



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**SOBRE LA POSIBLE EXISTENCIA DEL INHIBIDOR  
NATURAL DE LA  $H^+ATP_{asa}$  DE LA BACTERIA**

*Rhodospirillum rubrum*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A :**

**IRMA ROMERO ALVAREZ**

MEXICO, D. F.

1 9 8 2



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

	Página
ABREVIATURAS. ....	3
RESUMEN .....	4
INTRODUCCION .....	5
CAPITULO 1: GENERALIDADES. ....	6
1.1. BACTERIAS FOTOSINTETICAS .....	6
1.1.1. Taxonomía de Bacterias Fotosintéticas .....	6
1.1.2. Descripción de <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	8
1.1.3. Diferentes preparaciones de membrana .....	9
1.2. HIPOTESIS DE TRANSDUCCION DE ENERGIA .....	13
1.2.1. Hipótesis Química .....	14
1.2.2. Hipótesis Quimiosmótica .....	15
1.2.3. Hipótesis Conformacional .....	16
1.3. COMPLEJO ATP SINTETASA .....	17
1.4. FACTORES DE ACOPLAMIENTO EN BACTERIAS FOTOSINTE- TICAS .....	19
1.4.1. Solubilización y Purificación del Factor de A- coplamiento .....	21
1.4.2. Características del Factor de Acoplamiento .....	22
1.4.3. Propiedades de la H <sup>+</sup> ATPasa .....	26
1.4.4. Modulación de la H <sup>+</sup> ATPasa unida a la membrana ...	27
1.4.5. ¿Existe en Bacterias Fotosintéticas un Inhibi- dor de la H <sup>+</sup> ATPasa? .....	29
1.5. OBJETIVO .....	31
CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS .....	33
2.1. CRECIMIENTO DE BACTERIAS .....	33
2.1.1. Medios de Cultivo .....	33
2.1.2. Siembra de Bacterias .....	35
2.2. COSECHA DE BACTERIAS .....	37
2.3. OBTENCION DE CROMATOFOROS .....	37
2.4. SOLUBILIZACION DEL FACTOR DE ACOPLAMIENTO .....	38
2.5. METODO PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ATPasa .....	39
2.5.1. Método para determinar la Actividad ATPasa en cromatóforos .....	39

	Página
2.5.2. Método para determinar la Actividad ATPasa en el Extracto Crudo de Enzima .....	41
2.6. METODO DE RECONSTITUCION .....	41
2.7. ESTIMACION DEL CONTENIDO DE BCL EN CROMATOFOROS ...	42
2.8. METODO PARA MEDIR ACTIVIDAD DE TRIPSINA .....	42
2.9. DETERMINACION DE PROTEINA .....	42
CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSION .....	43
3.1. CRECIMIENTO DE <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	43
3.2. RECONSTITUCION DE LA ACTIVIDAD ATPasa A CROMATOFOROS DESPOJADOS DE ENZIMA .....	50
3.3. RESULTADO Y DISCUSION DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS .....	54
3.3.1. Tratamiento del Cromatóforo y del Extracto Crudo de la Enzima con Tripsina .....	54
3.3.2. Tratamiento de cromatóforos a través de una columna de Sephadex G-50 .....	58
3.3.3. Tratamiento del Extracto Crudo de Enzima con Frío .....	61
3.3.4. Tratamiento de los Cromatóforos con Extractos de Urea .....	64
3.3.5. Tratamiento del Extracto Crudo de la Enzima con Calor .....	69
CONCLUSION .....	71
BIBLIOGRAFIA .....	73

## ABREVIATURAS

ATP	trifosfato de adenosina
ADP	difosfato de adenosina
BSA	seroalbúmina de bovino
DNP	dinitro fenol
DEAE	dietyl amino etil
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen diamino tetra acético
FCCP	para trifluorometoxicarbonil-cianuro-fenilhidrazona
MOPS	ácido morfolino propano sulfónico
PEP	fosfoenol piruvato
PK	piruvato kinasa
SDS	dodecil sulfato de sodio
TCA	ácido tricloro acético
Tris	hidroximetil amino metano
H <sup>+</sup>	protones
nm	nanómetros
µm	micrómetros
BCl	bacterioclorofila
nd	no se determinó
PM	peso molecular
rpm	revoluciones por minuto
pmf	fuerza protomotriz
Pi	fosfato inorgánico
Prot	proteína

### Factores de Acoplamiento:

F <sub>1</sub>	factor de acoplamiento 1 o Adenosín Trifosfatasa, ATPasa
OSCP	proteína que confiere sensibilidad a oligomicina
F <sub>6</sub>	factor de acoplamiento 6
F <sub>0</sub>	segmento hidrofóbico de la ATP sintetasa
CF <sub>1</sub>	factor de acoplamiento 1 de la ATPasa de cloroplasto

## RESUMEN

Los estudios comparativos de la estructura y función del sistema fosforilante, en bacterias, cloroplastos y mitocondrias, han mostrado que existen semejanzas y diferencias que nos hablan acerca de la complejidad del sistema a lo largo de la escala filogenética.

El estudio del complejo fosforilante de bacterias termoflicas ha permitido el mayor avance en el conocimiento de la estructura y funcionalidad de este sistema enzimático. Sin embargo, dentro de las bacterias fotosintéticas han sido escasos los estudios a este respecto, de ahí la importancia de este trabajo cuyo objetivo principal es dilucidar la posible existencia de una protefna inhibidora, que na sido descrita con anterioridad, en bacterias, cloroplastos y mitocondrias. La prueba de su existencia permitiría suponer que a la par de la preservación estructural y funcional se ha mantenido en las bacterias fotosintéticas el mismo sistema de regulación.

El trabajo consta, básicamente, de tres partes, en la primera se presentan generalidades y el aspecto teórico de la investigación; en la segunda parte, una descripción de los materiales y metodologías seguidas; y en la tercera parte, se describen los resultados obtenidos y se hace una discusión de los mismos.

Finalmente, se exponen las conclusiones y se comenta acerca del futuro de esta investigación.

## INTRODUCCION

### PRINCIPIO BASICO DEL FLUJO ENERGETICO EN LA CELULA

Todas las células, sin importar su naturaleza, utilizan los mismos principios fundamentales y los mismos mecanismos en sus actividades transformadoras de energía. Sin excepción obtienen su energía del entorno circundante. Los organismos fotosintéticos utilizan la energía radiante de la luz solar, mientras que los organismos heterótrofos utilizan la energía dependiente del grado de reducción de la estructura de las moléculas orgánicas nutrientes obtenidas de su medio.

Tanto si la energía proviene de la luz como si procede de la oxidación de compuestos orgánicos, la célula la conserva de manera aprovechable en forma de molécula de ATP; la cual se sintetiza a partir de ADP y Pi en reacciones catalizadas por la  $H^+$ ATPasa. El ATP es entonces el transportador que lleva la energía química hacia aquellos procesos o reacciones de la célula que requieren de energía para realizarse. Así, la energía química del ATP se utiliza para llevar a cabo el trabajo químico, mecánico y osmótico de la célula, durante el cual se pierde el grupo fosfato terminal del ATP y se forma ADP. Resumiendo podríamos decir que el ATP es la forma "cargada" del sistema transportador de energía y el ADP la "descargada".

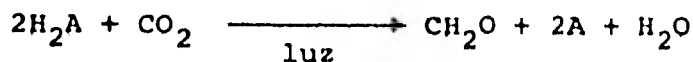
## CAPITULO 1

### GENERALIDADES

#### 1.1. BACTERIAS FOTOSINTETICAS.

Dentro de los organismos que son capaces de efectuar fotosíntesis, es decir, reducir  $\text{CO}_2$  a carbohidratos en presencia de luz, encontramos, además de las plantas superiores, algas y cianofíceas, una clase de bacterias llamadas verdes y púrpuras (1). Estas bacterias se distinguen de los demás organismos fototróficos en que oxidan donadores de electrones de potencial redox menor que el del  $\text{H}_2\text{O}$ , por ejemplo, compuestos inorgánicos de azufre,  $\text{H}_2$  o compuestos orgánicos simples. Los correspondientes productos de oxidación son sulfatos,  $\text{H}^+$  y compuestos orgánicos. Además, su fotosíntesis la llevan a cabo con un sólo fotosistema a diferencia de los dos fotosistemas que utilizan los demás organismos fotosintéticos.

Al realizar estudios sobre bacterias fotosintéticas, Van Niel en 1935 (2) formuló la siguiente ecuación generalizada para la fotosíntesis:



siendo A= donador de electrones.

#### 1.1.1. Taxonomía de Bacterias Fotosintéticas.

Las bacterias fotosintéticas corresponden al Orden Rhodospirillales. Este orden está integrado por organismos que contienen bacterioclorofilas y llevan a cabo fotosíntesis sin producción de  $\text{CO}_2$  [Clasificación según Pfennig y



Trüper (3 a 5)].

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

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

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

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

Orden	Rhodospirillales
Suborden	Rhodospirillineae
Familia	Rhodospirillaceae
Género	Rhodospirillum
Especie	rubrum

por lo que haremos hincapié en esta familia y especie.

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

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

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

#### 1.1.2. Descripción de *Rhodospirillum rubrum*.

A) Estructura: La forma de la célula es espiral, mide de  $0.8 \mu m$  de ancho por 7 a  $10 \mu m$  de largo. Presentan flagelos polares. Como todas las demás bacterias verdaderas (6) presentan una pared celular separada por el espacio periplásmico de la membrana celular, la cual envuelve al citoplasma y contiene el sistema de transporte de electrones. La membrana plasmática presenta invaginaciones que se denominan cromatóforos, este es el sistema intracitoplásmico de membrana que se toma como un criterio de clasificación entre especies. En el espacio periplásmico hay proteínas que participan en la cadena de transporte de electrones, por ejemplo citocromo  $C_2$ .

B) Crecimiento: Las bacterias *Rs. rubrum* son aeróbicas facultativas. El crecimiento anaeróbico ocurre en la luz mediante fotosíntesis y el aeróbico en la oscuridad con obtención de la energía de la oxidación de compuestos. Bajo estas

Últimas condiciones, el desarrollo de los cromatóforos es mínimo.

El color del cultivo es rojo. Requiere como factor de crecimiento a la biotina.

C) Otras características: Estas bacterias son gram negativas. Las quinonas que contienen son ubiquinona<sub>10</sub> y rhodoquinona. El carotenoide predominante es espiriloxantina. El espectro total de las células es único en dos aspectos:

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

Se reproducen por fisión binaria.

*Rs. rubrum* es el género tipo de la familia.

### 1.1.3. Diferentes Preparaciones de Membrana.

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

A) Preparación de esferoplastos o protoplastos. La pared puede ser digerida por tratamientos con lisozima (7) quedando intacta la membrana. Mediante este tratamiento los constituyentes citoplásmicos son retenidos en el interior y se elimina el citocromo C<sub>2</sub>.

B) Preparación de cromatóforos. Los cromatóforos son vesículas membranales selladas que contienen en el interior el citocromo C<sub>2</sub>. Esta preparación se obtiene mediante ruptura

mecánica de las bacterias (8 y 9). Su tamaño aproximado es de 100 nm. En la figura 1, se puede observar el diagrama de estas preparaciones, donde se ve que la polaridad de la membrana del cromatóforo es inversa a la de los esferoplastos o bacterias íntegras, Mitchell (10) y Scholes (11) lo han de mostrado, basándose en estudios sobre los movimientos de pro tones en condiciones de iluminación, y Crofts (6) lo ha com probado por medio de anticuerpos contra centros de reacción y citocromo C<sub>2</sub>.

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

La preparación de cromatóforos es de especial interés ya que contiene al aparato fotofosforilante y, por tanto, a la enzima encargada de la Síntesis del ATP (fig. 2) de una manera semejante a la contenida en la membrana del tilacoide del cloroplasto (12).

