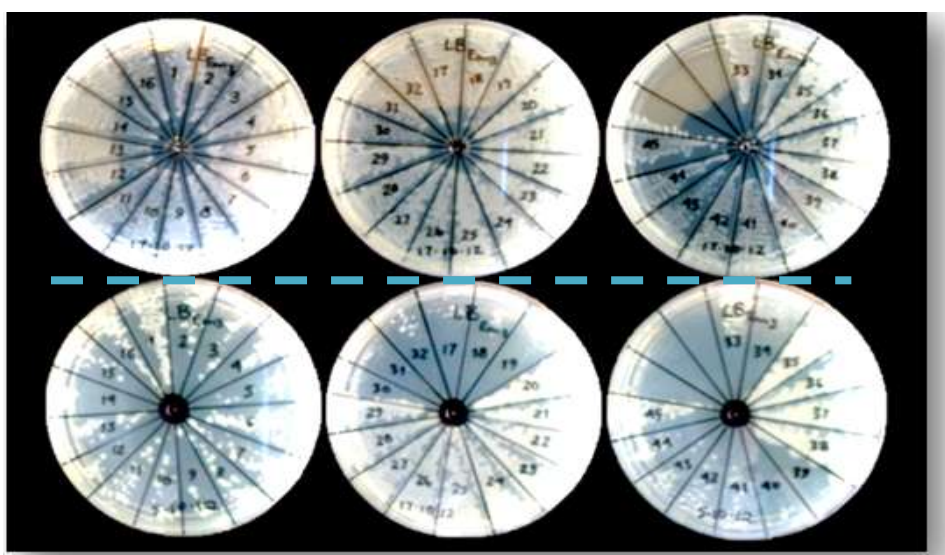


Figura 17. Cajas de LB-Em 3µg/ml donde crecieron las 45 clonas obtenidas en la transformación, arriba primer pase y abajo segundo pase.



Figura 18. Cajas de LB-Em 3 µg/ml en las que crecieron las 13 clonas positivas con los cuatro antibióticos a bajas concentraciones (izquierda) y altas concentraciones (derecha).

Las 14 clonas positivas se analizaron en un gel “cracking” (Fig. 19) donde se observó que todas presentaron tres bandas, una en la parte superior del gel, indicativa de la presencia de DNA cromosomal, otra correspondiente al plásmido con un tamaño de ~4900pb correspondiente al vector, y un difuminado en la parte inferior que muestra la presencia de RNA.

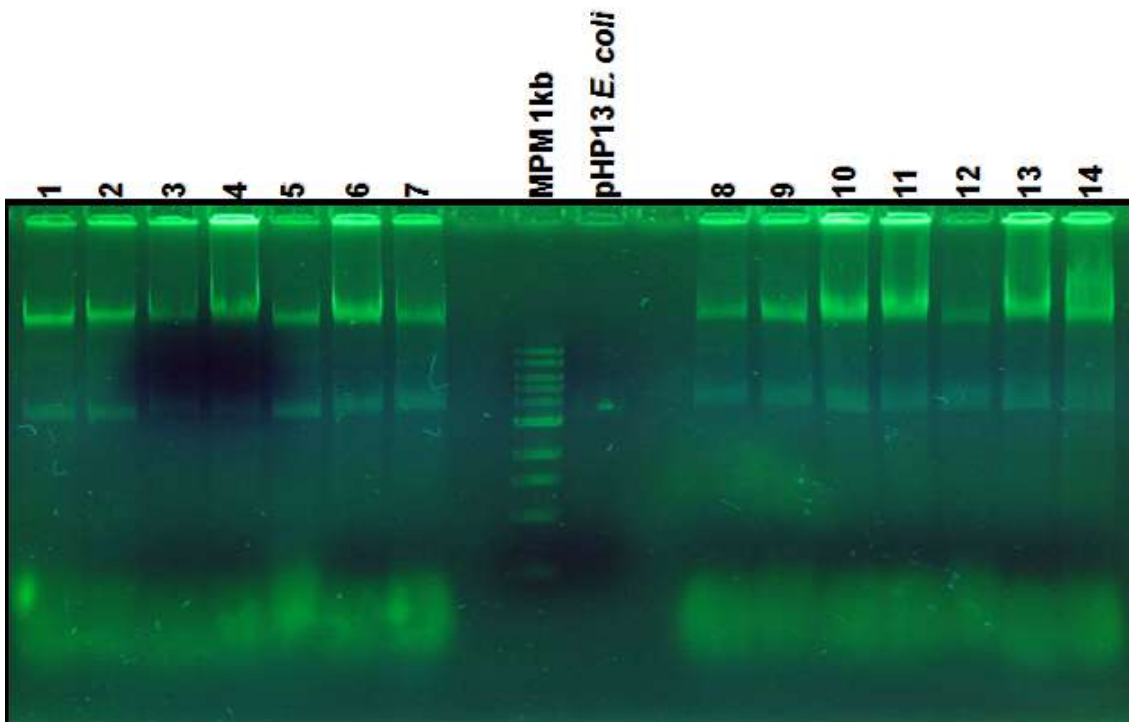


Figura 19. Gel cracking de agarosa al 1% en TBE de las 14 clonas de LUW196 transformadas con el plásmido pHP13. En los carriles centrales se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb (MPM 1kb) y el plásmido pHP13 extraído de *E. coli* considerado como control.

Posteriormente sólo 4 se seleccionaron para confirmar su identidad, realizando dobles digestiones con las enzimas *EcoRI/BamHI* y PCR's, mostrando así que sólo se encontraba el vector de 4900 pb sin liberación ni amplificación de inserto de 600 pb (Fig. 20A y B).

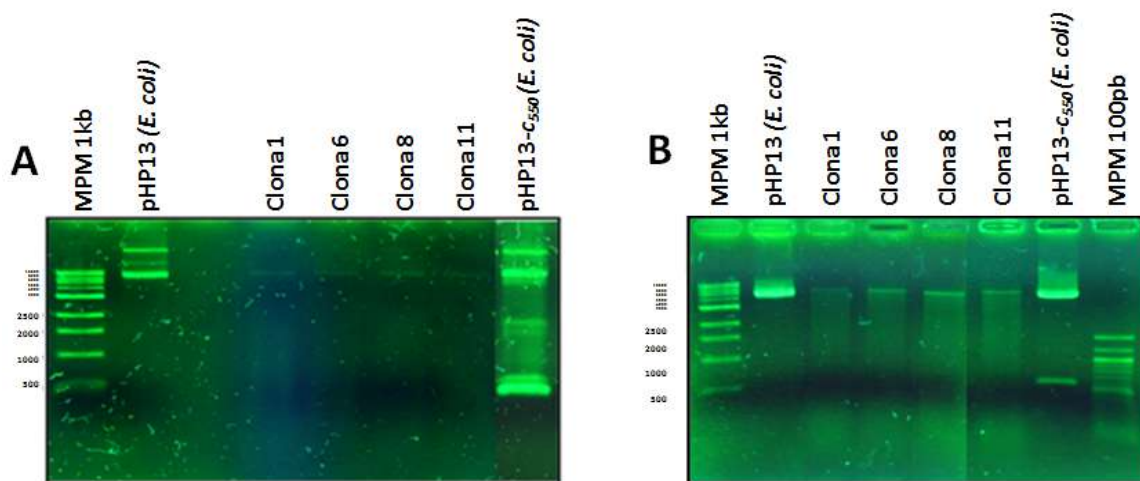


Figura 20. Geles de agarosa al 1% en TBE. A. Dobles digestiones con *EcoRI/BamHI*; y B. PCR's con oligonucleótidos específicos para el citocromo *c*₅₅₀ de las cuatro clonas seleccionadas de la transformación. Los plásmidos pHP13 y pHP13 *c*₅₅₀ (*E. coli*) se tomaron como control.

□ Selección del medio de crecimiento para la cepa *B. subtilis* LUW196-pHP13 *c*₅₅₀

Se realizaron curvas de crecimiento de la cepa de *B. subtilis* LUW196 pHP13 *c*₅₅₀ en dos medios diferentes (MSR suplementado con 3 % succinato y MM con 0.5 % glucosa) (Fig. 21A) con el objetivo de seleccionar aquel con el que se obtuviese un mejor rendimiento de citocromo *c*. El MM presentó un retraso para alcanzar la fase estacionaria, pero al término de las 23.5 hrs, ambos mostraron la misma D.O. También se observó que ambos cultivos cambiaron de color, el MM de ser transparente se tornó rosa, y el MSR de café a naranja (Fig. 21B).

Se prepararon membranas de las alícuotas tomadas a las 5, 9 y 23.5 hrs de crecimiento, separando el medio de cultivo, las membranas y el citoplasma. Por medio de espectros de absorción diferenciales de cada una de estas

fracciones, se determinó que en MSR a las 23.5 hrs se encontraba el mayor contenido de citocromo c_{550} (Fig. 22).

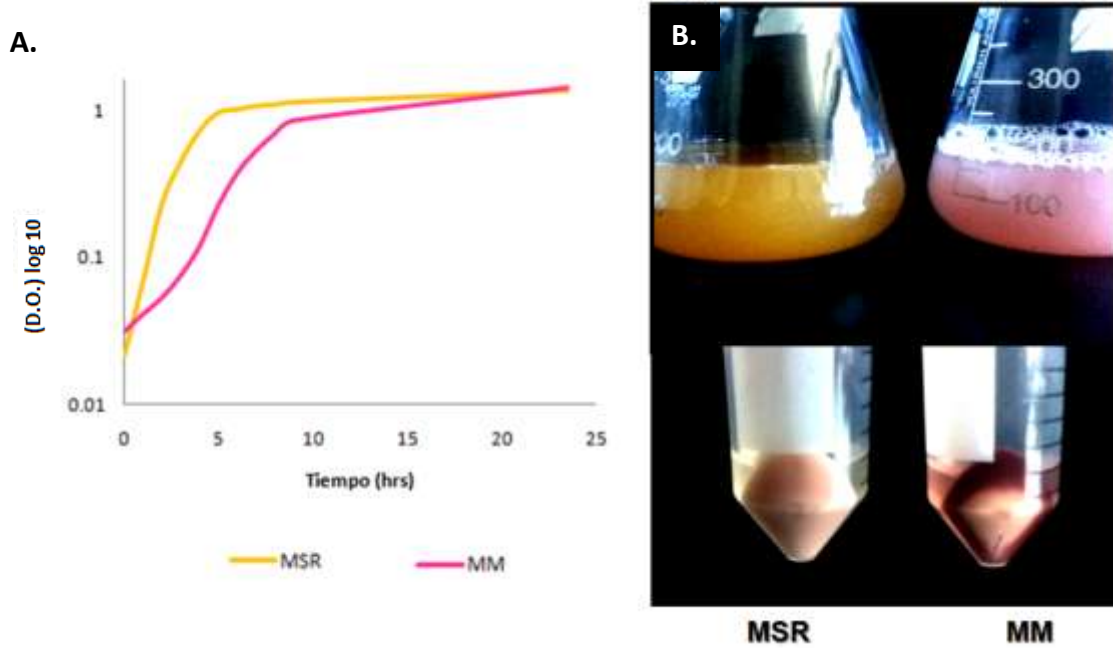


Figura 21. A. Curvas de crecimiento en dos medios diferentes de la cepa *B. subtilis* LUW168 pHP13 c_{550} , MSR con 3% succinato- línea amarilla y MM con 0.5% de glucosa- línea rosa. B. Comparación del color de los cultivos a las 23.5hrs de crecimiento.

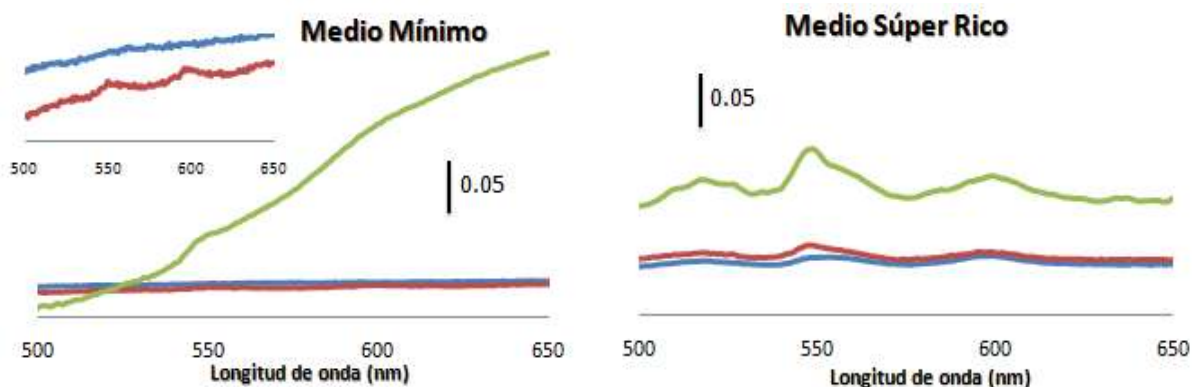


Figura 22. Espectros diferenciales de absorción (ditionita menos oxidado) en el rango de 500-650 nm de las membranas de la cepa *B. subtilis* LUW168 pHP13 c_{550} crecida en MM (izquierda) y MSR (derecha) a las 5, 9 y 23.5 hrs de crecimiento (azul, rojo y verde respectivamente). Inserto- ampliación. Únicamente se muestra el resultado final.

□ Curvas de crecimiento y contenido de citocromos en MSR

Se realizaron curvas de crecimiento hasta las 23.5 hrs de las cepas LUW196, LUW196 pHP13 y LUW196 pHP13 *c₅₅₀* para descartar algún efecto en el crecimiento a causa del plásmido o la sobreexpresión del citocromo (Fig. 23). Posteriormente, se obtuvieron membranas a partir de 1 Lt MSR con sus respectivos antibióticos (a bajas concentraciones) por 23.5 hrs de cada cepa (Fig. 24).

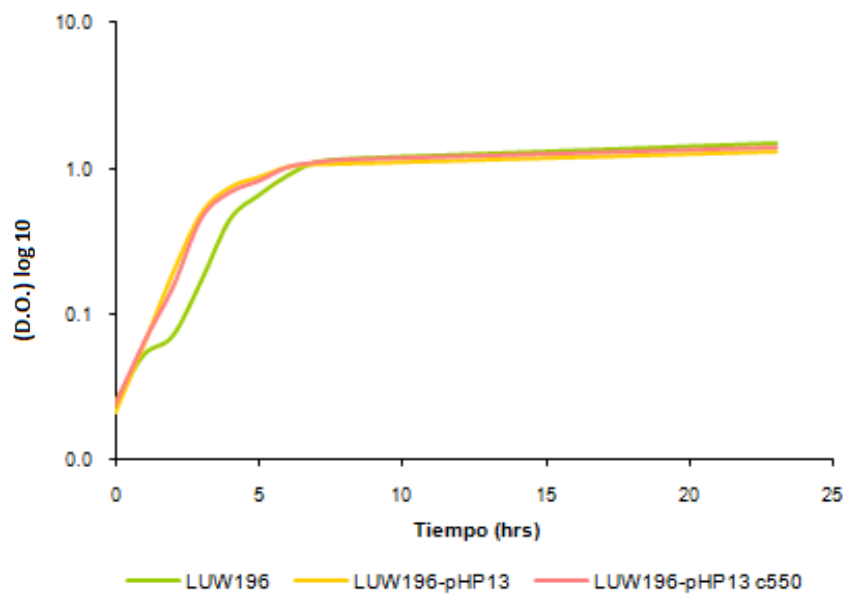


Figura 23. Curvas de crecimiento de las 3 cepas en MSR.



Figura 24. Pellet de las células cosechadas de 1 Lt de cultivo a las 23.5 hrs en MSR de las cepas LUW196, LUW196 pHP13 y LUW196 pHP13-*c₅₅₀* (izquierda a derecha)

Se obtuvo la concentración de proteína de las membranas por el método de Lowry y UV, se les realizaron espectros de absorción diferenciales (ditiotionita menos oxidado, Fig. 25). Como se muestra en la Tabla 3, la cepa LUW196 pHP13 *c*₅₅₀ muestra la sobreexpresión del citocromo *c*₅₅₀. Además las membranas se analizaron con geles bidimensionales CN- SDS PAGE para ver la sobreexpresión de la proteína (ver Apéndice I, Figs. 58 y 59).

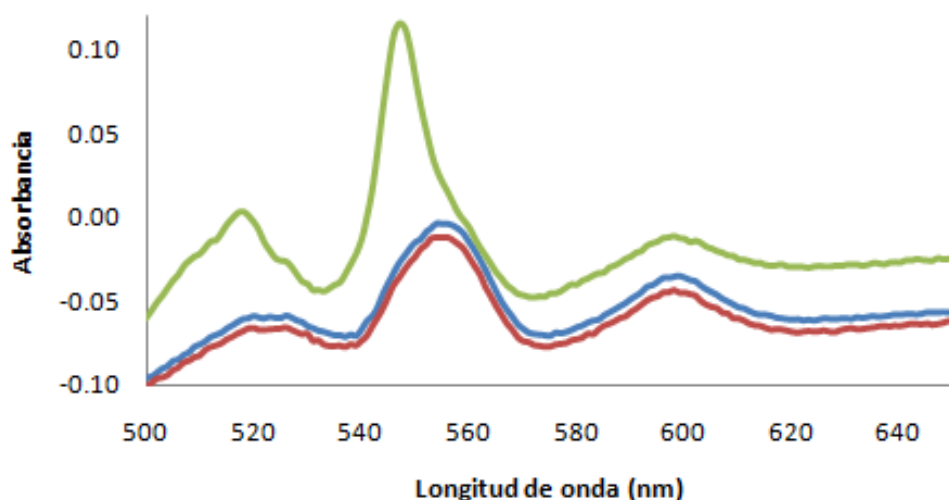


Figura 25. Espectros diferenciales de absorción (ditiotionita - oxidado) en el intervalo de 500-650 nm de las membranas obtenidas de las cepas LUW196 (azul), LUW196 pHP13 (rojo) y LUW196 pHP13 *c*₅₅₀ (verde).

Tabla 3. Cantidad de proteína, concentración y estequiometría de citocromos de las membranas extraídas de las cepas LUW196, LUW196 pHP13 y LUW196 pHP13 *c*₅₅₀.

	Concentración (mg proteína/ml membrana)			nmoles citocromo/mg proteína [uM]			ESTEQUIOMETRÍA		
	Lowry	UV	Promedio	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>c/a</i>	<i>c/b</i>	<i>b/a</i>
LUW196	15.88	13.92	14.9	2.7 7.94	4.5 13.5	4.6 13.66	1.72	1.01	1.70
LUW196 pHP13	15.85	14.08	14.97	2.5 7.42	4.7 14.03	3.9 11.76	1.58	0.84	1.89
LUW196 pHP13 <i>c</i> ₅₅₀	15.13	11.08	13.11	2.2 5.76	4.4 11.58	15.9 41.58	7.22	3.59	2.01

□ Pruebas de tripsinización de las membranas de LUW196-pHP13 *c*₅₅₀

Se realizaron pruebas de proteólisis utilizando 100 U de tripsina y 0.6 mg de proteína (basados en pruebas con la silvestre, datos no mostrados). Al sobrenadante resultante de la tripsinización, se le hicieron espectros de absorción y se cargaron 0.2 nmoles de citocromo *c* en un gel con gradiente 10-14 % de poliacrilamida con el método de Schägger y von Jagow (Fig. 26).

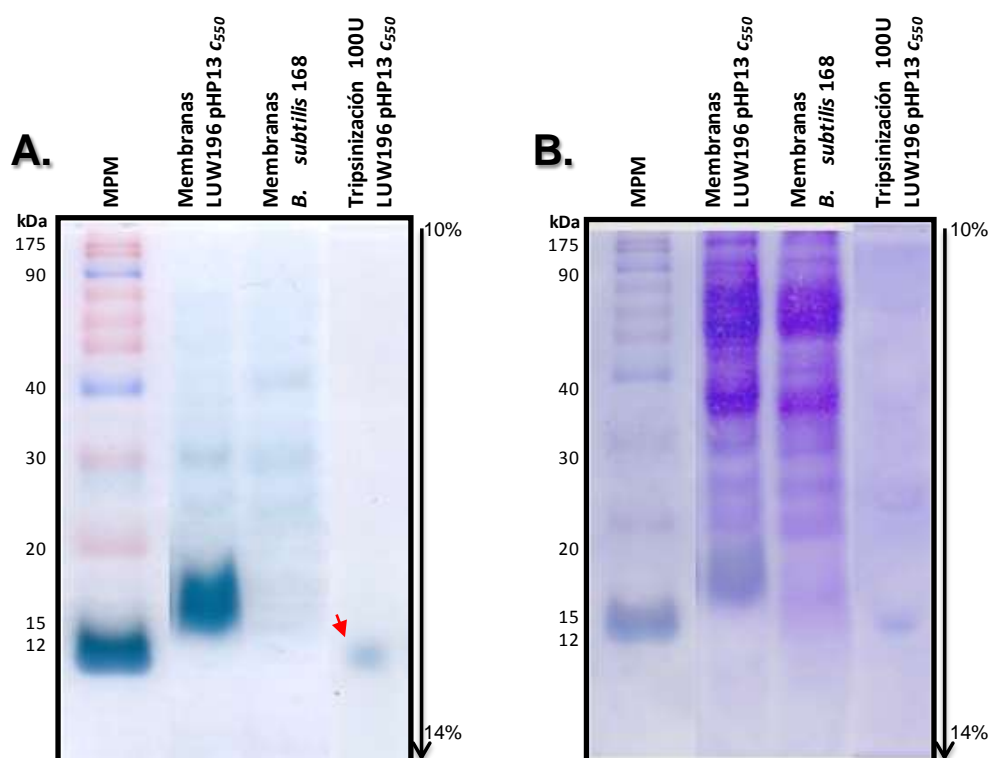


Figura 26. Geles de poliacrilamida SDS por el método de Schägger y von Jagow con un gradiente del 10-14 %. A Tinción con TMBZ, B. Tinción con azul de Coomassie. Para ambos casos 1. MPM 30 μ l; 2. Membranas sin tripsinizar de la cepa LUW196 pHP13 *c*₅₅₀ (0.1 nmoles citocromo *c*); 3. Membranas de *B. subtilis* 168 (0.1 nmoles citocromo *c*); 4. 0.2 nmoles del sobrenadante obtenido de la tripsinización de membranas de la cepa LUW196 pHP13 *c*₅₅₀. La flecha roja indica el citocromo *c* obtenido de ~12 kDa.

