

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LAS REACCIONES DE INTERCAMBIO P_i - PP_i E HIDROLITICA
DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA DE Rhodospirillum rubrum

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

(BIOQUIMICA)

PRESENTA

IRMA ROMERO ALVAREZ

MEXICO, D.F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., Departamento de Bioenergética bajo la dirección del Dr. Heliodoro Celis Sandoval.



Dr. Heliodoro Celis Sandoval

Director de Tesis



Asistente: Irma Romero Alvarez

Asistente.

El Jurado designado por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la U.N.A.M., que aprobó la presente tesis es el siguiente:

Presidente:	Dr. Armando Gómez-Puyou
1er. Vocal:	Dr. Heliodoro Celis Sandoval
Secretario	Dra. Rosario Muñoz Clares
Suplente:	Dra. Marina Gavilanes
Suplente:	Dr. Alfonso Cáramez Trejo

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por
la Beca con el Registro 31617.

INDICE

ABREVIATURAS	5
CAPITULO 1: GENERALIDADES	
1.1. BACTERIAS FOTOSINTETICAS.....	7
1.1.1. Taxonomía de Bacterias Fotosintéticas.....	8
1.1.2. Descripción de <u>Rhodospirillum rubrum</u>	9
1.1.3. Diferentes Preparaciones de Membrana.....	10
1.2. HIPOTESIS DE TRANSDUCCION DE ENERGIA.....	14
1.2.1. Hipótesis Química.....	15
1.2.2. Hipótesis Quimiosmótica.....	16
1.2.3. Hipótesis Conformacional.....	17
1.3. EL PAPEL BIOLOGICO DEL PIROFOSFATO.....	18
1.4. LOCALIZACION CELULAR DE LAS PIROFOSFATASAS.....	19
1.4.1. La Pirofosfatasa de Membrana de <u>Rhodospirillum rubrum</u>	20
1.4.2. Reacciones Parciales de la Pirofosfatasa Membranal..	22
1.4.3. Requerimientos de Cationes de la Pirofosfatasa Membranal.....	28
1.4.4. Solubilización y Purificación de la Pirofosfatasa Membranal.....	31
1.4.5. Papel de la Pirofosfatasa en la Evolución del Mecanismo de Acoplamiento y Fosforilación.....	34
1.5. OBJETIVO.....	36
CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS	
2.1. CRECIMIENTO DE BACTERIAS.....	38
2.1.1 Medios de Cultivo.....	38

2.1.2.	Siembra de Bacterias.....	40
2.2.	COSECHA DE BACTERIAS.....	42
2.3.	OBTENCION DE CROMATOFOROS.....	42
2.4.	ESTIMACION DEL CONTENIDO DE BCl EN CROMATOFOROS.....	43
2.5.	DETERMINACION DE PROTEINA.....	44
2.6.	METODO PARA DETERMINAR LA HIDROLISIS DE PIROFOSFATO O ACTIVIDAD PIROFOSFATASA EN CROMATOFOROS.....	44
2.7.	METODO PARA MEDIR LA REACCION DE INTERCAMBIO Pi-PPi EN CROMATOFOROS.....	45
2.8.	CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE COMPLEJOS Y ESPECIES LIBRES EN LAS REACCIONES.....	46
2.9.	DETERMINACION DEL CORRIMIENTO DE CAROTENO.....	47
2.10.	MEDIDA DE LA PRECIPITACION DE COMPLEJOS.....	47
2.11.	MEDIDA DE LA CONDUCTIVIDAD.....	47

CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.	CURVA DE TIEMPO DE LA REACCION DE HIDROLISIS DE PPi Y DE LA REACCION DE INTERCAMBIO Pi-PPi A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CROMATOFOROS.....	49
3.2.	EFECTO DEL Mg ²⁺ SOBRE LA HIDROLISIS DE PPi Y EL INTERCAMBIO Pi-PPi.....	52
3.3.	EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PIROFOSFATO EN LAS REACCIONES DE HIDROLISIS E INTERCAMBIO Pi-PPi DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA.....	59
3.4.	EFECTO DEL pH SOBRE LAS REACCIONES DE INTERCAMBIO Pi-PPi E HIDROLITICA DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA.....	65
3.5.	EFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES EN LA REACCION	

	DE INTERCAMBIO Pi-PPi.....	72
3.6.	EFFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES EN LA REACCION DE HIDROLISIS DE LA PIROFOSFATASA.....	76
3.7.	SUMARIO DE LOS EFECTOS DE LOS CATIONES DIVALENTES SOBRE LAS REACCIONES DE HIDROLISIS E INTERCAMBIO Pi-PPi.....	89
	CAPITULO 4: CONCLUSIONES.....	92
	BIBLIOGRAFIA.....	94

ABREVIATURAS

ANS	8-anilino naftalen-1-ácido sulfónico
ADP	difosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
BC1	bacterioclorofila
BSA	albúmina de suero de bovino
CCCP	p-triclorometoxi carbonil-cianuro-fenilhidrazona
cpm	cuentas por minuto
DCCD	diciclohexil carbodimida
2,6 DCPI	2,6 diclorofenol indofenol
2,4-DNP	2,4 dinitrofenol
DEAE	dietil amino etil
DTT	ditiotreitol (Reactivo de Cleland)
EDTA	ácido etilen diamino tetra acético
H ⁺	protón
H ³	tritio
H ⁺ ATPasa	ATP sintetasa de protones
IDP	imidodifosfato
FCCP	p-trifluorometoxi carbonil-cianuro-fenilhidrazona
MDP	metilen difosfonato
MOPS	ácido morfolino propano sulfónico
um	micrómetro
nm	nanómetro
NBF-Cl	4 cloruro 3 nitrobenzo-trifloruro
Pi	fosfato
Pi ³²	fosfato radioactivo, isótopo 32

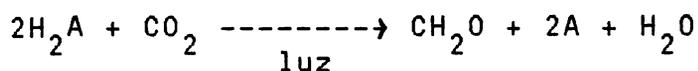
PM	peso molecular
pmf	fuerza protomotriz
PPi	pirofosfato
PPiase	Pirofosfatasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
TCA	ácido tricloroacético
Tris	Tris hidroximetil amino metano
UQ ₁₀	ubiquinona 10

CAPITULO 1
GENERALIDADES

1.1. BACTERIAS FOTOSINTETICAS

Dentro de los organismos que son capaces de efectuar fotosíntesis, es decir, reducir CO₂ a carbohidratos en presencia de luz, encontramos -además de las plantas superiores, algas y cianobacterias- una clase de bacterias llamadas verdes y púrpuras (Baccarini-Melandri y Melandri, 1978). Estas bacterias se distinguen de los demás organismos fototróficos en que oxidan donadores de electrones de potencial redox menor que el del H₂O; por ejemplo, compuestos inorgánicos de azufre, H₂ o compuestos orgánicos simples. Los correspondientes productos de oxidación son sulfatos, H⁺, y compuestos orgánicos. Además, su fotosíntesis la llevan a cabo con un solo fotosistema a diferencia de los dos fotosistemas que utilizan los demás organismos fotosintéticos.

El concepto moderno de fotosíntesis surge a partir de los estudios realizados por Van Niel sobre bacterias fotosintéticas quien, en 1935, formuló la siguiente ecuación generalizada para la fotosíntesis.



siendo A = donador de electrones.

En dicho concepto, se considera a la fotosíntesis como una reacción de óxido reducción promovida por luz; así como también, que el O₂, producto de la misma, proviene de la fotólisis del H₂O.

1.1.1. Taxonomía de Bacterias Fotosintéticas

Las bacterias fotosintéticas corresponden al orden Rhodospirillales. Este orden está integrado por organismos que contienen bacterioclorofilas y llevan a cabo fotosíntesis sin producción de O_2 (Clasificación según Pfennig y Truper, 1971 y 1974; Truper, 1976).

Las Rhodospirillales se dividen en dos subórdenes: 1o. Suborden Chlorobiineae. A sus miembros se les conoce comunmente como bacterias verdes. Sus pigmentos son bacterioclorofilas c, d, o e y están colocados en vesículas especiales llamadas de "clorobium", unidas a la membrana. Tienen carotenos monocíclicos.

Este suborden se divide en dos familias: Chlorobiaceae y Chloroflexaceae.

2o. Suborden Rhodospirillineae. A los integrantes se les conoce como bacterias púrpuras. Tienen como pigmentos bacterioclorofilas a o b colocados en sistemas membranales intracitoplásmicos que son continuación de la membrana plasmática. Tienen carotenos acíclicos. Se subdivide en dos familias: Rhodospirillaceae (bacterias no sulfurosas) y Chromatiaceae (bacterias sulfurosas).

Las bacterias que se utilizaron para realizar este trabajo pertenecen a:

Orden	Rhodospirillales
Suborden	Rhodospirillineae
Familia	Rhodospirillaceae
Género	Rhodospirillum

Especie rubrum

por lo que haremos hincapié en esta familia y especie.

La familia Rhodospirillaceae (antes Athiorhodaceae) se distingue de la Chromatiaceae (antes Thiorhodaceae) con base en la fuente reductora que utilizan.

Las bacterias de la familia Chromatiaceae oxidan H_2S , S , $S_2O_3^{2-}$ además de H_2 y sustratos orgánicos, de aquí su nombre de sulfurosas. A diferencia de éstas, las bacterias no sulfurosas de la familia Rhodospirillaceae oxidan compuestos orgánicos como succinato, glutamato y H_2 en algunas especies; esta característica puede relacionarse con su carencia de enzima adenil sulfato reductasa.

Las bacterias púrpuras no sulfurosas son, en su mayoría, aeróbicas facultativas, y sus habitats naturales son aguas dulces en medios orgánicos simples y a temperaturas no extremas (15° a $35^{\circ}C$). Nunca forman desarrollos masivos.

1.1.2 Descripción de Rhodospirillum rubrum.

A) Estructura: La forma de la célula es espiral, mide de 0.8 μm de ancho por 7 a 10 μm de largo. Presentan flagelos polares. Como todas las demás bacterias verdaderas (Crofts, 1974) presentan una pared celular separada por el espacio periplásmico de la membrana celular, la cual envuelve al citoplasma y contiene el sistema de transporte de electrones. La membrana plasmática presenta invaginaciones que se denominan cromatóforos, este es el sistema intracitoplásmico de membrana que se toma como un criterio de clasificación entre especies. En

el espacio periplásmico hay proteínas que participan en la cadena de transporte de electrones, por ejemplo citocromo C₂.

B) Crecimiento: Las bacterias Rs. rubrum son aeróbicas facultativas. El crecimiento anaeróbico ocurre en la luz mediante fotosíntesis y el aeróbico en la oscuridad con obtención de la energía de la oxidación de compuestos. Bajo estas últimas condiciones, el desarrollo de los cromatóforos es mínimo.

El color del cultivo anaeróbico es rojo y requiere como factor de crecimiento a la biotina.

C) Otras características: Estas bacterias son gram negativas. Las quinonas que contienen son ubiquinona₁₀ y rhodoquinona. El caroteno, predominante, es espiriloxantina. El espectro total de las células es único en dos aspectos:

1) tiene una banda de absorción prominente a los 550 nm debido a la espiriloxantina; y 2), presenta una banda de absorción sencilla y simétrica de bacterioclorofila a los 885 nm.

Se reproducen por fisión binaria.

1.1.3. Diferentes Preparaciones de Membrana.

La pared celular de las bacterias fotosintéticas es relativamente impermeable a numerosos reactivos, lo cual limita la utilidad experimental de las células completas. Por tanto, se han desarrollado dos tipos de preparaciones de membrana que eliminan la pared.

A) Preparación de esferoplastos o protoplastos. La pared puede ser digerida por tratamientos con lisozima (Karunairatnam y col., 1958) quedando intacta la membrana. Mediante este

tratamiento los constituyentes citoplásmicos son retenidos en el interior y se elimina el citocromo C_2 .

B) Preparación de cromatóforos. Los cromatóforos son vesículas membranales selladas que contienen en el interior el Citocromo C_2 . Esta preparación se obtiene mediante ruptura mecánica de las bacterias [Schachmann y col., 1952; Newton y Newton, 1957]. Su tamaño aproximado es de 100 nm. En la Fig. 1, se puede observar el diagrama de estas preparaciones, donde se ve que la polaridad de la membrana del cromatóforo es inversa a la de los esferoplastos o bacterias íntegras; Mitchell, 1967, y Scholes y col. 1969, lo han demostrado basándose en estudios sobre los movimientos de protones en condiciones de iluminación; y Crofts, 1974 lo ha comprobado por medio de anticuerpos contra centros de reacción y citocromo C_2 .

Mediante la utilización adecuada de estas preparaciones de membrana, se ha podido obtener mucha información que ha ayudado al mejor conocimiento de la bacteria.

La preparación de cromatóforos es de especial interés ya que contiene el aparato fotofosforilante y, por tanto, a la enzima encargada de la Síntesis del ATP (Fig. 2) de una manera semejante a la contenida en la membrana del tilacoide del cloroplasto [Hinkle y McCarty, 1978].

En este trabajo se utilizaron cromatóforos debido a que presentan algunas características importantes:

A) llevan a cabo reacciones de fotofosforilación [Frenkel, 1954] en presencia de ADP, P_i y luz. Así como la reacción reversa que

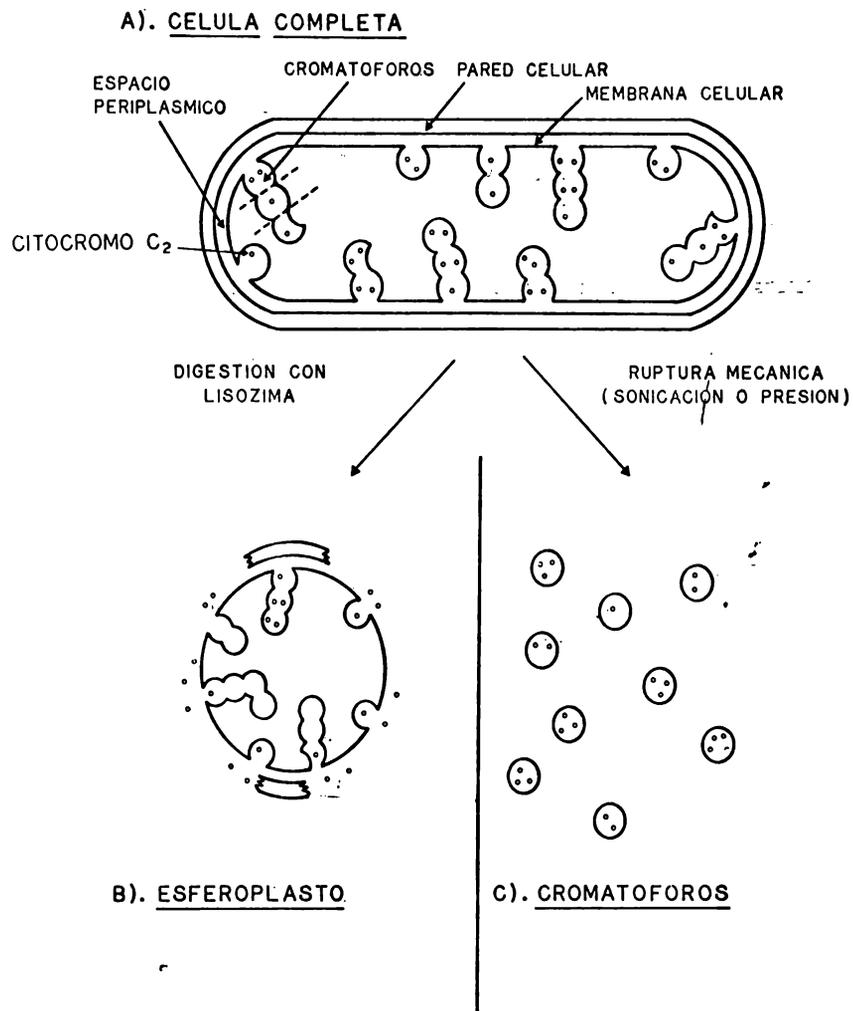
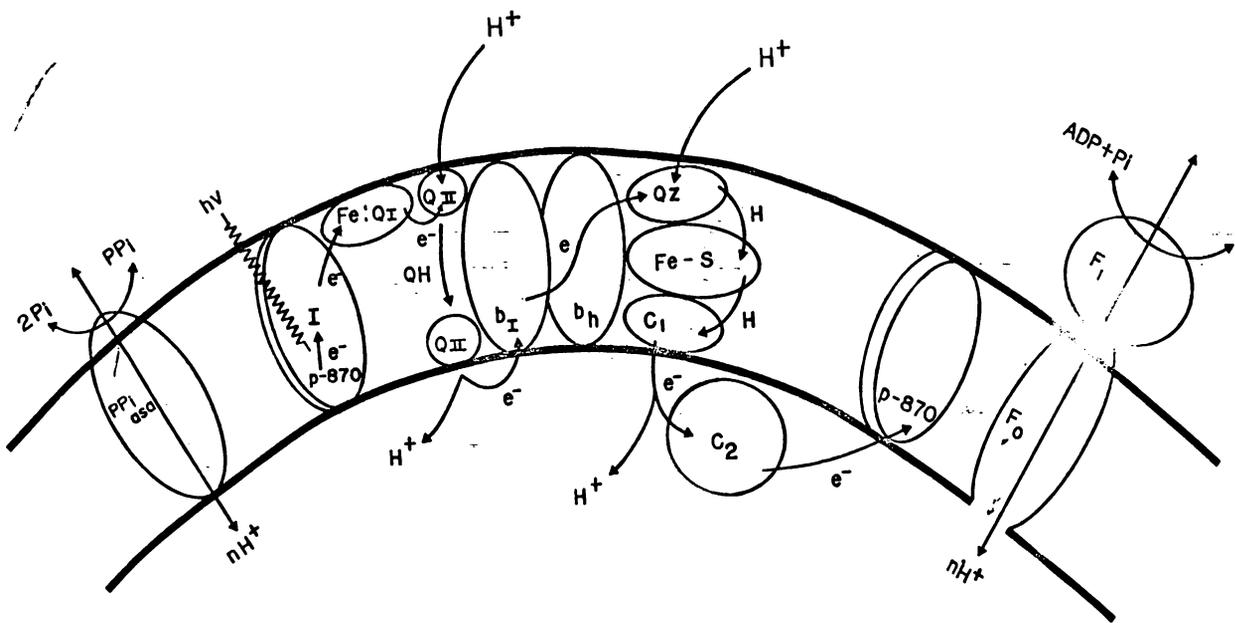


Fig. 1. Esquema General de Bacterias Fotosintéticas que muestra la obtención de Cromatóforos y Esferoplastos a partir de la célula entera. Tomado de Crofts, A.R., 1974.



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

biología:

- | | |
|--|--|
| <p>P870: Centro de Reacción Fotoquímico Intermediario (probablemente Bacterio feotitina)</p> <p>PPI: Aceptor primario, hierro ubiquinona</p> <p>Q: quinona secundaria</p> <p>b: citocromos b</p> | <p>Qz: ubiquinona terciaria</p> <p>Fe-S: Complejo hierro-azufre de Rieske</p> <p>C₁: Citocromo C₁</p> <p>F₁: Parte hidrofílica de la ATPasa (subunidades catalíticas, ...)</p> <p>F₀: Parte hidrofóbica de la ATPasa (canal de H⁺)</p> <p>PPIasa: Pirofosfatasa</p> |
|--|--|

B) Son inducibles por la luz, ya que se ha observado que los cromatóforos no se encuentran en cultivos crecidos en oscuridad.

C) Al igual que los esferoplastos, los cromatóforos transportan H^+ . Los primeros acidifican al medio, mientras que los segundos lo alcalinizan (Scholes y col, 1969). Esto es debido a la diferencia de polaridad.

D) Poseen pirofosfatasa de membrana acoplada a la transducción de energía (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966).

1.2. HIPOTESIS DE TRANSDUCCION DE ENERGIA.

En la actualidad se ha profundizado bastante en el conocimiento del conjunto de reacciones que conducen a la síntesis de ATP en la célula.

En todos los sistemas estudiados hasta la fecha se requiere que se extraigan electrones de algún donador, ya sea el H_2O , moléculas orgánicas, H_2 , compuestos sulfurosos reducidos, etc., los cuales son llevados, a través de una serie de moléculas transportadoras, a un aceptor, formando los productos reducidos correspondientes.

De todas formas, la transferencia de electrones proporciona la suficiente energía para la formación de ATP. Las etapas del metabolismo que comienzan con la transferencia de electrones y finalizan con la síntesis de ATP, en bacterias y mitocondrias, se denominan fosforilación oxidativa; cuando este proceso es fotoinducido y la energía requerida para la Síntesis de ATP proviene de la energía radiante que se transforma en energía redox, se denomina fotofosforilación y se presenta en bacterias fotosintéticas y cloroplastos.

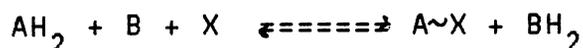
La mayor parte de estas reacciones de óxido reducción han sido desentrañadas; pero, a pesar de las muchas investigaciones que se han hecho, carecemos de un conocimiento molecular detallado del mecanismo por el cual la energía de la óxido reducción del transporte de electrones se convierte en la energía del enlace fosfato del ATP.

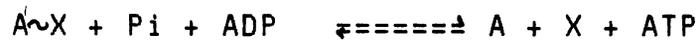
Son tres las principales hipótesis que se han propuesto para explicar el acoplamiento entre la transferencia de electrones y la síntesis de ATP llevada a cabo por la enzima H⁺ATP sintetasa, en mitocondrias; las cuales se han extendido, posteriormente, para explicar la fotofosforilación en cloroplastos y en cromatóforos de bacterias fotosintéticas.

1.2.1. Hipótesis Química.

Históricamente esta hipótesis fue la primera. La formulación inicial fue hecha por Slater. Propone un acoplamiento entre las reacciones de óxido reducción y la síntesis de ATP a través de un intermediario químico común, que debía ser un compuesto de alta energía (Slater, 1971).

Se postula que mediante la transferencia de electrones desde un transportador electrónico de la cadena respiratoria hasta el siguiente, se genera el intermediario químico de energía elevada, es decir, un compuesto con energía libre de hidrólisis fuertemente negativa, el cual aporta la energía necesaria para la formación de ATP a partir de ADP y Pi. Esto se esquematiza a continuación:





donde: A y B = transportadores redox

X = intermediario común.

En esencia, propone que el vehículo de la transferencia energética es un enlace covalente de alta energía del intermediario común. La hipótesis tiene dos serias limitaciones: a) No se ha aislado ningún complejo del tipo del intermediario químico de alta energía; y b) no toma en cuenta fenómenos de membrana, como cambios estructurales, potenciales eléctricos o flujos de iones; y el hecho de que la membrana deba permanecer intacta y continua para que haya fosforilación.

1.2.2. Hipótesis Quimiosmótica.

Tomando conceptos de fisiología de membrana, bioquímica tradicional y un concepto nuevo de reacciones vectoriales, que da lugar a transferencia de grupos químicos a través de la membrana, Mitchell desarrolló la Hipótesis Quimiosmótica (Mitchell, 1961 y 1967).

Mitchell sugiere que las reacciones redox suceden en una membrana cerrada que es poco permeable a H^+ u OH^- . El arreglo de las moléculas redox acarreadoras de electrones y H es alternante, de tal forma que a una molécula acarreadora de electrones le sigue una de H y así sucesivamente. El H^+ necesario para formar H con el electrón es tomado en un lado de la membrana y al encontrarse con un acarreador de electrones, es soltado del otro lado de la membrana. Produciéndose así un gradiente de H^+ formado por dos componentes: el químico (ΔpH) y el eléctrico ($\Delta \Psi$). La energía total del gradiente de H^+ es la

suma de ambos componentes y es la llamada fuerza protomotriz (pmf) que sigue la relación:

$$\text{pmf} = \Delta\psi + \frac{RT}{F} (\Delta\text{pH})$$

siendo: R = constante de los gases

T = temperatura absoluta

F = constante de Faraday.