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

- i) LLevan a cabo reacciones de fotofosforilación (13) en pre sencia de ADP, Pi y luz. Así como la reacción reversa que es la hidrólisis de ATP.
- ii) Se ha observado que los cromatóforos no se encuentran en cultivos crecidos en oscuridad, es decir, son inducibles por la luz.
- iii) Al igual que los esferoplastos, los cromatóforos mueven H<sup>+</sup>. Los primeros acidifican al medio, mientras que los segun-

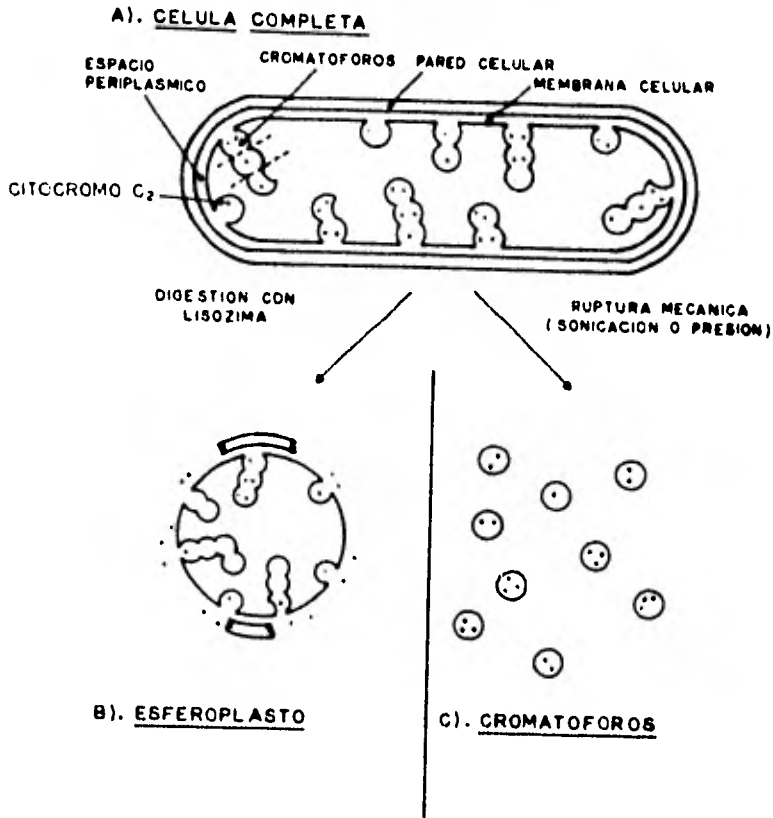


Fig. 1. Esquema General de Bacterias Fotosintéticas que muestra la obtención de Cromatóforos y Esferoplastos a partir de la célula entera. Tomado de Crofts, A. R. 1974 (6)

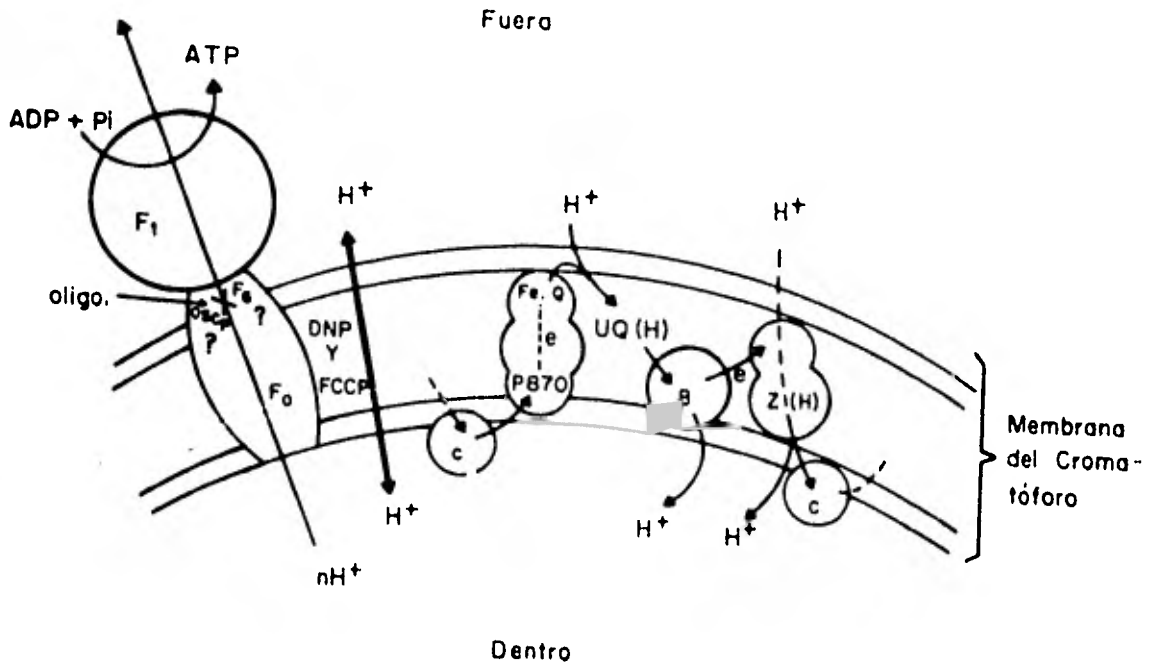


Fig. 2. Esquema que muestra a la  $H^+$ ATPasa y al Sistema de Transporte de electrones en la Membrana del Cromatóforo. Se indica el lugar en que actúan los desacoplantes DNP y FCCP y el inhibidor Oligomicina (oligo.). Tomado de Crofts, A.R. 1974 (6) y Modificado.

dos lo alcalinizan (11). Esto es debido a la diferencia de polaridad.

## 1.2. HIPOTESIS DE TRANSDUCCION DE ENERGIA.

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

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

De todas formas, la transferencia de electrones proporciona la suficiente energía para la formación de ATP. Las etapas del metabolismo que comienzan con la transferencia de electrones y finalizan con la síntesis de ATP, en bacterias y mitocondrias, se denominan fosforilación oxidativa, y en bacterias fotosintéticas y cloroplastos se llama fotofosforilación.

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

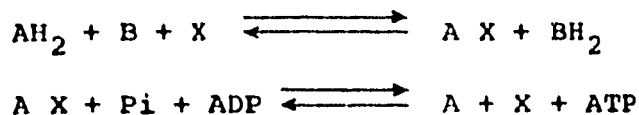
Son tres las principales hipótesis que se han propuesto

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

### 1.2.1. Hipótesis Química.

Históricamente esta hipótesis fue la primera. La formulación inicial fue hecha por Slater en 1953. Propone un acoplamiento entre las reacciones de óxido-reducción y la síntesis de ATP a través de un intermediario químico común, que debía ser un compuesto de alta energía (14).

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



donde: A y B = transportadores redox

X = intermediario común.

En esencia, propone que el vehículo de la transferencia energética es un enlace covalente de alta energía del intermediario común. La hipótesis tiene dos serias limitaciones: a) No se ha aislado ningún complejo del tipo del intermediario químico de alta energía y b) No toma en cuenta fenómenos



de membrana, como cambios estructurales, potenciales eléctricos o flujos de iones; y el hecho de que la membrana deba permanecer intacta y continua para que haya fosforilación.

### 1.2.2. Hipótesis Quimiosmótica.

Tomando conceptos de fisiología de membrana, bioquímica tradicional y un concepto nuevo de reacciones vectoriales, que da lugar a transferencia de grupos químicos a través de la membrana, Mitchell desarrolló la Hipótesis Quimiosmótica (10 y 15).

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

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

siendo: R = constante de los gases

T = temperatura absoluta

F = constante de Faraday.

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

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

Esta teoría contiene algunos detalles que han causado controversia. Sin embargo, la mayoría de sus postulados básicos han sido probados experimentalmente (16) por lo que la hemos tomado como hipótesis de trabajo.

### 1.2.3. Hipótesis Conformacional.

Ha sido postulada por varios investigadores, en particular por Boyer (17). Para ellos, la energía, producida en el transporte electrónico, se conserva en forma de un cambio conformacional provocado en una molécula transportadora de electrones o en la molécula de la ATP sintetasa. Este estado conformacional de elevada energía sería el resultado de un desplazamiento en el número y localización de los enlaces débiles como enlaces de H, interacciones hidrofóbicas etc, que mantienen la conformación tridimensional de la proteína. Así pues, la energía inherente a esta conformación energizada es la empleada para provocar la formación de ATP a partir de ADP y Pi.

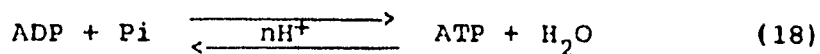
Básicamente, esta hipótesis propone que un número de enlaces no covalentes débiles de una macromolécula actúan como intermediario o transportador de energía, por lo que se ha hablado de que constituye una variante de la hipótesis quími

ca. Hasta la fecha sólo existen algunos resultados atractivos que permiten sostener esta hipótesis.

### 1.3. COMPLEJO ATP SINTETASA

Las enzimas que acoplan la difusión de retorno de  $H^+$  por la membrana con la síntesis de ATP parecen ser notablemente similares en los diferentes sistemas que han sido estudiados y se conocen con el nombre de complejo de ATP Sintetasa (ATPasa) (12).

Este complejo contenido en las membranas de bacterias, cloroplastos y mitocondrias, lleva a cabo la conversión reversible de la fuerza protomotriz, en energía química contenida en la molécula de ATP. La reacción catalizada es la siguiente:



La ATPasa es una bomba de protones cuya función es el paso de  $H^+$ , generados en un lado de la membrana por las reacciones del transporte de electrones, al oligómero catalítico de la enzima que los usa para formar ATP.

De una manera global, el complejo de la ATP sintetasa está formado por tres componentes principales (18 y 19): Uno hidrofílico o  $F_1$ , que destaca en las fotomicrografías electrónicas como cuerpos globulares que sobresalen de la superficie de la membrana y que cataliza la síntesis o hidrólisis de ATP; un segmento compuesto por, hasta ahora, dos péptidos cuya función es unir a la  $F_1$  con la membrana. Estos péptidos se denominan OSCP y  $F_6$  y le confieren a la  $F_1$ , sensibili-

dad a la oligomicina. Finalmente, un componente hidrófobo, denominado  $F_0$  que se encuentra en el interior de la bicapa lipídica de la membrana, atravesándola, y cuya función principal es permitir el paso de  $H^+$  a través de la misma. El segmento  $F_1$  puede desprenderse fácilmente de la membrana, pero el  $F_0$  sólo es posible solubilizarlo cuando la membrana es tratada con detergentes.

El segmento  $F_1$  fue aislado de mitocondria de corazón de buey por Racker, Pullman y Penefsky en 1960 (20). Racker y colaboradores descubrieron que cuando las vesículas submitocondriales se someten a agitación mecánica o a un tratamiento con tripsina y urea, se obtenían dos fracciones: 1) vesículas membranosas, capaces de catalizar transporte electrónico pero que no lograban fosforilar el ADP para formar ATP y 2) una fracción soluble protéica que catalizaba la hidrólisis de ATP, pero no el transporte de electrones. La microscopía electrónica demostró que estas vesículas no retenían los cuerpos globulares de la membrana sobre su superficie.

Una vez obtenidas estas dos fracciones, se procedió a hacer experimentos de reconstitución. Se observó que al combinar las dos fracciones se restablecía, en gran proporción, la actividad de la fosforilación oxidativa; y que los cuerpos globulares volvían a observarse sobre la superficie de las vesículas. De estos experimentos, Racker y sus colaboradores dedujeron que la membrana mitocondrial contenía las enzimas del transporte electrónico, mientras que la fracción protéica soluble contenía la enzima fosforilante.

Las proteínas solubles que se requieren para restaurar la actividad sintética de ATP ó hidrolítica se llaman Factores de Acoplamiento.

Trabajos posteriores de Racker, utilizando las técnicas de reconstitución pero utilizando anticuerpos anti  $F_1$  demostraron que en el factor  $F_1$  reside el sitio para la síntesis de ATP.

#### 1.4. FACTORES DE ACOPLAMIENTO EN BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS.

Las proteínas que están involucradas en la síntesis de ATP acoplada a la transferencia de electrones, pero que no catalizan las reacciones de óxido-reducción, se definen como factores de acoplamiento (21).

Han sido muy pocos los estudios que se han hecho de estos factores en bacterias fotosintéticas (1); además de no haber sido aislados todos los factores ya descritos para otros sistemas como mitocondria, cloroplasto y bacteria termófila.

A pesar de que existe analogía en los mecanismos de síntesis de ATP, en la fotofosforilación de los cloroplastos de las plantas superiores y de los cromatóforos de bacterias fotosintéticas, los estudios concernientes a la resolución y reconstitución de la fotofosforilación bacteriana no se habían hecho, hasta que Baccarini-Melandri y colaboradores, en 1970 (22), establecieron la identidad de un factor acoplante con actividad ATPásica para *Rhodospseudomonas capsulata*. A partir de entonces se ha logrado la resolución del sistema fosforilante de tres miembros de la familia Rhodospirillaceae:

*Rp. capsulata* (22), *Rhodospirillum rubrum* (23) y *Rp. shaeroides* (24); y de uno de la familia Chromatiaceae: *Chromatium vinosum* (25).

Las bacterias fotosintéticas facultativas, miembros de la familia Rhodospirillaceae, son los únicos organismos que además de sintetizar ATP por la energía luminosa, fotofosforilación en ausencia de  $O_2$ , tienen la habilidad de producir ATP por oxidación de sustrato; o sea, llevan a cabo fosforilación oxidativa en presencia de  $O_2$  y ausencia de luz. Las dos funciones, fotofosforilación y fosforilación oxidativa, están localizadas en la membrana citoplásmica y sus invaginaciones y, probablemente tienen componentes del transporte de electrones comunes. También ha sido demostrado (26) que la  $H^+$ ATPasa es común para las dos funciones, reconstituyendo la fosforilación oxidativa con el factor  $F_1$  de bacterias fotofosforilantes y viceversa.

Los primeros reportes en los que se menciona la localización de los factores de acoplamiento en bacterias fotosintéticas son los de Löw y Afzelius en 1964 (27), en donde se describe que los cromatóforos de *Rs. rubrum* tienen, en su superficie externa, cuerpos globulares semejantes a los observados en partículas submitocondriales. Mediante fotomicrografías se observó que el lavado de los cromatóforos con EDTA o con soluciones de Tritón X-100 (28) libera cuerpos globulares y que, consecuentemente, se pierde la actividad ATPasa. Esto sugiere que el papel de estas estructuras en el cromatóforo es el mismo que en las partículas submitocondriales.

1.4.1. Solubilización y Purificación del Factor de Acoplamiento.

A) Solubilización.

