

03062 16
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA [

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y
HUMANIDADES

**EL Mg²⁺ LIBRE ES UN ACTIVADOR ESENCIAL DE LA
CINETICA DE HIDROLISIS DE LA PIROFOSFATASA
DE MEMBRANA DE LA BACTERIA FOTOSINTETICA
Rhodospirillum rubrum.**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE SUSTENTA EL BIOLOGO
ALEJANDRO SOSA PEINADO

PARA OBTENER EL GRADO DE:
M. EN C. EN I.B.B. DEL AREA BIOQUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

RESUMEN	3
ABREVIATURAS	4
CAPITULO I. INTRODUCCION	5
I.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LA FOTOSINTESIS EN BACTERIAS	5
I.1.1. TAXONOMIA DE LAS BACTERIAS FOTOSINTETICAS.....	6
I.1.2. BACTERIAS FOTOSINTETICAS RHODOSPIRILLALES.....	9
I.1.3. DESCRIPCION DE <u>Rhodospirillum rubrum</u>	9
I.2. TRANSFORMACIONES DE ENERGIA EN MEMBRANAS.....	12
I.3. ESTRUCTURA DEL PPI Y PROPIEDADES GENERALES DE LAS PIROFOSFATASAS.....	15
I.4. PIROFOSFATASA, PROPIEDADES GENERALES.....	17
I.4.1. PIROFOSFATASA DE MEMBRANA DE <u>Rhodospirillum rubrum</u>	19
I.5. OBJETIVOS.....	27
CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS	28
II.1. CULTIVO DE BACTERIAS	28
II.1.2. SIEMBRA DE BACTERIAS.....	30
II.1.3. COSECHA DE BACTERIAS.....	31
II.2. OBTENCION DE CROMATOFOROS.....	31
II.3. DETERMINACION DE PROTEINA.....	32
II.3.1. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HCl.....	34
II.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA.....	34
II.5. CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS METALES, LIGANDOS Y COMPLEJOS PRESENTES EN EL MEDIO DE REACCION.....	35
II.6. MODIFICACION DEL POTENCIAL DE SUPERFICIE DE LOS CROMATOFOROS.....	37
II.7. ESTIMACION DEL POTENCIAL DE SUPERFICIE DE LOS CROMATOFOROS.....	39
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION	41
III.1. CONDICIONES PRELIMINARES	41
III.2. EFECTO DEL MAGNESIO LIBRE SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA	42
III.3 EFECTO DEL Mg²⁺ LIBRE EN LA HIDROLISIS DEL COMPLEJO MgPPI	44
III.3.1 EFECTO DEL SUSTRATO (Mg-PPI) EN LA ACTIVACION DEBIDA AL Mg ²⁺ LIBRE.....	46
III.4. ESTUDIOS CON INHIBIDORES COMPETITIVOS DEL SUSTRATO Y DEL ACTIVADOR PARA EVIDENCIAR EL MECANISMO CINETICO DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA	52
III.5. PAPEL DEL PPI LIBRE EN EL MECANISMO DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA	58
III.5.1. DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE INHIBICION PARA EL PPI LIBRE.....	62
III.6. EFECTO DE POTENCIAL DE SUPERFICIE SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA	66
III.6.1 FUSION DE LIPOSOMAS CON CROMATOFOROS DE LA BACTERIA <u>Rhodospirillum rubrum</u>	67
III.6.2. ESTIMACION DE LA MODIFICACION DEL POTENCIAL DE SUPERFICIE EN LOS CROMATOFOROS FUSIONADOS CON LIPOSOMAS.....	72
III.6.3 MODIFICACION DEL POTENCIAL DE SUPERFICIE DEL CROMATOFORO CON DETERGENTES ANIONICOS O CATIONICOS.....	76
III.7. ESTIMACION DE LA MODIFICACION DEL POTENCIAL DE SUPERFICIE EN LAS DIFERENTES PREPARACIONES DE MEMBRANA	76

CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	81
BIBLIOGRAFIA.....	84

RESUMEN.

