

24216

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
CENTRAL

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

CINETICA DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA DE LA BACTERIA

FOTOSINTETICA Rhodospirillum rubrum

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA

ALEJANDRO SOSA PEINADO

MEXICO, D.F.

1989

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

ABREVIATURAS.....	5
CAPITULO I : INTRODUCCION.	
I.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA FOTOSINTESIS EN BACTERIAS.....	7
I.1.1. PRINCIPALES FAMILIAS DE BACTERIAS FOTOSINTETICAS.....	8
I.1.2. CLASIFICACION DE LAS BACTERIAS FOTOSINTETICAS DEL ORDEN RHODOSPIRILLALES.....	10
I.1.3. CLASIFICACION Y DESCRIPCION DE <u>Rhodospirillum rubrum</u> ...	10
I.1.4. DIFERENTES PREPARACIONES DE MEMBRANA.....	12
I.2. HIPOTESIS DE LA TRANSFORMACION ENERGETICA EN MEMBRANAS.	16
I.2.1. HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA.....	17
I.3. LA ESTRUCTURA DEL PPI Y PROPIEDADES GENERALES.....	19
I.3.1 REACCIONES DONDE PARTICIPA EL PPI COMO FUENTE DE FOSFATOS Y ENERGIA EN SISTEMAS SOLUBLES.....	21
I.4. PIROFOSFATASAS, PROPIEDADES GENERALES.....	23
I.4.1. PIROFOSFATASA DE MEMBRANA DE <u>Rhodospirillum rubrum</u>	27
I.4.2. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA PPIasa DE MEMBRANA DE <u>Rhodospirillum rubrum</u>	34
I.5. ASPECTOS CINETICOS DE LAS PIROFOSFATASAS.....	38
I.6. OBJETIVOS.....	42
CAPITULO II. : MATERIALES Y METODOS	
II.1. CRECIMIENTO DE BACTERIAS.....	44
II.1.1. MEDIOS DE CULTIVO.....	44
II.1.2 SIEMBRA DE BACTERIAS.....	46
II.1.3 COSECHA DE BACTERIAS.....	47
II.2. OBTENCION DE CROMATOFOROS.....	47

II.2.1	SOLUBILIZACION DE LA PPIasa DE MEMBRANA.....	48
II.3.	DETERMINACION DE PROTEINA.....	51
II.3.1	DETERMINACION DEL CONTENIDO DE BCl.....	51
II.4.	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA EN EL CROMATOFORO Y EN EL SOLUBILIZADO EN DETERGENTE.....	51
II.5.	CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS ESPECIES LIBRES Y DE LOS COMPLEJOS EN EL MEDIO DE REACCION.....	52
II.6.	MEDIDA DE LA CONDUCTIVIDAD DEL CATION Mg^{2+}	53

CAPITULO III. : RESULTADOS Y DISCUSION.

III.1.	EFFECTO DEL Mg AÑADIDO SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA EN CROMATOFOROS Y SOBRE LA ENZIMA SOLUBILIZADA EN DETERGENTE.....	55
III.2.	COEFICIENTE DE HILL, DE LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA RESPECTO AL $MgCl_2$ AÑADIDO EN CROMATOFOROS.....	61
III.3.	ACTIVIDAD DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA Y DE LA ENZIMA SOLUBILIZADA EN DETERGENTE CON EL Zn -PPI COMO SUSTRATO	64
III.4.	EFFECTO DE LA VARIACION DEL Mg^{2+} LIBRE SOBRE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA EN CROMATOFOROS CON EL COMPLEJO Mg -PPI CONSTANTE.....	67
III.5.	CONDUCTIVIDAD DE METALES LIBRES (Mg^{2+}), CON Mg^{2+} VARIABLE Y Mg -PPI CONSTANTE.....	72
III.6.	EFFECTO DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE PPI AÑADIDO ($MgCl_2$ 1mM) Y CONCENTRACIONES CRECIENTES DE $MgCl_2$ AÑADIDO (PPI 1mM) SOBRE LA ACTIVIDAD DE PPIasa DE MEMBRANA..	74
III.7.	EFFECTO DE LA VARIACION DEL COMPLEJO Mg -PPI EN LA ACTIVIDAD DE LA PPIasa DE MEMBRANA A CONCENTRACIONES CONSTANTES DE Mg^{2+} LIBRE.....	79

III.8. EFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES Ca^{2+} Y Zn^{2+} SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA PPIasa.....	83
III.8.1.EFECTO DEL CALCIO.....	83
III.8.2.EFECTO DEL ZINC.....	90
CAPITULO IV : CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	95
BIBLIOGRAFIA.....	98

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina.
ATP	Trifosfato de adenosina.
BCI	Bacterioclorofila.
BSA	Albúmina de suero de bovino.
CCCP	p-triclorometoxi carbonil-cianuro-fenilhidrazona.
Cl	Clorofila.
DCCD	Diciclohexil carbodiimida.
2,6 DCP	2-6 Diclorofenol indofenol.
DEAE	Dietil amino etil.
DTT	Ditiotreitol.
DTE	Ditioeritol.
EDTA	Acido etilén diamino tetracético.
EGTA	Acido etilénglicol bis (amino-etil-eter) NN' tetracético.
fpm	Fuerza protón motriz.
H ⁺	Protón.
IDP	Imidodifosfato.
FCCP	p-trifluorometoxi carbonil-cianuro fenilhidrazona.
MalNET	N-etil maleimida.
MDP	Metilén difosfonato.
MOPS	Acido morfolino propano sulfónico.
µm	Micrómetro.
nm	Nanómetro.
NBF-Cl	4-cloro 3 nitrobenzo-trifluoruro.
PEP	Fosfoenol piruvato.
Pi	Fosfato.
³² Pi	Fosfato radioactivo.

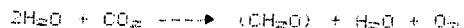
PPi	Pirofosfato inorgánico.
PPiase	Pirofosfatasa.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TCA	Acido tricloroacético.
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano.
UQ ₁₀	Ubiquinona 10.
UDP	Uracil difosfato.
UTP	Uracil trifosfato.

CAPITULO I.

INTRODUCCION

I.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA FOTOSINTESIS EN BACTERIAS.

En el proceso conocido como fotosíntesis, la energía de las radiaciones electromagnéticas es convertida en energía química, esto sucede en la membrana tilacoidal de los cloroplastos o bien en la membrana plasmática de las bacterias fotosintéticas. Durante la fotosíntesis oxigénica se produce oxígeno con base en la siguiente reacción:



Sin embargo, la mayoría de las bacterias fotoautótrofas llevan a cabo fotosíntesis anoxigénica con la reacción descrita por van Niel en 1935:



En esta reacción no existe liberación de oxígeno molecular y el agua es reemplazada por otros reductores como el S_2 , $S_2O_3^{2-}$, H_2S o el hidrógeno molecular. Asimismo algunas bacterias fotoheterotróficas, pueden reemplazar tanto al agua como a los compuestos de azufre por compuestos orgánicos parcialmente reducidos tales como el malato, succinato, β -hidroxibutirato, etc. (Gottscharik, 1986).

Los procesos que intervienen en la fotosíntesis están definidos en cuatro fases: 1) Captura de la energía radiante por los pigmentos que contienen bacterioclorofila y carotenos, 2) Transferencia de energía de los centros de reacción (contienen bacterioclorofila y bacteriofeofitina) en donde ocurre el proceso primario de separación de carga (oxido-reducción), 3) El transporte de electrones inducido por el centro de reacción, 4) la

energía derivada de la cadena de transporte de electrones es utilizada para la síntesis de ATP, transporte de solutos, etc. (Dawes, 1986).

La energía derivada de la luz, es utilizada para generar el ATP (fotofosforilación) por vía del circuito de protones análogo al de mitocondrias, cloroplastos y membranas bacterianas. Por lo tanto la fuerza protónmotriz (fpm) generada a través de la membrana impermeable a protones es utilizada por la ATP sintetasa translocadora de protones.

I.1.1 PRINCIPALES FAMILIAS DE BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS

Las bacterias fotosintéticas comprenden seis familias:

Cianobacteriaceae	Rhodospirillaceae
Chromatiaceae	Cloroflexaceae
Chlorobiaceae	Halobacteriaceae

De las cuales las cianobacterias llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica, su aparato fotosintético es similar al de los eucariontes fotosintéticos, ya que contienen dos fotosistemas. El citoplasma de las cianobacterias contiene unidades membranales llamados tilacoides. Muchos géneros de cianobacterias son fotoautotróficos obligados y algunos géneros son capaces de fijar el N_2 .

Las familias de bacterias fotosintéticas que llevan a cabo fotosíntesis anoxigénica, utilizan como reductores compuestos de azufre, hidrógeno y sustratos orgánicos. Estas familias se dividen en : la familia Chromatiaceae o bacterias púrpuras Sulfurosas y las Chlorobiaceae o bacterias verdes sulfurosas, que son anaeróbicas obligadas, estas familias son fotoatotróficas.

La familia *Rhodospirillaceae* o bacterias púrpuras no sulfurosas son principalmente fotoheterótrofas y pueden reducir el CO_2 . A diferencia del resto de las familias, que son capaces de crecer quimioheterotróficamente en presencia de O_2 y multiplicarse en la oscuridad, obteniendo su energía de la oxidación de compuestos orgánicos y utilizando el oxígeno como último aceptor de electrones. Algunas especies son capaces de utilizar el H_2 para reducir el CO_2 (Clayton y Sistrom, 1978).

La familia de *Chloroflexaceae*, presenta una sola especie *Chloroflexus auricantus*, es capaz de crecer fotoautotróficamente con compuestos de sulfato como donadores de electrones, y es fundamentalmente un organismo fotorganotrófico, que puede crecer con fotosíntesis anoxigénica o bien en condiciones respiratorias en la oscuridad.

En la familia *Halobacteriaceae*, se encuentran organismos que a concentraciones salinas elevadas (4.3 M de NaCl) realizan fotosíntesis anoxigénica, y su aparato fotosintético es muy diferente al resto de los demás procariontes fotosintéticos, ya que en lugar de Bcl (bacterioclorofila) o Cl (clorofila), presenta una proteína asociada a membrana llamada bacteriorrodopsina. Esta proteína comprende el 75% del peso seco de la membrana y se encuentra dispuesta en una sola capa de la membrana, cada complejo tiene un peso molecular de 26 kilodaltones (Eisenbach y Caplan, 1979).

I.1.2. CLASIFICACION DE LAS BACTERIAS FOTOSINTETICAS DEL ORDEN

RHODOSPIRILLALES

Las bacterias fotosintéticas usadas en este trabajo pertenecen al orden Rhodospirillales y llevan a cabo fotosíntesis anoxigénica y de acuerdo con la clasificación de Pfennig y Truper de 1971 este orden incluye dos subórdenes que son: Rhodospirillineae y Chlorobiineae.

El suborden Rhodospirillineae comprende organismos que contienen Bcl "a" o "b"; estos pigmentos están localizados en sistemas de membrana que se invaginan al interior del citoplasma, y que se denominan cromatóforos. Este suborden contiene dos familias: Rhodospirillaceae y Chromatiaceae.

El suborden Chlorobiineae comprende bacterias con Bcl "c", "d", o "e", tales pigmentos están localizados en estructuras especiales llamadas "chlorobium", los cuales están unidos a la membrana citoplásmica. Este suborden contiene dos familias: Chlorobiaceae y Chloroflexaceae (Trupper, 1976).

I.1.3. CLASIFICACION Y DESCRIPCION DE Rhodospirillum rubrum

La clasificación de la bacteria empleada en este trabajo es:

Orden: Rhodospirillales

Suborden: Rhodospirillineae

Familia: Rhodospirillaceae

Género: Rhodospirillum

Especie: Rhodospirillum rubrum

La especie Rhodospirillum rubrum, posee una forma espiral y mide 0.8 μm de ancho por 7 a 10 μm de largo; se multiplica por fisión binaria; presenta flagelos polares y una pared celular

separada de la membrana celular por un espacio periplásmico. La membrana celular envuelve al citoplasma y contiene el sistema de transporte de electrones. Si la fotosíntesis se lleva a cabo en la membrana plasmática en condiciones de baja concentración de oxígeno, presenta unas invaginaciones que se denominan cromatóforos y que constituyen una continuación de la membrana plasmática. En el espacio periplásmico existen proteínas que participan en el transporte de electrones como el citocromo C_2 . En condiciones aeróbicas sin luz, obtiene energía a partir de la oxidación de sustratos orgánicos. En la fase respiratoria no desarrolla las invaginaciones llamadas cromatóforos.

Un población de R. rubrum en un amortiguador fisiológico sin alimento tiene una vida media de 344 hrs con luz y de 12 hrs sin luz (Dawes, 1986). Esta bacteria almacena glucógeno o β -hidroxibutirato como reservorio de energía (Merrick, 1978) y requiere de biotina para su crecimiento.

Utiliza como donadores de electrones y como fuente de carbono los siguientes compuestos: acetato, butirato, propionato, piruvato, lactato, succinato, etanol y requiere de los aminoácidos: aspartato, glutamato y arginina o bien amonio o N_2 ; por lo tanto esta bacteria es fijadora del nitrógeno molecular.

Bajo condiciones respiratorias presenta las siguientes actividades enzimáticas: NADH oxidasa, fumarato reductasa dependiente de NADH, NADH deshidrogenasa, Deshidrogenasa Succinica y citocromo c oxidasa (Laskin y col, 1980).

R. rubrum es una bacteria Gram-negativa que contiene en su membrana 19% de fosfatidiletanolamina, 10% de fosfatidilcolina y 5% de cardiolipina (Rogers, 1986). Al igual que todas las

bacterias Gram-negativas, pose una cubierta de peptidoglucano de 2 nm de grosor que cubre la pared celular y juntas estas dos estructuras le dan rigidez y su forma característica.

Las quinonas que contiene son ubiquinonas y rodoquinona, el caroteno predominante es espiriloxantina y el espectro que contiene es muy especial debido a que: a) presenta una banda de absorción predominante a los 550 nm debido a la espiriloxantina y b) presenta un pico de absorción sencillo y simétrico de bacterioclorofila a los 825 nm.

La Ubiquinona 10 (UQ₁₀) se encuentra tanto en condiciones fotosintéticas como en condiciones respiratorias, pero su concentración es mayor durante la fase fotosintética. La actividad de NADH-oxidasa disminuye por la destrucción de la UQ₁₀ por luz ultravioleta (Nishikawa y col 1973).

I.1.4. DIFERENTES PREPARACIONES DE MEMBRANA.

Algunos aspectos de la transformación energética en membranas pueden estudiarse en la bacteria intacta, pero debido a problemas de permeabilidad esto no es conveniente (Nicholls, 1982), por lo cual existen diferentes preparaciones de membranas adecuadas para este tipo de estudios (fig 1):

a) Los esferoplastos o protoplastos son preparaciones donde la pared celular es removida por digestión con lisozima. Los esferoplastos retienen su contenido citoplásmico y su polaridad con respecto a la bacteria intacta, perdiendo el citocromo C₂ y sensibilizándose a los cambios osmóticos. Si en la formación de esferoplastos se pierde el contenido citoplasmico se denominan kabackosomas. Los esferoplastos son de tamaño relativamente

grande, de 1µm de diámetro (Crofts, 1974).

b) Los cromatóforos son vesículas de aproximadamente 0.1 µm de diámetro, en donde la polaridad respecto a la bacteria intacta se encuentra invertida (es decir contienen en su interior citocromo C_{22}). Esto ha sido demostrado por Mitchell y col, en 1967 por estudios de movimiento de protones en condiciones de iluminación y por Crofts en 1974, por medio de anticuerpos anti-centros de reacción. Los cromatóforos se obtienen mediante métodos más drásticos como es la ruptura mecánica mediante la prensa de French o con ultrasonido.

El empleo de estas preparaciones de membrana han permitido obtener mucha información, ya que contienen el aparato fosforilante encargado de la síntesis del ATP (fig 2), de manera similar a la contenida en la membrana tilacoides del cloroplasto (Hinckle y McCarty, 1978) y al contenido en la membrana interna mitocondrial (Lehninger, 1979).

En este trabajo se utilizaron cromatóforos, ya que presentan algunas características importantes:

- a) llevan a cabo reacciones de fosforilación (Frenkel, 1954) en presencia de ADP, Pi y luz.
- b) Los cromatóforos son inducidos por luz y no se encuentran en cultivos crecidos en oscuridad bajo condiciones aeróbicas.
- c) La membrana del cromatóforo contiene PPIasa de membrana acoplada a la síntesis de PPI con energía derivada de la luz (Baltscheffsky y von Stendigk, 1966).

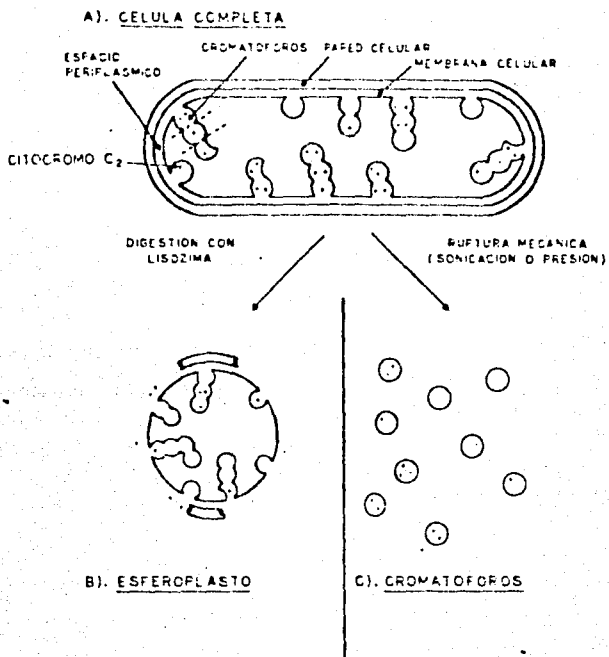


Fig. 1. Esquema General de Bacterias Fotosintéticas que muestra la obtención de Cromatóforos y Esferoplastos a partir de la célula entera. Tomado de Crofts, A.P., 1973.

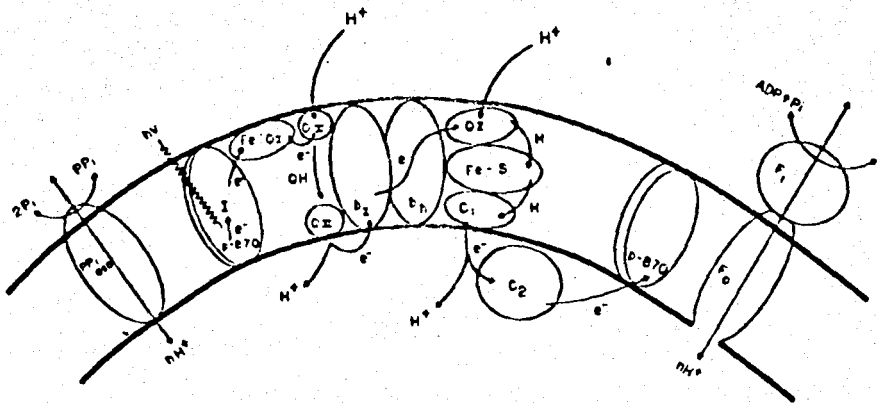


Fig. 2. Esquema de la Transducción Energética en Bacterias Fotosintéticas Púrpuras no Sulfurosas. Se muestra a la ATPasa, a la Pfiase y al Sistema de Transporte de electrones en la Membrana del Cromatóforo.

Simbología:

- P₈₇₀: Centro de Reacción Fotoquímico
- I₁: Intermediario (probablemente Bacterio feofitina)
- Fe-D: Aceptor primario hierro ubiquinona
- C₁: quinona secundaria
- b_h: citocromos b

- D₁: ubiquinona terciaria
- Fe-S: Complejo hierro-zufre de Rieske
- C₂: Catocina C₂
- F₁: Parte hidrófila de la ATPasa (subunidades catalíticas)
- F₀: Parte hidrófoba de la ATPasa (canal de H⁺)
- Pfiase: Fotorreducción

I.2. HIPOTESIS DE LAS TRANSFORMACIONES ENERGETICAS EN MEMBRANAS.