Se han desarrollado algunos métodos para la solubilización del factor de acoplamiento en bacterias fotosintéticas, a partir de cromatóforos. Estos métodos son semejantes a los usados para mitocondrias y cloroplastos, entre ellos tenemos:

- a) Sonicación en EDTA 1 mM (22 y 23), en donde se obtiene al factor  $F_1$
- b) Lavados con soluciones de alta fuerza iónica con 2 M de LiCl o NaBr (29 a 32), con esta extracción se libera la subunidad  $\beta$  del factor  $F_1$ , perdiéndose el 95% de la actividad hidrolítica y de sintetasa.
- c) Extracciones a partir de polvos acetónicos (33) en las que no se obtienen partículas despojadas del factor  $F_1$ .
- d) Extracciones con cloroformo (34 y 35), en las que se aíslan las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del factor  $F_1$
- e) Lavados con soluciones de Tritón X-100 (28, 36 a 38) en los que se obtiene el complejo sensible a oligomicina  $F_0-F_1$ .
- f) Incubación con buffer de baja fuerza iónica, en *Chromatium* (25), se obtiene al factor  $F_1$ .

B) Purificación.

Hasta ahora se han descrito varios procedimientos (33 y 39) para la purificación de los factores de acoplamiento solubilizados de las membranas de *Rp. capsulata* y *Rs. rubrum*. La preparación más pura del factor que se ha descrito en la literatura parece ser la obtenida de *Rs. rubrum* por Berzborn,

Johansson y Baltscheffsky (40). El proceso de obtención del factor  $F_1$  se hizo por extracción a partir de polvos acetónicos o por sonicación con EDTA (Tabla 1).

Las técnicas usadas en la purificación incluyen: precipitaciones fraccionadas con  $\text{NH}_4^+\text{SO}_2$ , filtración a través de geles de agarosa (Sepharosa 6 B), gradientes de densidad de sacarosa y cromatografía de intercambio iónico (DEAE Sephadex A-50).

En el caso de la purificación realizada por Berzborn y colaboradores, la identificación de las fracciones que contienen al factor de acoplamiento, se facilitó grandemente por la observación de la relación de fluorescencia (300/350 nm y 310/350 nm), debida al bajo contenido o a la falta de triptofano que existe en la proteína pura. La proteína obtenida resultó ser homogénea tanto inmunológica como electroforéticamente. La labilidad y el bajo rendimiento obtenido en esta preparación y en otras producidas por métodos diferentes, limitan su utilización en el laboratorio.

#### 1.4.2. Características del Factor de Acoplamiento ( $F_1$ ).

La proteína purificada de las Rhodospirillaceae es un complejo enzimático que tiene un PM que fluctúa entre 280 000 y 350 000, con un coeficiente de sedimentación  $s_{20w} = 13.1 \times 10^{-13}$  (39 y 41), compuesto de cinco subunidades cuando es analizado en una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS (42) (fig. 3). El patrón de subunidades es similar al observado en los factores de acoplamiento  $F_1$  de otras fuentes. Los PM aparentes observados



Tabla 1. Relación de Fluorescencia y Grado de Purificación del Factor de Acoplamiento de *Rhodospirillum rubrum*.

Paso	Proteína total (mg)	Actividad Específica ATPasa ( $\mu\text{mol hr}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )	Actividad Total ATPasa ( $\mu\text{mol hr}^{-1}$ )	Relación de Fluorescencia (nm)	
				300/350	310/350
1	960	0.5	480	0.2	0.5
2	320	5.2	1670	0.3	0.6
3	16	300	4800	0.6	0.9
4	3	640	1920	2.6	3.5
5	0.9	900	810	5.3	7.8

Tomada de Berzborn *et al.* 1975. (40) y Modificada.

Pasos de Purificación: (1) Extracto Crudo; (2) Fracción 30-55% de Sulfato de amonio; (3) Eluido de Sepharosa 6B; (4) Eluido de DEAE Sephadex A 50; (5) Fracción de Gradiente de Densidad de Sacarosa.

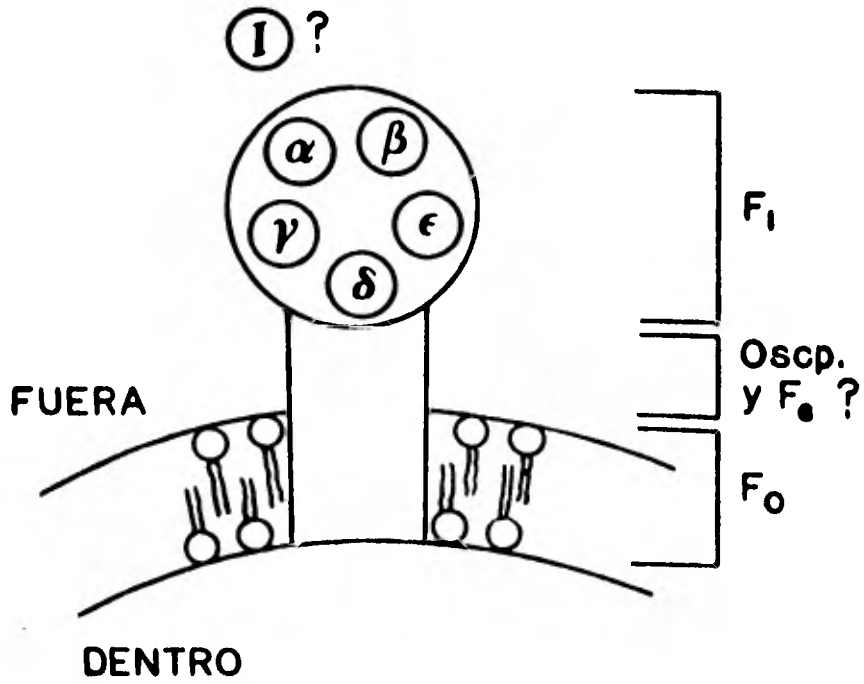


Fig. 3. Esquema de la H<sup>+</sup>ATPasa de Bacterias Fotosintéticas.

en las electroforesis en SDS son:

Subunidad $\alpha$	54 000
subunidad $\beta$	50 000
subunidad $\gamma$	32 000
subunidad $\delta$	13 000
subunidad $\epsilon$	7 500

Se han podido deducir las funciones de algunas de estas subunidades gracias a las diferentes técnicas de solubilización. Por ejemplo, la extracción del factor de acoplamiento que se hace con LiCl libera un sólo péptido que se ha identificado como la subunidad  $\beta$  por sus propiedades electroforéticas. La subunidad no presenta actividad ATPasa, pero mediante reconstituciones con las membranas despojadas de la subunidad con el LiCl, que carecen de actividad también y retienen las otras cuatro subunidades, se ha podido restaurar la fotofosforilación y la actividad ATPasa (32). De lo anterior se ha concluido, que la actividad de fotofosforilación y la de ATPasa del cromatóforo son estructuralmente dependientes de esta subunidad; lo cual sugiere, que en ella reside la actividad catalítica. Otros experimentos advierten que ésta subunidad no tiene otro papel estructural en la membrana ya que la toma de  $H^+$  por las partículas despojadas de la subunidad y otras funciones permanecen normales.

Por otro lado, en *Rs. rubrum* se han hecho experimentos que sugieren que la subunidad  $\delta$  está muy probablemente implicada en la unión del factor  $F_1$  y el  $F_0$  (36).

Con solubilizaciones con Tritón X-100 se ha aislado un

complejo  $F_0F_1$  sensible a oligomicina y estable en frío, semejante al aislado en mitocondria bajo condiciones similares. Este complejo posee 14 polipéptidos en electroforesis con SDS, 5 de los cuales se han identificado como los del factor de acoplamiento  $F_1$  (37).

#### 1.4.3. Propiedades de la $H^+$ ATPasa.

##### A) Propiedades de la $H^+$ ATPasa Unida a la Membrana.

Las preparaciones membranales de las Rhodospirillaceae poseen una  $H^+$ ATPasa dependiente de  $Mg^{+2}$  que es sensible a desacoplantes como FCCP, DNP, etc. y a inhibidores de la transferencia de energía como oligomicina, aurovertina, etc. Otros cationes metálicos pueden sustituir al  $Mg^{+2}$  tales como  $Mn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Ni^{+2}$  aunque con menor eficiencia (43 a 45), es muy posible que todos ellos actúen como un sustituto del  $Mg^{+2}$  en el sitio activo de la  $H^+$ ATPasa formando un complejo metal-ATP, que es el sustrato de la enzima.

Las características mencionadas con anterioridad, se han observado en los factores de acoplamiento de otros sistemas como mitocondria, cloroplasto y bacteria.

##### B) Propiedades de la $H^+$ ATPasa Soluble.

La solubilización de la enzima trae consigo cambios en las propiedades catalíticas de la proteína, especialmente en lo que se refiere al requerimiento de cationes, este hecho parece estar relacionado con el procedimiento empleado para su extracción de la membrana.

Por ejemplo, la proteína purificada de un extracto de polvos acetónicos de *Rs. rubrum*, presenta una actividad

ATPasa alta en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  y baja en  $\text{Mg}^{+2}$ , más aún, el  $\text{Mg}^{+2}$ -ATP inhibe la actividad, pues actúa como competidor del sustrato  $\text{Ca}^{+2}$ -ATP (39).

En el mismo organismo, se ha obtenido una  $\text{H}^{+}$ ATPasa soluble dependiente de  $\text{Mg}^{+2}$  en el sobrenadante obtenido por sonicación con EDTA y DTT (46).

En *Chromatium* tenemos un caso especial, ya que, la  $\text{H}^{+}$ ATPasa membranal es insensible a oligomicina y phlorizina, así mismo, la actividad en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  es baja y en la enzima soluble la actividad se observa tanto en presencia de  $\text{Mg}^{+2}$  como de  $\text{Ca}^{+2}$  (47).

En las Rhodospirillaceae la actividad de la  $\text{H}^{+}$ ATPasa soluble es insensible a desacoplantes e inhibidores de la transferencia de energía (39 y 45), de una manera similar a los que sucede con las  $\text{H}^{+}$ ATPasas de otros orígenes.

La  $\text{H}^{+}$ ATPasa soluble, es estable a 30°C y muestra un descenso en la actividad cuando se conserva en bajas temperaturas.

#### 1.4.4. Modulación de la $\text{H}^{+}$ ATPasa Unida a la Membrana.

La actividad del factor de acoplamiento  $\text{H}^{+}$ ATPasa cuando está unido a la membrana puede ser modificado por diferentes factores:

A) Luz. El primer fenómeno observado de esta naturaleza, es el incremento de la actividad  $\text{H}^{+}$ ATPasa causado por la iluminación de la membrana (48). Este incremento, que puede ser reversible, es de 2 a 3 veces la actividad de la enzima en la oscuridad; y requiere de algunos minutos de preilumina

ción. El aumento en la actividad parece estar relacionado con la interacción de la enzima con el flujo cíclico de electrones. Esta estimulación es inhibida por antimicina A.

B) Desacoplantes. Algunas indicaciones acerca de la actividad de la enzima en el estado energizado de la membrana se han obtenido de las respuestas de la  $H^+$ ATPasa a desacoplantes.

Todos los desacoplantes cuando se añaden a concentraciones que inhiben completamente la fosforilación, también inhiben la actividad  $H^+$ ATPasa que es sensible a oligomicina (49). El efecto, observable en la luz y en la oscuridad, sugiere que el estado activo de la enzima es de alguna manera dependiente del estado energizado de la membrana, el cual puede ser inducido por el flujo fotosintético de electrones, es decir, activación por luz, o por la hidrólisis de ATP en la oscuridad. El bajo nivel de actividad que se observa en la oscuridad es, por tanto, consecuencia del bajo nivel de energización, equivalente a pmf menor, producido por la hidrólisis. Es decir, la hidrólisis de ATP produce una pmf menor que el flujo de electrones.

En condiciones de oscuridad y a concentraciones que no inhiben por completo la fotofosforilación, los desacoplantes estimulan la actividad ATPasa de una manera semejante a como lo hacen con otros sistemas de transducción energética. En cambio, en la luz, la actividad ATPasa, a estas concentraciones no se modifica.

C) ADP y  $P_i$ . El ADP a concentraciones muy bajas, inhi-

de la activación por la luz. El Pi a 1 mM y arsenato incrementa la actividad en la oscuridad 2 o 3 veces; estos efectos son muy similares a los observados en cloroplastos de plantas superiores.

1.4.5. ¿Existe en Bacterias Fotosintéticas un inhibidor de la  $H^+$ ATPasa?

Se han descrito péptidos inhibidores de la  $H^+$ ATPasa en varios sistemas (50). Estos péptidos parecen tener un papel regulador de la actividad catalítica del complejo  $H^+$ ATPásico. Esta clase de péptidos, que se han llamado inhibidores naturales de las  $H^+$ ATPasas, inhiben las actividades sintética e hidrolítica de la enzima; y su efecto regulador es modificable por el gradiente de  $H^+$  o por la presencia de nucleótidos que están en contacto con la  $F_1$ . Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo de esta función reguladora.

Hasta la fecha, no se ha demostrado, ni hay evidencia directa de que exista en bacterias fotosintéticas un inhibidor de la  $H^+$ ATPasa semejante a los existentes en otros sistemas. Ya sea como la subunidad inhibidora ( $\epsilon$ ) de la  $CF_1$  de cloroplasto (51) o bien como el péptido endógeno inhibidor de la  $H^+$ ATPasa mitocondrial (52).

Sin embargo, existen una serie de hechos que nos sugieren la existencia de dicho inhibidor:

A) El considerable aumento de la actividad, después de la iluminación de la membrana durante unos minutos, es semejante al incremento observado en cloroplasto en las mismas condiciones y, en este caso, se relaciona con la acción de

la subunidad inhibidora.

B) Así mismo, la adición de succinato en condiciones de iluminación aumenta la actividad ATPásica del cromatóforo, tal como sucede en las partículas mitocondriales.