La pmf es la fuerza para la síntesis de ATP, que viene a ser el intermediario.

Esta pmf forma el ATP por la acción de una enzima unida a la membrana denominada ATP sintetasa o ATP hidrolasa según la dirección de la reacción, cuya actividad es estrictamente vectorial, esto es, que en la síntesis de ATP los H⁺ van hacia el lado de la membrana en donde se encuentra la ATP sintetasa y en la hidrólisis al lado contrario.

Esta teoría contiene algunos detalles que han causado controversia. Sin embargo, la mayoría de sus postulados básicos han sido probados experimentalmente (Harold, 1972) por lo que la hemos tomado como hipótesis de trabajo.

1.2.3. Hipótesis Conformacional.

Ha sido postulada por varios investigadores, en particular por Boyer, 1965. Para ellos, la energía, producida en el transporte electrónico, se conserva en forma de un cambio conformacional provocado en una molécula transportadora de electrones o en la molécula de la ATP sintetasa. Este estado conformacional de elevada energía sería el resultado de un desplazamiento en el número y localización de los enlaces

débiles como enlaces de H, interacciones hidrofóbicas, etc., que mantienen la conformación tridimensional de la proteína. Así pues, la energía inherente a esta conformación energizada es la empleada para provocar la formación de ATP a partir de ADP y Pi.

Básicamente, esta hipótesis propone que un número de enlaces no covalentes débiles de una macromolécula actúan como intermediario o transportador de energía, por lo que se ha hablado de que constituye una variante de la hipótesis química. Hasta la fecha, sólo existen algunos resultados atractivos que permiten sostener esta hipótesis (Consultar Boyer y col, 1977, para una discusión más amplia acerca de estas hipótesis).

1.3. EL PAPEL BIOLÓGICO DEL PIROFOSFATO

El Pirofosfato (PPi) es producido en la célula en diversas reacciones anabólicas dependientes de ATP. Por mucho tiempo se ha pensado que el único papel del PPi así formado, es el ser hidrolizado por la Pirofosfatasa inorgánica (PPiase) para provocar una ladera termodinámica que favorece y asegura la dirección de muchas reacciones biosintéticas. Sin embargo, una cantidad creciente de evidencias sugiere que este punto de vista subestima seriamente el papel del PPi en el metabolismo de algunos organismos.

El PPi puede ser utilizado más ampliamente de lo que es esperado. Puede sustituir al ATP en ciertas reacciones y ser usado como fuente de energía.

Desde un punto de vista termodinámico, no hay razón para excluir al PPi como una posible fuente de energía. En ausencia

de cationes divalentes, como por ejemplo el Mg^{2+} , la energía libre de hidrólisis del PPI es casi la misma que la de la hidrólisis del enlace β o γ del ATP. Sin embargo, en presencia de Mg^{2+} , el ΔG° para el PPI se vuelve relativamente menos negativo que el del ATP, porque el Pi no se quela con el Mg^{2+} tan fuertemente como lo hace el ADP.

Lawson y col., 1976, calcularon estos valores con 1 mM de Mg^{2+} libre a pH 7 y $38^{\circ}C$; para la hidrólisis de ATP a ADP y Pi la energía libre es de -7.6 Kcal/mol y para la hidrólisis de PPI a Pi de -5.27 Kcal/mol. Estos valores sirven para enfatizar el papel del PPI como donador de energía.

1.4. LOCALIZACION CELULAR DE LAS PIROFOSFATASAS.

La pirofosfatasa inorgánica E.C.3.6.1.1. (PPiase) es una enzima que cataliza la hidrólisis y la síntesis de PPI, el compuesto más simple que contiene una unión fosfoanhidra.

Se cree que hay dos tipos de enzima, los cuales juegan un papel diferente en la célula. Uno de ellos está localizado en el citoplasma e hidroliza el PPI que es formado como producto de diversas reacciones. Las pirofosfatasas de esta clase se han aislado de una gran variedad de fuentes y se conoce bastante acerca de sus propiedades catalíticas y estructurales (Bulter, 1971 y Josse, 1971). Las PPiases del otro tipo están asociadas a membranas y no han sido investigadas en detalle. Pueden formar PPI a expensas de la energía liberada en la cadena de transporte de electrones e hidrolizar PPI para mantener un número de procesos dependientes de energía. Este tipo de enzima se ha encontrado en los cromatóforos de las bacterias fotosintéticas,

también ha sido demostrado que se forma PPi, como compuesto rico en energía acoplado al transporte de electrones en mitocondrias de organismos heterotróficos inferiores (en levadura, Mansurova, y col., 1975a) y superiores (en mitocondrias de hígado de res, Mansurova y col., 1975b). Rubtzov y col., 1976, también han observado esto en cloroplastos de algas y plantas superiores.

Es necesaria una investigación detallada de las PPiases de membrana para dilucidar las bases moleculares de las variaciones en el funcionamiento de la PPiase en la célula. Estos estudios pueden ayudar también a averiguar los principios que fundamentan la síntesis de otros polifosfatos de alta energía como el ATP, ya que tanto la estructura de la enzima como la de los sustratos y productos son más sencillos que la de la H⁺ATPasa.

1.4.1. La Pirofosfatasa de Membrana de Rhodospirillum rubrum.

La bacteria púrpura no sulfurosa Rhodospirillum rubrum contiene los dos tipos de actividades de Pirofosfatasa: la Citoplásmica o soluble y la Membranal (Tabla 1) Más del 90% de la actividad PPiase total se observa en el citoplasma. Klemme y Gest (1971 a y c) han hecho estudios profundos acerca de esta enzima en Rs. rubrum e incluso la han purificado.

En los cromatóforos de esta bacteria fotosintética, la PPiase de membrana acoplada al transporte de electrones cataliza no sólo la hidrólisis de PPi sino también la síntesis de PPi en la luz. La síntesis de PPi inducida por la luz en cromatóforos de Rs. rubrum fue descubierta por primera vez por Baltscheffsky y von Stedingk en 1966. Originalmente esta actividad fue

Tabla 1. Grupos de Bacterias Púrpuras No Sulfurosas Respecto a la Distribución Intracelular de las PPIasas.

GRUPO I CON PPIasa MEMBRANAL Y CITOPLASMICA	GRUPO II CON PPIasa CITOPLASMICA SOLAMENTE
<u>Rhodospirillum rubrum</u>	<u>Rhodopseudomonas sphaeroides</u>
<u>Rhodopseudomonas palustris</u>	<u>Rps. capsulata</u>
	<u>Rps. gelatinosa</u>

Según Klemme y col, 1971b.

considerada como una reacción parcial a la síntesis de ATP por la H⁺ATPasa de membrana, pero subsecuentemente se reconoció que es debida a una enzima diferente que es insensible a oligomicina. Los experimentos que favorecieron esta idea fueron los siguientes:

- Fisher y Guillory, 1969, logran separar selectivamente la actividad de H⁺ATPasa o PPiase del cromatóforo, con 2 M de cloruro de litio ó 3.1% de butanol, respectivamente.

- Johansson, 1975, obtiene antisuero monoespecífico contra H⁺ATPasa que inhibe la energización de la membrana debida a ATP pero no la ligada a PPi.

-Keister y Minton, 1971b, demostraron la síntesis de ATP dirigida por la hidrólisis de PPi, sin encontrar incorporación de fosfato marcado del ³²PPi al ATP.

Así, la evidencia presentada hace concluir que las dos reacciones son catalizadas por dos sistemas enzimáticos diferentes acoplados a través del mismo estado energizado de la membrana.

1.4.2 Reacciones Parciales de la Pirofosfatasa Membranal

Las reacciones parciales o de intercambio frecuentemente pueden ser utilizadas para estudiar y conocer los mecanismos de conversión de energía de las enzimas, ya que estas reacciones son pasos intermedios de la síntesis o de la hidrólisis. De la PPiase de membrana de Rs. rubrum se conocen las siguientes:

A) HIDROLISIS DE PIROFOSFATO (PPiase)

Esta reacción requiere iones Mg²⁺, no sólo para formar el

sustrato de la enzima (Mg-PPi) sino también como activador (Randahl, 1979).

La actividad PPiase está reprimida parcialmente en la luz, aún en condiciones en las que no se da la síntesis de PPi (Nishikawa y col., 1973). La actividad en la oscuridad es inhibida por DCCD, Pi y arsenato; pero no por ATP o ADP. Es estimulada por desacoplantes (2,6 DCPI, 2,4-DNP, desaspidina y gramicidina, Baltscheffsky, M. y col., 1966), pero nunca en la magnitud en que es estimulada la H⁺ATPasa. En Rs. rubrum la actividad de PPiase, comparada con la de la H⁺ATPasa, es considerablemente más alta y sólo se igualan cuando ambas actividades se estimulan por desacoplantes (Baltscheffsky, 1969b).

La PPiase, a diferencia de la H⁺ATPasa, es inhibida parcialmente por oligomicina (Baltscheffsky, 1968). Además, la PPiase de membrana, es inhibida por butanol a diferencia de la H⁺ATPasa o de la PPiase citoplásmica que no lo son.

La PPiase de membrana es estimulada por Li⁺, Na⁺ y K⁺. Se ha observado que cuando se quitan las quinonas del cromatóforo la actividad PPiase en oscuridad decae parcialmente y se restituye al añadir UQ₁₀ (Nishikawa y col., 1973).

La hidrólisis de PPi en los cromatóforos se acompaña de un cambio de fluorescencia del ANS (Vainio y col., 1972), una captación del ión fenil dicarbaundecaborano (Isaev y col., 1970), y un cambio del pH del medio externo (Moyle y col., 1972). De lo que se concluye que la PPiase del cromatóforo trasloca H⁺ a través de la membrana en una reacción acoplada a la hidrólisis

de PPI, dejando el interior del cromatóforo cargado positivamente con respecto al exterior; aparentemente de una manera similar a como lo hace la H^+ ATPasa del mismo cromatóforo.

El hecho de que la PPIasa es inhibida por DCCD y transporte H^+ , sugiere que contiene un canal de H^+ semejante al de la H^+ ATPasa.

La N-etilmaleimida inhibe la actividad PPIasa después de preincubar a $0^{\circ}C$, pero no lo hace cuando se preincuba a $30^{\circ}C$ (Randahl, 1979). Esto puede ser interpretado de la siguiente manera: la enzima requiere un cambio conformacional, dependiente de temperatura, para que se expongan algunos de sus grupos sulfhidrilos y actúe en ellos el inhibidor. También la PPIasa del cromatóforo es inhibida por NBF-Cl y es dependiente de la temperatura de preincubación de igual manera que en el caso anterior.

Por otra parte, la PPIasa de membrana es dependiente de la presencia de cierto contenido de fosfolípidos de la membrana, tal como lo es la ATPasa (Klemme y col, 1971a).

Reversa del transporte de electrones y reacciones asociadas a la hidrólisis de PPI.- Se han demostrado en los cromatóforos de Rhodospirillum rubrum muchas reacciones dependientes de energía que pueden acoplarse a la hidrólisis de PPI. Estas reacciones incluyen: Transhidrogenación dependiente de energía (Keister y Yike, 1967a), reducción de citocromo (Baltscheffsky, 1967), reducción de NAD^+ ligado a Succinato (Keister y Yike, 1967b), toma de H^+ (Moyle y col, 1972), corrimiento de las longitudes de onda máxima de las bandas del espectro de absorción del caroteno

[Baltscheffsky, 1969a) y formación de ATP dirigida por PPI [Keister y Minton, 1971a).

Estos datos indican que la PPIasa media la transducción de energía entre la Síntesis [o la hidrólisis] de PPI y otras reacciones que generan [o que consumen] energía en la membrana.

La función fisiológica y catalítica de la PPIasa membranal parece ser equivalente a la de un factor de acoplamiento convencional; por tanto, la resolución de esta peculiar enzima es de gran interés.

B) SINTESIS DE PIROFOSFATO.

En condiciones de iluminación es cuando se lleva a cabo la Síntesis de PPI ya que prácticamente en la oscuridad no es detectable esta actividad. Esta reacción también requiere de iones Mg^{2+} para obtener máximas velocidades de síntesis y a concentraciones de Mg^{2+} por arriba de 5 mM se observa inhibición. El pH óptimo es de 7.5 [bajo las condiciones experimentales de Fisher y Guillory, 1972].

La formación de PPI y de ATP en la luz se inhibe de manera similar por los inhibidores del transporte de electrones: antimicina A, o-fenantrolina y el desacoplante 2.4-DNP. También es inhibida por ADP y arsenato pero no por ATP; sin embargo, la síntesis de PPI no se ve inhibida por oligomicina sino que, por el contrario, la estimula, indicando que este inhibidor evita la "fuga de energía" por la vía de la Síntesis de ATP [Baltscheffsky y von Stedingk, 1966].

De los otros inhibidores de la transferencia de energía el

DCCD tiene poco efecto en esta reacción mientras que el antibiótico Dio-9 sí la inhibe (Guillory y Fisher, 1972).

La fotofosforilación a PPi muestra un patrón de saturación de luz diferente al de formación del ATP. Guillory y Fisher, 1972, mostraron que la formación de PPi se satura a una intensidad de luz que es menos de un décimo de la requerida para la saturación de la síntesis de ATP. Hay que hacer notar que Rhodospirillum rubrum crece en condiciones naturales a bajas intensidades luminosas. Esto sugiere que la vía alternativa del PPi puede tener un importante significado fisiológico.

La síntesis de PPi y la de ATP utilizan, aparentemente, el mismo sitio de acoplamiento en la cadena de transporte de electrones, ya que, en la oscuridad, se puede inducir un flujo reverso de electrones por la hidrólisis de cualquiera de los dos compuestos. El resultado de esta reacción es una reducción de citocromo b y la oxidación de citocromo c_2 (Baltscheffsky, 1968).

La formación de PPi inducida por luz es inhibida parcialmente por la síntesis simultánea de ATP por luz, pero no se modifica por la adición de ATP. Esto sugiere que la formación fotosintética de ATP y la de PPi son catalizadas por diferentes sistemas enzimáticos de conversión de energía, que compiten por el mismo transporte cíclico de electrones fotosintético.

C) INTERCAMBIO P_i _____ PPi.

Keister y Minton en 1971, encontraron que los cromatóforos de Rhodospirillum rubrum catalizan la Reacción de Intercambio P_i _____ PPi en la oscuridad. Esta reacción es inhibida por

desacoplantes de la fosforilación (CCCP y S-13), MDP y fluoruro. Sin embargo, el inhibidor del transporte de electrones antimicina A no tiene efecto sobre la reacción.

El efecto de estos inhibidores es consistente con la idea de que esta es una reacción de intercambio dependiente de energía, catalizada por la PPIasa Membranal.

Keister y Minton, 1971, reportaron que el pH óptimo de la reacción es pH 8.1, con un 59% de la actividad a pH 7.0 y un 66% a pH 9.0. Obtuvieron una Km de 48 mM para Pi.

La velocidad de intercambio es considerablemente menor (5-8 umoles/mg BCl/hr) comparada con el intercambio ATP \rightarrow Pi³² (25 umoles/mg BCl/hr).

Para la máxima actividad de intercambio se necesita Mg²⁺ libre. La concentración de Pi no afecta el requerimiento de Mg²⁺ (Keister y Raveed, 1974).

Con Mn²⁺ y Co²⁺ no hay intercambio a pesar de que con ellos se obtiene un 24% de actividad hidrolítica.

D) RECAMBIO Pi \rightarrow H₂O.

Harvey y Keister en 1981, caracterizaron esta reacción. La membrana del cromatóforo tiene al menos 2 sistemas enzimáticos potencialmente capaces de catalizar el recambio Pi \rightarrow H₂O, uno de ellos es la H⁺ATP sintetasa y el otro la PPIasa de membrana. Con el uso de inhibidores específicos, se ha podido determinar que el recambio Pi \rightarrow H₂O en cromatóforos se debe exclusivamente a la PPIasa de membrana; ya que es inhibido hasta en un 100% por fluoruro y un 70% con MDP (ambos compuestos

inhibidores exclusivos de la PPiase). Además, la oligomicina, inhibidor de la H^+ ATPasa, prácticamente no afecta a este recambio.

El desacoplante CCCP tiene poco efecto en la reacción, este hecho podría significar que el recambio $Pi \rightleftharpoons H_2O$ no depende del gradiente de H^+ . La observación de que la luz no estimula este intercambio apoya esta afirmación.

En presencia de ADP, la reacción se estimula en un 40% y éste porcentaje es sensible a oligomicina y no a inhibidores de la PPiase lo que atribuye este porcentaje de estimulación de la reacción a la H^+ ATP sintetasa.

La reacción sólo requiere Pi , y Mg en una relación $Mg:Pi = 0.8$. Harvey y Keister encontraron que las velocidades de recambio eran variables con las diferentes preparaciones de cromatóforos (150-160 uatomo oxígeno/mgBCl/h). Es interesante notar que el recambio $Pi \rightleftharpoons H_2O$ y la hidrólisis de PPi tienen aproximadamente la misma velocidad, mientras que el intercambio $PPi \rightleftharpoons Pi$ es 10 veces menor.

1.4.3 Requerimiento de Cationes de la Pirofosfatasa Membranal

Como la mayoría de las PPiases inorgánicas, la PPiase de membrana de Rhodospirillum rubrum requiere para la hidrólisis de PPi de cationes divalentes, pero a diferencia de la PPiase citoplásmica de esta bacteria, que requiere Zn^{2+} para ser estable y Mg^{2+} para formar el complejo activo (véase la Tabla 2), la PPiase membranal requiere únicamente Mg^{2+}

Esta enzima de membrana tiene una actividad muy pobre con otros cationes divalentes:

A) EN HIDROLISIS DE PPi:

Randahl, 1979 50% de la actividad con Zn^{2+} y Mn^{2+}

Ninguna actividad con Ca^{2+}

Horio y col., 1973 42% de la actividad con 6.7 mM de Mn^{2+}

Keister y Minton, 1971b 24% de la actividad con Mn^{2+} y Co^{2+}

(pH 8)

B) EN SINTESIS DE PPi:

Nishikawa y col., 1973 El Mn^{2+} en el rango de 0.2 mM a 10 mM

inhibe aproximadamente un 90% en presencia de Mg^{2+}

(6.7 mM). No hay actividad con Mn^{2+} (0.1 mM a 10 mM)

(pH 8)

Horio y col., 1973 lo mismo.

C) REVERSA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES PRODUCIDA POR PPi:

Baltscheffsky, 1969b a pH.7.4 Co^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} (2.5 mM

substituyen muy pobremente al Mg^{2+}

Ca^{2+} (0.33 a 1mM) inhibe en presencia

de Mg^{2+} 3.3 mM (pH 7.4).

D) INTERCAMBIO Pi - PPi

Keister y Minton, 1971 b No hay actividad en presencia de

Mn^{2+} y Co^{2+} (pH 8).

TABLA 2. Propiedades Generales de la Pfiasa Citoplásmica de las bacterias púrpuras,
No Sulfurosas.

Organismo	PM	Actividad ^a	Requerimiento de Metal divalente ^b	Metal divalente Sustrato ^c	Mg ²⁺ libre	Efecto de 2-PGA (1 mM) ^d
<u>Spirillum rubrum</u>	100,000	1	Zn	Mg	activación	inhibición
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	100,000	1	Zn	Mg	activación	inhibición
<u>Alcaligenes eutrophus</u>	100,000	1	Zn	Mg	activación	inhibición
<u>Capsulata</u>	60,000	6	Co	Mg, Co, Mn	ninguno	ninguno
<u>Sphaeroides</u>	60,000	8	Co	Mg ²⁺	ninguno	ninguno

les Pi/min/mg

requerimiento para estabilización y manutención de la actividad catalítica durante almacenaje.

requerimiento para formar complejo M-PPi que sirve como sustrato.

acto del Acido 2 fosfo glicérico en ausencia de Mg²⁺ libre y a concentración de Mg-PPi que

la mitad de Vmax.

uada de Klemme, J.H. y col., 1971 y modificada.

Randahl, 1979, observó que el Mg^{2+} tenía dos papeles, uno de ellos como activador y el otro para formar el complejo PPI-Mg que es el verdadero sustrato de la hidrólisis. Asimismo, sugiere que el PPI se une directamente a la enzima pero no se hidroliza si no está combinado con el Mg^{2+} . Finalmente propone que la enzima tiene un sitio para el Mg^{2+} y otro para la fijación del sustrato.

Por otra parte, Randahl (1979), observó que la presencia de Mg^{2+} en el medio evita la inactivación de la enzima por calentamiento a $62^{\circ}C$. Esto indica un papel estabilizador del Mg^{2+} en la estructura de la proteína.

En resumen, el requerimiento de la enzima por cationes divalentes, ya sea libres o en complejo con PPI, no ha sido estudiado sistemáticamente. El realizar tal investigación es uno de los objetivos de este trabajo.

1.4.4. Solubilización y Purificación de la Pirofosfatasa Membranal

Esta enzima está firmemente unida a la membrana y ha resistido considerables esfuerzos a ser aislada. Rao y Keister, en 1978 lograron solubilizarla por primera vez con buen rendimiento, empleando colato en presencia de Mg^{2+} . En su trabajo, también incluían una purificación parcial utilizando un fraccionamiento con sulfato de amonio y una cromatografía en Bio-gel A1.5M. Después del fraccionamiento, la enzima solubilizada necesita fosfolípidos para su actividad, es específica para PPI y requiere de Mg.

Recientemente, el grupo de Margareta Baltscheffsky (Nyrén y

col., 1984) ha descrito un método en el que obtienen una PPiase de membrana de Rhodospirillum rubrum muy pura. Ellos solubilizan con Triton X-100 en presencia de etilenglicol y Mg^{2+} . Un alto porcentaje de pureza lo obtienen con una cromatografía en hidroxapatita del extracto con tritón.

La estabilidad de la enzima solubilizada es dependiente de la presencia de Mg^{2+} en el medio de almacenado. Este grupo ha proporcionado también una caracterización preliminar de la enzima solubilizada.

La enzima purificada por el método de Nyrén y col., 1984, pierde su sensibilidad al DCCD (esto puede ser un efecto de detergente), sigue siendo insensible a oligomicina y es inhibida por fluoruro, IDP y MDP. El FCCP no la afecta, y se inhibe potentemente por el Dio 9 (inhibidor de la transferencia de energía). La N-etilmaleimida inhibe a la PPiase purificada de la misma manera que afecta a la PPiase de los cromatóforos. Este compuesto ha mostrado tener un efecto inhibitorio de la enzima después de una preincubación a $0^{\circ}C$, pero no cuando se preincuba a $30^{\circ}C$; lo que se interpreta asumiendo que es necesario un cambio conformacional para poder exponer, a la acción de este inhibidor, uno o más grupos sulfhidrilos, esenciales para la actividad de la enzima. El NBF-C1 inhibe a la PPiase de los cromatóforos en forma dependiente de la temperatura de preincubación, de la misma manera que la inhibición con N-etilmaleimida. Sin embargo, la enzima purificada es inhibida por el NBF-C1, independientemente de la temperatura de preincubación. El efecto inhibitorio del NBF-C1 puede deberse a una

modificación química de un residuo de tirosina.

En resumen, la PPIasa solubilizada pierde su capacidad de estimularse por desacoplantes y su sensibilidad al por DCCD; con esto, se infiere que ha perdido su función translocadora de H^+ . Mientras que los inhibidores que, probablemente, inhiben los grupos envueltos en la catálisis, como son: NBF-C1, N-etilmaleimida, Dio-9, MDP e IDP aún actúan en la enzima solubilizada (Nyrén y col., 1984).

Cuando esta enzima es incorporada a liposomas puede funcionar por sí misma como bomba de H^+ y tiene respuesta a desacoplantes e inhibidores de la transferencia de energía de la misma manera que en el cromatóforo (Shakhov y col., 1982).