El sustrato real de la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa de membrana es el complejo Mg-PPi. El Mg^{2+} libre es un activador esencial de la reacción, ya que la enzima no presenta actividad cuando la concentración de Mg^{2+} libre es menor de $10 \mu M$, a pesar de que la concentración del sustrato es 0.5 mM . La K_m para el sustrato disminuye al aumentar la concentración del activador esencial, produciendo un aumento en la afinidad para el sustrato. Asimismo, la K_m para el Mg^{2+} libre cambia con la concentración del sustrato. Los estudios cinéticos en equilibrio rápido sugieren que el complejo catalítico es ternario: Enzima-(Mg)-(Mg-PPi), con un mecanismo ordenado para la formación del complejo, en donde el Mg^{2+} libre interactúa antes que el Mg-PPi (sustrato) con la enzima. Estudios con inhibidores competitivos sugieren un mecanismo ordenado, aunque se discute si el mecanismo es equilibrio rápido o estado estacionario.

Con el fin de conocer si el potencial de superficie ejerce un efecto en la afinidad de la enzima por el sustrato, se utilizaron dos métodos para modificar la carga de superficie de los cromatóforos: fusión de liposomas con cromatóforos e incorporación de detergentes aniónicos o catiónicos a los cromatóforos. Se encontró que la modificación del potencial de superficie no ejerce efecto sobre la cinética de hidrólisis y se discute que la distancia desde el sitio activo de la enzima a la superficie de la membrana del cromatóforo podría explicar esta ausencia del efecto.

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina.
ANS	Anilino Naftaleno Sulfonato.
ATP	Trifosfato de adenosina.
BCL	Bacterioclorofila.
BSA	Albúmina de suero de bovino.
CCCC	p-triclorometoxi carbonil-cianuro-fenilhidrazona.
Cl	Clorofila.
CTAB	Cetil Trimetil Amonio.
DCCD	Diciclohexil carbodiimida.
2,6 DCP	2-6 Diclorofenol indofenol.
DEAE	Dietil amino etil.
DTT	Ditiotreitól.
DTE	Ditioeritrol.
EDTA	Acido etilén diamino tetracético.
EGTA	Acido etilénglicol bis (amino-etil-eter) NN' tetracético.
FCCP	p-trifluorometoxi carbonil-cianuro fenilhidrazona.
fpm	Fuerza protón motriz.
IDP	Imidodifosfato.
MalNET	N-etil maleimida.
MDP	Metilén difosfonato.
MOPS	Acido morfolino propano sulfónico.
NBF-Cl	4-cloro 3 nitrobenzo-trifluoruro.
PEP	Fosfoenol piruvato.
Pi	Fosfato.
³² Pi	Fosfato radioactivo.
PPI	Pirofosfato inorgánico.
PPIasa	Pirofosfatasa.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TCA	Acido tricloroacético.
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano.
UQ ₁₀	Ubiquinona 10.

CAPITULO I.

INTRODUCCIÓN

I.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA FOTOSÍNTESIS EN BACTERIAS.

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



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



En esta reacción no existe liberación de oxígeno molecular y el agua es reemplazada por otros reductores como el S_2 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, H_2S o el hidrógeno molecular. Asimismo, algunas bacterias fotosintéticas pueden reemplazar tanto al agua como a los compuestos de azufre, por compuestos orgánicos, tales como el malato, succinato, β -hidroxibutirato, etc. (Gottschalk, 1986).

Los procesos que intervienen desde la fotosíntesis hasta la síntesis de ATP, están comprendidos en cuatro fases: 1) Captura de la energía radiante por los pigmentos cosechadores de la luz, 2) Transferencia de energía hacia el centro de reacción (contiene bacterioclorofila, bacteriofeofitina, quinonas y un Fe no hémico en

donde ocurre el proceso primario de separación de carga (energía de oxidación-reducción), 3) El transporte de electrones iniciado por el centro de reacción genera un gradiente electroquímico de H^+ , 4) la energía derivada de la cadena de transporte de electrones (gradiente electroquímico de H^+) es utilizada para la síntesis de ATP, transporte de solutos, etc. (Dawes, 1986). Es decir la energía derivada de la luz, se utiliza para generar el ATP (fotofosforilación) por medio de un circuito de protones análogo al de la mitocondrias y membranas bacterianas, alternativamente esta energía del gradiente electroquímico de protones se acopla a la síntesis de PPI a través de la H^+ Pirofosfatasa de membrana (Baltschefsky, 1967a).