Se observó que la banda de citocromo *c* obtenida era de ~12kDa correspondiente al *c*₅₅₀ completo, por lo que se decidió realizar una doble tripsinización del sobrenadante con 100 U de tripsina TPCK, para 1.86 mg, 3.7 mg y 7.4 mg de proteína membranal inicial. Los sobrenadantes se analizaron por medio de espectros de absorción y cargando 0.2 nmoles en el mismo tipo de gel (Fig. 27).

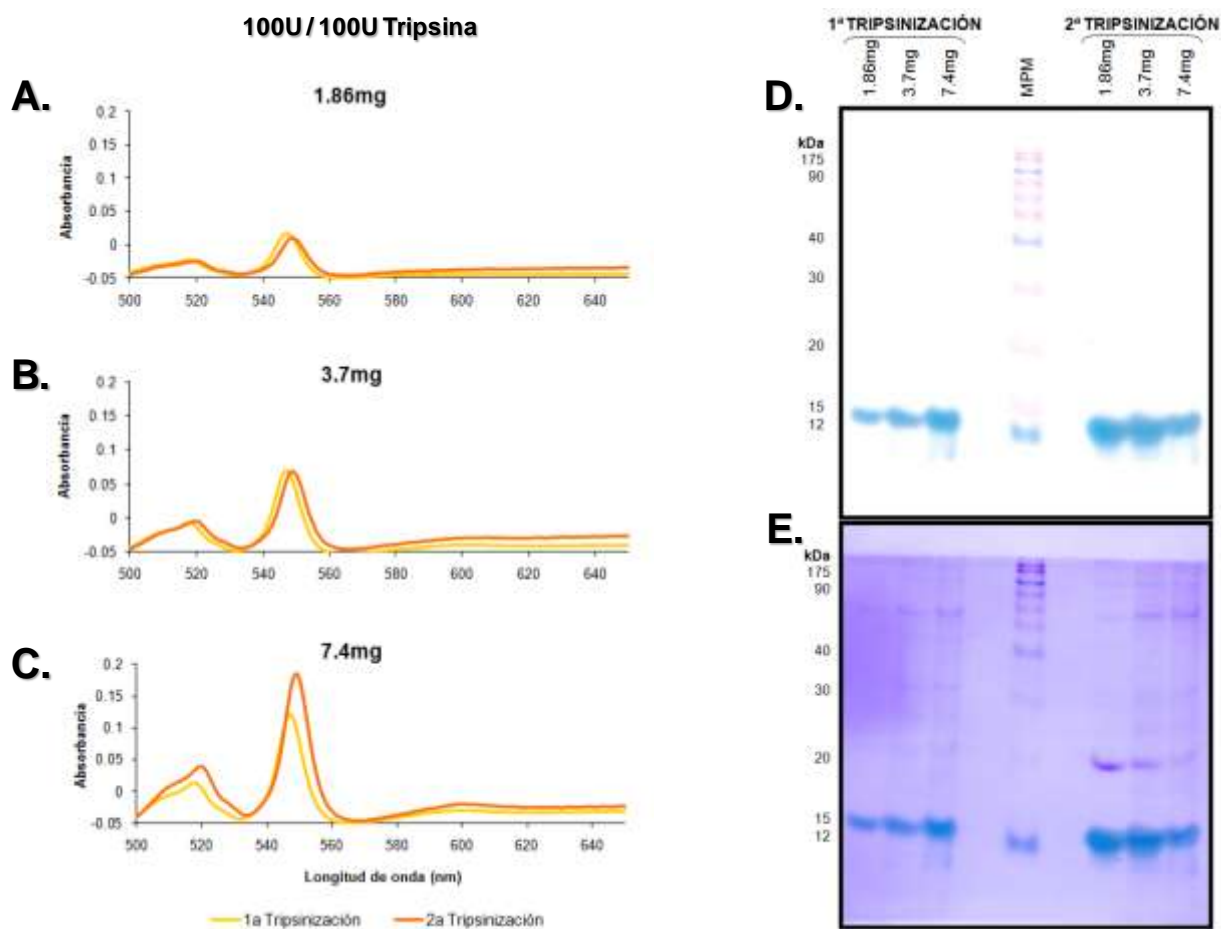


Figura 27. A., B. y C. Espectros diferenciales de absorción (ditionita menos oxidado) en el intervalo de 500-650 nm de la doble proteólisis con 100 U de tripsina cada una, de 1.86 mg, 3.7 mg y 7.4 mg respectivamente de membranas de la cepa LUW196 pHP13 *c₅₅₀*. D. y E. Gel de poliacrilamida SDS por el método de Schägger y von Jagow con un gradiente del 10-14 % teñidos con TMBZ y azul de Coomassie respectivamente de la 1ª y 2ª tripsinización (0.2 nmoles citocromo c en cada carril).

Se apreció que se comenzaba a liberar un poco del citocromo c, por lo que se decidió incrementar la cantidad de tripsina utilizando en esta ocasión 100 U para la 1ª y 400 U para la 2ª (Fig. 28), consiguiendo el fragmento de ~6.2 kDa.

Debido a la liberación parcial del fragmento soluble, se incrementó el tiempo de incubación de 15 min a 30 y 60 min en la segunda tripsinización, logrando finalmente la liberación completa del fragmento de ~6.2 kDa (Fig. 29).

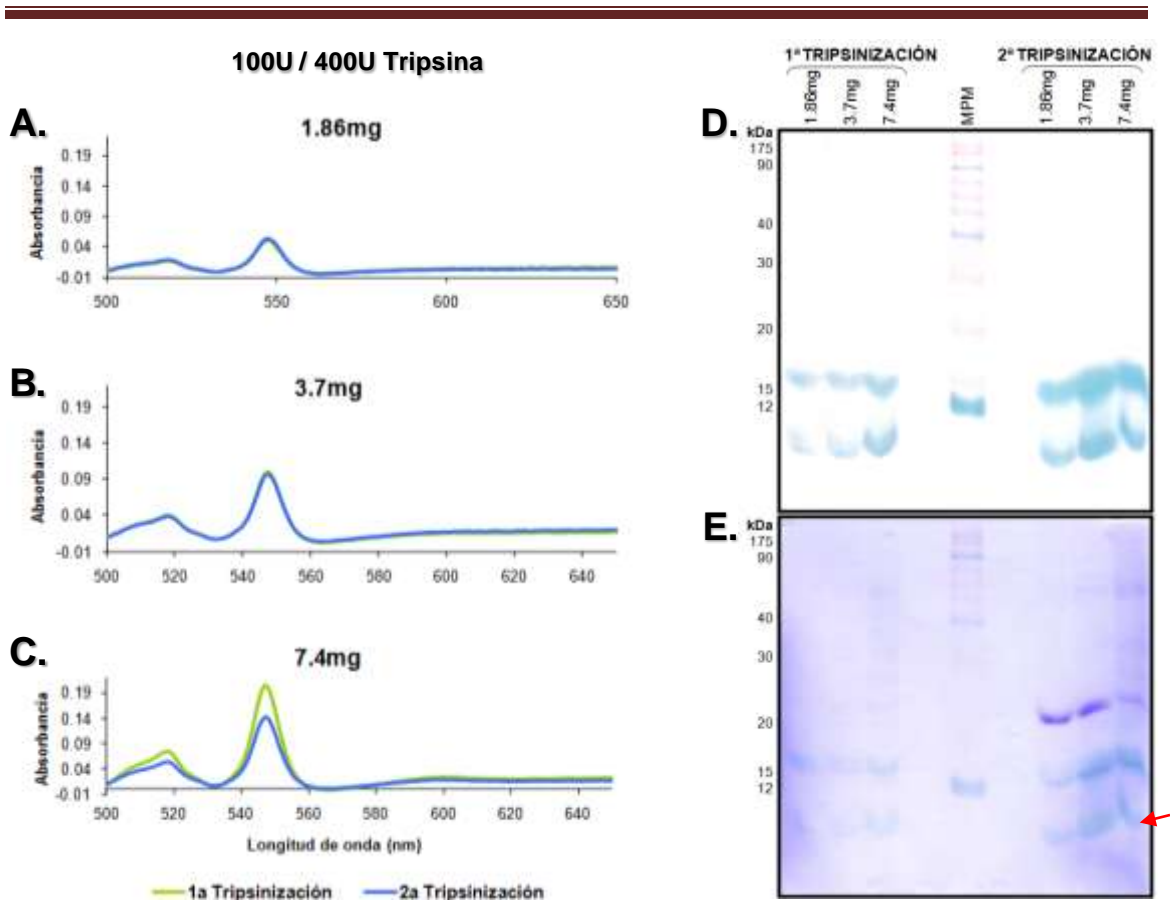


Figura 28. A., B. y C. Espectros diferenciales de absorción (ditiotionita menos oxidado) en el rango de 500-650 nm de la doble proteólisis con 100 y 400 U de tripsina, de 1.86 mg, 3.7 mg y 7.4 mg respectivamente de membranas de la cepa LUW196 pHP13 *c₅₅₀*. D. y E. Gel con un gradiente del 10-14 % de poli(acrilamida SDS por el método de Schägger y von Jagow teñidos con TMBZ y azul de Coomassie respectivamente de la 1^a y 2^a tripsinización (0.2 nmoles citocromo *c* en cada carril). La flecha roja muestra el fragmento soluble de ~ 6.2 kDa.

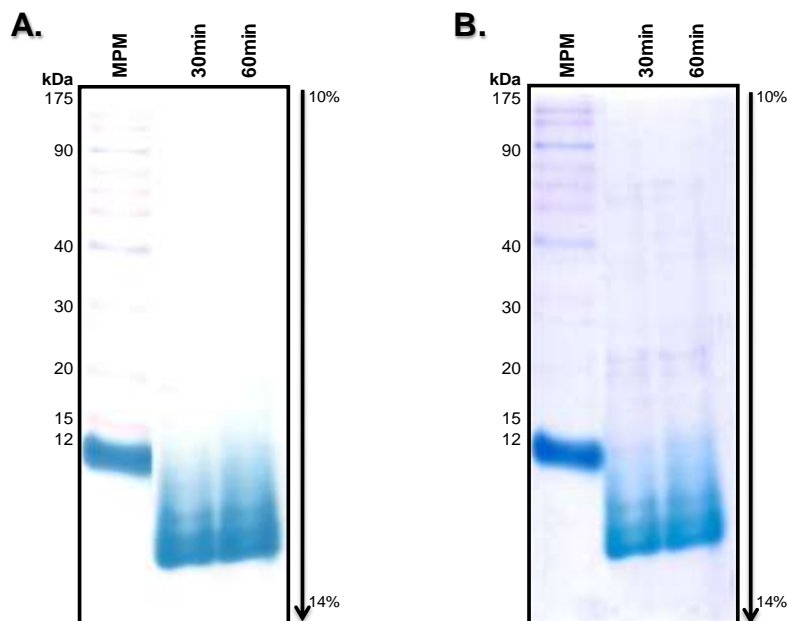


Figura 29. Gel de poli(acrilamida SDS por el método de Schägger y von Jagow con un gradiente del 10-14 % teñidos con A. TMBZ y B. azul de Coomassie, de la segunda incubación por 30 y 60min del sobrenadante con 400 U de tripsina (0.2 nmoles citocromo *c* en cada carril).

Para obtener una gran cantidad del fragmento soluble del citocromo c_{550} , se procedió a crecer, cosechar y preparar membranas a partir de 16 litros de cultivo en MSR de la cepa LUW196-pHP13 c_{550} . Se obtuvieron 200.81 g de bacterias y 125 ml de membranas, con una concentración de proteína de 20.35 mg/ml y 2.7 g de proteína total. En la figura 30 se muestran los espectros diferenciales de esas membranas, y en la tabla 4 la concentración y relación de citocromos.

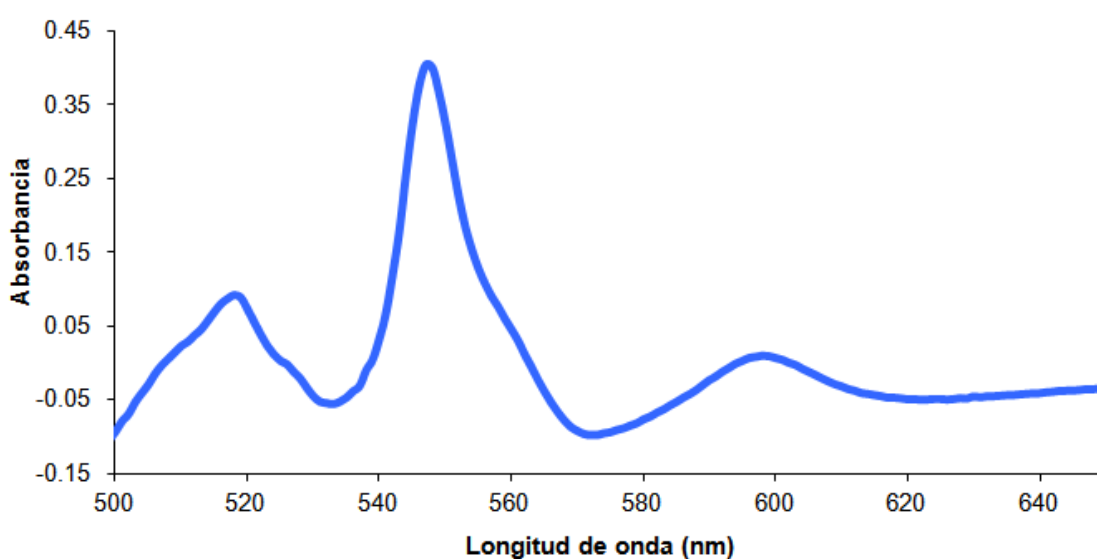


Figura 30. Espectro diferencial de absorción ditionita menos oxidado en el rango de 500-650 nm de las membranas extraídas de LUW196 pHP13 c_{550} .

Tabla 4. Contenido de proteína y estequiometría de citocromos de las membranas extraídas de la cepa LUW196 pHP13 c_{550} .

Concentración (mg proteína/ml membrana)			nmoles citocromo/mg proteína [uM]			Estequiometría		
Lowry	UV	Promedio	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>c/b</i>	<i>c/a</i>	<i>b/a</i>
20.35	21.16	20.76	0.51	0.99	3.20	3.2	6.3	1.9
			10.4	20.1	65.1			

Los 2.7 g de proteína de membrana se tripsinizaron con la relación 5.2 nmoles de citocromo c:100 U de tripsina. El sobrenadante obtenido se tripsinizó con la relación 5.2 nmoles de citocromo:400 U de tripsina (Fig. 31).

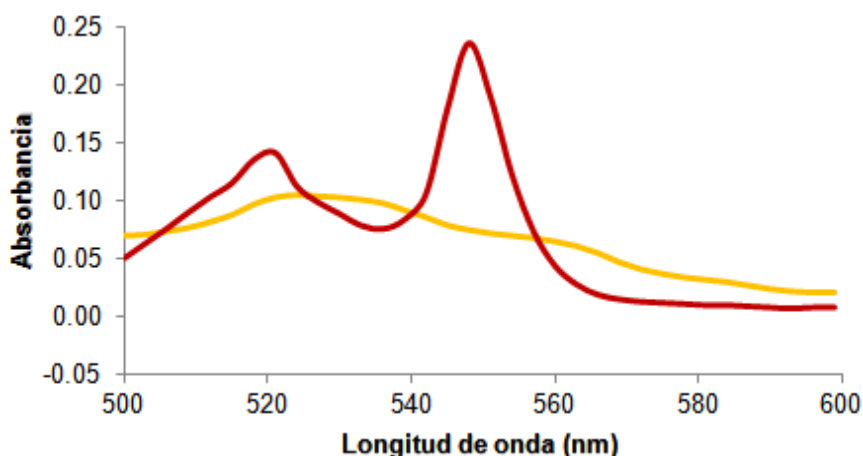


Figura 31. Espectros de absorción en el rango de 500-600 nm del sobrenadante obtenido después de la primera proteólisis con 100 U de tripsina de membranas de la cepa LUW196 pHP13 *c₅₅₀*, considerados para calcular los nmoles de citocromo c obtenidos y realizar la segunda proteólisis con 400 U de tripsina. Rojo: espectro oxidado con un poco de FCN y Amarillo: diferencial ditionita menos ferricianuro.

Una vez detenida la proteólisis con 1mM AEBSF y después de cargar el sobrenadante obtenido a la resina DEAE Biogel A de intercambio iónico, se obtuvo el perfil cromatográfico (Fig. 32). De éste se pudieron separar dos fracciones: 1 que contenía citocromo y proteína (obtenida a 228.5 mM NaCl), y la 2 que sólo mostraba proteína.

Al obtener los espectros de absorción de cada fracción nos percatamos de que la segunda fracción sí contenía citocromo (Fig. 33B), aunque comparativamente con la primera fracción (Fig. 33A), el contenido es menor (nótese la escala).

Se determinó la concentración de citocromo c y se cargaron 0.5 y 0.15 nmoles de la fracción 1 y de la fracción 2 respectivamente, en un gel de poliacrilamida al 16 % por el método de Schägger y von Jagow.

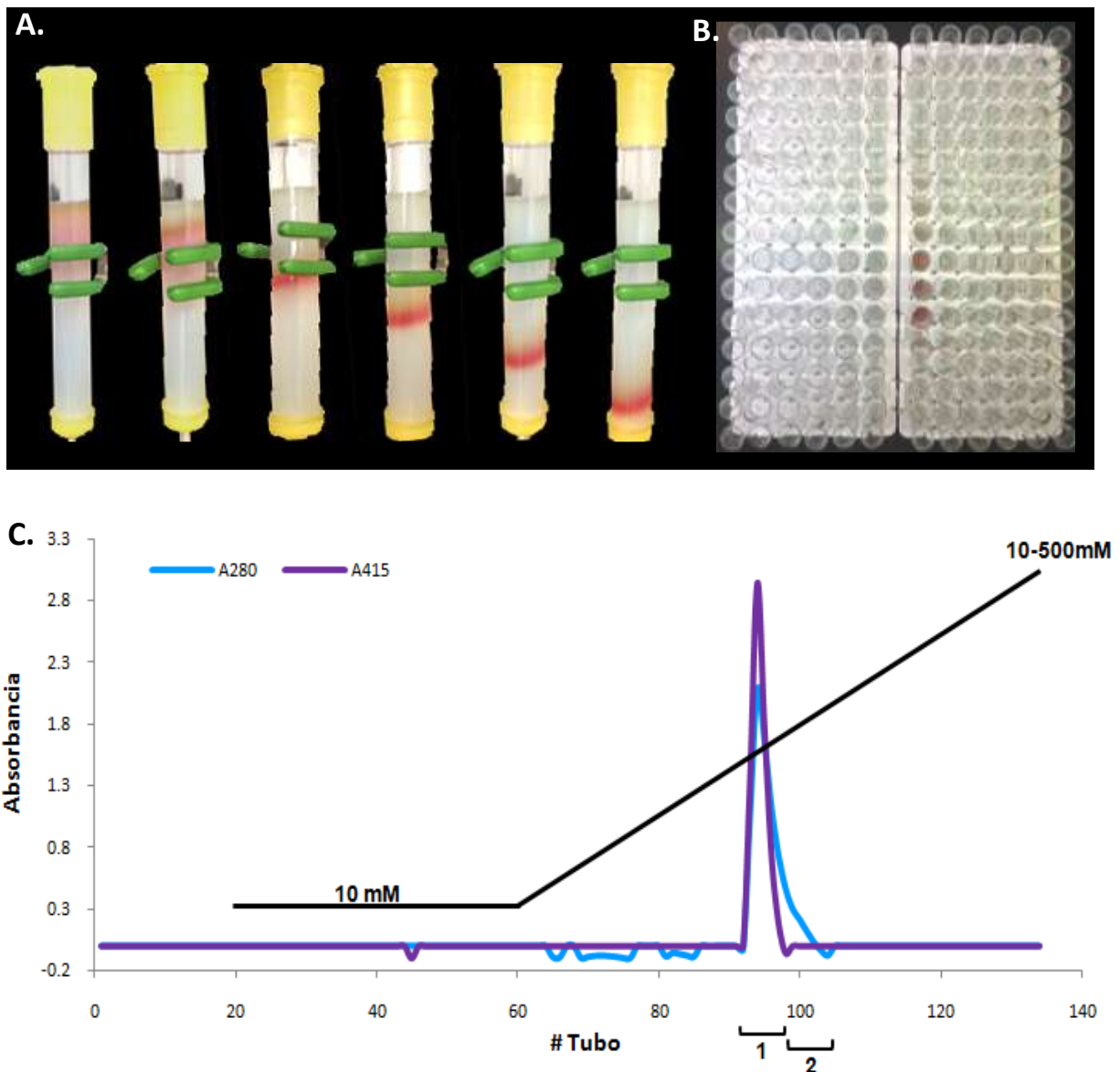


Figura 32. A. Cromatografía del citocromo c_{550} en la resina DEAE Biogel A; B. Fracciones colectadas; C. Perfil cromatográfico del citocromo c_{550} en la resina de intercambio iónico DEAE Biogel A se muestra la absorbancia a 280 y 415 nm (azul y morado, para proteína y citocromos, respectivamente). Del tubo 20 al 60 se realizó un lavado con 10 mM NaCl e inmediatamente después se inició un gradiente de 10-500 mM NaCl. Los números 1 y 2 muestran las fracciones obtenidas, separadas por su contenido de proteína/citocromo y sólo proteína.