Se ha logrado reconstituir en un sistema liposomal la síntesis de ATP dirigida por la energía de PPI. Este sistema contiene a: la PPIasa de membrana solubilizada de Rs. rubrum, el complejo de la H^+ ATP sintetasa sensible a DCCD, obtenido de la misma bacteria y fosfolípidos de soya. Esta síntesis de ATP es sensible a desacoplantes e inhibidores de la fosforilación (Nyrén y Baltscheffsky, 1983).

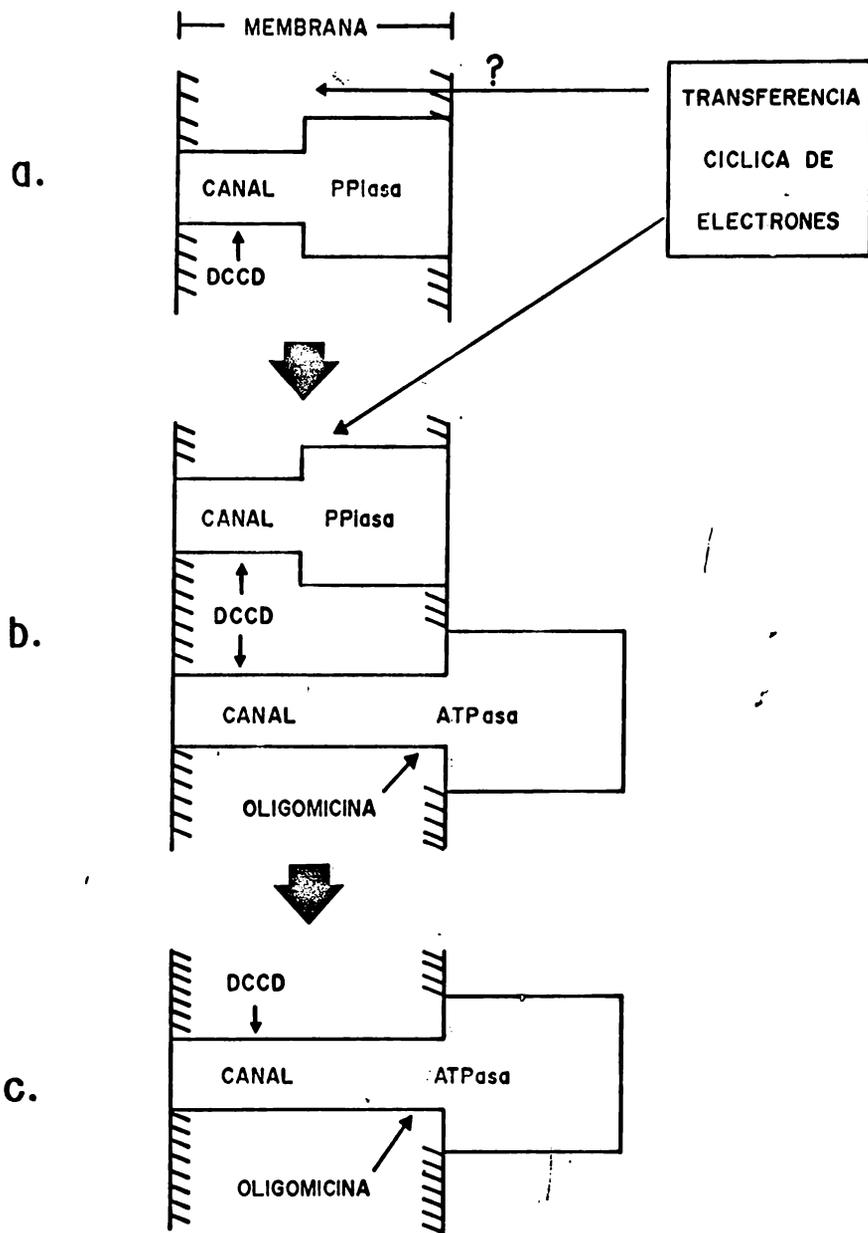
1.4.5 Papel de la Pirofosfatasa en la Evolución del Mecanismo de Acoplamiento y Fosforilación.

Acerca del papel que la PPiase de membrana pudo haber jugado en la evolución del mecanismo de acoplamiento de la oxidación y la fosforilación, M. Baltscheffsky y col., 1982 han propuesto la siguiente idea: originalmente, existía una situación en donde el sistema de transporte de electrones y el sistema de la PPiase (?PPiase o ATPasa?) se presentaban como fuentes de energía separada. Posteriormente, gracias a la reversa de la reacción de la fosfatasa, se dió una evolución convergente acoplando a las dos entidades que funcionaban autónomamente, conduciendo al primer almacén de energía libre unido a membrana en forma de un compuesto apropiado, con la configuración del PPI.

Dentro de su hipótesis ellos postulan que el primer transporte de H^+ a través de la membrana biológica, estuvo representado por la PPiase ligada a una molécula formadora del canal primitivo (Fig. 3a). Durante la evolución, surgió la F_1 del sistema de la ATPasa (Fig. 3b). El acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación pudo haber ocurrido en este estado evolutivo o antes, como indica la flecha.

Esto creó una situación semejante a la que existe en los cromatóforos de Rhodospirillum rubrum y Chromatium vinosum en los que existe un acoplamiento funcional entre el transporte de electrones cíclico inducido por luz y la PPiase o la ATPasa.

Posteriormente pudo haber ocurrido una delección evolutiva, perdiéndose la PPiase (Fig. 3c), como ocurre en algunos sistemas fotosintéticos como Rhodospseudomonas capsulata donde no se



Posible Mecanismo Evolutivo del Acoplamiento de Energía en Membranas Transductoras de Energía. a) Situación hipotética en la que sólo la PPIasa existía. b) Situación intermedia en la que coexisten la PPIasa y la H⁺ATPasa en la membrana. c) Situación en la que sólo subsiste la H⁺ATPasa; Tomada de Baltscheffsky y col., 1982.

presenta ya la PPiase. En la Fig. 3 se indican los sitios donde el DCCD y la oligomicina pueden inhibir la fosforilación.

Una pregunta de gran significado, tanto en el sentido evolutivo como en el mecanístico, es si la traslocación de H^+ de la PPiase utiliza el mismo canal de H^+ en la membrana del cromatóforo, uno idéntico o uno más o menos similar al que usa la ATPasa.

1.5. OBJETIVO.

Los estudios comparativos acerca de los mecanismos transformadores de energía, en bacterias, cloroplastos y mitocondrias, han demostrado ser muy útiles para comprender la complejidad e importancia de estos sistemas a lo largo de la escala filogenética.

Sin embargo, en bacterias fotosintéticas, los complejos fosforilantes como lo son la ATP sintetasa y la PPiase de membrana han sido, relativamente, poco estudiados, sobre todo la PPiase, de aquí la importancia de este trabajo que incluye como objetivos fundamentales:

1) Estudiar las reacciones de intercambio $P_i - PP_i$ y de hidrólisis de la PPiase de membrana de la bacteria fotosintética Rs. rubrum, así como la relación que existe entre estas dos reacciones.

2) Estudiar en detalle el efecto del P_i , PP_i , Mg^{2+} y otros cationes divalentes, sobre ambas reacciones.

Para, de esta manera, acercarnos más al conocimiento del mecanismo de acción de la PPiase de membrana de Rs. rubrum y, en

último término, contribuir al conocimiento del mecanismo de síntesis de uniones de alta energía en las enzimas transductoras, ya que la PPIasa es una enzima muy sencilla tanto molecularmente como en sus requerimientos de sustrato.

CAPITULO 2
MATERIALES Y METODOS

2.1. CRECIMIENTO DE BACTERIAS.

Se utilizó en todos los estudios la cepa silvestre de la bacteria fotosintética de Rhodospirillum rubrum.

2.1.1 Medios de Cultivo.

Para el crecimiento de esta bacteria se prepararon dos clases de medio de cultivo: A) sólido y B) líquido.

A) Medio sólido.

Contiene lo siguiente para un litro:

Extracto de levadura (Bioxon de México) -----	3 gr
Peptona de Gelatina (Bioxon de México) -----	2 gr
Agar bacteriológico (Bioxon de México) -----	1 %

El medio se esterilizó en la autoclave por 15 min en frascos con tapa de rosca de 15 a 20 ml de capacidad, conteniendo aproximadamente 10 ml de éste.

B) Medio líquido.

Se preparó el medio líquido formulado por Cohen-Bazire y col., 1957, el cual es una modificación del propuesto por Hutner, 1950.

Para la preparación de este medio se partió de las siguientes soluciones:

a) Base Concentrada. Contiene lo siguiente para 2 lts.:

$N(CH_2COOH)_3$ -----	20 gr
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -----	28.9 gr

$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ----- 8.7 gr
 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ --- 0.185 gr.
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- 0.195 gr
 * Metales '44' ----- 100 ml

Se ajusta el pH a 6.8.

*Metales '44'. La solución de metales utilizada en la base concentrada contiene lo siguiente:

EDTA ----- 2.5 gr
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- 5.0 gr
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- 11 mgr
 $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ----- 1.54 gr
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ----- 1.37 gr
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ----- 0.392 gr
 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ---- 0.248 gr
 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ---- 0.177 gr
 H_2SO_4 ----- aprox. 4 gotas

Se pone agua destilada hasta aforar 1 lt y se ajusta el pH a 6.8.

b) KH_2PO_4 136.09 gr para 1 lt de H_2O destilada, se ajusta el pH a 6.8.

c) Acido succínico 100 gr para 1 lt de H_2O destilada, se ajusta el pH a 6.8.

d) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 gr para 1 lt de H_2O destilada.

e) NaCl 50 gr para 1 lt de H_2O destilada.

f) Acido L-glutámico 25 gr para 250 ml de H_2O destilada y se ajusta el pH a 6.8.

g) Acido L-aspártico 5 gr para 250 ml de H_2O destilada, ajustar el pH a 6.8.

El medio líquido final, contiene, para 12.5 lt, las siguientes cantidades de las soluciones anteriores:

- a) Base concentrada ----- 250 ml
- b) KH_2PO_4 ----- 250 ml
- c) Acido succínico ----- 250 ml
- d) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ----- 62.5 ml
- e) NaCl ----- 125 ml
- f) Acido L-glutámico ---- 25 ml
- g) Acido L-aspártico ---- 25 ml

además de

- Peptona de gelatina -- 12.5 gr
- Acido nicotínico ----- 12.5 mgr
- Tiamina ----- 6.25 mgr
- Biotina ----- 0.125 mgr

Se ajustó el pH a 6.8. El medio se esterilizó por 45 min en frascos del volumen que se requiere. En el medio caliente, se forma un precipitado que se disuelve a la temperatura ambiente. El medio es transparente y de color semejante al del extracto de levadura.

2.1.2. Siembra de Bacterias

Las bacterias se sembraron en placa por el método de dilución para formar colonias únicas. De ahí se tomó una de ellas y se sembró por punción en los frascos con medio sólido. Se incubaron en la oscuridad por 12 hrs. para permitir que el crecimiento aeróbico de estos microorganismos elimine parcialmente el O_2 del medio. Terminado este período, las bacterias sembradas se expusieron a la luz de focos con filamento de tungsteno de 40 watts. La distancia entre los focos

y los frascos fue de 30 cm. Una vez observado el desarrollo de la colonia en la punción, estos cultivos pueden mantenerse así por largo tiempo, entre 6 y 12 meses, como reserva, o bien, utilizarse para cultivos posteriores.

Para obtener grandes cantidades de bacterias se cultivaron en medio líquido. La manera en que se hizo es la siguiente: a los frascos que contenían las bacterias en el medio sólido, se les agregó el medio líquido y se agitaron. Se dejaron toda la noche en la oscuridad y a continuación se colocaron a la luz de los focos con filamento de tungsteno de 40 watts a 30 cm. Después de 7 a 10 días se observó crecimiento de bacterias en el medio líquido, éste se transfirió a frascos de 100 ml de capacidad, a los cuales se les agregó medio fresco hasta colmar su capacidad. Se repitió el proceso oscuridad-luz y se dejó crecer a las bacterias hasta la fase logarítmica tardía. El inóculo bacteriano, obtenido así, se traslado a frascos de 1 lt y de 9 lt sucesivamente, siguiendo los pasos descritos con anterioridad. Los frascos se cerraron con tapones de hule herméticos y se dejó el mínimo de aire entre el tapón y el medio de cultivo, evitándose al máximo la presencia de O_2 , ya que el crecimiento fotosintético de estos microorganismos se realiza en anaerobiosis. Esta es la razón por la cual, previo al crecimiento en la luz, siempre se dejó crecer a los cultivos en la oscuridad por 12 hrs., aprovechando que la bacteria, por sus procesos metabólicos oxidativos, elimina el O_2 que esta presente en el agua. Los cultivos se mantuvieron a $30^{\circ}C$.

2.2. COSECHA DE BACTERIAS.

Las bacterias crecidas en los frascos de 9 lt de capacidad se cosecharon en una centrifuga de flujo continuo Sharples, en la fase de crecimiento logarítmica tardía, la cual se determinó haciendo curvas de crecimiento, esto es, midiendo la densidad óptica del cultivo a diversos intervalos de tiempo en un fotocolorímetro.

La cosecha permite obtener un paquete de bacterias libres de medio líquido. Es conveniente lavarlas al menos una vez con MOPS 50 mM, KCl 10 mM pH 7.5 para eliminar por completo los residuos de medio y desechos. Para volver a obtenerlas en un precipitado se centrifugan a 8 000 x g por 15 min. Los precipitados se pesaron y esto se consideró como peso húmedo. Se almacenaron así a -30°C en congelador REVCO hasta ser utilizadas.

2.3. OBTENCION DE CROMATOFOROS

Se siguió el método descrito por Baccarini-Melandri y col., 1970, para la obtención de cromatóforos.

A) Las bacterias se resuspendieron en buffer de glicilglicina 10 mM pH 7.5 en una proporción 1/10 (bacterias/buffer), que contenía 1 mg de DNAasa por 100 gr de peso húmedo de bacterias y MgSO_4 1 mM.

B) Para romper las células se siguieron cualquiera de los dos procedimientos siguientes:

a) Se hicieron pasar por una prensa Sorval Ribi Cell fractionator (French Press) a 16 000 psi (Baccarini-Melandri y col., 1970) o

b) Se sonicaron en lotes de 25 ml por 2 min en un sonicador

M.S.E. puesto al máximo y enfriando con agua a 4°C [Scholes y col., 1969].

C) A continuación se centrifugó a 20 000 x g durante 20 min para remover células sin romper, cápsulas, etc. que quedan en el precipitado.

D) El sobrenadante de la centrifugación anterior, se sedimentó a 100 000 x g por 60 min obteniéndose así un precipitado de cromatóforos los cuales se lavaron con el mismo buffer y se centrifugaron a la misma velocidad. Los cromatóforos se resuspenden en buffer de Tris-Cl 10 mM pH 7.5 a una concentración aprox. de BCl de 1 mg/ml. El sobrenadante de esta centrifugación contiene citocromo C₂ además de otras proteínas como la Pirofosfatasa Citoplásmica.

La preparación de cromatóforos se guarda a 4°C y se usa en los 3 días siguientes, ya que no se han detectado cambios en la actividad hidrolítica o de intercambio durante este período de tiempo.

2.4 ESTIMACION DEL CONTENIDO DE BCl EN CROMATOFOROS.

La concentración de BCl en los cromatóforos de la bacteria Rhodospirillum rubrum fue determinado por la absorción a 770 nm de un extracto de acetona-metanol [7/2, v/v] obtenido de cromatóforos, utilizando un coeficiente de extinción molar de 75 mM⁻¹ cm⁻¹ [Clayton, 1963].

La extracción de BCl de los cromatóforos se hizo a partir de 50 ul de suspensión de cromatóforos. Los cuales se añadieron a un tubo que contenía 4.95 ml de acetona - metanol [7/2, v/v]. Se

agitaron vigorosamente durante unos segundos y se centrifugaron a 3 000 rpm por 5 min. El sobrenadante obtenido se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 770 nm, contra un blanco de acetona-metanol. |

2.5 DETERMINACION DE PROTEINA

La cantidad de proteína se estimó por el método de Lowry y col., 1951, utilizando como estándar BSA.

2.6. METODO PARA DETERMINAR LA HIDROLISIS DE PIROFOSFATO O ACTIVIDAD PIROFOSFATASA EN CROMATOFOROS.

La actividad de Pirofosfatasa (PPiase) se midió como la liberación de Pi a partir de PPI a 25-30°C, en presencia de MgCl₂.

La determinación de la actividad puede hacerse en la oscuridad o en la luz. En este trabajo, únicamente se midió la actividad de PPiase en la oscuridad. Para lograr estas condiciones se utilizó un cuarto iluminado con luz verde de seguridad (Schiff, 1972).

Las condiciones del medio de reacción se especifican en los Pies de Figura de los Resultados, en general, contiene Tris-Cl pH 8, Pirofosfato de sodio y MgCl₂ en un volumen final de 1 ml.

La reacción se inicia al añadir una cantidad de cromatóforos correspondiente a 100 ug de BCl. Todo el medio se incubaba a 25-30°C durante el tiempo deseado, en la oscuridad, en un baño de temperatura constante. La reacción se detiene al añadir TCA a una concentración final de 6%. Finalmente se centrifuga en una centrífuga clínica a 3000 rpm por 5 min.

El Pi presente en el sobrenadante desproteínizado se midió colorimétricamente con el método de Sumner, 1944.

Para los cálculos de la cantidad de PPI hidrolizado se consideró que un PPI produce dos Pi. La actividad específica se refirió como umoles de Pi/min/mg de BCl.

2.7. METODO PARA MEDIR LA REACCION DE INTERCAMBIO Pi-PPi EN CROMATOFOROS.

La reacción de intercambio Pi-PPi se determina midiendo la formación de (Pi³²)PPi a partir de PPI y Pi³².

La reacción se llevó a cabo en oscuridad en las condiciones especificadas para cada experimento en los Resultados. En términos generales, el medio contiene lo mismo utilizado para la hidrólisis de PPI además de Pi-Tris pH 8.0 y Pi³².

La temperatura de incubación es de 25°C. Después de parar la reacción con 6% de TCA (concentración final) y centrifugar a baja velocidad, el ortofosfato se separó del sobrenadante con isobutanol:benzeno(1:1) saturado con agua subsecuentemente a la formación del complejo de fosfomolibdato como describen Meis y col., 1983.

La fase acuosa se lavó 5 veces con isobutanol:benzeno para eliminar todo el Pi³². Con el objeto de cuantificar la incorporación de Pi³² a PPI se tomaron alícuotas de la fase acuosa y se midieron por Cerenkov, en el Contador de centelleo por el canal de H³.

El Pi radioactivo utilizado fue de New England Nuclear

(Boston, Mass. USA) y se purificó como en de Meis y col., 1980.

2.8 CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE COMPLEJOS Y ESPECIES LIBRE EN LAS REACCIONES.

Las concentraciones de los metales libres, de los ligandos y de los complejos, se calcularon con un programa facilitado por el Dr. Jaime Mas-Oliva. Este programa resuelve las ecuaciones simultáneas que describen el equilibrio múltiple que existe en la solución problema utilizando el logaritmo de las constantes de asociación. El programa se corrió en una minicomputadora PDP 11/34 DIGITAL.

Las constantes de asociación fueron tomadas de Martell y Sillén, 1971. Las constantes de asociación (Ks) utilizadas son las siguientes, expresadas como log Ks:

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

L = ligando, ya sea Pi o PPi.

COMPLEJOS PARA PPi:

	log Ks
PPi/H-----	8.3
PPi/H ₂ -----	6.0
PPi/H ₃ -----	2.7
PPi/H ₄ -----	2.5

DE PPI PARA CATIONES DIVALENTES:

	log Ks
PPi/Mg ²⁺ -----	6.0
PPi/Zn ²⁺ -----	11.66
PPi/Ca ²⁺ -----	5.46
PPi/Co ²⁺ -----	6.1
PPi/Cu ²⁺ -----	6.2

DE PI PARA CATIONES DIVALENTES

	log Ks
Pi/Mg -----	2.91

2.9. DETERMINACION DEL CORRIMIENTO DEL CAROTENO

El corrimiento del caroteno dependiente de energía se midió en un Espectrofotómetro de Doble Haz Aminco DW-2 a las longitudes de onda de 530 y 508 nm como en Baltscheffsky, 1969.

2.10. MEDIDA DE LA PRECIPITACION DE COMPLEJOS

La formación de precipitados se determinó midiendo la dispersión de luz de las soluciones a 340 nm en un espectrofotómetro de doble haz Aminco DW-2, colocando las cubetas en la posición lejana del fotomultiplicador para ampliar los efectos de dispersión.

Las medidas se hicieron después de 3 min de haber añadido los cationes divalentes.

2.11. MEDIDA DE LA CONDUCTIVIDAD

Las medidas de conductividad se hicieron en un conductímetro CDMB Radiometer (Copenhagen) con una microcelda adecuada.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSION

La PPIasa de membrana de los cromatóforos de la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum requiere del ion divalente Mg^{2+} para formar complejo con el PPI, el cual es el sustrato real para la actividad hidrolítica de la enzima. Ciertos datos de la literatura [Randahl, 1979] sugieren, sin embargo, que el Mg^{2+} libre tiene una acción reguladora sobre las propiedades cinéticas de la enzima. Keister y Minton, 1971b, describieron que la enzima cataliza un Intercambio Pi-PPi y sus datos indican que ésta es una reacción parcial del proceso catalítico total, no obstante los requerimientos de la reacción así como su relación con la actividad hidrolítica no han sido bien definidos.

3.1. CURVA DE TIEMPO DE LA REACCION DE HIDROLISIS DE PPI Y DE LA REACCION DE INTERCAMBIO Pi-PPi A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CROMATOFOROS.

Esta curva está representada en la Fig. 4. El tiempo requerido para el máximo de intercambio Pi-PPi depende de la concentración de cromatóforos. Esto es: dentro de los tiempos de incubación medidos, el máximo de actividad se obtuvo a los 30, 5 y 2.5 min con 25 ug, 100 ug y 250 ug de Bcl de cromatóforos, respectivamente. En estos puntos máximos se calculó la velocidad específica de intercambio Pi-PPi y se obtuvo aproximadamente el mismo valor para 250 y 100 ug (76 y 80 nmoles Pi-PPi

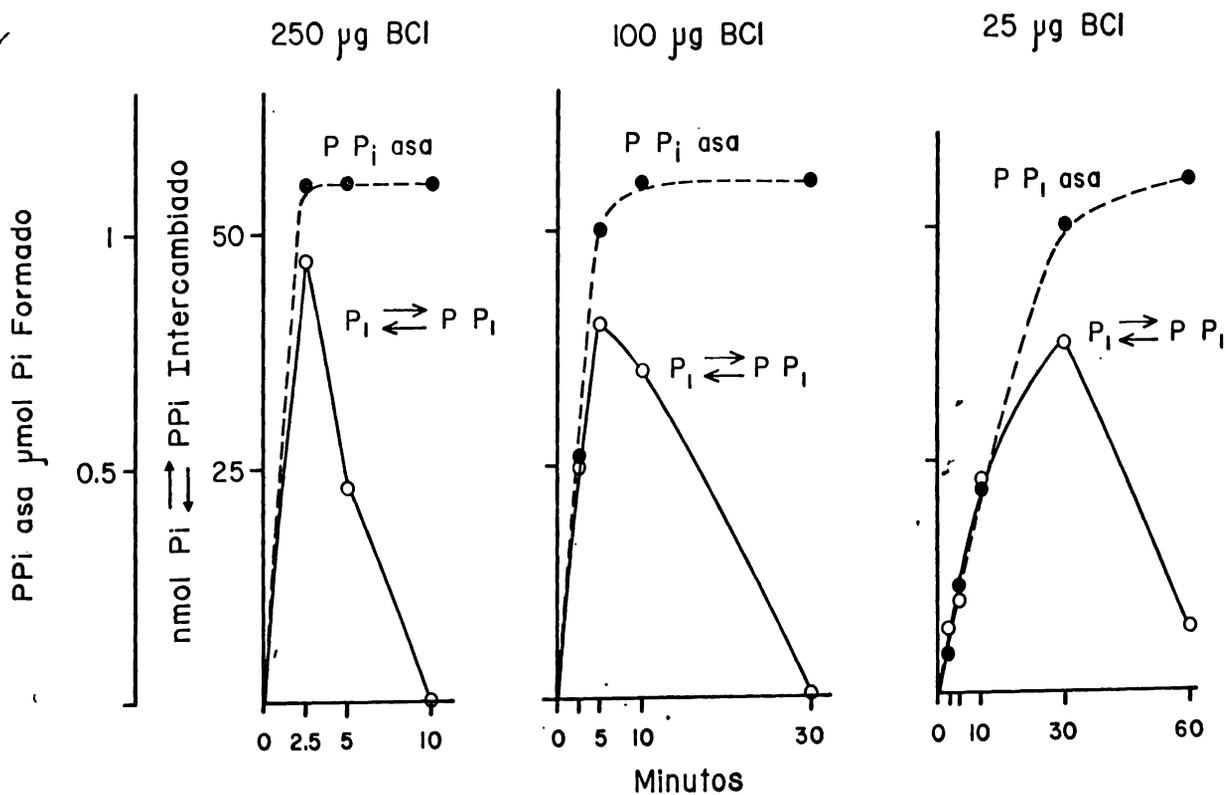


Fig. 4. Curva de Tiempo de Reacción de Intercambio Pi-PPi y de la Reacción de Hidrólisis con Diferentes Concentraciones de Cromatóforos.