I.1.1 TAXONOMIA DE LAS BACTERIAS FOTOSINTETICAS.

Las clasificaciones taxonómicas entre los organismos toman en cuenta relaciones fenotípicas para la determinación de los taxa, pero estas agrupaciones no siempre reflejan las relaciones de parentesco o linaje (relaciones evolutivas) entre los grupos. Al respecto, se ha propuesto (Woese, 1978, Woese y col 1990) tres dominios para agrupar a los organismos vivos: Eubacteria, Archaea y Eucarya (Fig. 1). Dentro de Eucarya (eucariontes) se encuentra los reinos de Animalia, Plantae y Fungi. Estas agrupaciones se basan en la similitud de la secuencia del ácido ribonucleico ribosomal (RNAr), dado que esta molécula se encuentra presente desde los primeros organismos los cambios en su secuencia sirven para establecer relaciones filogenéticas.

Las bacterias fotosintéticas están presentes en los dominios de Eubacteria y Archaea (arqueobacterias, ver Fig.1).

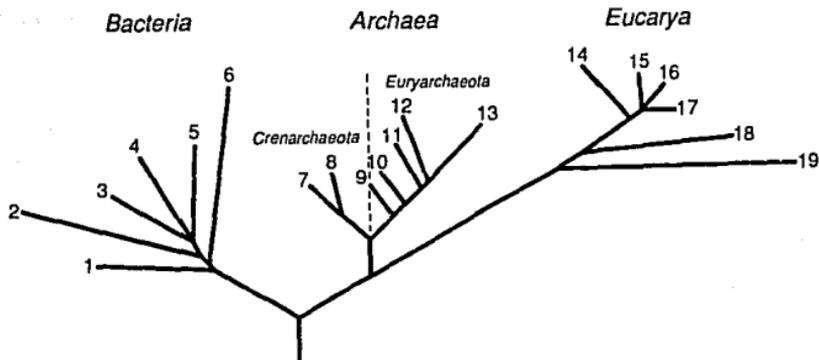


Figura 1. Relaciones filogenéticas entre los organismos, con base en las comparaciones del RNAr tomado de Woese (1990). Los números corresponden a los siguientes grupos: 1 termotogales; 2 falvobacterias; 3 cianobacterias; 4 bacterias púrpuras; 5 Grampositivas; 6 verdes no sulfurosas; 7 género *Pyrodictium*; 8 género *Thermoproteus*; 9 Thermococcales; 10 Methanococcales; 11 metanobacterias; 12 metanomicrobiales; 13 halófilas; 14 animales; 15 ciliados; 16 plantas; 17 hongos; 18 flagelados y 20 microsporidia.

Dentro del dominio de Eubacteria se encuentra el mayor número de especies de bacterias, en donde las bacterias fotosintéticas no forman un grupo genealógico diferente de las bacterias no fotosintéticas, es decir los grupos autótofos y

heterótrofos no están filogenéticamente separados, por ejemplo en el grupo de las bacterias púrpuras tanto encontramos bacterias fotosintéticas como heterótrofas. Las bacterias fotosintéticas que pertenecen a este dominio se encuentran representados en los siguientes grupos (Fig 1): el de bacterias púrpuras no sulfurosas (Rhodospirillum, Chromatium, Rhodobacter); el de bacterias gram positivas (Hellobacterium); el de cianobacteria; el de bacterias verde-sulfurosas (Chlorobium) y el de las verdes no sulfurosas (Chloroflexus).

El dominio de las arqueobacterias comprende cuatro fenotipos generales: las metanógenas, las reductoras de compuestos de azufre, las termófilas extremas y las halófilas. Desde el punto de vista filogenético no se encuentran separados estos grupos (Fig 1), sino que, muestran una relación evolutiva muy particular entre estos. Dentro del grupo de las halobacterias, se encuentran las únicas arqueobacterias fotosintéticas, estos organismos viven a concentraciones salinas elevadas (4.3 M de NaCl) y realizan fotosíntesis no oxido-reductora. Su aparato fotosintético es muy diferente al resto de los organismos fotosintéticos, ya que en lugar de BCl (bacterioclorofila) o Cl (clorofila), presenta una proteína asociada a membrana llamada bacteriorrodopsina. Esta proteína puede llegar a representar el 90% de la proteína de la membrana de la bacteria, si se cultiva en presencia de luz y bajas tensiones de oxígeno. La bacteriorrodopsina es una proteína monomérica que atraviesa 7 veces la membrana; el polipéptido tiene un peso molecular de 26 Kilodaltones (Eisenbach y Caplan, 1979).

