

11261
ces
14

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVACION DE LA H⁺-ATPasa
DE Rhodospirillum rubrum

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestra en Investigación Biomédica Básica

Presenta:

BIOL. MONICA MONTERO LOMELI

1987

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCION.....	6
1.1. Bacterias fotosintéticas.....	12
1.1.1. Clasificación	
1.1.2. Características de las bacterias púrpuras no sulfurosas	
1.2. Transporte de electrones fotosintético.....	16
1.3. ATP sintetasa.....	20
1.3.1. Estructura	
1.3.2. Mecanismo de síntesis e hidrólisis de ATP	
1.3.3. Interacciones cooperativas entre las subunidades catalíticas de F_1	
1.3.4. Regulación de la ATP sintetasa	
2. MATERIALES Y METODOS.....	32
2.1. Cultivo de <u>Rhodospirillum rubrum</u>	32
2.1.1. Crecimiento en medio sólido	
2.1.2. Crecimiento en medio líquido	
2.2. Siembra de bacterias.....	34
2.3. Conservación de la cepa.....	34
2.4. Cosecha de bacterias.....	35
2.5. Preparación de cromatóforos.....	35
2.6. Aislamiento de la H^+ -ATPasa de <u>Rhodospirillum</u> <u>rubrum</u>	36
2.6.1. Aislamiento de RrF_0F_1	
2.6.2. Aislamiento de RrF_1	
2.7. Cuantificación de la hidrólisis de ATP y del recambio $^{32}P_i$ -ATP.....	37
2.7.1. Purificación de $^{32}P_i$	
2.7.2. Síntesis de $^{32}P_i$ -ATP	
2.7.3. Cuantificación de la actividad hidrolítica	
2.7.4. Cuantificación de la reacción de recambio $^{32}P_i$ -ATP	
2.8. Determinación de bacterioclorofila.....	40
2.9. Determinación de proteína.....	41
2.9.1. Método de Biuret	
2.9.2. Método de azul de Coomassie	

2.10.	Cálculo de concentraciones de sustrato y cationes libres.....	42
2.11.	Otros procedimientos.....	44
3.	RESULTADOS.....	45
3.1.	Conservación de energía en cromatóforos de <u>Rhodospirillum rubrum</u> . Caracterización de la relación entre la hidrólisis de ATP y el recambio ^{32}P i-ATP.....	45
3.2.	Activación de la hidrólisis dependiente de Mg^{2+} en RrH^+ -ATPasa por laurildimetilamino óxido.....	53
4.	DISCUSION.....	66
4.1.	Conservación de energía en cromatóforos de <u>Rhodospirillum rubrum</u>	66
4.1.1.	Regulación del ciclo catalítico por sustratos	
4.1.2.	Activación de la ATPasa por LDAO	
4.1.2.1.	Conversión de la actividad Ca a Mg dependiente en RrF_0F_1 y RrF_1	
4.2.	Regulación del estado funcional E y de la RrF_0F_1 activada con LDAO. Efecto de cationes libres.....	73
4.2.1.	Efecto del Mg^{2+} utilizando como sustrato MgATP	
4.2.1.	Efecto del Ca^{2+} utilizando como sustrato CaATP	
4.2.3.	Efecto del Ca^{2+} utilizando como sustrato MgATP	
4.3.	Activación de RrF_0F_1 . Modificación de la interacción entre las subunidades catalíticas.....	75
5.	BIBLIOGRAFIA.....	78

RESUMEN.

La H⁺-ATPasa de bacterias fotosintéticas es similar estructuralmente a otras H⁺-ATPasas de membrana pero la regulación de éste sistema no se conoce aún. En éste trabajo se presenta un estudio sobre la conservación de energía en cromatóforos de Rhodospirillum rubrum mediante la caracterización de la relación entre la actividad hidrolítica y la de recambio ³²Pi-ATP. La relación hidrólisis/recambio es cercana a 1 a concentraciones menores de 100 µM de MgATP y a concentraciones mayores a ésta se observa un incremento hasta llegar a una relación de 5, con 5 mM de MgATP. Proponemos que existen dos estados funcionales de la H⁺-ATPasa, *E y E cuya conversión se modula por la concentración de ATP en el medio.

También se observa que el Mg²⁺ y Ca²⁺ libres modifican las propiedades catalíticas de la H⁺-ATPasa ya que al aumentar la concentración de estos en el medio, la relación hidrólisis /recambio aumenta tres veces cuando la concentración de Mg²⁺ en el medio se incrementa de 0.032 a 5 mM y 1.45 veces al aumentar el Ca²⁺ de 0.005 a 0.500 mM. En cuanto a la actividad hidrolítica Ca²⁺-dependiente que se midió paralelamente a la Mg²⁺-dependiente en todos los experimentos, muestra un comportamiento similar, pero siempre con valores alrededor de 10 veces más pequeños en las actividades específicas, tanto de hidrólisis de ATP como de recambio ³²Pi-ATP.

De particular interés en el presente trabajo es el uso de detergentes que estimulan la actividad ATPásica. Se estudió el efecto del laurildimetilamino óxido en la H⁺-ATPasa

de Rhodospirillum rubrum. Este detergente activa la hidrólisis de ATP dependiente de Mg^{2+} en la RrF_0F_1 aislada, 34 veces, mientras que la actividad dependiente de Ca^{2+} solo no se modifica tan significativamente. La activación de la ATPasa por el laurildimetilamino óxido aumenta el efecto de iones Mg^{2+} libres en la actividad ATPásica. Concentraciones de Mg^{2+} libre alrededor de 0.025 mM favorecen la activación mientras que concentraciones más altas inhiben aproximadamente el 70% de la actividad ATPásica. El análisis de la cinética en estado estacionario muestra que el laurildimetilamino óxido induce un comportamiento cinético complejo para MgATP en los cromatóforos, similar al del complejo F_0F_1 . El valor de la velocidad inicial para la catálisis de un sitio de MgATP, es 6.3 veces más alto (3.5×10^{-4} mol Pi por mol RrF_0F_1 por segundo) en presencia de detergente que en su ausencia, donde la velocidad inicial es de 5.5×10^{-4} mol Pi por mol RrF_0F_1 por segundo. Estos experimentos muestran que el laurildimetilamino óxido cambia el requerimiento por cationes para la hidrólisis de ATP de la H^+ -ATPasa aislada de R. rubrum de Ca^+ a Mg^+ y que ésta activa tanto la catálisis de multisitios como la de un sitio.

1. INTRODUCCION.

Durante la evolución los organismos vivos han adquirido un sistema transductor capaz de capturar, transformar y almacenar la energía en diferentes formas con una gran eficiencia. Los organismos primitivos probablemente eran quimiótrofos inmersos en un medio de compuestos orgánicos abiogénicos. En base a ésta teoría se ha sugerido que desarrollaron un transporte de electrones prerrespiratorio capaz de mantener un balance redox celular en respuesta a presiones selectivas (Gest, H. 1980). De estos protobiontes surgieron la glucólisis, la respiración y la fotosíntesis que son considerados como patrones generales de transducción de energía. La característica principal de estos tres sistemas es usar la energía disponible de la oxidación de sustratos o de la absorción de luz para generar e interconvertir las "monedas energéticas" más importantes: la pareja ATP-ADP y el potencial electroquímico. Los mecanismos de transducción de energía se han explicado por medio de la hipótesis quimiosmótica descrita por Mitchell en 1961 que dice que la membrana citoplásmica de bacterias y las membranas internas de mitocondrias y cloroplastos forman estructuras cerradas impermeables esencialmente a iones como H^+ y a OH^- . Estas membranas llamadas transductoras de energía, acoplan la transferencia de electrones a la síntesis de ATP por medio de una diferencia de potencial electroquímico a través de la

membrana. La transferencia de electrones y la síntesis de ATP se catalizan por distintas bombas de protones. En la membrana citoplásmica se encuentra una cadena de acarreadores de protones y electrones que generan un potencial electroquímico capaz de impulsar una bomba de protones, la ATP-sintetasa o ATPasa, que opera reversiblemente, ya sea en dirección de síntesis o de hidrólisis de ATP.

La ATP-sintetasa es una enzima multimérica compuesta de un sector membranal, F_0 , que cataliza el transporte de protones a través de la membrana, y una porción soluble, F_1 que contiene tres sitios catalíticos (Fig.1.1). Esta enzima se ha conservado bastante a nivel estructural durante la evolución. El origen de las ATPasas y su relación entre cloroplastos, mitocondrias y procariotes, está basado implícitamente en el modelo de Margulis y en el de Raven y Smith (Raven y Smith, 1978), sobre la evolución del mecanismo quimiosmótico. En el curso de la evolución, un canal de protones evolucionó antes que el fragmento F_1 . Este último, supuestamente evolucionó como una bomba, incrementando la eficiencia del canal para mover protones. Esta evolución se puede reflejar en la posición superficial de F_1 en relación con la membrana.

Así como la sensibilidad a DCCD es una característica común a todas las ATPasas con canales de protones, la sensibilidad a 4-cloro 7nitrobenzofurazano (Nbf-Cl) es común a todos los fragmentos F_1 de las ATPasas, desde Clostridium spp. hasta mitocondrias (Harris, D.A. 1981), (Ver fig.1.2). La estructura de la subunidad F_1 de mitocondrias y cloroplas

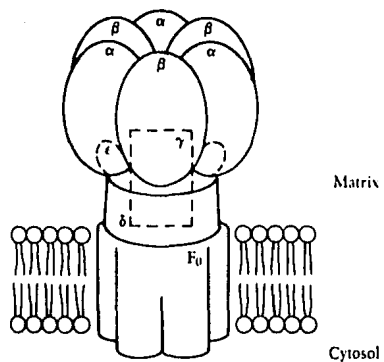


FIG. 1.1. ESTRUCTURA DE LA F₁-F₀ ATP sintetasa DE MITOCONDRIAS, CLOROPLASTOS Y BACTERIAS (Tomada de Harold, 1986).

sensibilidad a inhibidores en la línea mitocondrial

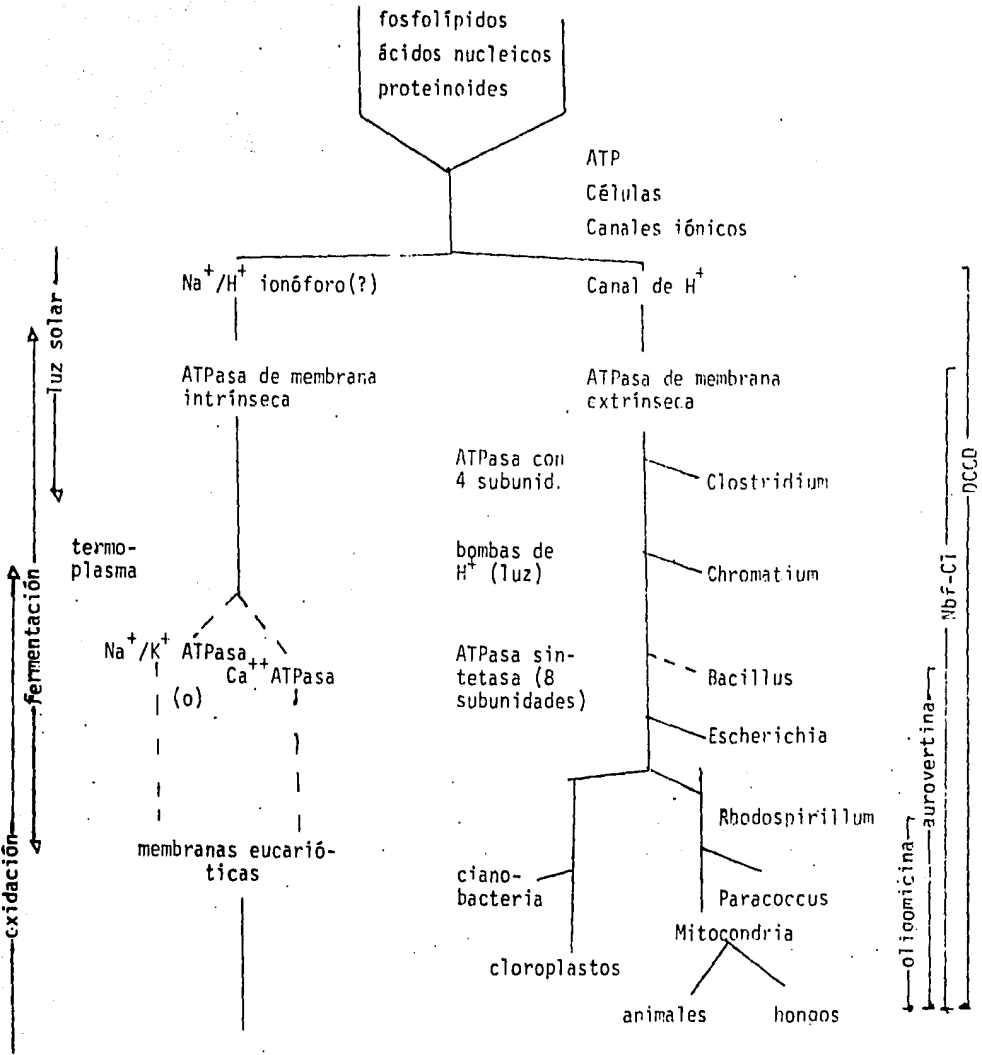


FIG. 1.2. RELACIONES POSTULADAS ENTRE ATPASAS DE MEMBRANA. (NEM) Sensible a N-etilmaleimida, (o) sensible a ouabaina. (Tomada de Harris, 1981).

tos es muy similar. Podemos trazar la relación evolutiva de la F_1 suponiendo ancestros mitocondriales, como Rhodospirillum rubrum, y ancestros de cloroplastos, las cianobacterias, que a la vez tienen un ancestro común para los dos. Otras bacterias distintas como Escherichia coli, Streptococcus faecalis y Mycobacterium phlei, muestran ATPasas similares. La subunidad F_1 fue fijada muy temprano en la evolución. Estudios de las secuencias de aminoácidos y de DNA en E. coli y de proteínas constitutivas del complejo bovino muestran que diferentes partes del complejo han evolucionado a velocidades diferentes. Las subunidades α y β que contienen sitios reguladores y catalíticos, respectivamente, se han conservado mucho más entre mitocondrias bovinas y E. coli, que las proteínas de la membrana de la subunidad F_0 . Parece ser que las subunidades estuvieron sujetas a diferentes presiones evolutivas. En el caso de las proteínas de membrana, parece ser que la selección opera predominantemente en la hidrofobicidad de la secuencia, aunque también se han conservado grupos funcionales involucrados directamente en la conducción de protones.

Las secuencias de aminoácidos de α y β de E. coli tienen otra característica importante, sus secuencias están relacionadas y han evolucionado de un ancestro común. La duplicación genética que da lugar a ellas debe haber ocurrido hace más de 1.2×10^9 años, antes de que aparecieran los eucariotes. Una importante implicación de ésta homología, es que α y β se doblan de una manera similar. Aunque tienen diferentes papeles en la catálisis, la homología parece estar

relacionada con la propiedad común de unir ADP y ATP. Esta conclusión está basada en el descubrimiento de que las secuencias α y β contienen secuencias significativamente similares a otras enzimas que unen ADP y ATP, notablemente entre ellas están la ATPasa de calcio, la miosina, la fosfofructoquinasa y la adenilatocinasa. La función de subunidades adicionales en complejos ATPasa "superiores" esta todavía en debate. Se puede sugerir que se requirieron para la conversión de la ATPasa de un papel hidrolítico a uno sintético, siguiendo el desarrollo de otras bombas de protones oxidativas o funcionales con la luz.

Los mecanismos de transporte de iones por medio de las ATPasas de membrana son desconocidos y un problema importante dentro de la bioenergética de la fotosíntesis es el mecanismo de síntesis de ATP del complejo ATPasa y la conservación de energía por medio de éste. Para cumplir con esta meta, es muy necesario contar con información adicional acerca de la estructura de estas enzimas tan complicadas y el mecanismo de la actividad de ATPasa de la porción soluble de los complejos. Un sistema interesante para este estudio, dado su lugar dentro de la evolución del mecanismo quimiosmótico, es la bacteria Rhodospirillum rubrum.

La H^+ -ATPasa de la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum se ha caracterizado estructuralmente (Schneider et.al. 1979 y Oren, R. and Gromet-Elhanan, Z. 1979), siendo su estructura similar a otros complejos F_0-F_1 , pero la regulación de los procesos catalíticos todavía no se ha des-

crito. Varios tratamientos que activan a la hidrólisis de ATP se han usado para investigar los mecanismos de regulación de hidrólisis de ATP. En el presente trabajo se estudió la regulación de la H⁺-ATPasa en cromatóforos de Rhodospirillum rubrum, utilizando la medición de la velocidad relativa de las reacciones de hidrólisis de ATP y del recambio ATP → P_i, como índice de los mecanismos de conservación de energía en éste sistema, así como la activación de la hidrólisis dependiente de Mg-ATP en la H⁺-ATPasa aislada de Rhodospirillum rubrum, por medio del detergente, lauril dimetilamino óxido (LDAO).