Para la hidrólisis (●) el medio de reacción fue Tris-Cl 50 mM pH 8, PPi-Na 0.67 mM pH 8 y $MgCl_2$ 10 mM. Para el intercambio (○) se usó el mismo medio de incubación, además de Pi-Tris 6.7 mM, pH 8 y Pi^{32} 10^6 cpm. Las concentraciones de BCl se indican. Temperatura de incubación 25° en oscuridad como se especifica en Métodos.

intercambiado/min/mg BCl, respectivamente. Con 25 ug la velocidad calculada es menor, 50 nmoles Pi-PPi intercambiado/min/mgBCl, probablemente porque al punto experimental de 30 min el intercambio no llegó al máximo. Sin embargo, con esta cantidad de cromatóforos en los minutos iniciales del experimento se calculó una velocidad de 79 nmoles Pi-PPi/min/mgBCl, lo cual está de acuerdo con los valores a concentraciones mayores de cromatóforos.

La hidrólisis de PPi también depende de la concentración de cromatóforos (Fig. 4). La hidrólisis de PPi, se encuentra ya en su máximo valor a los 2.5, 10 y 60 min con 250, 100 y 25 ug de BCl, respectivamente.

Si se compara la actividad hidrolítica con la de intercambio, se ve que el máximo de intercambio se obtiene cuando una cantidad importante de PPi ha sido hidrolizado. Después de este punto máximo de intercambio, este empieza a disminuir y llega a 0; esto coincide con la hidrólisis, la cual, para este tiempo es completa, o sea, que aquí se ha hidrolizado también el $(\text{Pi}^{32})\text{PPi}$ marcado. En cambio, la hidrólisis se mantiene al mismo valor debido a que se está midiendo Pi y una vez hidrolizado todo el PPi no puede aumentar más de este valor de Pi.

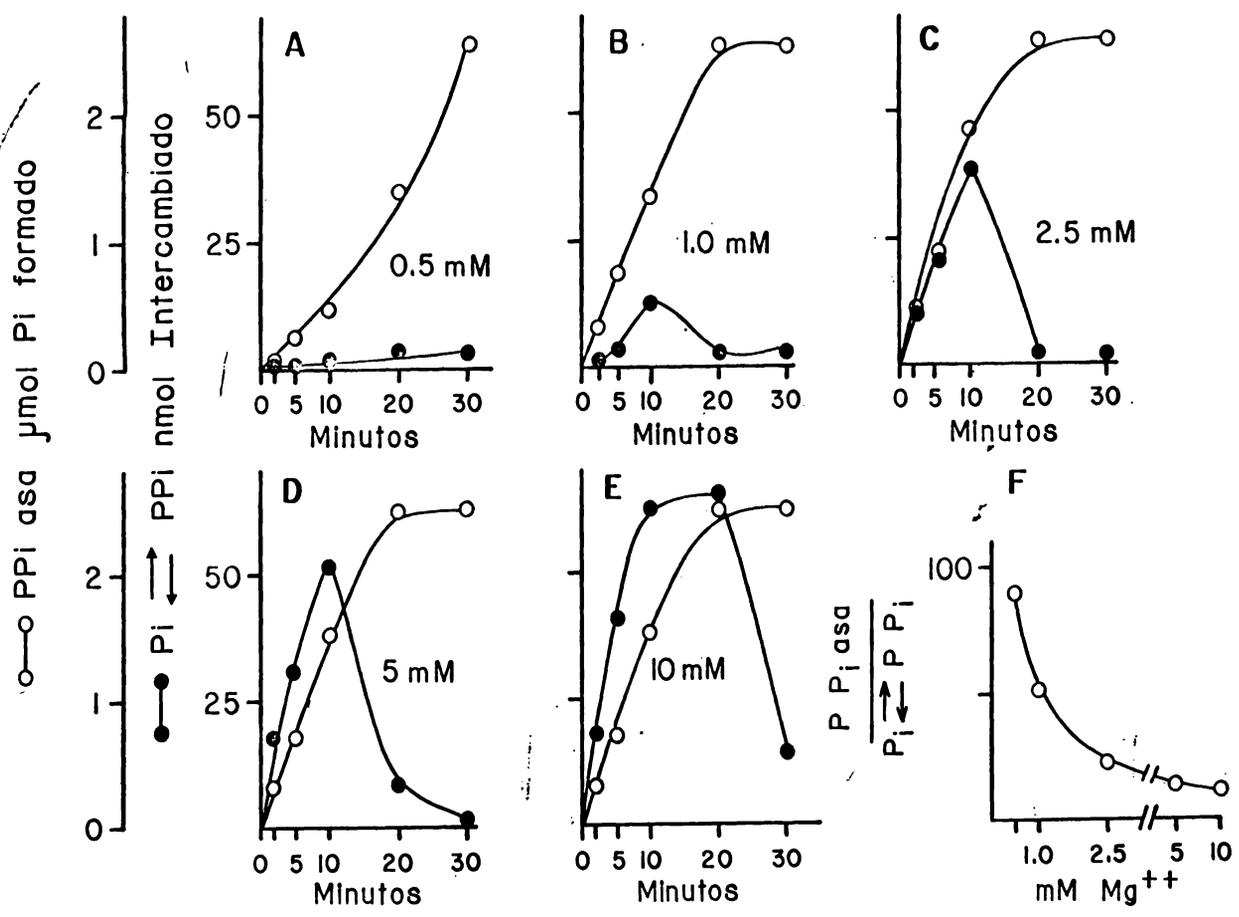
Estos resultados están de acuerdo con Keister y Raveed, 1974, quienes demostraron que el máximo de marcaje por intercambio se obtiene cuando un 75% del PPi añadido se ha hidrolizado y subsecuentemente, la cantidad de $(\text{Pi}^{32})\text{PPi}$ disminuye.

3.2. EFFECTO DEL Mg^{2+} SOBRE LA HIDROLISIS DE PPI Y EL INTERCAMBIO Pi-PPi.

Como se observa en la Fig. 5, la velocidad de hidrólisis depende de la concentración de Mg^{2+} añadido. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Randahl, 1979. A 0.1 mM de Mg^{2+} no hay hidrólisis medible (no se muestra en la Fig.5) pero a medida que se incrementa gradualmente la concentración de $MgCl_2$ la actividad hidrolítica aumenta también y es máxima a concentraciones de 1mM (con 0.67 mM de PPI fija). De 1 mM a 10mM de $MgCl_2$ añadido al medio, la velocidad de hidrólisis no varía notablemente.

Sin embargo, cuando se mide la reacción de intercambio Pi-PPi en condiciones semejantes se obtiene un comportamiento diferente al anterior. A 1 mM de $MgCl_2$ se obtiene un intercambio bajo (Fig. 5A y B) pero a concentraciones mayores de 1 mM el intercambio se incrementa considerablemente hasta 10 mM de $MgCl_2$ que fue la concentración más alta estudiada (Fig. 5C a E). Si se grafica la relación hidrólisis/intercambio (Fig. 5F) se puede ver que a 0.1 mM de $MgCl_2$ hay 90 moléculas de PPI hidrolizadas por 1 intercambiada, pero cuando la concentración de $MgCl_2$ se aumenta esta relación baja a 20 hidrolizadas por 1 intercambiada, esta variación en la relación anterior, se debe primordialmente a un aumento en la reacción de intercambio.

Para las condiciones del experimento de la Fig. 5, se calcularon las concentraciones de los complejos Mg-PPi, Mg-Pi y de Mg^{2+} libre, los valores así obtenidos se relacionaron con las actividades de hidrólisis e intercambio de la enzima (Fig. 6).



5. Efecto del Mg²⁺ sobre las Reacciones de Intercambio Pi-PPi e Hidrolitica de los Cronatóforos

Las condiciones de incubación son las mismas de la Fig. 4, pero ahora la concentración de MgCl₂ se varió como se indica. La cantidad de BCl fue 100 ug. En F se grafica la relación P Pi asa / Pi-PPi, calculada de los datos de A a E.

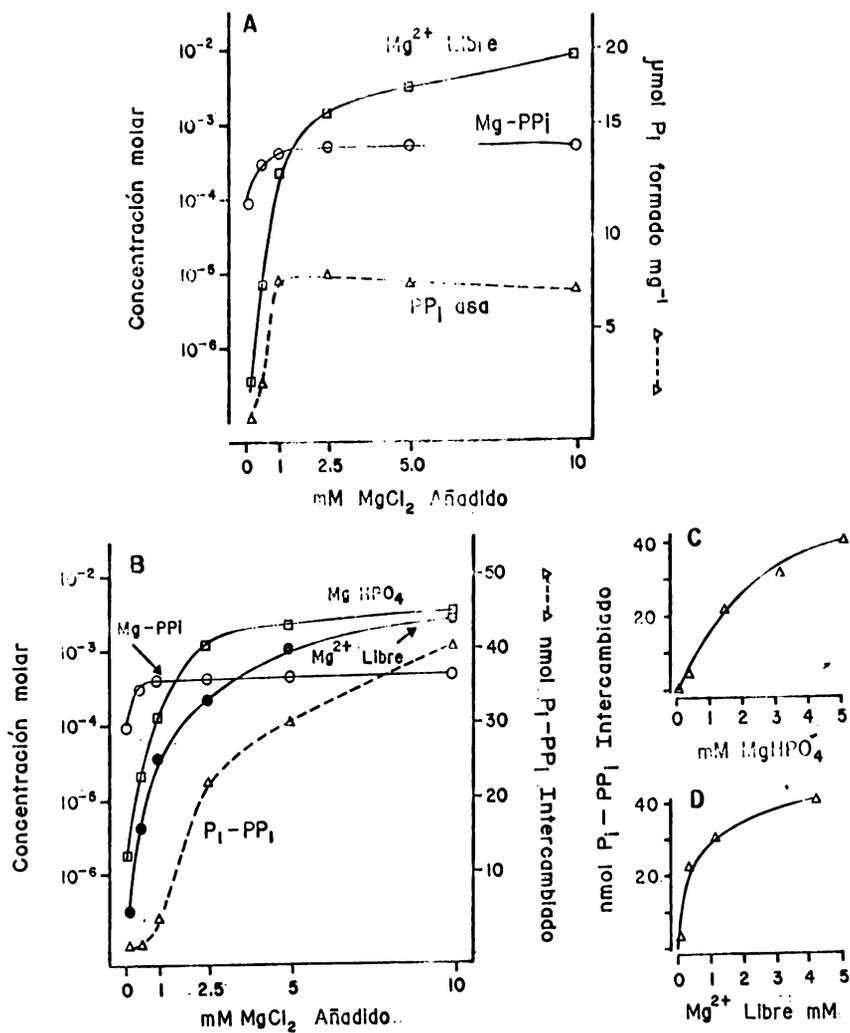


Fig. 5. Efecto de las Concentraciones de Mg libre, $Mg-PPi$ y $MgHPO_4$ sobre la actividad de PPi y de intercambio $Pi-PPi$ de cromatóforos. En A, se grafica, la concentración de Mg^{2+} añadido en el Medio de incubación de la Fig. 5 para la hidrólisis contra las concentraciones calculadas de $Mg-PPi$, Mg^{2+} libre y la hidrólisis de PPi . En B, la concentración de Mg^{2+} añadido en el medio de reacción para el intercambio $Pi-PPi$, de la Fig. 5, se grafica contra las concentraciones calculadas de $Mg-PPi$, Mg^{2+} libre, $MgHPO_4$ y la actividad de intercambio. En C y D se grafica las concentraciones calculadas de $MgHPO_4$ y Mg^{2+} libre contra la actividad de intercambio.

Con respecto a la hidrólisis, se observa que cuando la concentración de MgCl_2 es de 0.5 mM, la concentración del complejo Mg-PPi aumenta y con ella la hidrólisis; a 1 mM de MgCl_2 prácticamente todo el PPi está en forma de complejo Mg-PPi (Fig. 6A) y la actividad hidrolítica aumenta paralelamente en esos rangos de concentración. El hecho de que la hidrólisis varíe en relación con la concentración de Mg-PPi confirma los datos de la literatura (Randahl, 1979) de que el sustrato de la hidrólisis es el complejo Mg-PPi. Cuando la concentración de MgCl_2 añadido al medio aumenta de 1 a 10 mM la hidrólisis no aumenta más, pero sí el Mg^{2+} libre y éste no tiene ningún efecto notable sobre la reacción (2-8% de inhibición). Por otro lado, al analizar la reacción de intercambio Pi-PPi se observa lo siguiente (Fig. 6B):

a) A bajas concentraciones de Mg^{2+} añadido, por abajo de la concentración de PPi (0.67 mM), se obtiene un intercambio muy pobre. En estas condiciones se tiene una alta afinidad del PPi por el Mg^{2+} y, prácticamente, lo atrapa todo, mientras que la concentración del Mg^{2+} libre y del complejo MgHPO_4 permanece en el rango de μM .

b) A medida que la concentración de Mg añadido aumenta por arriba de la del PPi, la concentración de MgHPO_4 se incrementa y concomitantemente la reacción de intercambio, mientras que la concentración del complejo Mg-PPi ahora permanece constante. La dependencia que tiene la reacción de intercambio de la concentración de MgHPO_4 muestra un comportamiento tipo Michaelis-Menten (Fig. 6C) lo cual sugiere que el sustrato real para la reacción de intercambio es el MgHPO_4 . La gráfica de

Lineweaver-Burk (no mostrada) tomada de los datos de la Fig. 6C da una K_m aparente para $MgHPO_4$ de aproximadamente 4.6 mM.

c) Por otra parte, en la Fig. 6B se observa que la concentración de Mg^{2+} libre también afecta a la reacción de intercambio. Al graficar la concentración de Mg^{2+} libre contra la reacción de intercambio (Fig. 6D), la curva que se obtiene parece indicar un efecto activador del Mg^{2+} libre y un comportamiento también del tipo Michaelis-Menten. La K_m aparente que se obtiene para el Mg^{2+} libre de 0.4 mM (la gráfica de Lineweaver-Burk no se muestra).

Para estudiar con más detalle el efecto del $MgHPO_4$ y del Mg^{2+} libre sobre la reacción de intercambio Pi-PPi, se midió esta reacción a 2 concentraciones fijas de $MgCl_2$ añadido (1 y 10 mM) y variando las concentraciones de fosfato (Fig. 7).

La reacción de intercambio se graficó contra la concentración calculada de $MgHPO_4$ y se obtuvo una curva (Fig. 7) diferente a la obtenida en la Fig. 6C. La diferencia entre los dos experimentos es la siguiente: en el de la Fig. 6C la concentración de Mg^{2+} libre se incrementa en paralelo a la del complejo $MgHPO_4$, mientras que en el de la Fig. 7 hay una relación inversa entre la concentración de $MgHPO_4$ y la de Mg^{2+} libre. Como puede observarse en la Fig. 7, el intercambio depende de la concentración de $MgHPO_4$ ya que, a excepción de la concentración más baja de $MgCl_2$ estudiada (1 mM), todas las concentraciones de Mg^{2+} libre se encuentran significativamente arriba de la K_m para Mg^{2+} libre (0.4 mM, Fig. 6D).

Estos experimentos (Fig. 6C y D y Fig. 7) indican que el

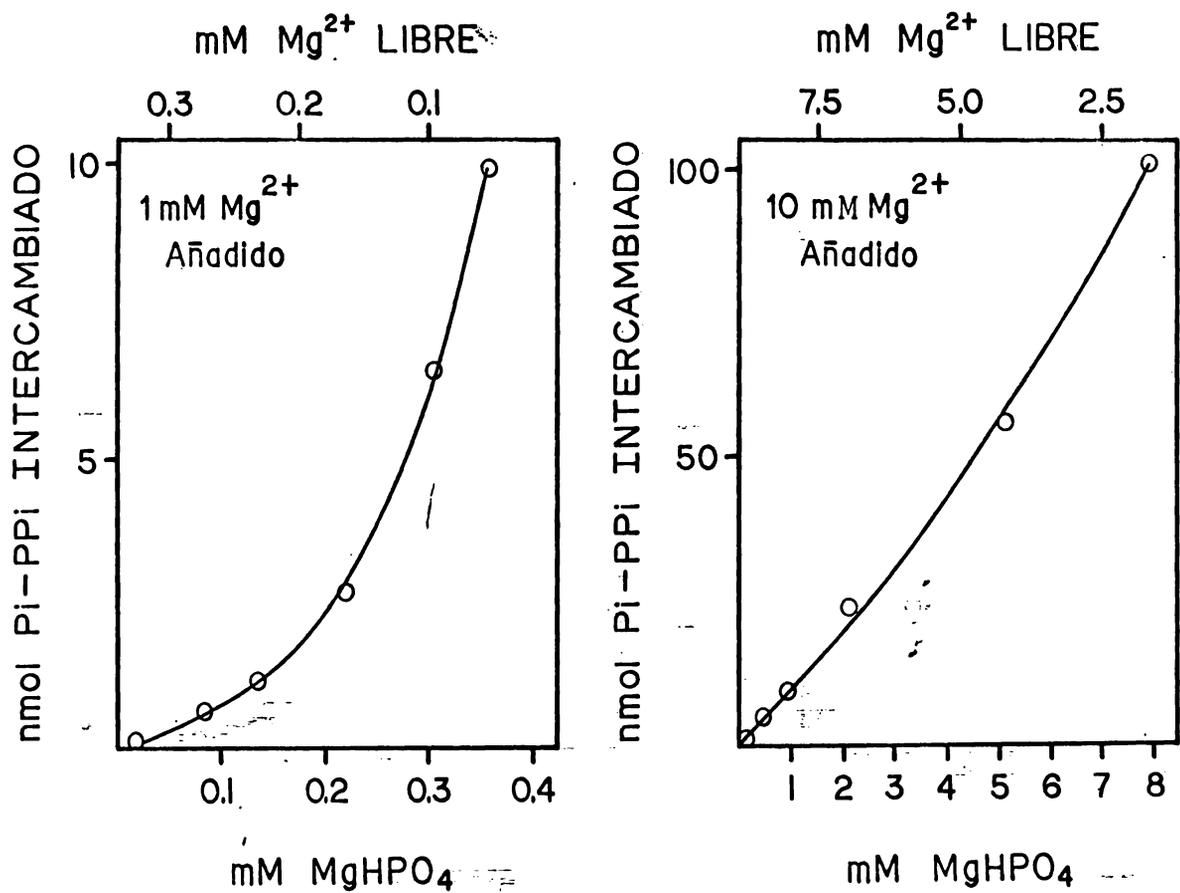


Fig. 17. Dependencia de la Reacción de Intercambio Pi-PPi de las Concentraciones de MgHPO₄ y de Mg²⁺ libre. Las condiciones experimentales son las mismas que las de la Fig. 4., con 100 ug ECl y 5 min de incubación, variando la cantidad de Pi. Se graficó la actividad del intercambio contra las concentraciones calculadas de MgHPO₄ (abscisa inferior) y de Mg²⁺ libre (abscisa superior).

complejo MgHPO_4 es el sustrato para la reacción de intercambio Pi-PPi , y sugieren que el Mg^{2+} libre modula, a la vez, la misma reacción.

De estos resultados es factible pensar que el Mg^{2+} libre se una a la enzima, induciendo un efecto favorable para la reacción de intercambio. Es interesante hacer notar, que en las H^+ ATPasas de Mitocondria [Gómez-Puyou y col., 1983 y Younis y col., 1983], las concentraciones altas de Mg^{2+} provocan un decremento en la relación ATP hidrolizado/ATP intercambiado. Como pudo verse en la Fig. 5F la concentración de Mg^{2+} libre pareció ejercer un control semejante sobre las propiedades catalíticas de la PPiase de cromatóforos.

Por su parte, Younis y col., 1983, reportaron que la H^+ ATPasa purificada de cloroplastos tiene un sitio de unión para Mg^{2+} que modula los mecanismos conservadores de energía de la enzima. Por tanto, es muy posible que las H^+ ATPasas y las PPiases de membrana posean sitios de unión semejantes para Mg que permitan su regulación.

Debido a que la reacción de intercambio depende del gradiente de H^+ formado por la hidrólisis de PPi (Fig. 5), se podría pensar, como una posibilidad al efecto del Mg^{2+} libre, que este catión divalente estuviera modificando la permeabilidad de la membrana a H^+ y de esta forma haciendo a la reacción de intercambio más eficiente. Con el objeto de descartar esta posibilidad se determinó el corrimiento electrocrómico del caroteno [Baltscheffsky, 1969a], que es un monitor interno del potencial eléctrico. La magnitud del corrimiento electrocrómico del caroteno producido por la hidrólisis de PPi en oscuridad es

el mismo a 1 ó a 10 mM de $MgCl_2$ añadido (no se muestran los trazos). Por tanto, se puede concluir que el efecto del Mg^{2+} sobre la reacción de intercambio es determinar las concentraciones del sustrato real ($MgHPO_4$) y de Mg^{2+} libre, para que de esta forma module las características cinéticas de la enzima y no a través de modificar la permeabilidad de la membrana de los cromatóforos.

3.3 EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE PIROFOSFATO EN LAS REACCIONES DE HIDROLISIS E INTERCAMBIO P_i - PP_i DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA.

En el experimento de la Fig. 8, se midió la reacción de intercambio P_i - PP_i en función del tiempo a dos concentraciones de PP_i (1 y 5 mM). Como puede observarse, en los minutos iniciales, la velocidad de intercambio fue más alta con 1 mM de P_i . Después, con esta misma concentración, la velocidad declina seguida por una disminución en la cantidad de PP_i radioactivo, esto último debido a la hidrólisis total del PP_i añadido, como se infiere por la cantidad de hidrólisis, la cual se determinó pero, no se muestra en la Fig. 8 para mayor claridad. Con 5 mM de PP_i la velocidad inicial es baja, pero posteriormente aumenta (Fig. 8), para evaluar estos datos se debe hacer notar que, a 20 min de incubación, cerca del 50 y 20 % de PP_i se ha hidrolizado ya, a 1 y 5 mM de PP_i añadido respectivamente (datos no mostrados).