C) La existencia de una actividad ATPásica enmascarada en el extracto crudo que se obtiene al solubilizar a la enzima. La actividad específica de la enzima en la membrana del cromatóforo es de aproximadamente 40 a 80  $\mu$ moles Pi/h/mg ECl y al hacer la solubilización de la misma, el extracto crudo que se obtiene tiene una actividad específica de 1  $\mu$ mol Pi/h/mg Prot. Este extracto, puesto en cromatóforos despojados de la enzima, reconstituye la actividad del cromatóforo intacto hasta en un 85 a 90%.

D) La actividad del extracto crudo mencionada en el inciso C, se va incrementando en los subsiguientes pasos de la purificación (Tabla 1). El gran incremento en las unidades totales de la actividad, durante la purificación, junto con el incremento de la actividad específica, sugiere, fuertemente, la presencia de un inhibidor en el extracto crudo.

El único hecho que presume la no existencia del inhibidor son los experimentos de Harris (53), los cuales muestran que en los cromatóforos de *Rs. rubrum* no existe un retardo al iniciarse la síntesis de ATP, tal como el que existe en el cloroplasto y las partículas mitocondriales y que se achaca a la presencia del inhibidor; por lo tanto, él presupone que no hay inhibidor o al menos que está inactivo.



### 1.5. OBJETIVO.

Así pues, nuestro objetivo primordial consistió en demostrar la existencia o ausencia del inhibidor de la  $H^+$ ATPasa de bacterias fotosintéticas.

Para lograr tal objetivo se hicieron tratamientos con los cuales se sabe se remueve al inhibidor en otros sistemas. Los criterios que se tomaron para esto fueron los siguientes:

A) Activación por tripsina, tanto en el cromatóforo como en el extracto crudo de la enzima soluble.

Se tienen referencias (51 y 54) de que la actividad ATPasa de muchos sistemas se ve incrementada por la digestión proteolítica de las membranas, usualmente por tripsina a bajas concentraciones. Este efecto se ha relacionado con la destrucción preferente del péptido inhibidor de la  $H^+$ ATPasa. El tratamiento tiene muy poco efecto sobre las demás subunidades de la enzima.

En bacterias fotosintéticas, se ha hecho un tratamiento semejante en *Chromatium*, encontrando un aumento de 5 a 8 veces de la actividad por la digestión con tripsina (47); en *Rhodospseudomonas capsulata*, las incubaciones con tripsina producen muy ligeras activaciones y subsiguientes desactivaciones.

B) Activación por la columna de Sephadex G-50 en cromatóforos.

Ha sido descrito que el inhibidor en mitocondrias puede ser movilizado de su sitio inhibitorio en la  $H^+$ ATPasa unida a la membrana por una filtración en gel utilizando Sephadex

G-50 grueso (55).

C) Estabilidad al frío de la enzima soluble.

Se ha demostrado que el inhibidor de la  $H^+$ ATPasa de mitocondria protege a la enzima soluble de su inactivación por bajas temperaturas (56 y 57).

D) Inhibición de la actividad del cromatóforo por extractos de urea.

En cloroplastos (51) se ha visto que un extracto de  $CF_1$  preparado en urea 7 M inhibe a la  $CF_1$  hasta en un 90%, esto es debido a que el inhibidor de la enzima se solubiliza en presencia de urea y detergentes quedando libre para actuar.

E) Activación de la enzima soluble por el calor.

En mitocondria (58) y cloroplasto (59) se ha movilizado la proteína inhibidora de los otros componentes de la  $F_1$  por tratamiento suave con calor, transformando a la  $F_1$  en una  $H^+$ ATPasa más activa.

Dentro de las bacterias fotosintéticas, en *Chromatium*, los tratamientos con calor no afectan la actividad del extracto crudo de la enzima (47).

En general todos los péptidos inhibidores que se conocen son estables al calentamiento.

## CAPITULO 2

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1. CRECIMIENTO DE BACTERIAS.

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

##### 2.1.1. Medios de Cultivo.

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

###### A) Medio Sólido.

Contiene lo siguiente para un litro:

Extracto de levadura (Bioxon de México)	_____	3 gr
Peptona de Gelatina (Bioxon de México)	_____	2 gr
Agar Bacteriológico (Bioxon de México)	_____	1 g

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

###### B) Medio Líquido.

Se preparó el medio líquido formulado por Cohen-Bazire *et al.* (60), el cual es una modificación del propuesto por Hutner (61).

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

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

$N(CH_2COOH)_3$	_____	20 gr
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	_____	28.9 gr
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	_____	8.7 gr

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  \_\_\_\_\_ 0.185 gr

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  \_\_\_\_\_ 0.195 gr

\* Metales '44' \_\_\_\_\_ 100 ml

Se ajusta el pH a 6.8.

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

EDTA \_\_\_\_\_ 2.5 gr

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  \_\_\_\_\_ 5.0 gr

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  \_\_\_\_\_ 11 mgr

$\text{MnSO}_4 \cdot 6$  \_\_\_\_\_ 1.54 gr

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  \_\_\_\_\_ 1.37 gr

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  \_\_\_\_\_ 0.392 gr

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  \_\_\_\_\_ 0.248 gr

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  \_\_\_\_\_ 0.177 gr

$\text{H}_2\text{SO}_4$  \_\_\_\_\_ aprox. 4 gotas

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

b)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  136.09 gr para 1 lt de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, se ajusta el pH a 6.8.

c) Acido succínico 100 gr para 1 lt de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, se ajusta el pH a 6.8.

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

e)  $\text{NaCl}$  50 gr para 1 lt de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

f) Acido L-glutámico 25 gr para 250 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y se ajusta el pH a 6.8.

g) Acido L-aspartico 5 gr para 250 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, ajustar el pH a 6.8.

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

a) Base concentrada	___	250 ml
b) $\text{KH}_2\text{PO}_4$	_____	250 ml
c) Acido succínico	___	250 ml
d) $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	_____	62.5 ml
e) NaCl	_____	125 ml
f) Acido L-glutámico	___	25 ml
g) Acido L-aspártico	___	25 ml
además de		
Peptona de gelatina	___	12.5 gr
Acido nicotínico	_____	12.5 mgr
Tiamina	_____	6.25 mgr
Biotina	_____	0.125 mgr

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

#### 2.1.2. Siembra de Bacterias.

Las bacterias se sembraron en placa por el método de dilución para formar colonias sencillas. De ahí se tomó una de ellas y se sembró por picadura en los frascos con medio sólido. Se incubaron en la oscuridad toda la noche, para permitir que el crecimiento aeróbico de estos microorganismos quite parcialmente el  $\text{O}_2$  del medio. Terminado este período, las bacterias sembradas se expusieron a la luz de focos con filamento de tungsteno de 40 watts. La distancia entre los focos

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

Para obtener grandes cantidades de bacterias se cultivaron en el medio líquido. La manera en que se hizo es la siguiente: A los frascos que contenían las bacterias en el medio sólido, se les agregó el medio líquido y se agitaron. Se dejaron toda la noche en la oscuridad y a continuación se colocaron a la luz de los focos con filamento de tungsteno de 40 watts a 30 cm. Después de 7 a 10 días se observó crecimiento de bacterias en el medio líquido, éste se transfirió a frascos de 100 ml de capacidad, a los cuales se les agregó medio fresco hasta colmar su capacidad. Se repitió el proceso oscuridad-luz y se dejó crecer a las bacterias hasta la fase logarítmica tardía. El inóculo bacteriano, obtenido así, se trasladó a frascos de 1 lt y de 16.5 lt sucesivamente, siguiendo los pasos descritos con anterioridad. Los frascos se cerraron con tapones de hule herméticos y se dejó el mínimo de aire entre el tapón y el medio de cultivo, tratando de evitar al máximo la presencia de  $O_2$ , ya que el crecimiento fotosintético de estos microorganismos se realiza en anaerobiosis. Esta es la razón por la cual, previo al crecimiento en la luz, siempre se dejó crecer a los cultivos en la oscuridad por 12 hrs, aprovechando que la bacteria, por sus procesos metabólicos oxidativos, elimina el  $O_2$  que llega a penetrar al frasco. Los cultivos se mantuvieron a  $30^\circ C$ .

## 2.2. COSECHA DE BACTERIAS.

Las bacterias crecidas en los frascos de 16.5 lt de capacidad fueron cosechadas en una centrifuga de flujo continuo Sharples, en la fase de crecimiento logarítmica tardía, la cual se determinó haciendo curvas de crecimiento, esto es, midiendo la densidad óptica del cultivo a diversos intervalos de tiempo en un fotocolorímetro.

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

## 2.3. OBTENCION DE CROMATOFOROS.

Se siguió el método descrito por Baccarini-Melandri et al. (22) para la obtención de cromatóforos.

A) Las bacterias se resuspendieron en buffer de glicilglicina 10 mM pH 7.5 en una proporción 1/3 (bacterias/buffer), que contenía 1 mg de DNasa por 100 gr de peso húmedo de bacterias y  $MgSO_4$  1mM.

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

a) Se hicieron pasar por una prensa Sorval Ribi cell fractionator (French Press) a 16 000 psi (22), o

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

M.S.E. puesto al máximo y enfriando con agua a 4°C (11).

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

D) El sobrenadante de la centrifugación anterior, se sedimentó a 100 000 x g por 60 min obteniéndose así un precipitado de cromatóforos los cuales se lavaron con el mismo buffer y se centrifugaron a la misma velocidad. Los cromatóforos se resuspenden en buffer de glicilglicina 10 mM pH 7.5 y glicerol ( 1/1, v/v). El sobrenadante de esta centrifugación contiene citocromo C<sub>2</sub> además de otras proteínas.

#### 2.4. SOLUBILIZACION DEL FACTOR DE ACOPLAMIENTO.

Para la solubilización de la H<sup>+</sup>ATPasa se siguió básicamente la metodología descrita por Baccarini-Melandri (22) en la preparación de partículas desacopladas.

A) Los cromatóforos frescos se resuspendieron en glicilglicina 20 mM, EDTA 1 mM pH 8, a una concentración aproximada de 0.25 - 0.4 mg de BCl/ml.

B) Esta suspensión se sonicó 90 seg en lotes de 25 ml y en frío. Durante el tratamiento, se intercalaron 30 seg de sonicación con 30 seg de descanso hasta completar los 90 seg de sonicación. Se utilizó un M.S.E. a su máxima capacidad.

C) A continuación se incubó en la oscuridad con agitación continua durante 1 hr a temperatura ambiente.

D) Se centrifugó durante 1 hr a 100 000 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido es el extracto crudo del factor de acoplamiento.



El precipitado contiene cromatóforos despojados parcialmente del factor de acoplamiento, los cuales se guardaron en buffer de glicilglicina 10 mM pH 7.5 y glicerol (1/1, v/v). Estas partículas tienen una actividad ATPasa residual que fluctúa entre el 15 y el 50% de la actividad del cromatóforo entero.

## 2.5. METODO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ATPasa.

La actividad ATPasa se midió como la liberación de Pi de ATP a 30°C a pH 8, en presencia de MgCl<sub>2</sub> y de un sistema regenerador de ATP, siguiendo la metodología usada por Melandri *et al.* (48).

### 2.5.1. Método para determinar la Actividad ATPasa en Cromatóforo.

La determinación de la actividad puede hacerse en la oscuridad o en la luz. En esta investigación, únicamente se midió la actividad ATPasa en oscuridad.

A) Determinación en la Oscuridad. Se tomó una cantidad de cromatóforos correspondiente a 30-50 µg de BCl y se transfirieron a un tubo que contenía el siguiente medio: 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.45 mM de PEP, 7 µg de PK y Tris-acetato 50 mM, KCl 60 mM pH 8, en cantidad suficiente para aforar a 1 ml.

La reacción se inició al agregar 3 mM de ATP ajustado a pH 7.4.

Todo el medio se incubó a 30°C durante 10 min, en la oscuridad, en un baño con agitación. La reacción se detuvo con TCA a una concentración final de 6%. Finalmente se centrifugó en la clínica a 3 000 rpm durante 10 min. El Pi presente



B) Determinación en la Luz. Para determinar la actividad en luz, se siguió todo el procedimiento anterior, con la iniciación de la reacción precedida de un período de 5 min de preiluminación a través de un filtro rojo.

La incubación se llevó a cabo a 30°C durante 10 min bajo iluminación constante a través de filtro rojo.

#### 2.5.2. Método para determinar la Actividad ATPasa en el Extracto Crudo de la Enzima.

Se tomó una cantidad de extracto crudo de aproximadamente 0.1 a 0.2 mg de proteína y se siguió el procedimiento descrito para la medición de la actividad del cromatóforo entero.

#### Cálculo de la Actividad.

La actividad específica se expresó como  $\mu\text{moles Pi/h/mg Prot}$  en las condiciones ensayadas.

#### 2.6. METODO DE RECONSTITUCION. (23 y 33)

Las partículas despojadas de la actividad ATPasa, equivalentes a 50  $\mu\text{gr}$  de BCl, obtenidas del tratamiento del cromatóforo con EDTA 1 mM, se incubaron, en un volumen final de 0.25 ml de Tris-acetato 50 mM KCl 60 mM pH 8, con diferentes cantidades del extracto crudo de la enzima soluble, que se encuentra en el sobrenadante obtenido del mismo tratamiento, y en presencia de  $\text{MgCl}_2$  por 1 hr.

La incubación se llevó a cabo en la oscuridad y a temperatura ambiente o a la temperatura de ensayo (30°C). Finalmente, se añadió la mezcla de reactivos correspondiente para medir la Actividad ATPasa.