1.1. BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS.

1.1.1. CLASIFICACIÓN.

Los procariontes fototróficos llevan a cabo la fotosíntesis anoxigénica utilizando un sólo fotosistema, por lo tanto requieren donadores de electrones con un potencial redox más bajo que el agua, tales como compuestos de sulfuro reducidos, hidrógeno molecular o compuestos orgánicos simples. En lugar de oxígeno, los productos resultantes son sulfato, protones y compuestos orgánicos y CO₂, respectivamente. Los nichos ecológicos de los organismos fototróficos son provistos solamente en medios acuosos por manantiales de sulfuro o a través de las actividades metabólicas de otros microorganismos cuyos productos finales del metabolismo sirven como elementos primarios para el metabolismo de los organismos fototróficos.

Las bacterias fotosintéticas se clasifican en dos grandes grupos en base a sus propiedades citológicas, las bacterias verdes sulfúreas y las bacterias púrpuras. En la

TABLA 1.1. CLASIFICACION DE LAS BACTERIAS FOTOSINTETICAS.

Microorganismo	Bacterias verdes Sulfurosas	Bacterias purpuras Sulfurosas	No Sulfurosas
Clasificación Antigua	Chlorobacteriaceae	Thiorodaceae	Athiorodaceae
Clasificación Nueva	Chlorobiaceae	Chromatiaceae	Rhodospirillaceae
Generos Representativos	<u>Chlorobium</u> <u>Chloropseudomonas</u>	<u>Chromatium</u> <u>Thiospirillum</u>	<u>Rhodospirillum</u> <u>Rhodopseudomonas</u>
Pigmentos	Bacterioclorofila c ó d Carotenos monocíclicos	Bacterioclorofila a ó b Carotenos acíclicos	
Fuente de poder reductor	H ₂ S, S, S ₂ O ₃ ó H ₂	H ₂ S, S, S ₂ O ₃ y compuestos orgánicos	Compuestos orgánicos H ₂ en pocas especies
Relación con el oxígeno	Anaeróbicos obligados	Anaeróbicos obligados	Aerobios facultativos
Crecimiento en la oscuridad	Ninguno	Ninguno	Si, cuando son aeróbico
Tipo de crecimiento en la naturaleza	Masivo	Masivo	No masivo

Tomada de Gromet-Elhanan, 1977.

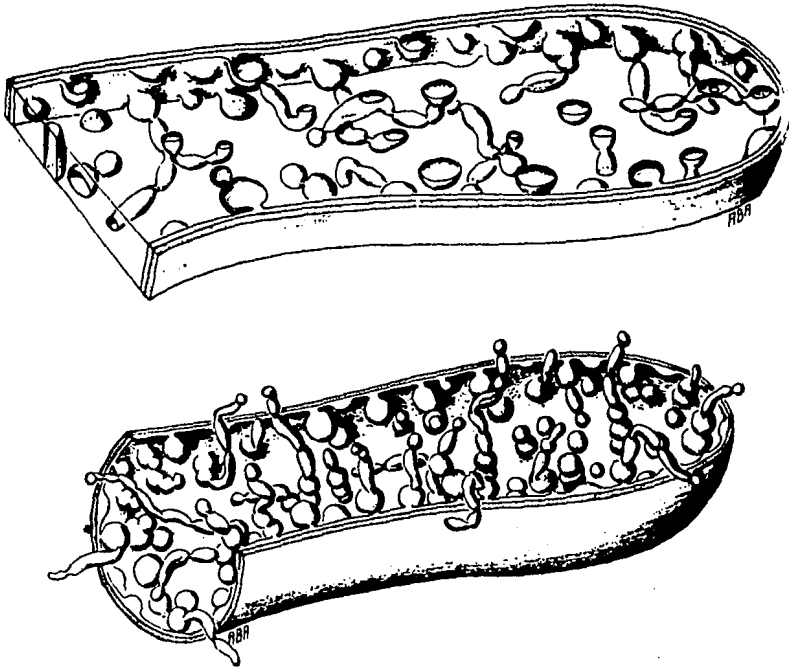


FIG. 1.3. REPRESENTACION GRAFICA DE UNA MICROGRAFIA ESTEREOELECTRONICA EN SECCIONES DE *Rhodospirillum rubrum*. (Tomada de Clayton y Sistrom, 1978).

tabla 1.1. se señalan las principales características de los dos grupos.

1.1.2. CARACTERISTICAS DE LAS BACTERIAS PURPURAS NO SULFUROSAS

Las bacterias púrpuras no sulfurosas tienen como especie tipo a Rhodospirillum rubrum cuyos sinónimos usados son: Spirillum rubrum von Esmarch, 1887 y Rhodospirillum giganteum Molisch, 1907. Son células espirales y tienen unas dimensiones aproximadas de 7 a 10 μ de largo por 0.7 a 0.9 μ de ancho. Son Gram negativas. Es un organismo microaerófilo que se puede cultivar en anaerobiosis estricta con cultivos iluminados. Algunas cepas se pueden cultivar en aerobiosis y en la oscuridad. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y el pH de 7. En anaerobiosis e iluminadas los cultivos son rojos o rojo pardo sin coloración café. En aerobiosis y en la oscuridad tienen una sola coloración gris pálida con un tinte rosa ligero. Tienen un olor característico. En medios líquidos los cultivos son homogéneos, turbios y rojos a la luz. El cultivo se puede volver viscoso cuando hay una deficiencia de calcio. En medios definidos muchas sustancias pueden servir de fuente de carbono y de energía como el lactato, succinato y glutamato (Cohen-Bazire, et.al., 1957).

El aparato fotosintético bacteriano responsable de la etapa luminosa de la fotosíntesis está asentado en estructuras membranales, llamadas por algunos autores, cromatóforos, que en la mayoría de los casos están en continuidad morfológica con la membrana plasmática (Fig.1.3). Se presentan en forma de discos de 500 a 1000 Å de diámetro, rodeados

por una membrana de 70 Å de espesor (Prévo, A.R. et al. 1967). Se encuentran en un número de alrededor de 5000 por célula siendo éste regulado por la intensidad de luz y de CO₂ (Kaplan, S. 1978). En los cromatóforos se encuentra también el sistema de transducción energética, desde la captura de fotones hasta la síntesis de ATP y PPI y la formación del poder reductor NADH. Las etapas oscuras de la fotosíntesis, por ejemplo, las relacionadas con el metabolismo del carbono son llevadas a cabo en general por enzimas citoplásmicas.

Cuando las bacterias son desintegradas por sonicación o por la prensa de French, las membranas fotosintéticas se fraccionan dando lugar a vesículas generalmente selladas llamadas también cromatóforos pues portan a los pigmentos fotosintéticos. Estas vesículas retienen la capacidad para llevar a cabo los procesos de transducción de energía fotosintética y los sitios de unión para sustratos de la cadena de transporte de electrones y de la ATPsintetasa, están orientados hacia el exterior del cromatóforo, al igual que en las partículas submitocondriales.

1.2. TRANSPORTE DE ELECTRONES FOTOSINTETICO.

El grupo de las Rhodospirillaceae y las plantas superiores, comparten la capacidad de utilizar la energía luminosa para su crecimiento. A diferencia de los cloroplastos y las cianobacterias, que poseen un proceso de transporte electrónico no cíclico, localizado en vesículas intracelulares membranales, llamadas tilacoides, las bacterias fotosintéticas como Rhodospirillum rubrum, poseen un transporte de electrones cíclico, en el cual el electrón lanzado de la clorofi-

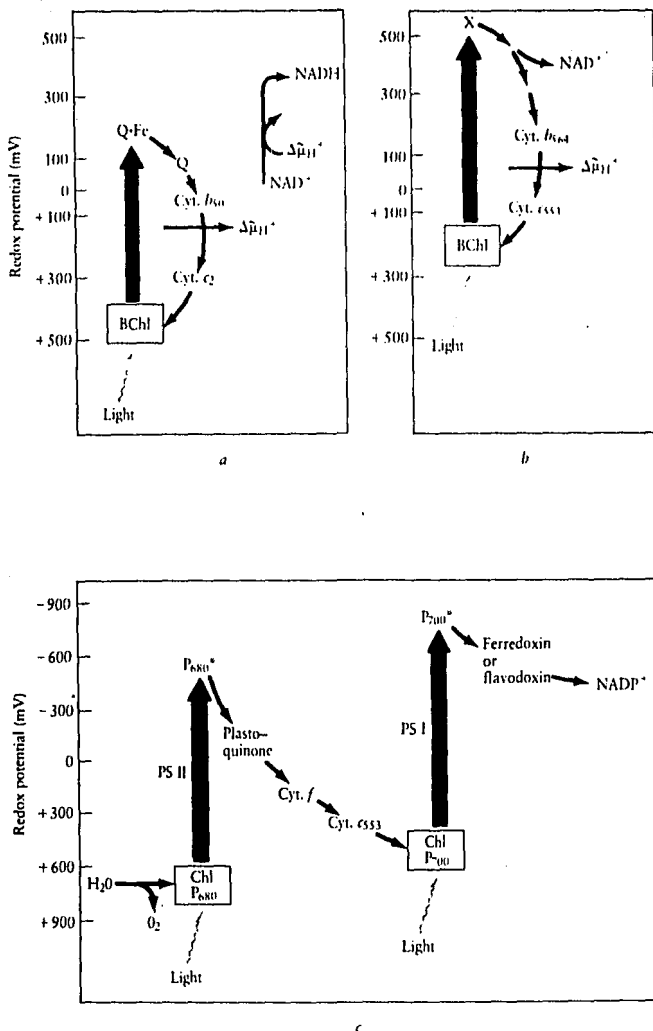


FIG. 1.4. TRANSPORTE CICLICO Y NO CICLICO EN LA FOTOSINTESIS BACTERIANA. a) Transporte de electrones ciclico en *R. sphaeroides*. b) Transporte de electrones ciclico en *Chlorobium limicola*. Estos dos organismos emplean diferentes acarreadores redox y operan en diferentes valores redox. *R. sphaeroides* genera NADH por el transporte de electrones operado en reversa, mientras que *C. limicola* reduce NAD⁺ directamente. c) Transporte de electrones aciclico en cianobacterias y cloroplastos. Dos fotosistemas separados participan en la reducción de NADP⁺ a NADPH por luz; el agua sirve como reductor, con la liberación de oxígeno. Chl, clorofila; Bchl, bacterioclorofila; Q, quinona. (Tomada de Harold, 1986)

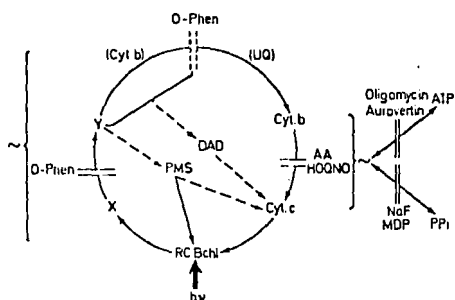


FIG. 1.5. PRESENTACION ESQUEMATICA DEL TRANSPORTE CICLICO DE ELECTRONES Y LOS SITIOS DE ACOPLAMIENTO CON LA FOSFORILACION EN CROMATOFOROS DE *R. rubrum*. La reacción de transporte de electrones se siguió espectrofotométricamente. -----Reacción sugerida de transporte de electrones. () indica un componente observado hasta ahora sólo en titulaciones redox en la oscuridad. =: sitio de acción de inhibidor. ==: sitio sugerido de inhibición. ~: estado de alta energía, AA: antimicina A, MDP: metilendifosfato, o-phen: ortofenantrolina, UQ ubiquinona. (Tomado de Gromet-Elhanan, 1977).

la en el último acto fotoquímico, regresa a su lugar original (Fig. 1.4).

El evento inicial del transporte de electrones en R. rubrum (Fig. 1.5), es la excitación fotoquímica de las moléculas de bacterioclorofila de los sistemas antena, que son los complejos de pigmento-proteína mayoritarios de la membrana. Esta energía luminica es transferida al centro de reacción, CR, de la bacterioclorofila, cuyo contenido en la membrana es menor (Junge, W. 1977). Como consecuencia un electrón es transferido a un aceptor primario no identificado, X.



Se han propuesto varios componentes como aceptores primarios, incluyendo a quinonas y proteínas con hierro no hémico. La separación de cargas provoca que el CR oxidado reciba electrones de un donador inmediato, el citocromo C_2 , estableciéndose así un flujo electrónico ciclico. Los transportadores electrónicos son en su gran mayoría citocromos de los tipos b y c y ubiquinona. Esta cadena de transporte de electrones tiene un doble trabajo, conducir electrones al oxígeno o de regreso a la clorofila dependiendo del medio en el que se encuentre la bacteria, anaeróbico en la luz o aeróbico en la oscuridad.

La cadena de oxidación ciclica está acoplada a la fosforilación en varios sitios, probablemente en dos; el producto terminal puede ser ATP o pirofosfato inorgánico. Alternativamente, la energía de la luz puede ser utilizada para la generación de poder reductor. Las bacterias fotosintéticas

son incapaces de usar al agua como donadora de hidrógenos y requieren a un agente reductor exógeno, H_2 , H_2S , o un reductor orgánico. La formación de NADH de un NAD^+ y un reductor ocurre por un proceso análogo a la reversa de la cadena de oxidación mitocondrial. Se debe notar que tanto la luz como el ATP pueden servir como donadores de energía (Jackson y Crofts, 1968). El paso de electrones por una cascada de transportadores redox genera un estado energizado para llevar a cabo las funciones ligadas a energía.

En 1954 Frenkel observó la existencia de la fotofosforilación acoplada al transporte de electrones inducida por luz en un medio anaeróbico. Existe ahora bastante evidencia para apoyar la tesis de que la iluminación induce un influjo electrogénico rápido de H^+ , generando tanto un gradiente de pH (ácido en el interior) y un potencial eléctrico (+250 mV, interior positivo) a través de la membrana. Esto fue inferido inicialmente por efecto de ionóforos en el movimiento de protones y en la fotofosforilación. La presencia de sustratos de fosforilación colapsan, en general, paricalmente el gradiente de potencial eléctrico y el de pH reflejando un consumo de energía. Los sistemas fotosintéticos pueden transducir la energía de un gradiente de pH en ATP, sin requerir el funcionamiento del transporte de electrones.

1.3. ATP sintetasa

La ATP sintetasa, también llamada ATPasa, cataliza tanto la síntesis como la hidrólisis de ATP. Consiste estructuralmente de dos componentes, un sector unido a la membrana, F_0 , que funciona como un canal translocador de protones (Mit-

chell, 1973), y un sector extramembranal, F_1 , que tiene actividad catalítica (Pullman et. al. 1960). Existen similitudes estructurales de las ATP sintetasas de mitocondrias, bacterias y cloroplastos.

1.3.1. ESTURCUTRA.

La F_1 de cromatóforos (Johansson et. al. 1973, Gephstein et. al. 1978) está compuesta por cinco subunidades diferentes. Los polipéptidos se designan de acuerdo a su tamaño y tienen una masa molecular entre 54-58, 43-53.5, 32-39, 13-18 y 7.5-14 kD correspondientes a las subunidades α , β , δ y ϵ , respectivamente (Johansson y Baltcheffsky, 1975; Bengis-Garber y Gromet-Elhanan, 1979; Muller et. al, 1979). La estequiometría propuesta más aceptada de estas subunidades es de $\alpha_3\beta_3\delta\epsilon$ (McCarty y Carmeli, 1982). La F_0F_1 de mitocondrias difiere de su contraparte en procariotes al poseer dos polipéptidos que parece que forman parte del tallo y son la proteína que confiere sensibilidad a oligomicina (OSCP) y el factor de acoplamiento $6 F_0$. Tienen pesos moleculares de 20,967 (Ovichinnikov, et. al., 1984) y 8,000 (Knowles, et. al., 1971), respectivamente. Es importante aclarar que dentro del grupo de las bacterias, las fotosintéticas también son sensibles a oligomicina, aunque todavía no se ha descrito una subunidad que le confiera esta sensibilidad. Otro aspecto importante es que aún no se tiene evidencia de que exista una proteína inhibidora natural como en mitocondrias (Pullman, 1961), en las bacterias o cloroplastos. La F_1 no contiene lípidos, ni grupos prostéticos conocidos y en prepa-

raciones puras de F_1 se encuentran Mg^{2+} y nucleótidos (ATP y ADP) fuertemente unidos (Foster y Fillingame, 1979; Friedl et. al. 1979). El sector membranal F_0 contiene tres subunidades, que en geles de SDS corren con pesos moleculares de 24, 19 y 8.5 KD. (Negrin et. al 1980; Schneider y Altendorf, 1982). Estas subunidades se denominan con las letras a, b, y c, respectivamente. Su estructura y estequiometría no se conoce aún y se agregan en un factor de 100 a 150 kD fuertemente integrado a lípidos. El peso molecular de la RrF_0F_1 -ATPasa determinado por filtración en gel es de $480,000 \pm 30,000$ (Schneider et. al., 1978).

Las preparaciones de bacterias fotosintéticas tienen una ATPasa con una actividad hidrolítica dependiente de Mg^{2+} que es sensible a inhibidores de transferencia de energía. La ATPasa de membrana es menos activa en presencia de cationes divalentes diferentes al Mg^{2+} , en el siguiente orden: Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Fe^{2+} . El Ca^{2+} aparece frecuentemente asociado con la actividad de hidrólisis, característica de la H^+ -ATPasa solubilizada (Baccarini-Melandri y Melandri, 1978).