De los resultados anteriores es claro que existe una

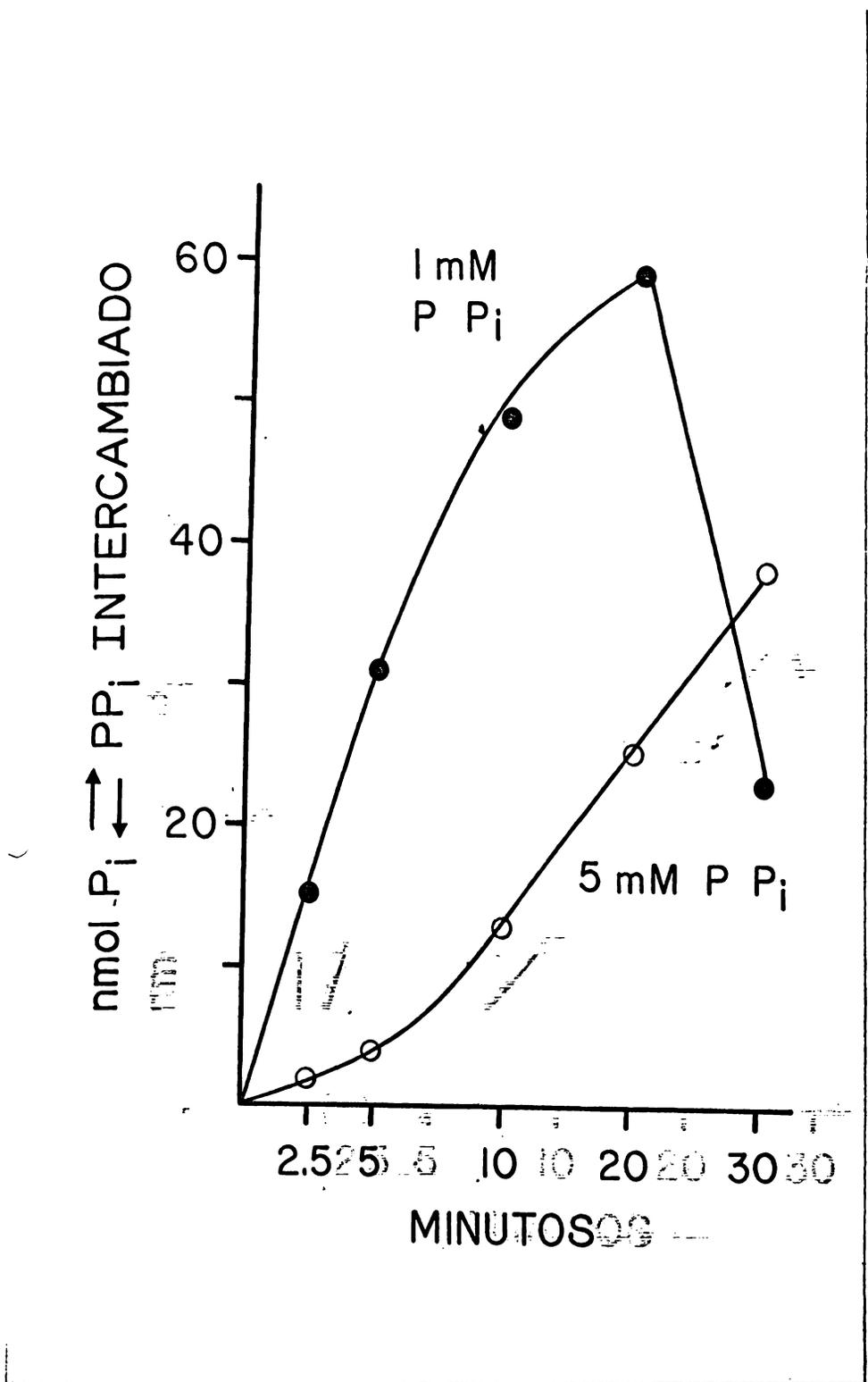


Fig. 8. Curvas de Tiempo de la Reacción de intercambio Pi-PPi a Diferentes Concentraciones de P Pi. El medio de incubación es el mismo de la Fig. 5, excepto que aquí se usaron dos concentraciones de P Pi (1 y 5 mM) y MgCl₂ en 10 mM.

concentración óptima de PPI para la reacción de intercambio Pi-PPI. Para explorar un poco más esto, se diseñó el experimento que se muestra en la Fig. 9. En ella, se presenta la reacción de intercambio Pi-PPI de la PPIasa de cromatóforos a varias concentraciones de PPI añadido, como función del tiempo. Se midió también la reacción de hidrólisis y se graficó como el porcentaje de PPI hidrolizado.

En el caso de la reacción de intercambio, a 2.5 min ésta se incrementa cuando aumenta la concentración de PPI añadido de 50 a 240 μM . Sin embargo, a 2.5 min, en el caso de la más baja concentración de PPI utilizada, más del 90% de PPI ya había sido hidrolizado, es pues posible que a las concentraciones más bajas de PPI, la cantidad de intercambio sea mayor. A concentraciones de PPI añadido más altas de 240 μM a 2.5 min de incubación, la cantidad de intercambio decrece. Sin embargo, conforme el tiempo de incubación se incrementa, la concentración de PPI en la cual se obtiene el máximo de intercambio, se desplaza a valores mayores.

Los datos de las Figs. 8 y 9 sugieren fuertemente que la reacción de intercambio Pi-PPI tiene una concentración óptima para PPI. No obstante, la concentración óptima exacta es difícil de determinar porque aparentemente está en el rango de μM y porque además los cromatóforos tienen una alta actividad hidrolítica en la oscuridad. El experimento de la Tabla 3 estudia la reacción de intercambio a 1 min de tiempo de incubación y con una actividad específica alta de ^{32}Pi . Los resultados se relacionaron con las concentraciones calculadas del complejo Mg-PPI , MgHPO_4 y Mg^{2+} libre. El intercambio más

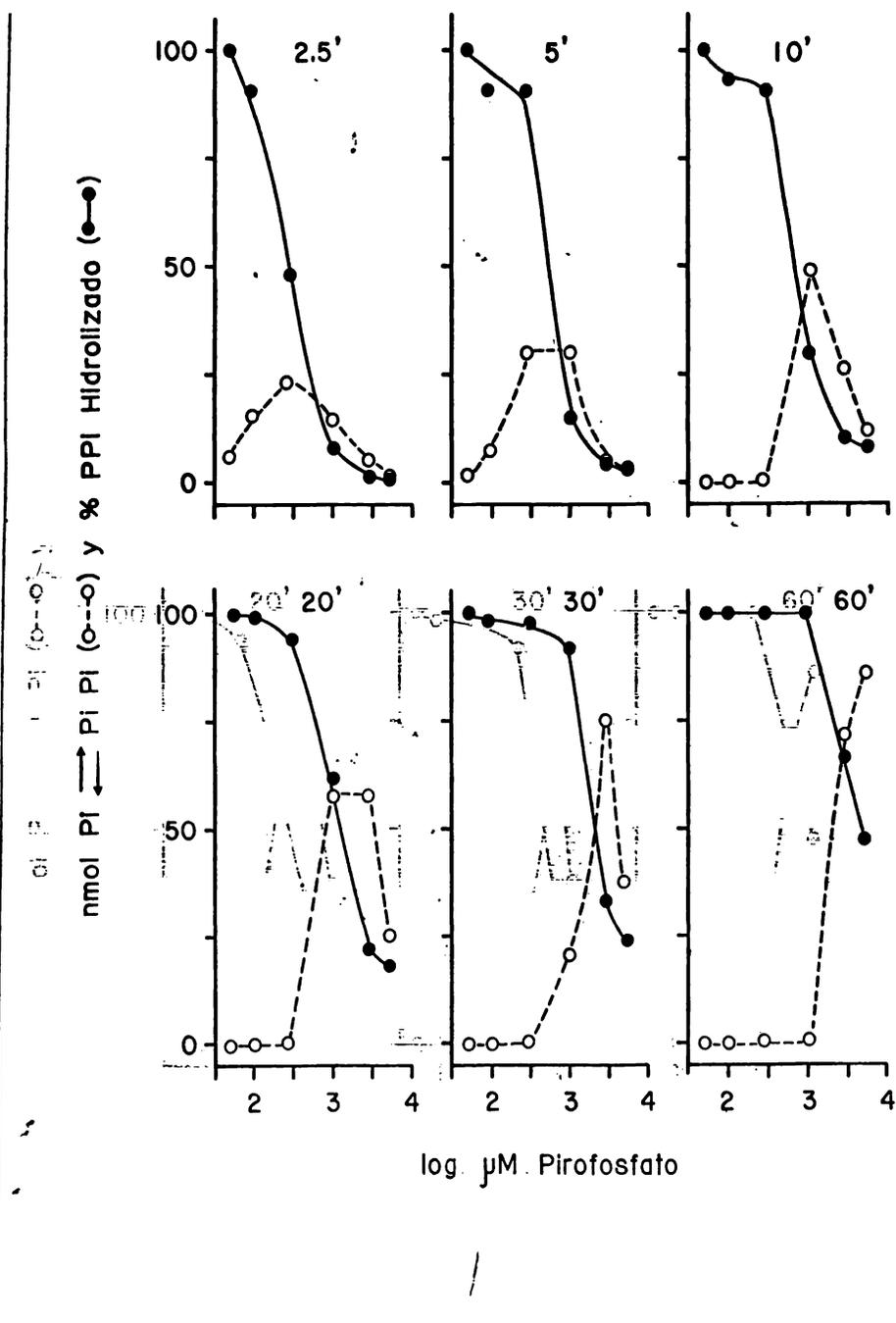


Fig. 9. La Reacción de Intercambio de Pi-PPI y la de Hidrólisis en función de tiempo a Concentraciones variables de PPI.

Las condiciones de experimentación son las mismas de la Fig. 4., excepto que la concentración de Mg^{2+} es 10 mM y la concentración de PPI se varió como se indica. Los tiempos de incubación también se señalan. Las ordenadas representan tanto nmoles de Pi-PPI intercambiado (o) como el porcentaje de PPI hidrolizado (●).

Tabla 3. Efecto del Pirofosfato sobre la Reacción de Intercambio Pi-PPi de Cromatóforos.

PPi añadido (mM)	Pi-PPi intercambiado (nmol)	PPi Hidrolizado (%)	Mg-PPi	Concentraciones Calculadas (mM)	
				Mg ²⁺ libre	MgHPO ₄
0.055	23	81	0.0549	4.64	5.29
0.1	28	85	0.099	4.61	5.28
0.24	30	44	0.239	4.49	5.26
0.67	24	15	0.669	4.15	5.17
1.0	20	5	0.999	3.90	5.09
2.4	12	3	2.39	2.89	4.70

Nota. Las condiciones de incubación, son las mismas de la Fig. 4, con 100 ug de BCl excepto que la concentración de PPi añadido se varió como se indica. El tiempo de incubación fue de 1 min.

alto se obtuvo a 240 uM de PPI añadido. Hay que hacer notar que, bajo las condiciones del experimento de la Tabla 3, y dentro del rango de 0.055 a 2.4 mM de PPI añadido, las concentraciones de MgHPO_4 y Mg^{2+} libre varían, pero en un grado que no afecta significativamente la reacción de intercambio (ver Fig. 6). Por lo tanto, los cambios de velocidad de la reacción de intercambio descritos en la Tabla 3, deben ser adscritos a variaciones en la concentración del complejo Mg-PPI.

Es importante subrayar que los datos mostrados en las Figs. 8 y 9, no han sido corregidos por la dilución del fosfato radioactivo, debida al fosfato derivado de la hidrólisis de PPI. A concentraciones bajas de PPI añadido el factor de dilución no es significativo, pero a las dos últimas concentraciones de PPI añadido este factor de dilución puede ser considerado importante. Sin embargo, la dilución más alta que teóricamente se puede obtener es de 10 mM de Pi (cuando hay 5 mM de PPI añadido, porque por cada PPI hidrolizado se obtienen 2 fosfatos), pero esto sería si todo el PPI se hidroliza. Por tanto, el factor de dilución no puede dar lugar a las diferencias de toma de ^{32}Pi a las concentraciones de PPI que se emplearon en los experimentos de las Figs. 8 y 9, particularmente a tiempos cortos de incubación; en donde, aún a concentraciones altas de PPI, sólo un pequeño porcentaje de PPI se hidrolizó.

La reacción de intercambio se ve regulada por la concentración de Mg-PPI. Esta reacción requiere necesariamente la hidrólisis reversible de PPI en el sitio catalítico y la

liberación del PPI formado al medio. Por tanto, es muy posible que los altos valores de intercambio observados a bajas concentraciones de Mg-Pi se deben a la existencia de una concentración de Mg-PPI casi o totalmente saturante para la hidrólisis; pero que al mismo tiempo, no impide la liberación del producto del intercambio (Mg-PPI) del sitio catalítico. Cualquier variación de la concentración de Mg-PPI resultaría en una disminución del intercambio, ya sea a través de una disminución de la hidrólisis o en un decremento en la liberación del producto Mg-PPI.

En relación a esto, Gresser y col., 1982, han reportado que en la ATPasa de corazón, la cantidad de Pi marcado por ^{18}O a partir de H_2^{18}O que proviene de la hidrólisis de ATP es mayor que a concentraciones bajas de ATP. Aparentemente bajas concentraciones de sustrato inducen en la enzima un estado en el que la reversa de la hidrólisis se incrementa, este podría ser un mecanismo que funcionara también en la PPIasa de Rs. rubrum.

3.4 EFFECTO DEL pH SOBRE LAS REACCIONES DE INTERCAMBIO Pi-PPI E HIDROLITICA DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA.

Como se ha visto anteriormente, en presencia de 0.67 mM de PPI, la reacción de hidrólisis y de intercambio a pH 8 es función de la concentración de MgCl_2 . La hidrólisis es máxima a 1 mM de MgCl_2 añadido, pero en condiciones similares la reacción de intercambio Pi-PPI llega a su máximo valor a 10 mM de MgCl_2 . Para estudiar el efecto del pH sobre estas dos reacciones se fijó la concentración de MgCl_2 (10 mM) y se midieron a varios pH (Fig. 10 A). La hidrólisis tiene un pH óptimo entre pH 6 y 7,

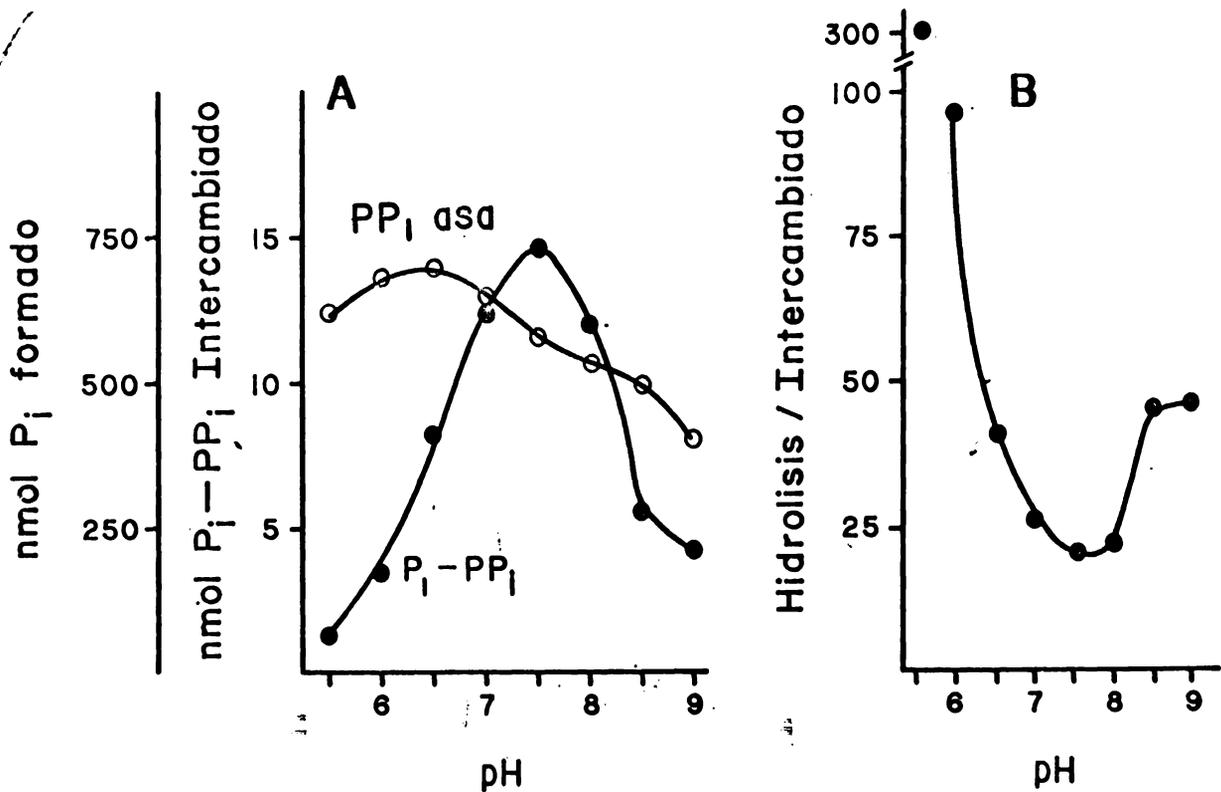


Fig. 10. Efecto del pH sobre la Reacción de Hidrólisis de PP_i y sobre el Intercambio P_i - PP_i de cromatóforos. En A, la hidrólisis de P_i (○) se midió en las siguientes condiciones experimentales: Tris 50 mM ajustado a diferentes pH con ácido maléico, PP_i -Na 0.67 mM a pH 8.0, $MgCl_2$ 10 mM y BCl 100 ug. El tiempo de incubación fue 5' a 25°C en la oscuridad. La reacción de intercambio P_i - PP_i (●) se midió bajo las mismas condiciones pero el medio también contaba 6.7 mM de P_i -Tris ajustado a los pH indicados y 10^6 cpm de P_i^{32} . En B se grafica la Relación Hidrólisis/Intercambio.

mientras que el intercambio es muy bajo a este pH y tiene su máximo valor a pH 7.5, en tanto que a pH más altos el intercambio baja. A las concentraciones de cromatóforos usadas para estos experimentos y a 5 min de incubación, aproximadamente el 50-60% del PPI añadido se hidroliza, o sea, que los máximos alcanzados no se deben a falta de sustrato, este tiempo coincide con el intercambio más alto (Fig. 4, 100 ug BCl). Una gráfica de la relación entre PPI hidrolizado/PPI intercambiado (Fig. 10B) indica que existe un marcado cambio de las propiedades cinéticas de la enzima por el pH; esto es, a pH 5 esta relación es de 100, mientras que a pH 7.5 y 8 es de 20. Dado que a los pH ensayados no hay una variación considerable de $MgHPO_4$ y sin embargo la actividad de intercambio sí se modifica, podemos atribuir esta modulación de la actividad a la concentración de H^+ en la mezcla de incubación. Es entonces aparente que las propiedades cinéticas de la enzima son moduladas por el pH el medio y por la cantidad de Mg^{2+} libre como ya se mencionó anteriormente.

Debido a que el PPI tiene cuatro H^+ dissociables, es interesante conocer cual de sus formas es el sustrato para la hidrólisis. Para este propósito se hicieron cálculos en la computadora de las formas posibles del PPI, considerando las 4 constantes de asociación de H^+ con PPI^{-4} , el programa usado permite hacer estos cálculos a todos los pH. Los resultados de este tipo de análisis se presentan en la Tabla 4. Como se puede ver, al pH donde la reacción de hidrólisis es máxima (pH 6-7) la forma predominante es el PPI^{3-} , pero cuando este quela al Mg^{2+} se libera un H^+ (Cooperman, 1982) quedando como sustrato real el

Tabla 4. Concentraciones Calculadas de las Formas del PPI a Diferentes pHs.

$$\begin{aligned} (\text{PPI})_{\text{TOTAL}} &= 0.67 \text{ mM} \\ &= 6.7 \times 10^{-4} \text{ M} \end{aligned}$$

TIPO DE COMPLEJO:

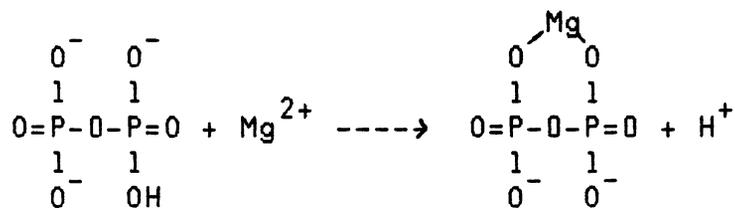
pH	$[\text{PPIH}_3^{3-}] \text{ M}$	$[\text{PPI}^{4-} (\text{LIBRE})] \text{ M}$
5.5	6.68×10^{-4}	1.06×10^{-6}
6.0	6.66×10^{-4}	3.34×10^{-6}
6.5	6.59×10^{-4}	1.04×10^{-5}
7.0	6.38×10^{-4}	3.19×10^{-5}
7.5	5.78×10^{-4}	9.10×10^{-5}
8.0	4.46×10^{-4}	2.23×10^{-4}
8.5	2.59×10^{-4}	4.10×10^{-4}
9.0	1.11×10^{-4}	5.58×10^{-4}

LAS CONCENTRACIONES DE LA FORMA PPIH_2^{2-} ESTAN EN EL RANGO DE 10^{-11} A 10^{-16} M.

LAS DE LA FORMA PPIH_3^{-} EN EL RANGO DE 10^{-20} A 10^{-28} M.

LAS DE LA FORMA PPIH_4 EN EL RANGO DE 10^{-26} A 10^{-37} M.

complejo Mg-PP⁻²



Como un intento de determinar el mecanismo por el cual las propiedades cinéticas de la PPIasa se ven moduladas por el pH, se llevaron a cabo los experimentos presentados en las Fig. 11 y 12. En ellos, se midió la reacción de intercambio a dos pH y se varió la concentración de MgCl₂ y Pi añadido al medio.

A todas las concentraciones de MgCl₂ estudiadas (Fig. 11 A) la actividad a pH 8 es más alta que a pH 6.5. La curva que describe el proceso a pH 8 es del tipo Michaelis-Menten con una Km aparente para el Mg²⁺ libre de 0.13 mM. En cambio a pH 6.5, la gráfica de dobles recíprocas no es lineal e indica una cooperatividad negativa (Fig. 11B), su Km, extrapolada, para Mg²⁺ libre, es de 1.2 mM. Tentativamente y tomando en cuenta previos experimentos de este trabajo (fig. 6D), se podría decir que la unión del Mg²⁺ a la enzima es facilitada a pH básico (pH 8).

La gráfica de Lineweaver Burk de la reacción de intercambio a varias concentraciones de MgHPO₄ y a dos pH: 6.5 y 8.0, se presenta en la Fig. 12. La Km para MgHPO₄ fue de 26 mM a pH 6.5 y de 8 mM a pH de 8.0

En ambos experimentos (Fig. 11 y 12) el pH afecta principalmente a la Km para MgHPO₄ y para Mg²⁺ libre pero sin cambio apreciable en la Vmax., esto nos está indicando una

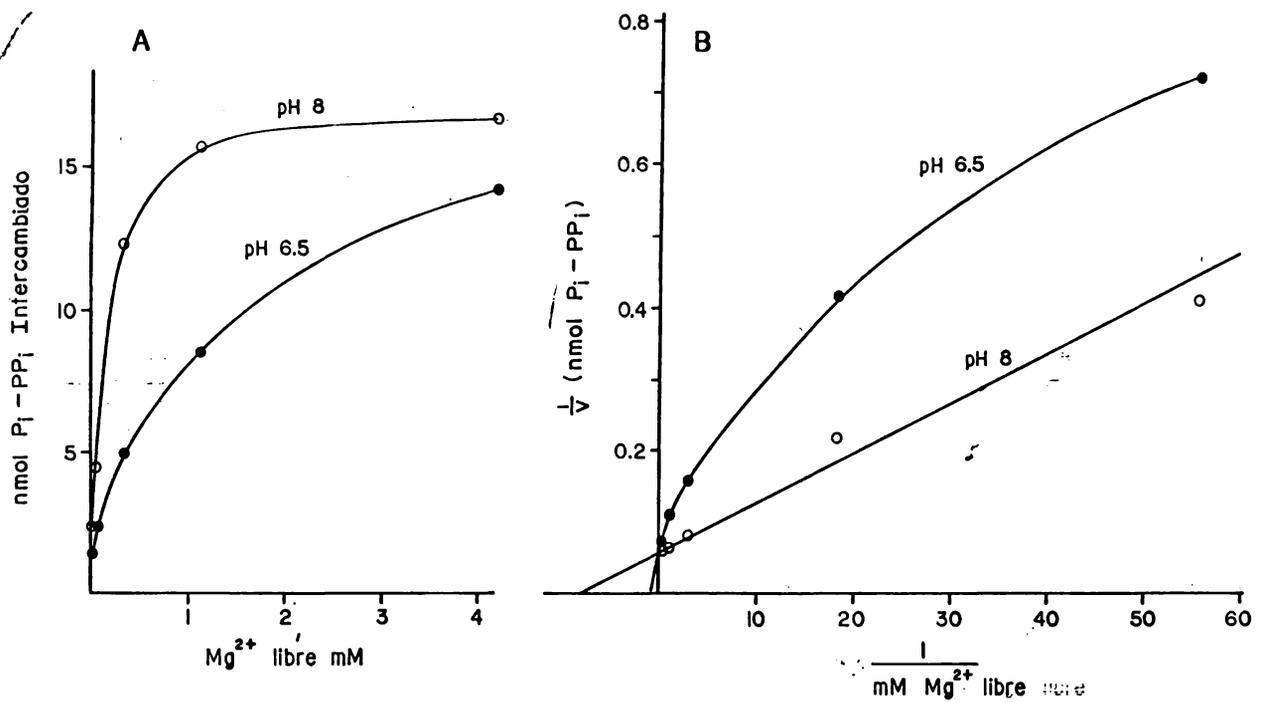


Fig. 11. Efecto del Mg sobre la Reacción de Intercambio Pi-PPi a pH 6.5 y pH 8.0

En el panel A se grafica la reacción de Intercambio Pi-PPi contra la concentración calculada de MgCl₂ libre. El medio de reacción fue el mismo que en el panel A de la Fig. 10 y el tiempo de incubación fue 1.5 min. En B tenemos la gráfica de Lineweaver-Burk obtenida de los datos de A.