Con la tinción de TMBZ se observaron dos poblaciones de citocromo *c*: una de ~6.2 kDa y una de mayor peso (~10 kDa) (Fig. 34A). Con la tinción de Coomassie se observaron proteínas de mayor peso molecular (Fig. 34B).

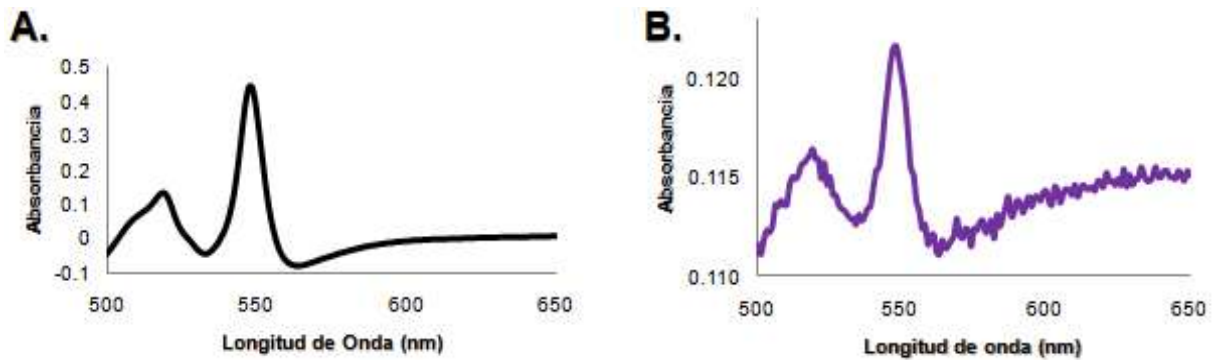


Figura 33. Espectros diferenciales de absorción en el rango de 500-650 nm para observar el pico alfa de citocromos de las fracciones obtenidas en el perfil cromatográfico de la resina DEAE Biogel A. A. Fracción 1, B. Fracción 2.

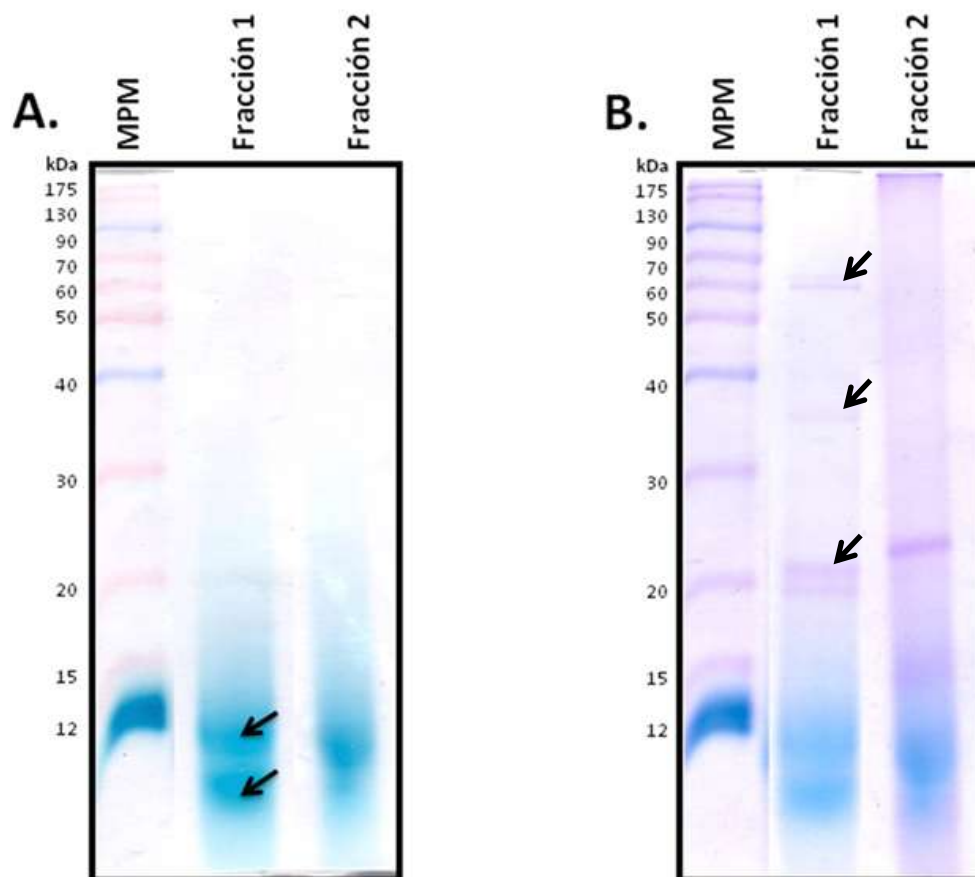


Figura 34. Gel al 16 % de poliacrilamida-SDS por el método de Schägger y von Jagow de las fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico. A. Tinción con TMBZ específica para citocromos covalentemente unidos, las flechas indican dos bandas difusas que dieron señal, B. Tinción con azul de Coomassie. Para ambos gels: 1. MPM; 2. Fracción 1 con 0.5 nmoles; 3. Fracción 2 con 0.15 nmoles.

Para poder eliminar las proteínas de mayor tamaño (Fig. 34B), se decidió cargar la fracción 1 en una columna que contenía la resina de filtración en gel Sephadex G-50 fina. El perfil cromatográfico se muestra en la figura 35, así como las 3 nuevas fracciones obtenidas. Se puede notar claramente que la fracción 2 de esta última cromatografía mostró absorbancia alta tanto de proteína como de citocromo, por lo que se separó y concentró, para analizar por medio de un gel de poliacrilamida.

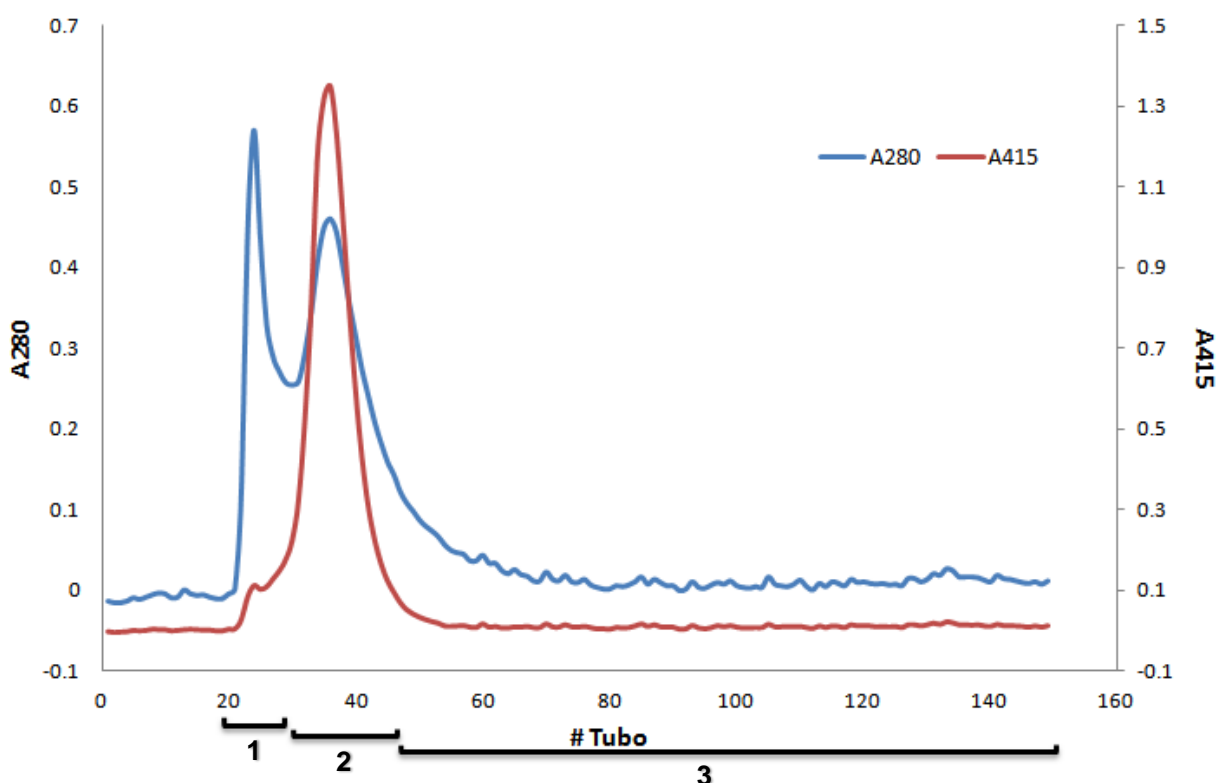


Figura 35. Perfil cromatográfico de la resina de filtración en gel Sephadex G-50 fina obtenido a lecturas de 280 y 415 nm (azul y rojo respectivamente). Los números 1, 2 y 3 muestran las fracciones obtenidas, separadas por su contenido de proteína/citocromo.

En el gel teñido con TMBZ se observó una banda de aproximadamente 6.2 kDa (correspondiente al citocromo c_{550} soluble), mejor definida que la banda obtenida de mayor peso molecular que dio positivo para grupos hemo (Fig. 36A). Con la tinción con azul de Coomassie, se observó una pequeña cantidad de proteína de mayor peso molecular (Fig. 36B) que solo fue apreciable al

cargar 1 nmol de citocromo. Una vez puro (Fig. 37) se decidió empezar los ensayos de actividad del complejo b_6c de *B. subtilis*.

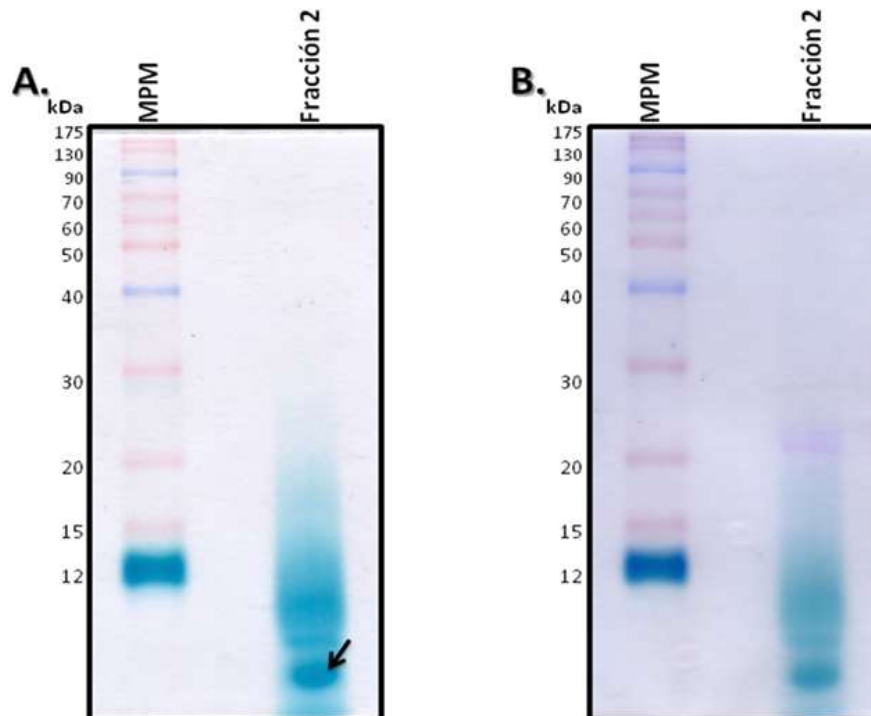


Figura 36. Gel al 16 % poliacrilamida SDS por el método de Schägger y von Jagow de la fracción 2 de la cromatografía de filtración en gel, cargando 1nmol. A.-Tinción con TMBZ, la flecha indica la banda mejor definida y B. Tinción con azul de Coomassie.



Figura 37. Muestra del fragmento purificado del citocromo c_{550} de *B. subtilis*.

Las membranas tripsinizadas también se analizaron y se les determinó la concentración tanto de citocromos como de proteína (Fig. 38 y Tabla 5) y con geles bidimensionales CN-SDS PAGE (ver Apéndice I, Figs. 59 y 60). De este análisis se comprobó que la concentración de citocromo *b* ahora es mayor que la del citocromo *c*, confirmando la liberación de este último, y se logró determinar el rendimiento de la purificación del citocromo *c* (Tabla 6).

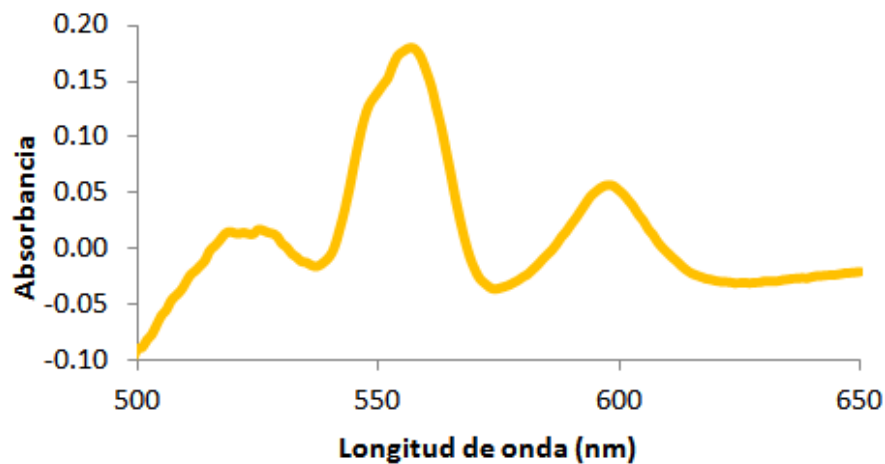


Figura 38. Espectro diferencial de absorción ditionita menos oxidado, en el rango de 500-650 nm de las membranas solubilizadas con 0.6 mg DDM/mg proteína de la cepa LUW196 pHP13 *c₅₅₀* después de la proteólisis con tripsina.

Tabla 5. Contenido de proteína y estequiometría de citocromos de las membranas tripsinizadas de la cepa que sobreexpresa el citocromo *c₅₅₀* (LUW196 pHP13 *c₅₅₀*).

Concentración (mg proteína/ml membrana)			nmoles citocromo/mg proteína [uM]			ESTEQUIOMETRÍA		
Lowry	UV	Promedio	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>c/a</i>	<i>c/b</i>	<i>b/a</i>
18.93	20.53	19.73	1.7	3.2	2.4	1.42	0.73	1.94
			13.22	25.64	18.79			

Tabla 6. Rendimiento durante la purificación del dominio soluble del citocromo *c*₅₅₀ de *B. subtilis*.

Paso	Proteína (mg)	Citocromo <i>c</i> (nmoles)	Contenido (nmol/mg)	Recuperación (%)	Veces de purificación
Membranas	2747	8791.2	3.2	100	-
Sobrenadante	926.2	3974.4	4.3	45	1
DEAE-Biogel A	30.6	3278	107	37	33
Sephadex G-50 fina	15	2682	179	31	56

□ Reducción de quinonas por medio de la FNR de *Fremyella diplosiphon*

Como ya se mencionó, en el trabajo de licenciatura se midió la actividad del complejo *b₆c* en membranas aisladas utilizando 11 diferentes naftoquinonas. Se seleccionaron tres de ellas, con las que se obtuvo una actividad específica alta comparada con la que se obtuvo utilizando al análogo de la benzoquinona el DBH₂ y con la actividad del complejo III de mitocondrias de levadura, (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad específica (nmoles de citocromo *c* de corazón de caballo reducido min⁻¹ mg⁻¹ proteína) de tres mejores naftoquinonas seleccionadas (Menadiona, Naftazarina y Juglona), comparada con la actividad obtenida usando DBH₂. Adicionalmente, se comparó con el complejo III de mitocondrias de levadura (García G. y Gutiérrez Cirlos, 2010).

Quinona	Actividad específica
DBH ₂	9.86
Menadiona	97.43
Naftazarina	148.61
Juglona	155.49
Levadura (DBH ₂)	322.17

Debido a la diferencia de actividades también se realizaron espectros de absorción a estas naftoquinonas en el rango de luz visible de 400-650 nm para saber si alguna absorbía alrededor de los 550 nm, longitud de onda a

la que se monitorea la reducción del citocromo *c* (Fig. 39). La Naftazarina presentó un pico a los 560 nm por lo cual se descartó y se decidió buscar otras quinonas. Se seleccionó una bezoquinona y una naftoquinona (Duroquinona y Filoquinona respectivamente).

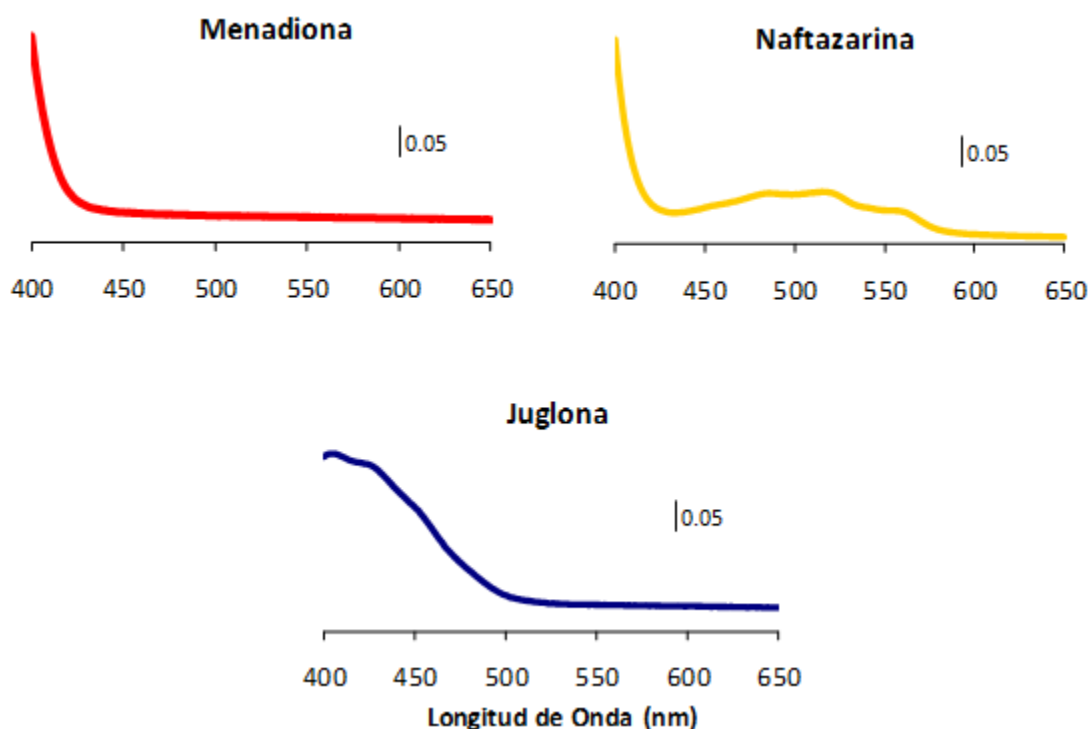


Figura 39. Espectros de absorción en el rango de luz visible 400-650 nm a pH 7.0, de las tres naftoquinonas seleccionadas en trabajos anteriores (García G. y Gutiérrez Cirlos, 2010).

De igual manera se les realizaron espectros de absorción, pero ahora ampliando el rango de 230 – 650 nm, en condiciones oxidadas y reducidas con ditionita y a pH 6.8 y 7.0 para descartar aquellas que absorbieran alrededor de los 550 nm y poder observar si el pH indica una diferencia de reducción de la quinona en la región UV (Fig. 40). Sólo la Filoquinona oxidada a pH 7.0 mostró absorción alrededor de los 560 nm.