Uno de los problemas centrales en la biología, es el estudio de las transformaciones de energía en los sistemas vivos, que pueden ser transformaciones de energía luminosa en energía química (fotosíntesis) o bien transformaciones de energía química en otras formas de energía química, por ejemplo la generación de ATP. Al respecto existen tres mecanismos generales de fosforilación del ADP:

1) Fosforilación a nivel de sustrato. Este tipo de fosforilación involucra la transferencia de ciertos grupos químicos, en sistemas enzimáticos solubles, con la consecuente síntesis de ATP.

2) Fosforilación oxidativa. Se refiere a aquellos procesos que involucran la transferencia de electrones a partir de un sustrato reducido hasta un aceptor último de electrones (generalmente oxígeno), de manera acoplada a la síntesis de ATP. Este tipo de fosforilación está invariablemente asociada a las membranas donde se encuentran los acarreadores de electrones.

3) Fotofosforilación. En este proceso la energía captada por los pigmentos de la unidad fotosintética, es utilizada para generar un transporte de electrones a través de la membrana tilacoide de los cloroplastos o en la membrana plasmática de las bacterias fotosintéticas, en un proceso acoplado a la síntesis de ATP.

Un avance crucial en el campo de la bioenergética, fue el descubrimiento de que la mayor parte del ATP sintetizado en la célula, proviene de los complejos enzimáticos asociados a las

membranas de la mitocondria (membrana interna), la membrana tilacoide de los cloroplastos, y la membrana citoplasmática de los procariontes (Harold, 1986). Estas membranas acopiadas a la transformación energética, están caracterizadas por dos tipos de estructuras protéicas:

a) la H⁺ATP-sintetasa, que se encarga de la síntesis del ATP.

b) El segundo sistema está determinado por la fuente de energía primaria en la membrana, de tal suerte que en la membrana interna de la mitocondria y en la membrana plasmática de las bacterias se encuentra la cadena respiratoria, que cataliza la transferencia de equivalentes de óxido-reducción hasta el oxígeno u otro aceptor (fosforilación oxidativa), mientras que en plantas y en bacterias fotosintéticas se encuentra la unidad fotosintética, compuesta de complejos cosechadores de luz, centros de reacción y los complejos de citocromos donde ocurre la fotofosforilación (Nicholls, 1982).

La hipótesis que ha permitido explicar de manera general el mecanismo de transferencia de la energía de óxido-reducción del transporte de electrones para fosforilar el ADP es la teoría quimiosmótica.

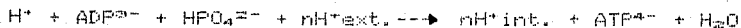
I.2.1. HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA.

El planteamiento novedoso de la hipótesis quimiosmótica postula que las enzimas y los acarreadores de electrones están dispuestos asimétricamente en las membranas transformadoras de energía, de tal manera que catalizan el transporte de moléculas, iones y grupos químicos en un sentido vectorial. Es decir muchas de estas reacciones son electrogénicas, con la consecuente formación de un potencial químico de membrana

(Mitchell, 1966 y Mitchell, 1979).

Los puntos esenciales de esta hipótesis son :

- a) La transferencia de electrones por la cadena redox provoca el bombeo de protones al exterior de la membrana.
- b) La membrana es impermeable a iones en especial a los H^+ y los OH^- , excepto por los sistemas de transporte de iones.
- c) La existencia de una proteína integral de membrana, la $H^+ATPasa$ translocadora de protones y que cataliza la siguiente reacción.



En donde "n" es el número de gramos-iones de H^+ translocados por mol de ATP, lo que es expresado como el cociente H^+/ATP , el otro protón en la ecuación corresponde a un proceso escalar más que vectorial (Nicholls, 1982).

Dado que esta reacción es reversible, la acumulación de protones en el exterior, puede dirigir la síntesis del ATP con la concomitante entrada de protones. El resultado de la translocación de protones trae consigo la generación de un gradiente eléctrico o potencial de membrana ($\Delta\psi$) y un potencial químico expresado como la diferencia de la concentración de protones ΔpH ($pH_{ext} - pH_{int}$). Estos dos parámetros sumados forman la fuerza protón motriz, que no es mas que la expresión de un potencial electroquímico (fig 3).

La expresión que define la fuerza protónmotriz (fpm) es:

$$\Delta p = \Delta\psi - Z \Delta pH$$

En donde $\Delta\psi$ es el potencial eléctrico y " $Z \Delta pH$ " es una expresión del potencial químico en unidades de milivoltios (mV).

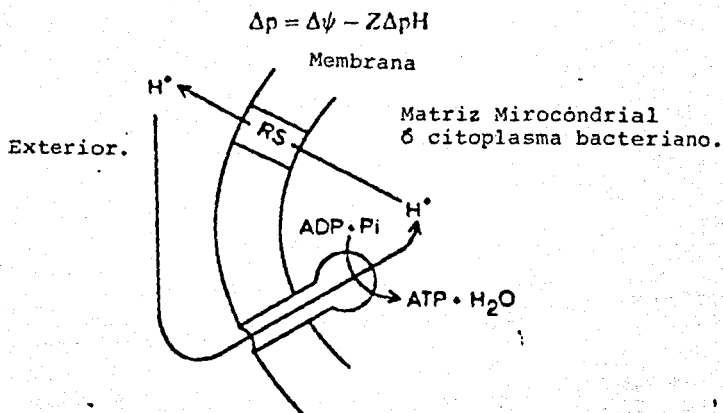


Figura 3. Esquema general de la hipótesis quimiosmótica. RS significa cadena de transporte de electrones.

1.3. LA ESTRUCTURA DEL PPI Y PROPIEDADES GENERALES.

La estructura del enlace -P-O-P- juega un papel importante en la biología, ya que es la principal forma de energía química en los sistemas vivos. El pirofosfato inorgánico (PPI) es el compuesto más simple que contiene esta estructura. El papel del PPI en el metabolismo se ha menospreciado (Reeves, 1976), ya que no solo sirve para darle direccionalidad a procesos biosintéticos, sino también es fuente de energía y fosfatos para diversas reacciones metabólicas; por lo que ha cobrado mayor atención el estudio del PPI en los procesos bioenergéticos.

El PPi es producto de diversas reacciones biosintéticas tales como la síntesis de DNA, RNA, aminoácidos, nucleótidos, lípidos, urea, ácidos grasos, etc. Ya que muchas de estas reacciones son reversibles, se pensó durante mucho tiempo que el único papel del PPi era el de ser hidrolizado por las pirofosfatasas citoplásmicas (PPiases), formándose así una barrera termodinámica que impide el reverso de estas reacciones. El considerar sólo este papel, es subestimar la función del PPi , ya que existen diferentes reportes (inciso I.3.1.) en donde se ha visto que el PPi es fuente de fosfatos y de energía para diversas reacciones. Asimismo se ha medido la concentración del PPi libre en el citoplasma de células animales (Guynn y col, 1973) y células vegetales (Black y col, 1987) bajo condiciones fisiológicas, lo que muestra que la concentración del PPi se encuentra por arriba de la concentración predicha por el equilibrio de la reacción de la PPiase citoplásmica, sugiriéndose así una participación más compleja en el metabolismo.

Estudios del ΔG° de hidrólisis del enlace PPi , muestran que no es posible descartarlo como donador de energía para distintas reacciones metabólicas. Al respecto se ha medido la energía libre de hidrólisis de la reacción, la cual es muy parecida a la energía de hidrólisis del enlace gama del ATP en ausencia de cationes divalentes, pero en presencia de cationes el ΔG° se vuelve menos negativo, esto debido a que los productos de hidrólisis del PPi no son quelados tan fuertemente como los productos del ATP (el ADP quela más fuertemente al Mg que al Pi).

Los valores calculados por Flodgaard y Fleron en 1974 para

la hidrólisis del PPI en el equilibrio en presencia de 1mM de Mg^{2+} , 150mM de K y 250 mM de fuerza iónica y pH de 7.4, fue de -4.0 Kcal/mol, pero en ausencia de Mg^{2+} el valor fue de -5.63 Kcal/mol lo cual está en concordancia con lo publicado por Lawson y col en 1976. Ellos calcularon una energía libre de hidrólisis de -5.27 Kcal/mol, en presencia de 1mM de Mg^{2+} , lo que de nuevo nos sugiere que no es posible eliminar al PPI como fuente de energía.

1.3.1. REACCIONES DONDE PARTICIPA EL PPI COMO FUENTE DE FOSFATOS Y ENERGIA EN SISTEMAS SOLUBLES.

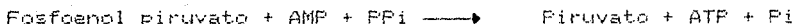
Existen diversos reportes (Wood, 1977; Reeves y col 1976; Blanck y col 1987) en donde se propone al PPI como fuente de fosfatos y de energía en diferentes sistemas solubles.

Al respecto se ha encontrado una fructocinasa dependiente de PPI en Propionibacterium shermani, en Entamoeba histolytica (Reeves y col, 1974) y en tejidos de plantas superiores, la cual cataliza la siguiente reacción:



en donde se reemplaza al ATP para la fosforilación de la fructuosa 6-P.

En los mismos organismos se ha encontrado una Piruvato fosfato dicinasa, que cataliza la siguiente reacción :



a esta enzima se la clasifica como un dicinasa, porque en el sentido inverso (der. a izq.) fosforila tanto al piruvato como al fosfato.

Tanto en Propionobacterium shermani como en Entamoeba

histolítica se ha encontrado una carboxitransferasa, la cual cataliza una reacción similar a la fosfoenolpiruvato carboxilasa, excepto que el PPI reemplaza al ATP como donador de fosfatos :



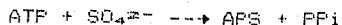
La reacción de la UDP glucosofosforilasa fue descrita en plantas desde hace tres décadas (Carnal y col., 1985):



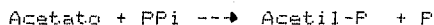
con esta última reacción, más la participación de la fructocinasa en estudios de tejidos vegetales que necesitan importar sacarosa, ha sido posible plantear una nueva vía de síntesis de la sacarosa, a través de una enzima reguladora de la glucólisis y la gluconeogénesis (Carnal y col., 1979).

Las bacterias reductoras del sulfato del género Desulfomaculum son capaces de utilizar el PPI como fuente de energía en un medio con concentraciones definidas de carbono y acetato (Liu y col., 1982) por medio de las siguientes reacciones acopladas :

La ATP sulfurilasa produce PPI



La energía del enlace es conservada por la reacción catalizada por la fosfotransferasa dependiente del PPI (Wood y col., 1976) :



y finalmente el ATP puede regenerarse por la acetato cinasa :

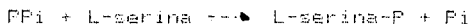


En diversos eucariontes que producen acetato, propionato y butirato se presentan la siguiente reacción catalizada por la Acetil-CoA sintetasa, en donde se conserva parte de la energía de

hidrólisis del ATP, en un enlace de PPi:



En Propionibacterium shermani se ha visto una fosfotransferasa PPi-serina:



la reacción utiliza la energía de hidrólisis para fosforilar la serina, ya que el ΔG° de hidrólisis es de -6.7 Kcal/mol (Reeves y col., 1976).

I.4. PIROFOSFATASA, PROPIEDADES GENERALES.

Las Pirofosfatasas son enzimas que se encargan de hidrolizar la unión fosfoanhidro del PPi inorgánico, de acuerdo con la siguiente reacción :



Se conoce la existencia de dos tipos de PPiasas :

a) PPiasa Citoplásmica.

Se encuentra en el citoplasma de todas las células y se ha purificado de diferentes organismos, lo que ha permitido conocer algunos aspectos de su estructura y de sus propiedades catalíticas (Cooperman, 1982 y Barry y Dunaway-Mariano, 1987). Asimismo se conocen dos tipos de PPiasa citoplásmicas: una con actividad óptima en medio ácido y otra con actividad óptima en medio alcalino.

La PPiasa citoplásmica se ha estudiado extensamente en levadura, y se sabe que es una enzima dimerica (dos subunidades idénticas), la cual requiere de tres cationes divalentes para presentar actividad. Uno de los cationes se acompleja con el PPi,

para formar el complejo de hidrólisis y los otros dos se unen en una zona cercana al sitio activo como cofactores (Knighth, B.W. y col., 1983). En general, se ha visto que los cationes divalentes regulan su actividad (Ridlington y Butler, 1972).

En la PPIasa de la bacteria fotosintética R. rubrum, se ha propuesto una regulación alostérica debida al efecto de los cationes divalentes (Klemme y Gest, 1971).

Las reacciones parciales de la enzima son: la hidrólisis del PPI, el recambio del oxígeno $Pi-H_2O$ y el recambio $PPI-PPi$ (Cooperman , 1982).

b) PPIasas DE MEMBRANA

La PPIasa de membrana fue descubierta por Baltscheffsky y col en 1966, en los cromatóforos de la bacteria fotosintética R. rubrum. Esta enzima no solo cataliza la hidrólisis del PPI sino también su síntesis, al utilizar la energía proveniente del transporte de electrones.

Se ha encontrado la PPIasa de membrana en otras 3 especies de bacterias fotosintéticas: en Rhodobacter viridis se reportó reducción del succinato en la oscuridad con PPI como fuente de energía (Jones y Saunders, 1972); en Rhodobacter palustris se demostró actividad de transhidrogenación debida al PPI (Schwam y col., 1986); en cromatóforos de Chromatiun D. sp se ha observado un cambio electrocrómico del espectro de absorción del caroteno, inducido por la hidrólisis del PPI (Kneff y col, 1979). Existe PPIasa de membrana acoplada a la cadena de transporte de electrones en mitocondrias de organismos heterótrofos como levadura (Mansurova y col., 1975) y en mitocondrias de hígado y corazón de res (Volk y col., 1982). En

cloroplastos de hojas de chícharo y en algas se ha reportado síntesis del PPI en presencia de luz, en toncelastos de ciertas algas del género Chara y en la raíz de la zanahoria se encuentre PPIasa de membrana, pero sin actividad de síntesis, lo que parece asociarla con fenómenos de transporte.

Dadas todas estas evidencias, parece clara la importancia del PPI y de las PPIasas en las reacciones metabólicas de muchos organismos, por lo que sería adecuado un estudio acerca de los mecanismos que regulan y su papel en la célula.

Se puede ver en la tabla 1, la distribución de las PPIasas en diferentes organismos.

Tabla 1. Distribución de la actividad de pirofosfatasa en diferentes organismos. Tomado de Baltscheffsky (1986) y Lathi (1984).

CITOPLASMICA

En todos los sistemas

MEMBRANAL

Bacterias Fotosintéticas
Púrpura No sulfuradas y
Sulfurosas.

Mitocondrias de levadura:

Endomyces magnusi.

Saccharomyces cerevisiae.

Hígado y Corazón de res.

Cloroplastos.

Tonoplasto sólo hidrolítica

Bacterias Purpuras No sulfuradas

	Membranal	Citoplásmica
<u>Rhodospseudomonas gelatinosa</u>		si
<u>Rhodobacter sphaeroides</u>		si
<u>Rhodobacter palustris</u>	si	si
<u>Rhodobacter viridis</u>	si	si
<u>Rhodospirillum rubrum</u>	si	si

I.4.1. PIROFOSFATASA DE MEMBRANA DE Rhodospirillum rubrum

La bacteria fotosintética no sulfurosa R. rubrum contiene las dos tipos de PPIasas mencionadas. Klemme y Guest en 1971 encontraron que más del 90% de la actividad de PPIasa corresponde a la citoplásmica.

La PPIasa de membrana de R. rubrum no solo hidroliza el PPI, sino también lo sintetiza con la energía derivada de la cadena de transporte de electrones, que es generada por la luz. Asimismo se ha encontrado actividad de PPIasa en membranas de R. rubrum crecidas en condiciones respiratorias en la obscuridad (Romero y col., 1987).

La PPIasa es una enzima muy parecida a la ATPasa, en el sentido que se encarga de hidrolizar la unión fosfoanhidro del enlace fosfodiéster, por lo que se pensó en algún tiempo que era una reacción parcial de la ATPasa, pero se evidenció que es una enzima diferente por las siguientes pruebas:

- La PPIasa es insensible a oligomicina (Baltscheffsky y col., 1967) a diferencia de la ATPasa que es sensible a oligomicina.
- Fisher y Guilloiry en 1969 lograron separar selectivamente la actividad de ATPasa o de PPIasa con inhibidores específicos, manteniendo intacta una de las actividades, con cloruro de litio 2 M que inhibe a la ATPasa o con 3.1% de butanol que inhibe a la PPIasa. De esta manera se concluyó, que son dos sistemas enzimáticos diferentes acoplados al potencial electroquímico de membrana.
- Johanson en 1975, inhibió la actividad de H⁺-ATPasa con anticuerpos mono-específicos, sin inhibir la actividad de PPIasa.
- En cromatóforos de R. rubrum que contienen actividad tanto de

ATPasa como de PPiase, se demostró por Keister y Minton en 1977 la síntesis de ATP debido a la formación de un potencial transmembranal durante la hidrólisis del PPI; por esta razón no se encontró el fosfato marcado del $^{32}\text{P}\text{PPI}$ en el ATP.

De esta manera se concluyó, que son dos sistemas enzimáticos diferentes, acoplados al potencial electroquímico de membrana.

Al respecto de la actividad hidrolítica de la PPIasa de membrana de la bacteria fotosintética R. rubrum, se sabe que está acoplada a muchos procesos dependientes de energía tales como: la reversa de transporte de electrones (Baltscheffsky y col., 1968); formación de potencial reflejado en un corrimiento electrocrómico del espectro de absorción del caroteno (Baltscheffsky y col., 1969); alcalinización del espacio externo del cromatóforo (Moyle y col., 1976); el transporte de iones (Isaev y col., 1970); las reacciones de transhidrogenación (Keister y Yike, 1967) la formación de ATP como consecuencia de la formación de un potencial de membrana (Keister y Minton, 1971) (fig 4).

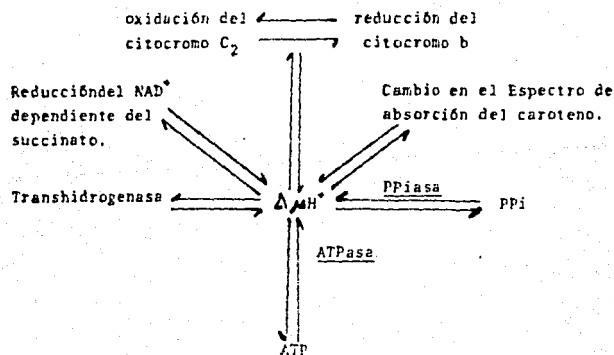


Fig 4. Reacciones a las que se encuentra acoplada la hidrólisis del PPI, a través de la PPIasa de membrana. Tomado de Baltscheffsky (1985).

La PPIasa de Membrana de R. rubrum, es capaz de sintetizar el PPI, como respuesta a la formación de un potencial químico (ΔpH), debido a un gradiente de pH o eléctrico ($\Delta\psi$) debido a un gradiente de iones K^+ (Strid y col., 1987). Estas evidencias demostraron que la PPIasa es una enzima que cataliza la translocación electrogénica de protones en un proceso totalmente reversible.

La PPIasa de membrana de R. rubrum, cataliza cuatro reacciones parciales: a) Hidrólisis del PPI; b) Síntesis del PPI; c) Intercambio Pi-PPI; d) Intercambio Pi- H_2O . El estudio de las reacciones de intercambio ha sido muy útil, porque ha permitido conocer los pasos intermedios de la actividad de síntesis e hidrólisis del PPI.

a) Actividad de PPIasa (hidrólisis).

Como se ha visto, la energía de hidrólisis del PPI puede utilizarse en diferentes reacciones dependientes de energía.

La hidrólisis del PPI requiere del catión divalente Mg^{2+} , tanto para formar el complejo de hidrólisis, como para activar a la enzima (Randhall, 1979 y Celis y col., 1985).

Estudios de Celis y Romero (1987), sobre el efecto de los cationes divalentes y de los protones sobre la actividad de PPIasa y de intercambio Pi-PPI, indican que el Zn^{2+} a bajas concentraciones (menores que el Mg^{2+}), es buen sustituto del Mg^{2+} en la hidrólisis, mientras que otros cationes divalentes como el Ca^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} , no substituyen al Mg^{2+} en la hidrólisis. Asimismo, en presencia del sustrato (Mg-PPI), los cationes divalentes libres son inhibidores en el siguiente orden: $\text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$.