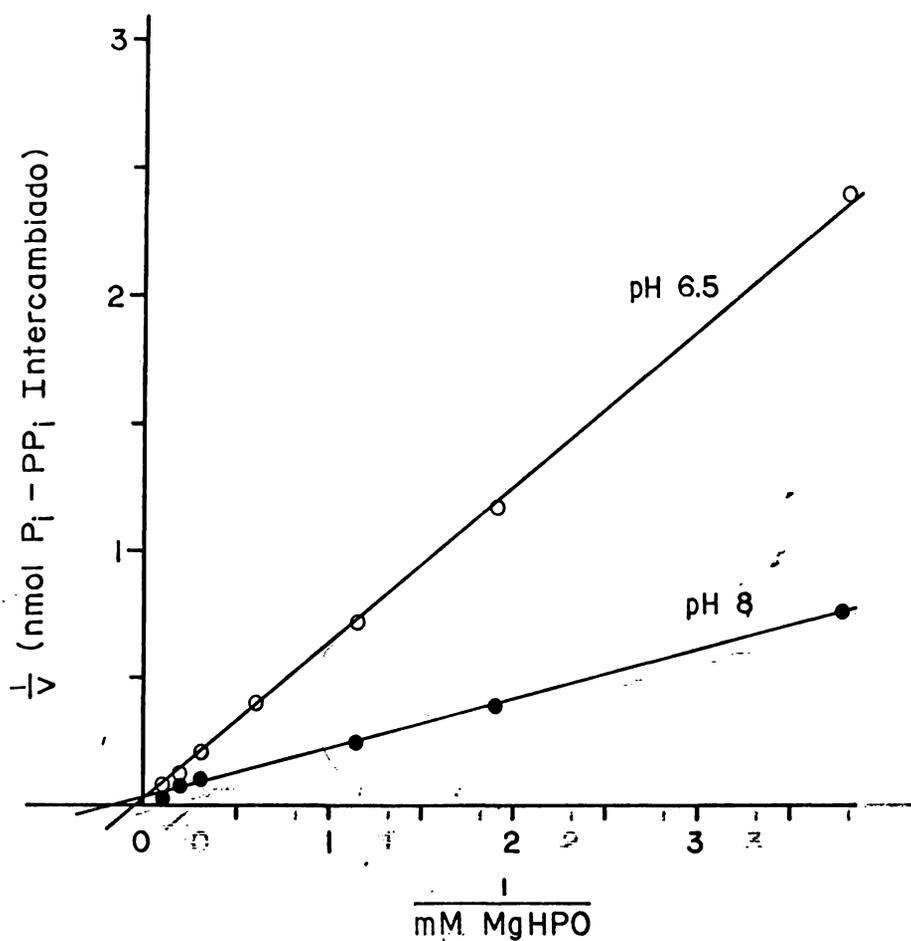


Fig. 12. Efecto de Diferentes Concentraciones de $MgHPO_4$ sobre la Cinética de la Reacción de Intercambio P_i - PP_i .

Gráfica de Lineweaver-Burk de la reacción de Intercambio P_i - PP_i en función de la concentración calculada de $MgHPO_4$. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Fig. 10 pero variando la concentración de P_i a pH 6.5 y pH 8.0.

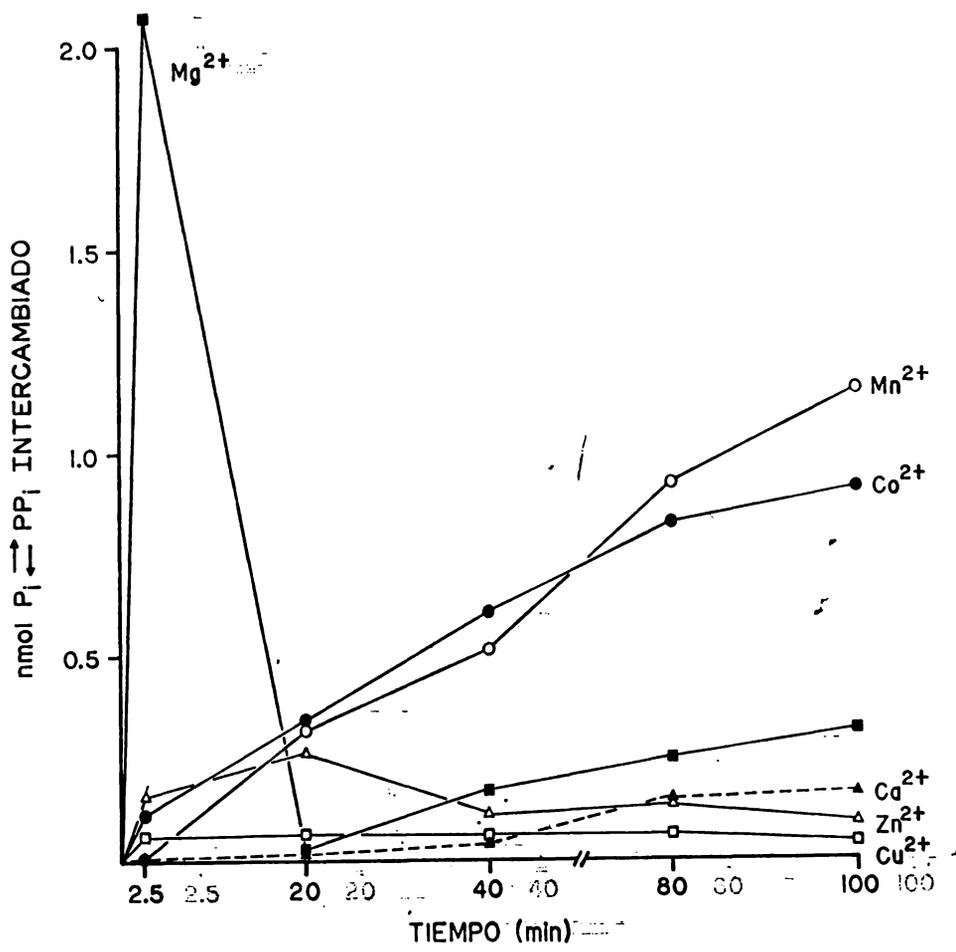
posible inhibición competitiva del H^+ sobre la enzima en un sitio de naturaleza aniónica en el cual el Mg^{2+} libre podía interaccionar.

3.5. EFFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES EN LA REACCION DE INTERCAMBIO Pi-PPi.

Como se mencionó anteriormente, el sustrato real de la reacción de intercambio es el complejo $MgHPO_4$. Sin embargo, no se ha explorado en detalle si otros cationes divalentes pueden sustituir al Mg^{2+} en la reacción de intercambio Pi-PPi, así como en la hidrólisis. Por tanto, para estudiar esta posibilidad, se llevó a cabo el experimento de la Fig. 13, a pH 8 y en presencia de diferentes cationes divalentes (Mg, Zn, Ca, Mn, Co y Cu) a una concentración fija de 1 mM. Se eligió 1 mM porque a más altas concentraciones se detectaron precipitados, los cuales se determinaron por nefelometría (ver Métodos).

Como puede verse, en la Fig. 13 y, de acuerdo a los datos obtenidos anteriormente (Fig. 5), el $MgCl_2$ a 1 mM genera un intercambio que con el transcurso del tiempo decrece; de todos los demás cationes utilizados, únicamente el Mn^{2+} y el Co^{2+} pueden mantener la reacción de intercambio pero sólo en un 50% del total producido por el Mg^{2+} y de una manera más lenta.

Del experimento anterior se demuestra que los cationes divalentes estudiados son pobres sustitutos del Mg^{2+} en la reacción de intercambio, sin embargo, es posible que estos estén ejerciendo una acción inhibitoria sobre la reacción. Para explorar esta posibilidad se hizo el experimento de la Fig. 14, en el cual los cromatóforos se incubaron en presencia de 10 mM



g. 13. Efecto de los Cationes Divalentes sobre la Reacción de Intercambio Pi-PPi de la PPIasa de Membrana de Cromatóforos. El medio de incubación contenía: Tris maleato 50 mM pH 8, PPI-Na 0.67 mM pH 8, Pi-Tris 1 mM pH 8, Pi ³² 10⁶ cpm, 1 mM del respectivo catión divalente y 100 ug BCl. Se incubó a los tiempos indicados a 25°C. Los cromatóforos empleados se lavaron dos veces, en primer lugar con Tris-Cl 10 mM, EDTA 5 mM pH 7.5 y posteriormente con Tris-Cl 10 mM pH 7.5 solamente. Estos lavados tienen como fin quitar todos los posibles cationes divalentes que tuviera la preparación.

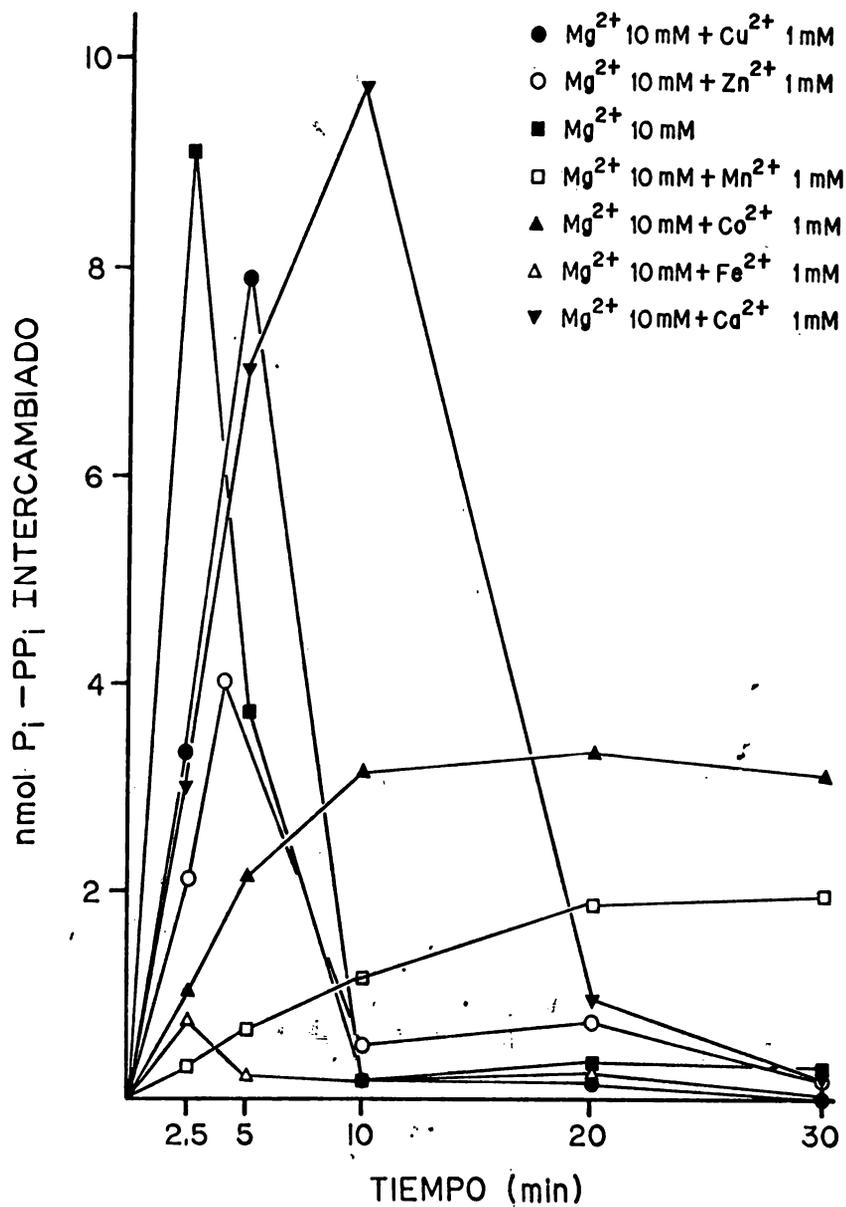


Fig. 14. Efecto de los Cationes Divalentes sobre la Reacción de Intercambio Pi-PPi en Presencia de Altas Concentraciones de MgCl₂.

Las condiciones experimentales son las mismas de la Fig. 13, excepto que se agregó 10 mM de MgCl₂.

de MgCl_2 , donde la reacción de intercambio es máxima (asegurando así suficiente sustrato Mg-PPi y MgHPO_4) y con 1 mM de los diferentes cationes divalentes. Con MgCl_2 solamente, se obtiene a los pocos minutos una alta actividad de intercambio, seguido, como ya se ha visto (Fig. 4), de un decremento debido a la hidrólisis de PPi . En presencia de 10 mM de MgCl_2 el Ca^{2+} y el Cu^{2+} no modifican el total de la reacción de intercambio, sólo la hacen un poco más lenta; el Mn^{2+} y el Co^{2+} inducen un intercambio muy limitado; y, finalmente, el Zn^{2+} y el Fe^{2+} inducen una inhibición muy grande de la reacción de intercambio.

3.6. EFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES EN LA REACCION DE HIDROLISIS DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA.

En la literatura (ver Introducción pág. 28) se ha descrito que los cationes divalentes como el Co^{2+} , el Zn^{2+} y el Mn^{2+} son pobres sustitutos del Mg^{2+} en la hidrólisis de PPI o en reacciones que dependen de ésta; pero en estos estudios los cationes divalentes fueron usados a una sólo concentración. Por lo tanto, se investigó el efecto de varios cationes divalentes (en general, los que forman parte de los oligoelementos del medio de cultivo, ver sección de Métodos), a varias concentraciones y a pH 6.5. Estos experimentos se muestran en la Fig. 15.

El Zn^{2+} a concentraciones bajas produce una hidrólisis de PPI en una cantidad comparable a la obtenida con Mg^{2+} a concentraciones altas. El Co^{2+} produce una hidrólisis que alcanza aproximadamente el 50% de la obtenida con Mg^{2+} ó Zn^{2+} , y el Mn^{2+} sólo da un 20% del máximo. Otros cationes (Ca^{2+} , Cu^{2+} , etc. ver Fig. 15) no producen una hidrólisis de PPI medible, a ninguna concentración probada. Es interesante notar que el Zn^{2+} y el Co^{2+} producen curvas de hidrólisis máxima y ésta decrece hacia arriba y hacia abajo de la concentración máxima. El Zn^{2+} a pH 8.0 no produce una hidrólisis importante (datos no mostrados). Esta es la razón por la cual Baltscheffsky, 1969b, encontró que el Zn^{2+} y Co^{2+} sustituyen muy pobremente al Mg^{2+} en la reversa del transporte de electrones producida por PPI, ya que ella utiliza un pH de 7.4, y una concentración de 2.5 mM de los cationes.

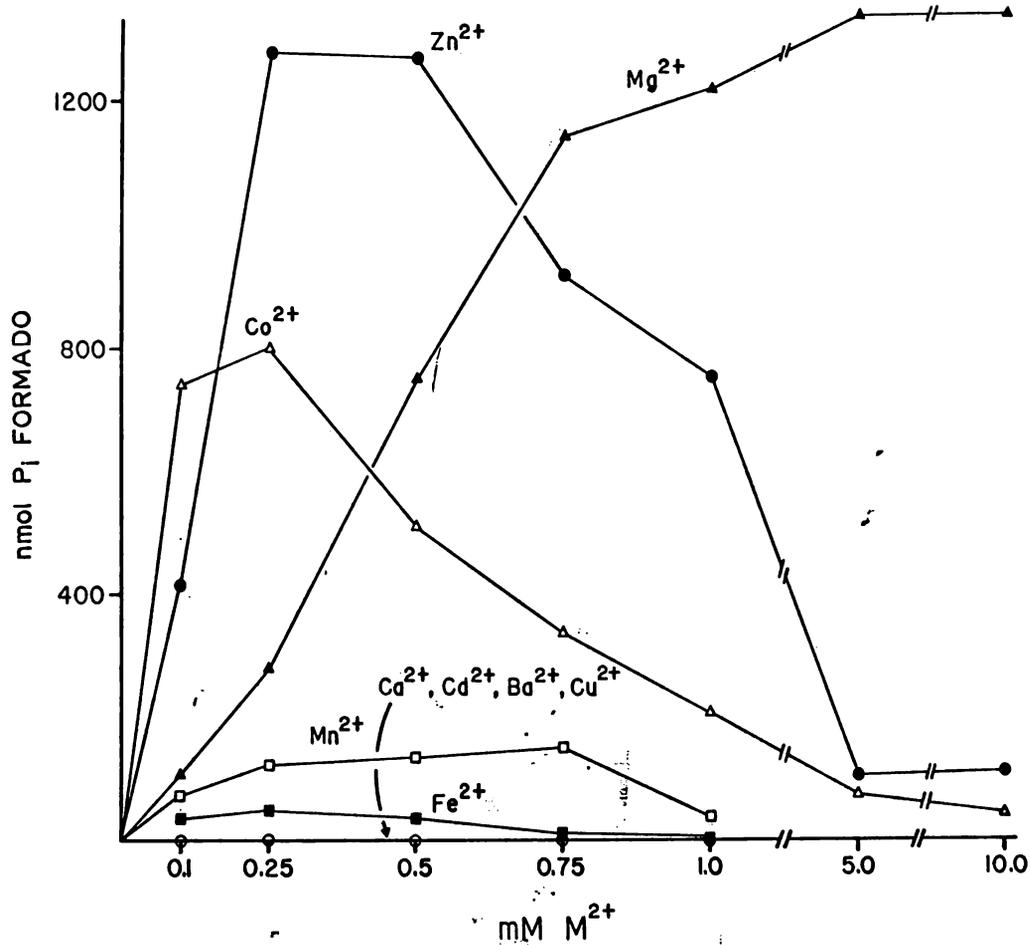


Fig. 15. Efecto de Diferentes Concentraciones de Cationes Divalentes sobre la Actividad Hidrolítica de la PPIasa de Membrana de Cromatóforos.

Las condiciones del medio de reacción son: Tris-maleato 50 mM pH 6.5, PPI-Na 0.67 mM pH 8.0; la concentración indicada de los cationes divalantes se añadió 15 seg antes de iniciar la reacción con 100 ug de BCl. El tiempo de incubación fue 5 min a 25°C y se utilizaron cromatóforos lavados, como en la Fig. 13.

Por otra parte, es importante hacer notar que a pesar de que el Cu^{2+} tiene una constante de asociación por el PPI muy parecida a la del Mg^{2+} ($\log K_s=6.2$ para PPI/Cu Martell y Sillén, 1971) no es sustrato el complejo Cu-PPI para la hidrólisis.

Para llevar a cabo un análisis, un poco más detallado al respecto de estos resultados, los cationes se dividieron en dos grupos. En uno se agruparon aquellos cationes que permiten la hidrólisis de PPI y a altas concentraciones inhiben la actividad (Zn^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+}); y en otro, aquellos que no producen hidrólisis a ninguna concentración (Ca^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+} , y Cu^{2+}). De cada grupo se escogieron algunos para estudiarlos en detalle.

CATIONES QUE AL FORMAR COMPLEJO CON PPI SE HIDROLIZAN Y A ALTAS CONCENTRACIONES INHIBEN LA ACTIVIDAD.

Zn^{2+}

Con respecto a la acción bifásica del Zn^{2+} sobre la PPIasa de membrana, existen las siguientes posibilidades: A) el Zn^{2+} libre es inhibidor, y B) la especie inhibitoria es el complejo Zn-PPI-Zn. En un intento para diferenciar entre estas posibilidades se graficó la actividad hidrolítica, las concentraciones calculadas de complejo Zn-PPI y Zn^{2+} libre contra la concentración añadida de ZnCl_2 en la mezcla que contenía cromatóforos y PPI a 0.67 mM (Fig. 16).

Como se puede observar en la Fig. 16, todo el Zn^{2+} forma complejo con el PPI, pero hasta concentraciones equimolares de Zn^{2+} y PPI, debido a la alta constante de asociación del Zn^{2+} por el PPI ($\log K_s=11.66$, Martell y Sillén, 1971). La actividad

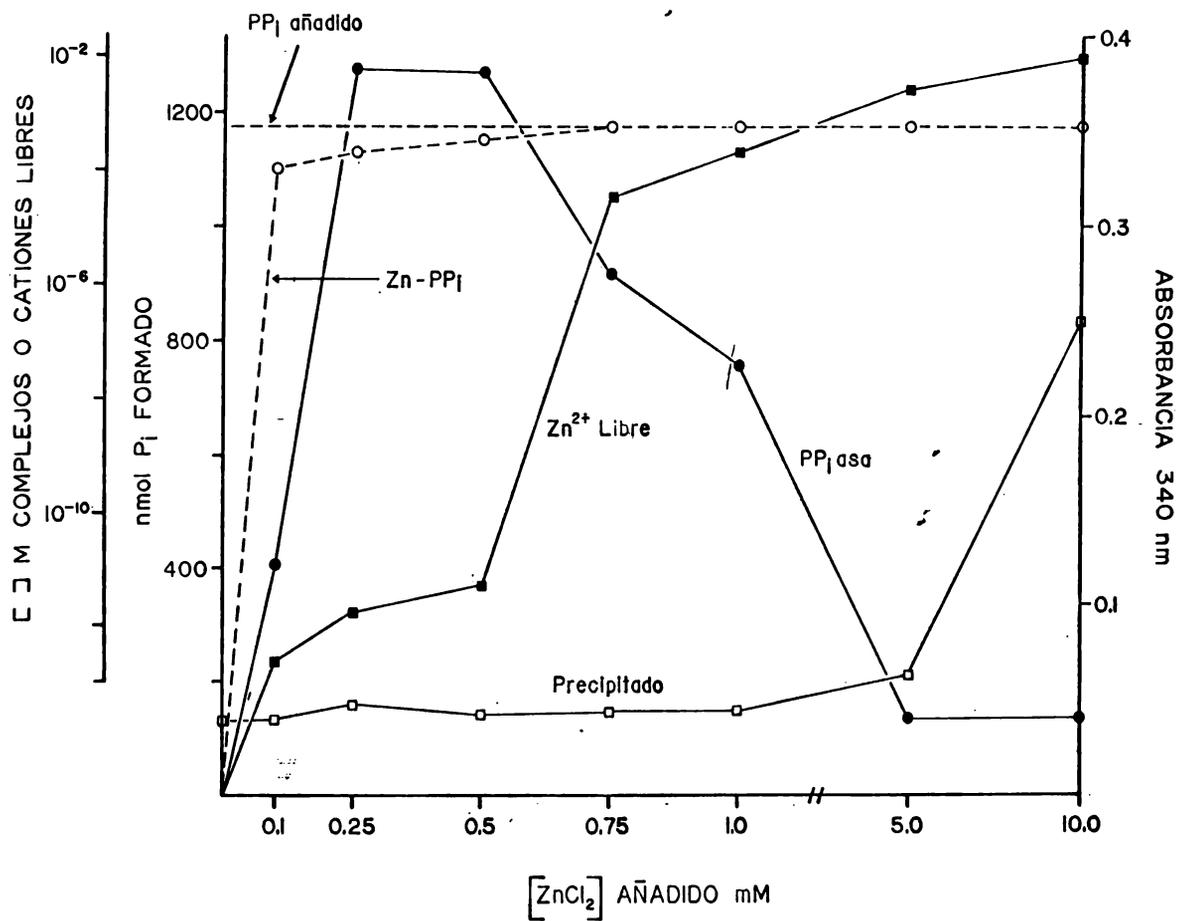


Fig. 16. Dependencia de la Reacción Hidrolítica de las Concentraciones del Complejo Zn-PPi y Zn²⁺ libre.