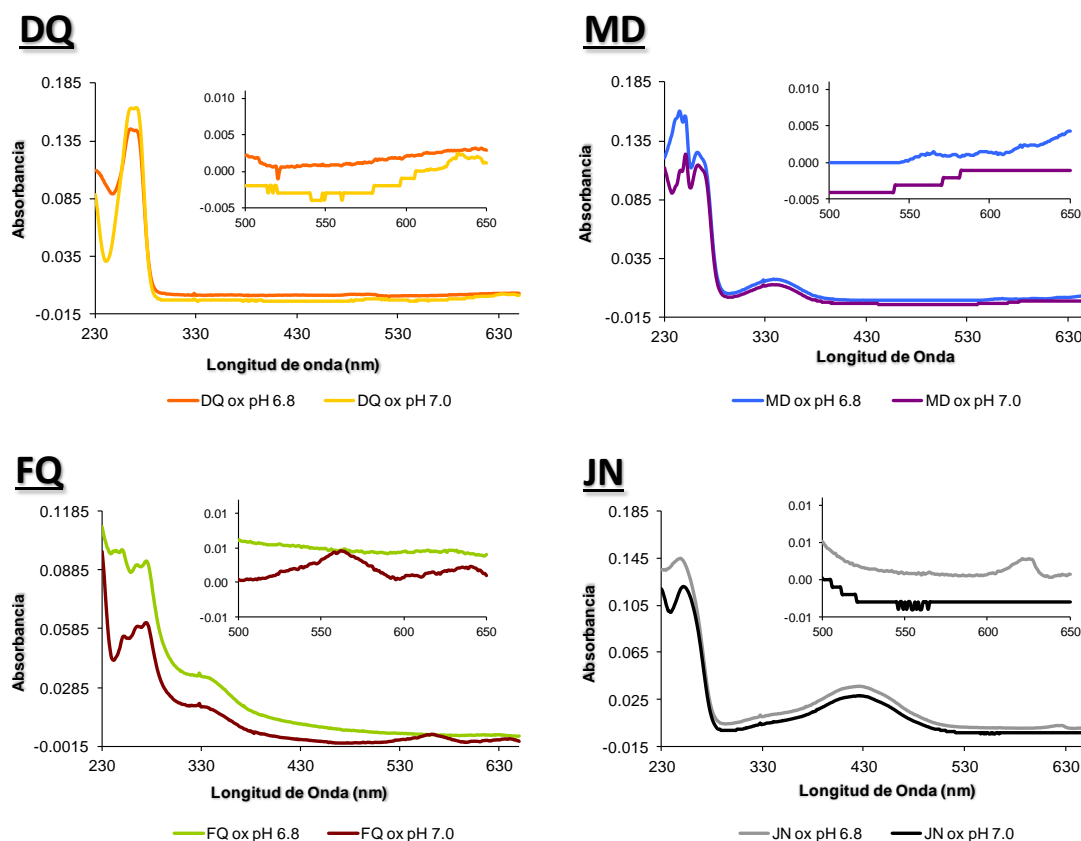


Figura 40. Espectros de absorción oxidados en el rango de 230-650 nm de la DQ, MD, FQ y JN a los dos pH 6.8 y 7.0. Los insertos muestran la amplificación de la región de 500-650 nm. Los espectros reducidos con ditionita no se muestran por el hombro tan grande (230-400 nm) obtenido por el efecto del mismo reductor.

Además, para conocer el mínimo de citocromo *c* necesario para ser detectado en el ensayo, se realizó un seguimiento de la reducción del citocromo *C*₅₅₀ en las membranas de *B. subtilis* 168. Se utilizaron reductores con diferente potencial redox para calcular la cantidad de citocromo *c* que podían reducir (Fig. 41 y Tabla 8). Como la ditionita es el reductor más fuerte, se consideró como el 100 % de reducción, y con base en esto se determinó la concentración μM de citocromo *c* reducido y el porcentaje de reducción. Se observó que el DBH_2 , tuvo el menor porcentaje de reducción (3 %), mientras que con el succinato y el ascorbato se obtuvo un 7.8 y 9.2 μM de citocromo *c* reducido, indicando que se requieren mínimo 10 μM de citocromo *c* para monitorear fácilmente la reducción.

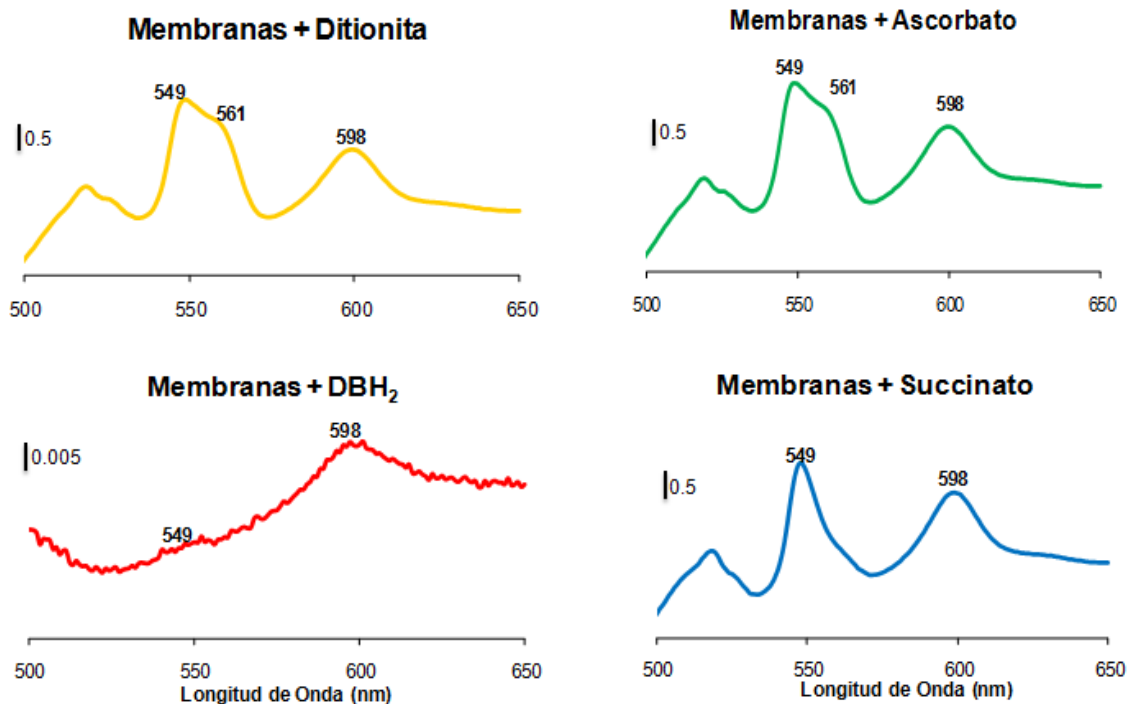


Figura 41. Espectros diferenciales de absorción reducidos menos oxidados en el rango de 500-650 nm de cada reductor utilizado.

Tabla 8. Porcentaje de reducción y concentración μM de citocromo *c* reducido con los diferentes reductores utilizados.

Reductor agregado (mM)	Concentración μM citocromo <i>c</i> reducido	% Reducción
Ditionita (polvo)	49	100
DBH ₂ 0.2	1.5	3.06
Succinato 20	7.8	15.9
Ascorbato 10	9.2	18.7

A continuación, se realizó un ensayo para descartar la auto oxidación del NADPH (Fig. 42), y entonces se midió la actividad de FNR en presencia de 5, 10 y 15 μM de NADPH (Fig. 43), de naftoquinonas (Fig. 44) y de citocromo *c* de corazón de caballo (Fig. 45).

Una vez seleccionados 15 μM de citocromo *c*, NADPH y quinonas, se procedió a realizar los ensayos de actividad con el citocromo *c* de corazón de caballo.

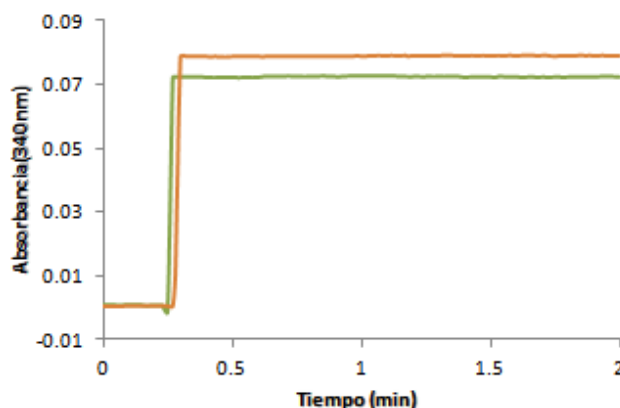


Figura 42. Seguimiento a 340 nm de la auto-oxidación del NADPH. Verde- pH 6.8 y Naranja- pH 7.0.

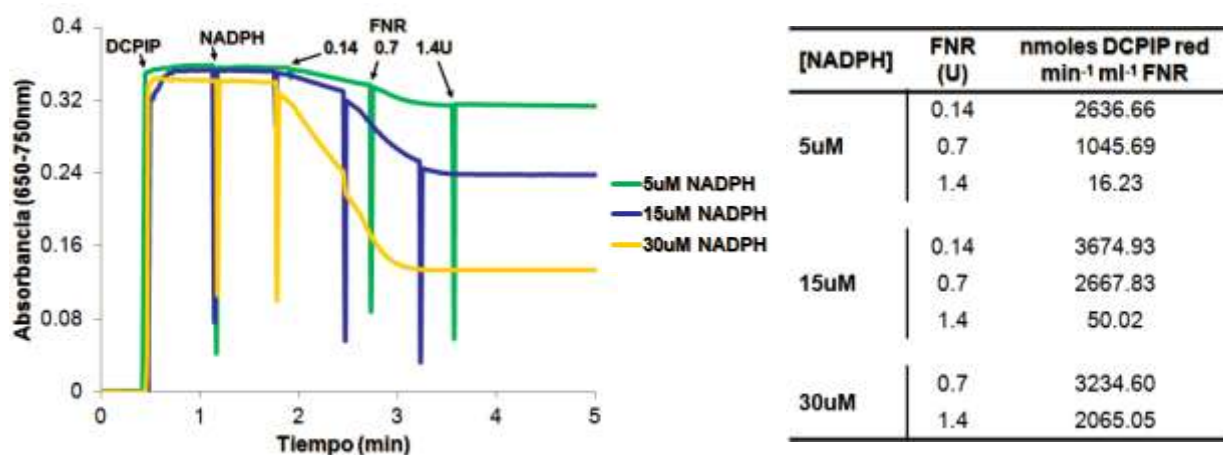
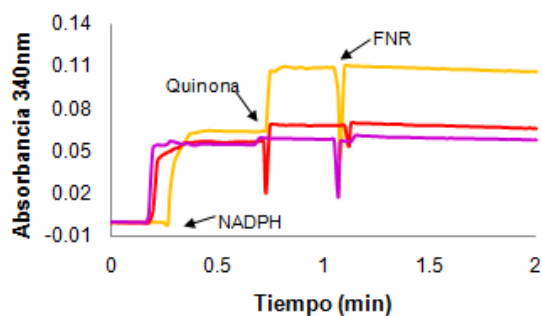
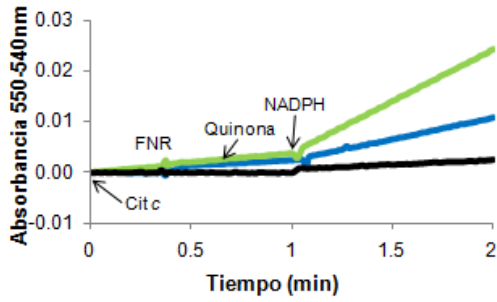


Figura 43. Reducción del DCPIP (a 650-750 nm) por la adición de 0.14, 0.7 y 1.4 U de FNR, con 5, 15 y 30 μ M de NADPH.



	nmoles NADPH oxid min ⁻¹ ml ⁻¹ FNR		
Quinona	5uM	10uM	15uM
Menadiona	585.61	1018.97	1200.26
Juglona	973.52	1174.25	1258.52
Duroquinona	545.12	552.66	792.85

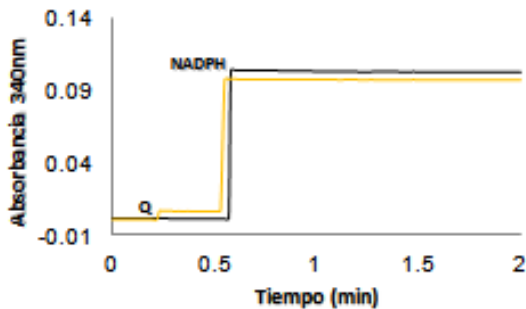
Figura 44. Trazos representativos de la oxidación de 15 μ M NADPH (a 340 nm), disparando la reacción con 0.14 U de FNR y en presencia de 5, 10 y 15 μ M de quinonas Menadiona, Rojo: Juglona, Morado: Duroquinona.



	nmoles cit c red min ⁻¹ ml ⁻¹ FNR		
	[Citocromo c]		
	5uM	10uM	15uM
Menadiona	524.82	442.04	427.07
Juglona	1408.65	1162.84	982.16
Duroquinona	152.48	125.43	81.57

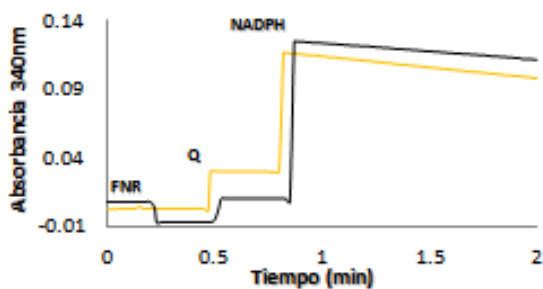
Figura 45. Trazos representativos de la reducción del citocromo c de corazón de caballo con 5, 10 y 15 μM (A., B. y C. respectivamente), disparando la reacción con 15 μM de NADPH en presencia de 0.14 U de FNR. Azul: Menadiona, Verde: Juglona y Negro: Duroquinona.

Se midió la reducción química de la quinona por el NADPH (Fig. 46) para distinguirla del sistema $\text{NADPH} \rightarrow \text{FNR} \rightarrow \text{Q}$ (Fig. 47).



Quinona	nmoles NADPH oxid min ⁻¹	
	pH 6.8	pH 7.0
Menadiona	0.167	0.194
Duroquinona	0.153	0.200
Filoquinona	0.146	0.169
Juglona	0.111	0.157

Figura 46. Trazos representativos de la oxidación del NADPH (a 340 nm) con la adición de quinonas oxidadas (reducción química $\text{NADPH} \rightarrow \text{Q}$) a pH 6.8 y 7.0.



Quinona	nmoles NADPH oxid min ⁻¹	
	pH 6.8	pH 7.0
Menadiona	0.920	1.327
Duroquinona	0.453	0.823
Filoquinona	0.308	0.367
Juglona	1.708	2.321

Figura 47. Trazos representativos de la oxidación del NADPH (a 340 nm) por la reducción de quinonas por medio de la FNR ($\text{NADPH} \rightarrow \text{FNR} \rightarrow \text{Q}$), a pH 6.8 y 7.0.

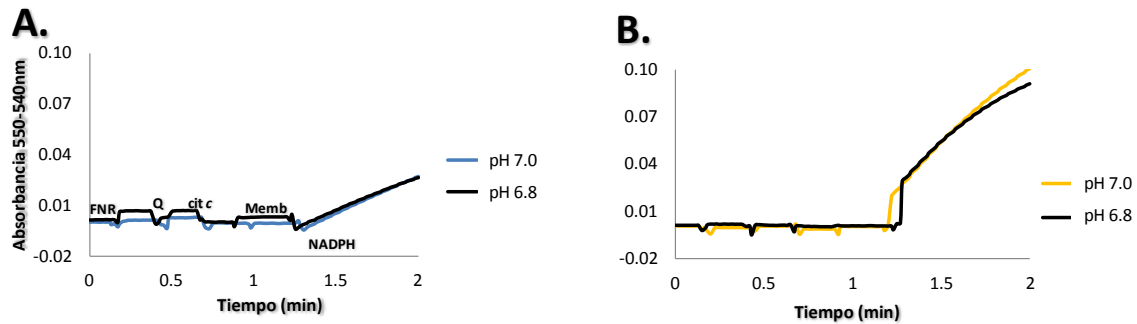
En la Tabla 9 se muestra la velocidad de reducción de quinonas expresada en nmoles de NADPH oxidado por minuto menos la reducción química (Fig. 46). La actividad específica del control de reducción química fue mucho menor que la del ensayo, denotando que aunque hay reducción directa de la Q por el NADPH, la presencia de la FNR acelera la reducción de las quinonas, lo que fue más apreciable con la Juglona.

Tabla 9. Velocidad total de reducción de quinonas por medio de la FNR (expresada en nmoles de NADPH oxidado por minuto), obtenida de la resta del Ensayo completo (NADPH → FNR → Q) menos Control de reducción química (NADPH → Q).

Quinona	nmoles NADPH oxid min ⁻¹	
	pH 6.8	pH 7.0
Menadiona	0.753	1.133
Duroquinona	0.300	0.623
Filoquinona	0.162	0.198
Juglona	1.590	2.164

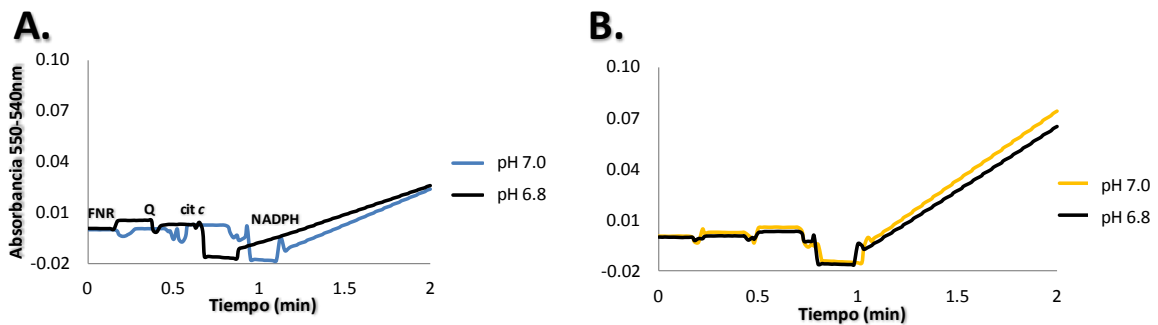
Posteriormente se realizó el ensayo agregando NADPH → FNR → Q → Membranas → citocromo *c* de corazón de caballo (Fig. 48), se agregaron dos controles de reducción química, uno sin agregar membranas, para restar la reducción química del citocromo por la quinona: NADPH → FNR → Q → citocromo *c* de corazón de caballo (Fig. 49); y otro sin agregar citocromo, con el fin de restar la reducción del citocromo *c* endógeno (trazos no mostrados). En la Tabla 10, se muestra la actividad específica obtenida, expresada en nmoles de citocromo *c* reducido por minuto, ya restándole los controles de reducción química.

En estos ensayos, con la Juglona se obtuvo la mayor velocidad de reducción aún restando la reducción química. Por lo cual se decidió realizar los 8 ensayos posibles con Juglona y el fragmento soluble del citocromo *C*₅₅₀.



nmoles cit c red min ⁻¹		
Quinona	pH 6.8	pH 7.0
Menadiona	1.989	2.015
Duroquinona	0.718	1.096
Filoquinona	0.356	0.585
Juglona	5.802	6.211

Figura 48. Trazos representativos de los ensayos NADPH → FNR → Q → Membranas (Complejo *b_{6c}*) → cit c de corazón de caballo, siguiendo la reducción del citocromo c a A550-540 nm, a pH 6.8 y 7.0 de A. Menadiona y B. Juglona. La Filoquinona y Duroquinona presentan un comportamiento similar a la Menadiona. Ensayos repetidos tres veces por duplicado.



nmoles cit c red min ⁻¹		
Quinona	pH 6.8	pH 7.0
Menadiona	1.311	1.931
Duroquinona	1.015	0.994
Filoquinona	0.063	0.442
Juglona	3.557	4.456

Figura 49. Trazos obtenidos de los controles de reducción química NADPH → FNR → Q → cit c de corazón de caballo, siguiendo la reducción del citocromo c a una A550-540 nm, tanto a pH 6.8 y 7.0 de A. Menadiona y B. Juglona. La Filoquinona y Duroquinona presentan un comportamiento similar a la Menadiona. Ensayos repetidos tres veces por duplicado.

Tabla 10. Velocidad total expresada en nmoles de citocromo *c* reducido por minuto, obtenida de la resta del Ensayo completo ($Q \rightarrow b_6c \rightarrow \text{cit } c$) menos el Control de reducción química sin membranas ($Q \rightarrow \text{cit } c$) y el Control sin agregar citocromo *c* de corazón de caballo ($Q \rightarrow b_6c$).

Quinona	nmoles cit <i>c</i> red min ⁻¹	
	pH 6.8	pH 7.0
Menadiona	0.661	0.063
Duroquinona	-0.307	0.086
Filoquinona	0.276	0.130
Juglona	2.226	1.741

Se realizó el ensayo completo agregando NADPH \rightarrow FNR \rightarrow Juglona \rightarrow Membranas (Complejo b_6c) $\rightarrow c_{550}$ (Fig. 50A) y se obtuvo la velocidad de reducción química (NADPH \rightarrow FNR \rightarrow Juglona $\rightarrow c_{550}$) (Fig. 50B). En la Tabla 11 se muestra una comparación de la actividad específica obtenida restando previamente la reducción química, utilizando citocromo *c* de corazón de caballo y Juglona comparada contra la obtenida con el fragmento soluble del citocromo c_{550} y Juglona, ambos a los dos pHs.