## 2.7. ESTIMACION DEL CONTENIDO DE BCl EN CROMATOFOROS.

La concentración de BCl en los cromatóforos de la bacteria *Rhodospirillum rubrum* fue determinado por la absorción a 770 nm de un extracto de acetona-metanol (7/2, v/v) obtenido de cromatóforos, asumiendo un coeficiente de extinción molar de  $75 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (63).

La extracción de BCl de los cromatóforos se hizo a partir de 50  $\mu\text{l}$  de suspensión de cromatóforos. Los cuales fueron añadidos a un tubo que contenía 4.95 ml de acetona-metanol (7/2, v/v). Se agitaron vigorosamente durante unos segundos y se centrifugaron a 3 000 rpm por 5 min. El sobrenadante obtenido se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 770 nm, contra un blanco de acetona-metanol.

## 2.8. METODO PARA MEDIR ACTIVIDAD DE TRIPSINA (64).

Considerando que la tripsina pierde su actividad con el tiempo de almacenaje, se procedió a determinar su actividad hidrolítica en una solución pura. Para lo cual, se utilizó el método de Anson (65).

Se obtuvo una actividad de tripsina de 46.28  $\mu\text{moles}$  de tirosina/ mg/ min. Esta actividad fue sensible a inhibición por el Inhibidor de Tripsina.

## 2.9. DETERMINACION DE PROTEINA

La cantidad de proteína se estimó por el método de Lowry et al. (66), utilizando como estándar BSA.

## CAPITULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1. CRECIMIENTO DE *Rhodospirillum rubrum*.

Con el objeto de obtener cromatóforos con una actividad ATPasa suficientemente alta, fue necesario trabajar con bacterias en fase de crecimiento logarítmica tardía. Es en esta fase, cuando la velocidad de crecimiento de la población, que se ha ido elevando gradualmente, empieza a disminuir debido a la presencia de un número mayor de bacterias, de desechos acumulados y de otros factores que reducen la fertilidad de la población; hasta que eventualmente, cesa su crecimiento y se llega a la fase estacionaria. Por tanto, justo cuando se inicia la fase de crecimiento logarítmica tardía se cosecharon las bacterias.

Es importante hacer notar que el rendimiento de las bacterias es menor en fases de crecimiento anteriores a la fase logarítmica tardía por lo que se prefirió cosechar los cultivos al inicio de la fase antes mencionada.

El crecimiento de la población de *Rs. rubrum* puede ser representado por una curva logística típica (67), descrita por la siguiente ecuación:

$$N = \frac{K}{1 + e^{a-rt}}$$

en donde:

- N = tamaño de la población al tiempo  $t$
- $e$  = 2.71828, base de los logaritmos naturales
- $t$  = variable que representa al tiempo

$K$  = máximo valor de  $N$ , equivalente a la capacidad de carga del medio.

$r$  = tasa de crecimiento de la población

$a$  = posición de la curva respecto al origen

El cálculo usual de los parámetros  $K$ ,  $r$  y  $a$  es el siguiente. Se sabe que  $K$  es una asíntota de la curva y para obtener una estimación aproximada de ella, se calcula el promedio de los valores correspondientes a los  $t$  más grandes. Una vez determinado el valor de  $K$ , el paso siguiente es obtener estimaciones de los valores  $r$  y  $a$  mediante la transformación de la ecuación original en otra más sencilla en términos de  $r$  y  $a$ .

A partir de

$$N = \frac{K}{1 + e^{a-rt}}$$

tenemos

$$K = (1 + e^{a-rt})N$$

$$K - N = N e^{a-rt}$$

$$\frac{K - N}{N} = e^{a-rt}$$

de donde

$$\ln \left( \frac{K - N}{N} \right) = a - rt$$

si hacemos

$$\ln \left( \frac{K - N}{N} \right) = g(t)$$

tenemos

$$g(t) = a - rt$$

Esta viene a ser la ecuación de una recta en términos de  $a$  y  $r$ . De donde obtendremos: el parámetro  $a$ , como la intersec

ción de la recta  $g$  con el eje de las ordenadas y el parámetro  $\lambda$  como la pendiente de dicha recta.

Para un refinamiento de las estimaciones de los parámetros se emplearon:

i) para el ajuste de la logística, el método Levenberg Marquardt, y

ii) para el ajuste de la recta, el método de Householder (68 a 70). Ambos ajustes se llevaron a cabo en una computadora Digital PDP-10.

En la Tabla 2 se enlistan los datos experimentales así como el valor de  $\ln\left(\frac{K-N}{N}\right)$  necesarios para calcular la recta  $g$  y la curva logística (figs. 4 y 5)

De los valores obtenidos en los ajustes tenemos:

$$K = 274.797$$

$$\lambda = 0.0063$$

$$a = 2.2438$$

Por lo tanto, la ecuación de la curva logística que se muestra en la figura 4 y que describe el crecimiento de *R. rubrum* para los datos de la Tabla 2 es:

$$N = \frac{274.797}{1 + e^{2.2428 - 0.0063t}}$$

Utilizando esta ecuación puede predecirse el momento de cosechar las bacterias correspondiente a la fase de crecimiento logarítmica tardía, esto es posible, si se mantiene constante el inóculo inicial de bacterias en todos los cultivos al igual que las demás variables como son: tiempo, intensidad luminosa, volumen del cultivo, etc.

Tabla 2. Crecimiento de *Rhodospirillum rubrum*.

Tiempo (hrs)	N (U.K.)	$\ln \left( \frac{K-N}{N} \right)$
0	6	3.80
32.0	5.5	3.89
59.0	30	2.10
62.5	43	1.69
83.5	54	1.41
109.5	54	1.41
130.5	43	1.69
158.5	54	1.41
177.0	57	1.34
199.5	75	0.98
228.5	86	0.79
252.0	99	0.58
277.0	115	0.33
302.5	127	0.15
329.0	139	-0.02
369.0	139	-0.02
394.5	165	-0.40
418.0	170	-0.48
445.0	175	-0.56
468.0	183	-0.69
493.5	191	-0.82
516.5	202	-1.02
537.5	193	-0.86
567.25	210	-1.17
591.0	226	-1.53
613.0	232	-1.69
638.5	234	-1.74
658.5	238	-1.86
685.25	244	-2.06
735.5	250	-2.30
781.5	250	-2.30
809.5	263	-3.09
835.0	270	-3.99
848.5	273	-4.92
923.5	264	-3.18
948.0	280	-4.50
996.5	272	-4.51

tomando  $K = 275$

Datos experimentales. La cantidad de bacterias se considera directamente proporcional a las Unidades Klett ( U.K. ).



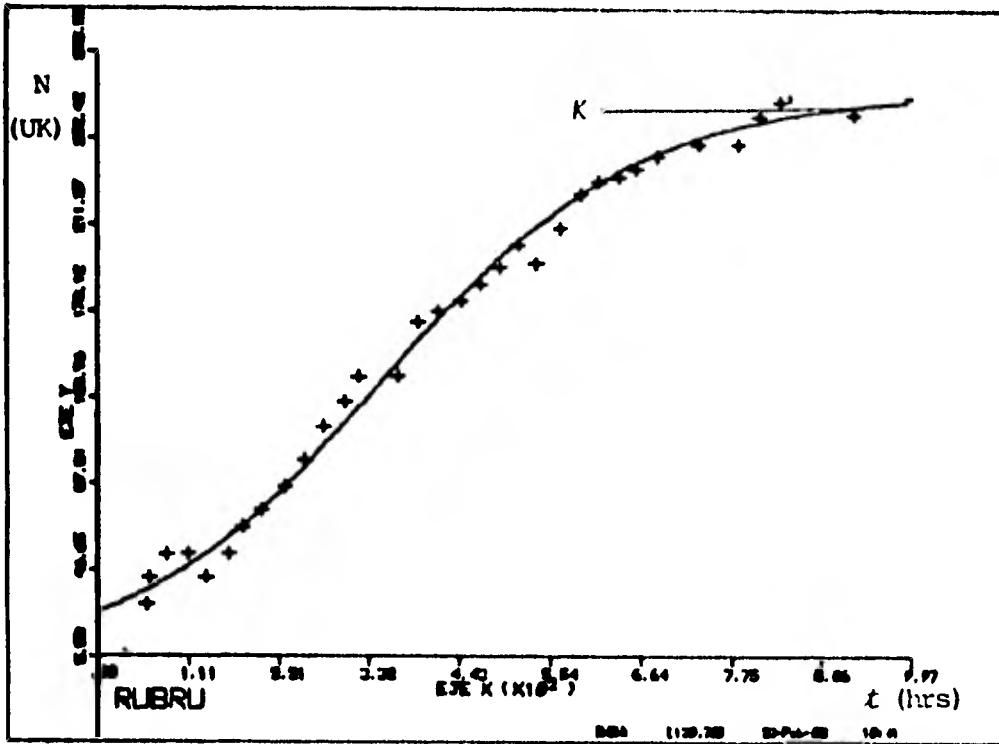


Fig. 4. Curva Logística del Crecimiento de *Rhodospirillum rubrum*.

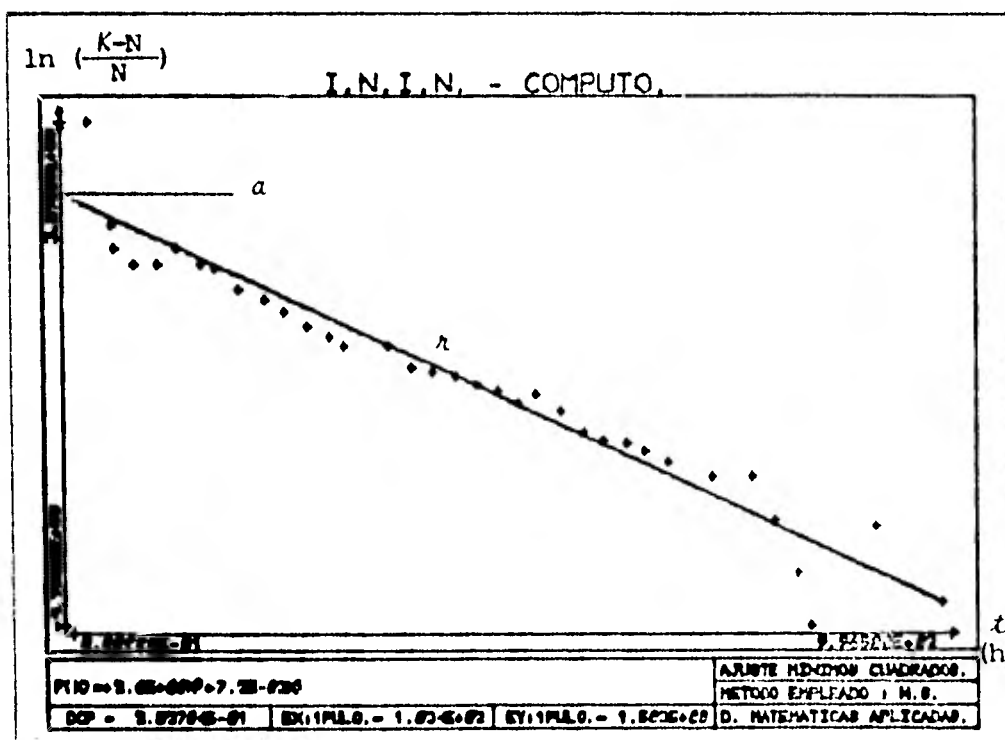


Fig. 5. Recta  $g(t)$  correspondiente al Crecimiento de *Rhodospirillum rubrum*.

Mediante variaciones y optimización en las condiciones de cultivo, hemos podido reducir el tiempo del mismo, obteniendo bacterias en fase logarítmica tardía, listas para su cosecha, hasta en 8 días.

Por medio de estos experimentos se ha logrado predecir y reproducir el momento de la curva de crecimiento de la bacteria *Rs. rubrum* donde existe buena actividad específica de la enzima  $H^+$ ATPasa. Sería interesante estudiar la actividad de la enzima a lo largo de la curva; sin embargo, como el objeto de esta tesis es tener una fuente de enzima que sea abundante y reproducible, no se hizo este estudio.

3.2. RECONSTITUCION DE LA ACTIVIDAD ATPasa A CROMATOFOROS DESPOJADOS DE ENZIMA.

El grado de restauración de la actividad ATPasa en los cromatóforos despojados de la enzima fue, claramente, función de la cantidad de extracto crudo añadido, como puede observarse en la Tabla 3. Al ir aumentando la cantidad de proteína, se fue incrementando proporcionalmente la actividad del cromatóforo despojado hasta que a cierta concentración, se llegó a la saturación. Esto se debe a que en el cromatóforo despojado de enzima, se van ocupando los sitios vacíos de la superficie de la membrana, que son receptores para la  $H^+$ ATPasa, hasta que todos ellos se ocupan observándose un máximo de actividad entre los 100 y 200  $\mu$ gr de proteína del extracto crudo.

Hemos observado, que este máximo puede ser, en algunos casos, una actividad mayor que la del cromatóforo al cual no se le ha removido la enzima. Esto es posible ya que durante la técnica de obtención de cromatóforos pueden desprenderse algunas  $H^+$ ATPasas, lo que permite superar su actividad en las reconstituciones.

Con el objeto de saber la cantidad adecuada de enzima añadida a los cromatóforos para optimizar las reconstituciones, graficamos la actividad total entre los mgs de proteína añadida, contra los  $\mu$ gr de extracto de enzima (fig. 6). En la gráfica obtenida, la cima representa la máxima actividad con el mínimo de proteína añadida. La cantidad de proteína que corresponde a este máximo es la que se utilizó

Tabla 3. Reconstitución de la Actividad ATPasa de Cromatóforos despojados de enzima.