I.1.2. BACTERIAS FOTOSINTETICAS RHODOSPIRILLALES.

De acuerdo con la clasificación de Pfenning y Truper (1971), las bacterias fotosintéticas usadas en este trabajo pertenecen al orden Rhodospirillales y de acuerdo con la clasificación de Woese (1987) pertenecen al subgrupo α -1 de las bacterias púrpuras. Este orden incluye dos subórdenes (Pfenning y Truper 1971) que son: **Rhodospirillineae y Chlorobiineae.**

El suborden Rhodospirillineae comprende organismos que contienen Bcl "a" o "b", los pigmentos se localizan en la membrana plasmática, que se invagina al interior del citoplasma, formando los cromatóforos. Este suborden contiene dos familias: Rhodospirillineae y Chromatiaceae.

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

I.1.3. DESCRIPCIÓN DE Rhodospirillum rubrum

Tomando en cuenta la clasificación de Trupper (1976) la bacteria Rhodospirillum rubrum pertenece al:

Orden: Rhodospirillales
Suborden: Rhodospirillineae
Familia: Rhodospirillaceae
Género: Rhodospirillum
Especie: Rhodospirillum rubrum

La especie Rhodospirillum rubrum, posee una forma espiral

y mide 0.8 μm de ancho por 7 a 10 μm de largo; se multiplica por fisión binaria; presenta flagelos polares y una pared celular separada de la membrana celular por un espacio periplásmico. La membrana celular envuelve al citoplasma y contiene el sistema de transporte de electrones, los complejos cosechadores de luz y el centro de reacción (Fig 2). Si el crecimiento se lleva a cabo en condiciones de baja concentración de oxígeno y luz, presenta invaginaciones de la membrana plasmática denominadas cromatóforos (Clayton y Sistro, 1978). En el espacio periplásmico existen proteínas que participan en el transporte de electrones como el citocromo C_2 . En condiciones aeróbicas sin luz, obtiene energía a partir de la oxidación de substratos orgánicos. En esta fase respiratoria no desarrolla los cromatóforos. Esta bacteria almacena glucógeno o poli β -hidroxibutirato como reservorio de energía (Merrick, 1978) y requiere de biotina para su crecimiento. Utiliza como donadores de electrones y como fuente de carbono los siguientes compuestos: acetato, butirato, propionato, piruvato, lactato, succinato, etanol y requiere de los aminoácidos: aspartato, glutamato y arginina o bien amonio o N_2 , por lo tanto esta bacteria es fijadora del nitrógeno molecular. Bajo condiciones respiratorias presenta las siguientes actividades enzimáticas: NADH oxidasa, fumarato reductasa dependiente de NADH, NADH deshidrogenasa, deshidrogenasa succínica y citocromo c oxidasa (Laskin y Lechevalier, 1988). *R. rubrum* es una bacteria Gram-negativa que contiene en su membrana 19% de fosfatidiletanolamina, 10% de

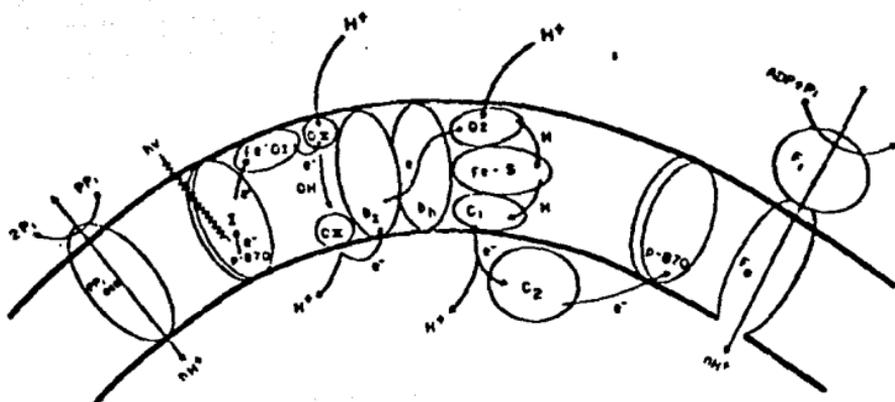


Figura 2. Esquema de la transducción energética en bacterias púrpuras no sulfurosas