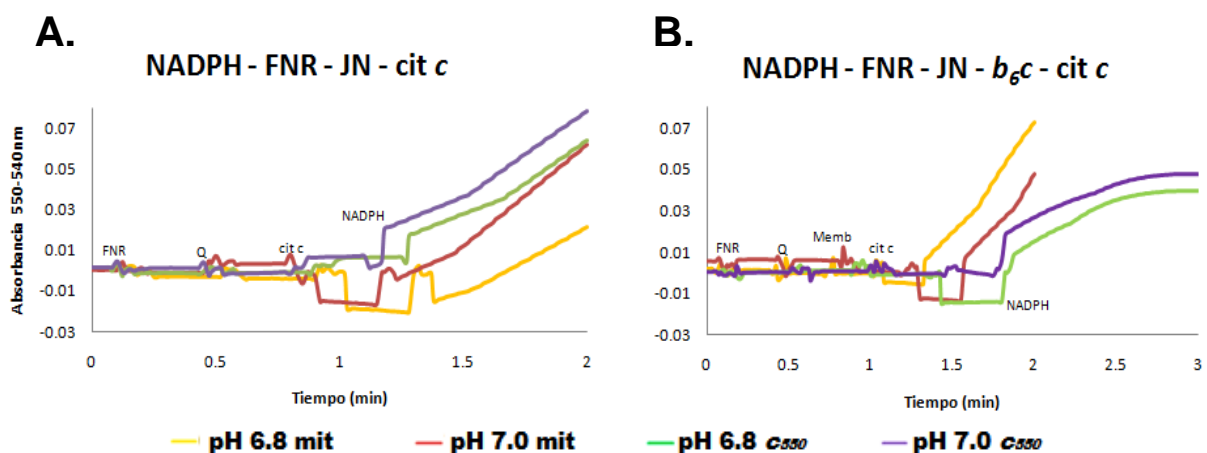


Figura 50. Comparación de los trazos obtenidos de A. Reducción química NADPH \rightarrow FNR \rightarrow Q \rightarrow cit *c*; y B. Ensayo completo NADPH \rightarrow FNR \rightarrow Q \rightarrow Membranas (Complejo b_6c) \rightarrow cit *c*, a los dos pHs utilizando tanto citocromo *c* de corazón de caballo (mitocondrial), como el fragmento soluble del citocromo c_{550} con Juglona como quinona.

Tabla 11. Comparación de la velocidad de reducción (expresada en nmoles de citocromo *c* reducido por minuto), obtenida utilizando citocromo *c* de corazón de caballo (*c* mit) *versus* fragmento soluble del citocromo *c*₅₅₀ de *B. subtilis*. Ensayo completo (Q → *b*₆*c* → cit *c*). Reducción química en ausencia de membranas (Q → cit *c*); Control del citocromo *c* endógeno (Q → *b*₆*c*). Velocidad total = ensayo completo menos controles de reducción química.

Citocromo	pH	nmoles cit <i>c</i> red min ⁻¹			Velocidad Total
		Q → <i>b</i> ₆ <i>c</i> → cit <i>c</i>	Q → cit <i>c</i>	Q → <i>b</i> ₆ <i>c</i>	
<i>c</i> ₅₅₀	6.8	2.832	5.244	0.0189	-2.431
		2.930	5.327	0.0135	-2.410
<i>c</i> mit	7.0	5.802	3.557	0.0189	2.226
		6.211	4.456	0.0135	1.741

Se decidió realizar el ensayo completo (Fig. 51B) y el control de reducción química (Fig. 51A) a pH 6.8 con la siguiente mejor naftoquinona según el análisis con el citocromo *c* mitocondrial (Menadiona). De igual manera que con la Juglona, se realizó una comparación contra el citocromo *c* de corazón de caballo, obteniendo la Tabla 12.

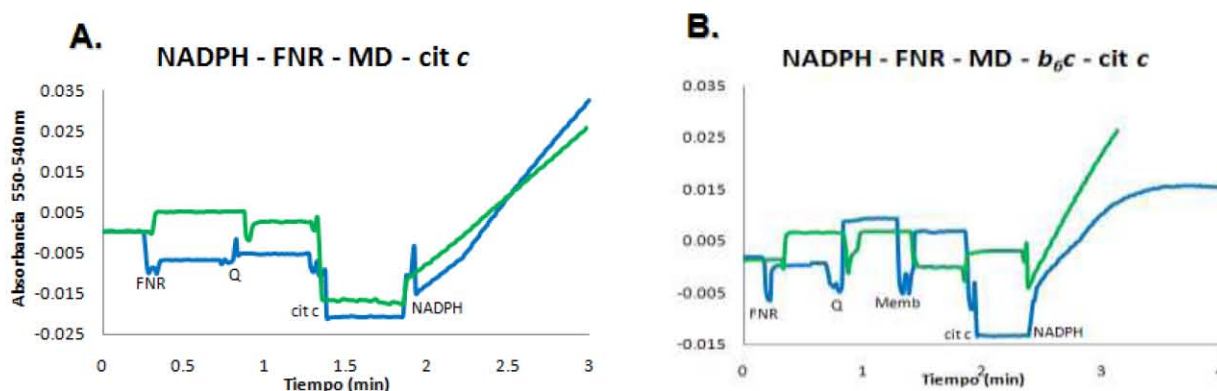


Figura 51. Comparación de los trazos obtenidos de A. Controles de reducción química NADPH → FNR → Q → cit *c*; y B. Ensayo completo NADPH → FNR → Q → Membranas (Complejo *b*₆*c*) → cit *c*, a pH 6.8 utilizando tanto citocromo *c* de corazón de caballo (mitocondrial) en verde, como el fragmento soluble del citocromo *c*₅₅₀ en azul, con Menadiona como quinona.

Tabla 12. Comparación de la velocidad de reducción (expresada en nmoles de citocromo *c* reducido por minuto), obtenida utilizando citocromo *c* de corazón de caballo (*c* mit) contra el fragmento soluble del citocromo *c*₅₅₀ de *B. subtilis*. Ensayo completo ($Q \rightarrow b_6c \rightarrow \text{cit } c$); reducción química sin agregar membranas ($Q \rightarrow \text{cit } c$); control del citocromo *c* endógeno ($Q \rightarrow b_6c$). Velocidad total = ensayo completo menos reducción química.

Citocromo	pH	nmoles cit <i>c</i> red min ⁻¹			Velocidad Total
		$Q \rightarrow b_6c \rightarrow \text{cit } c$	$Q \rightarrow \text{cit } c$	$Q \rightarrow b_6c$	
c₅₅₀	6.8	1.550	3.155	0.0166	-1.621
c mit		1.989	1.311	0.0166	0.661

Finalmente se realizó una comparación de la velocidad de reducción del fragmento soluble del citocromo *c*₅₅₀ con las dos naftoquinonas a pH 6.8 en este caso, la Juglona dio mayor velocidad que la Menadiona, tanto en el control de reducción química como en el ensayo completo (Tabla 13).

Tabla 13. Comparación de la velocidad de reducción (expresada en nmoles de citocromo *c* reducido por minuto), obtenida a pH 6.8 entre Menadiona y Juglona con el fragmento soluble del citocromo *c*₅₅₀ de *B. subtilis*. Ensayo completo ($Q \rightarrow b_6c \rightarrow \text{cit } c$); reducción química sin agregar membranas ($Q \rightarrow \text{cit } c$); control del citocromo *c* endógeno ($Q \rightarrow b_6c$). Velocidad total = ensayo completo menos controles de reducción química.

Quinona	pH	nmoles cit <i>c</i> red min ⁻¹			Velocidad Total
		$Q \rightarrow b_6c \rightarrow \text{cit } c$	$Q \rightarrow \text{cit } c$	$Q \rightarrow b_6c$	
Menadiona	6.8	1.550	3.155	0.0166	-1.621
Juglona		2.832	5.244	0.0189	-2.431

Discusión

Mucho se ha discutido sobre la presencia del denominado hemo “x” en organismos fotosintéticos, también una de las principales características del complejo b_6c de *B. subtilis* (bacteria no fotosintetizadora). Con el propósito de poder entender mejor el comportamiento de este complejo, anteriormente se trató de caracterizar su actividad utilizando citocromo *c* de corazón de caballo y diferentes naftoquinonas sintéticas. Tres de estas naftoquinonas mostraron una actividad específica mayor, aunque comparativamente con la obtenida utilizando membranas de levadura seguía siendo baja. Además de que la reducción química obtenida, era similar a la velocidad de reducción.

Estudios anteriores mostraron que el citocromo *c* de corazón de caballo está cargado positivamente, y que hay complementariedad electrostática con la citocromo oxidasa y el complejo bc_1 (Winstedt y von Wachenfeldt, 2000). Debido a las diferencias de aminoácidos en la superficie del citocromo c_{550} , pensamos que no había suficiente complementariedad del citocromo de caballo con el complejo b_6c y la caa_3 de *B. subtilis*, y por tanto, la velocidad de reducción del citocromo era baja comparada con la reducción química. Se pensó entonces, que al utilizar el fragmento soluble del c_{550} de *B. subtilis* podríamos restaurar esa complementariedad. Además al tener un potencial redox más negativo que el citocromo mitocondrial, la reducción química sería menor y la actividad del complejo mayor.

□ **Uso de la mutante de *B. subtilis* LUW196 para obtener al fragmento soluble del citocromo c_{550}**

Al tratar de iniciar la purificación del fragmento soluble por el método descrito por von Wachenfeldt y Hederstedt, 1993, nos topamos con un problema. Como ya se mencionó, la principal característica del complejo citocromo *c* oxidasa caa_3 de *B. subtilis* es poseer un citocromo *c* extra en su subunidad II, que es idéntico en un 30 % al citocromo c_{550} (Fig. 52). Por ello se decidió utilizar la cepa mutante de *B. subtilis* LUW196 carente de citocromo *c* oxidasa con el fin

de eliminar la posible contaminación de péptidos al momento de realizar la proteólisis temporal con tripsina y obtener el fragmento soluble del citocromo *C₅₅₀*.

Las pruebas iniciales de proteólisis con membranas de *B. subtilis* 168 mostraron la liberación del fragmento soluble citocromo utilizando sólo 100 U de tripsina (datos no mostrados). Después de realizar el mismo proceso para la cepa LUW196 pHP13-*C₅₅₀*, la liberación del fragmento soluble (~6.2 kDa) fue más difícil, teniendo que aumentar las U de tripsina y el tiempo de incubación (Figs. 27, 28 y 29).

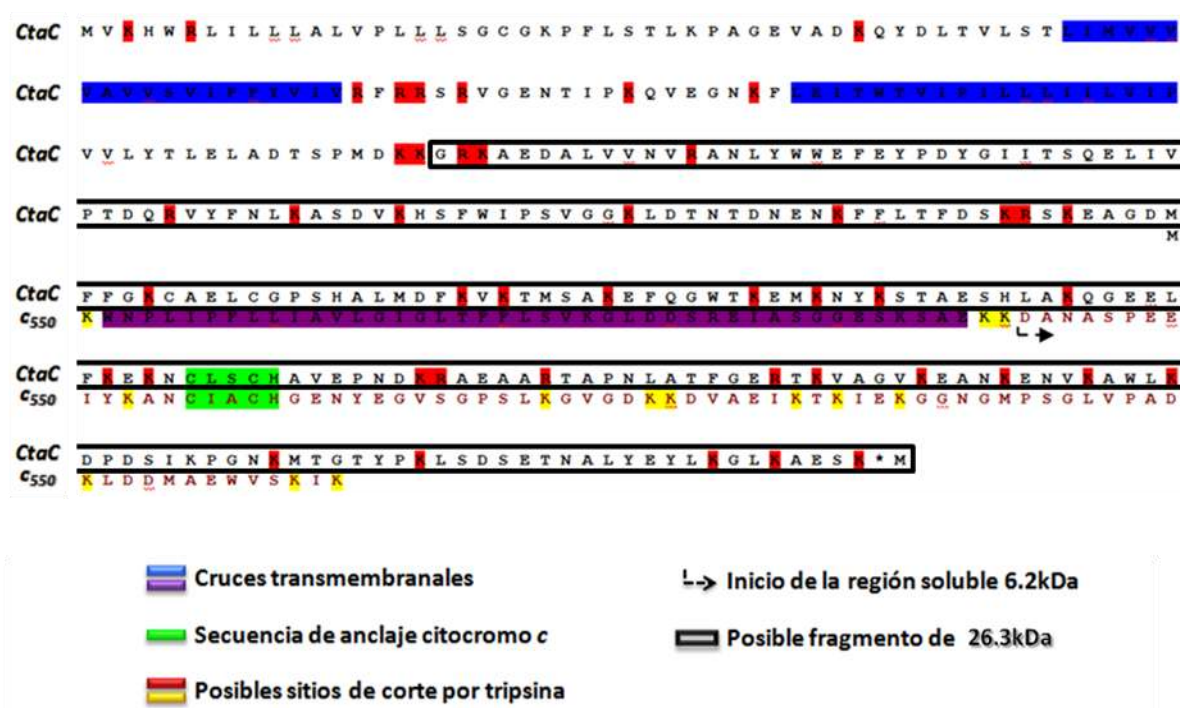


Figura 52. Alineamiento de las secuencias *ctaC* (Subunidad II de la citocromo *c* oxidasa) y del citocromo *c₅₅₀*. En azul y morado se muestran los cruces transmembranales de *ctaC* y *C₅₅₀* respectivamente, en verde la secuencia de anclaje característica de los citocromos *c* (CXXCH), en rojo y en amarillo los posibles sitios de corte por tripsina (arginina/lisina), y con una flecha negra el inicio de la región soluble del citocromo *c₅₅₀*. El rectángulo negro muestra una predicción hecha del posible fragmento liberado de aproximadamente 26.3kDa de *CtaC*.

Debido a que el citocromo *c* de la subunidad II de la citocromo *c* oxidasa y el citocromo *c₅₅₀* tienen un 30 % de identidad, se pensó que al proteolizar las

membranas de la cepa silvestre se cortarán los citocromos *c* mencionados (Fig. 52). Lo anterior se evitó utilizando la cepa mutante (carente de citocromo *c* oxidasa) y que posee la sobreexpresión del citocromo *c*₅₅₀, sin embargo, al aumentar la cantidad de citocromo *c*₅₅₀ se requirió de más tripsina y más tiempo de incubación.

En cuanto al rendimiento de proteína obtenido después de dos cromatografías (de intercambio iónico y de filtración en gel), no fue posible eliminar por completo a las proteínas contaminantes. El análisis de las membranas tripsinizadas por gel mostró que aún hay citocromo *c*₅₅₀ asociado al complejo *b*₆*c* (Apéndice I, Fig. 58). Es posible que éste quede protegido de la proteólisis o que se requiera mayor cantidad de tripsina o tiempo de incubación. Sin embargo, para evitar la presencia de otros citocromos *c* se decidió no aumentar más el tiempo ni la cantidad de tripsina. En cambio, la zona del gel (Apéndice I, Fig. 59) con el citocromo *c*₅₅₀ libre no dio reacción positiva con TMBZ, indicando que éste es el que se proteoliza.

Durante la purificación, en el análisis de los geles de poliacrilamida (Figs. 34 y 36), se puede observar una heterogeneidad de bandas difusas que dan señal con TMBZ indicando la presencia de citocromo *c* de diferentes tamaños. Esto puede deberse al corte de diferentes residuos lisina/arginina accesibles a la tripsina durante la proteólisis (Fig. 53), ya que la secuencia de aminoácidos del citocromo *c*₅₅₀ contiene 15 residuos de lisina y uno de arginina como lo reportan von Wachenfeldt y Hederstedt, 1993.

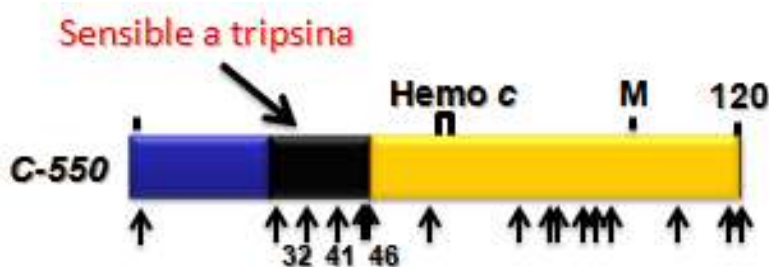


Figura 53. Esquema de la estructura primaria del citocromo *c*₅₅₀, las flechas señalan la localización de los residuos de lisina y arginina. La sección de anclaje membranar se indica de color azul, la región sensible a los cortes de tripsina en condiciones no desnaturizantes se muestra en negro, y la región amarilla muestra el fragmento soluble donde se indica el sitio de unión del hemo y la metionina (M) propuesta de ser el sexto ligando axial del hemo. Tomado de von Wachenfeldt y Hederstedt, 1993.

Por otra parte, en el análisis por electroforesis de las membranas tripsinizadas, se pierde la señal de la subunidad QcrC del complejo b_6c (Apéndice I, Fig. 59), indicando que también hubo proteólisis de este citocromo. Un alineamiento muestra que estos dos citocromos c (de la subunidad QcrC del complejo b_6c y el c_{550}) poseen un 32 % de identidad (Fig. 54), y también varios sitios de corte por tripsina. Aunque el fragmento liberado es de mayor tamaño (9.6 kDa) que el del c_{550} (6.2 kDa), pensamos que también este citocromo contribuye al barrido en el gel. Sin embargo es difícil distinguirlos al tener masas moleculares tan cercanas.

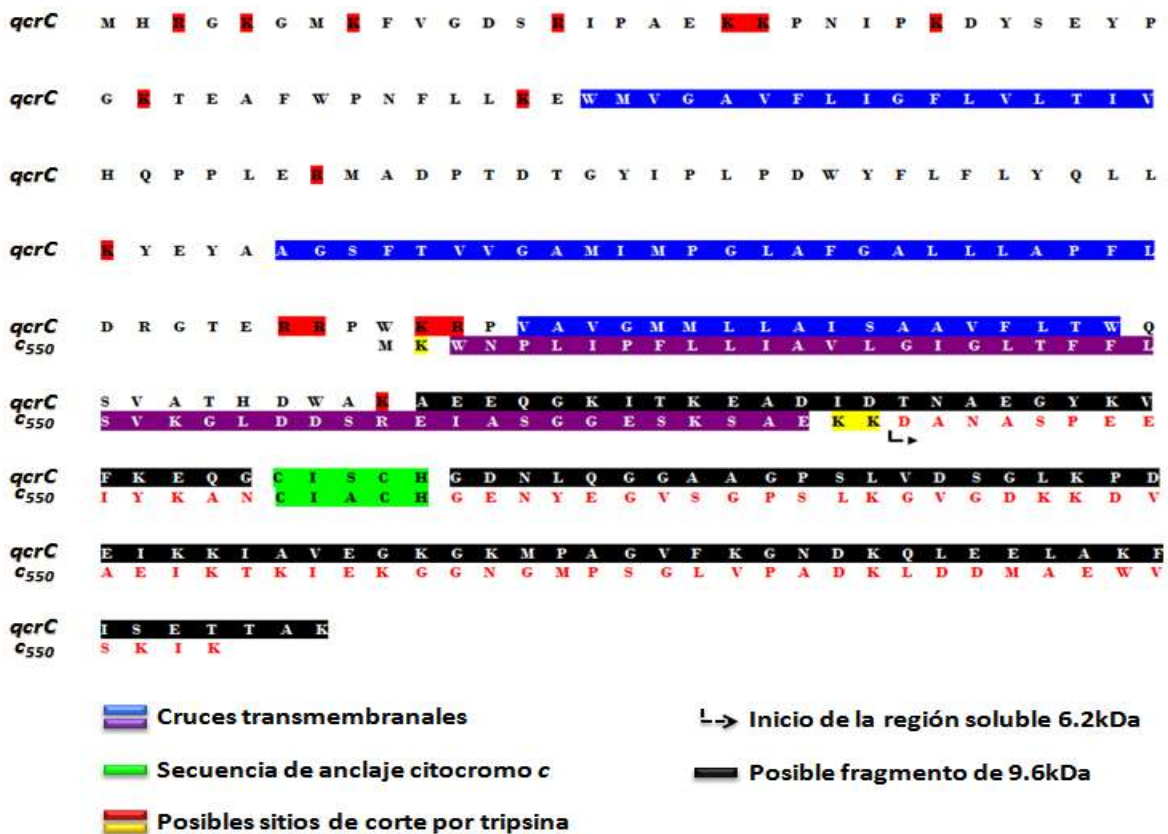


Figura 54. Alineamiento de las secuencias QcrC (Subunidad del complejo b_6c) y del citocromo c_{550} . En azul y morado se muestran los cruces transmembrales de QcrC y c_{550} respectivamente, en verde la secuencia de anclaje característica de los citocromos c (CXXCH), en rojo y en amarillo los posibles sitios de corte por tripsina (arginina/lisina), y con una flecha negra el inicio de la región soluble del citocromo c_{550} . La región en negro muestra el posible fragmento liberado (de aproximadamente 9.6 kDa) de QcrC.