Extracto de Enzima ATPasa µg de prot añadida	--	50	100	200	300	600
Actividad Específica µmoles de Pi/h/mg BCl	19.7	32.6	46.9	48.9	39.8	46.9

Las condiciones de ensayo fueron: En un volumen final de 0.25 ml de Tris-acetato 50 mM, KCl 60 mM, pH8, se incubaron por 1 hr: Cromatóforos despojados de enzima equivalentes a 50 µg de BCl, Extracto Crudo de la enzima en las cantidades mencionadas en la Tabla y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. La incubación se llevó a cabo en la oscuridad y a la temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió el medio para medir actividad ATPasa. La actividad se midió en un medio que contenía tris-acetato 50 mM, KCl 60 mM pH 8; 3 mM de MgCl<sub>2</sub> PEP 1.45 mM; 7 µg de PK y 3 mM de ATP, durante 10 min parando la reacción con TCA 6% de concentración final.

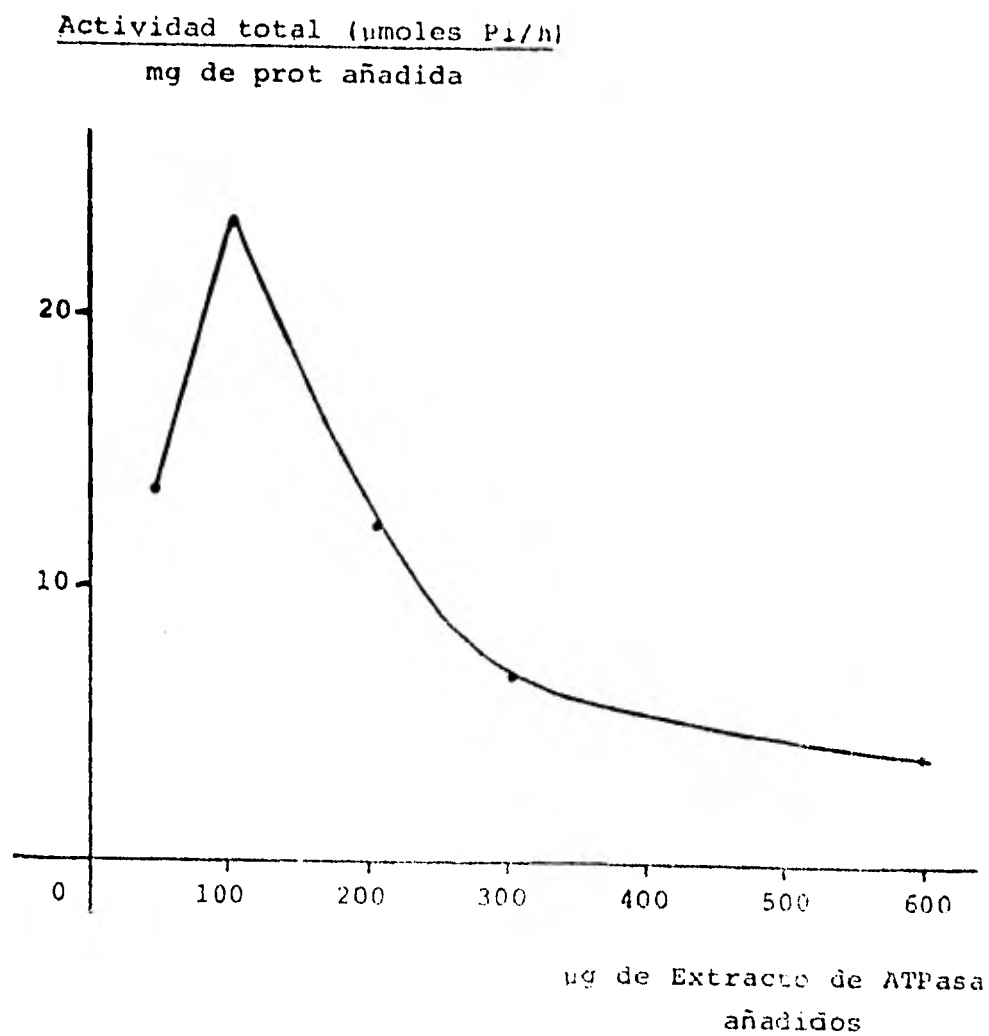


Fig. 6. Reconstituci $\tilde{o}$ n de la Actividad ATPasa de Cromat $\tilde{o}$ foros despojados de Enzima.  
Se utilizaron para elaborar esta gr $\tilde{a}$ fica los datos de la Tabla 3.

para hacer las subsiguientes reconstituciones.

Con estos experimentos se trató de caracterizar la reconstitución de la  $H^+$ ATPasa de *Rhodospirillum rubrum*; ya que como se ha visto, la enzima no es activa en el extracto crudo que se obtiene al solubilizarla. Esto puede deberse a una propiedad alotópica de la enzima; o a que el inhibidor natural de la  $H^+$ ATPasa está en su sitio inhibitorio en la enzima soluble y sólo parcialmente, en la membrana. De tal manera, estos experimentos de reconstitución nos sirvieron para determinar la actividad de la enzima soluble, que bajo otras condiciones no es posible hacerlo.

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSION DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS.

Posterior a la demostración de la existencia de actividad ATPasa "críptica" en la enzima soluble, deducible de los experimentos de reconstitución, se procedió a someter al extracto crudo y a los cromatóforos a diferentes tratamientos que han sido utilizados en partículas submitocondriales y cloroplastos, como índice de la existencia de un inhibidor natural.

#### 3.3.1. Tratamiento del Cromatóforo y del Extracto crudo de la Enzima con Tripsina.

Se sabe que el inhibidor natural de la  $H^+$ ATPasa de mitocondria y cloroplasto se hidroliza preferentemente al resto de las subunidades de la enzima cuando se trata con tripsina (51y 54), lo cual produce una estimulación de la actividad. Esto se ha interpretado como evidencia de la existencia del inhibidor.

Gepshtein y Carmeli, en 1974 (47), observaron activación de la  $H^+$ ATPasa dependiente de  $Ca^{+2}$  o de  $Mg^{+2}$  por digestión con tripsina de la bacteria fotosintética *Chromatium*. En cambio, el tratamiento con tripsina de *Rhodopseudomonas capsulata*, de la familia Rhodospirillaceae, misma a la que pertenece *Rhodospirillum rubrum*, sólo activa ligeramente.

Debe hacerse notar, sin embargo, que en los cromatóforos de *Rps. capsulata*, la  $H^+$ ATPasa está considerablemente más activa que en la membrana de *Chromatium*.

El experimento de la Tabla 4 muestra la inactivación de



Tabla 4. Efecto de diferentes concentraciones de Tripsina sobre la Actividad ATPasa de Cromat6foros.

Tripsina ( $\mu$ g)	--	50	250	500
Actividad Especflica del Cromat6foro $\mu$ moles Pi/h/mg BCl	35.0	5.5	5.9	9.0

En un volumen final de 1 ml de Tris-acetato 50 mM, KCl 60 mM, pH 8, se incubaron durante 1 hr a 25°C, cromat6foros correspondientes a 50  $\mu$ g de BCl y distintas concentraciones de tripsina disuelta en 1 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La reacci6n se detuvo con Inhibidor de Tripsina en una concentraci6n 5 veces mayor a la usada de tripsina. y se midi6 la actividad ATPasa, en las condiciones especificadas en la Tabla 3.

la  $H^+$ ATPasa de cromatóforos de *Rs. rubrum*, al ser sometidos a diferentes concentraciones de tripsina, durante 1 hr de preincubación. Este efecto inactivante se observa aun en concentraciones bajas de tripsina, ya que 50  $\mu$ gr producen 85% de inactivación.

Buscando una estimulación de la actividad, se llevó a cabo otro experimento en el que se trataron a los cromatóforos y al extracto crudo con 50  $\mu$ gr de tripsina a tiempos cortos de incubación. Los resultados se muestran gráficamente en la figura 7.

La ligera estimulación observada en la figura 7 a 3 min de incubación, en cromatóforos, no resultó significativa en los cinco experimentos individuales; de los cuales, se presenta en la gráfica un promedio.

A partir de los 3 min, los cromatóforos muestran un decremento casi lineal de la actividad, mientras que en el extracto crudo de la enzima, no se observa decremento, ni incremento.

En resumen, la imposibilidad de encontrar una activación por tripsina en las condiciones experimentales empleadas, podría ser una indicación de la ausencia de proteína inhibidora en las bacterias fotosintéticas de la familia Rhodospirillaceae; sin embargo, también podría concluirse que se trata de una resistencia a la tripsina de la proteína inhibidora.

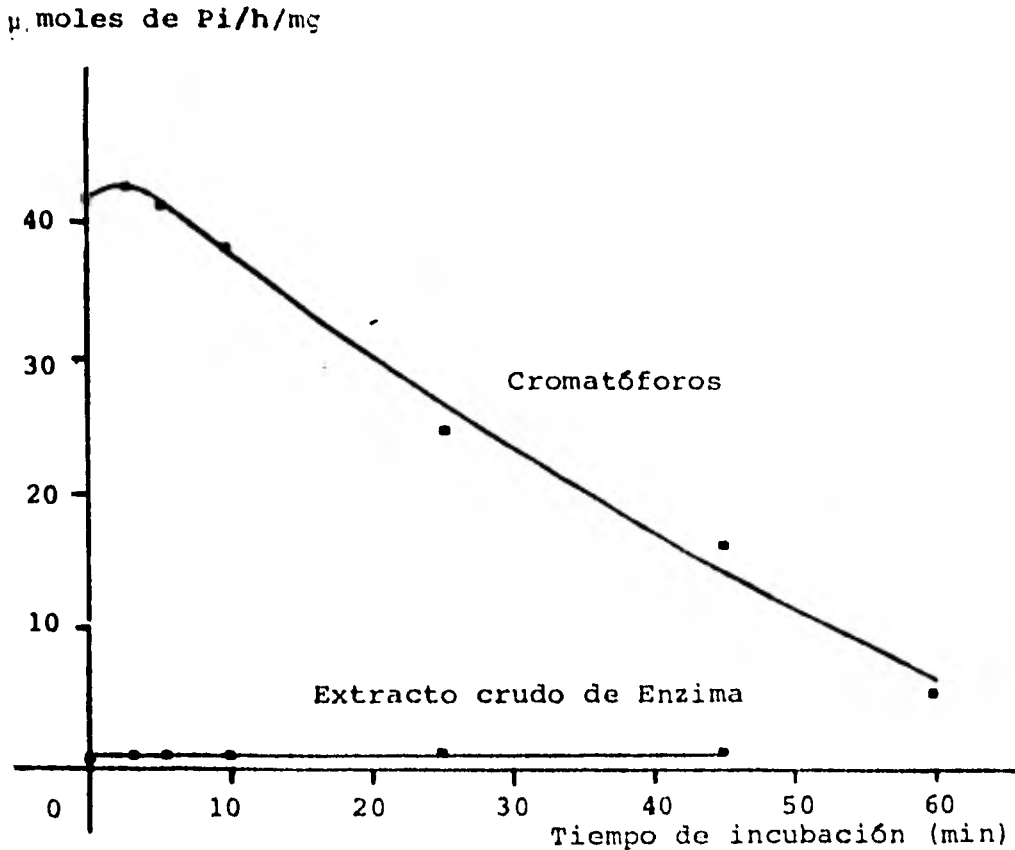


Fig. 7. Efecto de la Tripsina sobre la Actividad ATPasa del Cromatóforo y del Extracto Crudo de Enzima.

Las condiciones del experimento fueron las mismas que las especificadas en la Tabla 4, empleando 50  $\mu$ g de tripsina e incubando la mezcla por los tiempos especificados en la Tabla. Los datos son promedio de 5 experimentos.

### 3.3.2. Tratamiento de Cromatóforos a Través de una Columna de Sephadex G-50.

Otro índice de la existencia de la proteína inhibidora de la  $H^+$ ATPasa es la activación que se observa al pasar partículas submitocondriales de corazón de res por una columna de Sephadex G-50 (55). Este tratamiento no es un método de purificación del inhibidor, ya que éste no se adhiere o se retrasa en la columna de la resina y, la activación se debe, probablemente, a un cambio de sitio del inhibidor dentro de la enzima, pero no a la salida de ella.

Siguiendo este criterio se realizó el experimento ilustrado en la Tabla 5, en la que se observa un aumento de la actividad ATPásica de aproximadamente un 40% al pasar por una columna de Sephadex. Esta activación, si se compara con la obtenida en partículas mitocondriales, resulta baja; lo cual podría explicarse por el hecho de que la  $H^+$ ATPasa en el cromatóforo de *Rhodospirillum rubrum* está ya parcialmente activada en la preparación. Esto se comprueba si llevamos la actividad de la  $H^+$ ATPasa a lo máximo midiéndola con DNP. De esta forma, al pasar los cromatóforos por Sephadex, se obtiene una estimulación menor que la alcanzada sin desacoplante.

Por otro lado, en datos no publicados del grupo de los profesores Baltscheffsky (comunicación personal), utilizando cromatóforos de *Rs. rubrum*, no se encontró estimulación de la actividad por tratamientos con tripsina o a través del paso de una columna de Sephadex, por lo cual éste sería el primer caso de activación observada en *Rs. rubrum* por el paso a traá

Tabla 5. Estimulación de la Actividad ATPasa de Cromatóforos por el paso a través de una Columna de Sephadex.