El pH óptimo para la reacción de hidrólisis en el cromatóforo de R. rubrum es de 6.5, mientras que el pH óptimo para la reacción de recambio Pi-PPi es de 7.5. Asimismo se ha visto (Celis y Romero, 1987) que el cambio de pH para la reacción de recambio Pi-PPi, modifica las Km para el Pi y para el Mg²⁺, por lo que se concluye que los cationes divalentes y los protones juegan un papel importante en las modulaciones cinéticas de la enzima.

La actividad de PPIasa no es inhibida por la oligomicina (inhibidor específico de la ATPasa) sino que, por el contrario, la estimula en los cromatóforos de la bacteria R. rubrum (Baltscheffsky y col., 1968). Esto puede ser explicado porque la ATPasa y la PPIasa están presentes en el cromatóforo de la bacteria y compiten estas enzimas, por el potencial electroquímico de membrana.

La actividad de PPIasa es inhibida por la dicitclohexil-carbodiimida (DCCD), fosfato (Pi), y arsenato, mientras que los desacoplantes (que colapsan el potencial electroquímico de membrana) tales como: gramicidina, 2-6 dicloro indofenol (2-6 DCPI), 2-4 dinitrofenol (2-4 DNP), desaspidina estimulan la actividad (Baltscheffsky y col., 1966 y Baltscheffsky, 1966)

Nyren, P. y col., (1984), publicaron que el FCCP estimula la actividad de PPIasa en cromatóforos, mientras que los análogos del sustrato como el metilendifosfato (MDP), el imidodifosfato (IDP) y el antibiótico Dio-9 son inhibitorios. Los mismos autores y Randhal en 1979, coinciden en que los reactivos de grupos -SH, ejercen una inhibición a 0° C, mientras que a 30° C,

casi no inhiben. Esto podría explicarse como cambios conformacionales dependientes de temperatura, lo que permitiría la exposición de los grupos -SH de la proteína.

Nishikawa y col., (1972), han visto que la actividad de PPIasa disminuye en la luz a pesar de que existen condiciones de baja síntesis de PPI. Asimismo han visto que el Li^+ , el Na^+ y el K^+ estimulan la actividad de PPIasa. La PPIasa de membrana, al igual que la ATPasa, es una enzima que depende de fosfolípidos particulares de la membrana, ya que bajo la acción de la fosfolipasa A la actividad disminuye y al agregar fosfolípidos totales de soya se reconstituye la actividad (Klemme y Guest, 1972).

b) Síntesis del PPI.

La síntesis del PPI se lleva a cabo en condiciones de iluminación y también requiere de MgCl_2 para la actividad. La oligomicina no inhibe, sino que por el contrario estimula. Bajo condiciones desacoplantes con FCCP y valinomicina y en presencia de luz, también se inhibe la síntesis. La antimicina, también es inhibidor, ya que inhibe el transporte de electrones. Además en presencia de NaF 10 mM se inhibe totalmente la síntesis (Nyren y col., 1986).

Guillory y Fisher (1972), estudiaron la dependencia de las intensidades luminosas para la síntesis del ATP y del PPI, encontrando velocidades máximas de síntesis de PPI a intensidades luminosas menores que las requeridas para el ATP. El pH óptimo para esta actividad es de 7.5.

Strid y col., (1987) generaron potenciales eléctricos con el

ion K^+ ($\Delta\psi$), y gradientes de protones en los cromatóforos de R. rubrum, logrando las síntesis del PPI y del ATP, ya que los cromatóforos contienen ambas actividades. Al respecto concluyeron: son diferentes las cantidades de protones translocados para formar ATP o PPI; es necesario que la ATPasa se active por el potencial de membrana antes de darse la síntesis del ATP a diferencia de la PPIasa que con bajos potenciales de membrana (respecto a la ATPasa) es capaz de sintetizar el PPI.

La síntesis del PPI y del ATP, utilizan el potencial electroquímico generado en la cadena de transporte de electrones, ya que en la oscuridad se puede inducir el transporte reverso de electrones, ya sea con ATP o con PPI, provocando la oxidación del citocromo C_2 y la reducción del citocromo b.

c) Intercambio Pi-PPI.

La actividad del intercambio de Pi por el PPI, presenta el mismo pH óptimo que para la actividad de síntesis (7.5), ya que de hecho, este tipo de intercambio es una reacción parcial de la síntesis. Esta actividad fue descubierta por Kesister y Minton en 1971 en los cromatóforos de R. rubrum.

La reacción se inhibe por desacoplantes de la fosforilación tales como el p-triclorometoxi carbonil-cianuro-fenilhidrazona (DCCP) y el antibiótico S-13, y se estimula por oligomicina. Se inhibe por adición de ADP. Esta inhibición es eliminada si se agrega oligomicina (Baltscheffsky, 1986).

Los protones y los cationes divalentes ejercen un papel modulador en las propiedades catalíticas de la enzima (Celis y Romero, 1987), ya que el pH afecta la K_m para el Pi y para el

Mg^{2+} . Asimismo los cationes divalentes como el Mn^{2+} y el Co^{2+} son substitutos del Mg^{2+} para formar el sustrato en un 50 % de la actividad obtenida con Mg^{2+} , mientras que los cationes Ca^{2+} y el Zn^{2+} , no son substitutos del Mg^{2+} en la reacción. Por otro lado los requerimientos de Mg añadido a la reacción son mayores que para la actividad hidrolítica (Celis y col., 1985). Los mismos autores sugieren que el sustrato para la actividad de recambio es el $MgHPO_4$ con una K_m de 1.5 mM. Se ha visto que para la actividad de recambio el Mg^{2+} libre es importante, y que probablemente juega un papel activador de esta reacción.

d) Intercambio P_i-H_2O .

Los cromatóforos de R. rubrum, catalizan una rápida actividad de recambio del oxígeno del pirofosfato por el oxígeno del agua, esta reacción es inhibida por inhibidores de la PPIasa de membrana, como el fluoruro y el metilendifosfato (Harvey y Keister 1981). Esta reacción se considera una reacción parcial de la hidrólisis del PPI. El oxígeno recambiado en ausencia de $MgCl_2$ añadido es bajo y se requiere una relación $MgCl_2:P_i$ de 0.8 para alcanzar las velocidades óptimas. Harvey y Keister (1981), utilizando inhibidores específicos encontraron que esta actividad de intercambio en la bacteria fotosintética R. rubrum, se debe exclusivamente a la PPIasa membranal, a pesar de que la ATPasa tiene el potencial suficiente para llevar a cabo esta reacción.

El desacoplante CCCP, no presenta un gran efecto sobre la reacción, por lo que podría sugerirse que el intercambio P_i-H_2O no depende de un gradiente de protones. Esto parece estar apoyado por el hecho de que la luz no estimula el recambio.

1.4.2. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA PPIasa DE MEMBRANA DE

R. rubrum.

La PPIasa de membrana fue solubilizada y parcialmente purificada de la cepa mutante deficiente de carotenos de R. rubrum (G-9) por Rao y Kesiter en 1978. La enzima se solubilizó utilizando colato de sodio en presencia de $MgCl_2$ y se purificó parcialmente con precipitaciones con sulfato de amonio y cromatografía en Bio-Gel A (1.5.Mesh), obteniéndose una preparación 10 veces más purificada con respecto al cromatóforo.

La enzima purificada requiere fosfolípidos para su actividad, es específica para el PPI y requiere de Mg^{2+} .

Nyren y col., (1984), purificaron la enzima con un buen rendimiento (80 veces más purificada respecto al cromatóforo). La enzima se solubilizó con Triton X-100, en combinación de altos contenidos de Mg^{2+} y etilenglicol y se purificó con una columna de hidroxapatita. La PPIasa de membrana es una enzima dependiente de fosfolípidos ya que la adición de éstos, incrementa su actividad en un 40%. Durante el proceso de solubilización el Mg^{2+} es importante para mantener la estabilidad de la enzima (puede almacenarse durante 6 meses a -70° conservando su actividad). El hecho de que el medio de solubilización requiere de altas concentraciones de etilenglicol nos indica que es una enzima altamente hidrofóbica.

La estimulación de la hidrólisis del 50% debida al FCCP, desaparece en la enzima purificada, al igual que el efecto del DCCD que se observa en el cromatóforo desaparece (quizás sea un efecto debido a la presencia del detergente). La enzima purificada es insensible a oligomicina y es inhibida por el

fluoruro, el IDP, el MDP, Dio9, NBF-Cl y N-etilmaleimida.

La N-etilmaleimida también inhibe la actividad de la enzima purificada al igual que en el cromatóforo, en un proceso dependiente de energía, ya que a 0°C ejerce su efecto, mientras que a 30°C es muy pequeña la inhibición, por lo que podría suponerse un cambio conformacional dependiente de temperatura el cual expone ciertos grupos SH importantes para la actividad catalítica (Nyren y col., 1984). Por otra parte el NBF-Cl inhibe en un proceso independiente de la temperatura, este efecto podría deberse a modificaciones químicas en los residuos de tirosina (tabla 2).

Como la enzima solubilizada pierde su sensibilidad al DCCD y a los desacoplantes, podría pensarse que también podría perderse la actividad de bombeo de protones. Shakov y col (1984) reconstituyeron la PPIasa purificada en liposomas y observaron que la adición de FCCP estimula la actividad hidrolítica en el liposoma, similar a lo que ocurre en el cromatóforo. Asimismo la actividad hidrolítica se estimula cuando la membrana del liposoma se hace permeable al K^+ por el efecto de la valinomicina. También se observaron efectos estimuladores de la nigericina (intercambiador $Na-K$). Estas observaciones, refuerzan que la PPIasa de membrana es una enzima translocadora de protones acoplada a la utilización o generación de un potencial de membrana al igual que la ATP sintetasa.

La bomba de protones de la PPIasa de membrana fue reconstituida en liposomas, lo que se utilizó para energizar la membrana del liposoma por la hidrólisis del PPI, con lo que se

Adición	Conc.	Actividad de PPIasa. (% del control).	
		PPiasa de membrana .	Purificada.
FCCP	1.5 μ M	150	100
DCCP (0°C)	100 μ M	30	97
Na F	5 mM	83	32
	10 mM	64	11
	20 mM	45	4
Metilen Difosfo- nato.	0.1 mM	84	64
	0.2 mM	74	36
Imidodifosfato	0.1 mM	48	24
	0.2 mM	34	12
NBF-C1 (0°C)	0.25mM	33	23
	0.5 mM	18	7
NBF-C1 (30°C)	0.25mM	82	12
	0.5 mM	61	1
N-metilmaleimida (0°C)	1.0 mM	30	20
	2.0 mM	13	13
N-metilmaleimida (30°C)	1.0 mM	99	84
	2.0 mM	85	76
Dio-9 (0°C)	15.0 g/ml	80	40
	30.0 g/ml	60	30

Tabla 2. Efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad de PPIasa de membrana en cromatóforos y la enzima purificada. Tomado de Nyren y Baltscheffsky (1984).

Tabla 2. Efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad de PPiase de membrana en cromatóforos y en la enzima purificada. Tomado de Nyren y Balstcheffsky (1984).

Adición	Conc.	Actividad de PPiase.	
		(% del control).	
		PPiase de membrana .	Purificada.
FCCP	1.5 μ M	150	100
DCCP (0°C)	100 μ M	30	97
Na F	5 mM	83	32
	10 mM	64	11
	20 mM	45	4
Metilen Difosfo- nato.	0.1 mM	84	64
	0.2 mM	74	36
Imidodifosfato	0.1 mM	48	24
	0.2 mM	34	12
NBF-C1 (0°C)	0.25mM	33	23
	0.5 mM	18	7
NBF-C1 (30°C)	0.25mM	82	12
	0.5 mM	61	1
N-metilmaleimida (0°C)	1.0 mM	30	20
	2.0 mM	13	13
N-metilmaleimida (30°C)	1.0 mM	99	84
	2.0 mM	85	76
Dio-9 (0°C)	15.0 g/ml	80	40
	30.0 g/ml	60	30

logró sintetizar ATP en liposomas con la actividad de bombeo de protones de la F1F0 ATPasa y el complejo de la ATPasa F₀F₁ de R. rubrum (Baltscheffsky y Nyren, 1983).

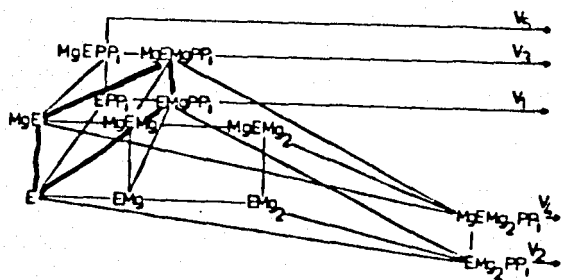
Kondrasin y col., (1980), incorporaron F1F0 ATPasa de membrana purificada en una membrana artificial de fosfolípidos, se encontró que la hidrólisis del F1P sirve para generar un potencial eléctrico de 15 milivoltios (mV), que requiere de MgCl₂ y que es inhibida por fluoruro, pero no por DCCD.

I.5. ASPECTOS CINETICOS DE LAS PIROFOSFATASAS

Los diferentes reportes acerca de la actividad de la PPIasa, ya sea citoplásmica o de membrana, muestran que existe una dependencia de los cationes divalentes, ya que se ha observado que el Mg^{2+} libre ejerce dos papeles: uno donde se acompleja con el PPI para dar el verdadero sustrato ($Mg-PPI$); y otro donde funciona como activador de la reacción (Lathi, 1983). Asimismo se ha visto que el PPI libre es un inhibidor competitivo de la reacción ya que se pega al sitio activo y no presenta actividad (Butler y col., 1971 y Josse y col., 1971). Con respecto al efecto del complejo $Mg-PPI$, existe una gran divergencia entre si es sustrato para la hidrólisis o si es inhibidor de la reacción. Horn y col., (1967) encuentra en la PPIasa citoplásmica de hígado de rata un efecto alostérico debido al Mg^{2+} libre. Por otra parte Klemme y Guest (1971) en PPIasa citoplásmica de R. rubrum, encuentran una cinética descrita por una curva sigmoide, en donde el aumento de la relación Mg/PPI cambia el comportamiento cinético de curvas sigmoides a curvas hiperbólicas.

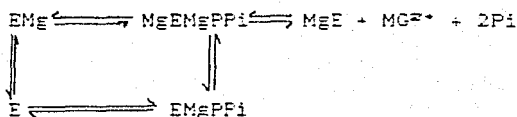
Rapoport y col., (1977), realizaron un análisis cinético de la actividad de la PPIasa citoplásmica de levadura; para ello se valen del análisis de London y Steac (1973) para enzimas activadas por metales. En este modelo, el Mg^{2+} libre es esencial para la reacción, en especial para la unión del sustrato a la enzima.

El análisis de la reacción es un tanto complejo ya que el modelo general es el siguiente (Rapoport y col., 1977):



El modelo considera todos los equilibrios posibles entre el sustrato, la enzima y el Mg^{2+} libre, en donde se aprecian cinco complejos (enzima-sustrato-metal) factibles de presentar actividad de hidrólisis: 1) EMg_2PPi ; 2) $MgEMg_2PPi$; 3) $EMgPPi$; 4) $MgEMgPPi$; 5) $MgEPPi$.

Debido a la complejidad de un análisis a partir de este modelo (Rapoport y col., 1973), se obtuvieron submodelos, los cuales fueron comparados con la actividad obtenida experimentalmente con base a tratamientos estadísticos, en donde el modelo que más se correlacionó con los datos experimentales para una cinética donde intervienen tres especies es un submodelo del que involucra cuatro especies y así sucesivamente. El modelo más simple obtenido es el siguiente (Rapoport y col., 1973):

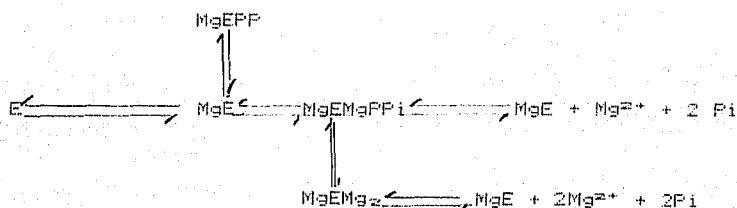


En donde se concluye que es necesaria la unión del Mg^{2+} libre a

la enzima para que el Mg-PPi sea hidrolizado.

Moe y Butler en 1972 realizan un análisis cinético de la PPIasa citoplásmica de levadura, en donde se presenta una activación por la unión del Mg^{2+} libre a la enzima, la cual es requerida para la unión del sustrato; asimismo el PPi es inhibidor de la reacción, mientras que el MgPPi y el Mg₂PPi son sustratos de la reacción. El modelo en donde el Mg^{2+} libre no activa, mostró poca adecuación con los resultados experimentales.

El siguiente modelo fue propuesto por Moe y Butler (1972):



Josse en 1966 propuso otro modelo para la actividad de PPIasa en Escherichia coli, en donde el Mg^{2+} no es esencial para la reacción, pero no puede descartar un papel del Mg^{2+} como activador de la reacción. En este modelo el sustrato es el Mg-PPi y el PPi libre es inhibidor de la reacción.

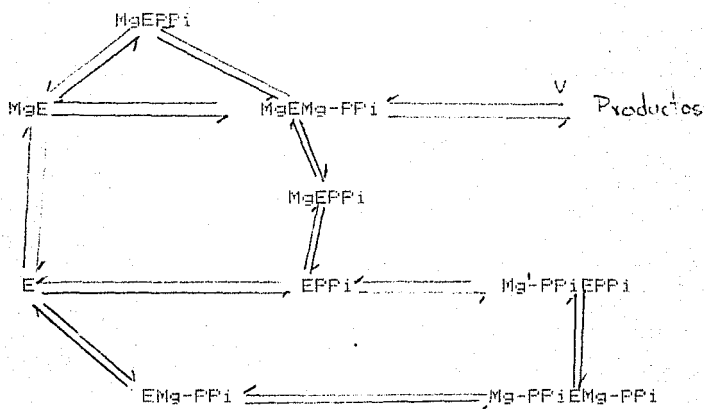
Randahl (1979) propone un modelo cinético para la actividad de la PPIasa de membrana de R. rubrum, el cual está basado en el modelo general de London y Steck (1969) para enzimas activas por metal. Este modelo tiene las siguientes particularidades:

- 1) El Mg^{2+} tiene dos papeles uno como activador y otro como parte del complejo de hidrólisis (Mg-PPi).
- 2) El PPi es capaz de unirse a la enzima y no es hidrolizado sino

se encuentra en forma acomplejada con el Mg^{2+} .

3) La enzima tiene un sitio activador y otro para el sustrato.

El modelo es el siguiente (Randahl, 1979):



Aún existen divergencias en los papeles moduladores de la actividad de las PPIasas de membrana, por lo que es importante continuar la caracterización de la PPIasa de membrana con el fin de conocer los mecanismos que regulan esta actividad.

La PPIasa de membrana es un enzima que ha cobrado mucho interés en el estudio de los procesos de transformación de energía en los seres vivos por sus similitudes con la ATPasa y su participación dentro de diferentes reacciones metabólicas.

La PPIasa es una enzima más sencilla que la ATPasa tanto estructuralmente, como en lo que a sustratos y productos se refiere, por lo que resulta un buen modelo de estudio de los procesos de transformación de energía.

La motivación de este trabajo ha surgido de estudios previos por Celis y Romero (1986) sobre la dependencia de los cationes divalentes y los protones sobre las actividades hidrolítica y de intercambio PPI-Pi de la PPIasa de membrana en cromatóforos de Rhodospirillum rubrum. Por tales razones nos parece importante caracterizar desde el punto de vista cinético los aspectos que regulan la actividad hidrolítica, en especial los siguientes puntos:

-Diferenciar los efectos producidos por los metales libres (como el Mg^{2+}) y el sustrato Mg-PPI, de tal suerte que podamos esclarecer el mecanismo del efecto activador y conocer el comportamiento de la enzima frente al sustrato.

-Si se logra diferenciar los efectos de los metales libres y del sustrato, se obtendrán parámetros cinéticos y se estudiará las modulaciones que ejercen los mismos.

-Solubilizar la enzima en detergente con el fin de conocer si juega la membrana un papel en la cinética de la PPIasa.

-Investigar sobre la existencia de un sitio para cationes divalentes diferente del sitio activo y su papel en la actividad

de la PPIasa.

-Disernir la posibilidad de efectos cooperativos o bien explicar el comportamiento de la enzima con otro modelo alternativo.