P-870 : Centro de reacción

I: Bacteriofeofitina

Fe:Q_i: Hierro-Quinona

Q_{ii}: Quinona Secundaria

b_i y b_h: Citocromos b

Fe-S: Complejo Hierro-Azufre

C_i: Citocromo C_i

FoF₁: ATP sintasa

PPI: pirofosfatasa

fosfatidilcolina y 5% de cardiolipina (Rogers, 1986). Al igual que todas las bacterias Gram-negativas, posee una cubierta de peptidoglicano de 2 nm de grosor que cubre la pared celular, juntas estas dos estructuras le dan rigidez y su forma característica a la bacteria.

Las quinonas que contiene son ubiquinonas y el caroteno predominante es espiriloxantina. El espectro de la membrana del cromatóforo presenta una banda de absorción a los 550 nm debido a la espiriloxantina y un pico de absorción sencillo y simétrico de bacterioclorofila a los 825 nm (Clayton y Sistrom 1978)

La ubiquinona 10 (UQ₁₀) se encuentra en la membrana tanto en el cultivo fotosintético como en el cultivo respiratorio, pero su concentración es mayor durante el cultivo fotosintético. La actividad de NADH-oxidasa disminuye por la destrucción de la UQ₁₀ por luz ultravioleta (Nishikawa y col, 1973).

I.2. TRANSFORMACIONES DE ENERGIA EN MEMBRANAS.

Un avance crucial en el campo de la bionergética, fue el descubrimiento de que la mayor parte del ATP sintetizado en la célula, proviene de los complejos enzimáticos asociados a las membranas de la mitocondria (membrana interna), la membrana tilacoide de los cloroplastos y la membrana citoplasmática de los procariontes (Harold, 1986). Estas membranas, acopladas a la transformación energética, están caracterizadas por dos tipos de estructuras protéicas:

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

b) un segundo sistema que está determinado por la fuente de energía primaria, de tal suerte que en la membrana interna de la mitocondria y en la membrana plasmática de las bacterias se encuentra la cadena respiratoria, que cataliza la transferencia de equivalentes de óxido-reducción hasta el oxígeno u otro aceptor (fosforilación oxidativa), mientras que en plantas y en bacterias fotosintéticas se encuentra la unidad fotosintética, compuesta de complejos cosechadores de luz y centros de reacción además de los complejos de citocromos que forman una cadena de transporte de electrones cíclica (Nicholls, 1982) y estos en su regreso impulsan la síntesis de ATP a través de la ATP sintasa (ver Fig 3).

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

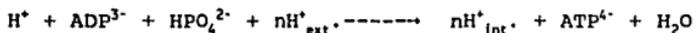
TEORIA QUIMIOSMOTICA. La teoría quimiosmótica postula que las enzimas y los acarreadores de electrones están dispuestos asimétricamente en la membrana, de tal manera que catalizan el transporte vectorial de protones, con la concomitante formación de un gradiente de potencial tanto químico como eléctrico en la membrana (Mitchell, 1966 y Mitchell, 1979)

Los puntos esenciales de esta teoría son (Fig 3.) :

a) La transferencia de electrones por la cadena redox provoca el bombeo de protones en dirección de la región electropositiva de la membrana.

b) La membrana es impermeable a iones, en especial a los H^+ y los OH^- , excepto por los sistemas de transporte de iones.

c) La existencia de una proteína integral de membrana, la ATPasa translocadora de protones, que cataliza la siguiente reacción.