La concentración de ZnCl₂ añadido en la mezcla de reacción (en las mismas condiciones de la Fig. 15) se graficó contra: La actividad Hidrolítica (-●-), las concentraciones calculadas de Zn-PPi (-○-) y Zn²⁺ libre (-■-), y la formación de precipitado (-□-) medida como la absorbancia a 340 nm bajo las condiciones de la reacción. Se indica (---) el total de PPI añadido.

hidrolítica a estas concentraciones de complejo Zn-PPi es máxima, lo que indica que el complejo Zn-PPi es un buen sustrato para la enzima. Sin embargo, a medida que la concentración de Zn^{2+} libre aumenta, la actividad hidrolítica decrece con un coeficiente de correlación lineal de 0.87 y potencial de 0.98. Esto sugiere que el Zn^{2+} libre es la especie inhibitoria.

Por otra parte, el efecto inhibitorio también podría deberse a la formación del complejo Zn-PPi-Zn que se formaría a altas concentraciones de Zn^{2+} y que es altamente precipitable. En la fig. 16, se muestra también la medida de la precipitación del sistema, determinada por nefelometría (340 nm). Se observa que no hay precipitación, sino hasta a altas concentraciones de $ZnCl_2$ añadido (10 mM). Esto puede explicar la inhibición a esta alta concentración, pero es importante aclarar que a 5 mM de $ZnCl_2$ añadido, existe formación de precipitados, pero sólo son detectables hasta después de 5-7 min de incubación con el catión divalente. Por esta razón, los experimentos descritos se realizaron añadiendo el catión a la mezcla de incubación 15 seg. antes de la adición de los cromatóforos y el tiempo de incubación se limitó a 5 min.

Con el tipo de análisis empleado en la Fig. 16, no es posible definir si el complejo Zn-PPi-Zn se forma a altas concentraciones de $ZnCl_2$ añadido. Por lo tanto, se hicieron los experimentos de conductimetría, reportados en la Fig. 17. Como se puede observar en ella, a medida que se adiciona el $ZnCl_2$ hay un incremento lineal de la conductividad. en presencia de 0.67 mM de PPi y sin $ZnCl_2$ se obtiene una conductividad inicial más alta, debida a la conductividad producida por la presencia del

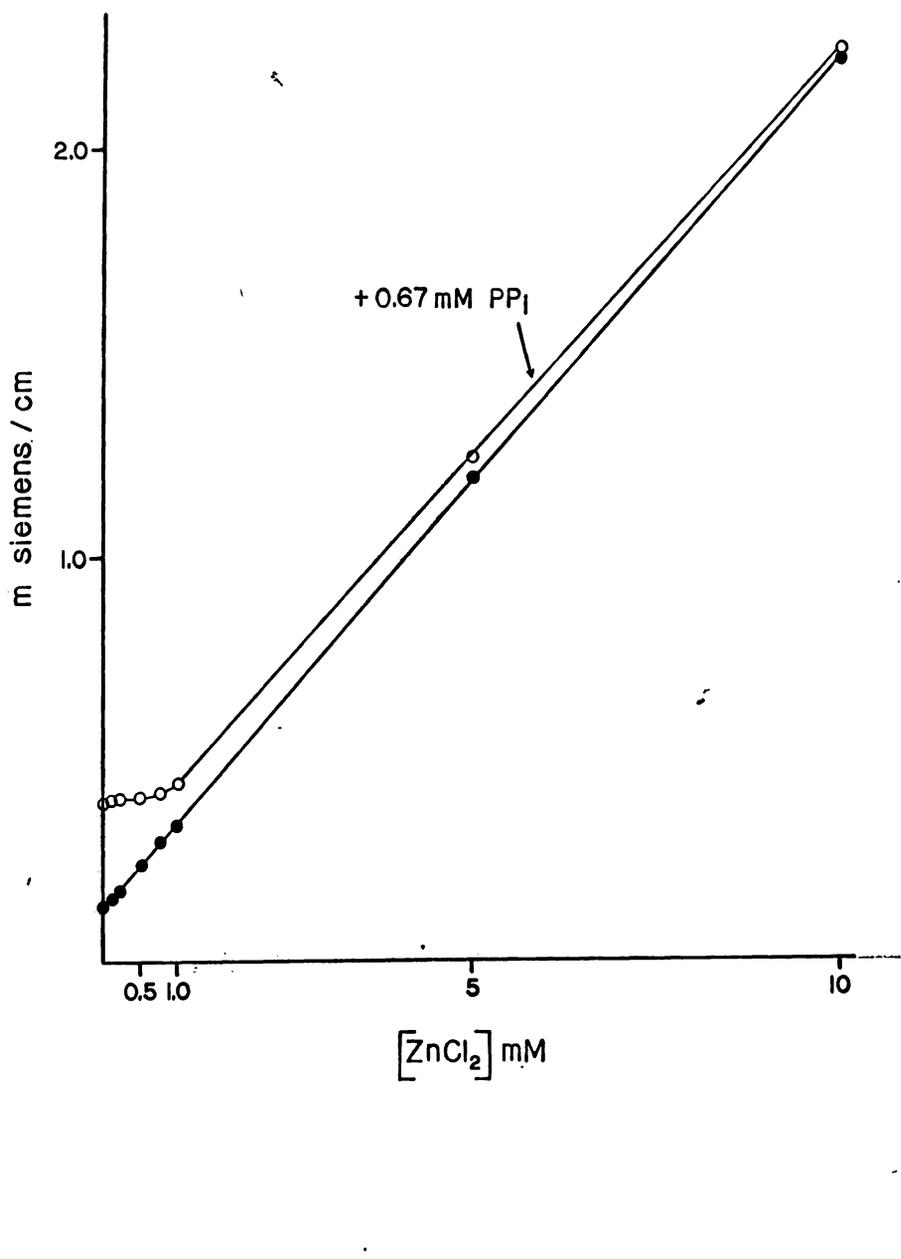


Fig. 17. Cambios en la Conductividad Inducidos por el $ZnCl_2$ en Presencia de PPI.

La mezcla de incubación contenía: Tris-maleato 2.5 mM pH 6.5 y las concentraciones indicadas de $ZnCl_2$. En el trazo superior (-o-) se añadió PPI-Na 0.67 mM a la mezcla.

PPI; cuando se agrega ZnCl_2 en presencia de PPI no se obtiene un incremento en la conductividad debido a la quelación del Zn^{2+} por el PPI, a concentraciones de 0.75 mM de ZnCl_2 añadido la conductividad empieza a aumentar, arriba de estas concentraciones la conductividad aumenta en proporción a la cantidad de ZnCl_2 añadido. Este último aumento no es estrictamente paralelo al observado en ausencia de PPI, lo que sugiere que se está formando un poco de complejo Zn-PPI-Zn (5% de la concentración total), esto indica que la inhibición principal de la actividad de la PPIasa de membrana es debida a Zn^{2+} libre, o bien a la presencia en el medio de muy bajas concentraciones de complejo Zn-PPI-Zn, cuando se está en el rango de 5 a 10 mM de ZnCl_2 añadido.

Co^{2+}

En el caso del Co^{2+} que se comporta muy parecido al Zn^{2+} (Fig. 15), pero con menor eficiencia para producir la hidrólisis de PPI, el análisis es semejante al del Zn^{2+} , como se muestra en la Fig. 18, con la ventaja de que no existen precipitados a ninguna concentración de CoCl_2 añadido. La actividad hidrolítica decrece a medida que la concentración de Co^{2+} libre se incrementa con un coeficiente de correlación lineal de 0.78 y potencial de 0.96. Entonces se sugiere que el Co^{2+} libre sea la especie inhibidora de la actividad enzimática.

Estos experimentos apoyan la idea propuesta de que la enzima tiene algun (o algunos) sitio regulador para catión divalente que puede ser ocupado por el Mg^{2+} para activar la reacción de intercambio o por el Zn^{2+} o Co^{2+} libre para

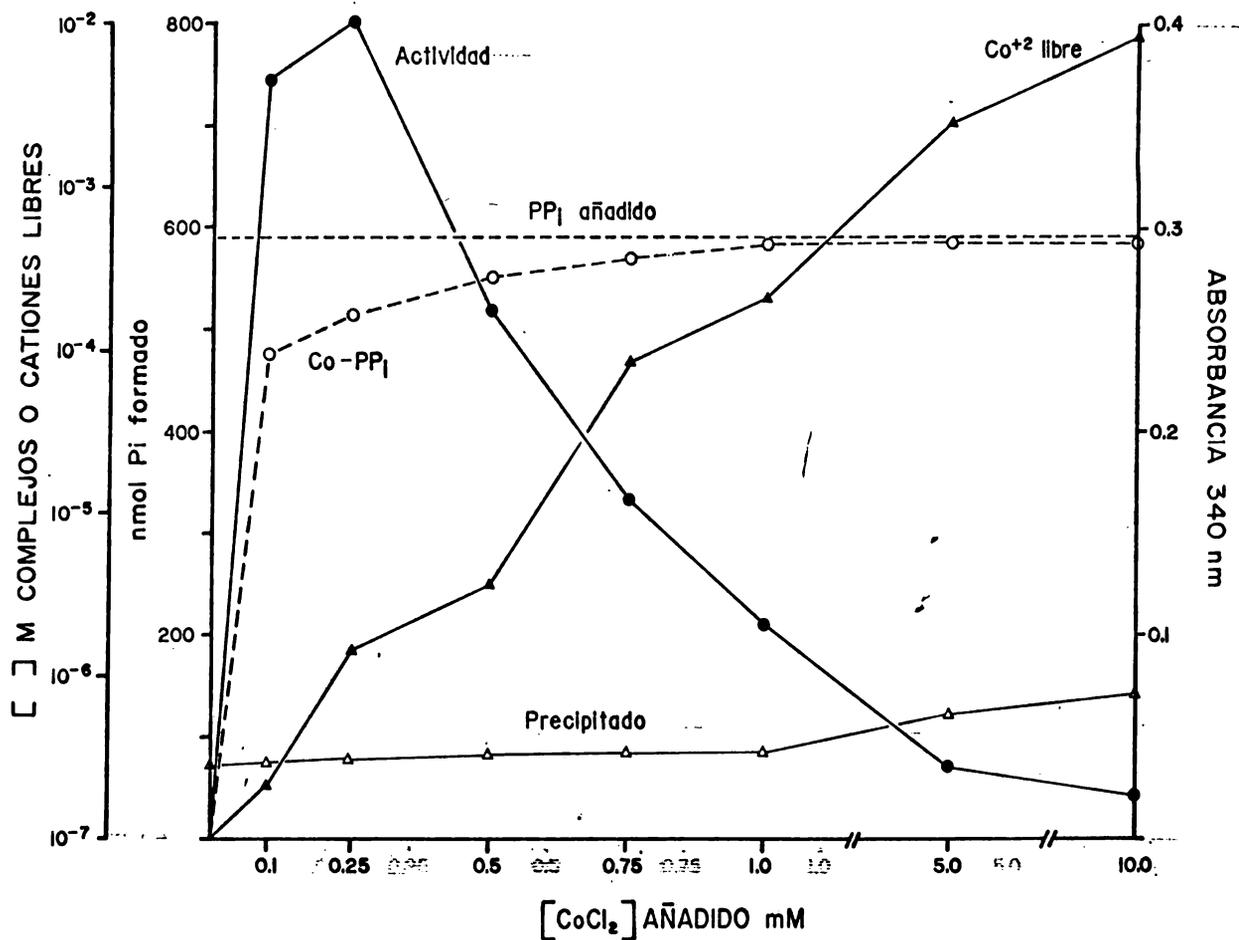


Fig. 18. Dependencia de la Reacción Hidrolítica de las Concentraciones del Complejo Co-PP_i y Co²⁺ libre. Las concentraciones de CoCl₂ añadido al medio de reacción (mismo de la Fig. 15) se graficaron contra: La actividad hidrolítica (—●—), las concentraciones calculadas de Co-PP_i (—○—) y Co²⁺ libre (—▲—), y la formación de precipitado.

inhibirla.

CATIONES QUE AL FORMAR COMPLEJO CON PPI NO SE HIDROLIZAN A NINGUNA CONCENTRACION.

En los casos del Ca^{2+} y del Cu^{2+} , los cuales no producen hidrólisis de PPI, se han considerado varias posibilidades: a) que se formen complejos de Ca^{2+} y Cu^{2+} con PPI, pero que éstos no sean sustratos para la hidrólisis, b) el Ca^{2+} o el Cu^{2+} libre son inhibidores de la actividad, y c) que el PPI^{4-} es la especie inhibitoria.

Para explorar más a fondo estas posibilidades y empezar a discriminar de entre ellas, se efectuaron los análisis de la Fig. 19, para el Ca^{2+} y Fig. 20, para el Cu^{2+} . Como puede observarse en las Figuras, ambos cationes pueden formar complejos con el PPI en cantidades significativas, porque sus constantes de asociación son muy semejantes a la del Mg^{2+} ($\log K_s \text{ Mg}=6.0$, $\log K_s \text{ Ca}=5.46$ y $\log K_s \text{ Cu}=6.2$, Martell y Sillén, 1971)' en consecuencia, a todas las concentraciones de CaCl_2 o CuCl_2 añadido existe una importante cantidad de complejo Ca-PPI o Cu-PPI en el medio. Esto sugiere que estos complejos no son reconocidos por la enzima o que los cationes en su estado libre o el PPI^{4-} que queda en el medio pueden ser las especies inhibitorias.

Para diferenciar si el PPI^{4-} es el inhibidor o lo es el catión libre, se midió la hidrólisis de PPI en presencia de 10 mM de MgCl_2 y 0.67 mM de PPI a pH 8.0, para tener suficiente sustrato y sobre esto se añadieron diferentes concentraciones de

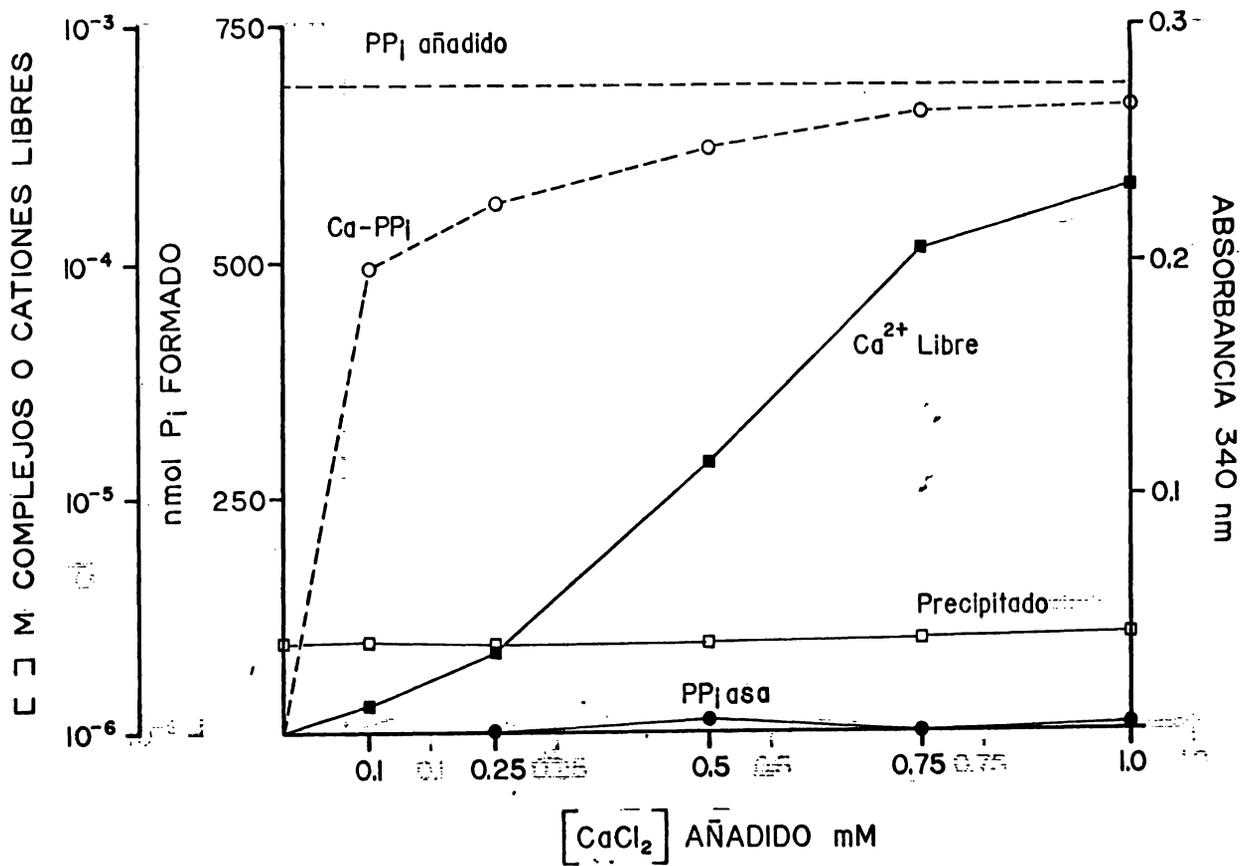


Fig. 19. Efecto de las Concentraciones de Ca^{2+} libre y del Complejo Ca-PPi sobre la Hidrólisis de PPi .

Las condiciones experimentales para medir la hidrólisis de PPi fueron las mismas de la Fig. 15. Las concentraciones de CaCl_2 añadido se grafica contra: Hidrólisis de PPi (-■-), las concentraciones calculadas de Ca-PPi (-○-) y la Ca^{2+} libre (-■-), y la formación de PPi .

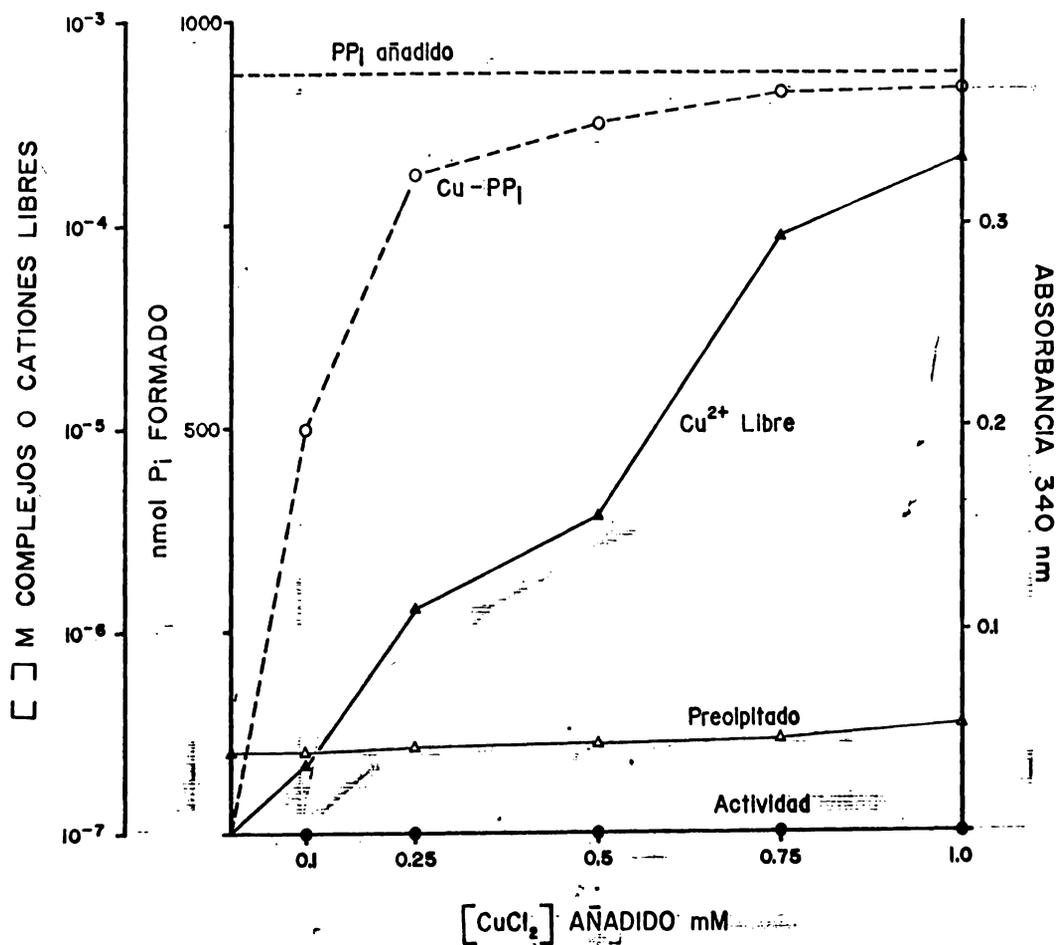


Fig. 20. Dependencia de la Reacción-Hidrolítica de las Concentraciones del Complejo Cu-PPi y Cu^{2+} libre.

Se graficaron las concentraciones de CuCl_2 añadido a la mezcla de reacción (en las mismas condiciones de la Fig. 15) contra: la Actividad Hidrolítica (—■—), las concentraciones calculadas de Cu-PPi (—○—) y Cu^{2+} libre (—●—), y la formación de precipitados (—▲—).

cationes divalentes hasta 1 mM, Fig. 21. En esta Fig. se observa una inhibición de la actividad hidrolítica inducida por los diferentes cationes pero de distinta magnitud. El Zn^{2+} y el Mn^{2+} son buenos inhibidores (80-95%), el Ca^{2+} y el Co^{2+} inhiben cerca del 60%, el Cu^{2+} y el Fe^{2+} inhiben entre un 20 y 40%.

Para investigar estas inhibiciones se hizo el análisis de los complejos y especies libres, para el caso del ZnCl_2 se ve en la Fig. 22. El Zn^{2+} desplaza al Mg^{2+} del complejo Mg-PPi y forma el complejo Zn-PPi que, como ya se mencionó (Fig. 15), es sustrato para la reacción hidrolítica. Sin embargo, se encuentra que la reacción se inhibe, esto indica que el inhibidor es el Zn^{2+} libre, como se ha sugerido antes.

El Ca^{2+} no desplaza al Mg^{2+} del complejo Mg-PPi (Fig. 23); sin embargo, se inhibe la actividad de hidrólisis, a través de un proceso que correlaciona con la concentración de Ca^{2+} libre (coeficiente de correlación lineal de 0.98) y del complejo Ca-PPi (coeficiente correlación lineal de 0.97). Sobre este punto, hay que considerar que el Ca^{2+} libre siempre está en mayor concentración que el Ca-PPi.