-Indagar el papel que juegan los cationes divalentes libres, como el Zn^{2+} y el Ca^{2+} , sobre la actividad hidrolítica de la PPIasa con el sustrato Mg-PPi, tanto en el cromatóforo como en el solubilizado, con el fin conocer algunos aspectos del mecanismo de la reacción.

CAPITULO II.

MATERIALES Y METODOS

II.1. CRECIMIENTO DE BACTERIAS

Se utilizó la cepa silvestre de la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum en todos los experimentos. La cepa se obtuvo del Dr A. Crofts, de la universidad Bristol U.K.

II.1.1. MEDIOS DE CULTIVO

Los cultivos de esta bacteria se crecieron en medio sólido y líquido

a) Medio sólido .

En un volumen final de 1 litro se disuelven:

Extracto de Levadura.....	3 g
Peptona de gelatina.....	2 g
Agar Bacteriológico.....	1 %

El medio fue esterilizado en el autoclave durante 15 min en frascos de tapa con rosca de 15 a 20 ml de volumen, conteniendo solamente 10 ml de medio.

b) Medio líquido

Se preparó el medio líquido en base al método de Cohen-Bazire y col, (1957), el cual es una modificación del propuesto por Hunter (1950).

La preparación del medio requirió de las siguientes soluciones:

i) Base concentrada. Un volumen de 2 l contiene:

$N(CH_2COOH)_3$	20.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	28.9 g
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	8.7 g
$(NH_4)_2MoO_7 \cdot 4H_2O$	0.185 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.195 g

Solución de Metales "44".....100 ml

Se ajusta a un pH de 6.8.

Solución de Metales "44". La solución de metales "44" que se utiliza en es :

EDTA.....	2.5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O.....	5.0 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O.....	11.0 mg
MnSO ₄ ó.....	1.54 g
MnCl ₂ 4H ₂ O.....	1.37 g
CuSO ₄ 5H ₂ O.....	0.392 g
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O.....	0.248 g
Na ₂ B ₄ O ₇ 6H ₂ O.....	0.177 g
H ₂ SO ₄	aprox. 4 gotas

La solución se afora a 1 l de agua destilada y se ajusta el pH a 6.8.

ii) KH₂PO₄ 136.08 g para a 1 l de agua destilada. se ajusta el pH a 6.8.

iii) Acido succínico, 100 g para 1 l de agua destilada, se ajusta el pH a 6.8.

iv) (NH₄)₂SO₄, 100 g para 1 l de agua destilada.

v) NaCl 50, g para 1 l de agua destilada.

vi) Acido L-glutámico, 25 g para 250 ml de agua destilada.

vii) Acido L-aspártico, 5 g para 250 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 6.8.

Finalmente el medio líquido contiene por cada 12.5 l, las cantidades siguientes de las soluciones mencionadas:

i) Base Concentrada.....250 ml

ii) KH_2PO_4	250 ml
iii) Acido Succínico.....	250 ml
iv) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	62.5 ml
v) NaCl	125 ml
vi) Acido L-glutámico.....	25 ml
vii) Acido L-aspártico.....	25 ml
viii) Peptona de gelatina.....	12.5 g
ix) Acido Nicotínico.....	12.5 mg
x) Tiamina.....	6.25 mg
xi) Biotina.....	0.125 mg

El medio se ajustó a un pH de 6.8 y se esterilizó en el autoclave durante 45 minutos. Cuando el medio está caliente se forma un precipitado que se disuelve a temperatura ambiente. El medio es translúcido y de un color amarillo claro.

II.1.2. SIEMBRA DE BACTERIAS.

Las bacterias fueron sembradas en placa en inóculos muy diluidos para formar colonias sencillas. Se tomó una muestra del inóculo para sembrarlas por punción en frascos con medio sólido. Posteriormente se incubaron durante 12 hrs en la obscuridad para que el crecimiento respiratorio de las bacterias consuma el O_2 presente. Posteriormente se expusieron a focos con filamento de tungsteno de 40 watts colocadas a 30 cm de distancia de los frascos a una temperatura de 30 °C.

Una vez formado el cultivo bajo condiciones fotosintéticas este puede conservarse viable para resiembras durante varios meses. La obtencion de grandes cantidades de bacteria se realiza en cultivos líquidos de la siguiente manera:

Se le agrega medio líquido a los frascos de medio sólido y se agitan para desprender alguna colonia, de nuevo se guardan los frascos en obscuridad durante 12 hrs. y posteriormente se exponen a la luz a 30°C. A los 7 días aproximadamente se obtiene el cultivo fotosintético, el cual se vacía en matraces de 100 ml con medio líquido, agregando la suficiente cantidad para no mojar el tapon de hule esteril, pero dejando la menor cantidad de O_2 posible. Se repite de nuevo el ciclo obscuridad-luz indicado para obtener un cultivo en condiciones fotosintéticas. Este procedimiento se repite trasladando el cultivo a un frasco de 1 l y posteriormente a uno de 9 l.

II.1.3. COSECHA DE BACTERIAS.

Se procedió a cosechar el cultivo a los 7 días aproximadamente, cuando este alcanzó la fase logarítmica tardía. La curva de crecimiento fue detectada con un fotocolorímetro con filtro rojo (fotocolorímetro Klett-Summerson).

La cosecha se realizó por centrifugaciones sucesivas del medio de cultivo a 8 000 x g durante 15 minutos, obteniéndose pastillas de bacterias, las cuales se lavaron dos veces en un amortiguador MDPS 50 mM y KCl 10 mM PH 7.5 y se centrifugaron a 8 000 x g durante 15 minutos eliminando así los residuos del medio y los desechos. Las pastillas son pesadas y registradas como peso húmedo y guardadas en un refrigerador REVCO a -70°C.

II.2. OBTENCION DE CRONATOFOROS.

A partir de las bacterias se obtienen los cromatóforos con el procedimiento reportado por Baccarini-Melandri y col., (1970) (fig 5):

- Se resuspenden las bacterias en un amortiguador Tris-Cl pH 7.5 en relación 1:10 (peso:volumen), se homogenizan y se les agrega DNAasa en proporción de 1 mg por 100 g de peso húmedo de bacterias y $MgSO_4$.
- Se sonicaron en volúmenes de 20 ml durante 2 minutos en un sonicador tipo M.S.E. a la máxima potencia, en un baño de hielo a 0°C (Scholes y col, 1969).
- Se centrifugan a 20 000 x g durante 20 min, para remover las células sin romper, cápsulas, etc, que quedan en el precipitado.
- Se toma el sobrenadante y se centrifuga a 100 000 x g durante 80 min.
- El precipitado de cromatóforos se resuspende en un amortiguador Tris-Cl 10 mM con EDTA 5 mM y EGTA 2mM a pH de 7.5, para remover los cationes divalentes como el Mg^{2+} presente en la preparación y se centrifuga a 100 000 x g durante 80 min.
- El precipitado obtenido se resuspende en Tris-Cl 50 mM se centrifuga a la 100 000 x g duante 80 min para lavar el exceso de quelantes.
- Se resuspende la pastilla de cromatóforos en el amortiguador del paso anterior a una concentración aproximada de 25 mg/ml de proteína y se almacena a 4°C durante los siguientes tres días que conservan su actividad o bien a -70°C donde conservan su actividad durante 6 meses.

II.2.1. SOLUBILIZACION DE LA PPIasa DE MEMBRANA.

Este procedimiento fue reportado por Nyren,P. y col.,

(1984) todo el procedimiento se realizó de 0 a 5°C (fig 5).

A partir de 3 g de cromatóforos concentrados de 50 a 60 mg de proteína / ml, se mezclan con una solución de 21 ml que contiene:

Tris-Cl 50 mM, pH 8.4.

Tritón X-100 al 2.5 % (v/v)

MgCl₂ 750 mM

Etilenglicol al 25 % (v/v)

DTE 0.2 mM

Se agita suavemente la solución en un baño de hielo durante 20 min. Se centrifuga la suspensión a 100 000 x g durante 135 min. Se obtiene la fracción del solubilizado (sobrenadante) y se puede almacenar a 4°C si se desea utilizar en los próximos 5 días o bien, almacenar en oscuridad a -70° C conservándose su actividad durante 6 meses, aproximadamente.

Posteriormente el solubilizado se dializó contra un amortiguador:

Tris-Cl 50 mM, pH 8.4.

Tritón X-100, 0.5% (v/v)

Etilenglicol al 25% (v/v)

DTE 0.2 mM

Se dializó contra dos volúmenes de 600 ml con agitación constante. El primer cambio fue a las 6hrs y el segundo a las 12 hrs; la diálisis se realizó con el objeto de quitar el magnesio presente en el medio de solubilización.

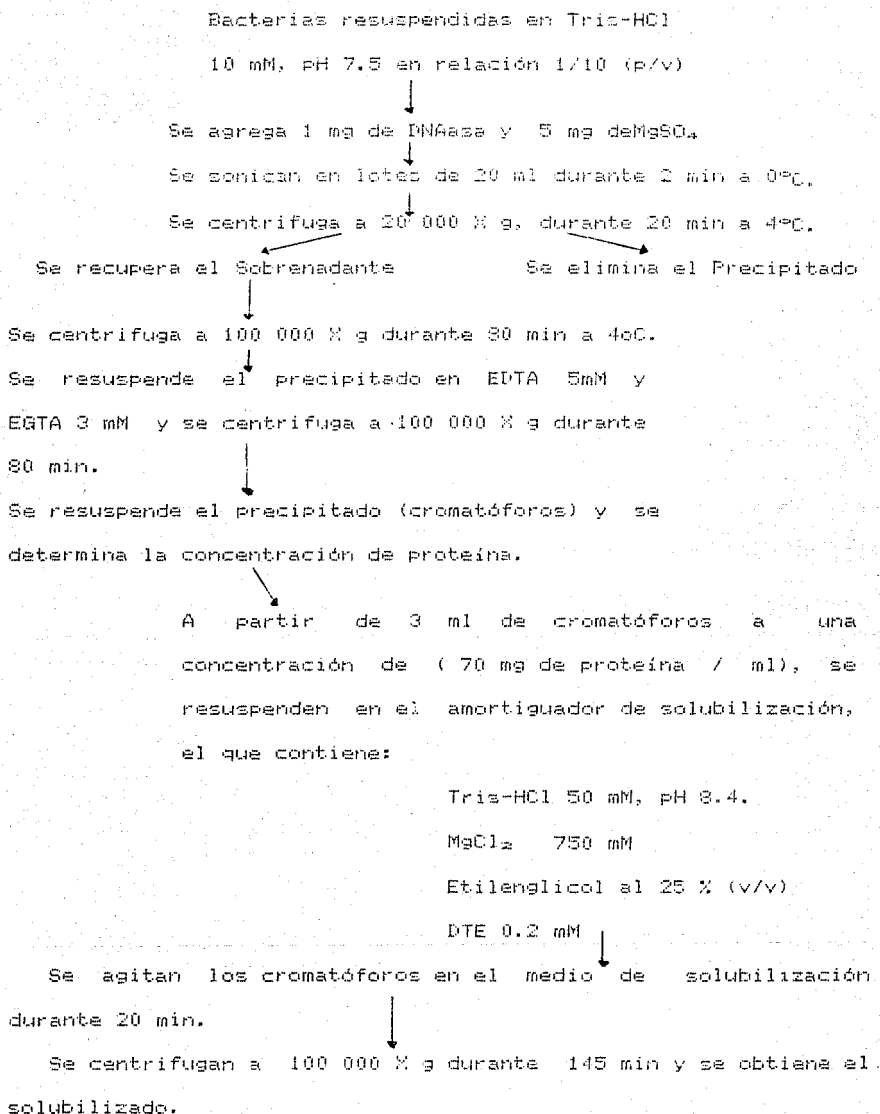


Figura 5. Esquema de la obtención de cromatóforos y solubilización de la PPIasa membranar en detergente.

II.3. DETERMINACION DE PROTEINA.

La cantidad de proteína para los ensayos se determinó por el método de Lowry y col., (1951), utilizando estandares de albúmina de suero de bovino (BSA) y con un rango de sensibilidad de 0 a 400 µg de proteína/ml.

II.3.1. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE BCI

El contenido de bacterioclorofila de los cromatóforos se determinó por la absorción a 770 nm de un extracto de acetona / metanol (7/2, v/v), agitándose vigorosamente durante algunos minutos y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos en una centrifuga clinica. El sobrenadante se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 770 nm, contra un blanco de acetona/ metanol (Clayton y Sistro, 1978).

II.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA EN EL CROMATOFORO Y EN EL SOLUBILIZADO EN DETERGENTE.

La actividad de Pirofosfatasa se determinó a partir de la cuantificación del fosfato (Pi) liberado a partir de la hidrólisis del PPI, a 30°C en presencia de $MgCl_2$.

Esta determinación se realizó en oscuridad, para evitar la síntesis del PPI promovida por la energía de la luz y por tal motivo se utilizó un cuarto iluminado con luz verde (Schiff, 1972).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 0.5 ml, agregando 1mg de proteína de cromatóforo por tubo, o bien, para el solubilizado se agregaron 0.35 mg de proteína por tubo. El medio también contenía Tris -malato 50 mM pH 6.5 , Pirofosfato

de Sodio 0.67 mM y $MgCl_2$ variable.

La reacción se inició con la adición de enzima (cromatóforos o solubilizado) al medio de reacción, realizándose las determinaciones en velocidades iniciales; la reacción se terminó agregando 0.1 ml de TCA al 30 % (p/v). Finalmente se centrifuga el ensayo a 3 000 rpm durante 10min y a partir del sobrenadante se determina la cantidad de Pi liberado. Para eliminar la turbidez de los ensayos en la enzima solubilizada se agregaron 0.02ml de SDS al 10 % antes de la determinación colorimétrica.

Se utilizaron dos métodos colorimétricos de diferente sensibilidad para la cuantificación del fosfato liberado en el medio de reacción:

i) El de Summer (1944), con una sensibilidad de 0 a 1600 nmoles.

ii) El de Chase y Shaw (1956), que tiene una sensibilidad de 0 a 70 nmoles.

Para la cuantificación se realizaron curvas patrones con estándares de H_2PO_4 .

La velocidad de hidrólisis se expresó en nmoles de Pi/min/mg de proteína.

II.5. CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS ESPECIES LIBRES Y DE LOS COMPLEJOS EN EL MEDIO DE REACCION.

Las concentraciones de los metales libres, de los ligandos (diferentes formas iónicas del PPI) y de los complejos Metal-Ligando (M-L) se calcularon por un programa de computadora. Este programa resuelve ecuaciones simultáneas que describen el equilibrio de unión múltiple que existe entre las diferentes

especies involucradas para formar complejos o quedar como especies libres. El programa fué elaborado por el Dr. Kentish C. del "Department of Physiology University College, London University" y por el Dr. Maz O. del "Departamento de Fisiología Celular de la UNAM". El programa se corrió en una minicomputadora PDP 11 34 Digital.

Las constantes de asociación (K_s) utilizadas se tomaron de Martell y Sillen (1971), las cuales se definen como :

$$K_s = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad \text{en donde M = metal y L = ligando.}$$

Logaritmos de las constantes de asociación.

Complejo	log de K_s
PPi H	8.3
PPi H ₂	6.0
PPi H ₃	2.7
PPi H ₄	2.5
PPi Mg ²⁺	6.0
PPi Zn ²⁺	11.66
PPi Ca ²⁺	5.46

II.6. MEDIDA DE LA CONDUCTIVIDAD DEL CATION Mg²⁺.

Las medidas de la conductividad del catión libre Mg²⁺, se realizaron en un conductímetro CDMB Radiometer (Copenhagen) con una microcelda del tipo CDC104₆₅ de la marca Radiometer Copenhagen.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION.

ASPECTOS PRELIMINARES

Se determinó la velocidad inicial para la actividad hidrolítica de la PPIasa de membrans. La reacción se incubó a 30°C, en Tris-malato 50mM, pH 6.5, PPI 0.67 mM y MgCl₂. El tiempo de incubación de la enzima en cromatóforos para observar la actividad en velocidad inicial fue de 1.5 a 2 min, tanto con Mg-PPI o Zn-PPI como sustrato y para la enzima solubilizada en detergente fue de 4.5 a 5 min, para cualesquiera de los dos sustratos mencionados.

El pH óptimo de la reacción de hidrólisis para los cromatóforos (Celis, y Romero, 1986) es de 6.5; asimismo para el solubilizado de la enzima se determinó un pH óptimo de 6.5. Se calculó la concentración de las diferentes formas iónicas del PPI a los diferentes pH's (ver Romero, 1987), en donde la forma predominante del PPI a pH de 6.5 fue la $PPiH_2^-$, lo que nos indica que esta es la forma iónica del sustrato.

III.1. EFECTO DEL $MgCl_2$ AÑADIDO SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA EN CROMATÓFOROS Y SOBRE LA ENZIMA SOLUBILIZADO EN DETERGENTE.

Se determinó la actividad de PPIasa de membrana de *R. rubrum* tanto en cromatóforos como en el solubilizado, variando la concentración del $MgCl_2$ añadido y fijando la concentración del PPI añadido (0.67 mM) (fig 6). Se observó que la cinética no sigue un comportamiento Michaeliano, sino que la curva de actividad está descrita por una función sigmoide.

Al graficar la actividad enzimática vs la concentración de sustrato, es factible encontrar curvas sigmoideas, debido a los siguientes factores: a) Incremento del sustrato precisamente en una forma sigmoidea; b) Efecto de moduladores sobre la actividad enzimática, ya sea del sustrato o algún cofactor (Segel, 1987.); c) En enzimas integrales de membrana, pueden darse efectos debidos a la misma membrana que, al solubilizar la enzima desaparecen. En primer lugar descartamos que este efecto sea un reflejo del incremento en concentración del complejo MgPP (sustrato) en forma sigmoidea, como puede verse en la fig 7, donde se calculó la concentración del sustrato. De igual manera descartamos que esta fenomenología se deba a propiedades de la membrana, ya que el solubilizado en el detergente Tritón X-100 muestra el mismo comportamiento (aunque con menor actividad).

Es importante hacer notar que, el proceso de solubilización presenta algunos inconvenientes, ya que no se esperaba tal disminución de la actividad, lo que a su vez puede deberse a varios factores: disminución de la cantidad total de enzima

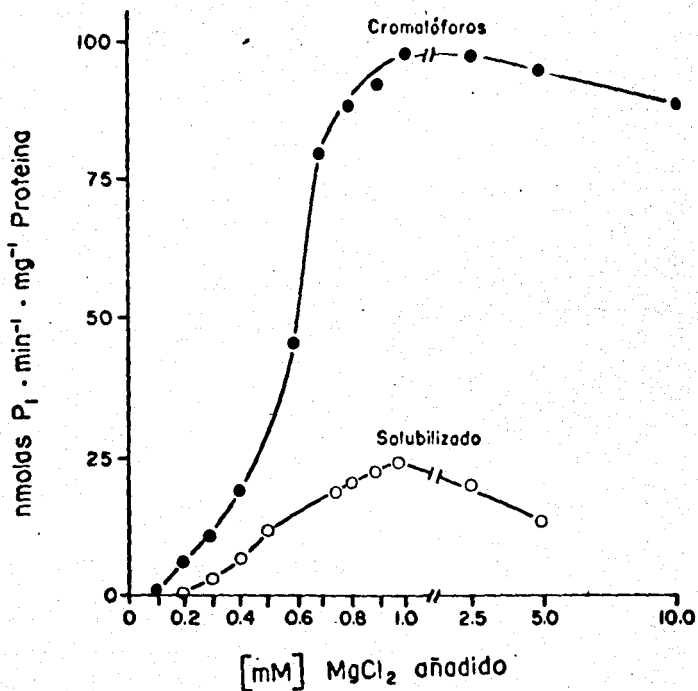


Figura 6. Efecto del Mg añadido sobre la actividad de la PPIasa de membrana en cromatóforos (●) y en el solubilizado con Tritón X-100 (○). P_i constante 0.67 mM. MgCl₂ añadido variable. La reacción se incubó en Tris-malato 50 mM, pH 6.5.

catalíticamente activa, quizá debido al tipo de detergente; cambios en la fuerza iónica de medio; dependencia de algún tipo de fosfolípidos para la actividad de PPIasa de membrana, ya que se ha visto (Klemme y Guest, 1971) que la acción de fosfolipasa "A" sobre cromatóforos de la bacteria R. rubrum inhibe la actividad de la PPIasa de membrana, esta inhibición es revertida por la adición de fosfolípidos al cromatóforo. Asimismo se ha visto (Nyren y col., 1984) que la adición de fosfolípidos al solubilizado de la PPIasa de Membrana incrementa su actividad en un 40%. Por las razones mencionadas, es importante mejorar el proceso de solubilización, por lo que en el futuro se probarán otros detergentes y diferentes concentraciones del solvente etilenglicol, el cual le da un ambiente hidrófobo al medio de solubilización, lo que es muy importante para una enzima integral de membrana. Además, se estudiara la dependencia de fosfolípidos en el solubilizado de la enzima.