En donde "n" es el número de gramos-iones de H⁺ translocados por mol de ATP, lo que es expresado como el cociente H⁺/ATP. El otro protón en la ecuación corresponde a un proceso escalar (Mitchell, 1967). Dado que esta reacción es reversible, la acumulación de protones en el exterior, puede dirigir la síntesis del ATP con la concomitante entrada de protones. El resultado de la translocación de protones trae consigo la generación de un gradiente eléctrico o gradiente de potencial de membrana ($\Delta\psi$) y un potencial químico expresado como la diferencia de la concentración de protones ΔpH ($pH_{ext} - pH_{int}$). Estos dos parámetros sumados forman la fuerza protón motriz, que no es mas que la expresión de una diferencia de potencial electroquímico de H⁺ (Fig 3). La expresión que define la fuerza protónmotriz (fpm) es:

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

En donde $\Delta\psi$ es el gradiente de potencial electrico y " $Z \Delta pH$ " es una expresión del potencial químico en unidades de milivoltios (mV). Z equivale a $2.303 RT/F$, en donde R es la cte. universal de los gases, T es la temperatura y F es la cte. de Faraday.

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

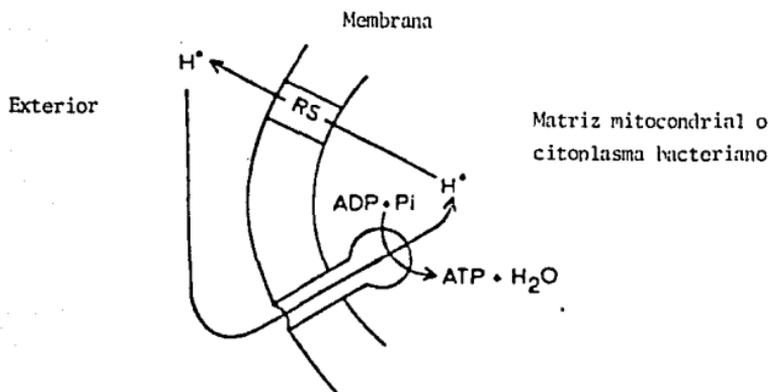


Figura 3. Esquema general de la teoría quimiosmótica. C.R. es la cadena respiratoria.

I.3. LA ESTRUCTURA DEL PPI Y PROPIEDADES GENERALES.

La estructura del enlace fosfoanhidro $O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{\underset{\underset{O}{\parallel}}{|}}{P}-O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{\underset{\underset{O}{\parallel}}{|}}{P}-O$ juega un papel importante en los procesos de transducción de energía, ya que este enlace es la principal forma de energía química en los sistemas vivos. El pirofosfato inorgánico (PPI) es el compuesto más simple que contiene esta estructura. El PPI es producto de diversas reacciones biosintéticas tales como la síntesis de DNA, RNA, aminoácidos, nucleótidos, lípidos, urea, ácidos grasos, etc. Ya que muchas de estas reacciones son reversibles, se pensó durante mucho tiempo que el único papel del PPI era el de ser hidrolizado por las pirofosfatasas citoplásmicas (PPiasas), formándose así una barrera termodinámica que impide el reverso de estas reacciones

biosintéticas. Además se ha visto que el PPI es fuente de fosfatos y de energía para diversas reacciones (Reeves, 1976, Wood, 1977). Asimismo se ha medido la concentración del PPI libre en el citoplasma de células animales (Guynn y col, 1973) y células vegetales (Black y col, 1987) bajo condiciones fisiológicas, lo que muestra que la concentración del PPI se encuentra por arriba de la concentración predicha por el equilibrio de la reacción de la PPIasa citoplásmica. En la especie de arqueobacteria Methanobacterium thermoautotrophicum el PPI se encuentra en una concentración de 2.5 a 40 mM (Keltjens y col, 1988), dependiendo de las condiciones del medio de cultivo. Lo que sugiere, una participación más compleja del PPI en el metabolismo.

Estudios del ΔG° de hidrólisis del PPI, muestran que no es posible descartarlo como donador de energía para distintas reacciones metabólicas. Se ha visto que la energía libre de hidrólisis de la reacción, es muy parecida a la energía de hidrólisis del enlace gama del ATP en ausencia de cationes divalentes, pero en presencia de estos, el ΔG° se vuelve menos negativo, ya que el ADP es mas afin por el Mg^{2+} que el Pi. El valor calculado por Flodgard y Fleron en 1974 para la hidrólisis del PPI fue de -4.0 Kcal/mol, en presencia de 1mM de Mg^{2+} , 150 mM de K y pH de 7.4, y de -5.63 Kcal/mol en ausencia de Mg^{2+} , lo cual está en concordancia con lo publicado por Lawson y col (1976), quienes calcularon una energía libre de hidrólisis de -5.27 Kcal/mol, en presencia de 1mM de Mg^{2+} . Estos valores de nuevo nos sugieren que no es posible eliminar al PPI como fuente de energía.