1.3.2. MECANISMO DE SINTESIS E HIDROLISIS DE ATP.

La premisa principal de la teoría quimiosmótica de Mitchell (Mitchell, 1961) es que el gradiente electroquímico transmembranal sirve como intermediario en los procesos de conversión de energía. El acoplamiento de energía ocurre a través de la cadena de transporte de electrones en mitocondrias, cloroplastos y bacterias fotosintéticas y aeróbicas, en donde la diferencia en el punto medio del potencial de

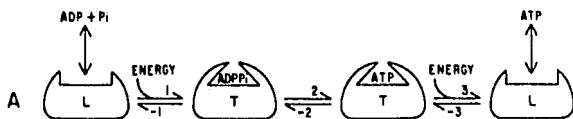
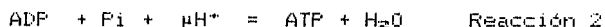


FIG. 1.6. MECANISMO DE SINTESIS DE ATP. Mecanismo propuesto por Boyer, en donde se traza una vuelta del ciclo. Propone que durante la energización en los pasos 1 y 3, un sitio catalítico de la F₁ es interconvertido entre dos formas: L, unión débil para ligandos catalíticamente inactivo y T, unión fuerte para ligandos y catalíticamente activo. (Tomado de Cross, 1981).

reducción de acarreadores adyacentes, A y B, es termodinámicamente suficiente para transportar protones en contra de un gradiente electroquímico. (Reacción 1). La energía guardada en éste gradiente, μH^+ , es usada por la ATPasa para llevar a cabo la síntesis neta de ATP (reacción 2).



Antes de 1973, en los modelos propuestos para la fosforilación oxidativa y fotofosforilación, se suponía que el paso de utilización de energía durante la síntesis neta de ATP, era el paso catalítico, es decir, la formación de la unión anhídrida. Esto estaba basado en precedentes bioquímicos en que la energía libre para la formación de ATP en el sitio catalítico, sería, como en soluciones acuosas, altamente endérgico. En partículas submitocondriales acopladas, todos los pasos de la reacción involucrados en la síntesis de ATP, son reversibles. Esto resulta en un número de reacciones de recambio de isótopos que se pueden estudiar para monitorear pasos de unión de sustrato y liberación de productos, así como el paso catalítico. Cada reacción de recambio requiere una combinación diferente de pasos de unión y liberación, pero todos requieren tanto la formación y ruptura de uniones covalentes. Si la entrada de energía durante la síntesis de ATP fuera requerida para la formación del enlace anhídrido (Fig. 1.6, paso 2), entonces la adición de desacoplantes para disipar el estado energizado debería prevenir no sólo la síntesis neta de ATP del medio sino también todas las

reacciones de recambio. Este no fue lo que se encontró (Mitchell, P.A. et. al. 1967; Boyer, P.D. et. al, 1973; Cross, R. and Boyer, 1975, Rosing J., et. al. 1977; Russo, J.A. et. al. 1978). El intermediario de recambio de oxígeno PiH₂O, que ocurre durante la hidrólisis neta de ATP es insensible a desacoplantes. Este intercambio se mide fácilmente siguiendo la pérdida de ¹⁸O marcado puesto en el grupo fosforilo gamma del ATP durante la hidrólisis neta. Los pasos requeridos (Fig.1.6) incluyen la unión de ATP (paso -3), la hidrólisis reversible de ATP (pasos -2 y 2) y la disociación de ADP y Pi (paso -1). Los únicos pasos no requeridos por éste cambio insensible a desacoplantes son la unión de ADP y Pi (paso 1) y la liberación de ATP (paso 3). Ya que cada uno de los recambios sensibles a desacoplantes requieren el paso 1 ó 3, o ambos, éstos pasos son los candidatos para una entrada de energía de la oxidación de sustratos. Inicialmente se propuso que la liberación del ATP es el paso principal que requiere energía en la fosforilación oxidativa y fotosintética (Boyer et, al. 1973; Boyer, P.D. 1974). Estudios posteriores mostraron que la unión ADP + Pi estaban también asociada con una entrada de energía de la oxidación (Gómez-Puyou, et.al., 1983).

1.3.3. INTERACCIONES COOPERATIVAS ENTRE LAS SUBUNIDADES CATALITICAS DE F₁. (Cross, 1981).

La evidencia derivada de múltiples estudios de las propiedades físicas y enzimáticas de ATPasas de mitocondrias y bacterias, sugiere que la hidrólisis de ATP por estas enzimas

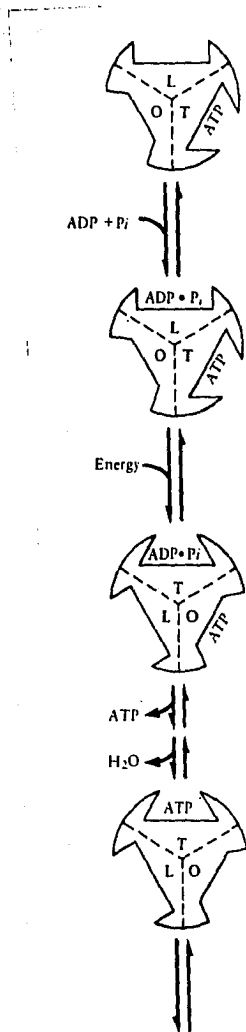


FIG. 1.7. COOPERATIVIDAD CATALITICA ENTRE LOS TRES SITIOS CATALITICOS. El esquema muestra un tercio de un ciclo enzimático. Los sitios en la F₁ se interconvierten en tres formas: O, sitio abierto con baja afinidad a ligandos y catalíticamente inactivo. L, baja afinidad a ligandos debilmente unidos y catalíticamente inactivo. T, unión de ligandos fuerte y activo catalíticamente (Tomado de Cross, 1981).

involucra interacciones cooperativas entre dos o más sitios catalíticos. Los primeros estudios que lo sugirieron los hizo Ferguson (Ferguson, et. al., 1975). La modificación química de una subunidad β por MF_1 , en un sólo residuo de tirosina o arginina con $Nbf-Cl$, causaba la inhibición completa de la hidrólisis de ATP. En estudios de unión de ADP a BF_1 de Alcaligenes faecalis, Adolfsen y Moudrianakis (1976), encontraron que la velocidad de disociación de ADP previamente unido, aumentaba añadiendo nucleótidos al medio. Los autores concluyeron que la unión de un nucleótido a un sitio de la enzima, promueve la disociación alostérica del nucleótido de otro sitio, pero no se estableció si estos sitios eran catalíticos o no. Estudios de Boyer, Kayalar y Rosing, de recambio entre los oxígenos del agua y los átomos de oxígeno del P_i , liberados durante la hidrólisis de ATP, catalizada por F_1 , dieron evidencia de que la unión de ADP y P_i promueve la liberación de ATP durante la síntesis neta (Kayalar et. al. 1977) y que la unión de ATP promueve la liberación de ADP + P_i durante la hidrólisis neta (Hackney, D. and Boyer, 1978; Choate, et. al. 1979). El mecanismo propuesto se muestra en la Fig. 1.7. La unión de sustratos y la liberación de producto se asocian con la entrada de energía de la oxidación.

Independientemente, Kozlov y Skulachev en 1977, propusieron un mecanismo detallado para la hidrólisis de ATP por F_1 que involucra simultáneamente cambios de afinidad dependientes de energía para sustratos y producto. Sus caracte-

ísticas básicas están incorporadas en la Fig. 1.5, solamente que incluye movimientos complicados de nucleótidos entre las subunidades α y β en un intento para involucrar sitios de unión, que no participan directamente en la catálisis.

En adición a los compuestos que modifican la F_1 , como el Nbf-Cl, otros reactivos han mostrado reactividad de la mitad de los sitios, o la tercera parte de los sitios, si la F_1 contiene 3 subunidades catalíticas. La hidrólisis de ATP se inhibe en BF_3 de *E. coli*, por la incorporación covalente de un mol de DCCD por mol de enzima (Satre et. al. 1979) y la inactivación de MF_1 de corazón de res, correlaciona con la modificación de la reactividad de un sólo residuo con fenil-glioxal (Kohlbrenner, W.E. Cross, R.L. 1978).

Una de las formas más claras y directas para probar la cooperatividad catalítica entre los sitios hidrolíticos de la ATPasa de mitocondrias de corazón de res es la catálisis de un sitio, la cual se lleva a cabo en condiciones tales en las que exista sólo el sustrato suficiente para ocupar un solo sitio catalítico activo. Esta catálisis está asociada con velocidades bajas de hidrólisis de sustrato. Mediante la adición de sustrato en exceso, en concentraciones suficientes para llenar el sitio dos de la enzima, se acelera la velocidad de hidrólisis neta del ATP previamente unido al primer sitio 10^6 veces (Grubmeyer, C. y Penefsky, H.S., 1981). El ATP y análogos hidrolizables y no hidrolizables, pueden promover la hidrólisis. Estos datos muestran claramente que las velocidades normales de catálisis requieren interacciones entre por lo menos, dos sitios catalíticos. La afinidad

aparente para la unión de los productos en el primer sitio decrece mostrando una cooperatividad negativa en la unión de sustratos, cuando el segundo sitio es ocupado por sustratos y el incremento en la velocidad de liberación de producto es el principal factor en la promoción de la velocidad de reacción (Grubmeyer et. al., 1982).

1.3.4. REGULACION DE LA ATP sintetasa.

El complejo ATP sintetasa cataliza la reacción de síntesis de ATP así como la reacción reversa. La H^+ -ATPasa de mitocondrias, cloroplastos y bacterias trabaja principalmente en dirección de síntesis de ATP, por lo que es razonable pensar en un sistema regulatorio para abolir ciclos fútiles. Aunque este complejo es estructuralmente parecido en diferentes sistemas, la expresión de la actividad de hidrólisis de ATP está regulada por distintos factores. Estos factores pueden ser: a) el equilibrio termodinámico del gradiente de protones a través de la membrana transductora de energía, b) la proteína inhibidora de la ATPasa, c) ADP (y/o ADP y Pi), d) cationes divalentes y tal vez e) el estado redox de los grupos SH en la molécula de F_1 .

En 1963 Fullman y Monroy describieron a la proteína inhibidora de mitocondrias (ver revisión de Schwerzmann y Pedersen, 1986). Es es una proteína con un peso molecular entre 7,000 en levaduras y 16,000 en músculo esquelético, con un alto grado de homología entre las diferentes especies. En cloroplastos y algunas bacterias como E. coli, la subunidad ϵ de la F_1 podría ser la responsable de la regula-

ción de la catálisis (Mc Carty R.E. y Monroy, 1984; Smith y Sternweiss, 1977; Smith y Sternweis, 1982; Dreyfus y Satre, 1984) aunque todavía es una materia que requiere un estudio ulterior.

La ATPasa de cromatóforos de R. rubrum, Rhodospseudomonas capsulata y Rhodospseudomonas sphaeroides, se regula por un gradiente transmembranal de protones. En cromatóforos de Rp. capsulata (Baccarini-Melandri et. al. 1975) y R. rubrum (Edwards y Jackson, 1976) que catalizan la hidrólisis de ATP en la oscuridad, los desacoplantes a altas concentraciones disipan el gradiente de protones inducido por ATP e inhiben la actividad hidrolítica. En ambos casos, la inhibición es superada por la iluminación. En R. rubrum esta energización se deba a una disminución de la Km para la hidrólisis de ATP (Baltschefscky y Lundin, 1979). El hecho de que la actividad hidrolítica de la ATPasa se active con luz puede darle importancia fisiológica a la inhibición por producto. El ADP es un inhibidor competitivo con una $K_i = 40 \mu M$ en la ATPasa inducida por luz en cloroplastos (Bennun and Avron, 1965). En cromatóforos de R. rubrum (Baltschefscky y Lundin, 1979), la activación es inhibida por concentraciones micromolares de ADP, controlando la hidrólisis como un efector alostérico. Sin embargo el ADP es un inhibidor competitivo con una $K_i = 0.28 \text{ mM}$, de la hidrólisis en la oscuridad. Así mismo la ATPasa en cromatóforos no tratados se encuentra en un estado de baja actividad. Este se puede activar aplicando un gradiente electroquímico transmembranal generado por un transporte de electrones inducido por luz o aplicando saltos

ácido-base. Después de una disipación rápida, del potencial electroquímico, el estado activo de la H^+ -ATPasa, decae a uno de baja actividad, diferente al estado inicial de baja actividad, ya que puede ser reactivado añadiendo sustrato a una concentración de Mg^+ baja, entre 20 y 30 μM . Estos datos sugieren que el ADP fuertemente unido es liberado, activando la ATPasa (Slooten y Nuyten, 1981 a., Slooten y Nuyten, 1981 b.).

Los iones divalentes libres, como el Mg^{2+} , actúan como inhibidores competitivos débiles utilizando como sustrato al complejo Mg -ATP. El Mg^{2+} libre, en cromatóforos es un potente inhibidor no competitivo, sólo en presencia de altas concentraciones de desacoplante (Edwards y Jackson, 1976). Aunque estos datos son interesantes mecanísticamente, se requieren más datos para asegurar su significado fisiológico.

Estudios de la regulación con activadores reversibles como ciertos indicadores de pH lipofílicos y algunos detergentes (Soe et. al., 1978) estimulan la velocidad de hidrólisis de ATP dependiente de Mg^{2+} , e inhiben la actividad dependiente de Ca^{2+} , en la F_1 aislada de R. rubrum. Entre los detergentes más eficientes en la activación se encuentran los detergentes con una cadena de doce átomos de carbono como el dodecilsulfonato.

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1. CULTIVO DE Rhodospirillum rubrum (Cepa S1)

2.1.1. CRECIMIENTO EN MEDIO SOLIDO.

Este método se aplica para mantener a las cepas de 6 a 12 meses con una tasa de crecimiento baja. El medio sólido contiene: 2% de agar, 0.3% de extracto de levadura y 0.2% de peptona y un poco de biotina. Se esteriliza en frascos de 20 ml, conteniendo 10 ml de medio cada uno. Se inoculan los frascos por punción y se mantienen en la oscuridad durante 12 horas antes de iluminarlas con luz constante, utilizando lámparas con filamento de tungsteno, de 40 watts.

2.1.2. Crecimiento en medio líquido.

Este método se aplica para obtener grandes cantidades de bacterias. Se utiliza el medio (Cohen Bazire et, al., 1957) que se describe a continuación:

1. Base concentrada	Total	500 ml
Acido nitriloacético	$N(CH_2COOH)_3$	5 g
Sulfato de Magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7.2 g
Cloruro de calcio	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	2.18 g
Molibdato de amonio	$(NH_4)_2MoO_7 \cdot 2H_2O$	0.012 g
Sulfato ferroso	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.049 g
Metales "44"		25 ml
Ajustar a pH 6.8 con NaOH y utilizar agua bidestilada.		

2. Metales "44"

EDTA	2.5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.0 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	11.0 g
$MnSO_4 \cdot 6H_2O$	1.54 g

MnCl ₂ 4H ₂ O	1.37 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.392 g
Co(NO ₂) ₂ 6H ₂ O	0.248 g
Na ₂ B ₄ O ₇ 6H ₂ O	0.177g

Se afora con agua bidestilada a 1 litro y se añaden aproximadamente 4 gotas de H₂SO₄ para que se disuelvan los metales.

3. KH ₂ PO ₄	136.9 g/l	pH 6.8 + 20 g de NaOH
4. Acido succínico	100 g/l	pH 6.8 + 70 g de NaOH
5. (NH ₄) ₂ SO ₄	100 g/l	
6. NaCl	50 g/l	
7. Acido Glutámico	25 g/250 ml	pH 6.8
8. Acido Aspártico	5 g/250 ml	pH 6.8

Con las soluciones anteriores se preparan 12.5 l de medio de siguiente forma:

1. Base concentrada	250 ml
2. KH ₂ PO ₄	250 ml
3. Acido succínico	250 ml
4. (NH ₄) ₂ SO ₄	62.5 ml
5. NaCl	125 ml
6. Acido Glutámico	25 ml
7. Acido Aspártico	25 ml
8. Caseína hidrolizada ó extracto de carne	12.5 g
9. Acido nicotínico	12.5 mg
10. Tiamina	6.25 mg
11. d-Biotina	0.125 mg

Para hacer el medio se agregan todos los componentes al recipiente menos la base concentrada, la cual se agrega hasta

que se haya puesto la mitad de la cantidad de agua destilada. Al final se ajusta el pH a 6.8 con HCl.

Se esterilizan botellas pyrex de un litro a 15 libras de presión durante 15 minutos. Si se utilizan botellas de 15 litros se esterilizan durante 45 minutos.

2.2. SIEMBRA DE BACTERIAS

Ya que se obtiene un cultivo en medio sólido, éste se inocula en una botella de 1 l. Se mantienen en la oscuridad durante doce horas y después se transfieren a la luz, con focos de 40 watts, a 30°C. De este inóculo es posible obtener un cultivo más grande, transfiriendo 10 ml de cultivo en fase de crecimiento logarítmico tardío a cada botella de 1 l.