Cabe señalar que después de pasar la muestra por la resina Sephadex G-50 fina la banda correspondiente a 6.2 kDa se observó más claramente (Fig. 38), y la banda de mayor tamaño (posiblemente QcrC) se volvió más difusa.

□ **Ensayos de actividad del complejo b_6c en membranas por medio del uso de la actividad de diaforasa de la FNR de *Fremyella diplosiphon***

Con el fin de poder medir la actividad del complejo b_6c de una manera más directa, se buscó otro sistema que no fuese a través de la succinato deshidrogenasa, para poder reducir las naftoquinonas (Fig. 55).

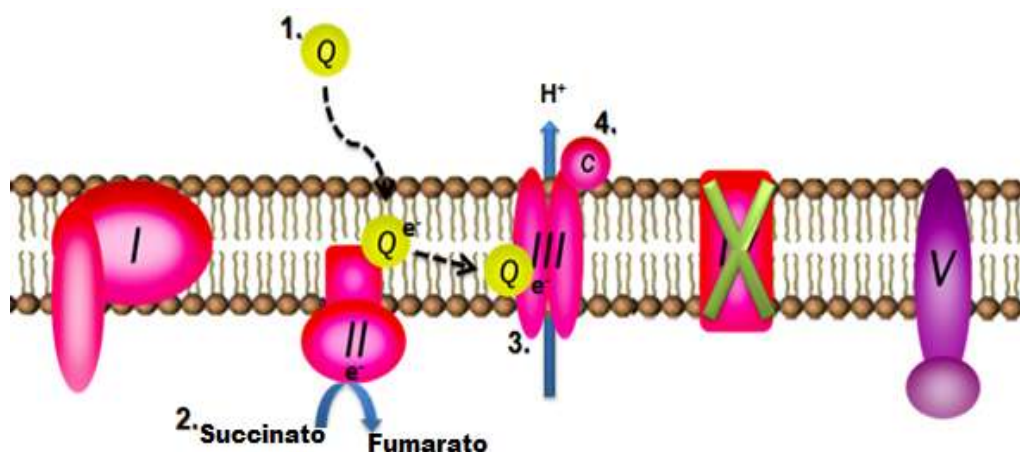


Figura 55. Modelo que explica cómo se realizó la medición de actividad por medio del sistema succinato: citocromo c reductasa. 1. Se agregó la naftoquinona junto con las membranas; 2. Disparo de la reacción agregando succinato de sodio que fue oxidado a fumarato por la succinato deshidrogenasa y redujo a la naftoquinona; 3. Oxidación de la naftoquinona por el complejo b_6c ; 4. Reducción del citocromo c . La X de color verde sobre el complejo citocromo c oxidasa indica la inhibición con cianuro para evitar la oxidación del citocromo c .

El sistema alterno fue a través del uso de la Ferredoxina NADP^+ reductasa de *Fremyella diplosiphon* (Fig. 56), purificada y donada por el Dr. Carlos Gómez Lojero (Gómez- Lojero *et al.*, 2003). *F. diplosiphon* es la cianobacteria más ampliamente estudiada, capaz de tener una adaptación cromática complementaria, en la cual puede alterar el largo de sus filamentos, morfología celular, sus pigmentos o composición de proteínas para maximizar su absorción de luz para la fotosíntesis (Pattanaik *et al.*, 2012).

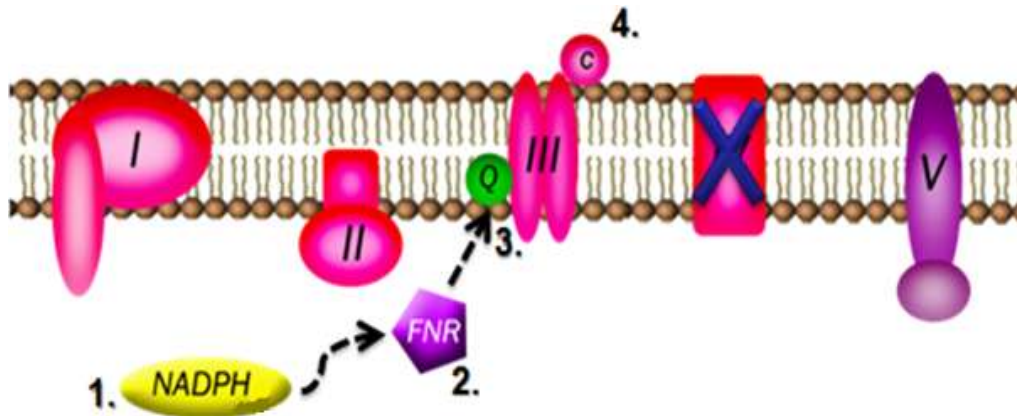


Figura 56. Modelo que explica cómo será la medición de actividad por medio del sistema FNR: citocromo c reductasa. 1. La reacción inicia agregando NADPH, que es oxidado por la FNR; 2. La FNR reduce a la naftoquinona; 3. La naftoquinona es oxidada por el complejo b_6c ; 4. Finalmente el complejo b_6c reduce a su vez al citocromo c.

La FNR, se encarga de transferir los electrones de la Ferredoxinaa al dinucleótido de nicotina adenina fosfato (NADP) para reducirlo a NADPH que será utilizado en las reacciones de fijación del CO_2 . Se ha observado que *in vitro* la FNR es capaz de utilizar NADPH para reducir varios sustratos como ferricianidas, quinonas, citocromos y nitrilos, u oxidantes artificiales como DCPIP ó ferricianuro de potasio, lo que se conoce como actividad de diaforasa (Melamed-Harel *et al.*, 1985; Carrillo y Ceccarelli, 2003; Szczepaniak, *et al.* 2013).

Analizando el potencial redox de cada uno de los componentes para la medición de la actividad por el sistema FNR: citocromo c reductasa (Fig. 57), pudimos observar que teóricamente, el transporte de los electrones era posible.

La diferencia de potenciales redox entre benzoquinonas (~150 mV) y naftoquinonas (~-70 mV), mostró cuál es la razón de la auto oxidación de estas últimas, después de ser reducidas por la FNR. Este problema de auto oxidación se ve reflejado en la reducción química del citocromo c tan alta (tanto con el citocromo c de corazón de caballo como con el fragmento soluble del c_{550}), ya que ambos poseen un potencial redox más positivo; por ello es que la pérdida de los electrones por las naftoquinonas sea más rápida en presencia del

citocromo *c*. Este efecto es mucho menor con el uso de benzoquinonas, ya que la diferencia de potenciales entre éstas y el citocromo *c* es mucho menor que entre las naftoquinonas y el citocromo *c*. Por lo cual, *in vitro*, la actividad del complejo b_6c es muy difícil de medir.

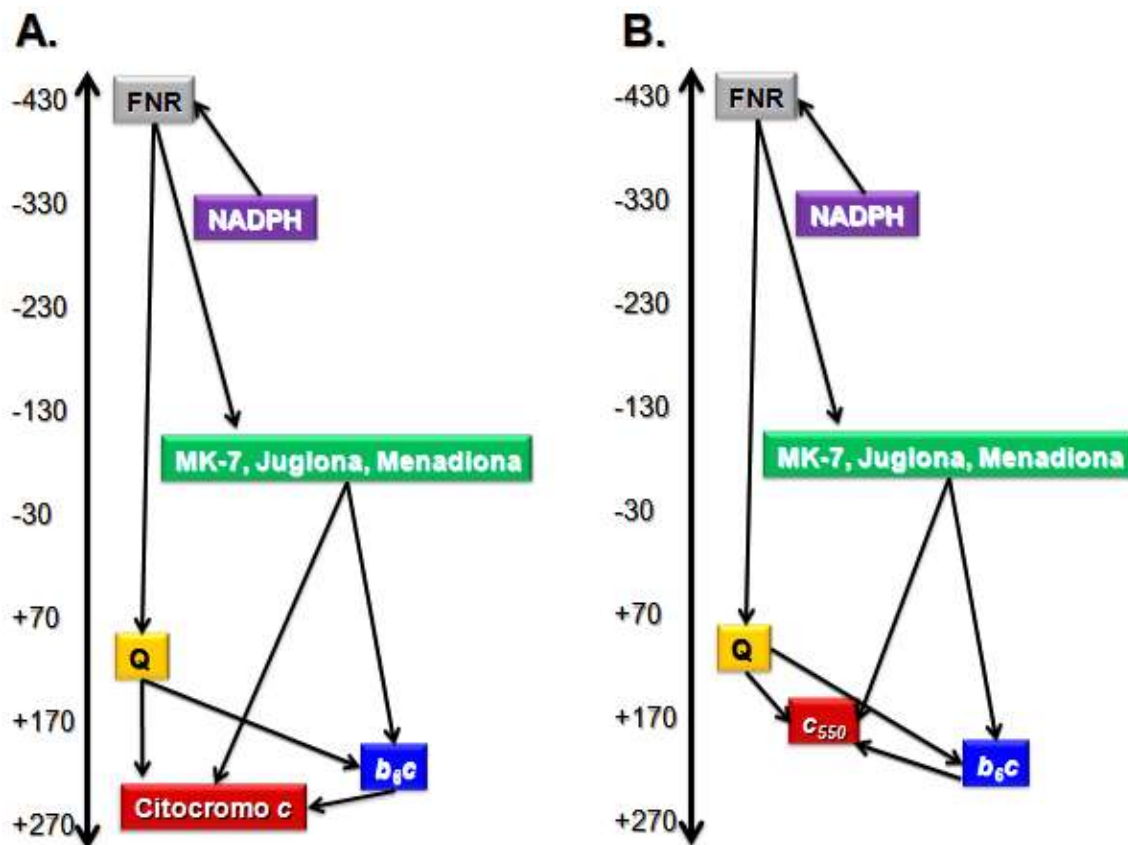


Figura 57. Comparación de los potenciales redox de cada reacción redox utilizada. A. con citocromo *c* de corazón de caballo y B. con el citocromo c_{550} de *B. subtilis*.

En las primeras pruebas de medición, se observó que la velocidad de reducción química era casi tan alta como la velocidad obtenida en el ensayo al agregar membranas. Por lo que se decidió realizar espectros de absorción en el intervalo de luz visible (400-650 nm) de las naftoquinonas seleccionadas (Fig. 39), con el objetivo de poder descartar si éstas absorbían alrededor de los 550 nm, longitud de onda característica de citocromos *c*, provocando así una mayor absorbancia. Sólo la Naftazarina mostró este comportamiento, por lo

que fue descartada, y las nuevas naftoquinonas se analizaron de igual manera para evitar este aumento de absorbancia (Fig. 40).

Así mismo se decidió saber si el citocromo *c* podía ser reducido por el NADPH, por lo que se monitoreó la oxidación del NADPH a 340 nm en presencia del citocromo (Fig. 42B), pero no se obtuvo reducción del citocromo *c*, y se descartó esta reducción química. Posteriormente, para descartar que la posible auto oxidación del NADPH interfiriera con el sistema NADPH → FNR → Q (Fig. 42A), se decidió igual que antes, seguir la oxidación del NADPH a 340 nm, pero no se observó pendiente.

Tratando de disminuir la reducción química, se realizaron los ensayos a pH 7.0 y 6.8, de tal manera que al acidificar el medio se reduzca la velocidad de oxidación de las naftoquinonas. Aunque los potenciales redox del citocromo *c* de corazón de caballo (250 mV) y el fragmento soluble de *c*₅₅₀ de *B. subtilis* (178 mV) no son muy similares, se realizó el análisis inicial con citocromo *c* de corazón de caballo, considerando su disponibilidad.

Al obtener la velocidad de oxidación del NADPH ó reducción del citocromo *c*, la diferencia entre los dos pHs no fue significativa, aunque se puede notar una mayor velocidad a pH 7.0, dando indicio de que es posible disminuir la velocidad de oxidación de las naftoquinonas disminuyendo el pH. Sin embargo, no es posible bajar (o aumentar) demasiado el pH por la estabilidad del complejo *b*₆*c*, como mostraron algunos trabajos con el complejo *bc*₁ (Castellani *et al.*, 2010; Covian *et al.*, 2004; Covian *et al.*, 2007; Gutiérrez Cirlos y Trumpower, 2002; Hughes *et al.*, 2009; Snyder *et al.*, 2000).

Comparando las velocidades, no hubo una diferencia significativa entre la de la reducción química y los ensayos completos, incluso son muy similares entre el citocromo *c* mitocondrial ó el fragmento soluble del *c*₅₅₀. Las velocidades de reducción del citocromo *c* mitocondrial y el fragmento soluble, en el ensayo completo (NADPH - FNR-Q-Membranas-cit *c*), mostraron una diferencia, de 3 veces, siendo más alta con citocromo *c* mitocondrial. Observando sólo el control de reducción química (sin membranas) del fragmento soluble del *c*₅₅₀,

se notó que la velocidad obtenida fue del doble que en el ensayo completo, lo que dio como resultado un total negativo.

Realizar el control de reducción química, ayudó a tener una mejor idea de la cantidad de citocromo que realmente está siendo reducido por el sistema FNR. Sin embargo, se pensó que el citocromo *c* endógeno de las membranas posiblemente también estaba siendo reducido ($\text{NADPH} \rightarrow \text{FNR} \rightarrow \text{Q} \rightarrow b_6c$), incrementando los valores obtenidos. En trabajos anteriores, se utilizaron 0.3 mg de proteína membranal (0.4 μM de citocromo *c*). Sabiendo que se necesita mínimo 10 μM de citocromo *c* para poder monitorear la reducción, se decidió incrementar la cantidad de membrana a 0.5 mg (0.66 μM de citocromo *c*). Aún así la velocidad de reducción obtenida fue muy poca, y ya que no se podía agregar más cantidad de proteína sin enturbiar la celdilla provocando una mala transmitancia, se concluyó que la reducción del citocromo *c* endógeno no sería un problema.

A pH 6.8 se observó que la reducción química del citocromo *c* soluble fue mayor que la actividad medida al añadir las membranas. Sin embargo, se observó que la velocidad de reducción con Menadiona es menor que con la Juglona. Al comparar la reducción química contra el ensayo completo, se puede observar que la actividad específica obtenida utilizando citocromo *c* de corazón de caballo fue del doble que la obtenida con el *c*₅₅₀, tanto con Juglona como con Menadiona.

Se pensó entonces que posiblemente las quinonas no se estaban integrando a las membranas, pero al comparar los trazos obtenidos, se notan diferencias entre la reducción química y el ensayo completo, indicando la participación del complejo *b*₆*c* y la integración de las quinonas a la membrana (Fig. 53 y 54). Es posible que el potencial redox más negativo del citocromo *c*₅₅₀ de *B. subtilis* podría estar haciendo más lenta la velocidad del complejo *b*₆*c* y por tanto, de la reducción del citocromo. Esto coincide con que se obtuvo el triple de citocromo *c* mitocondrial reducido que del *c*₅₅₀ soluble (Tabla 9 y 10). Esta diferencia de potencial, podría deberse a que: “el dominio hemo *c* del citocromo *c*₅₅₀ de *B. subtilis* es más pequeño que el citocromo *c* mitocondrial por lo que podría tener

una mayor exposición a solventes y así un menor potencial redox” (Winstedt y von Wachenfeldt, 2000).

Además se debe considerar que la decisión de realizar los ensayos con 15 μM de citocromo fue en base a reducciones con el citocromo *c* de corazón de caballo, y su E° es muy diferente del c_{550} de *B. subtilis*. Por lo que sería necesaria una titulación con el fragmento soluble, para encontrar la concentración adecuada del citocromo y llegar a la velocidad máxima del complejo b_6c .

Otra posible explicación, es que al realizar los ensayos con membranas de *B. subtilis* 168, las oxidasas alternas (quinol oxidasas) estén compitiendo con el fragmento soluble del c_{550} por los electrones de las quinonas, y por lo tanto, el complejo b_6c parezca tener una velocidad menor. Una opción para poder descartar esta posibilidad sería realizar los ensayos de actividad en condiciones anóxicas, inhibiendo así la actividad de las oxidasas alternas.

Conclusiones

- Se logró transformar la mutante LUW196 con la construcción pHP13-*c*₅₅₀, obteniendo una mejor sobreexpresión con MSR en membranas (3 veces más que LUW196).
- El rendimiento de la obtención del fragmento soluble del citocromo *c*₅₅₀ de *B. subtilis* fue del 31 % de recuperación.
- El fragmento soluble del citocromo *c*₅₅₀ obtenido, fue del tamaño esperado (6.2 kDa) y la región catalítica se mantiene activa.
- El potencial redox del citocromo *c*₅₅₀ es más negativo que el citocromo *c* mitocondrial, haciendo el transporte de electrones más lento.
- De las tres naftoquinonas sintéticas y la benzoquinona que se utilizaron para la medición de quinol: citocromo *c* reductasa, la Juglona sigue siendo el sustrato que proporciona una mayor velocidad de reducción específica.

Perspectivas

El rendimiento de la obtención del fragmento soluble del citocromo *c*₅₅₀, se podría mejorar utilizando el plásmido pEC86 donado por la Dra. Thöny- Meyer, además de la construcción del fragmento soluble en el plásmido pHP13.

Purificar el complejo *b*₆*c* de las membranas tripsinizadas y carentes de citocromo *c* oxidasa, y lograr así una mejor caracterización con el sistema FNR.

El uso de la naftoquinona endógena purificada de *B. subtilis* podría mejorar la actividad.

Se podría disminuir aún más la velocidad de oxidación de las naftoquinonas en condiciones anóxicas y monitorear con mayor precisión la actividad del complejo *b*₆*c*.

Apéndice I

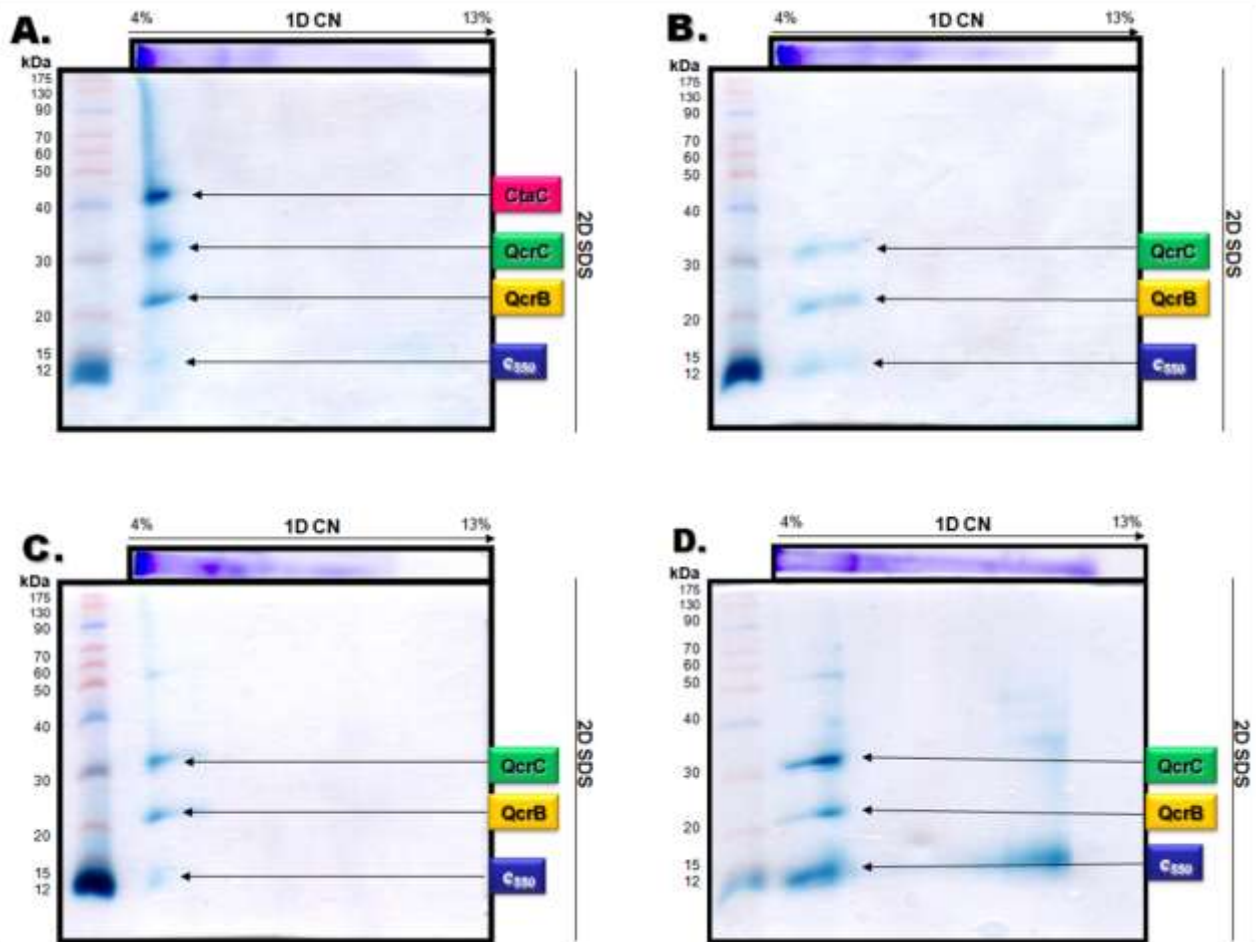


Figura 58. Análisis de geles de poliacrilamida de primera dimensión en condiciones nativas por medio de segundas dimensiones en condiciones desnaturalizantes con SDS, de las membranas solubilizadas con 0.6 mg DDM/ mg proteína. A. *B. subtilis* 168; B. LUW196; C. LUW196 pHP13; D. LUW196 pHP13-*C*₅₅₀. Tinción con TMBZ específica para citocromos covalentemente unidos.