I.4. PIROFOSFATASA, PROPIEDADES GENERALES.

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



Se conoce la existencia de tres tipos de pirofosfatasas:

a) **PIROFOSFATASA CITOPLASMICA.** Se encuentra en el citoplasma de todas las células y se ha purificado de diferentes organismos, lo que ha permitido conocer algunos aspectos de su estructura y de sus propiedades catalíticas (Cooperman, 1982, Rapoport y col 1972, Barry y Dunaway-Mariano, 1987). Asimismo se conocen dos tipos de PPIasa citoplásmicas: una con actividad óptima en medio ácido y otra con actividad óptima en medio alcalino.

La PPIasa citoplásmica se ha estudiado extensamente en levadura, y se sabe que es una enzima homodimérica, la cual requiere de iones Mg^{2+} para presentar actividad. Uno de los cuales forma complejo con el PPI y los otros dos funcionan como cofactores (Knigh y col, 1984). En general, se ha visto que los cationes divalentes regulan su actividad (Ridlington y Butler, 1972).

En la PPIasa de la bacteria fotosintética *R. rubrum*, se ha propuesto una regulación alostérica debida al efecto de los cationes divalentes (Klemme y Gest, 1971). Las reacciones parciales de la enzima son: el recambio del oxígeno isotópico pesado de $\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$ y el recambio radioactivo del $\text{PPI-}^{32}\text{Pi}$ (Cooperman, 1982).

b) **PIROFOSFATASA DE MEMBRANA.** La PPIasa de membrana fue descubierta por Baltscheffsky y col en 1966, en la bacteria fotosintética *R.*

rubrum. Esta enzima no solo cataliza la hidrólisis del PPI, sino también su síntesis, al utilizar el gradiente electroquímico de H^+ generado por el transporte de electrones. La PPIasa de membrana se ha encontrado en otras 3 especies de bacterias fotosintéticas: en Rhodobacter viridis se reportó reducción del succinato en la oscuridad con PPI como fuente de energía (Jones y Saunders, 1972); en

Rhodobacter palustris se demostró actividad de transhidrogenación debida al PPI (Schwamm y col, 1986); en cromatóforos de Chromatiun D. sp se ha observado un cambio electrocrómico del espectro de absorción del caroteno, inducido por la hidrólisis del PPI (Kneff y col, 1979). También existe una PPIasa de membrana acoplada a la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias de levadura (Mansurova y col, 1975) y en mitocondrias de hígado y corazón de res (Volk y col, 1982 y Volk y Mansurova, 1984).

c) **PIROFOSFATASA DE TONOPLASTO**. Recientemente se ha descubierto una pirofosfatasa membranal en la membrana vacuolar de plantas y de algas (Rea y Poole 1985). Esta enzima actúa como bomba de protones, utilizando al PPI como fuente de energía. Su actividad es independiente de la H^+ ATP sintetasa. Ambas enzimas generan un gradiente electroquímico de protones, a través de la membrana del tonoplasto, el cual se utiliza para el transporte de iones y la regulación del pH interno. Dupaix y col (1989) ha logrado utilizar el gradiente electroquímico de H^+ generado por la pirofosfatasa para llevar a cabo síntesis de ATP.

Dadas todas estas evidencias, es clara la importancia del PPI y de las PPIasas en las reacciones metabólicas de muchos organismos, por lo que sería interesante conocer los mecanismos que regulan las pirofosfatasa y su papel en el metabolismo celular.

PIROFOSFATASA DE MEMBRANA DE Rhodospirillum rubrum

La bacteria fotosintética no sulfurosa R. rubrum contiene pirofosfatasa citoplásmica y de membrana. Klemme y Guest (1971a) encontraron que más del 90% de la actividad de PPIasa corresponde a la citoplásmica. La PPIasa de membrana de R. rubrum no solo hidroliza el PPI, sino también lo sintetiza con la energía derivada de la cadena de transporte de electrones, que es alimentada por la luz. Asimismo se ha encontrado actividad de PPIasa en membranas de R. rubrum crecidas en condiciones respiratorias en la oscuridad (Romero y col 1991).