2.3. CONSERVACION DE LA CEPA.

Se crecen las bacterias en tubos de 15 ml, en un medio rico, que se describe a continuación:

Peptona de caseína	2.5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Potasio dihidrógeno fosfato	
KH_2PO_4 pH 6.9 1 M	10 ml
Malato de potasio 20%	10 ml
Cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 10%	10 ml
Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 0.8%	10 ml
Cloruro ferroso (FeCl_2) 0.1%	10 ml
Agua bidestilada	c.b.p. 1 l

Se mantienen en la oscuridad durante 12 horas y después se transfieren a la luz, como se explicó anteriormente. Se dejan crecer y se toma un mililitro de cultivo pesado, se añade 0.1 ml de dimetilsulfóxido previamente filtrado, y se

congela a -70°C . Este cultivo se mantiene viable durante años.

2.4. COSECHA DE BACTERIAS.

Las bacterias se cosechan en fase de crecimiento logarítmico tardío. Se conservan a 4°C y se centrifugan a $5,500 \times g$, durante 10 minutos. El precipitado se resuspende en Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 y se centrifuga nuevamente. Este proceso se repite aproximadamente 3 veces, hasta que se quite el olor. El precipitado bien lavado se resuspende en 50mM de Tricina, pH 7.4, 10 mM de MgCl_2 , 10% glicerol y 100 mM de sacarosa en un volumen pequeño, para después centrifugarlo en el rotor Sorvall, SS-34 a 10,000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se pesa y se congela en alícuotas a -70°C .

2.5. PREPARACION DE CROMATOFOROS.

Los cromatóforos se preparan según el método de Baccarini-Melandri y col. (1974).

- a. Se resuspenden las bacterias en 50 mM de Tricina NaOH pH 8.0, 250 mM de Sacarosa, 5 mM de MgCl_2 más 1 mg de RNasa y 1 mg de DNasa por cada 10 g de bacterias.
- b. Se sonicán en lotes de 15 ml durante 90 s en un sonicador MSE, conservando la temperatura en 4°C .
- c. Se centrifuga a 13,000 rpm durante 20 min en el rotor Sorvall SS34.
- d. El sobrenadante se centrifuga a 40,000 rpm, en el rotor Beckman 45Ti durante 90 min.

- e. El precipitado se resuspende en 10 ml por gramo de bacterias iniciales, en 50mM Tricina NaOH, pH 8.0, 250 mM de sacarosa y 0.5 mM de EDTA.
 - f. Se centrifuga en las mismas condiciones que en el paso "d"
 - g. Los pasos "e" y "f" se repiten 3 veces.
 - h. El precipitado de la última lavada se resuspende en 1 mM de Tricina NaOH y 50% de glicerol, y se guarda a -70°C.
- NOTA. Los precipitados se pueden resuspender utilizando un pincel de cerda fina cuidando no hacer espuma.

2.6. AISLAMIENTO DE LA H⁺-ATPasa DE Rhodospirillum rubrum.

2.6.1. AISLAMIENTO DE RrF₀F₁.

La H⁺-ATPasa de Rhodospirillum rubrum se aisló mediante una modificación del método de Izagaloff y Oren (Izagaloff et. al, 1971 y Oren, R. y Gromet-Elhanan, 1979). Se resuspenden los cromatóforos en una concentración de 4.5 mg/ml de proteína en 150 mM sacarosa, 5 mM Tris-HCl, pH 7.5, a los cuales se añade un volumen igual de Tritón X-100 al 9%. La mezcla se centrifuga inmediatamente durante 30 min. a 45,000 rpm en un rotor Beckman 50 Ti. El sobrenadante se colecta y se concentra por ultrafiltración a través de una membrana de Amicon XM-300. Este concentrado se coloca encima de un gradiente continuo de sacarosa de 5 a 15%, que contiene 0.45% de Tritón X-100 y 5 mM Hepes NaOH, pH 8.0. El gradiente se centrifuga durante 13 h a 21,000 rpm en un rotor Beckman SW 27. Se colectan 25 fracciones de un mililitro cada una y se colectan por punción del fondo del tubo. Se cuantifica la

actividad ATPásica de cada fracción y las fracciones activas se concentran en una membrana de Amicón X-100 y se guardan a 4°C.

2.6.2. AISLAMIENTO DE RrF₁.

La RrF₁ se aisló mediante el método de Baccarini-Melandri (Baccarini-Melandri y Melandri, 1974) modificado. Se extraen cromatóforos (50 mg de BC1) en presencia de 2.5 mM de MgCl₂, gota por gota con 20 volúmenes de acetona fría (-10°C) y se sedimentan por centrifugación a -10°C. El precipitado se seca por evacuación y se extrae dos veces con 40 ml totales de una solución con 0.05 M de Tris-HCl pH 7.6 y 4 mM de ATP. Se deja 30 min a 4°C y se centrifuga durante 30 min a 25,000 x g (13,000 rpm en el rotor sorvall SS-34). El sobrenadante se centrifuga 2 horas a 100,000 x g h se obtiene la RrF₁ (4 mg/ml).

2.7. CUANTIFICACION DE LA HIDROLISIS DE ATP Y DEL RECAMBIO ATP-³²Pi.

2.7.1. PURIFICACION DE ³²Pi.

La purificación de ³²Pi, se lleva a cabo mediante una modificación del método reportado por Boyer y Bryan (Boyer y Bryan, 1967) de la siguiente manera:

- a. Se toman aproximadamente 5 mCi de ³²Pi más 6 µl de 500 mM Pi y se aforan a 1.5 ml con agua bidestilada.
- b. Se añade 1 ml de molibdato de amonio en H₂SO₄ (6.6% de molibdato de amonio más 7.5 N H₂SO₄, 1:1).
- c. Se añade 0.3 ml de acetona y se agita.
- d. Se añade 1 ml de acetato de butilo y se agita durante 90

s y se guarda la fase de acetato de butilo.

- e. Se vuelve a añadir 1 ml de acetato de butilo, se agita y se junta la fase de acetato de butilo con la anterior.
- f. A éstos dos mililitros de acetato de butilo se les añade 1 ml de 1M NH_4Cl más 5 M de NH_4OH . Si el color sigue amarillo se añaden 10 μl de NH_4OH fumante y se agita vigorosamente
- g. Se elimina la capa orgánica.
- h. A la capa acuosa se le añaden 0.8 ml de la siguiente solución: 5.5 g MgCl_2 , 10 g NH_4Cl , 50 ml H_2O , 10 ml NH_4OH y se lleva a 100 ml.
- i. Se añaden 6 μl de 500 mM Pi.
- j. Se coloca en hielo durante 2 horas.
- k. Se centrifuga a 3,000 x g y se elimina el sobrenadante.
- l. Se añade 1 ml de H_2O al precipitado y se forma una suspensión. Se añaden 10 μl de una solución 1 N de HCl hasta disolver.

2.7.2. SINTESIS DE ^{32}P -ATP.

La síntesis de ^{32}P -ATP se llevó a cabo por el método de Glynn y Chapell (Glynn y Chapell, 1964), utilizando ^{32}P i previamente purificado, de la siguiente forma:

- a. 5 mCi de ^{32}P i se dejan reaccionar durante 60 min a 26°C en: 50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 6 mM MgCl_2 , 2 mM cisteína, 1 mM 3-fosfoglicerato, 5 mM ATP, 0.4 mM NADH, 1 mM EGTA-K, 0.1 ml de β -mercaptostanol y 200 μg de 3-P-gliceratocinasa.
- b. Después de la incubación se añaden 50 ml de etanol y se agregan otros 10 ml de etanol al 17% al tubo de reacción.

- c. Se evapora el alcohol a una temperatura máxima de 40°C.
- d. Se pasa por una columna de 3.5 x 0.5 cm que contiene 1 g de resina AG 1x8 de Bio-Rad. La columna se carga después de haber filtrado el líquido a través de papel Whatman 1, lavándolo con 10 ml de agua.
- e. Para eliminar de la columna al AMP, al ADP y al Pi se eluye con 40 ml de NH₄Cl 20 mM en HCl 0.02 N. Se lava con agua para eliminar el NH₄⁺ y finalmente el ³²P-ATP se eluye con HCl 0.25 N.
- f. Este volumen (15-17 ml) se colecta en hielo y se le ajusta el pH a 6.8 con una solución 1M de Tris (de 3 a 3.4 ml).

2.7.3. CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA.

La cuantificación del fosfato liberado durante la hidrólisis de ATP, tanto en cromatóforos como en la H⁺-ATPasa se midió a partir de una alícuota del ensayo (según De Mais et.al., 1983) previamente centrifugado a 3,000 rpm durante 10 min. Teniendo la alícuota (0.7 ml cuando se midió el efecto del LDAO y 0.2 ml cuando se midieron las relaciones hidrólisis/recambio ATP - ³²Pi) se hizo la determinación de la actividad ATPásica extrayendo el ³²Pi añadiendo 0.3 ml de acetona, 0.4 ml de molibdato (5 g de heptamolibdato de amonio, 40 ml de ácido sulfúrico 10 N y c.b.p. 100 ml de agua). Una vez formado el complejo fosfomolibdato, soluble en solventes orgánicos, se añade 1 ml de acetato de butilo y se agita vigorosamente durante 1 min. Se centrifuga 1 min a 3,000 rpm y se saca una alícuota de la fase orgánica (de 0.4

a 0.8 ml). Esta se coloca en un papel filtro (2.5 x 8.0 cm) y se deja secar. Se coloca el papel dentro de un vial con líquido de centelleo Bray que contiene 5.5 g de PPO (2,5-difeniloxazol), 0.125 g de POPOP (1,4 bis(2-(5-feniloxazolil)-benceno), mas 1 l de tolueno. Es importante señalar que no es necesario utilizar POPOP, ya que originalmente era requerido como "convertidor de longitudes de onda" para poder corresponder con la longitud de onda de la luz de salida de los tubos fotomultiplicadores antiguos. Los tubos modernos tienen una respuesta espectral tan amplia, que el uso de solutos secundarios no es ya necesaria y puede llevar a eficiencias de contaje reducidas, además de que es un gasto innecesario (Chapman y Ayrey, 1981).

2.7.4. CUANTIFICACION DE LA REACCION DE RECAMBIO ATP-³²Pi.

La medición de ³²Pi incorporado a ATP durante ésta reacción se llevó a cabo tomando una alícuota de 0.2 ml del ensayo previamente centrifugado a 3000 rpm durante 10 min, la cual se proceso del mismo modo que la cuantificación de ATP hidrolizado, excepto que ahora la fase de interés es la fase acuosa donde se encuentra el ATP y el ADP. A partir de la primera separación, la fase orgánica se desecha y se vuelve a extraer 6 veces, añadiendo solamente 0.3 ml de acetona, 15 µl de Pi 25 mM y 1 ml de acetato de butilo. Se toma una muestra de 0.5 ml de la fase acuosa final y se coloca en un papel filtro para después contarlo en líquido de centelleo de Bray.

2.8. DETERMINACION DE BACTERIOCLOROFILA.

La bacterioclorofila fue determinada utilizando el coeficiente de extinción in vivo (Clayton, 1963) a 880 nm que es de $140 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.9. DETERMINACION DE PROTEINA

2.9.1. METODO DE BIURET (Gornall, et. al. 1949).

Para determinar la proteína en los cromatóforos es necesario separar la bacterioclorofila de la proteína (Eze y Dumbroff, 1982). La separación se lleva a cabo tomando 10 μl de cromatóforos, a los que se añade gota a gota una solución de acetona-metanol 7:2 v/v. Simultáneamente se agita vigorosamente y se centrifuga a 3,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante puede leerse a 770 nm para determinar bacterioclorofila, asumiendo un coeficiente de extinción molar de $75 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y un peso molecular de 1000. El precipitado se resuspende en 0.2 ml de deoxicolato de sodio al 1% y se le añaden 0.8 ml de agua y 2 ml de reactivo de Biuret (colato de sodio al 4%, NaOH al 10% y CuSO_4). se agita y después de 15 min se lee a 540 nm. Simultáneamente se hace una curva patrón con albúmina bovina.

2.9.2. METODO DE AZUL DE COOMASIE (Bradford, 1976).

Se utiliza para cuantificar proteína de material soluble, además de que tiene una gran sensibilidad, ya que detecta hasta 10 μg de proteína. A la muestra de proteína se le añaden 2 ml de una solución colorante que contienen 100 mg de Coomasie G en 50 ml de etanol al 95%, y 100 ml de ácido

fosfórico al 85%. Esta solución se afora a 1 l con agua, y se filtra. Se conserva a 20°C en un frasco ámbar. La muestra de proteína con la solución de Bradford se incubaba de 2 a 30 min y se lee espectrofotométricamente a 595 nm. La curva estándar se hace con albúmina de bovino. En las mezclas de proteína que contienen detergente se agrega una concentración correspondiente en los tubos de la curva estándar.

2.10. CALCULO DE CONCENTRACIONES DE SUSTRATO Y CATIONES LIBRES.

Las concentraciones de sustrato MgATP y CaATP y de cationes libres, Mg^{2+} y Ca^{2+} , se calcularon usando el programa de Fabiato (Fabiato y Fabiato, 1979), que está diseñado para calculadoras de bolsillo como la Texas Instrument. Con este programa podemos calcular las concentraciones totales de metal y de ligando necesarias para obtener concentraciones iónicas libres, y una fuerza iónica específica.

El programa resuelve ecuaciones de equilibrio múltiple hasta entre cuatro ligandos y cinco metales (tres divalentes y dos monovalentes), utilizando el logaritmo de las constantes de asociación. Estos valores fueron tomados de Martell y Sillen (Martell y Sillen, 1971) y fueron:

Metal	log absoluto de la cte de estabilidad	Referencia de Martell y Sillen, 1971
-------	---------------------------------------	--------------------------------------

LIGANDO: EGTA

H	log K1= 9.46	Schwarzenbach et al. (1957)
	log K2= 8.85	" "
	log K3= 2.68	" "
	log K4= 2.00	" "
Ca	log K1= 10.716	Allen y Blinks (1977)

	log K2= 5.33	Schwarzenbach et. al. (1977)
Mg	log K1= 5.21 log K2= 3.37	" "
		LIGANDO: ATP
H	log K1= 6.95 log K2= 4.05 log K3= 1.00 log K4= 1.00	Smith y Alberty (1965) Martell y Schwarzenbach (1965) Arbitrario (es muy bajo) " "
Ca	log K1= 3.982 log K2= 1.80	Nanninga (1961) Martell y Schwarzenbach (1965)
Mg	log K1= 4.324 log K2= 2.74	Nanninga (1961) Phillips (1966)
K	log K1=0.903 log K2= -0.30	Botts et. al. (1965) " "
		LIGANDO: EDTA
H	log K1= 10.26 log K2= 6.16 log K3= 2.67 log K4= 1.99	Schwarzenbach et. al. (1954) " " " " " "
Ca	log K1= 10.70 log K2= 3.51	Das Sarma y Ray (1956) Schwarzenbach et. al. (1954)
Mg	log K1= 8.69 log K2= 2.28	" " " "
		LIGANDO: ADP
H	log K1= 6.68 log K2= 3.99 log K3= 1.00	Smith y Alberty (1956a) Martell y Schwarzenbach (1956) Arbitrario (es muy bajo)
Ca	log K1= 2.81 log K2= 1.52	Smith y Alberty (1965a) " "
Mg	log K1= 3.00 log K2= 1.45	" " " "
		LIGANDO: PO ₄ H
H	log K1= 6.71 log K2= 2.10	Schwarzenbach y Geier (1963) " "
Ca	log K1= 1.70	Smith y Alberty (1965a)
Mg	log K1= 1.88	" "
K	log K1= 0.49	" "

2.11. OTROS PROCEDIMIENTOS.

Se utilizó un peso molecular de 480,000 para la H⁺-ATPasa (Schneider, et. al. 1979). Las concentraciones de nucleótidos de adenina se determinaron por la absorbencia a 259 nm, utilizando un coeficiente de extinción milimolar de 15.4 (Cross, et. al., 1982).

3. RESULTADOS.

3.1. CONSERVACION DE ENERGIA EN CROMATOFOROS DE R. rubrum. CARACTERIZACION DE LA RELACION ENTRE LA HIDROLISIS DE ATP Y RECAMBIO $^{32}\text{P}_i$ -ATP.

El ensayo simultáneo de la actividad ATPásica y el recambio $^{32}\text{P}_i$ -ATP catalizados por la H^+ -ATPasa de R. rubrum en el estado estacionario, muestran, una velocidad lineal hasta los 10 min (Fig.3.1) al utilizar como sustrato MgATP, sin embargo se observa una fase inicial de retardo en ambas reacciones hasta los 3 min. Después de éste tiempo la velocidad relativa de hidrólisis de ATP y de recambio es constante y se mantiene un valor de la relación hidrólisis/recambio de 4 aproximadamente. Es importante observar que cuando la ATPasa está en un medio con CaATP como sustrato, la actividad específica es 6.6 veces menor que la Mg^{2+} -dependiente, y tiene una velocidad lineal hasta los 50 min.

En la figura 3.2 se muestra la dependencia al pH de la relación hidrólisis/recambio. Observamos que esta relación es insensible a los cambios de pH en la actividad Mg-dependiente, (Fig.3.2A). La actividad ATPásica dependiente de Ca^{2+} (Fig. 3.2.B) cambia linealmente al aumentar el pH del medio, mientras que la actividad de recambio no se altera. Así las relaciones hidrólisis/recambio varían 6 veces, de 1.67 a pH 6 a 10.4 a pH 8.5 al utilizar CaATP y se conserva alrededor de 4 al utilizar MgATP como sustrato.