El objetivo de esta tesis, como se ha mencionado, es caracterizar la actividad hidrolítica de la PPIasa de membrana con el fin de conocer los mecanismos de su posible regulación. Sobre este punto existen dos mecanismos generales que permiten explicar la posible regulación de la PPIasa de membrana:

- a) Efectos cooperativos entre el sitio o sitios de unión del sustrato a la enzima (Ricard y Cornish-Bowdwen, 1987).
- b) Enzima activada por metales libres y formación de complejo Metal-Ligando como sustrato verdadero. (Segel, 1987).

El segundo modelo (b) se considerará como hipótesis de trabajo por las siguientes evidencias de la literatura y de los trabajos previos en el laboratorio:

--Se ha visto que el verdadero sustrato para la actividad de hidrólisis en el complejo Mg-PPI, tanto en la PPIasa de membrana como en la citoplásmica (Randahall, 1979; Celis y Romero, 1987; Lathi 1983.).

--Por analogía con las PPIasas citoplásmicas (se supone que el mecanismo de acción de la PPIasas en general, debería ser similar) se sabe que los cationes divalentes libres juegan un papel importante en las modulaciones de la actividad, ya que los cationes como el Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , activan la velocidad de hidrólisis de la PPIasa citoplásmica, mientras que el Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , (Owen y col., 1984 y Butler y col., 1977.) son inhibidores de la reacción.

-- En la PPIasa de membrana de la bacteria R. rubrum se ha sugerido la participación del Mg^{2+} libre en un sitio independiente al sitio activo (Randhal, 1979 y Celis y Romero, 1987) dado que: es estrictamente necesario la presencia del Mg^{2+} para activar a la enzima; el Mg^{2+} libre se une a la enzima, ya que éste la protege de la inactivación por reactivos MAINET y NBF-Cl (reactivos que atacan grupos sulfhidrilo de la enzima); En experimentos realizados en el laboratorio (no publicados) se ha visto que la preincubación de la enzima con Mg^{2+} la protege de la inactivación por calor.

--Se ha visto (Celis y Romero, 1987), que la PPIasa de membrana en presencia de altas concentraciones del Mg-PPI los cationes divalentes son inhibitorios en el siguiente orden $Zn^{2+} > Mn^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Cu^{2+} > Mg^{2+}$, por lo que es de suponerse que estos cationes actúan en un sitio diferente al sitio activo.

--En Rhodobacter palustris (Schwarm y col 1965), se demostró

que un incremento en el Mg^{2+} libre en curvas de actividad hidrolítica vs concentración de sustrato (Mg-PPI), provoca una disminución de la K_m , asimismo a bajas concentraciones de Mg^{2+} libre la curva de actividad es sigmoidea, mientras que a altas concentraciones de Mg^{2+} libre, la curva de actividad es hiperbólica. Dado que se tomó como hipótesis de trabajo, el mecanismo de enzimas activadas por metal (b), es importante diferenciar el efecto producido únicamente por el Mg^{2+} libre, por el sustrato y por el PPI libre por lo que, se procedió a comparar sus concentraciones en el medio de reacción, a partir del experimento de la figura 6 (fig 7), en donde se observó una correlación de la activación con el incremento del Mg^{2+} libre y con el incremento de la concentración del complejo Mg-PPI lo que sugiere el mecanismo de regulación propuesto en "b" (enzimas activadas por metal) y coincide con el papel activador que se le ha dado al Mg^{2+} libre en diferentes PPIasas (Lathi, 1984). Asimismo existe la posibilidad de deshibición (que se refleja en una activación) por desaparición del PPI libre, ya que la activación se correlaciona con la desaparición del PPI libre (al incrementar el el metal libre, el ligando disminuye), ya que se ha reportado como inhibidor de la reacción en otras PPIasas (Moe y Butlert, 1972 y Rapoport 1979). Es interesante hacer notar que el Mg^{2+} libre juega otro papel como inhibidor a concentraciones mayores de 5 mM de $MgCl_2$ añadido (fig 7), tanto en cromatóforos como en el solubilizado, este hecho nos sugiere la participación del Mg^{2+} libre en un sitio independiente del sitio activo, ya que a concentraciones saturantes de sustrato deberíamos obtener una actividad constante.

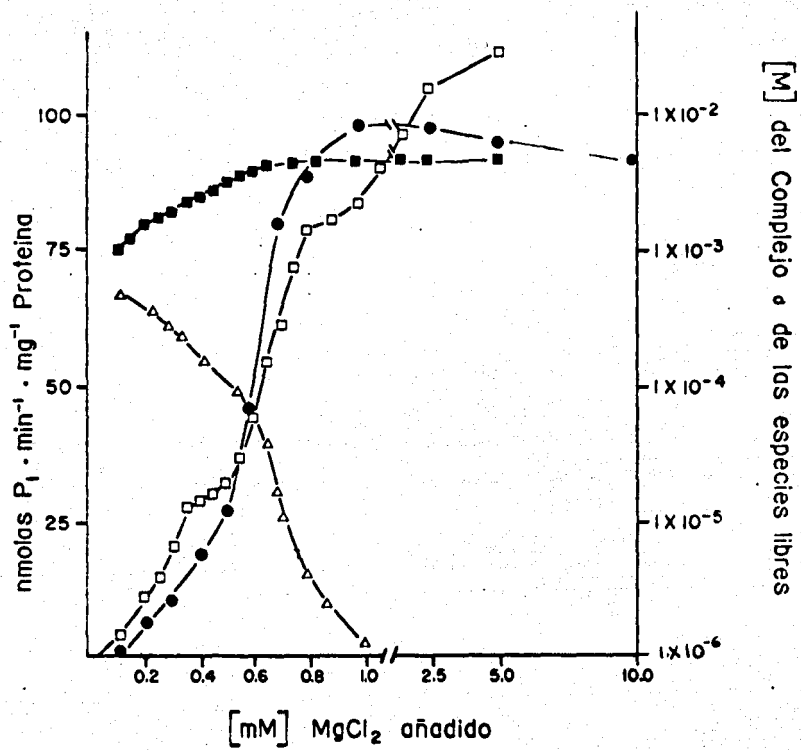


Figura 7. Efecto del Mg añadido sobre la actividad de la PPIasa de membrana en cromatóforos (●) y concentración de Mg²⁺ libre (□), PPI libre (Δ) y complejo Mg-PPI (●). PPI constante 0.67mM, MgCl₂ variable. La reacción se incubó en Tris-malato 50 mM, pH 6.5.

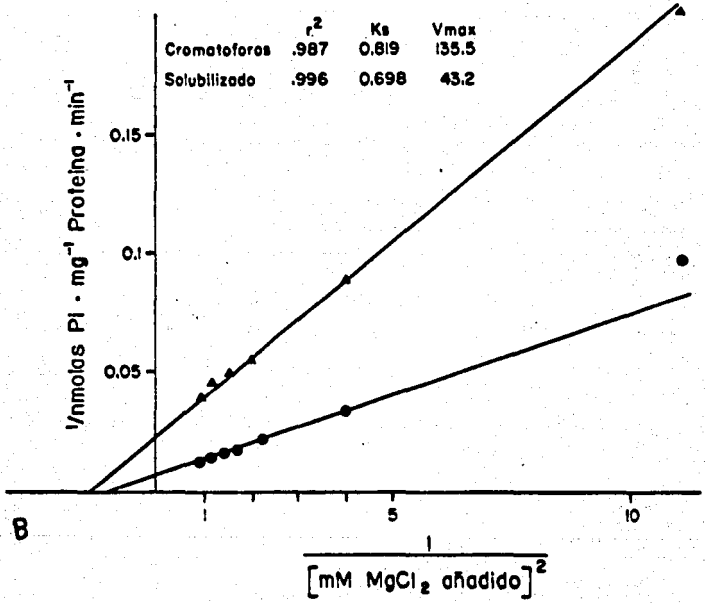
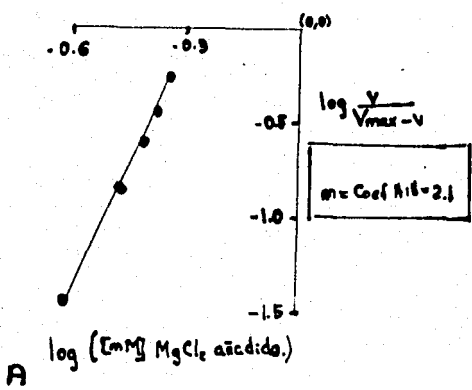
II.2. COEFICIENTE DE HILL. DE LA ACTIVIDAD DE PPIasa RESPECTO AL Mg AÑADIDO.

Con el objeto de comparar las constantes cinéticas entre la actividad hidrolítica en cromatóforos y el solubilizado en detergente, se procedió a obtener un coeficiente de Hill, respecto al $MgCl_2$ añadido, a partir de los experimentos de la figura 6, (figura 8a) en donde se obtuvo un valor entre 2 y 2.2, lo que sugiere una participación del $MgCl_2$ añadido en dos sitios diferentes, es decir un Mg^{2+} se acompañaría con el PPI para dar el sustrato y el otro Mg^{2+} se uniría a un sitio diferente del sitio activo. Al respecto en la ATPasa translocadora de protones de cloroplastos (Younis y col, 1983), se reportan sitios de unión al magnesio independientes del sitio activo; asimismo para la PPIasa citoplásmica de levadura se ha propuesto la existencia de sitios específicos para metales divalentes (Barry y Dunamay-Mariano, 1987) diferentes del sitio activo.

A partir de los coeficientes de Hill obtenidos, se linearizaron las gráficas de la actividad de la fig. 6, en un sistema de dobles recíprocas, en donde se graficó el inverso de la velocidad vs. el inverso de la concentración del $MgCl_2$ añadido elevado en el valor del coeficiente de Hill obtenido (2) (fig 8a), lo que permitió comparar las constantes cinéticas de K_s y la V_{max} entre la PPIasa en cromatóforos y el solubilizado en detergente (fig 8 b)

Se observó que las K_s no cambian prácticamente, (de 0.819 a 0.689) mientras que solo varia la V_{max} aparente (de 135.5 a 43.2), es decir las propiedades del sitio activo no se ven modificadas en el proceso de solubilización, por lo que esto

sugiere que el efecto sigmoidal de la curva de actividad hidrolítica, es propio de la enzima y no de las condiciones de la membrana en que se encuentra la enzima, ya que podría atribuirse al comportamiento sigmoidal de la curva de actividad, al efecto de la carga de superficie de la membrana, que podría ejercer atracciones y repulsiones electrostáticas entre los iones Mg^{2+} , PPi^{4-} o $Mg-PPi^{2-}$, en una forma que el sustrato en determinadas condiciones se encuentre más accesible al sitio activo.



Figuras: 8A. Cráfica de Hill para Mg añadido, a partir de los datos de la figura 6. 8B. Gráfica de dobles recíprocas de la actividad de PPIasa de membrana en cromatóforos (Δ) y solubilizado de la enzima (\circ), obtenida a partir de los datos de la fig 6.

III.3. ACTIVIDAD DE LA PPIasa DE MEMBRANA Y DE LA ENZIMA SOLUBILIZADA EN DETERGENTE CON EL Zn-PPi COMO SUSTRATO.

En la PPIasa de membrana se ha visto (Deliz y Romero, 1987) que los cationes divalentes modulan las actividades cinéticas de la enzima, los cuales se pueden dividir en dos grupos:

- a) los que son capaces de formar complejos hidrolizables como el Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} .
- b) los que no forman complejos hidrolizables como el Ca^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+} y Cu^{2+} .

Dados estos antecedentes y debido a que nuestro interés es conocer si el efecto sigmoideo de la actividad de la PPIasa es particular para el magnesio o es un mecanismo general de la PPIasa, se decidió estudiar el efecto del Zn-PPi en la reacción, ya que es buen representante del grupo "a" y además se escogió el $ZnCl_2$ porque a concentraciones más bajas respecto al $MgCl_2$ añadido (1 mM de metal añadido) es mejor sustrato para la hidrólisis.

En la figura 9 se observó que la actividad de PPIasa, tanto en cromatóforos como en el solubilizado con Zn-PPi como sustrato, se presenta un comportamiento muy similar al obtenido con Mg-PPi como sustrato (comportamiento no Michaeliano). Asimismo el Zn^{2+} libre y el Zn-PPi incrementan su concentración a la par que la actividad hidrolítica, y a concentraciones altas del metal libre (más de 5mM de Zn^{2+}), el Zn^{2+} inhibe más de un 95% al máximo de actividad ya sea por ocupar el sitio activo o por ocupar un sitio modulador diferente al sitio activo. Estos datos sugieren que el efecto sigmoideal de la actividad hidrolítica parece estar asociado con un mecanismo más general de la enzima

que con una respuesta particular a un determinado catión.

Se estudió el efecto del Ca-PPi como sustrato, tanto en cromatóforos como en el solubilizado, ya que existen reportes de que para la ATPasa mitocondrial, no es complejo hidrolizable el Ca-ATP, pero al solubilizarse este complejo es reconocido como sustrato. Es decir, nos fue importante conocer si en el proceso de solubilización no cambiamos la dependencia de algún catión para la actividad de hidrólisis. La PPIasa de membrana no presentó actividad de hidrólisis con Ca-PPi en el solubilizado, al igual que en los cromatóforos.

Estos experimentos plantean una pregunta muy importante: ¿por qué las PPIasas reconocen solamente a algunos complejos metal-PPi como sustrato? . La respuesta es muy difícil de contestar, ya que esto involucraría conocer los aspectos moleculares de la especificidad para diversos procesos metabólicos.

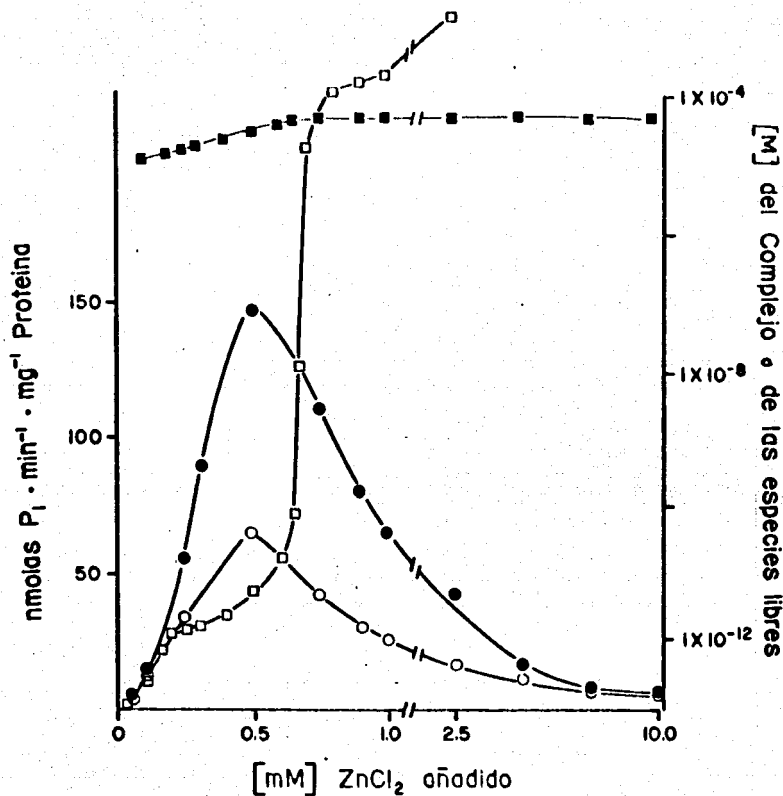


Figura 9. Actividad de la PPiase de Membrana en crómatoforos (●) y solubilizado de la enzima en detergente (○) con Zn-PPi como sustrato. PPi añadido en 0.67 mM y concentraciones del Zn libre (□) y del complejo Zn-PPi (■). La reacción se incubó en Tris-malto 50 mM pH 6.5.

III.4 EFECTO DE LA VARIACION DEL Mg LIBRE SOBRE LA PPIasa DE MEMBRANA EN CROMATOFOROS CON EL COMPLEJO Mg-PPI CONSTANTE.

Con el fin de conocer qué factores modulan la actividad de la enzima (ya sea el Mg^{2+} libre, el PPI libre o el complejo Mg-PPI) para darse una curva de actividad sigmoidea, se calcularon las concentraciones de magnesio total y PPI total, necesarias para variar la concentración del Mg^{2+} libre y mantener constante la concentración del complejo Mg-PPI en 0.5 mM (Morrison, 1973), se observa que el incremento del Mg^{2+} libre (fig. 10) trae consigo una activación de la velocidad hidrolítica, la cual está descrito por una función sigmoide, en donde, descartamos que tal efecto se deba al complejo Mg-PPI, ya que se encuentra constante. lo cual sugiere un fenómeno de activación alostérica producida por el Mg^{2+} libre, que bien podría modificar el equilibrio de unión del sustrato a la enzima y/o modificar la velocidad del ciclo catalítico. En la PPIasa citoplásmica de levadura estos sitios para cationes divalentes, están muy bien caracterizados (Dunaway-Mariano y col., 1987).

Existen otras interpretaciones de la activación, por ejemplo: una desinhibición de la actividad de PPIasa (Segel, 1987) debido a la desaparición PPI libre, el cual es un inhibidor competitivo (ya que si aumenta la concentración del Mg^{2+} libre, el PPI libre disminuye y viceversa) de la reacción (Rapoport y col., 1979). Para descartar el efecto desinhibitorio del PPI, se realizó un análisis local de la activación (ver fig 10 y tabla 3), en donde se dividió la activación en tres regiones a, b, y c que representan el 5.4%, 51.6% y el 43% del máximo de actividad respectivamente .

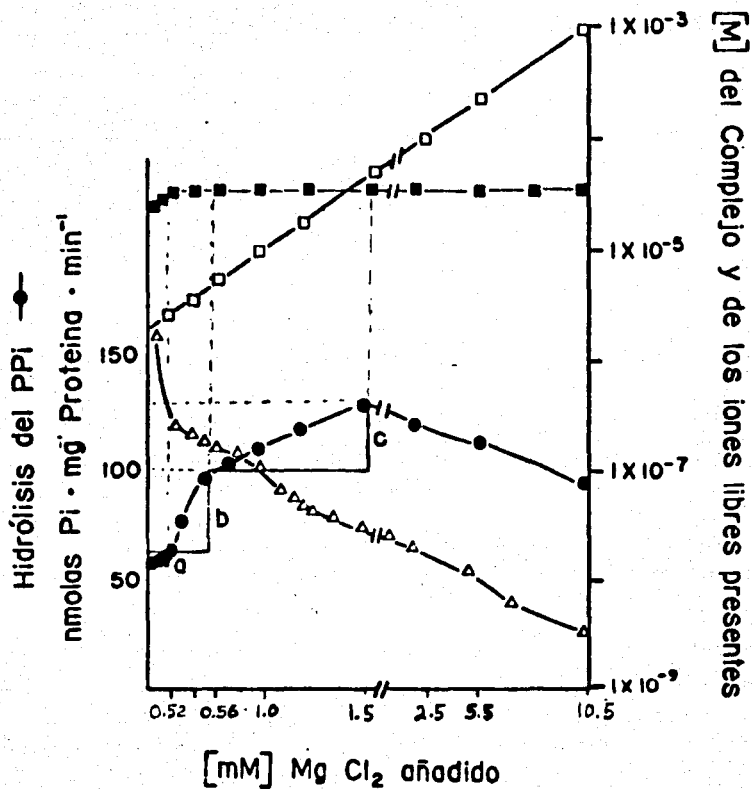


Figura 10. Efecto de la variación del Mg²⁺ libre, sobre la actividad de la PPIasa de membrana en cromatóforos (●), con el Mg-PPi constante en 0.5 mM. Concentraciones del complejo Mg-PPi (■), Mg²⁺ libre (□), PPI libre (Δ). La reacción se incubó en Tris-malato 50 mM. pH 6.5.