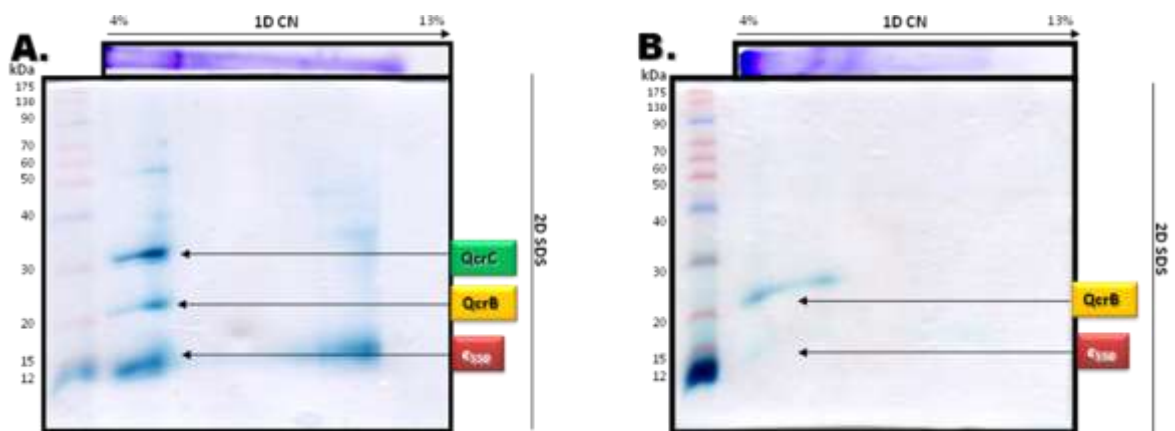
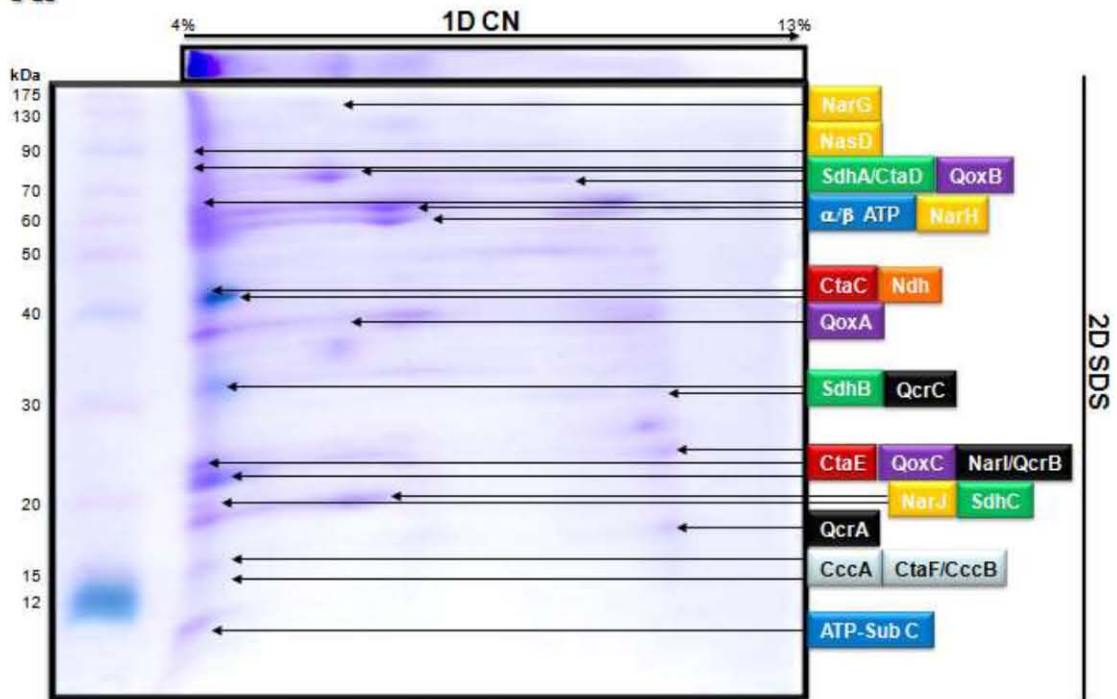
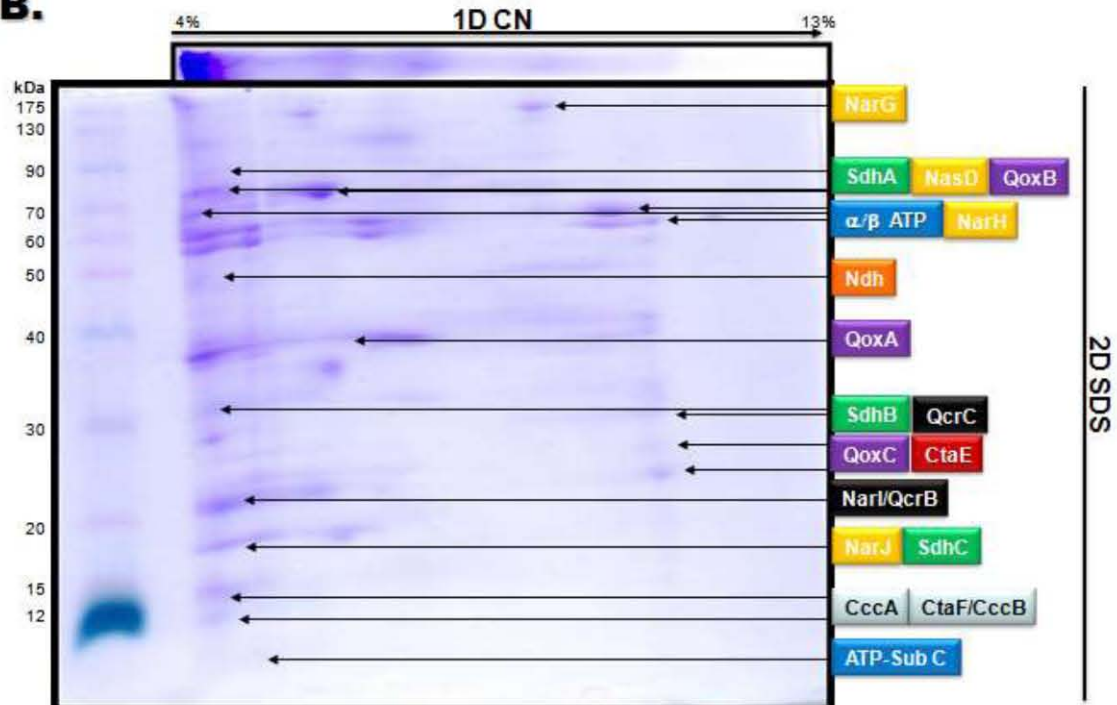
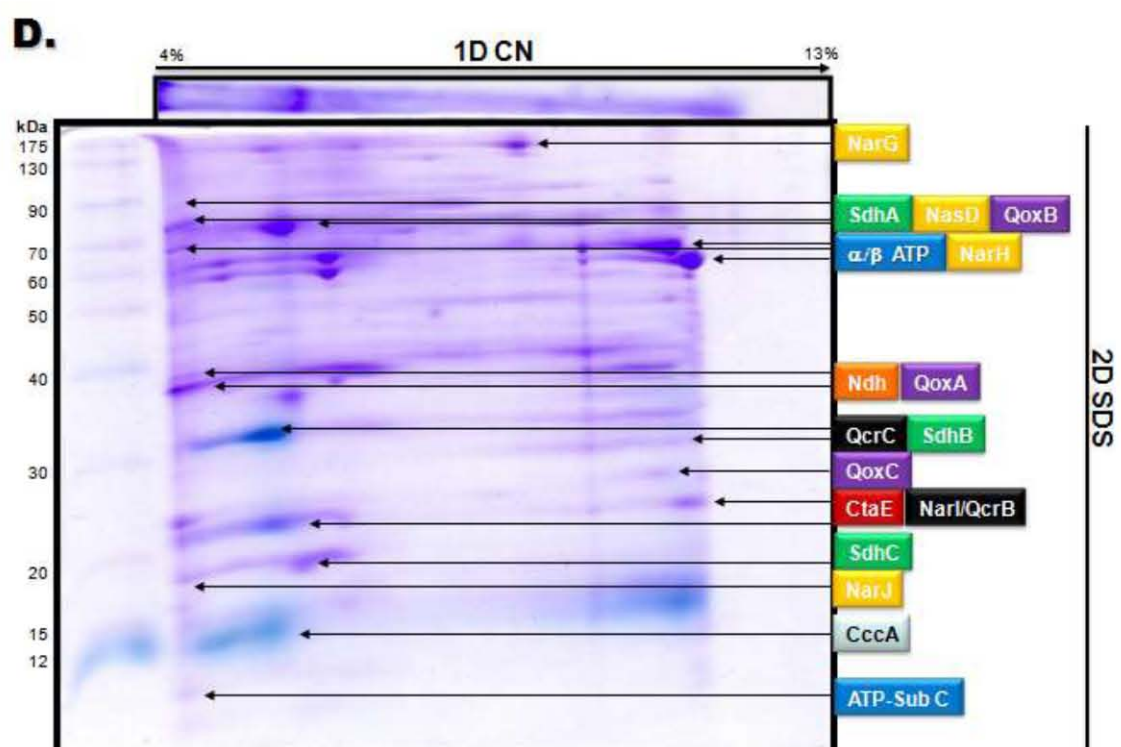
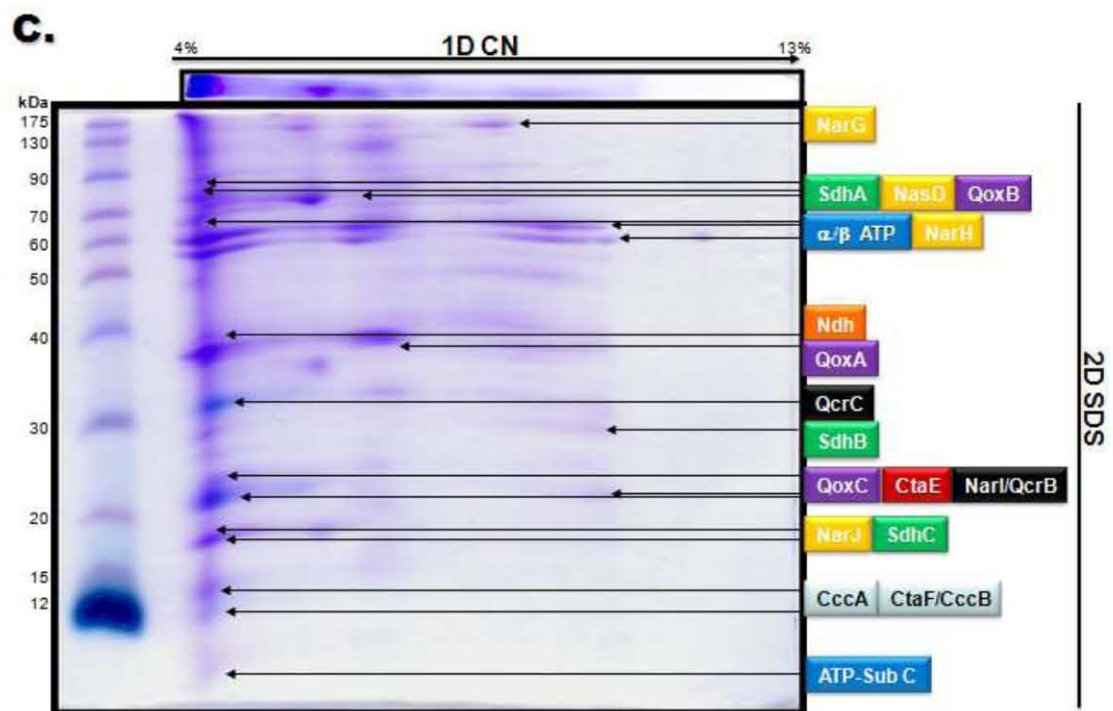


Figura 59. Comparación del análisis de geles de poliacrilamida de primera dimensión en condiciones nativas por medio de segundas dimensiones en condiciones desnaturalizantes con SDS, de membranas solubilizadas con 0.6 mg DDM/ mg proteína. A. Cepa LUW196 pHP13-*C*₅₅₀. B. Cepa LUW196 pHP13-*C*₅₅₀ después de la proteólisis con tripsina. Tinción con TMBZ específica para citocromos covalentemente unidos.

A.**B.**



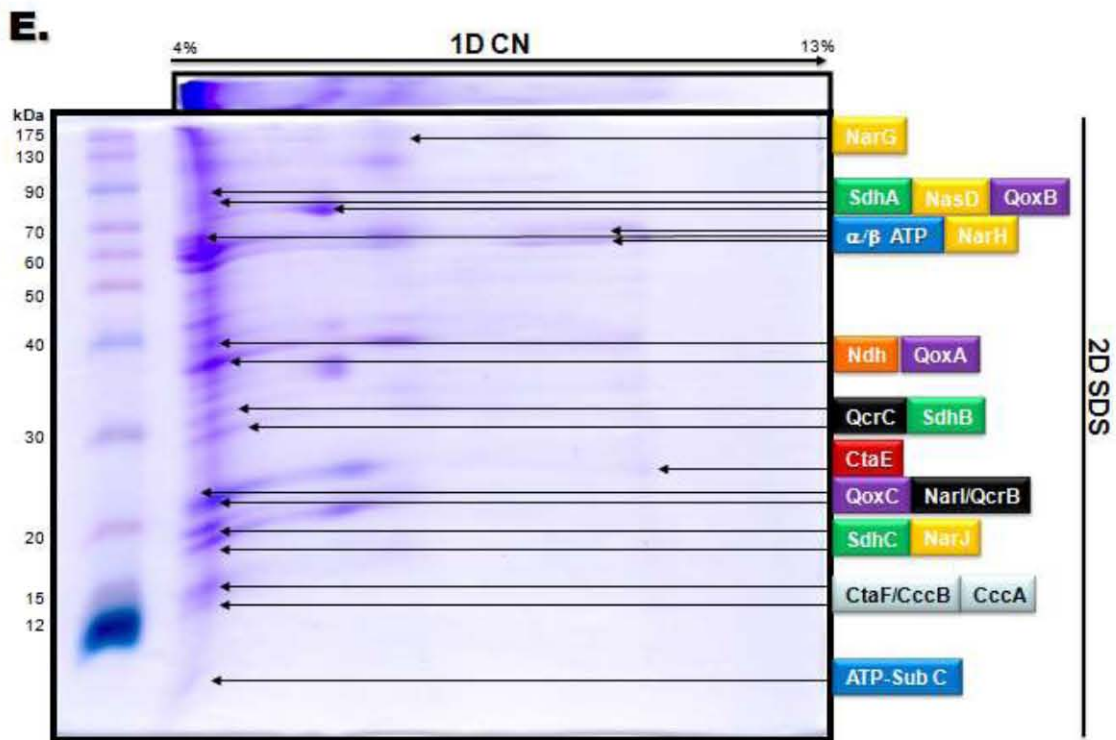


Figura 60. Análisis de geles de poliacrilamida de primera dimensión en condiciones nativas por medio de segundas dimensiones en condiciones desnaturalizantes con SDS, de las membranas solubilizadas con 0.6 mg DDM/ mg proteína. A. *B. subtilis* 168; B. LUW196; C. LUW196 pHP13; D. LUW196 pHP13-*C*₅₅₀; E. LUW196 pHP13-*C*₅₅₀ tripsinizadas. Tinción con Azul de Coomassie para revelar todas las proteínas presentes. Amarillo: subunidades de la Nitrato Reductasa, Verde: subunidades de la Succinato Deshidrogenasa, Morado: subunidades de la Quinol oxidasa tipo *aa*₃, Azul: subunidades de la ATP sintetasa, Negro: subunidades del Complejo *b*₆*c*, Rojo: subunidades de la Citocromo *c* oxidasa, Naranja: NADH deshidrogenasa, y en Blanco: citocromos pequeños *C*₅₅₀ y *C*₅₅₁.

Bibliografía

- Ahuja U., Kjølgaard P., Schulz B.L., Thöny-Meyer L. y Hederstedt L. (2009), **Haem -delivery proteins in cytochrome c maturation System II**, *Molecular Microbiology*, 73: 1058–1071.
- Allen J.W.A., Daltrop O., Stevens J.M. y Ferguson S.J. (2003), **C-type cytochromes: diverse structures and biogenesis systems pose evolutionary problems**, *Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Sciences*, 358: 255-266.
- Ansari M.A., Roberts K.N. y Scheff S.W. (2008), **Oxidative Stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury**, *Free Radical Biology & Medicine*, 45: 443-452.
- Azarkina N., Siletsky S., Borisov V., von Wachenfeldt C., Hederstedt L., y Konstantinov A.A. (1999), **A Cytochrome *bb'*-type Quinol Oxidase in *Bacillus subtilis* Strain 168**, *The Journal Of Biological Chemistry*, 274: 32810–32817.
- Becerra Rivera V.A. y Gutiérrez-Cirlos E.B. (2012), **Efecto de la clonación y sobreexpresión del citocromo *c*₅₅₀ en los complejos respiratorios durante el crecimiento de *Bacillus subtilis***, Tesis de Licenciatura, pp. 78.
- Bengtsson J., Rivolta C., Hederstedt L. y Karamata D. (1999), ***Bacillus subtilis* Contains Two Small c-Type Cytochromes with Homologous Heme Domains but Different Types of Membrane Anchors**, *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 26179-26184.
- Bergsma J., Van Dongen M.B., y Konings W.N. (1982), **Purification and Characterization of NADH Dehydrogenase from *Bacillus subtilis***, *European Journal of Biochemistry*, 128: 151-157.
- Berry E.A., Guergova-Kuras M., Huang L. y Crofts A.R. (2000), **Structure and Function of Cytochrome *bc* Complexes**, *Annual Review of Biochemistry*, 69:1005–1075.
- Bertini I., Cavallaro G. y Rosato A. (2006), **Cytochrome c: Occurrence and Functions**, *Chemical Reviews*, 106: 90-115.
- Borisov V.B., Gennis R.B., Hemp J. y Verkhovsky M.I. (2011), **The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807: 1398–1413.
- Boyer Paul D. (1997), **The ATP Synthase—A Splendid Molecular Machine**, *Annual Review of Biochemistry*, 66: 717-749.
- Boyer Paul D. (2002), **A Research Journey with ATP Synthase**, *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 39045–39061.

-
- Carrillo N. y Ceccarelli E.A. (2003), **Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism**, European Journal of Biochemistry, 270: 1900-1915.
- Carroll J., Fearnley I.M., Skehel J.M., Shannon R.J., Hirst J. y Walker J.E. (2006), **Bovine Complex I Is a Complex of 45 Different Subunits**, The Journal Of Biological Chemistry, 281: 32724–32727.
- Castellani M., Covian R., Kleinschroth T., Anderka O., Ludwig B. y Trumpower B.L. (2010), **Direct Demonstration of Half-of-the-sites Reactivity in the Dimeric Cytochrome *bc*₁ Complex ENZYME WITH ONE INACTIVE MONOMER IS FULLY ACTIVE BUT UNABLE TO ACTIVATE THE SECOND UBIQUINOL OXIDATION SITE IN RESPONSE TO LIGAND BINDING AT THE UBIQUINONE REDUCTION SITE**, The Journal Of Biological Chemistry, 285: 502–510.
- Castro G.N. y Moreno R. (2004), **Biosíntesis del Grupo Hemo**, Revista de Educación Bioquímica, 23: 99-106
- Cooper G.M. y Hausman R.E. (2006), **La Célula**, Marbán, tercera edición, 716 pp.
- Covian R., Gutiérrez Cirlos E.B. y Trumpower B.L. (2004), **Anti-cooperative Oxidation of Ubiquinol by the Yeast Cytochrome *bc*₁ Complex**, The Journal Of Biological Chemistry, 279: 15040–15049.
- Covian R., Kleinschroth T., Ludwig B. y Trumpower B.L. (2007), **Asymmetric Binding of Stigmatellin to the Dimeric *Paracoccus denitrificans bc*₁ Complex EVIDENCE FOR ANTI-COOPERATIVE UBIQUINOL OXIDATION AND COMMUNICATION BETWEEN CENTER P UBIQUINOL OXIDATION SITES**, The Journal Of Biological Chemistry, 282: 22289–22297.
- Covian R. y Trumpower B.L. (2009), **The Rate-limiting Step in the Cytochrome *bc*₁ Complex (Ubiquinol-Cytochrome cOxidoreductase) Is Not Changed by Inhibition of Cytochrome b-dependent Deprotonation IMPLICATIONS FOR THE MECHANISM OF UBIQUINOL OXIDATION AT CENTER P OF THE *bc*₁ COMPLEX**, The Journal Of Biological Chemistry, 284: 14359 –14367.
- Crofts Antony R. (2004), **The Cytochrome *bc*₁ Complex: Function in the Context of Structure**, Annual Review of Physiology, 66: 689–733.
- David P.S., Morrison M.R., Wong S.L. y Hill B.C. (1999), **Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Forms of Membrane-Bound Cytochrome *c-550nm* from *Bacillus subtilis***, Protein Expression and Purification 15: 69–76.
- David P.S., Dutt P.S., Wathen B., Jia Z. y Hill B.C. (2000), **Characterization of a Structural Model of Membrane Bound Cytochrome *c-550* from *Bacillus subtilis***, Archives of Biochemistry and Biophysics, 377: 22–30.