La figura 3.3 se muestra el comportamiento de la hidrólisis de ATP y del recambio $^{32}\text{P}_i$ -ATP a concentraciones cre-

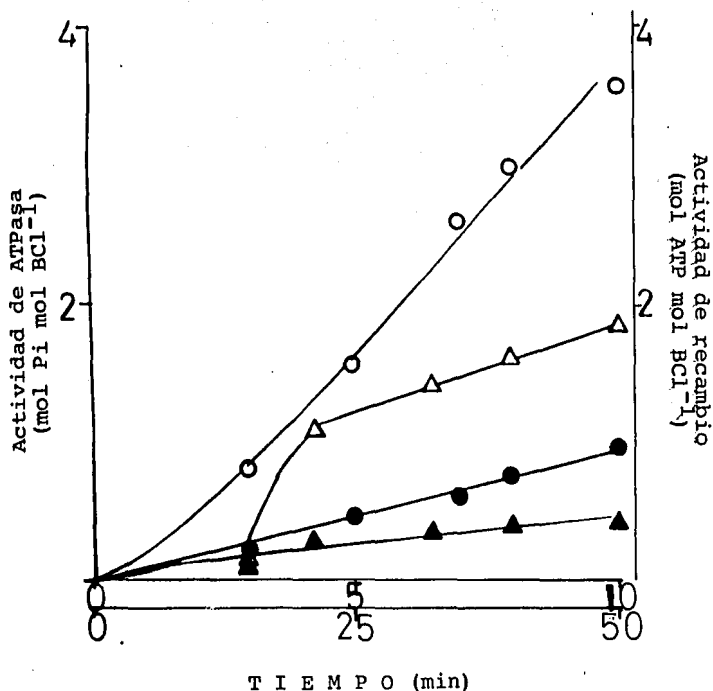


FIG.3.1. LA REACCIÓN DE RECAMBIO ^{32}P i-ATP Y LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA EN CROMATÓFOROS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.

Se incubaron cromatóforos (175 nmoles de Bcl) en la oscuridad en 1 ml total de una solución que llamaremos TS que contenía 50 mM de Tricina-NaOH, pH 8.0, 1 mM de ADP, 4 mM de fosfato de K, 0.2 M de sacarosa y 2.2×10^6 cpm de ^{32}P i/ml en el caso del recambio (●▲) y 1×10^6 cpm de ^{32}P -ATP/ml en el caso de la hidrólisis (○△). Mas 4 mM de ATP y 2 mM de MgCl_2 (○●) ó mas 4 mM de ATP y 3 mM de CaCl_2 (△▲). A los tiempos indicados se tomó una alícuota de 0.2 ml a los que se añadió 10% de TCA. La cantidad de ^{32}P i formado durante la hidrólisis y de ^{32}P i-ATP recambiado, se cuantificó como se indica en materiales y métodos.

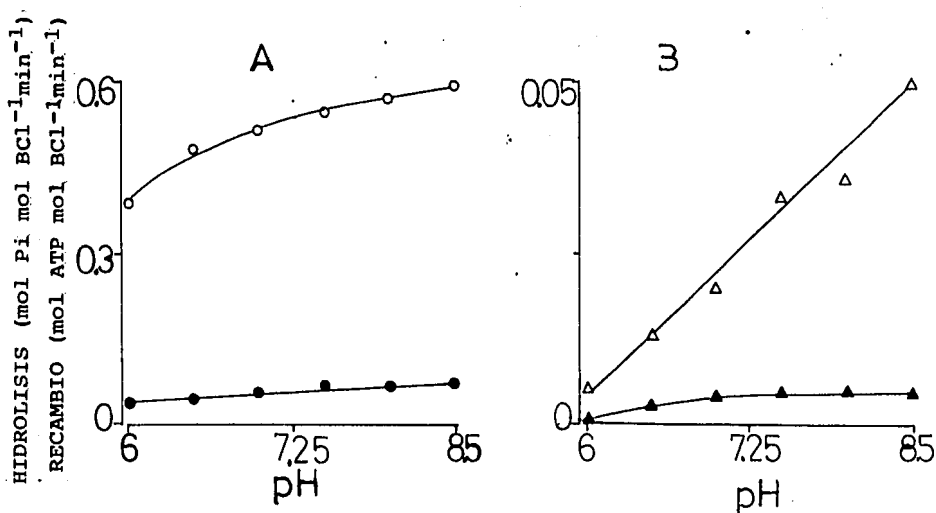


FIG. 3.2. EFECTO DEL pH EN EL RECAMBIO ³²Pi-ATP Y EN LA HIDROLISIS DE ATP.

La reacción se llevó a cabo en la oscuridad, en 0.2 ml del medio TS utilizando como solución amortiguadora MES, MOPS y TRICINA, 50 mM a los pH indicados y 2mM de ATP mas 2mM de MgCl₂ y 1 mM de EGTA ó 3 mM de CaCl₂, 1 mM de EDTA . A. Actividad Mg-dependiente, (○) hidrólisis, (●) recambio. B. Actividad Ca-dependiente (△) hidrólisis, (▲) recambio. La reacción se inició añadiendo cromatóforos (35 nmoles de BCl) y se paró a los 10 min en el caso de (A) y a los 40 min en el caso de (B), con 10% de TCA.

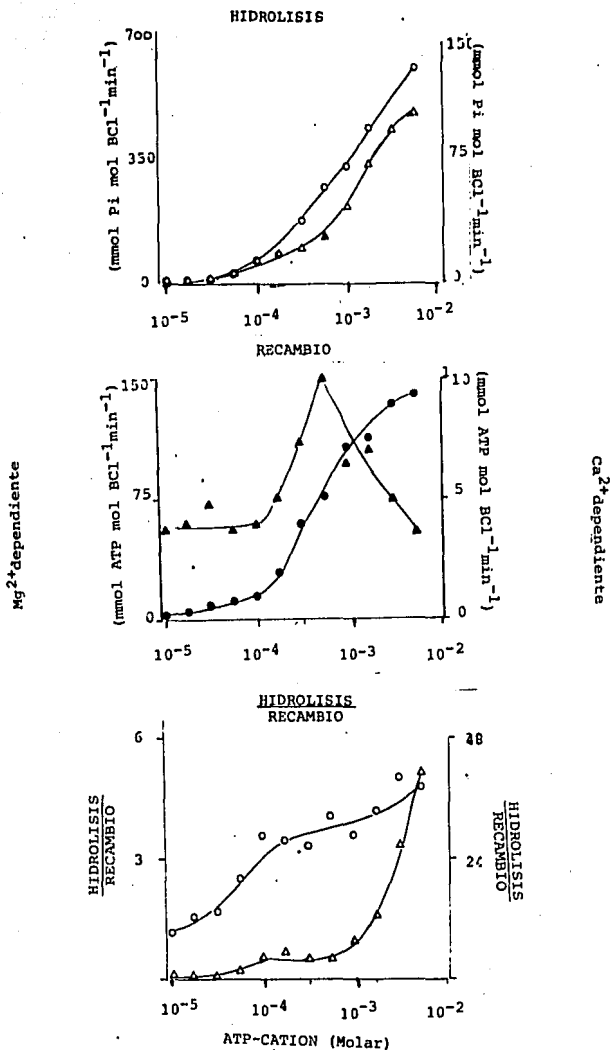


FIG. 3.3. CINETICA EN ESTADO ESTACIONARIO DE LA REACCION DE RECAMBIO ³²Pi-ATP Y DE LA ACTIVIDAD ATPásica.

Tanto la reacción de hidrólisis (A) como la de recambio (B) se llevaron a cabo en las mismas condiciones. Se incubó a los cromatóforos (35 nmolas de BCl) en la oscuridad, en 0.2 ml de la solución TS y las concentraciones indicadas de Mg-ATP (○●) ó Ca-ATP (△▲) tomadas de una solución concentrada de 8.58 mM de ATP, 7.916 mM de MgCl₂ y 1 mM de EDTA (con 340 μM de Mg²⁺) ó 7.7 mM de ATP, 9.24 mM de CaCl₂ y 1 mM de EDTA (340 μM de Ca²⁺ libre), respectivamente. La reacción se inició añadiendo los cromatóforos y se paró a los 5 min en el caso de la actividad ATPásica dependiente de Mg y a los 40 min en el caso de la dependiente de Ca con 10% de TCA.

cientes del complejo MgATP ó CaATP, donde se mantuvo siempre una concentración de cationes libres menor a $320 \mu\text{M}$ en el medio. La hidrólisis de MgATP aumenta a medida que la concentración de MgATP es mayor. El recambio alcanza un máximo a 3.2 mM de ATP mostrando una K_m de 0.44 mM . En relación a la hidrólisis de ATP y al recambio, dependientes de Ca^{2+} , la hidrólisis muestra el mismo comportamiento que la hidrólisis de MgATP, pero con una actividad específica menor, mientras que el recambio a concentraciones mayores de 0.560 mM , comienza a inhibirse. Las relaciones hidrólisis/recambio son menores a concentraciones menores de $100 \mu\text{M}$ de MgATP, con valores cercanos a 1, lo que implica una conservación de energía del ATP hidrolizado. A concentraciones mayores de $100 \mu\text{M}$ de MgATP se observa un cambio rápido en esta relación, llegando a un valor de 5 con 5 mM de MgATP.

Al utilizar CaATP, el comportamiento es diferente, ya que la relación hidrólisis/recambio se mantiene constante hasta concentraciones de CaATP de $560 \mu\text{M}$ a partir de la cual, la relación aumenta debido a la inhibición del recambio. También podemos observar una relación de hidrólisis/recambio menor a 1, a concentraciones inferiores a $18 \mu\text{M}$ de CaATP, debido a posibles contaminantes en los cromatóforos, como la adenilatocinasa o la polinucleótido fosforilasa. A concentraciones mayores de ATP añadido la contribución de ATP formado por contaminantes es despreciable, ya que tiene un valor menor al 3%. Durante la cinética de MgATP ó CaATP se tomó la precaución de llevar a cabo la reacción en un tiempo en el cual la hidrólisis fuera lineal y que no más del 30% del

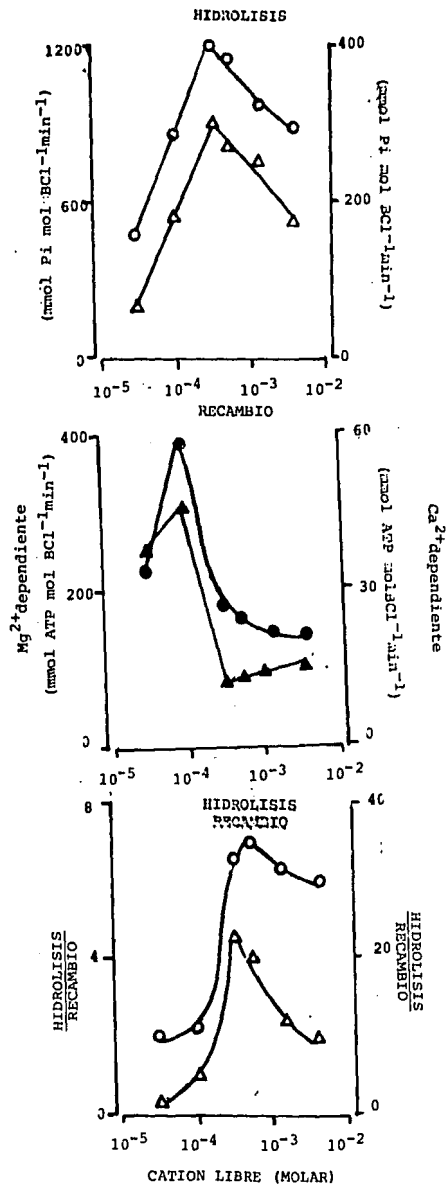


FIG.3.4. RELACION ENTRE LA HIDROLISIS DE ATP Y RECAMBIO ³²Pi-ATP. EFECTO DE Mg²⁺ Y Ca²⁺ LIBRE.

Los cromatóforos (35 nmoles de BCl) se incubaron en la oscuridad en medio TS en presencia de 3 mM de MgATP (○●) ó 3 mM de CaATP (△▲) y las concentraciones indicadas de Mg²⁺ y Ca²⁺ libre respectivamente. El tiempo de incubación fue de 10 min para la actividad Mg-dependiente y 40 min para la Ca-dependiente. La reacción se paró con 10% de TCA.

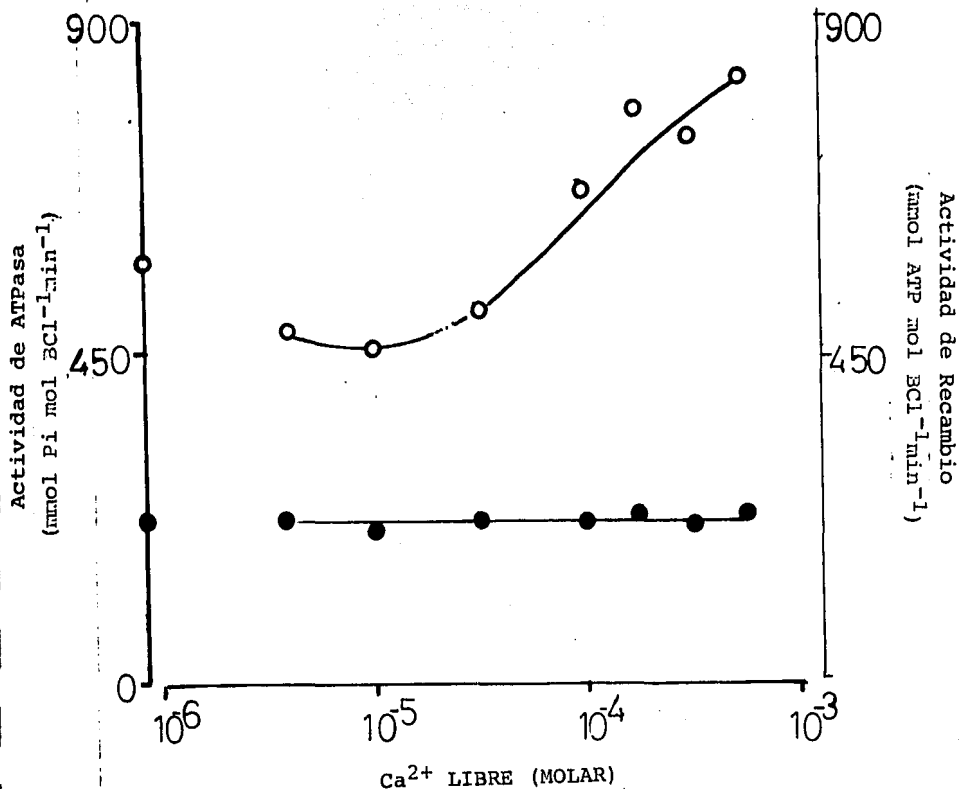


FIG.3.5. RELACION ENTRE LA HIDROLISIS DE ATP Y RECAMBIO ^{32}P -ATP DEPENDIENTES DE Mg^{2+} . EFECTO DEL Ca^{2+} LIBRE.

Se incubaron cromatóforos (35 nmolas de BCl) en la oscuridad en 0.2 ml de solución TS, 3 mM de MgATP con 0.320 mM de Mg^{2+} libre, y las concentraciones indicadas de Ca^{2+} libre. El tiempo de incubación fue de 10 min. La reacción se paró con 10% de TCA. Hidrólisis (O), recambio (●).

sustrato fuera hidrolizado en cada uno de los puntos.

En la fig. 3.4 se muestra el efecto de los cationes libres, Mg^{2+} y Ca^{2+} , en la conservación de energía, donde podemos observar que tanto la actividad ATPásica dependiente de Mg^{2+} es muy sensible al Mg^{2+} libre, como la actividad ATPásica dependiente de Ca^{2+} al Ca^{2+} libre. Ambas reacciones muestran el mismo comportamiento llegando a un máximo de actividad con una concentración del respectivo catión libre en el medio de 320 μM . La reacción de recambio muestra también el mismo comportamiento en ambas actividades llegando a una actividad máxima a 320 μM de catión libre. En cuanto a la relación entre la hidrólisis y el recambio, la ATPasa muestra un máximo de acoplamiento a concentraciones menores a 100 μM de catión libre con valores de 2 en la actividad Mg^{2+} -dependiente y de 3.8 en la Ca^{2+} -dependiente.

Para definir si cada uno de los cationes libres usados modifican las propiedades catalíticas de la enzima, o si solamente actúan como sustrato al formar el complejo $MgATP$ o $CaATP$, estudiamos el efecto del Ca^{2+} libre en la relación hidrólisis/recambio dependiente de Mg^{2+} utilizando una concentración fija de Mg^{2+} libre de 320 μM (Fig. 3.5). La actividad de recambio Mg^{2+} -dependiente es completamente insensible al Ca^{2+} libre mientras que la actividad hidrolítica es activada, lo que lleva a un cambio de 2.0 a 3.4 en la relación hidrólisis/recambio.