Se calculó el decremento de la concentración de PPI (PPI) y el incremento de la concentración del Mg^{2+} libre (Mg^{2+}), correspondiente a cada región.

Se aprecia que, en la región "a" donde el decremento del PPI es el más grande (-16.8 μM) representa la menor proporción de la activación (5%), mientras que en la región "b", que representa el 51.6% de la activación, el decremento de PPI es menor que en "a" (3 μM), asimismo el incremento de Mg^{2+} libre es de 200 μM y en la región "c" el resultado es similar a la región "c". Por lo que resulta difícil explicar un efecto desinhibitorio del PPI ya que en la región (a) donde el PPI disminuye en mayor proporción es precisamente donde se presenta la menor activación, mientras que es muy claro explicar que la activación corresponde a las regiones (a y b) donde se incrementa la concentración del Mg^{2+} libre.

De nuevo se refleja un efecto inhibitorio producido por el Mg^{2+} libre (a concentraciones mayores de 1.5 mM de Mg^{2+} libre) que bien podría explicarse por la modulación ejercida por un sitio de unión al magnesio, independiente del sitio activo y/o por el bloqueo del sitio activo por el Mg^{2+} libre, impidiendo así la unión del sustrato.

Asimismo se calculó un coeficiente de Hill respecto al Mg^{2+} libre para la región de activación de la figura 10. Se obtuvo un valor del coeficiente de Hill de 2 (fig 11), lo cual podría implicar que existen dos estados de la enzima: a) Activado por la unión del Mg^{2+} en un sitio diferente del sitio activo y b) un estado no activado.

Es decir, dado que se sugiere que el Mg^{2+} es el que provoca

Tabla 3. Concentración del $-\Delta\text{PPI}$ y del $+\Delta\text{Mg}^{2+}$, que corresponden a las regiones a, b y c de la figura 10.

	% DE ACTIVIDAD	$-\Delta\text{PPI}$ LIBRE	$+\Delta\text{Mg}$ LIBRE
a	5.4	$-16.8 \mu\text{M}$	$78 \mu\text{M}$
b	51.6	$-3.0 \mu\text{M}$	$200 \mu\text{M}$
c	43.0	$-1.5 \mu\text{M}$	$700 \mu\text{M}$

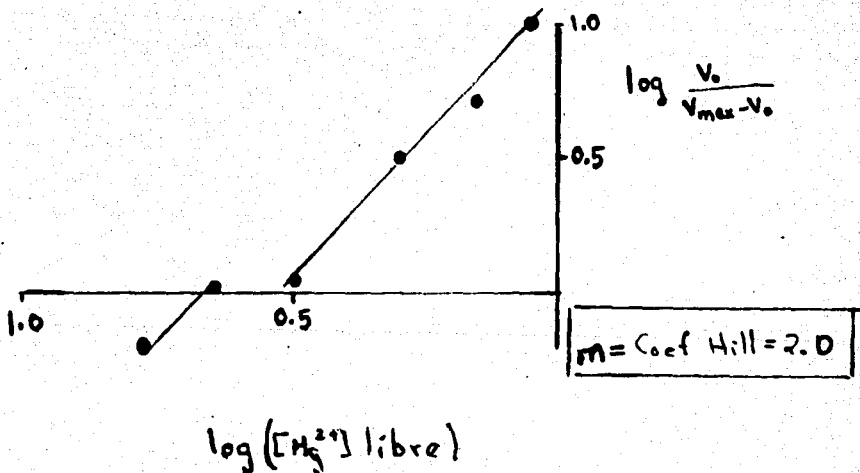
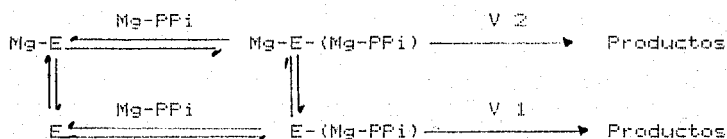


Fig 11. Gráfica de Hill para el Mg libre, de la región de activación de la figura 10.

la respuesta sigmoideal. podría suponerse que bajo la región "a" donde existe poca concentración de Mg^{2+} libre (0.03 mM), tendríamos una concentración baja de enzimas activadas, las cuales en promedio formarían el producto a una velocidad " V_1 ", menor que a una velocidad " V_2 ", donde el Mg^{2+} libre ha incrementado su concentración y por lo tanto activado la mayor parte de la población de enzimas (a concentración de Mg^{2+} libre de 1 mM) y que correspondería a la región "b". Esto sugiere el siguiente modelo cinético:



En donde V_2 es mayor que V_1 . Dado que no se tienen evidencias de la estructura o de algún número de subunidades de la enzima y por lo tanto no se conoce el número de sitios activos de la enzima, se sugiere el modelo más sencillo con un solo sitio activo y que presenta dos estados de actividad: con Mg^{2+} (alta actividad) y sin Mg^{2+} (baja actividad).

III.5. CONDUCTIVIDAD DE METALES LIBRES (Mg^{2+}), CON Mg VARIABLE Y Mg -PPI CONSTANTE.

Para corroborar que las concentraciones del Mg^{2+} libre calculado, se incrementan linealmente como se muestra en la fig 10, se procedió a medir la conductividad (conductímetro Copenhagen) en dos condiciones: a) Tris-malato 2.5 mM y concentraciones crecientes de $MgCl_2$; b) Tris-malato 2.5 mM, pH 6.5 y las concentraciones añadidas del $MgCl_2$ en el experimento de la figura 10. Las determinaciones de conductividad no son un método analítico para medir la concentración del Mg^{2+} libre, sino para corroborar que bajo las condiciones de la figura 10, el Mg^{2+} libre aumenta linealmente, ya que si este incrementara su concentración de manera sigmoideal, el mecanismo alosterico propuesto para la activación por Mg^{2+} libre no tendría evidencias.

Se observó (fig 12), que la conductividad medida con Mg^{2+} y PPI añadidos al medio incrementó linealmente, al igual que respecto al control donde solamente se agregó Mg^{2+} , por lo que podemos tener la certeza de que el Mg^{2+} calculado en la fig 10, incrementa su concentración en forma lineal.

Además descartamos la aparición del complejo Mg_2PPI en concentraciones apreciables (curva con Mg y PPI añadidos) ya que, de formarse este complejo, se observaría una desviación fuerte de la pendiente que describe el incremento de concentración del metal libre.

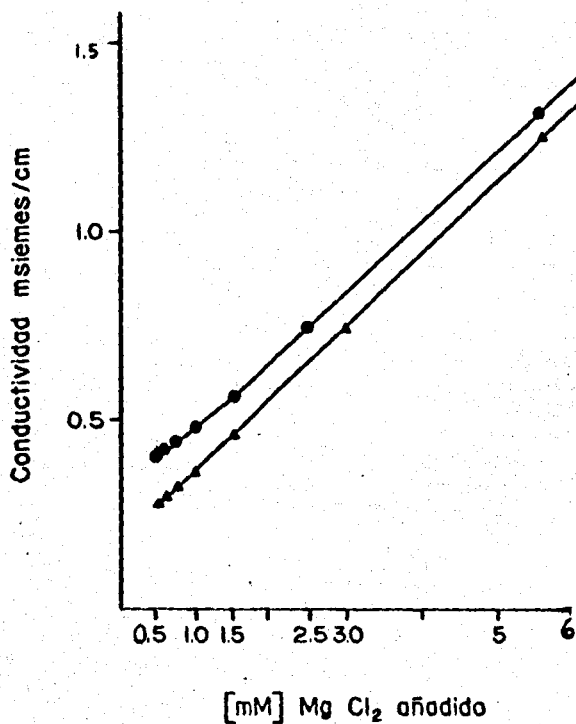


Fig 12. Conductividad para el Mg^{2+} : a) Tris-malato 2.5 mM , pH 6.5 y concentraciones crecientes de $MgCl_2$ añadido (▲); b) Tris-malato 2.5 mM, pH 6.5 y las concentraciones de PPI y $MgCl_2$ añadido de la figura 10 (●). La reacción se incubó en Tris-malato 50mM, pH 6.5.

III.6. EFECTO DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE PPI ANADIDO ($MgCl_2$ 1mM) Y CONCENTRACIONES CRECIENTES DE Mg ANADIDO (Y PPI 1mM) SOBRE LA ACTIVIDAD DE PPIasa DE MEMBRANA.

Con el fin de ahondar en el papel que juegan las especies libres metal (Mg^{2+}) libre y ligando (PPI) libre, se procedió a realizar un perfil de actividad para el metal (en donde se fija la concentración del magnesio total y se varia la concentración del PPI total) y un perfil de actividad para el ligando (se fija la concentración del PPI total y se varia la concentración del metal total). Dicho enfoque experimental está bien documentado (Segel, 1976 y London y Steck, 1969).

Es de notarse (fig 13) que, en ambas curvas, a partir de la concentración 1mM de metal o ligando, según sea la curva, la concentración del complejo se mantiene prácticamente constante en 1mM (ver tabla 4 y 5) y por lo tanto, los efectos inhibitorios se deben al metal o al ligando libres. Se observó una inhibición más severa del PPI libre (1mM de PPI libre inhibe un 72 %), que del Mg^{2+} libre (4 mM de Mg^{2+} libre inhibe un 29. %), lo que podría sugerir que la constante de asociación del PPI por la enzima es mayor que por el Mg libre. Esta suposición se basa (London y Steck, 1969) en que el efecto inhibitorio podría estar dado en mayor medida, por los valores de asociación de estos ligandos a la enzima.

En el perfil de actividad hidrolítica para el PPI (fig 13), se sugiere un papel activador del magnesio ya que a partir de 1mM de magnesio la concentración del complejo es constante y al aumentar la concentración del magnesio total, se obtiene un incremento de la actividad. Esta activación es muy pequeña (10 %

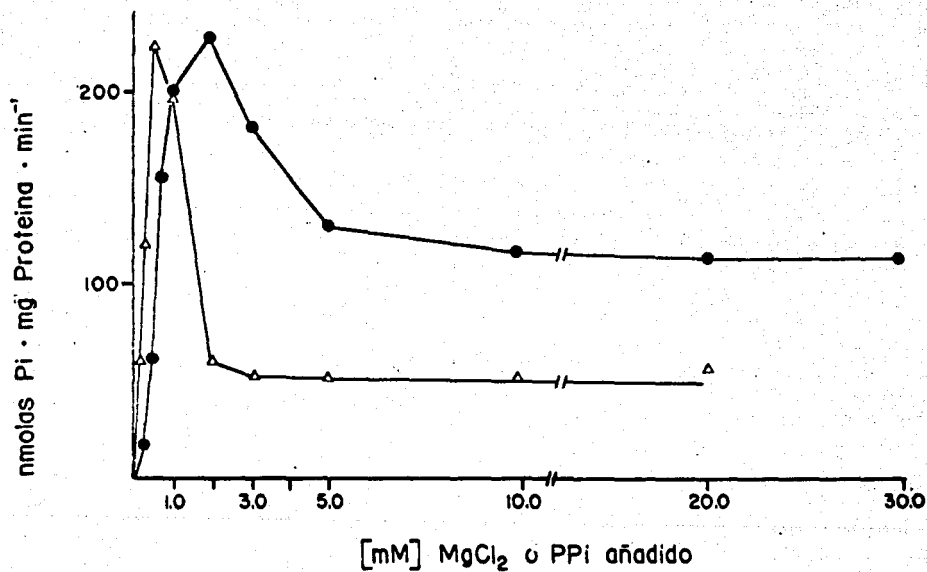


Figura 13. Efecto de concentraciones crecientes de PPI (Δ) (MgCl₂ 1 mM) y concentraciones crecientes de MgCl₂ (●) (PPI 1mM), sobre la actividad de PPIasa de membrana en cromatóforos. La reacción se incubó en Tris-malato 50 mM, pH 6.5.

Tabla 4. Concentracion de los complejos y especies libres con concentraciones crecientes de $MgCl_2$ y PPI constante en 1mM, los datos se calcularon a partir de los datos de la figura 13.

PPI Total	Mg Total	PPI Libre	Mg Libre	Complejo $MgPP_i$
mM	mM	mM	mM	mM
1.0	0.25	0.750	0.000333	0.249
1.0	0.3	0.700	0.000427	0.299
1.0	0.5	0.501	0.000996	0.499
1.0	0.75	0.253	0.00295	0.747
1.0	1.0	0.031	0.031	0.968
1.0	2.0	0.000998	1.009	0.999
1.0	3.0	0.000499	2.003	0.999
1.0	5.0	0.000249	4.001	0.999
1.0	7.5	0.000154	6.500	0.999
1.0	10.0	0.000111	9.000	0.999
1.0	20.0	0.000052	19.00	1.000
1.0	30.0	0.000034	29.00	1.000

Tabla 5. Concentración del complejo Mg-PPi y las especies libres a concentraciones crecientes de PPi añadido y MgCl₂ constante en 1mM, los datos se calcularon a partir de la figura 13.

PPi Total	Mg Total	PPi Libre	Mg Libre	Complejo MgPPi
mM	mM	mM	mM	mM
0.1	1.0	0.000111	0.900	0.0989
0.25	1.0	0.000332	0.7503	0.249
0.3	1.0	0.000437	0.700	0.299
0.4	1.0	0.00064	0.6006	0.399
0.5	1.0	0.000996	0.5009	0.499
0.75	1.0	0.002955	0.2528	0.747
1.0	1.0	0.0311	0.0311	0.968
2.0	1.0	1.009	0.0009	0.999
3.0	1.0	2.004	0.00049	0.999
5.0	1.0	4.001	0.000249	0.999
7.5	1.0	6.500	0.000154	0.999
10.0	1.0	9.000	0.000111	0.999
20.0	1.0	19.0	0.000052	1.000
30.0	1.0	29.0	0.000034	1.000

III.7. EFECTO DE LA VARIACION DEL COMPLEJO $Mg-PPi$ EN LA ACTIVIDAD DE LA PPIasa DE MEMBRANA A CONCENTRACIONES CONSTANTES DE Mg^{2+} LIBRE.

Con el fin de conocer unicamente el efecto del sustrato ($Mg-PPi$) sobre la actividad hidrolitica, se calculó las cantidades necesarias de Mg total y PPi total, que se debe agregar para variar la concentración del sustrato y mantener constante la concentración del Mg^{2+} libre, en cada una de las concentraciones siguientes: 1.0 , 0.1 , 0.03 mM. Es importante hacer notar que en cualquier proceso enzimático, la función general que describe el proceso de saturación está descrito por una hipérbola, por lo que la idea de este experimento fue eliminar los factores que modifiquen la actividad de $PPiasa$.

Se observó que al fijar la concentración del Mg^{2+} libre la curva de actividad tienden a describir funciones hiperbólicas, es decir, la enzima presenta un comportamiento Michaeliano con respecto al sustrato, y conforme se fija una mayor concentración de magnesio libre, las velocidades hidroliticas son mayores y la K_m respecto al sustrato disminuye de 7.1 (0.03 mM de Mg^{2+} libre) hasta 0.5 mM (Mg^{2+} libre en 1.0 mM), (Figs 14 y 15).

Estos resultados sugieren que el Mg^{2+} podría actuar en un sitio independiente del sitio activo aumentando la afinidad de la enzima por el sustrato y/o bien aumentando la velocidad del ciclo catalítico.

En la $PPiasa$ de membrana de Rhodobacter palustris se ha visto (Knobloch, y col., 1986) que el Mg^{2+} libre juega un papel modulador similar al de la figura 14, en donde al fijar concentraciones mayores de Mg^{2+} libre, la K_m para el sustrato

disminuye de 0.5 mM (Mg^{2+} constante a 0.001 mM) a 0.1 mM (Mg^{2+} constante a 1.0 mM). Randhal en 1979, calculó en la PPIasa de membrana de R. rubrum diferentes valores de K_m para el sustrato dependiendo de la concentración del Mg^{2+} libre, los valores de K_m reportados fueron 0.5, 0.35, 0.15 y 0.065 mM correspondientes a 0.001, 0.05 0.1 y 0.5 mM del Mg^{2+} libre. Por lo tanto, el Mg^{2+} libre juega un papel importante en las modulaciones de la enzima, al grado de modificar las propiedades catalíticas del sitio activo.

Además, es de notarse que las velocidades máximas no son las mismas (recuadro de la fig 15), quizás debido a que la velocidad máxima de una enzima depende de la concentración del complejo E-S catalítico y si además suponemos la existencia de otro complejo catalítico dado por Mg-E-(Mg-PPI), entonces es de esperarse que a concentraciones bajas de Mg^{2+} libre (0.03 mM) se obtenga una velocidad máxima diferente respecto a concentraciones altas de Mg^{2+} libre.

En el laboratorio se ha visto (datos no publicados) que en la PPIasa de membrana los complejos de hidrólisis metal trivalente-PPI, presentan poca hidrólisis pero, al agregar los cationes divalentes Mg^{2+} o Zn^{2+} la hidrólisis aumenta y dado que el PPI presenta una afinidad 17 ordenes de magnitud más alta por el metal trivalente, que por los metales divalentes, se concluye que, este efecto de activación se debe a un efecto de los cationes divalentes libres en un sitio diferente del sitio activo.

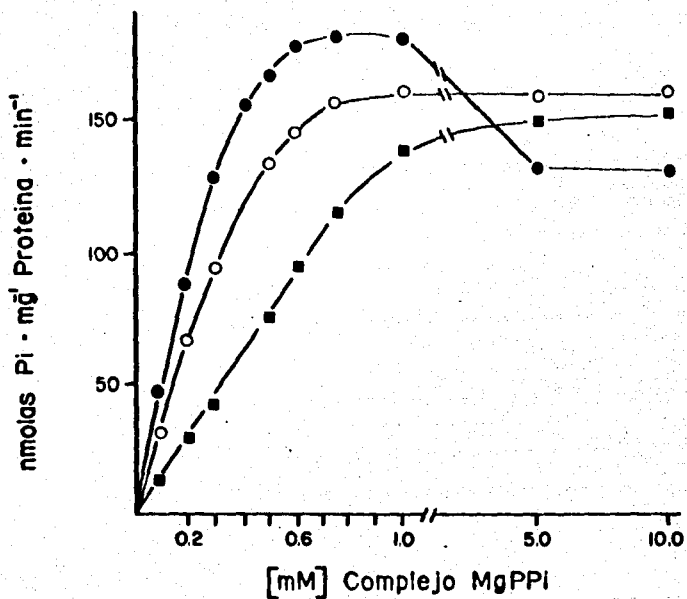


Figura 14 . Actividad hidrolitica de PPIasa vs concentraciones del complejo Mg-PPI. Se mantuvo constante la concentración de Mg²⁺ libre en: 1.0 mM (●), 0.1 mM (○), 0.03 mM (■). La reacción se incubó en Tris-malato 50 M, pH 6.5.

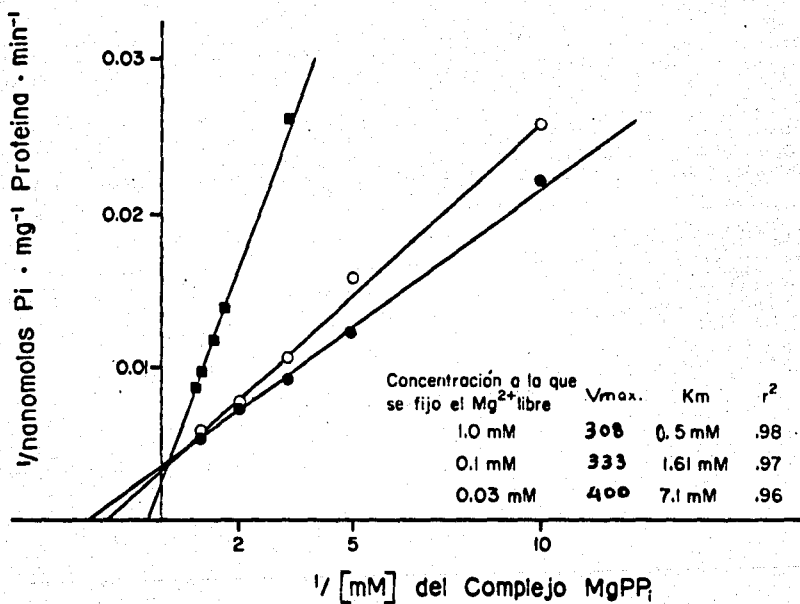


Figura 15. Dobles recíprocas de la actividad de PPIasa vs la concentración de sustrato. A partir de los datos de la fig 10. Concentración del Mg^{2+} constante en: 1 mM (●); 0.1 mM (○) y 0.03 mM (■). La reacción se incubó en Tris-malato 50 mM pH 6.5.