El Cu^{2+} forma complejos con PPi, ya que tiene una constante de asociación muy semejante al Mg^{2+} ($\log K_s=6.2$ Martell y Sillén, 1971) por el PPi; pero estos complejos no son reconocidos por la enzima, aún más, el Cu^{2+} inhibe muy poco a la actividad hidrolítica (Fig. 21).

En las condiciones usadas en los experimentos anteriores, las inhibiciones observadas no pueden ser atribuidas a la presencia de PPi^{-4} , debido a que (a las concentraciones de cationes empleadas en las cuales se inhibe la actividad

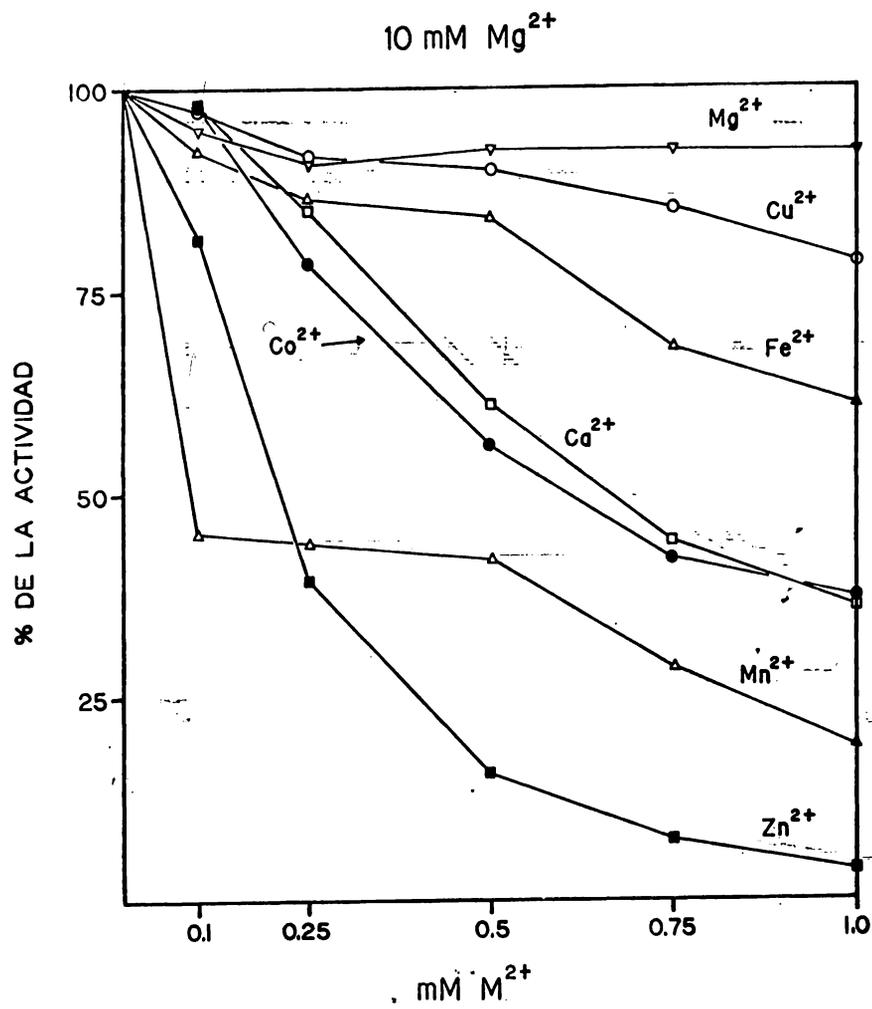


Fig. 21. Efecto de Diferentes Concentraciones de Cationes Divalentes sobre la Actividad Hidrolítica de la PPIasa de Membrana a Concentraciones Altas de $MgCl_2$.

Las condiciones experimentales fueron: Tris-Cl 50 mM pH 8, PPI-Na 0.67 mM pH 8, $MgCl_2$ 10 mM, 100 ug de BCl y las concentraciones indicadas de Cationes Divalentes. Tiempo de incubación 5' a 30°C.

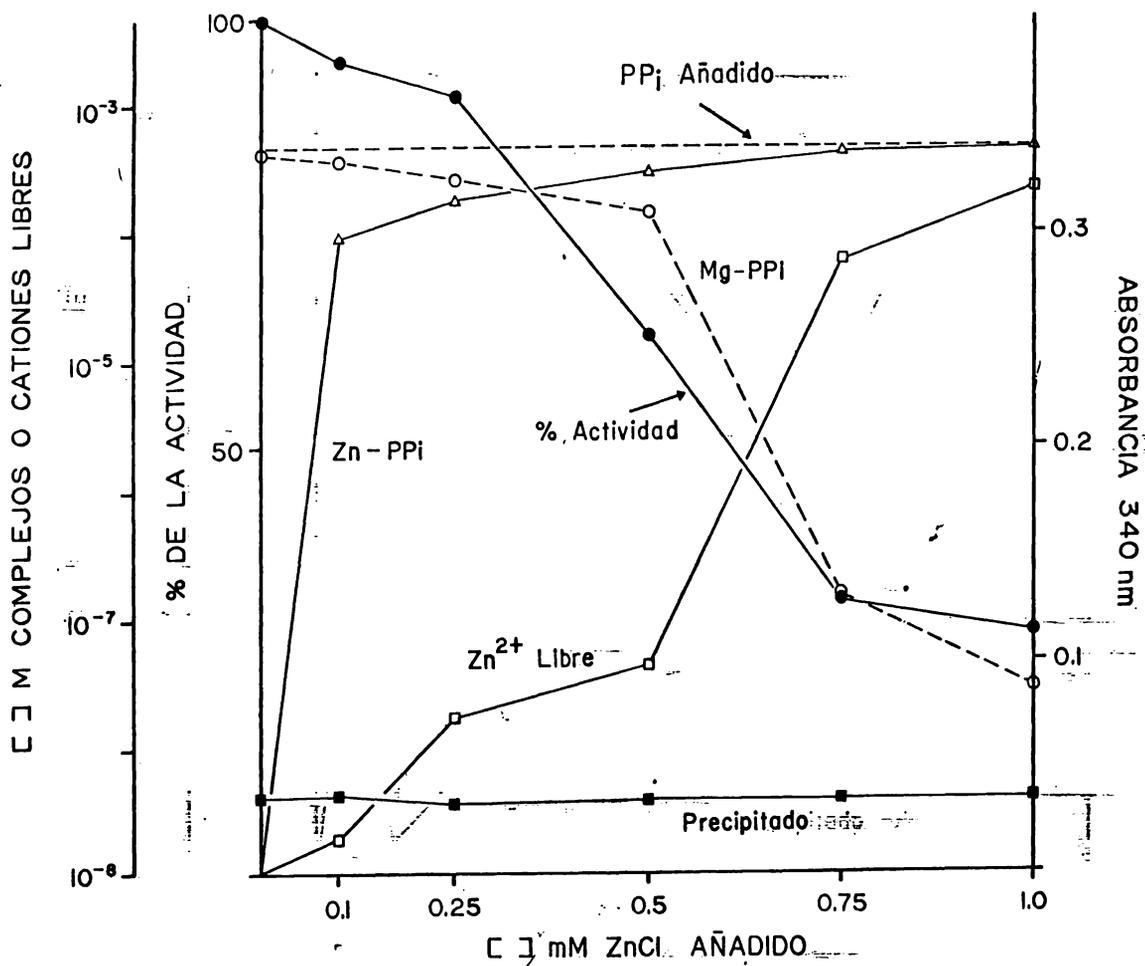


Fig. 22. Dependencia de la Reacción Hidrolítica de las Concentraciones del Complejo Zn-PPi y de Zn²⁺ libre en presencia de altas concentraciones de MgCl₂.

Las condiciones experimentales son las de la Fig. 21. Se graficó: % de la actividad hidrolítica (-●-), complejo Mg-PPi (-o-), Complejo Zn-PPi (-Δ-), Zn²⁺ libre (-□-), precipitados (-■-) y PPI añadido (---); contra la concentración de ZnCl₂ añadido.

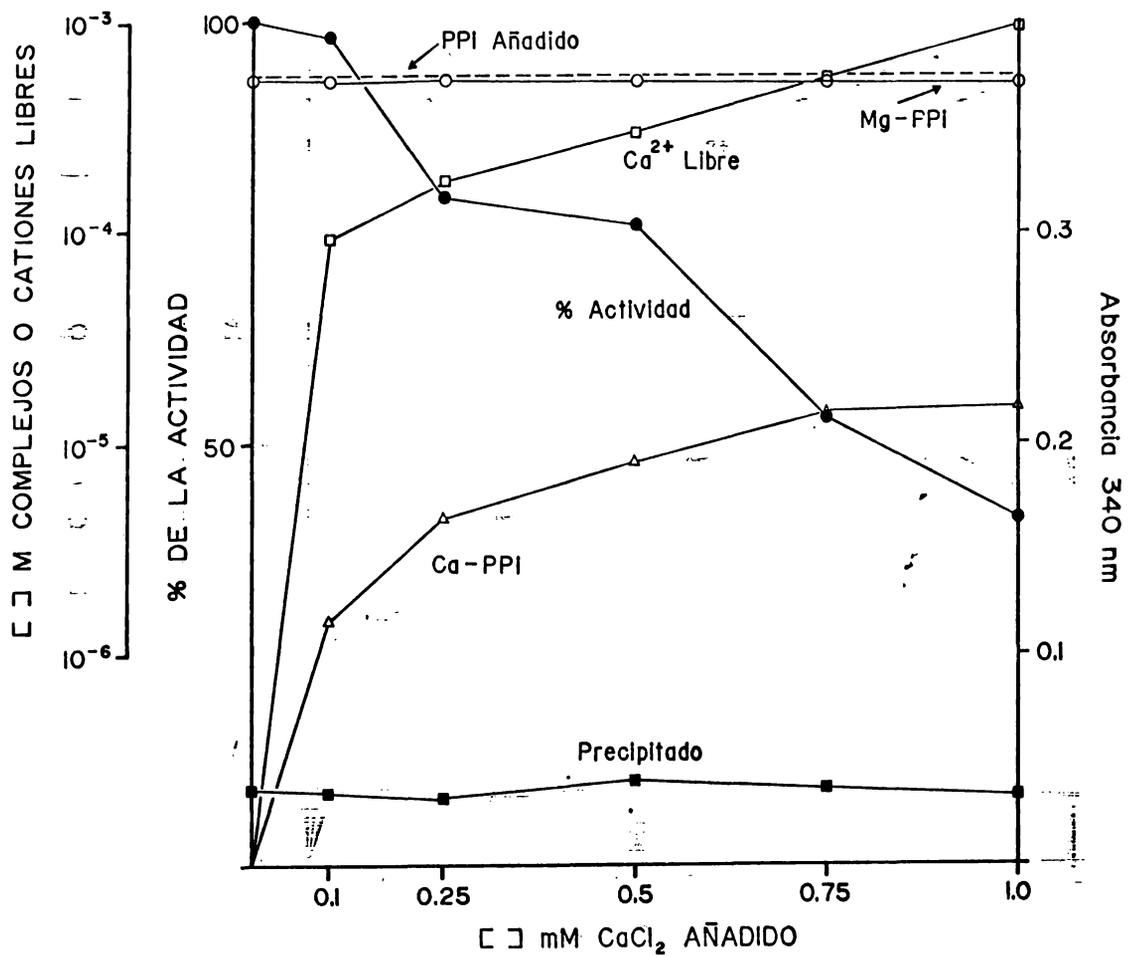


Fig. 23. Dependencia de la Reacción Hidrolítica de la Concentración de Ca-PPi y Ca²⁺ libre en Presencia de Altas Concentraciones de MgCl₂.

Las condiciones experimentales son las mismas de la Fig. 21. Se graficó la concentración de CaCl₂ añadido, contra: % de la Actividad (●), Ca-PPi (▲), Ca²⁺ libre (◻), Mg-PPi (○), precipitados (■) y PPI añadido (---).

hidrolítica) todo el PPI presente en el medio está en forma de complejo, ya sea como Mg-PPI o como Zn-PPI.

3.7 SUMARIO DE LOS EFECTOS DE LOS CATIONES DIVALENTES SOBRE LAS REACCIONES DE HIDROLISIS Y DE INTERCAMBIO Pi-PPI DEL CROMATOFORO

Los efectos que, sobre las reacciones de hidrólisis y de intercambio Pi-PPI, tienen los cationes divalentes pueden integrarse en las Tablas 5 y 6.

TABLA 5. Resumen del Efecto de los Cationes Divalentes sobre la Reacción de Intercambio Pi-PPi de la PPiase de Membrana del Cromatóforo.

CATION DIVALENTE	% COMO SUSTRATO	% DE INHIBICION CON 1 mM DE CATION DIVALENTE Y EN PRESENCIA DE 10 mM DE MgCl ₂
Mg	100	
Zn	0	58
Mn	56	80
Co	45	66
Fe	0	92
Cu	0	16
Ca	0	0

TABLA 6. Resumen del Efecto de los Cationes Divalentes sobre la Reacción Hidrolítica de la PPIasa de Membrana de Cromatóforos.

CATION DIVALENTE	% COMO SUSTRATO	% DE INHIBICION CON 1 mM DE CATION DIVALENTE Y EN PRESENCIA DE 10 mM DE MgCl ₂
Mg	100	8
Zn	100	96
Mn	10	81
Co	61	63
Fe	4	39
Cu	0	21
Ca	0	64

CAPITULO 4

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo nos han permitido conocer algunos de los factores que controlan la reacción de hidrólisis de PPI y a la reacción de intercambio Pi-PPI de la PPiase de Membrana de Rhodospirillum rubrum.

1) En concordancia con lo reportado por Randahl, 1979, el sustrato para la reacción de hidrólisis es el complejo Mg-PPI a través de un proceso independiente del Mg^{2+} libre.

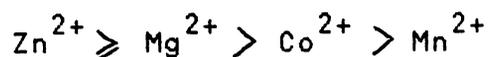
2) En contraste a lo anterior, la reacción de intercambio Pi-PPI requiere, para su máxima actividad, de una concentración de Mg^{2+} por arriba de la de PPI. Es decir el Mg^{2+} libre ejerce un efecto estimulador sobre la reacción de intercambio Pi-PPI.

3) El complejo $MgHPO_4$ es el sustrato para la reacción de intercambio Pi-PPI.

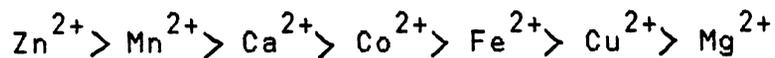
4) La reacción de intercambio se regula por la concentración de Mg-PPI hidrolizado. La reacción de intercambio requiere necesariamente la hidrólisis del PPI en el sitio catalítico y la liberación del PPI formado al medio.

5) El efecto de los cationes divalentes sobre las propiedades catalíticas de la PPiase de membrana dependen de su concentración.

A) Los siguientes cationes pueden formar complejos con PPI y ser sustratos activos.



B) Los siguientes cationes divalentes en su forma libre pueden actuar como inhibidores de la PPiase de membrana



Por lo tanto, se sugiere que la enzima tiene un sitio para el catión divalente libre que puede regular sus propiedades catalíticas.

En el futuro, se tratará de conocer más profundamente acerca de los mecanismos moleculares a través de los cuales esta enzima canaliza la energía de los gradientes electroquímicos de protones para sintetizar PPi.

Específicamente, se trabajará sobre:

1) el posible mecanismo alostérico de esta enzima tanto en la membrana como solubilizada.

2) La determinación de la energía de activación de las reacciones de hidrólisis, intercambio y de síntesis, de esta enzima, en la membrana

3) El efecto de cationes divalentes y solventes orgánicos sobre la enzima.

4) Conocer si existe alguna relación entre la PPiase citoplásmica y la membranal.

5) Estudiar si existe una PPiase membranal en membranas respiratorias de bacterias fotosintéticas.

BIBLIOGRAFIA

- Baccarini-Melandri, A., Gest, H., y San Pietro, A., 1970, A coupling factor in Bacterial Photophosphorylation, *J. Biol. Chem.* 245: 1224.
- Baccarini-Melandri, A. y Melandri, B.A., 1978, Coupling factors, en: *The Photosynthetic Bacteria* (Ed.: R.K. Clayton y W.R. Sistrom), pp. 3-36 y 615-625, Plenum Press New York, y London.
- Baltscheffsky, H., von Stedingk, L.V., Heldt, M.W. y Klingenberg, M., 1966, Inorganic pyrophosphate: Formation in bacterial photophosphorylation, *Science*, 153:1120-1121.
- Baltscheffsky, H. y von Stedingk, L.V., 1966, Bacterial Photophosphorylation in the absence of added nucleotide, A second intermediate stage of energy transfer in light-induced formation of ATP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22:722-728.
- 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., 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 Rs. rubrum chromatophores, Arch. Biochem. Biophys. 130:646-652.
- Baltscheffsky, M., 1969b, Reversed energy conversion reaction of bacterial photophosphorylation, Arch. Biochem. Biophys. 133:46-53.
- Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H. y Boork, J. 1982, Evolutionary and Mechanistic Aspects on coupling and phosphorylation in photosynthetic bacteria. En: Electron Transport and Photophosphorylation. Topics in Photosynthesis. Vol. 4 (Ed. Barber, J.) Cap. 7, pp. 249-272, Elsevier Biomedical Press., Amsterdam, New York, Oxford.
- Boyer, P.D., 1965, Oxidases and Related Redox Systems Vol. II, (Editores: T.E. King, H.S. Mason y M. Harrison) p. 994 Willey, New York.
- 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.
- Bulter, L.G., 1971, en: The Enzymes (Ed. Boyer, P.D.) 3a. Ed. Vol. 4, pp. 529-541, Academic Press, New York.
- Clayton, R.K., 1963, Toward isolation of a photochemically Reaction Center in Rhodopseudomonas sphaeroides. Biochim. Biophys. Acta 75: 312.
- 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., 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, Sn. Francisco y London.
- de Meis, L., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A., 1983, Action of the Mitochondrial ATPase inhibitor protein on the Ca^{2+} ATPase of Sarcoplasmic Reticulum., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 274-279.
- de Meis, L., Martins, O.B. y Alves, E.W., 1980, Role of Water, hydrogen ion and temperature on the synthesis of adenosine triphosphate by the Sarcoplasmic Reticulum Adenosine Triphosphatase in the absence of a Calcium Ion gradient. *Biochemistry* 19: 4252-4261.
- Fisher, R.R. y Guillory, R.J., 1969, Partial resolution of energy-linked reactions in *Rs. rubrum* chromatophores., *FEBS Lett.* 3:27-
- Frenkel, A.W., 1954, Light induced phosphorylation by cell-free preparations of photosynthetic bacteria, *J. Am. Chem. Soc.* 76:5568-5569.
- Gómez-Puyou, A., Ayala, G., Muller, U. y Tuena de Gómez-Puyou, M., 1983, Regulation of the Synthesis and hydrolysis

- of ATP by Mitochondrial ATPase. J. Biol. Chem. 258:
13673-13679.
- Gresser, M.J., Myers, J.A. y Boyer, P.D., 1982, Catalytic site
Cooperativity of beef heart Mitochondrial F₁ adenosine
triphosphatase, J. Biol. Chem. 257: 12030-12038.
- Guillory, R.J. y Fisher, R.R., 1972, Studies on the light-
dependent synthesis of inorganic pyrophosphate by
Rs. rubrum chromatophores, Biochem. J. 129: 471-481.
- 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: Pi = HOH Oxygen Exchange
catalyzed by Membrane-bound inorganic Pyrophosphatase
of Rs. rubrum, Arch. Biochem. Biophys. 208:426-430.
- Hinkle, P.C. y Mc. Carty, R.E., 1978, How cells make ATP, Sci.
Am. 20: 58-75.
- Horio, 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.
- Hutner, S.H., 1950, Anaerobic and aerobic growth of purple
bacteria (Athiorhodaceae) in chemically defined media.
J. Gen. Microbial. 4:286-293.
- 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,

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

Karunairatnam, M.C., Spizisen, J. y Gest, H., 1958, Preparations and properties of protoplasts of Rs. rubrum Biochim. Biophys. Acta 29: 649.

Keister, D.L. y Yike, N.J., 1967a, 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., 1967b, 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., 1971a, ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in Rs. rubrum chromatophores. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42: 932-939.

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

- Biophys. 147:330-338.
- Keister, D.L. y Raveed, N.L., 1974, Energy-Linked reactions in photosynthetic bacteria. IX Pi-PPi Exchange in Rs. rubrum J.Biol.Chem. 249: 6454-6458.
- Klemme, B., Klemme, J.H. y San Pietro, A., 1971a, PPase, 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., 1971a, Regulation of the Cytoplasmic Inorganic Pyrophosphatase of Rs. rubrum. Eur. J. Biochem., 22: 529-537.
- Klemme, J.H., Klemme, B. y Gest, H., 1971b, Catalytic Properties and regulatory diversity of inorganic Pyrophosphatases from Photosynthetic Bacteria, J. Bacteriol. 108: 1122-1128.
- Klemme, J.H. y Gest, H., 1971c, Regulatory properties of an Inorganic Pyrophosphatase from the Photosynthetic bacterium Rs. rubrum, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 721-725.
- Lahti, R., 1983, Microbial Inorganic Pyrophosphatases, Microbiol. Rev. 47: 169-179.
- Lawson, J.W.R., Guynn, R.W., Cronell, N. y Veech, R.L., 1976, en: Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species., (Ed. Hanson, R.W. y M.A. Mehlman), pp. 481, Wiley, New York.
- 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., Ermakova, S.A., Zvyagil'skaya, R.A. y Kulaev, I.S., 1975a, Microbiology, USSR, 44: 874-879.
- Mansurova, S.E., Shakhov, Yu, A. y Kulaev, I.S., 1975b, Synthesis of inorganic pyrophosphate by animal tissue mitochondria, FEBS Lett. 55: 94-98.
- Martell, A. y Sillén, L.G., 1971, Stability Constants of Metal-Ion Complexes: Supplement No. 1, Special Publication No. 25., The Chemical Society, London.
- Mitchell, P., 1967, Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: Natural Fuel cells and solar cells, Fed. Proc. 26: 1370-1379.
- Mitchell, P., 1961, Coupling of Phosphorylation to electron and hydrogen transfer by the Chemiosmotic type Mechanism, Nature 191: 144-148.
- Moyle, J., Mitchell, R., y Mitchell, P., 1972, Proton-translocating pyrophosphatase of Rs. rubrum FEBS Lett. 23: 233-236.
- Newton, J.W., y Newton, G.A., 1957, Comprehension of the photoactive subcellular particles from Chromatium, Arch. Biochem. Biophys. 71: 250-265.
- Nishikawa, K., Hosi, K., Suzuki, J., Yoshimura, S. y Horio, T., 1973, Formation and Descomposition of Pyrophosphate Related to Bacterial Photophosphorylation. J. Biochem. 73: 537-553.
- Nyrén, 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.
- Nyrén, 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.
- 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, 8th 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 Keister, 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.
- Rubtzov, P.M., Efremovich, N.V. y Kulaev, I.S., 1976, Dokl. Akad. Nauk SSSR 230: 1236-1237.
- Schachmann, H.K., Pardee, A.S. y Stanier, R.Y., 1952, Studies on the macromolecular organization of microbial cells, Arch. Biochem. Biophys. 38: 245-260.
- 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.
- Shakhov, Y.A., Nyrén, 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.
- Sumner, J.B., 1944, A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* 100: 413-415.
- 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.
- Vainio, H., Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H. y Azzi, A., 1972, Energy-dependent changes in Membrane of Rs. rubrum chromatophores as measured by 8-anilino-naphtalene-1-sulfonic-acid, *Eur. J. Biochem.* 30: 301-306.
- Van Niel, C.B., 1935, Photosynthesis of Bacteria, Harbor Symp. *Quant. Biol.* 3: 138-150.
- Younis, H.M., Weber, G., y Boyer, I.S., 1983, Activity and conformational changes in Chloroplast coupling factor

induced by Ion Binding: Formation of a Magnesium-
Enzyme-Phosphate Complex, *Biochemistry* 22: 2505-2511.