Al observar a lo largo de la caracterización de la relación hidrólisis/recambio que la actividad de recambio

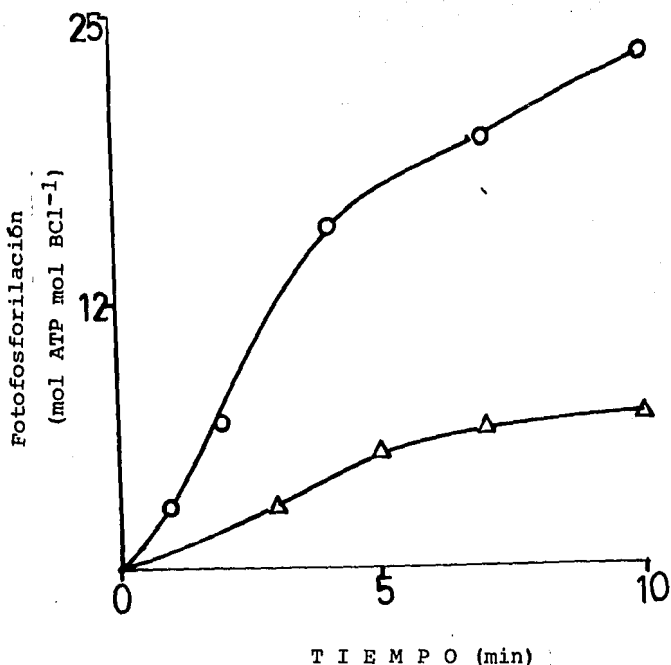


FIG. 3.6. FOTOFOSFORILACION.

Se incubaron cromatóforos (50 nmolas de BCl) en la oscuridad en 1.0 ml de una solución que contenía 50 mM de Tricina NaOH pH 8.0, 1 mM de ADP, 4 mM de fosfato de K, 0.2 M de sacarosa, 1 mM de EDTA, 2.2×10^6 cpm de $^{32}\text{P}_i$ y 2 mM de MgCl_2 (○) ó 2 mM de CaCl_2 . △ Para empezar la reacción se iluminaron los cromatóforos durante los tiempos indicados. La reacción se paró con 10% de TCA.

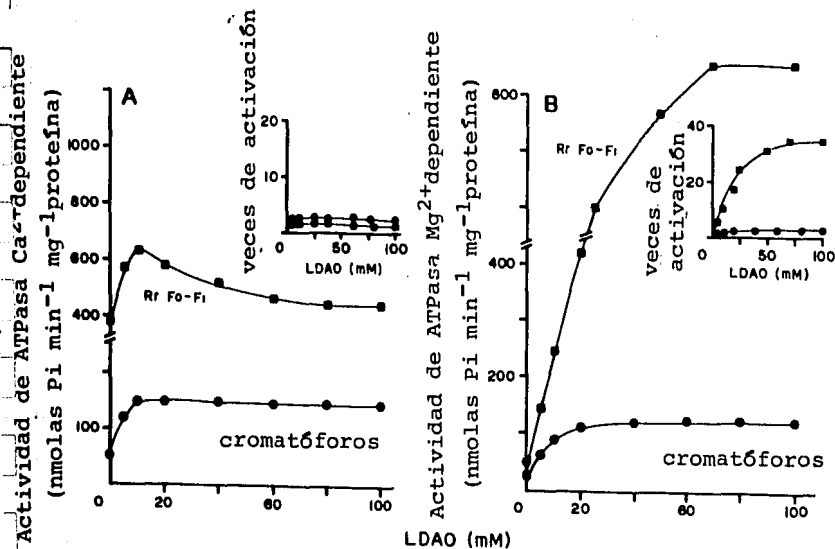


FIG.3.7. EFECTO DEL LDAO EN LA ACTIVIDAD HIDROLITICA Ca²⁺ y Mg²⁺-DEPENDIENTE EN LA H⁺-ATPasa DE *R. rubrum*.

Se probaron los efectos del LDAO en la actividad hidrolítica de cromatóforos (400 µg) y RrRF₀F₁ (50 µg), preincubando en cantidades variables de LDAO durante 15 min a 37°C. La solución de preincubación (0.3 ml) contenía 150 mM de sacarosa y 5 mM de Tris-OAc, pH 7.5. La hidrólisis de ATP se inició añadiendo 0.3 ml de un medio de reacción (concentración final) con 60 mM de KCl, 50 mM de TrisOAc, pH 7.5, 2 mM de ATP, 3 mM de MgCl₂ o 0.5 mM de CaCl₂, ³²P-ATP (2×10⁶ cpm) y 1 µM de FCCP en el caso de cromatóforos. La reacción se llevó a cabo durante 10 min a 37°C y se paró añadiendo 10% de TCA.

Ca²⁺-dependiente es muy baja, pensamos que el recambio posiblemente sólo pudiera utilizar como sustrato al MgCl₂, Pi y ADP y no al CaCl₂, por lo que estudiamos la fotofosforilación en cromatóforos de R. rubrum, utilizando como sustrato al Ca²⁺ (Fig. 3.6), donde observamos que la fotofosforilación dependiente de Mg²⁺ tiene una velocidad inicial de Vo=3.75 moles de ATP sintetizado/mol Bcl min y la Ca²⁺-dependiente una Vo= 1.0 mol de ATP sintetizado/mol Bcl min.

3.2. ACTIVACION DE LA HIDROLISIS DEPENDIENTE DE Mg²⁺ EN Rr H⁺-ATPasa POR LDAO.

Después de haber caracterizado a la ATPasa de cromatóforos de R. rubrum y algunos de los factores que regulan la conservación de energía en estos, como el pH, la concentración de sustrato, MgATP ó CaATP, y cationes libres, Mg²⁺ y Ca²⁺, y tomando en cuenta evidencia previa de estudios enfocados hacia la regulación de la H⁺-ATPasa por medio de activación de ésta misma con varios agentes como los detergentes, decidimos utilizar esta herramienta para estudiar la regulación de la actividad hidrolítica dependiente de Mg²⁺ en la H⁺-ATPasa de R. rubrum.

Primeramente se estudió el efecto de concentraciones crecientes de LDAO en cromatóforos y en la RrF₀-F₁ aislada (Fig.3.7). Se observaron efectos diferentes en la hidrólisis de ATP dependientes de Ca²⁺ y Mg²⁺. La Fig. 3.7 muestra que la actividad Ca-dependiente llega a un máximo de activación a una concentración de LDAO de 15 mM. Esta activación corresponde a un aumento en la actividad específica de 2.5

Tabla 3.1. Relación entre las actividades de ATPasa Mg^{2+} y Ca^{2+} dependientes

Dependencia al catión	Actividad Especifica ^a			
	+ LDAO ^b			
	cromatóforos	RrF ₀ F ₁	cromatóforos	RrF ₀ F ₁
Mg^{2+}	62	25	190	860
Ca^{2+}	44	380	156	440
Mg^{2+}/Ca^{2+}	1.40	0.06	1.22	1.95

^a Actividad específica expresada en $nmol\ min^{-1}\ mg^{-1}$ de proteína

^b LDAO (Concentración 100 mM). Se añadió como se indica en la Fig. 3.7.

Tabla 3.1. Relación entre las actividades de ATPasa Mg^{2+} y Ca^{2+} dependientes

Dependencia al catión	Actividad Especifica ^a			
			+ LDAO ^b	
	cromatóforos	RrF ₀ F ₁	cromatóforos	RrF ₀ F ₁
Mg^{2+}	62	25	190	860
Ca^{2+}	44	380	156	440
Mg^{2+}/Ca^{2+}	1,40	0,06	1,22	1,95

^a Actividad específica expresada en $nmol\ min^{-1}mg^{-1}$ de proteína

^b LDAO (Concentración 100 mM). Se añadió como se indica en la Fig. 3.7.

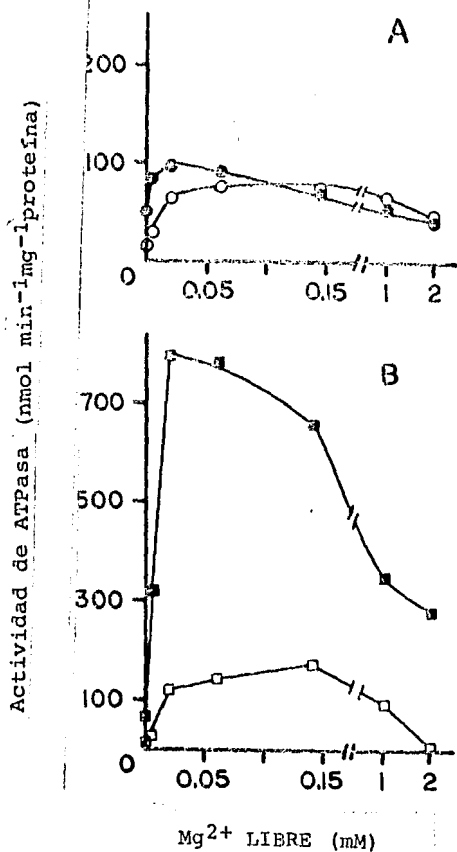


FIG. 3.8. ACTIVACION DE LA HIDROLISIS CON LDAD. EFECTO DE Mg²⁺ LIBRE.

Se preincubaron cromatóforos (400 µg) y RrF₆F₁ (50 µg) en LDAD 100 mM durante 15 minutos. La reacción se llevó a cabo como en la fig. 3.7., añadiendo cantidades variables de MgCl₂. Los símbolos abiertos corresponden a la enzima no tratada y los cerrados a la H⁺-ATPasa tratada con LDAD. (A) y (B): Efecto del Mg²⁺ libre en cromatóforos y RrF₆F₁, respectivamente.

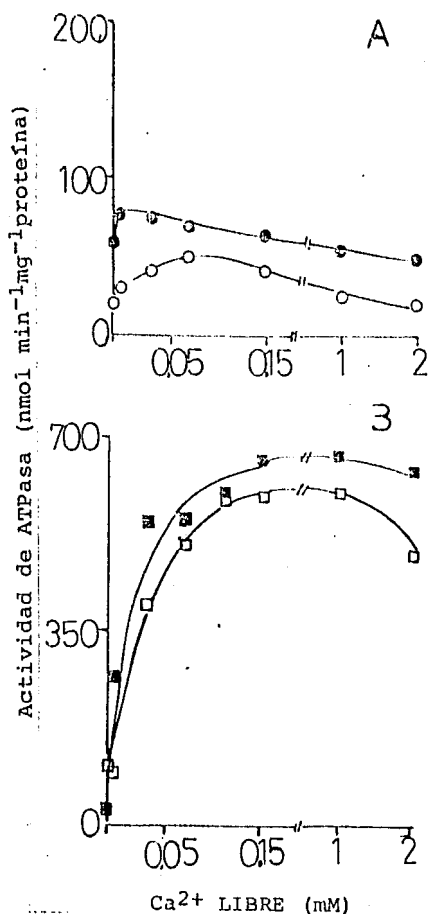


FIG.3.9. ACTIVACION DE LA HIDROLISIS CON LDAO. EFECTO DEL Ca²⁺ LIBRE.

Se preincubaron cromatóforos (400 µg) y RrF₀-F₁ (50 µg) en LDAO 100 mM durante 15 minutos. La reacción se llevó a cabo como en la fig. 3.7., añadiendo cantidades variables de CaCl₂. Los símbolos abiertos corresponden a la enzima no tratada y los cerrados a la Rr₀-ATPase tratada con LDAO. (A) y (B): Efecto del Ca²⁺ libre en cromatóforos y RrF₀-F₁, respectivamente.

veces en cromatóforos y 2.0 en la H^+ -ATPasa aislada.

La actividad hidrolítica Mg-dependiente de la RrF_0-F_1 es muy sensible a la presencia de LDAO (Fig. 3.7B). La actividad ATPásica aumenta de un valor de 26 nmolas/min mg de proteína (muy bajo respecto a la actividad inicial Ca-dependiente) hasta un valor de 900 nmolas/min mg de proteína, a una concentración de 65 mM. Esto representa un aumento de 34 veces. En la tabla 3.1. se muestra la relación entre la actividad ATPásica dependiente de Mg^{2+} y la dependiente de Ca^{2+} , donde se indica que la RrF_0-F_1 tiene una actividad específica mayor al utilizar como sustrato al CaATP, mientras que en presencia de 100 mM de LDAO éste complejo soluble cambia la relación de 0.06 a 1.95, indicando que el detergente activa predominantemente la actividad Mg-dependiente.

En la figura 3.8. A y B, se muestra que el LDAO cambia la respuesta de la enzima al Mg^{2+} libre, tanto en cromatóforos como en RrF_0-F_1 . En presencia de LDAO hay un aumento rápido en la actividad de la RrF_0-F_1 cuando se incrementa el Mg^{2+} libre, a 0.025 mM. En ausencia de detergente esto no se observa. A concentraciones mayores de 0.025 mM de Mg^{2+} libre, la actividad de la RrF_0-F_1 disminuye. La actividad Ca-dependiente no es modulada por Ca^{2+} libre en la RrF_0-F_1 soluble, independientemente de la presencia de LDAO en el medio (Fig.3.9 A y B). Debe de ser notado que el LDAO no está secuestrando al Ca^{2+} libre ya que concentraciones crecientes de Ca^{2+} no interfieren con la habilidad del LDAO para activar la hidrólisis Ca-dependiente. Además de que se alcanza la máxima actividad hidrolítica a la misma concentra-

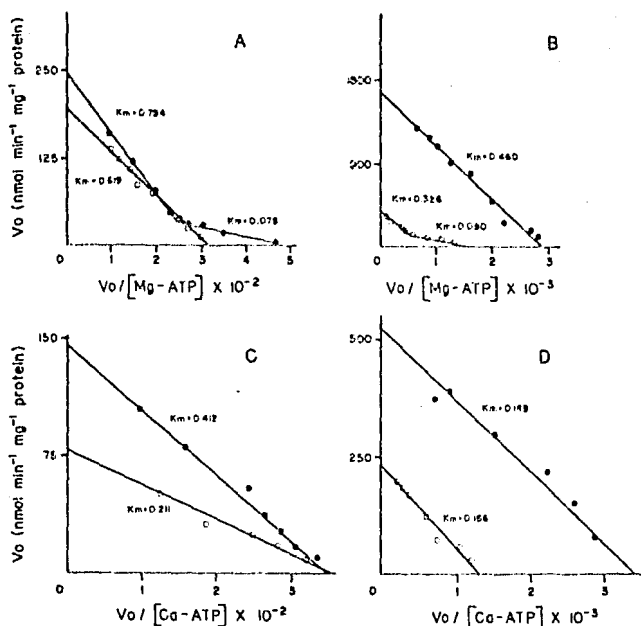


FIG.3.10. CINETICA EN ESTADO ESTACIONARIO DE Mg-ATP y Ca-ATP.

Los cromatóforos (500 µg) en presencia de Mg-ATP y Ca-ATP se muestran en (A) y (C) respectivamente, y RrFoF₁ (50 µg) en la presencia de Mg-ATP y Ca-ATP en (B) y (D) respectivamente. Tanto los cromatóforos como en RrFoF₁ se preincubaron durante 15 min a 37°C en 0.3 ml de 150 mM sacarosa, 5 mM de Tris-OAc, pH 7.5 y donde se indica con 100 mM de Li₂SO₄. La reacción se inició con 0.3 ml de un medio de reacción que contiene (concentración final): 50 mM LiCl, 50 mM Tris-OAc, ³²P-ATP (2x10⁶ cpm) y concentraciones crecientes de Mg-ATP (0.00-3 mM) o Ca-ATP (0.00-0.8 mM) en una proporción de ATP:creciente, 1:2. (●) Cromatóforos o RrFoF₁, tratados con Li₂SO₄ y (○) cromatóforos o RrFoF₁, no tratados. Se añadió 1 µM de FCCP a los cromatóforos.

obtenida por medio de otro detergente zwitteriónico, el CHAPS (3-((3-colamidopropil-dimetilamonio)-1-propanosulfonato). En este caso el LDAO también activa la hidrólisis de ATP (Fig.3.11). En el segundo sistema solubilizamos la RrF₁ a partir de un extracto de acetona, para poder comparar con otro sistema purificado en ausencia de detergente. La actividad hidrolítica Mg-dependiente tiene un máximo de activación a una concentración de LDAO de 5 mM. Esta actividad se incrementa 4.5 veces, de un valor de 45 hasta uno de 206 nmoles/min mg. La actividad hidrolítica Ca-dependiente es inhibida (Fig. 3.12).

Una forma de probar si el LDAO estaba afectando el mecanismo cooperativo entre los sitios catalíticos de la enzima o las propiedades catalíticas per se, fue mediante el estudio de la catálisis de un sitio en la actividad hidrolítica Mg-dependiente, en la RrF₀-F₁ aislada. Ya que la velocidad inicial de la catálisis de un sitio en la F₁ de bacterias como E. coli es menor que en la F₁ de mitocondrias (Tommasino y Capaldi, 1985; Cross, et. al. 1982), es posible determinar la catálisis de un sitio en intervalos de segundos. Al conocer que la actividad ATPásica de R. rubrum es menor que en mitocondrias, pensamos que también lo sería la catálisis de un sitio. Los resultados se muestran en la figura 3.13. El detergente aumenta la fase inicial de la catálisis de un sitio. En presencia de LDAO es de $V_0 = 3.5 \times 10^{-3}$ mol Pi /mol RrF₀-F₁ sec y en ausencia de LDAO de $V_0 = 5.5 \times 10^{-4}$ mol Pi/ mol RrF₀-F₁ sec. Esto representa un aumento en la velocidad de 6.3 veces al añadir LDAO.