III.8. EFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTE Ca^{2+} Y Zn^{2+} SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA PPIasa.

Celis y Romero (1986) reportaron que los cationes divalentes y los protones modulan la actividad de la PPIasa de membrana de Rhodospirillum rubrum, observando un efecto inhibitorio debido a cationes divalentes en presencia de un alta concentración del sustrato y dividieron la acción de estos cationes en dos grupos : los que son sustitutos del Mg^{2+} para formar un sustrato hidrolizable y los que no forman complejo de hidrólisis, por tal razón se decidió estudiar el efecto de los cationes divalentes Zn^{2+} y Ca^{2+} en la actividad de hidrólisis con el complejo Mg-PPi como sustrato, de manera comparativa entre la enzima en cromatófos y el solubilizado en detergente. Se escogió al zinc y al calcio que representan al grupo de cationes que son sustitutos del magnesio para formar sustrato y de los que no forman sustrato respectivamente. El análisis del tipo de inhibición producida es importante, ya que nos permite conocer los mecanismos de acción de la enzima.

III.8.1. EFECTO DEL CALCIO.

Se hicieron dos experimentos con $CaCl_2$, con 0.35 mM y con 1mM (Fig 16 y 17 en cromatóforos y solubilizado, respectivamente). Se observó una inhibición más severa a mayor concentración de $CaCl_2$ total (en el solubilizado no es claro) y la inhibición es reversible al agregar $MgCl_2$ tanto en los cromatóforos, como en el solubilizado. El efecto de añadir concentraciones crecientes de $MgCl_2$ es formar complejo Mg-PPi, ya

que la constante de afinidad del PPI por el Mg^{2+} (6.0) es mayor que por el Ca^{2+} (5.46), lo que se observó en las concentraciones calculadas para las especies libres y los complejos, en la condición de $CaCl_2$ 0.35 mM, PPI 0.67 mM y $MgCl_2$ en concentraciones variables (Fig 18), en donde la pérdida de inhibición se correlaciona con tres factores: a) el aumento en la concentración de Mg^{2+} libre, b) el aumento del complejo Mg-PPI, c) la disminución del complejo Ca-PPI, lo que nos sugiere una inhibición del tipo "competitiva compleja", ya que el Ca-PPI que no es sustrato de hidrólisis podría ser desplazado por el sustrato Mg-PPI (ya que aumenta su concentración) y dado que se observó un incremento del Mg^{2+} libre, no podemos excluir un efecto activador de este ión. El análisis de la linealización de las gráficas de inhibición con Ca^{2+} , nos sugiere una inhibición del tipo "acompetitiva compleja" (recuadros de la fig 19), porque los valores de K_i cambian respecto a la K_s (zin inhibidor) y cambian los valores de V_{max} . Esta discrepancia para la interpretación del tipo de inhibición, se le atribuye al efecto de los metales libres presentes en el medio de reacción, ya que si suponemos la existencia de un sitio para cationes divalentes, independiente del sitio activo, no existe ninguna razón para eliminar su participación. Este análisis se observó tanto en cromatóforos como en el solubilizado con detergente, lo que sugiere que las propiedades de la enzima no se ven modificadas en el proceso de solubilización, ya que el mecanismo de inhibición por el Ca^{2+} es similar en ambas preparaciones de la enzima. Es importante resolver la discrepancia entre las interpretaciones del mecanismo de inhibición (competitiva y acompetitiva compleja)

para lo cual sería conveniente fijar las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} libre y, así, variar las concentraciones de los complejos Ca-PPi y Mg-PPi . Así al obtener valores para las constantes de inhibición, es factible simular modelos de actividad y compararlos con las actividades obtenidas en experimentos y de esta manera determinar el tipo de inhibición.

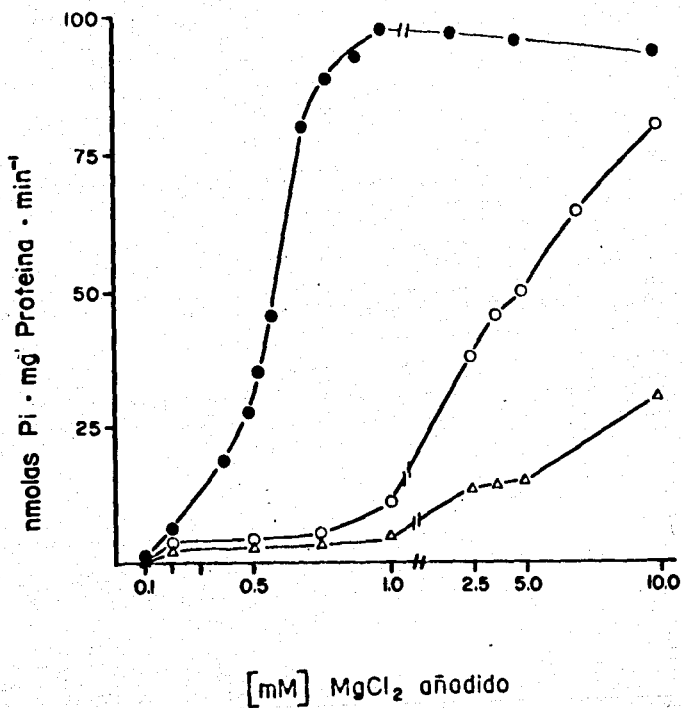


Fig 16. Efecto del CaCl₂ sobre la actividad de PPIasa en cromatóforos con PPI añadido (0.67mM) y Mg variable. Ca añadido 1.0mM (Δ) , Ca añadido 0.35mM (○); sin Ca añadido (●). La reacción se incubó en Tris-malato 50 mM, pH 6.5.

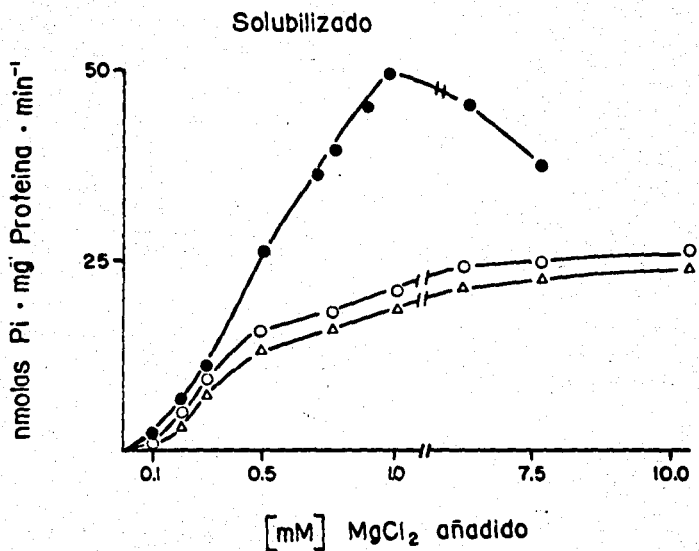


Fig 17. Efecto del CaCl_2 sobre la actividad de la PPiase solubilizada en detergente, con PPi añadido 0.67mM, MgCl_2 variable. Ca añadido 1.0mM (Δ); Ca añadido 0.35 mM (\circ); sin Ca añadido (\bullet). La reacción se incubó en Tris-malato 50 mM, pH 6.5.

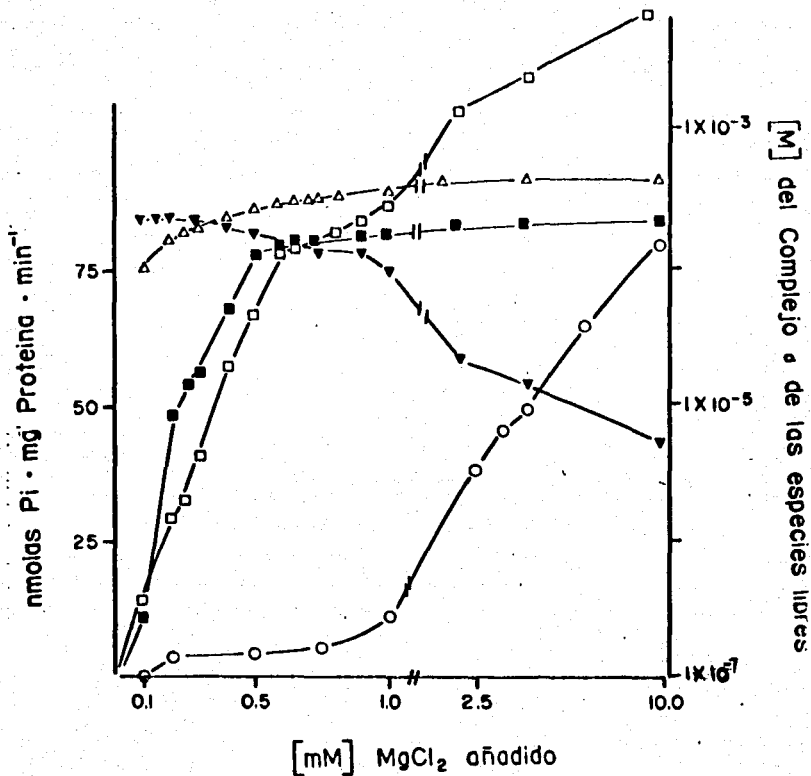
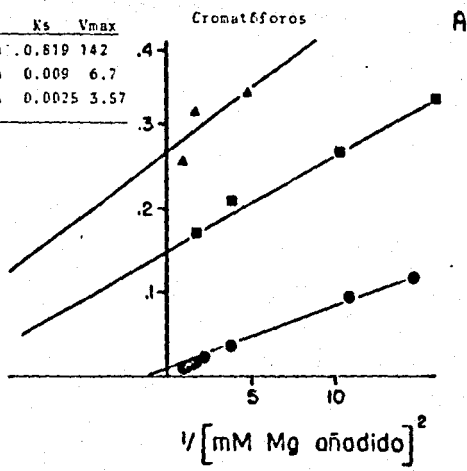


Fig 18. Efecto del CaCl₂ sobre la actividad de PPIasa en cromatóforos, con PPI añadido 0.67 mM, MgCl₂ variable, Ca añadido 0.35 mM (○). Concentración de Ca libre (▼), Mg²⁺ libre (■), Mg-PPi (▲), Ca-PPi (▼). La reacción se incubó en Tris-malto 50 mM, pH 6.5.

$1/\text{nanomolas Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Proteina} \cdot \text{min}^{-1}$

	K_s	V_{max}
(●) 0.0 mM Ca	0.819	142
(■) 0.35mM Ca	0.009	6.7
(▲) 1.0 mM Ca	0.0025	3.57



	K_s	V_{max}
(●) 0.0 mM Ca	0.67	43.3
(■) 0.35 mM Ca	0.06	6.25
(▲) 1.0 mM Ca	0.04	4.16

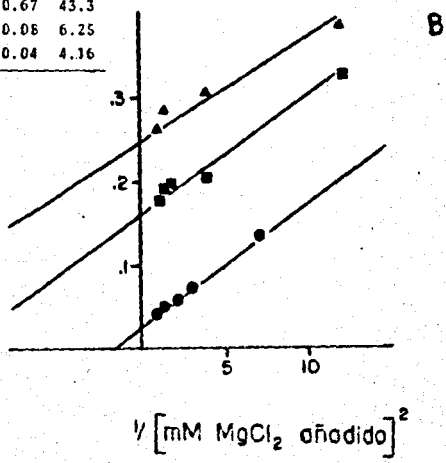


Figura 19. Dobles reciprocas de las figuras 17 (A) y 18 (B), para linearizar, se elev6 al cuadrado el inverso de la concentraci6n del MgCl_2 .

III.8.2. EFECTO DEL ZINC.

Se estudió el efecto del Zinc sobre la actividad de hidrólisis del Mg-PPi, tanto en cromatóforos como en el solubilizado en detergente (fig 20 y 21 respectivamente). Se utilizaron dos concentraciones de Zn^{2+} añadido (0.2mM y 0.75m), y se observaron dos efectos: a) uno de activación respecto a la actividad con Mg-PPi (Zn-PPi 0.0 mM) a concentraciones menores de 1.0 mM de $MgCl_2$ añadido y b) un efecto inhibitorio a concentraciones mayores de 1.0 mM de $MgCl_2$ añadido.

Se analizaron estos efectos con las concentraciones calculadas de los complejos y metales libres en el medio de reacción (fig 22), tomando como modelo la curva con Zn^{2+} añadido a una concentración de 0.35 mM. El efecto de activación con respecto a la actividad con Mg-PPi (a) es de esperarse, ya que la enzima está funcionando con dos sustratos (Mg-PPi y Zn-PPi) y las concentraciones de los metales libres (Mg^{2+} y Zn^{2+}) se incrementan (fig 17), los que podrían funcionar como activadores de la reacción. El proceso de inhibición (b) es complejo, ya que al incrementar las concentraciones de Mg^{2+} libre y Zn^{2+} libre estos cationes divalentes pueden ejercer su acción en un sitio diferente al sitio activo.

En la región de activación (a) (fig 20), se observó un efecto sinérgico, ya que se agregó una concentración constante de $ZnCl_2$ (0.35 mM), por lo que se esperaba una curva de actividad con la misma forma que la actividad sin $ZnCl_2$ añadido (sigmoidea), es decir al agregar dos sustratos (Zn-PPi y Mg-PPi), se esperaba obtener una suma aditiva de las velocidades hidrolíticas.

En la región de inhibición (b), es difícil interpretar el

mecanismo de inhibición producido por los metales libres (Mg^{2+} y Zn^{2+}), porque no podemos diferenciar el efecto por separado de estos cationes con este tipo de análisis, por lo que sería adecuado realizar un experimento de este tipo fijando las concentraciones de los metales libres o de los complejos que son sustratos, con el fin de conocer aspectos del mecanismo de esta reacción.

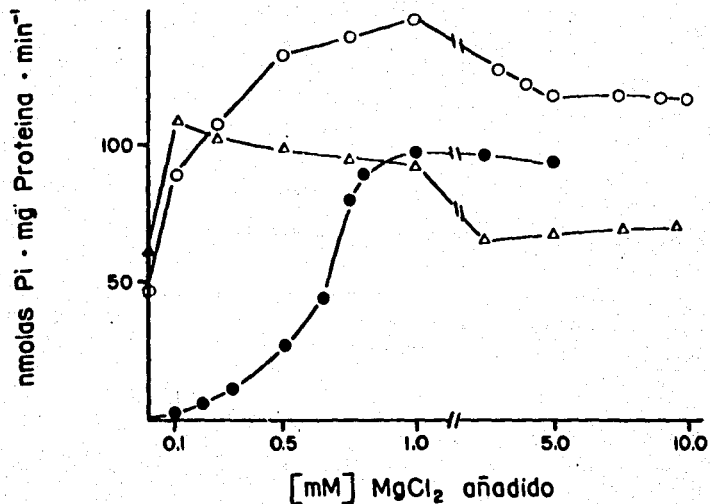


Fig 20. Efecto del ZnCl₂ sobre la actividad PPIasa en cromatóforos (●), con PPI añadido 0.67mM, MgCl₂ variable y Zn 0.75 mM (○), Zn 0.2 mM (△). La reacción se incubó en Tris-malato 50 mM, pH 6.5.

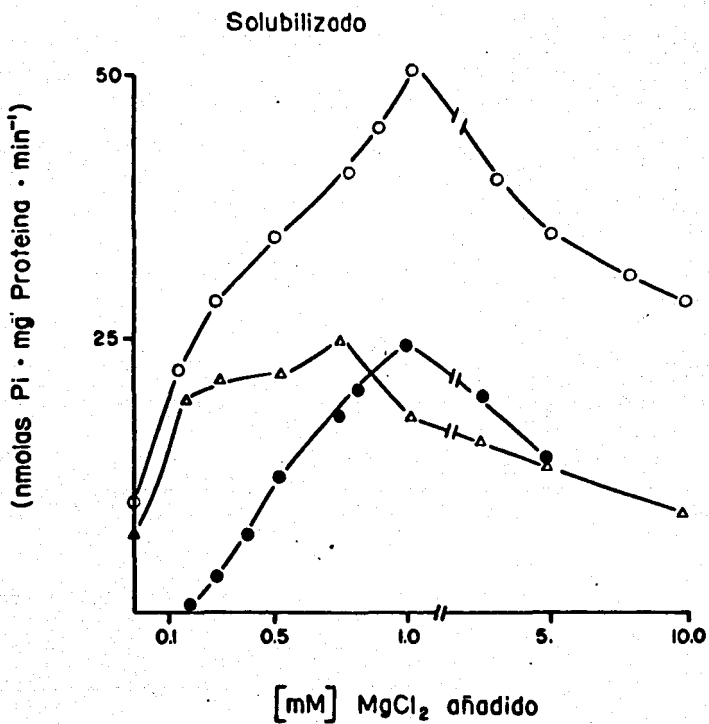


Figura 21. Efecto del $ZnCl_2$, sobre la actividad de la PPIasa solubilizada en detergente (\bullet), con PPI añadido 0.67mM, $MgCl_2$ variable y Zn 0.75 mM (Δ), Zn 0.2 mM (\circ). La reacción se incubó en Tris-malato 50 mM, pH 6,5.

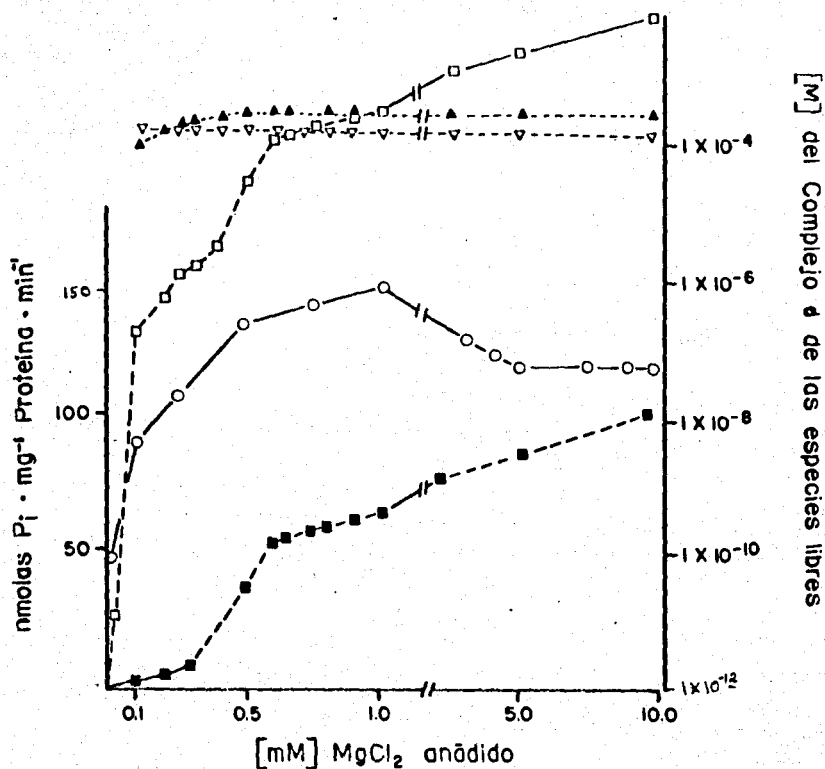


Fig 22. Efecto del ZnCl₂ sobre la actividad de PPIasa en comatóforos con Zn 0.2 mM, MgCl₂ variable y PPI en 0.67 mM (○) y concentración de complejos y especies presentes. Zn²⁺ libre (■) Mg²⁺ libre (□) Zn-PPi (▽) y Mg-PPi (▲). La reacción se incubó en Tris-malato 50 mM, pH 6.5.

CAPITULO IV.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Al respecto de la actividad hidrolítica de PPIasa en cromatóforos de R. rubrum, podemos concluir:

-Corroboramos que el sustrato de hidrólisis es el complejo Mg-PPi.

-La pirofosfatasa de membrana presenta un comportamiento Michaeliano respecto al sustrato.