-
- De Vitry C., Redeker D.A., Zito V. y Wollman F.A. (2004), **Biochemical and spectroscopic characterization of the covalent binding of heme to cytochrome *b*₆**. *Biochemistry* 43, 3956–3968.
- De Vrij W., van den Burg B. y Konings W.N. (1987). **Spectral and potentiometric analysis of cytochromes from *Bacillus subtilis***. *European Journal of Biochemistry*, 166: 589-595.
- Dunphy P.J., Phillips P.G., y Brodie A.F. (1971), **Separation and identification of menaquinones from microorganisms**, *Journal Lipid Research*, 12: 442-449.
- Edmondson D. y Ghisla S. (1999), **Flavoenzyme Structure and Function: Approaches Using Flavin Analogues**, *Methods in Molecular Biology*, 131: 157-179.
- Efremov R.G., Baradaran R. y Sazanov L.A. (2010), **The architecture of respiratory complex I**, *Nature*, 465: 441-447.
- Eguiarte L.E., Sousa V. y Aguirre X. (2007), **Ecología molecular**, Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT, México, 336-499.
- Farver O., Einarsdóttir Ó. y Pecht I. (2000), **Electron transfer rates and equilibrium within cytochrome *c* oxidase**, *European Journal of Biochemistry*, 267: 950-954.
- Feissner R.E., Richard-Fogal C.L., Frawley E.R., Loughman J.A., Earley K.W. y Kranz R.G. (2006), **Recombinant cytochromes *c* biogenesis systems I and II and analysis of haem delivery pathways in *Escherichia coli***, *Molecular Microbiology*, 60: 563–577.
- Fontecave M. y Ollagnier-de-Choudens S. (2008), **Iron–sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer**, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 474: 226-237.
- García G.A.P. y Gutiérrez Cirlos E.B. (2010), **Caracterización de la actividad del complejo tipo *bc* de *Bacillus subtilis* con diferentes quinonas**, Tesis de Licenciatura, pp. 96.
- García M.O.L.Y.J., Chagolla-López A., González de la Vara L., Cabellos T., Gómez-Lojero C y Gutiérrez Cirlos E.B. (2012), **The composition of the *Bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplexes**, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44: 473-486.
- Gary N.D. y Bard R.C. (1952), **Effect of nutrition on the growth and metabolism of *Bacillus subtilis***, Department of Bacteriology, Indiana University, 501-511.
- Gómez-Lojero C., Pérez-Gómez B., Shen G., Schluchter W.M. y Bryant D.A. (2003), **Interaction of Ferredoxin: NADP⁺ Oxidoreductase with**

Phycobilisomes and Phycobilisome Substructures of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002, *Biochemistry*, 42: 13800-13811.

Gorbikova E. (2009), **Oxygen Reduction and Proton Translocation by Cytochrome c Oxidase**, Department of Biological and Environmental Sciences, 1-48.

Gustavsson T., Trane M., Moparthi V.K., Miklovyte E., Moparthi L., Górecki K., Leiding T., Arsköld S.P. y Hägerhäll C. (2010), **A cytochrome c fusion protein domain for convenient detection, quantification, and enhanced production of membrane proteins in *Escherichia coli*- expression and characterization of cytochrome- tagged Complex I subunits**, *Protein Science*, 19: 1445-1460.

Gutiérrez-Cirlos E.B. y Trumpower B.L. (2002), **Inhibitory Analogs of Ubiquinol Act Anti-cooperatively on the Yeast Cytochrome *bc*₁ Complex EVIDENCE FOR AN ALTERNATING, HALF-OF-THE-SITES MECHANISM OF UBIQUINOL OXIDATION**, *The Journal Of Biological Chemistry*, 277: 1195–1202.

Haddock B.A. y Jones C.W. (1977), **Bacterial Respiration**, *Bacteriological Reviews*, 41: 47-99.

Hägerhäll C., Aasa R., von Wachenfeldt C., y Hederstedt L. (1992), **Two Hemes in *Bacillus subtilis* Succinate:Menaquinone Oxidoreductase (Complex II)**, *Biochemistry*, 31: 741 1-7421.

Hamoen L.W., Venema G. y Kuipers O.P. (2003), **Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators**, *Microbiology*, 149: 9-17.

Henning W., Vo L., Albanese J. y Hill B.C. (1995), **High-yield purification of cytochrome *aa3* and cytochrome *caa3* oxidases from *Bacillus subtilis* plasma membranes**, *Biochemical Journal*, 309: 279-283.

Holmes D.S. y Quigley M. (1981), **A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids**, *Analytical Biochemistry*, 114: 193–197.

Hughes L.M., Covian R., Gribble G.W. y Trumpower B.L. (2009), **Probing binding determinants in center P of the cytochrome *bc*₁ complex using novel hydroxy-naphthoquinones**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1-6.

Inouye K., Mae T., Kondo S. y Ohkawa H. (1999), **Inhibitory Effects of Vitamin A and Vitamin K on Rat Cytochrome P450A1-Dependent Monooxygenase Activity**, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262: 565–569.

Johnson D.C., Dean D.R., Smith A.D. y Johnson M.K. (2005), **Structure, Function, and Formation of Biological Iron-Sulfur Clusters**, *Annual Review of Biochemistry*, 74: 247-281.

-
- Kabashima Y., Sone N., Kusumoto T. y Sakamoto J. (2013), **Purification and characterization of malate:quinone oxidoreductase from thermophilic *Bacillus* sp. PS3**, Journal of Bioenergetic Biomembranes, 45: 131-136.
- Konings W.N. y Freese E. (1972). **Amino acid transport in membrane vesicles of *Bacillus subtilis***. Journal of Biological Chemistry, 247: 2408-2418.
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G, Bessières P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S.C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C.V., Caldwell B., Capuano V., Carter N.M., Choi S.K., Codani J.J., Connerton I.F., Cummings N.J., Daniel R. A., Denizot F., Devine K.M., Düsterhöft A., Ehrlich S.D., Emmerson P.T., Entian K.D., Errington J., Fabret C., Ferrari E., Foulger D., Fritz C., Fujita M., Fujita Y., Fuma S., Galizzi A., Galleron N., Ghim S.Y., Glaser P., Goffeau A., Golightly E.J., Grandi G., Guiseppi G., Guy B.J., Haga K., Haiech J., Harwood C.R., Hénaut A., Hilbert H., Holsappel S., Hosono S., Hullo M.F., Itaya M., Jones L., Joris B., Karamata D., Kasahara Y., Klaerr-Blanchard M., Klein C., Kobayashi Y., Koetter P., Koningstein G., Krogh S., Kumano M., Kurita K., Lapidus A., Lardinois S., Lauber J., Lazarevic V., Lee S.M., Levine A., Liu H., Masuda S., Mauël C., Médigue C., Medina N., Mellado R.P., Mizuno M., Moest D., Nakai S., Noback M., Noone D., O'Reilly M, Ogawa K., Ogiwara A., Oudega B., Park S.H., Parro V., Pohl T. M., Portetelle D., Porwollik S., Prescott A.M., Presecan E., Pujic P., Purnelle B., Rapoport G., Rey M., Reynolds S., Rieger M., Rivolta C., Rocha E., Roche B., Rose M., Sadaie Y., Sato T., Scanlan E., Schleich S., Schroeter R., Scoffone F., Sekiguchi J., Sekowska A., Seror S.J., Serror P., Shin B.S., Soldo B., Sorokin A., Tacconi E., Takagi T., Takahashi H., Takemaru K., Takeuchi M., Tamakoshi A., Tanaka T., Terpstra P., Tognoni A., Tosato V., Uchiyama S., Vandenbol M., Vannier F., Vassarotti A., Viari A., Wambutt R., Wedler E., Wedler H., Weitzenegger T., Winters P., Wipat A., Yamamoto H., Yamane K., Yasumoto K., Yata K., Yoshida K., Yoshikawa H.F., Zumstein E., Yoshikawa H. y Danchin A. (1997), **The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis***, Nature, 390: 249-266.
- Kusumoto K., Sakiyama M., Sakamoto J., Noguchi S. y Sone N. (2000), **Menaquinol oxidase activity and primary structure of cytochrome *bd* from the amino-acid fermenting bacterium *Corynebacterium glutamicum***, Archives of Microbiology., 173: 390-397.
- Kutoh E. y Sone N. (1988), **Quinol-cytochrome *c* Oxidoreductase from the Thermophilic Bacterium PS3**, The Journal of Biological Chemistry, 263: 9020-9026.
- Laemmli U.K. (1970), **Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4**, Nature, 227: 680-685.
- Lancaster C.R.D. y Kröger A. (2000), **Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures**, Biochimica et Biophysica Acta, 1459: 422-431.

-
- Lancaster C.R.D. (2002), **Succinate:quinone oxidoreductases: an overview**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1553: 1-6.
- Lauraeus M., Haltia T., Saraste M. y Wikstrom M. (1991), ***Bacillus subtilis* expresses two kinds of haem-A-containing terminal oxidases**, *European Journal of Biochemistry*, 197: 699-705.
- Lauraeus M. y Wikström M. (1993), **The terminal quinol oxidases of *Bacillus subtilis* have different energy conservation properties**, *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 11470-11473.
- Lemma E., Schägger H. y Kröger A. (1993), **The menaquinol oxidase of *Bacillus subtilis* W23**, *Archives of Microbiology.*, 159: 574-578.
- Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Bretscher A., Ploegh H. y Matsudaira P. (2007), **Molecular Cell Biology**, Sixth Edition, W. H. Freeman and Company, New York, pp. 1150.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951), **Protein measurement with the Folin phenol reagent**. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Mansoorabadi S.O., Thibodeaux C.J., y Liu H. (2007), **The Diverse Roles of Flavin Coenzymes - Nature's Most Versatile Thespians**, *Journal of Organic Chemistry*, 72: 6329-6342.
- Markwell M.A., Haas S.M., Bieber L.L., y Tolbert N.E. (1978), **A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples**. *Analytical Biochemistry*. 87: 206-210.
- Melamed-Harel H., Tel-Or E. y San Pietro A. (1985), **Effect of Ferredoxin on the Diaphorase Activity of Cyanobacterial Ferredoxin-NADP Reductase**, *Plant Physiology*, 77: 229-231.
- Merker M.P., Audi S.H., Bongard R.D., Lindemer B.J. y Krenz G.S. (2006), **Influence of pulmonary arterial endothelial cells on quinone redox status: effect of hyperoxia-induced NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1**, *American Journal of Lung Cellular and Molecular Physiology*, 290: 607-619.
- Mitchell P. (1978), **David Keilin's Respiratory Chain Concept and Its Chemiosmotic Consequences**, 295-330.
- Moreno-Campuzano S., Janga S.C. y Pérez-Rueda E. (2006), **Identification and analysis of DNA-binding transcription factors in *Bacillus subtilis* and other Firmicutes- a genomic approach**, *BioMed Central Genomics*, 7: 147.
- Nakano M.M., Dailly Y.P., Zuber P. y Clark D.P. (1997), **Characterization of Anaerobic Fermentative Growth of *Bacillus subtilis*: Identification of**

-
- Fermentation End Products and Genes Required for Growth**, Journal of Bacteriology, 179: 6749–6755.
- Nakano M.M. y Zuber P. (1998), **Anaerobic Growth of A “Strict Aerobe” (*Bacillus subtilis*)**, Annual Review of Microbiology, 52: 165-190.
- Nelson D.L. y Cox M.M. (2009), **Lehninger: Principios de Bioquímica**, Omega quinta edición, 1158 pp.
- Pattanaik B., Whitaker M.J. y Montgomery B.L. (2012), **Light quantity affects the regulation of cell shape in *Fremyella diplosiphon***, Frontiers in Microbiology, Microbial Physiology and Metabolism, 3: 1-6.
- Picón G.G.I. y Gutiérrez-Cirlos E.B. (2012), **Análisis de la solubilización de membranas de *Bacillus subtilis* para una purificación parcial del complejo *b_{6c}***, Tesis de Licenciatura, pp. 116.
- Piggot P.J. (2009) ***Bacillus subtilis*. Encyclopedia of Microbiology** (Tercera edición). Temple University School of Medicine, Philadelphia, PA, USA, pp. 45.
- Powers L., Lauraeus M., Reddy K.S., Chance B. y Wikström M. (1994), **Structure of the binuclear heme iron-copper site in the quinol-oxidizing cytochrome *aa3* from *Bacillus subtilis***, Biochimica et Biophysica Acta, 1183: 504-512.
- Samaniego H.M. (2007), **Clonación, sobre-expresión y purificación de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en *Escherichia coli***, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. México. 89 pp.
- Sambrook J. y Russell D.W. (2006), **The condensed Protocols. From Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 800 pp.
- Santana M., Kunst F., Hullo M.F., Rapoport G., Danchin A. y Glaser P. (1992), **Molecular Cloning, Sequencing, and Physiological Characterization of the *qox* Operon from *Bacillus subtilis* Encoding the *aa3-600* Quinol Oxidase**, The Journal of Biological Chemistry, 267: 10225-10231.
- Saraste M., Metso T., Nakari T., Jalli T., Lauraeus M. y Van Der Oost J. (1991), **The *Bacillus subtilis* cytochrome-c oxidase. Variations on a conserved protein theme**, European Journal of Biochemistry, 195: 517-525.
- Schägger H. y von Jagow G. (1987), **Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa**, Analytical Biochemistry, 166: 368-379.
- Schägger H., Cramer W.A. y von Jagow G. (1994), **Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis**. Analytical Biochemistry, 220-230.

-
- Schoepp-Cothenet B., Lieutaud C., Baymann F., Verméglio A., Friedrich T., Kramer D.M. y Nitschke W. (2009), **Menaquinone as pool quinone in a purple bacterium**, Proceedings of the National Academy of Sciences, 106: 8549–8554.
- Schultz B.E. y Chan S.I. (2001), **Structures And Proton-Pumping Strategies of Mitochondrial Respiratory Enzymes**, Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 30: 23-65.
- Schnorpfel M., Janausch I.G., Biel S., Kröger A. y Uden G. (2001), **Generation of a proton potential by succinate dehydrogenase of *Bacillus subtilis* functioning as a fumarate reductase**, European Journal of Biochemistry, 268: 3069-3074.
- Smith J., Zhang H., Yan J., Kurisu G. y Cramer W.A. (2004), **Cytochrome *bc* complexes: a common core of structure and function surrounded by diversity in the outlying provinces**, Current Opinion in Structural Biology, 14: 432-439.
- Snyder C.H., Merbitz-Zahradnik T., Link T.A. y Trumpower B.L. (1999), **Role of the Rieske Iron–Sulfur Protein Midpoint Potential in the Protonmotive Q-Cycle Mechanism of the Cytochrome *bc1* Complex**, Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 31: 235-242.
- Snyder C.H., Gutierrez-Cirlos E.B. y Trumpower B.L. (2000), **Evidence for a Concerted Mechanism of Ubiquinol Oxidation by the Cytochrome *bc1* Complex**, The Journal of Biological Chemistry, 275: 13535–13541.
- Sone N., Seckmachi N. y Kutoh E. (1987), **Identification and properties of a quinol oxidase super-complex composed of a *bc1* complex and cytochrome *c* oxidase in the thermophilic bacterium PS3**, The Journal of Biological Chemistry, 262: 15386-15391.
- Sonenshein A.L., Hoch J.A. y Losick R. (2002), ***Bacillus subtilis* and its closest relatives: FROM GENES TO CELLS**, American Society for Microbiology Press Washington D.C., 629 pp.
- Stroebe D., Choquet Y., Popot J. y Picot D. (2003), **An atypical haem in the cytochrome *b6f* complex**, Nature, 426: 413-418.
- Szczepaniak K., Worch R. y Grzyb J. (2013), **Ferredoxin:NADP(+) oxidoreductase in junction with CdSe/ZnS quantum dots: characteristics of an enzymatically active nanohybrid**, Journal of Physics Condensed Matter, 25 (19) 194102.
- Thomas P.E., Ryan D. y Levin W. (1976), **An imprinted staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P450 on sodium dodecil sulfate polyacrylamide gels**, Analytical Biochemistry., 75: 168-176.

-
- Thöny-Meyer L. (1997) **Biogenesis of Respiratory Cytochromes in Bacteria**, *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 61: 337–376
- Trumpower Bernard L. (1990^a), **Cytochrome *bc1* Complexes of Microorganisms**, *Microbiological Reviews*, 54: 101-129.
- Trumpower Bernard L. (1990^b), **The Protonmotive Q Cycle. ENERGY TRANSDUCTION BY COUPLING OF PROTON TRANSLOCATION TO ELECTRON TRANSFER BY THE CYTOCHROME *bc*, COMPLEX**, *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 11409-11412.
- von Wachenfeldt C. y Hederstedt L. (1990), ***Bacillus subtilis* 13-Kilodalton Cytochrome *c-550* Encoded by *cccA* Consists of a Membrane-Anchor and a Heme Domain**, *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 13939-13948.
- von Wachenfeldt C. y Hederstedt L. (1992), **Molecular biology of *Bacillus subtilis* cytochromes**, *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 100: 91-100.
- von Wachenfeldt C. y Hederstedt L. (1993), **Physico-chemical characterisation of membrane-bound and water-soluble forms of *Bacillus subtilis* cytochrome *c-550***, *European Journal Biochemistry.*, 212: 499-509.
- Weiss H., Friedrich T., Hofhaus G. y Preis D. (1991), **The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria**, *European Journal Biochemistry*, 197: 563-573.
- Wikström M. (2010), **Cytochrome *c* Oxidase**, *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-10.
- Winstedt L., Yoshida K., Fujita Y. y von Wachenfeldt C. (1998), **Cytochrome *bd* Biosynthesis in *Bacillus subtilis*: Characterization of the *cydABCD* Operon**, *Journal of Bacteriology*, 180: 6571–6580.
- Winstedt L. y Von Wachenfeldt C. (2000), **Terminal Oxidases of *Bacillus subtilis* Strain 168: One Quinol Oxidase, Cytochrome *aa3* or Cytochrome *bd*, Is Required for Aerobic Growth**, *Journal of Bacteriology*, 182: 6557–6564.
- Wittig I., Karas M. y Schägger H. (2007), **High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complex**. *Molecular and Cellular Proteomics*, 1215-1225.
- Xia D., Yu C., Kim H., Xia J., Kachurin A.M., Zhang L., Yu L. y Deisenhofer J. (1997), **Crystal Structure of the Cytochrome *bc1* Complex from Bovine Heart Mitochondria**, *Science*, 277: 60-66.

-
- Yagi Takao (1993), **The bacterial energy-transducing NADH-quinone oxidoreductases**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1141: 1-17.
- Yi S.M., Narasimhulu K.V., Samoilova R.I., Gennis R.B. y Dikanov S.A. (2010), **Characterization of the Semiquinone radical Stabilized by the Cytochrome aa_3 -600 Menaquinol Oxidase of *Bacillus subtilis***, *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 18241-18251.
- Yu J., Hederstedt L. y Piggot P.J. (1995), **The Cytochrome *bc* Complex (Menaquinone: Cytochrome *c* Reductase) in *Bacillus subtilis* Has a Nontraditional Subunit Organization**, *Journal Of Bacteriology*, 177: 6751–6760.
- Yu J. y Le Brun 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**, *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 8860–8866.
- Zamboni N. y Sauer U. (2003), **Knockout of the high-coupling cytochrome aa_3 oxidase reduces TCA cycle fluxes in *Bacillus subtilis***, *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 226: 121-126.
- Zhang H., Primak A., Cape J., Bowman M.K., Kramer D.M. y Cramer W.A. (2004), **Characterization of the High-Spin Heme *x* in the Cytochrome *b6f* Complex of Oxygenic Photosynthesis**, *Biochemistry*, 43: 16329-16336.

Referencias de Internet:

http://www.allposters.es/-sp/Endospores-in-Bacillus-Subtilis-Bacteria-TEM-Posters_i8990236_.htm

http://www.cliffsnotes.com/study_guide/topicArticleId-8524,articleId-8420.html

<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00190.html>.

<https://www.morebooks.de/store/es/book/funktionale-charakterisierung-des-yhbdef-operons-aus-bacillus-subtilis/isbn/978-3-639-34105-8>

<http://www.u-tokyo.ac.jp/en/todai-research/research-highlights/dethroning-the-dictator/>

<http://www.sigmaaldrich.com>