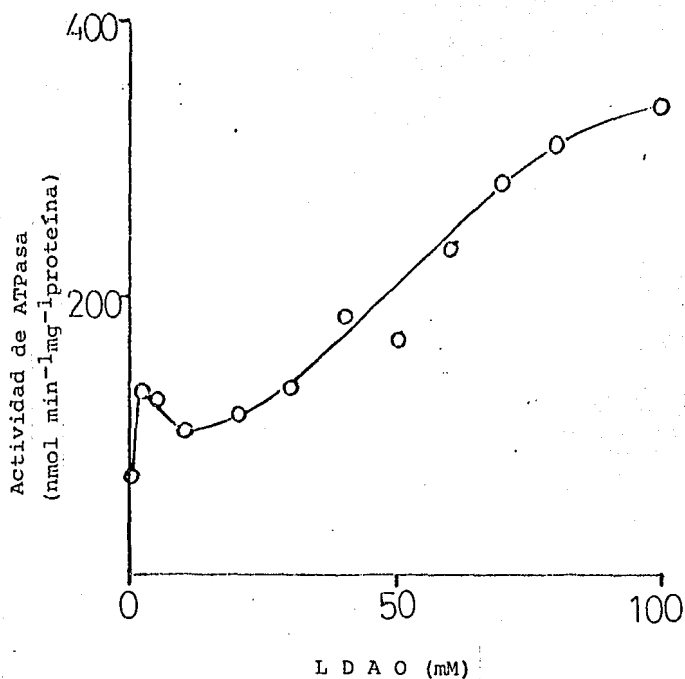


FIG.3.11. EFECTO DEL LDAO EN F_1F_0 SOLUBILIZADA CON CHAPS.

El extracto de CHAPS se preparó añadiendo 0.6% de CHAPS a un volumen igual de cromóforos (3 mg proteína/ml) resuspendidos en una solución con 150 mM de sacarosa, 5 mM de Tris-Clac, pH 7.5, 4 mM de EDTA y 1 mM de ATP. La mezcla se centrifugó por una hora a 45,000 rpm en un rotor Beckman 50 Ti. El sobrenadante se colectó para el ensayo. Se incubaron 50 μ g de proteína con concentraciones crecientes de LDAO y se midió la hidrólisis de ATP dependiente de Mg^{2+} como en la figura 3.7.

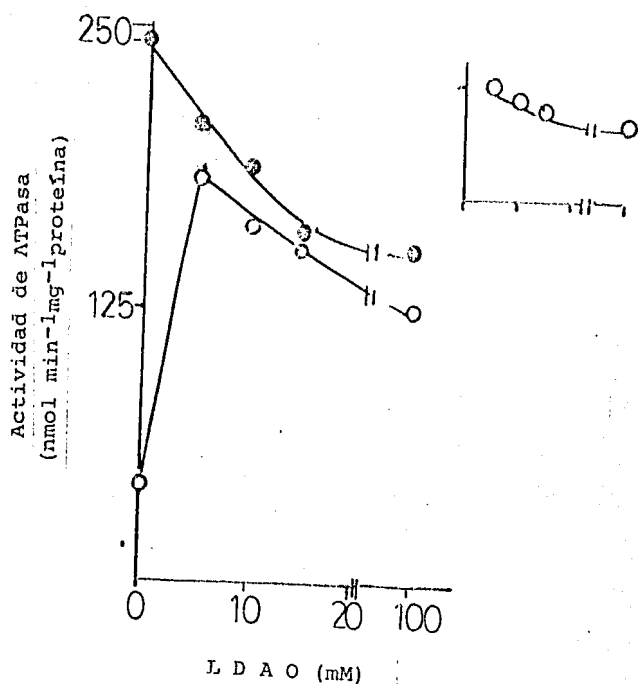


FIG. 3.12. EFECTO DE LDAD EN LAS ACTIVIDADES DE ATPasa Ca^{2+} y Mg^{2+} DEPENDIENTES EN Rr F₁.

Rr F₁ (30 µg de proteína) se preincubó durante 15 min a 37°C en 0.3 ml de un medio con 150 mM sacarosa, 5 mM de Tris-OAc, pH 7.5, mas concentraciones crecientes de LDAD. La reacción se inició añadiendo 200 µl de un medio de reacción con (concentración final) 50 mM de Tris-OAc, 4 mM de ATP y 2 mM $MgCl_2$ (○) o 2 mM de $CaCl_2$ (●) y ^{32}P -ATP (2.10⁴ cpm). La reacción se paro después de 10 min añadiendo 100 de TCA.

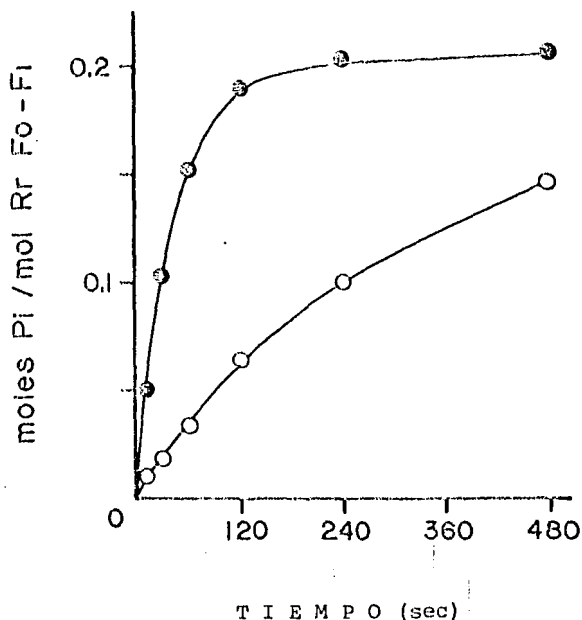


FIG.3.13. CINETICA DE CATALISIS DE UN SITIO. EFECTO DE LDAO.

Se preincubó RrF_0-F_1 ($2.23 \mu M$) en 0.3 ml con 150 mM de sacarosa, 5 mM de Tris-OAc, $\text{pH } 7.5$, más 10 mM de LDAO donde se indica. La reacción se inició añadiendo 0.3 ml de un medio de reacción con (concentración final) 60 mM de KCl, 50 mM de Tris-OAc, $\text{pH } 7.5$, $0.370 \mu M$ Mg-ATP, 1 mM H_2PO_4 ajustado a $\text{pH } 7.5$ con sal de Tris, y $12 \mu l$ de ^{32}P -ATP con 5000 Ci/nmol ($2.7 \times 10^7 \text{ cpm/ml}$). La reacción se paró a los tiempos indicados con 10% de TCA más 0.66 mM de ATP. La velocidad de hidrólisis de ATP se graficó en función del tiempo (segundos) y la velocidad inicial fue calculada de ésta gráfica dibujando una tangente a la curva en los puntos iniciales de la gráfica. (Descrito en Wise et. al., 1984). (●) RrF_0F_1 tratada con LDAO, (○) RrF_0F_1 sin tratar.

4. DISCUSION

Una característica esencial de la H⁺-ATPasa en bacterias fotosintéticas es que dentro del metabolismo de la bacteria se encuentra en estado activo siempre en dirección de síntesis de ATP, mientras que la actividad hidrolítica es sumamente baja aun en condiciones no fisiológicas, como en preparaciones de cromatóforos o en la H⁺-ATPasa purificada. Hasta ahora todavía no se conocen los mecanismos de su regulación. En el caso de mitocondrias la expresión de la actividad ATPásica está regulada por una proteína endógena (Pedersen et. al., 1981) y en otros sistemas como cloroplastos y E. coli existe evidencia de que están regulados por la subunidad ϵ , aunque todavía está en debate (Dreyfus y Satre, 1984)

4.1. CONSERVACION DE ENERGIA EN CROMATOFOROS DE R. rubrum.

La medición de la velocidad relativa de las reacciones parciales de la síntesis de ATP, como el recambio ³²P_i-ATP y la hidrólisis de ATP nos dan un buen índice de la conservación de energía durante el ciclo catalítico. La reacción de recambio ³²P_i-ATP implica la hidrólisis de ATP (pasos 1 a 3, fig. 4.1) y la reincorporación de los productos de la hidrólisis, ADP y P_i, para sintetizar nuevamente ATP (pasos 3 a 1, fig. 4.1), utilizando la energía generada por la misma hidrólisis. Una relación entre el ATP hidrolizado y el ³²P_i-ATP recambiado cercana a uno, implica un óptimo de conservación de energía por el sistema.

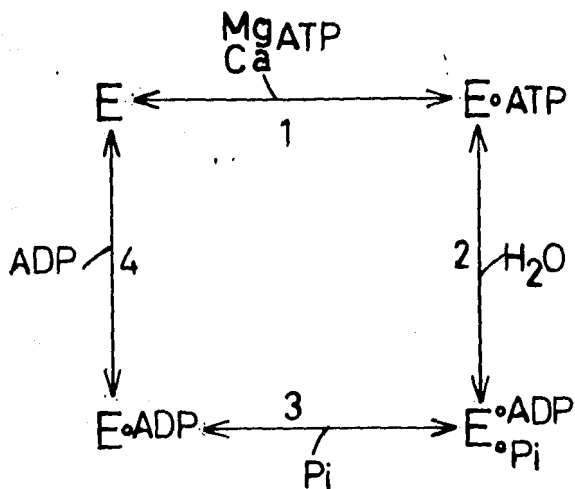


FIG. 4.1. MECANISMO DE SINTESIS DE ATP. Mecanismo basado en el propuesto por Boyer (1973), donde se muestra una vuelta al ciclo catalítico.

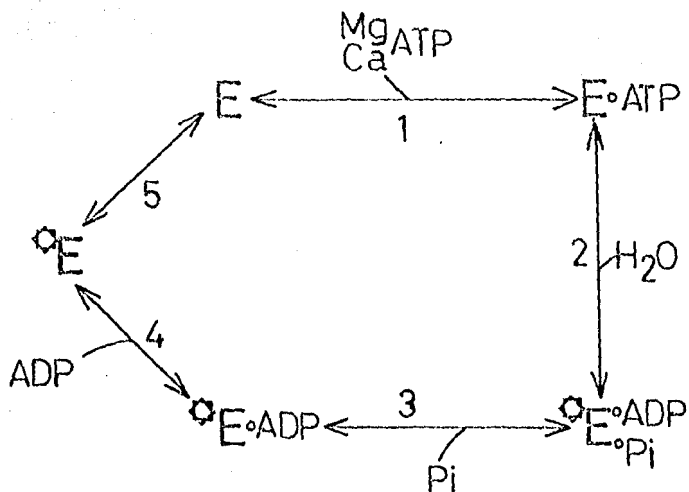


FIG. 4.2. ESQUEMA DEL CICLO CATALITICO EN LA ATPasa DE *R. rubrum*. El esquema muestra una vuelta al ciclo catalitico, en el cual proponemos que existen dos estados funcionales de la ATPasa, *E y E regulados por la concentración de nucleótidos en el medio. Ver explicación en el texto.

4.1.1. REGULACION DEL CICLO CATALITICO POR SUSTRATOS.

Durante el ciclo catalítico mostrado en la fig. 4.1., la ATPasa de R.rubrum utiliza como sustrato preferentemente al MgATP, pero si solubilizamos a la ATPasa, hidroliza preferentemente CaATP. El cambio de afinidad por los sustratos o el papel en la conservación de energía se desconocen. Al analizar los resultados de la cinética de MgATP y CaATP en el estado estacionario, tanto en la hidrólisis de ATP como en el recambio, nos encontramos con un dato interesante ya que la curva de la relación hidrólisis/recambio dependiente de MgATP tiene una forma sigmoidal, lo que sugiere que la RrATPasa está regulada ampliamente por la concentración de MgATP en el medio. Teniendo en cuenta que a concentraciones menores de 32 μM de MgATP, la relación hidrólisis/recambio tiene valores cercanos a 1 y que a partir de ésta concentración hay un incremento rápido en la relación pensamos que posiblemente existen dos estados funcionales de la enzima, los cuales no podemos explicar tomando en cuenta el ciclo catalítico de la fig. 4.1. ya que es demasiado simple. Proponemos un nuevo esquema en el cual se incluyen los dos estados funcionales de la ATPasa que designaremos como *E y E (Fig. 4.2.) Las características principales de este ciclo catalítico son:

- a) La ATPasa hidroliza ATP lentamente (paso 1 a 4) al estar en un medio con concentraciones bajas de ATP en el medio, provocando la acumulación del estado funcional *E.
- b) Al acumularse el estado *E la relación entre la hidrólisis y el recambio tiende a uno, ya que está accesible ésta forma

para participar en la reacción contraria (paso 4 a 1).

c) La conversión de *E a E (paso 5) se favorece al encontrarse en un medio con una concentración de ATP alta en el medio. Al favorecerse esta forma se incrementa tanto la hidrólisis que de 5 moléculas de ATP hidrolizadas sólo una es capaz de recambiarse.

Estos resultados son similares a los obtenidos en la ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico, con la cual se ha demostrado que la secuencia de reacciones del ciclo catalítico incluye dos estados funcionales de la enzima E y *E, con actividad en dirección de hidrólisis o de síntesis, respectivamente. Estos estados se pueden inducir variando las concentraciones de ATP en el medio (Carvalho et.al., 1976). La relación entre la hidrólisis y la síntesis se acerca a la unidad con concentraciones bajas de ATP. Por cada molécula de Pi liberada durante la hidrólisis, una molécula de *E está accesible para participar en la reacción contraria, dirigida hacia la síntesis. Al utilizar concentraciones altas de ATP se favorece la conversión de *E a E, lo que aumenta la velocidad de hidrólisis y disminuye la de síntesis. La activación máxima se alcanza en la ATPasa de retículo sarcoplásmico con una concentración de ATP de 5 a 10 mM donde se hidrolizan de 20 a 50 moléculas de ATP por cada una sintetizada (Carvalho et.al, 1976).

En cuanto a las actividades dependientes de Ca^{2+} , observamos que la relación hidrólisis/recambio se mantiene en niveles muy bajos y aumenta rápidamente debido a una inhibición de la actividad de recambio por medio de Ca^{2+} libre, ya

que las concentraciones usadas son inhibitorias como veremos más tarde en el inciso 4.2.2.

4.1.2. ACTIVACION DE LA ATPasa POR LDAO.

Una forma de distinguir los dos estados funcionales de la H^+ -ATPasa propuestos, sería activándola por medio de algún tratamiento diferente a la concentración de MgATP, lo suficientemente sencillo para manipular uno u otro estado. Ya que la H^+ -ATPasa de R. rubrum está sujeta a eficientes mecanismos regulatorios y que su estructura es muy parecida a la de otras H^+ -ATPasas decidimos utilizar al detergente LDAO. Recientemente se han utilizado ciertos detergentes que han dado información importante acerca de la regulación de la catálisis de la ATPasa en cloroplastos (Yu y Mc. Carty, 1985; Pick y Bassilian, 1982; Pick y Bassilian, 1981), en E. coli (Lótscher et. al., 1984), en mitocondrias (Vázquez-Laslop y Dreyfus, 1986), en la bacteria termofilica PS3 (Norling et. al, 1986) y en R. rubrum (Soe et. al., 1978, Dreyfus y Montero-Lomelí, 1986 y Montero-Lomelí y Dreyfus, 1987).

En el caso de mitocondrias Vázquez-Laslop y Dreyfus, (1986) postulan que el LDAO tiene un efecto activador en MF_1 con un alto contenido de inhibidor. Este detergente activa a la hidrólisis de ATP al suprimir la acción inhibidora de la proteína inhibidora natural, mientras que en E. coli y cloroplastos (Lótscher, et.al, 1984; Yu y McCarty, 1985) se postula que la activación por detergentes se debe a la liberación de la acción inhibidora de la subunidad e, aunque también se observó en los trabajos anteriores que el

LDAO y los alquilglucósidos estimulan la hidrólisis de ATP, independientemente de la presencia de la subunidad ϵ en cloroplastos o de la proteína inhibidora en mitocondrias.

Inicialmente estudiamos el efecto del LDAO en la actividad hidrolítica de la H^+ -ATPasa de esta bacteria fotosintética. Encontramos que el LDAO es capaz de estimular la actividad Mg-ATPasa en cromatóforos y en RrF_0-F_1 soluble, alcanzando una activación hasta de 34 veces en la RrF_0-F_1 . Probamos también otros tratamientos clásicos para activar a la ATPasa mitocondrial, como el calor y la tripsina que son activadores irreversibles, llamados así porque después de tratar a la enzima con éstos, en ausencia del efector, la actividad ATPásica sigue estimulada. De éstos activadores ninguno es capaz de producir una estimulación como la del LDAO en la ATPasa de R. rubrum, sino que al contrario inhiben la actividad ATPásica. En base a estos datos decidimos utilizar al LDAO ya que es un sistema de activación de la ATPasa con el cual podemos distinguir fácilmente entre los estados E y E' propuestos.