-El Mg^{2+} libre, al incrementar su concentración, provoca una disminución de la K_m en la actividad hidrolítica, lo que sugiere un efecto modulador en un sitio diferente al sitio activo de la enzima.

-El Mg^{2+} libre además del efecto activador, presenta un efecto inhibitor a altas concentraciones; es decir, a bajas concentraciones (menores de $1mM$ de Mg^{2+} libre) es un modulador positivo de la actividad y a altas concentraciones (mayores de $2mM$ de Mg^{2+} libre) es un modulador negativo de la actividad.

-El Mg^{2+} juega un papel activador muy característico, ya que sugiere un proceso de activación alostérica.

-El complejo Zn-PPi es un buen sustrato para la actividad hidrolítica en la enzima solubilizada en detergente al igual que en los cromatóforos, mientras que el complejo Ca-PPi no es sustrato para la hidrólisis ni en la enzima solubilizada en detergente ni en los cromatóforos.

-Con base en los perfiles de actividad para el PPI y para el Mg^{2+} se aprecia que el PPI es un inhibidor más potente que el Mg^{2+} , por lo que se sugiere el siguiente orden en las constantes

de asociación con respecto al sitio activo de la enzima :PPI >
Mg²⁺.

-El efecto del CaPPI, sobre la actividad hidrolítica con MgPPI sugiere una inhibición competitiva compleja, debida a la presencia del Ca²⁺ libre y del Mg²⁺ libre en el medio de reacción.

-La inhibición producida por el Zn²⁺ libre es compleja debido a la participación del Mg²⁺ libre en el medio de reacción.

Una aproximación para conocer los mecanismos moleculares que regulan la actividad de la PPIasa de membrana sugiere proceder de la siguiente manera:

-Purificar a la enzima en un columna de intercambio iónico o bien con anticuerpos (anti-PPIasa de membrana) acoplados a una columna de afinidad.

-Una vez lograda la purificación de la enzima, se pueden medir las constantes de afinidad por su sustrato o por sus ligandos PPI o por el Mg²⁺ libre, bajo diferentes condiciones.

-Asimismo se puede continuar la caracterización con inhibidores análogos al sustrato, con el fin de conocer el mecanismo de reacción de la enzima.

Independientemente de la purificación se investigará:

-La posibilidad de la reversibilidad del proceso de activación, debida al incremento al Mg²⁺ libre.

-Conocer si las propiedades debidas a los fosfolipidos de la membrana, como pueda ser la carga de superficie de la membrana, es capaz de modificar la actividad de la PPIasa de membrana por interacción de cargas entre la membrana y los iones y complejos que intervienen en la reacción.

-Se elaborarán modelos cinéticos de la actividad hidrolítica, para ser simulados y comparados con los datos experimentales, con el fin de discernir qué factores regulan la actividad de la enzima.

BIBLIOGRAFIA

- Ames, N.B. 196. Assay of Inorganic Phosphate, Total Phosphate and Phosphatases. en: Methods in Enzymology. (ed. Purich). vol VII:115-118. Academic Press. New-York London.
- Barry, B. S. y Dunaway-Mariano, D., 1987. The Kinetics of Yeast Inorganic Pyrophosphatase. Arch. Biochem. Biophys. 259: 196-203.
- Baltscheffsky, H., von Stedingk, L.V., Heldt, M.W. y Klingenberg, M., 1966. Inorganic pyrophosphate: Formation in bacterial photophosphorylation. Science, 153:1120-1121.
- Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H., y von Stedingk, L.V., 1966. Light-induced energy conversion and the inorganic pyrophosphatase reaction in chromatophores from Rhodospirillum rubrum, Brookhaven Symp. Biol. 19: 246-257.
- Baltscheffsky, M., 1967. Inorganic Pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from Rs. rubrum. Nature (London). 216:241-243.
- Baltscheffsky, M., (1967). Inorganic Pyrophosphate as an Energy in photosynthetic and Respiratory electron transport phosphorylation system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28
- Baltscheffsky, M., 1968. Inorganic Pyrophosphatase as energy donor in photosynthetic and respiratory structures, en: Regulatory Functions of Biological Membranes (J. Jarnefelt, ed.) B.B. Libr. 11:277-286.

- Baltscheffsky, M., 1969a, Energy conversion-linked changes of carotenoid absorbance in *Rh. rubrum* chromatophores, Arch. Biochem. Biophys. 130:646-652.
- Baltscheffsky, M., 1969b, Reversed energy conversion reaction of bacterial photophosphorylation. Arch. Biochem. Biophys. 130:46-53.
- Baltscheffsky, M., 1986, The synthesis and utilization of inorganic Pyrophosphate en: Bionergetics (ed. Ernster, L.). Elsevier Science Publishers.
- Baltscheffsky, M. y Nyren, P. 1986. Preparations and Reconstitution of proton-pumping Membrane-Bound Inorganic Pyrophosphatase. en: Methods in Enzymology (Ed. Purich, D.L.) Vol 126. pp: 538-545 Academic Press, New-york London.
- Black, C.C. (1987). PPi Metabolism and its regulation by fructose 2-6 biphosphate in plants. En Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in microorganisms. (ed. Torriani-Gorni). American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E. y Slater, E.C., 1977, Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. Ann. Rev. Biochem. 46: 955-1026.
- Butler, L.G., 1971, en: The Enzymes (Ed. Boyer, P.D.) 3a. Ed. Vol. 4, pp. 529-541, Academic Press, New York.
- Carnal, N. W. y Black, C.C. 1979. Pyrophosphate dependent 6-phosphofruktokinase, and new glycolytic enzyme in pineapple leaves. Biochem. Biophys. Res. Commun. 86: 20-26.
- Celis, H., Romero, A., y Gómez-Poyou, A. 1985. The Phosphate-Pyrophosphate exchange and hydrolytic Reactions of

- the Membrane-Bound Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: Effects of Mg^{2+} , phosphate and pyrophosphate. *Arch. Biochim. Biophys.* 236: 766-774.
- Celis, H., y Romero, A., 1987. The phosphate-pyrophosphate Exchange and Hydrolytic reactions of Membrane-bound Pyrophosphatase of *R. rubrum*: Effects of pH and Divalent Cations. *J. Bioenerg. Biomem.* 19: 225-271.
- Clayton, R.K. y Sistrom W.R., 1978. *The Photosynthetic Bacteria*. New York y London, Plenum Press.
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.B., Stainer, R.Y., 1957. The kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.* 49:
- Cooperman, B.S., Panakal, A., Springs, E., Hann, D.J. 1981. Divalent Metal Binding and Inorganic Phosphate Analogue Binding to Yeast Inorganic Pyrophosphatase. : 6051-6060.
- Cooperman, B.S., 1982. The Mechanism of action of Yeast Inorganic Pyrophosphatase. en: *Methods in Enzymology* (Ed. Purich, D.L.) Vol. 87, Parte C, pp. 526-548, Academic Press. New York y London.
- Crofts, A.R., 1974. The electron transport system as a pump in the photosynthetic Bacteria. en: *Perspectives in Membrane Biology*, (Editores: S. Estrada y C. Gitler), pp. 373-412. Academic Press. New York, San Francisco y London.
- Dawes, A.E. 1986. *Microbial Energetics*. Blackie & Sons. Glasgow.
- Ersenbach, M. y Caplan, S.r. 1979. The light driven proton pump of *Halobacterium halobium*: mechanism and function. *Current Topic in Membranes and Transport*, 12: 165-248.
- Fisher, R.R. y Guillory, R.J. 1969. Partial resolution of energy-

- linked reactions in Rs. rubrum chromatophores. FEBS Lett. 3: 27-35.
- Flodgaard, H. y Fleron, P. 1974. Thermodynamic parameters for the hydrolysis of inorganic pyrophosphate pH 7.4 as a function (Mg^{2+}), (K^+) an ionic strength determined from equilibrium studies of the reaction. Biol. Chem. 11: 3465-3474.
- Gottschalk. 1986. Bacterial Metabolism. New York and Berlin. Springer Verlag.
- Guyon, R.W., Veloso, D., Randolph, L. y Veech, R. 1973. The concentration and control of cytoplasmic free inorganic pyrophosphate in rat liver in vivo. biochem. J. 140: 369-375
- Harold, F.M., 1972. Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. Bacteriological Rev. 36: 172-230.
- Harvey, G.W. y Keister, D.L. 1981. Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria: P_i - H_2O Oxygen Exchange catalyzed by Membrane-bound inorganic Pyrophosphatase of Rs. rubrum. Arch. Biochem. Biophys. 202: 426-430.
- Horie, T., Yamashita, J., Nishikawa, K., Kakuno, T., Hosoi, K., Suzuki, J. y Yoshimura, S. 1973. Systems for hydrolysis of ATP and pyrophosphate in chromatophores from Rs. rubrum. en: Organization of energy-transducing membranes (Nakao, M. y Packer, L.) University of Tokyo Press, Japan, pp. 239-249.
- Horn, A., Borning, H., y Thiele, G. 1967 Allosteric Properties of the Mg^{2+} Dependent Inorganic Pyrophosphatase in mouse liver cytoplasm. Eur. J. Biochem 2: 243-249.
- Isaev, P.I., Liberman, E.A., Samuilov, V.D., Skulachev, V.P. y Tsofina, L.M. 1970. Conversion of Biomembrane-produced

energy into Electric Form. Biochim. Biophys. Acta 216:
22-29.

Johansson, B.C.. 1975. Partial resolution of the energy transfer system in chromatophores from Rs. rubrum, purification and characterization of the "coupling factor" ATPase. Ph.D. Thesis, University of Stockholm.

Josse, J.. 1971. in: The Enzymes, (Ed. Boyer, P.D.) 3era. Ed., vol. 4, pp. 499-527. Academic Press, New York.

Keister, D.L. y Yike, N.J. 1966. Studies on an energy linked pyridine nucleotide transhydrogenase in photosynthetic bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 24: 519-525.

Keister, D.L. y Yike, N.J. 1967. Energy-Linked reactions in photosynthetic bacteria. I Succinate-linked ATP-driven NAD⁺ reduction by Rs. rubrum chromatophores. Arch. Biochem. Biophys. 121: 415-422.

Keister, D.L. y Yike, N.J. 1967. Energy-Linked reactions in photosynthetic bacteria. II The energy-dependent reduction of oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in chromatophores of Rs. rubrum, Biochemistry 6: 3847-3857.

Keister, D.L. y Minton, N.L. 1971. ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in Rs. rubrum chromatophores. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42: 932-939.

Keister, D.L. y Minton, N.L. 1971. Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. VI Inorganic pyrophosphate-driven ATP synthesis in Rs. rubrum. Arch. Biochem. Biophys. 147:330-336.

- Klemme, B., Klemme, J.H. y San Pietro, A. 1971a. F₁F₀ ATPase and Photophosphorylation in Chromatophores of Rs. rubrum: Inactivation by phospholipase A. Reconstitution by phospholipids. Arch. Biochem. Biophys. 144: 339-342.
- Klemme, J.H. y Gest, H. 1971. Regulation of the Cytoplasmic Inorganic Pyrophosphatase of Rs. rubrum. Eur. J. Biochem., 22: 529-537.
- Klemme, J.H., Klemme, B. y Gest, H. 1971. Catalytic Properties and regulatory diversity of inorganic Pyrophosphatases from Photosynthetic Bacteria, J. Bacteriol. 108: 1122-1128.
- Klemme, J.H. y Gest, H. 1971. Regulatory properties of an Inorganic Pyrophosphatase from the Photosynthetic bacterium Rs. rubrum, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 721-725.
- Knaff, D.B. y Carr, J.W. 1979. Arch. Biochem. Biophys. 193: 379-384.
- Knight, W.B., Dunaway-Mariano, D., ranson, S.C. y Villafranca, J.J. 1984. Investigations of the metal ion-binding sites of yeast inorganic pyrophosphatase. J. Biol. Chem. 259: 2886-
- Kondrashin, A.A., Renennikon, G.U., Samuslov, D.V. y Skulachev, P.V. 1980. Reconstitution of Biological Molecular Generators of Electric Current. Inorganic pyrophosphatase. Eur. J. Biochem. 113: 219-222.
- Lahti, R. 1983. Microbial Inorganic Pyrophosphatases, Microbiol. Rev. 47: 169-179.
- Lawson, J.W.R., Guynn, R.W., Cronell, N. y Veech, R.L. 1978 en: Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species., (Ed. Hanson, R.W. y M.A. Mehلمان), pp. 481, Wiley, New York.
- Laskin, A. I. y Lechevalier. 1980. Handbook of Microbiology. vol.

I CRC Press.

- Liu, C., Hart, N., Peck, D.H. 1982. Inorganic pyrophosphate: Energy source for sulfate reducing bacteria of the genus Desulfotomaculum. Science 217: 363-364.
- London, W.P. y Steck, T.L. 1969. Kinetics of Enzyme reactions with interaction between substrate an a(metal) modifier. Biochemistry 8: 1707-1779.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randal, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Mansurova, S.E., Shakhov, Yu. A. y Kulaev, I.S. 1975b. Synthesis of inorganic pyrophosphate by animal tissue mitochondria. FEBS Lett. 55: 94-98.
- Merrick, J.M. 1978. Metabolism of reserve materials an: Photosynthetic Bacteria (ed. Clayton, K.R. y Sistrom, R.W.) New York-London Plenum Press.
- Martell, A. y Sillen, L.G. 1971. Stability Constants of Metal-Ion Complexes: Supplement No. 1. Special Publication No. 25. The Chemical Society, London.
- Mitchell, P. 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Revs. 41: 445-502.
- Mitchell, P. 1967. Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: Natural Fuel cells and solar cells. Fed. Proc. 26: 1370-1379.
- Mitchell, P. 1982. Compartementation and communicatio in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems. Eur. J. Biochem. 166:255-272.

- Morrison, F.J. 1973. Approaches to kinetics studies on metal activated enzymes. (Ed. Purich), vol 63: 257-294. Elseviers Publishers Amsterdam.
- Moyle, J., Mitchell, R., y Mitchell, P. 1972. Proton-translocating pyrophosphatase of Rs. rubrum FEBS Lett. 22: 233-236.
- Nicholls, D.g. 1982. Bioenergetics: An introduction chemiosmotic theory. London and New York. Academic Press.
- Nishikawa, K., Hosi, K., Suzuki, J., Yoshimura, S. y Horio, T. 1973. Formation and Decomposition of Pyrophosphate Related to Bacterial Photophosphorylation. J. Biochem. 73: 537-553.
- Nore, B.F., Husain, I., Nyren, P. y Baltscheffsky, M. 1986. Synthesis of pyrophosphate coupled to the reverse energy linked transhydrogenase reactions. in: R. rubrum chromatophores. FEBS Lett. 200: 133-139.
- Nyren, P. y Baltscheffsky, M. 1983. Inorganic pyrophosphate-driven ATP-synthesis in liposomes containing membrane-bound inorganic pyrophosphatase and F_0-F_1 complex from Rs. rubrum, FEBS Lett. 155: 125-130.
- Nyren, P., Hajnal, K., y Baltscheffsky, M. 1984. Purification of the membrane-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase from Rs. rubrum Biochim. Biophys. Acta. 766: 630-635.
- Nyren, P., Nore, F.B. y Baltscheffsky, M. 1986. Inorganic pyrophosphate synthesis after a short light flash in chromatophores from rodospirillum rubrum. Photobiology and Photobiophysics 11: 185-196.

- Parsons, W.B. 1978. Quinones as secondary electron acceptor in: Photosynthetic Bacteria. (ed Clayton, K.R. y Sistrom, R.W.) New York-London, Plenum Press.
- Prebble, J.N. 1981. Mitochondria, Chloroplasts and Bacterial Membranes. London. Longman.
- Pfennig, N., y Truper, H.G. 1971. Higher taxa of the phototrophic bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 21: 17.
- Pfennig, N., y Truper, H.G. 1974. The phototrophic bacteria, en: Begey's Manual of Determinative Bacteriology, 6th Ed. (Editores: R.E. Buchanan y N.E. Gibbons), pp. 24-64. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Randahl, H. 1979. Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in Rs. rubrum. Eur. J. Biochem. 102: 251-256.
- Rao, P.V., y Kaister, D.L. 1978. Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. X Solubilization of the Membrane-bound energy-linked inorganic pyrophosphatase of Rs. rubrum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84: 465-473.
- Rapoport, T.A., Höhne, W.E., Heitman, P.R., Rapoport, S.M. 1972. A kinetic model for the action of the inorganic pyrophosphatase from baker's yeast. The activity influence of magnesium ions. Eur J. Biochem. 26: 237-246.
- Reeves, E.R., South, J.S., Blytt, J.H., Warren, G.C. 1974. Pyrophosphate: D-fructuosa 6-phosphate 1-phosphotransferasa. J. Biol. chem. 249: 7737-7741.
- Reeves, E.R. 1976. How useful is the energy in inorganic pyrophosphate? Trends in Biochemical Sciences 1: 53-55.

- Ricard, J. y Connish-Bowden, A. 1987. Co-operative and allosteric enzymes: 20 years on. *Eur. J. Biochem.* 95:1-26.
- Ridlington, W.J. y Butler, G.L. 1972. Yeast inorganic pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* 247: 7303-7307.
- Romero, I., Quinto, J., Celis, H. 1986. Pyrophosphatase of respiratory membrane from R. rubrum en: *Progress in photosynthesis. Research* (Ed. Briggs J. Vol. III. 2: 225-228.
- Romero, A.I. 1987. Tesis por obtener al grado de Maestría en Ciencias. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Rogers, A.J. 1983. Bacterial cell structure. Workingham: Van Nostrand. Reinhold (U.K.)
- Segel, I. 1975. Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and study state enzyme kinetics. New York. John Willey & Sons.
- Schiff, J.A. 1972. A green safelight for the study of Chloroplast Development and other Photomorphogenetic Phenomena, en: Methods in Enzymology (Ed. San Pietro, A.) Vol. 24, Parte B, pp. 321-322. Academic Press. New York, London.
- Scholes, P., Mitchell, P. y Moyle, J. 1969. The polarity of proton translocation in some Photosynthetic microorganisms. *Eur. J. Biochem.* 8: 450-454.
- Schwarm, H.S., y Col. 1986. Kinetics characterization and partial purification of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase form Rhodospseudomonas palustris. *J. Biol. Chem.* 367: 127-133.
- Shakhov, Y.A., Nyren, P. y Baltscheffsky, M. 1982. Reconstitution of highly purified proton-translocating pyrophosphatase from Rs. rubrum. *FEBS Lett.* 146: 177-180.

- Slater, E.C. 1971. The coupling between energy-yielding and energy-utilizing reactions in mitochondria. *Q. Rev. Biophys.* 4: 35-71.
- Strid, A., Karlsson, M.J. y Baltscheffsky, M. 1987. Demonstration of ΔpH and $\Delta\psi$ induced synthesis of inorganic pyrophosphate in chromatophores from *R. rubrum*. *FEBS Lett.* 224: 348-352.
- Summer, J.B. 1944. A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* 100: 413-415.
- Trupper, H.G. 1971. Higher taxa of the phototrophic bacteria. *Int. Syst. Bacteriol.* 21: 217-220.
- Truper, H.G. 1976. Higher taxa of the phototrophic bacteria: Chloroflexaceae fam. nov., a family for the gliding, filamentous, phototrophic "green" bacteria. *Int. J. System. Bacteriol.* 26: 74.
- van Niel, C.B. 1935. Photosynthesis of Bacteria, Harbor Symp. *Quant. Biol.* 3: 138-150.
- Volk, S.E., Baykou, A., Duzhenico, S., Ayaeva, M. 1982. Kinetic studies on the interaction of two forms of inorganic pyrophosphatase of heart mitochondria with physiological ligands. *Eur. J. Biochem.* 125: 215-220.
- Volk, S.E. y Baykou, A. 1984. Isolation and subunit composition of membrane inorganic pyrophosphatase from rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 791: 198-204.
- Wood, H.g. 1977. Some reactions in which inorganic pyrophosphate replaces ATP and serves as a source of energy. *Fed. Proc.* 36: 2197-2205.

Youngs, H.M., Weber, G., y Poyer, I.S. 1983. Activity and conformational changes in Chloroplast coupling factor induced by Ion Binding: Formation of a Magnesium-Enzyme-Phosphate Complex. Biochemistry 22: 3505-3511.