	Antes de Columna	Después de Columna	
	Actividad Específica μmoles Pi/h/mg BCl	Activ. Específica μmoles Pi/h/mg BCl	%Activación
- DNP	89.9	125.2	39.2
+ DNP	140.9	157.9	12.0

Condiciones de ensayo: 5 mg de prot de cromatóforos resuspendidos en 20 ml de buffer de glicilglicina 10 mM, KCl 100 mM pH 8; fueron aplicados a una columna de Sephadex G-50 grueso ( 1.10 m x 2.4 cm) equilibrada con el mismo buffer. Las fracciones colectadas que contenían a los cromatóforos se centrifugaron a 100 000 x g y se resuspendieron en buffer de glicilglicina 10 mM pH 8. Finalmente se les midió su actividad ATPasa en las condiciones especificadas en la Tabla 3. El DNP se empleó en una concentración de 1 mM.

vés de una columna de Sephadex.

### 3.3.3. Tratamiento del Extracto Crudo de la Enzima con Frío.

Las  $H^+$ ATPasas no particuladas de mitocondrias son inactivadas a bajas temperaturas, pero este efecto es contrarrestado por la presencia de la proteína inhibidora (56 y 57). Esta propiedad fue tomada en cuenta en el diseño del experimento ilustrado en la Tabla 6, en el que se midió la estabilidad al frío de la enzima solubilizada de cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*.

En el experimento A, se midió la actividad de la enzima en el extracto crudo a 25°C y mantenido durante 24 hr a 4°C, observándose que la actividad permanece estable a bajas temperaturas y es capaz de reconstituir la actividad de cromatóforos despojados de enzima, aun en condiciones de congelación a -30°C, como se ilustra en el experimento B de la misma Tabla.

Para cerciorarse de que la actividad reconstituida correspondía a la  $H^+$ ATPasa unida a la membrana y no a otras fosfatasas o pirofosfatasas que existen en la membrana, se midió la sensibilidad de la enzima a oligomicina, encontrándose que un alto porcentaje de la actividad reconstituida es sensible a ella.

De los resultados obtenidos es posible concluir que, de acuerdo a lo observado en otros sistemas, probablemente, el inhibidor de la  $H^+$ ATPasa en el extracto crudo proteja a la enzima de la inactivación por frío. Esto se podrá corroborar en el futuro, midiendo la sensibilidad de la  $H^+$ ATPasa al

Tabla 6. Estabilidad al Frío del Extracto crudo de Enzima.

A.	
	$\mu$ moles Pi/h/mg Prot
Extracto Crudo a 25°C	1.6
Extracto Crudo 24 h a 4°C	1.5

B.		
Reconstituciones		
	$\mu$ moles de Pi/h/mg BCl	
	-Oligomicina	+ Oligomicina
Cromatóforo	39.2	16.8
Crom. despojado de enzima	14.2	6.4
Crom. despojado + Extracto crudo 72 h 4°C	33.6	12.5
Crom. despojado + Extracto crudo congelado	32.7	8.6

El extracto crudo se mantuvo a 4°C en fracciones de 2 ml o se sometió a congelación en el congelador REVCO a -30°C por 24 y 72 h. Las reconstituciones se hicieron con 50  $\mu$ g de BCl de cromatóforos y 100  $\mu$ gr de extracto crudo enfriado a 4°C o congelado. La determinación de ATPasa se hizo en las mismas condiciones especificadas en la Tabla 3.



frío, en los diferentes estados de purificación.

### 3.3.4. Tratamiento de los Cromatóforos con Extractos de Urea.

El inhibidor de mitocondrias y cloroplastos es estable a la desnaturalización por concentraciones altas de urea (51), por lo que es posible medir la actividad inhibitoria del extracto de la enzima en urea, sobre la  $F_1$  normal.

En el experimento ilustrado en la Tabla 7 se utilizó un extracto crudo de enzima en 7 M de urea, inactivado en un 58%, como fuente de la proteína inhibidora. Este extracto se adicionó a los cromatóforos normales de *Rhodospirillum rubrum* en una concentración de 0.35 M y se incubó por variables períodos de tiempo.

Para medir el posible efecto de la urea se hicieron controles de cromatóforos tratados con la concentración de urea equivalente a la adicionada de extracto en urea e incubándolos en la misma forma.

Los resultados obtenidos muestran que la urea produce una activación de los cromatóforos y que la adición del extracto crudo en urea no produjo inhibición.

La Tabla 8 ilustra el efecto de diferentes concentraciones de extracto de urea 7 M, en la que se observa la activación por urea reportada en la Tabla anterior, y ningún efecto inhibitorio del extracto de urea.

En un intento de explicar los datos anteriores, es posible pensar que los resultados negativos pueden deberse a la ausencia de proteína inhibidora en el extracto crudo de urea o, a que, en las condiciones del ensayo, pueden exis-

**Tabla 7. Efecto de los Extractos de Enzima en Urea 7 M sobre la Actividad ATPasa del Cromatóforo.**

<b>A.</b>		<b>Actividad Especifica</b>	
		$\mu$ moles Pi/h/mg Prot	
Extracto Crudo .....		1.6	
Extracto Crudo tratado con Urea 7M..		0.6	
<b>B.</b>		<b>Actividad Especifica</b>	
		$\mu$ moles de Pi/h/mg BCl	
<b>Cromatóforos:</b>	Control	+ Urea [0.35 M]	+ Extracto crudo en Urea [0.35 M]
<b>Tiempo (min)</b>			
5	69.7	74.6	87.2
18		66.7	69.7
30		101.8	103.7
60	69.7	81.3	76.1

En el experimento A: A 3 ml del extracto crudo de enzima se les añadió urea sólida a una concentración final de 7 M y se dejó incubar durante 6 hrs a 25°C

En el Experimento B: A cromatóforos equivalentes a 50  $\mu$ g de BCl, se les añadió 100  $\mu$ g de extracto crudo en urea y a los controles de urea se les añadió la cantidad equivalente de ésta. Todos fueron incubados a 25°C en 0.25 ml de Tris-acetato 50mM KCl 60mM pH 8, en los tiempos señalados en la Tabla, al término de los cuales se midió la Actividad ATPasa en las condiciones dadas en Tabla 3.

Tabla 8. Efecto de los Extractos de enzima en Urea 7 M sobre la Actividad ATPasa del Cromatóforo.

A.		Actividad Especifica μ moles Pi/h/mg Prot
Extracto Crudo .....		1.6
Extracto crudo en Urea 7 M .....		0.6

B.		Actividad Especifica μ moles Pi/h/ mg BCl
Cromatóforos:	+ Urea	+ Extracto Crudo en Urea
Urea		
--	53.0	--
0.35 M	67.0	65.5
0.7 M	66.6	66.3
1.75 M	63.6	70.1

En las condiciones del experimento A se usó el extracto crudo tratado en las mismas condiciones de la Tabla 7. En el experimento B, se añadieron diferentes concentraciones de Extracto crudo en urea con sus respectivos controles de urea a concentraciones equivalentes. La mezcla se incubó durante 40 min y se procedió de la misma manera que en la Tabla 8

tir factores que enmascaren la posible actividad inhibitoria del extracto como:

- a) El hecho de que el extracto de urea tenga actividad ATPasa residual, la cual puede contribuir a aumentar la Actividad en los cromatóforos mediante reconstitución; y
- b) La alta concentración de urea en el medio que puede ser desfavorable para la interacción de la proteína inhibidora con el sitio inhibitorio de la  $H^+$ ATPasa, ya que es sabido que las sales inhiben la interacción del inhibidor con la  $F_1$ .

En el experimento de la Tabla 9 se trató de disminuir al máximo la actividad residual. Para esto, se aumentó la concentración de urea del extracto a 10 M, provocando la inactivación de la enzima en un 77%. La adición del extracto de urea a diferentes concentraciones no produjo, nuevamente, algún efecto inhibitorio.

En conclusión, los resultados negativos obtenidos hasta ahora no excluyen totalmente, en las condiciones experimentales empleadas, la presencia de una proteína inhibidora en el extracto crudo de la enzima; y es importante hacer notar que la activación de los cromatóforos por urea, podría ser un indicio de disociación de una proteína inhibidora.

Tabla 9. Efecto de los Extractos de Enzima en Urea 10 M sobre la Actividad ATPasa de cromatóforos.

<b>A.</b>		<b>Actividad Especifica</b>	
		$\mu$ moles Pi/h/mg Prot	
Extracto Crudo	.....	0.97	
Extracto crudo tratado con Urea 10M...		0.22	
<b>B.</b>		<b>Actividad Especifica</b>	
		$\mu$ moles Pi/h/mg BCl	
<b>Cromatóforos:</b>	<b>+ Urea</b>	<b>+ Extracto Crudo en Urea</b>	
urea			
--	36.4	--	
0.25 M	76.8	63.3	
0.5 M	62.4	72.9	
1.0 M	78.2	79.2	

En el experimento A, el extracto crudo se llevó con urea sólida, a una concentración final de 10 M y se incubó por 6 hrs a 25°C.

En el experimento B, se utilizaron diferentes concentraciones del extracto en urea además de los controles de urea correspondientes y se incubaron durante 30 min. La determinación de la actividad ATPasa se hizo como en la Tabla 7.

### 3.3.5. Tratamiento del Extracto Crudo de la Enzima con Calor.

El último criterio empleado para dilucidar la presencia del inhibidor en el extracto crudo, está basado en la activación de la  $H^+$ ATPasa de mitocondria y cloroplasto (58 y 59) por desplazamiento de la protefna inhibidora mediante un tratamiento con calor.

En el experimento ilustrado en la Tabla 10 se observó, utilizando un criterio indirecto como lo es la reconstitución, que el someter a 75°C al extracto crudo por períodos variables de tiempo produce activación de la enzima midiéndola en reconstitución. Como puede verse en la tabla hay un aumento gradual en la actividad de la enzima con el tiempo de calentamiento, hasta llegar a un máximo a los 5 min.

Sin embargo, cuando se midió la actividad del extracto crudo calentado no se pudo detectar activación.

En algunos experimentos llevados a cabo reconstituyendo con enzima calentada no se encontró activación, esto pudo deberse a que las actividades basales de reconstitución fueron muy altas.

Cabe hacer notar que en otros sistemas, la temperatura a la que se ha encontrado activación de la enzima, por movilización del inhibidor, es de 62 a 64°C y, en nuestro caso, a estas temperaturas no se encontró activación.

Tabla 10. Efecto del Calentamiento a 75°C de la Enzima Soluble sobre la Actividad ATPasa de Cromatóforos reconstituidos.

	Actividad Específica					
	µmoles Pi/h/mg					
Tiempo de calentamiento	0	2'	3'	4'	5'	10'
Extracto Crudo	1.2	-	-	-	0.8	-
Cromatóforo	43.6					
Crom. despojado de enzima	22.0					
Crom. + 100 µg de Extracto crudo	35.7	42.7	37.8	52.2	64.8	40
‡ Estimulación de la Actividad ATPasa.	--	11.9	5.8	46.2	81.5	12.0

Condiciones de Ensayo: Se calienta al extracto que contiene a la enzima a una temperatura de 75°C durante diferentes tiempos y, transcurridos estos, se enfría a 20°C y se toman alícuotas de 100 µg para medir la actividad ATPasa en el Soluble y reconstituida en cromatóforos despojados de la enzima, bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.



## CONCLUSION

Los resultados de este trabajo nos han permitido acumular evidencias que favorecen la existencia de una proteína inhibidora de la  $H^+$ ATPasa de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*:

- 1° La actividad ATPasa del extracto crudo es "críptica" y sólo demostrable en experimentos de reconstitución.
- 2° La actividad ATPasa en el extracto crudo es estable a bajas temperaturas.
- 3° La actividad ATPasa de los cromatóforos se ve estimulada al pasarlos a través de una columna de Sephadex.
- 4° La actividad ATPasa del extracto crudo de la enzima se activa por calor.
- 5° La actividad ATPasa en el cromatóforo se estimula por la adición de urea, este criterio podría sugerir la existencia del inhibidor; sin embargo, no se tienen reportes del mismo comportamiento en otros sistemas ya bien caracterizados.

Por otro lado, hubo experimentos que no prueban de una manera definitiva la presencia de una proteína inhibidora; como fue la imposibilidad de demostrar activación en el tratamiento con tripsina, y el no haber logrado inhibición de la actividad del cromatóforo con extractos de enzima en urea.

A pesar de que los resultados experimentales obtenidos en este trabajo aportan solamente datos indirectos, con los cuales es difícil llegar a una conclusión definida, las evidencias obtenidas en el trabajo aunadas a los antecedentes, nos permiten sugerir la existencia de una proteína inhibidora de la  $H^+$ ATPasa de bacterias fotosintéticas, lo cual hablaría, una vez más, de la universalidad estructural y funcional de las  $H^+$ ATPasas de diversos orígenes.

Así, el trabajo futuro está encaminado a tratar de purificar a la  $H^+$ ATPasa por los métodos convencionales y se intentará probar de una manera más directa la existencia de la proteína inhibidora. Por lo que, el primer paso para lograr esto, será tratando de purificarla usando los métodos que se conocen para inhibidores ya caracterizados.