4.1.2.1. CONVERSION DE LA ACTIVIDAD Ca^{2+} a Mg^{2+} -DEPENDIENTE EN RrF_0F_1 y RrF_1 .

Un hecho interesante es que el LDAO estimula preferentemente la actividad dependiente de Mg^{2+} en la RrF_0F_1 soluble, lo que incrementa la relación entre las actividades de ATPasa Mg^{2+} y Ca^{2+} dependientes, de 0.06 a 1.95. Esto significa que la dependencia al sustrato de la RrF_0F_1 soluble cambia de Ca a Mg dependiente en presencia de LDAO, comportándose igual que dentro de la membrana. Este mismo cambio en la dependen-

cia a cationes se presenta también en la H^+ -ATPasa de cloroplastos tratada con detergentes (Yu y Mc Carty, 1985).

En contraste con datos anteriores, en los que se indica que detergentes iónicos en RrF_1 (Sce et. al., 1978) y el octilglucósido en CF_1 (Pick y Bassilian, 1982) estimulan la actividad Mg-ATPasa y simultáneamente inhiben la actividad Ca-ATPasa, encontramos que el LDAO tiene el mismo efecto en RrF_1 , pero en el complejo RrF_0-F_1 es capaz de estimular ambas actividades, posiblemente debido a la presencia del canal F_0 en la preparación y no a la presencia del detergente TX100 en ésta, ya que solubilizándola con otros detergentes se observan los mismos resultados.

4.2. REGULACION DEL ESTADO FUNCIONAL E Y DE RrF_0F_1 ACTIVADA CON LDAO. EFECTO DE CATIONES LIBRES.

A partir de estudios previos del control de la $RrATPasa$ en cromatóforos, por medio de cationes divalentes, en los que se indica que la activación por luz es dependiente de Mg^{2+} del medio en cromatóforos previamente inhibidos por altas concentraciones de FCCP y Mg^{2+} libre y de estudios en partículas submitocondriales donde muestran que a concentraciones relativamente altas de Mg^{2+} la proporción de hidrólisis en relación al recambio es varias veces más baja que a concentraciones bajas de Mg^{2+} , probablemente debido a cambios en las características cinéticas de la enzima (Gómez-Puyou, et. al., 1983), decidimos estudiar en la $RrATPasa$ el efecto de los cationes divalentes en la conservación de energía y en la activación por LDAO.

4.2.1. EFECTO DEL Mg^{2+} UTILIZANDO COMO SUSTRATO $MgATP$.

Encontramos que utilizando $MgATP$ como sustrato al medir la relación hidrólisis/recambio, el Mg^{2+} libre cambia la habilidad de la ATPasa para catalizar la hidrólisis y el recambio en el estado funcional E de la ATPasa, ya que estamos utilizando concentraciones de ATP-cation de 3 mM que favorecen este estado. Al aumentar el Mg^{2+} libre, al contrario de lo encontrado en la ATPasa mitocondrial (Gómez-Puyou, et.al., 1983) la relación entre estas dos reacciones aumenta de 2 a 6, al variar la concentración de Mg^{2+} libre arriba de 100 μM .

Al evaluar el efecto del Mg^{2+} en cromatóforos y $RrFoF_1$, tratados con LDAO, encontramos que éste sólo regula a la ATPasa cuando la hidrólisis se encuentra estimulada con LDAO. Los datos anteriores sugieren que sólo al activar a la enzima con LDAO o concentraciones altas de $MgATP$, el Mg^{2+} libre puede jugar un papel como regulador.

4.2.2. EFECTO DEL Ca^{2+} LIBRE UTILIZANDO COMO SUSTRATO $CaATP$.

El ion Ca^{2+} modifica la relación hidrólisis/recambio de la misma forma que el Mg^{2+} con su sustrato correspondiente sólo que se llega a alcanzar una relación de 23 moléculas de ATP hidrolizadas por una recambiada, lo que podría sugerir que éste cation no favorece el estado funcional *E de la figura 4.2, al no ser capaz de conservar una relación hidrólisis/recambio baja, o que el ADP, el Pi y el Ca^{2+} no son utilizados como sustrato para la síntesis de ATP. En cuanto al efecto de éste cation en la enzima tratada con LDAO no encontramos los mismos efectos que los observados anterior-

mente con Mg^{2+} , lo que sugiere que posiblemente sean otros los mecanismos los que activen a la ATPasa tratada con LDAO, diferentes a los que favorecen la forma E.

4.2.3. EFECTO DEL Ca^{2+} UTILIZANDO COMO SUSTRATO AL MgATP.

Para poder discernir entre el papel de los cationes en general o de un sólo catión como el Mg^{2+} en la regulación de la conservación de energía, probamos el efecto del Ca^{2+} utilizando como sustrato al MgATP. Al variar las concentraciones de Ca^{2+} libre observamos que este no modifica de la misma forma que el Mg^{2+} al ciclo catalítico, ya que sólo es capaz de estimular a la hidrólisis, mientras que el recambio no se altera. Estos resultados refuerzan la proposición de que el Ca^{2+} libre es incapaz de estimular la acumulación de la forma *E para que se lleve a cabo la reacción de recambio.

4.2. ACTIVACION DE RrF_0F_1 . MODIFICACION DE LA INTERACCION ENTRE LAS SUBUNIDADES.

Aparte de un cambio conformacional en la RrF_0F_1 al estimularla en presencia de LDAO, también podemos considerar cambios en parámetros cinéticos como la afinidad por el sustrato MgATP y en la velocidad máxima. Estos cambios no los observamos al evaluar la cinética de MgATP y CaATP en la relación hidrólisis/recambio. El incremento en la actividad hidrolítica de la RrF_0F_1 activada con LDAO, podría ser explicado por un cambio en la interacción de las subunidades catalíticas β y α , o posiblemente como se ha descrito en E. coli tratada con LDAO, mediante un cambio en la interacción

entre β y ϵ (Lótscher, et. al.1984), que proponemos podría resultar en la abolición de la cooperatividad entre sitios. Otros datos interesantes de la literatura que apoyan el cambio en la interacción entre las subunidades por medio de detergentes es que el deoxicolato y el octilglucósido son capaces de convertir a la F_1 ATPasa de la bacteria termofílica en lábil al frío (Norling, 1980). A partir de estas informaciones estudiamos la catálisis de un sitio. Los resultados muestran que el LDAO la incrementa casi por un orden de magnitud, (de una velocidad inicial de 5.5×10^{-4} hasta 3.5×10^{-3} mol Pi por mol RrF_0F_1 , por segundo) lo que puede ser explicado por el cambio propuesto, al abolir la interacción y cooperatividad entre las subunidades ya que hay una supresión de control en la única subunidad β que está operando en éste caso. Estos datos no los podríamos incluir dentro del esquema propuesto ya que no se muestran los mecanismos cooperativos.

El hecho de que los factores estudiados durante este proyecto como el Mg^{2+} libre, MgATP y activadores como el LDAO, tengan efectos similares en la conservación de energía en bacterias fotosintéticas, cloroplastos, E. coli y mitocondrias, sugiere que el mecanismo de catálisis de la ATPasa es un fenómeno general, aunque la existencia de diversos parámetros de regulación, como son el equilibrio termodinámico del gradiente de protones a través de la membrana, los nucleótidos, el Pi, los cationes divalentes, la energización de la membrana, la proteína inhibidora o las diferentes subunidades de la H^+ -ATPasa, indican que durante la evolución han ido

surgiendo estos parámetros, teniendo mayor o menor eficiencia en cada uno de los sistemas biológicos.

5. BIBLIOGRAFIA.

- Adolfson, R., Moudrianakis, E.N. (1976). Arch. Biochem. Biophys. 172, 425-433.
- Baccarini-Melandri, A y Melandri, B.A. (1974). Methods of Enzymology 23, 556-561.
- Baccarini-Melandri, A. y Melandri, B.A. (1975). Biochim. Biophys. Acta. 376, 82-95.
- Baccarini-Melandri, A., y Melandri, B.A. (1978) en The Photosynthetic Bacteria de Clayton, R., y Sistrom, W.R. Plenum Press, N.Y., 615.
- Baltscheffsky, M. y Lundin, A. (1979) en: Cation Flux Across Biomembranes, Mukohata, Y y Packer, L. eds. Academic Press, N. Y., 209-218.
- Bengis-Garber, C., y Gromet-Elhanan, Z. (1979). Biochemistry, 18, 3577-3581.
- Bennun, A., y Avron, M. (1965) Biochem. Biophys. Acta. 109, 117-127.
- Boyer, P.D. y Bryan, D.M. (1967) Methods of Enzymology 10, 60-71.
- Boyer, P.D., Cross, R.L. y Momsen, W. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 2837-39.
- Boyer, P.D. (1974). en: Dynamics of Energy Transducing Membranes, ed. L. Ernster, R. Estabrook, E.C. Slater, Amsterdam. Elsevier. 289-301.
- Boyer, P.D. (1979) en: Membrane Bioenergetics, ed. Loe C., Schatz, G. y Ernster L. Addison Wesley Pub. Co. Reading, Pa. 461-479.
- Bradford, M.M. (1976). Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Carvalho, M.G.C., Souza, D.O. y de Meis, L. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3629.
- Catterall, W.A., Pedersen, P.L. (1972). J. Biol. Chem. 247, 7969-76.
- Chapman, J.M., Ayrey, G. (1981). The Use of Radioactive Isotopes in The Life Sciences. Ed. George Allen y Unwin. London. p. 54.
- Choate, G.L., Hutton, R.L., Boyer, P.D. (1979). J. Biol. Chem.

- Clayton, R.K. (1963) en *Bacterial Photosynthesis*, Gest H. et al. eds. p. 495.
- Clayton, R.K. y Sistrom, W.R. (1978). *The Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press. N. Y. p. 35.
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.B. y Sleiner, R.Y. (1957). *J. Cell.Comp. Physiol.* 49, 25-68.
- Cross, R.L. y Boyer, P.D. (1975) *Biochemistry*. 14, 392-98.
- Cross, R.L. (1981). *Ann. Rev. Biochem.* 50, 681-714.
- Cross, R.L., Grubmeyer, C., y Penefsky, H.S. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 12092-12100.
- de Meis, L., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111, 274-279.
- Dreyfus, G., y Satre M., (1984). *Arch. Biochem. Biophys.*, 229, 212-219.
- Dreyfus, G., y Montero-Lomeli, M. (1986) *EBEC Short. Rep.* 4, 244.
- Edwards, P.A. y Jackson, J.B. (1976). *Eur. J. Biochem.* 62, 7-14.
- Eze, J.M. y Dumbroff, O. (1982). *Can. J. Bot.* 60, 1046-1049.
- Fabiato, A., y Fabiato, F. (1979). *J. Physiol. Paris*, 75, 463-505.
- Ferguson, S.J., Lloyd, W.J., y Radda, G.K., (1975). *Eur. J. Biochem.* 54, 127-53.
- Foster, D.L. y Fillingame, R.H. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 8230-8236.
- Frenkel, A. (1954). *J. Am. Chem. Soc.* 76, 5568-5569.
- Friedl, P., Friedl, C. y Scharer, H.O. (1979). *Eur. J. Biochem.* 100, 175-180.
- Gepfstein, A., Carmeli, C. y Nelson, N. (1978). *FEBS Lett.* 85, 219-223.
- Gest, H. (1980). *FEMS Lett.* 7, 72-77.
- Glynn, J.M. y Chappel, J.B. (1964). *Biochem. J.* 90, 147.

- Gómez-Puyou, A., Ayala, G., Muller, U. y Tuena de Gómez-Puyou, M. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 13673-13679.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. y David, M.M. (1949). *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
- Gromet-Elhanan, Z. (1977). En: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 5.* Ed. A. Trebst y M. Avron. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. N.Y.
- Grubmeyer, C. y Penefsky, H.S. (1981) a. *J. Biol. Chem.* 256, 3718-3727.
- Grubmeyer, C. y Penefsky, H.S. (1981) b. *J. Biol. Chem.* 256, 3728-3734.
- Hackney, P.D. y Boyer, P.D. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 3164-3170.
- Harris, D.A. (1981). *BioSystems.* 14, 113-121.
- Harris, D.A., Dall-Larsen, J., and Klungbom, L. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 635, 412-428.
- Harold, M.F. (1986). *The Vital Force: A Study of Bioenergetics.* W.H. Freeman and Company, N. Y.
- Jackson, J.B. y Crofts, B. (1968). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 908-915.
- Johansson, B.C., Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H., Baccarini-Melandri, A. y Melandri, B.A. (1973). *Eur. J. Biochem.* 40, 109-117.
- Johansson, B.C., y Baltscheffsky, M. (1975). *FEBS Lett.* 53, 221-224.
- Junge, W. (1977). En: *Encyclopedia of Plant Physiology. N.S.* Ed. Trebst, A. and Avron, M. Vol. 5.
- Kayalar, C., Rosing, J. y Boyer, P.D. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 2486-2491.
- Kaplan, S. (1978). En: Clayton, R.K. y Sistrom, W.R. (1978). *The Photosynthetic Bacteria.* Plenum Press. N.Y.
- Kneusel, R. E., Merchant, S., and Selman, B.R. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 681, 337-344.
- Knowles, A.F., Guillory, R., Racker, E. (1971). *J. Biol. Chem.* 246, 2672-2679.
- Kohlbrenner, W.E. y Cross, R.L. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 7609-7611.

- Kozlov, I.A. y Skulachev, V.F. (1977). *Biochim. Biophys. Acta.* 463, 29-89.
- Lötscher, H.R., de Jong, C., y Capaldi, R.A. (1984). *Biochemistry.* 23, 4140-4143.
- Martell, A. y Sillen, L.G. (1971). *Stability Constants of Metal-ion Complexes. Suppl. 1. Special Publication No. 25.* The Chemical Society of London.
- McCarty, R.E. y Carmeli, C. (1982). *Photosynthesis: Energy Conversion by Plants and Bacteria*, Ed. Govindjee. N.Y. Academic. 1, 647-95.
- McCarty, R.E. y Moroney, J.V. (1984). En: *The Enzymes of Biological Membranes.* E. Martonosi, A. 2nd. Ed. Plenum New York. p. 383-431.
- Mitchell, P. (1961). *Nature (London).* 191, 144-148.
- Mitchell, R.A., Hill, R.D., Boyer, P.D. (1967). *J. Biol. Chem.* 242, 1793-1801.
- Montero-Lomelí, M. y Dreyfus, G. (1987). *Arch. Biochem. Biophys.* 257, 345-351.
- Muller, H.W., Schwalern, V., Salzer, M., y Dosi, D. (1979). *Z. Naturforsch. C: Biosci.* 34 C, 38-45.
- Negrin, R.S., Foster, D.L., y Fillingame, R.H. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 5643-5648.
- Oren, R. y Gromet-Elhanan, Z. (1979). *Biochem. Biophys. Acta.* 548, 106-118.
- Ortiz-Flores, G., Acosta, A., y Gómez-Puyou, A. (1982) *Biochim Biophys. Acta* 679, 466-473.
- Ovchinnikov, Y.A., Modyanov, N.N., Grinkevich, V.A., Aldanova, N.A. Trubetskaya, O.E., et. al. (1984). *FEBS Lett.* 166, 19-22.
- Perefsky, H.S. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 2891-2899.
- Prevot, A.R., Turpin, A. y Kaiser, P. (1967). *Les Bacteries Anaerobies.* Ed. Dunod. Paris. p. 2044-2061.
- Pullman, M.E. y Monroy, G.C. (1963). *J. Biol. Chem.* 238, 3762-3769.
- Raven, J.A. y Smith, F.A. (1976). *J. Theoret. Biol.* 57, 301-312.

- Rosing, J., Kayalar, C. y Boyer, P.D. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 2478-2485.
- Russo, J.A., Lamos, C.M. y Mitchell, R.A. (1978). *Biochemistry*. 17, 473-480.
- Satre, M., Lunardi, J., Pougeois, R. y Vignais, P.V. (1979). *Biochemistry*. 18, 3134-3140.
- Schneider, E., Schwulera, U, Müller H. (1978). *FEBS Lett.* 87, 257-260.
- Schneider, E. y Altendorf, K. (1982). *Eur. J. Biochem.* 126, 149-153.
- Schwerzmann, K. y Pedersen, P.L. (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* 250, 1-18.
- Selman, B.R., y Selman-Reimer, S. (1983) *J. Biol. Chem.* 256, 1722-1726.
- Senior, A.E., y Wise, J.G. (1983). *J. Membr. Biol.* 73, 105-124.
- Smith, J.B. y Sternweiss, P.C. (1977). *Biochemistry*. 16, 306-311.
- Smith, J.B. y Sternweiss, P.C. (1982). *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 376-387.
- Slooten, L. y Nuyten, A. (1981)a. *Biochim. et. Biophys. Acta.* 638, 305-312.
- Slooten, L. y Nuyten, A. (1981)b. *Biochim. et. Biophys. Acta.* 638, 313-326.
- Soe, G., Nishi, N. Kakumo, T. y Yamashita, J. (1978). *J. Biochem.* 84, 805-814.
- Tommasino, M. y Capaldi, R.A. (1985). *Biochemistry*. 24, 3972-3976.
- Tzagloff, A. y Meagher, P. (1971). *J. Biol. Chem.* 246, 7328-7336.
- Vázquez-Laslop, N. y Dreyfus, G. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 7807-7810.