## BIBLIOGRAFIA

1. Baccarini-Melandri, A. y Melandri, B.A., 1978, Coupling factors, en: *The Photosynthetic Bacteria* (Editores: R. K. Clayton y W. R. Sistrom), pp. 3-36 y 615-625, Plenum Press New York and London.
2. Van Niel, C.B., 1935, Photosynthesis of bacteria, *Harbor Symp. Quant. Biol.* 3:138-150.
3. Pfennig, N., y Trüper, H.G., 1971, Higher taxa of the phototrophic bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21: 17.
4. Pfennig, N., y Trüper, H.G., 1974, The phototrophic bacteria en: *Bergey's Manual of Determinative bacteriology*, 8th Ed. (Editores: R.E. Buchanan y N.E. Gibbons), pp. 24-64, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
5. Trüper, H.G., 1976, Higher taxa of the phototrophic bacteria: *Chloroflexaceae* fam. nov., a family for the gliding, filamentous, phototrophic "green" bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26:74
6. Crofts, A.R., 1974, The electron transport system as a pump in the photosynthetic bacteria, en: *Perspectives in Membrane Biology*. (Editores: S. Estrada y C. Gitler), pp. 373-412, Academic Press New York, San Francisco y London.
7. Karunairatnam, M.C., Spizizen, J. y Gest, H., 1958, Preparations and properties of protoplasts of

*Rhodospirillum rubrum*, *Biochim. Biophys. Acta*  
29: 649.

8. Schachmann, H.K., Pardee, A.S. y Stanier, R.Y., 1952, Studies on the macromolecular organization of microbial cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 38:245-260
9. Newton, J.W., y Newton, G.A., 1957, Comprehension of the photoactive subcelular particles form *Chromatium* *Arch. Biochem. Biophys.* 71:250-265.
10. Mitchell, P., 1967, Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, cloroplasts and bacteria: Natural Fuel cells and solar cells, *Fed. Proc.* 26: 1370-1379.
11. Scholes, P., Mitchell, P. y Moyle, J., 1969, The polarity of proton translocation in some photosynthetic microorganisms, *Eur. J. Biochem.* 8: 450-454.
12. Hinkle, P.C. y Mc. Carty, R.E., 1978, How cells make ATP, *Sci. Am.* 20: 58-75
13. Frenkel, A.W., 1954, Light induced phosphorylation by cell-free preparation of photosynthetic bacteria *J. Am. Chem. Soc.* 76: 5568-5569.
14. Slater, E.C., 1971, The coupling between energy-yielding and energy-utilizing reacciones in mitochondria, *Q. Rev. Biophys.* 4: 35-71
15. Mitchell, P., 1961, Coupling of Phosphorylation to electron and hidrogen transfer by the Chemiosmotic type Mechanism, *Nature* 191: 144-148.

16. Harold, F.M., 1972, Conservation and transformation of energy by bacterial membranes, *Bacteriological Rev.* 36: 172-230.
17. Boyer, P.D., 1965, *Oxidases and Related Redox Systems* Vol. II, (Editores: T.E. King, H.S. Mason y M. Harrison) p. 994 Willey, New York.
18. Senior, A.E., 1973, The structure of mitochondrial ATPase, *Biochim. Biophys. Acta.* 301:249-277
19. Tuena de Gómez Puyou, M. y Gómez Puyou, A., 1981, Componentes estructurales del complejo de la ATP sintetasa y su función integrada, en *Temas Selectos de Fisiología Celular*. (Editores: A. Peña, R. Druker-Colin y R. Tapia). pp. 1-12 UNAM México.
20. Racker, E., 1976, *A new look at mechanisms in Bioenergetics*. Academic Press, p. 197 U.S.A.
21. Racker, E., 1970, Function and structure of the inner Membrane of Mitochondria and Chloroplast en: *Membranes of mitochondrial and chloroplasts* (Editores: E. Racker) p.p. 127-171, Van Nostrand Reinhold, New York.
22. Baccarini-Melandri, A., Gest, H., y San Pietro, A., 1970, A coupling factor in Bacterial Photophosphorylation., *J. Biol. Chem.* 245: 1224.
23. Johansson, B.C., 1972, A coupling factor from *Rs. rubrum* chromatophores, *FEBS Lett.* 20: 339-340.
24. Saphon, S., Jackson, J.B. y Witt, H.T., 1975, Electrical potential changes,  $H^+$  translocation and phospho

- rylation induced by short flash excitation in *Rhodospseudomonas sphaeroides* chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta* 408: 67
25. Hochman, A. y Carmeli, C., 1971, A coupling factor from *Chromatium* strain D chromatophores, *FEBS Lett.* 13: 36.
26. Melandri, B.A., Baccarini-Melandri, A., San Pietro, A. y Gest, H., 1971. Interchangeability of Phosphorylation coupling factors in Photosynthetic and respiratory energy conversion. *Science* 174: 514-516.
27. Löw, H., y Afzelius, 1964, Subunits of the chromatophores membranes in *Rs. rubrum*, *Exp. Cell Res.*, 35: 432
28. Reed, D.W. y Raveed. D., 1972, Some properties of the ATPase from chromatophores of *Rps. sphaeroides* and its structural relationship to the bacterial chlorophyll proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 282: 79
29. Fisher, R.R. y Guillory, R.J., 1969, Partial resolution of energy linked reactions in *Rs. rubrum* chromatophores, *FEBS Lett.* 3: 27.
30. Gromet-Elhanan, Z., 1974, Role of photophosphorylation coupling factor in energy conversion by depleted chromatophores of *Rs rubrum*. *J. Biol. Chem.* 249: 2522.

31. Melandri, B.A., Fabbri, E., Firstater, E., y Baccarini-Melandri, A., 1974, Allotopic properties and energy dependent conformational changes of bacterial ATPase en: *Membrane proteins en transport and phosphorylation* (Editores: G.F. Azzone, M.E. Klingenberg, E. Quagliariello y N. Siliprandi) pp. 55-60, North Holland, Amsterdam.
32. Philosoph, S., Binder, A. y Gromet-Elhanan, Z., 1977, Couplig factor ATPase complex of *Rs. rubrum*. *J. Biol. Chem.* 252: 8747-8752
33. Baccarini-Melandri, A., y Melandri, B.A., 1971, Partial Resolution of the photophosphorylating system of *Rps. capsulata*, *Methods Enzymol.* 23: 556-561.
34. Webster, G.D., Edwards, P.A. y Jackson, J.B., 1977, Interconversion of two kinetically distinct sates of the membrane -bound and solubilised  $H^+$  translocating ATPase from *Rs. rubrum*. *FEBS Lett.* 76: 29-35.
35. Webster, G.D., y Jackson, J.B., 1978, Affinity chromatography of  $H^+$  translocating Adenosine Triphos~~ph~~atase isolated by chloroform extraction of *Rs. rubrum* chromatophores, *Biochim Biophys Acta* 503: 135-154.
36. Müller, H.W., Schm'tt, M., Schneider, E. y Dose, K., 1979, Immunological and reconstitution studies on the adenosine triphosphatase complex from

- Rs. rubrum*, *Biochim. Biophys. Acta* 545:77-85.
37. Schneider, E., Müller, H.W., Rittinghaus, K., Thiele, V., Schwulera, V. y Dose, K. 1979, Properties of the  $F_0F_1$  ATPase complex from *Rs. rubrum* chromatophores solubilized by Triton X-100, *J. Biochem.* 97: 511-517.
38. Oren, R., y Gromet-Elhanan, Z., 1979, Coupling factor ATPase complex of *Rs. rubrum*, *Biochim. Biophys. Acta* 548: 106-118.
39. Johansson, B.C., Baltscheffsky, M. y Baltscheffsky, H., 1973, Purification and properties of a coupling factor from *Rs. rubrum*, *Eur. J. Biochem.* 40: 109-117.
40. Berzborn, R.J., Johansson, B.C. y Baltscheffsky, M., 1975, Immunological and fluorescence studies with the coupling factor ATPase from *Rs. rubrum* *Biochim. Biophys. Acta* 396: 360-370.
41. Melandri, B.A., Baccarini-Melandri, A., Gest, H., y San Pietro, A., 1971, Studies on resolution of the photophosphorylating system of the photosynthetic bacterium *Rps. capsulata*, en: *Energy transduction in respiration and photosynthesis*. (Editores: E. Quagliariello, S. Papa y C.S. Rossi) pp. 593-608 Adriatica Editrice Bari, Italy.
42. Johansson, B.C., y Baltscheffsky, M., 1975, On the subunit composition of the coupling factor (ATPase) from *Rs. rubrum*. *FEBS Lett.* 53: 221-224.



43. Bose, S.K., y Gest, H., 1965, Properties of adenosine triphosphatase in a photosynthetic bacterium, *Biochim. Biophys. Acta* 96: 159.
44. Horio, T., Nishikawa, K., y Horiuti, Y., 1971, Adenosine triphosphatase: Bacterial, *Methods Enzymol.* 23: 650-654.
45. Melandri, B.A. y Baccarini-Melandri, A., 1972, Energy transduction in photosynthetic bacteria en: *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Congress on Photosynthesis.* (Editores: G. Forti, M. Avron, y B. A. Melandri) p.p. 1169-1183. The Hague.
46. Konings, A.N.T., y Guillory, R.J., 1973, Resolution of enzymes catalysing transhydrogenase. *J. Biol. Chem.* 248: 1045.
47. Gepshtein, A., y Carmeli C., 1974, Properties of adenosine triphosphatase in chromatophores and in coupling factor from the photosynthetic bacterium, *Chromatium D, Eur. J. Biochem* 44: 593-602.
48. Melandri, B.A., Baccarini-Melandri, A., y Fabbri, E., 1972, Energy transduction in photosynthetic bacteria. Light dependent ATPase in photosynthetic membranes from *Rps. capsulata*. *Biochim Biophys. Acta* 275: 383-394.
49. Baccarini-Melandri, A., Fabbri, E., Firstater. E., y Melandri, B.A., 1975, Energy transduction in photosynthetic bacteria. Inhibition of the cou

pling ATPase by N-ethylmaleimide related to the energized state of the membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 376: 72

50. Pedersen, P., Schwerzmann, K., y Cintron, N., 1981, Regulation of the synthesis and hydrolysis of ATP in Biological systems: Role of peptide inhibitors of the  $H^+$ ATPases, *Curr. Top. Bioenerg.* 2:149-199.
51. Nelson, N., Nelson, H. y Racker, E., 1972, Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. Purification and Properties of an inhibitor isolated from chloroplast coupling factor. *J. Biol. Chem.* 247: 7657-7662.
52. Pullman, H.E., y Monroy, G.C., 1963, A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.* 238: 3762-3769'
53. Harris, D.A., y Baltscheffsky, M., 1979, Bound nucleotides and phosphorylation in *Rs. rubrum*. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 86: 1248-1255 .
54. Leimbgruber, R.M. y Senior, A.E., 1976, Removal of  
° Tightly bound nucleotides from phosphorylating submitochondrial particles, *J. Biol. Chem.* 251: 7110-7113.
55. Horstman, L., y Racker, E., 1970, Partial resolution of enzymes catalyzing oxidative phosphorylation.  
22. Interaction between mitochondrial adenosine triphosphatase inhibitor and mitochondrial ade

- nosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 245: 1336-1344.
56. Pullman, M.E, Penefsky, H., Datta, A. y Racker, E., 1960, Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation (I) Purification and Properties of soluble DNP stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 235: 3322-3329.
57. Low, H. y Vailin, I., 1963, Succinate linked diphosphopyridine nucleotide reduction in submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta* 69:361-364.
58. Warshaw, J.B. Lam, K.W., Nagy, B., y Sanadi, D.R., 1968, Studies on oxidative phosphorylation. 15 Latent adenosine 5' triphosphatase activity of Factor A *Arch. Biochem. Biophys* 123:385-396.
59. Vambutas, V. y Racker, E., 1965, Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. I Stimulation of photophosphorylation by a preparation of a latent,  $Ca^{+2}$  dependent adenosine triphosphatase from Chloroplasts, *J. Biol. Chem.* 240:2660-1667.
60. Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.B, Stainer, R.Y., 1957, The kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell Comp. Physiol.* 49:29
61. Hutner, S.H., 1950, Anaerobic and aerobic growth of purple bacteria (Athiorhodaceae) in chemically defined media. *J. Gen. Microbiol.* 4: 286-293.

62. Sumner, J.B., 1944, A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* 100:413-415.
63. Clayton, R.K., 1963, Toward isolation of a photochemically Reaction Center in *Rps. sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta*, 75:312.
64. Laskowski, M., 1955, Trypsinogen and Trypsin, *Methods Enzymol.* 2: 26-36.
65. Anson, M.L., y Mirsky, A.E., 1933, The estimation of trypsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 17: 151-157.
66. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randal, R.J. 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
67. Krebs, CH.J. 1978, *Ecology*, (Editores: Smith J.K. y Castellano, E.) pp. 184-193. Harper & Row. New York
68. Bevington, P.R., 1969, *Data reduction and error analysis for the Physical sciences*. p.336, Mc Graw Hill New York.
69. Stewart, G.W., 1973, *Introduction to Matrix computations* p. 441, Academic Press, USA.
70. Moré J.J., 1977, *The Levenberg-Marquardt Algorithm, Implementation and Theory*. Por aparecer en los Proceedings of the Conference Dundee on Numerical Analysis. pp. 1 -12.
71. Moyle, J., Mitchell, R. y Mitchell, P., 1972, Proton translocating Pyrophosphatase of *Rs. rubrum*. *FEBS Lett.* 23: 233-236.

72. Randahl, H., 1979, Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in *Rs. rubrum*. *Eur. J. Biochem.* 102: 251-256.