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

- La PPIasa es insensible a oligomicina (Baltscheffsky y col, 1967b) a diferencia de la ATPasa que es sensible a oligomicina.
- Fisher y Guilloiry (1969) lograron distinguir actividad de la ATPasa de la actividad de la PPIasa con inhibidores específicos: la ATPasa se inhibe con cloruro de litio 2 M, en cambio la PPIasa se

inhibe con 3.1% de butanol. De esta manera, se concluyó que son dos sistemas enzimáticos diferentes acoplados al gradiente de potencial electroquímico protones.

- Johanson (1975), inhibió la actividad de H^+ -ATPasa con anticuerpos monoespecíficos, sin modificar la actividad de la PPiase.

- En cromatóforos de *R. rubrum*, que contienen actividad tanto de ATPasa como de PPiase, Keister y Minton (1971) demostraron la síntesis de ATP debido a la formación de un gradiente electroquímico de protones durante la hidrólisis del PPI; por esta razón no se encontró el fosfato marcado del ^{32}PPI en el ATP. De esta manera, se concluyó que son dos sistemas enzimáticos diferentes, acoplados al gradiente electroquímico de protones. Con respecto a la actividad hidrolítica de la PPiase de membrana de la bacteria fotosintética *R. rubrum*, se sabe que está acoplada a muchos procesos dependientes de energía (Fig 4)

tales como: la reversa de transporte de electrones (Baltscheffsky y col, 1968); la formación de un gradiente de potencial eléctrico evidenciado por el corrimiento electrocrómico del espectro de absorción del caroteno (Baltcheffsky y col, 1969); la alcalinización del espacio externo del cromatóforo (Moyle y col, 1976); el transporte de iones (Isaev y col, 1970); las reacciones de transhidrogenación (Keister y Yike, 1967); la formación de ATP como consecuencia de la formación de un gradiente de potencial electroquímico de protones (Keister y Minton, 1971). La PPiase de

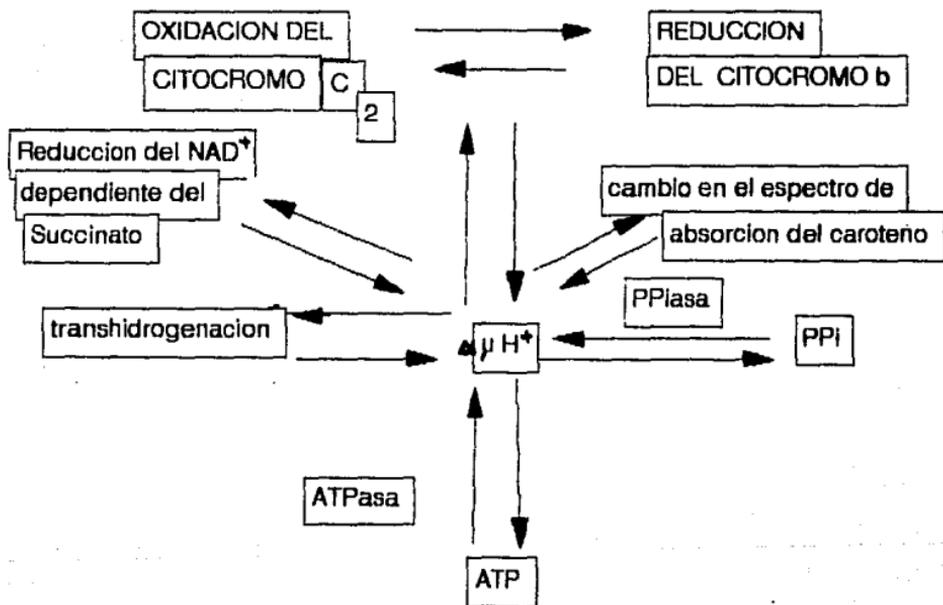


Figura 4. Esquema de las reacciones acopladas a la pirofosfatasa de membrana a través del gradiente electroquímico de protones

membrana de R. rubrum, es capaz de sintetizar PPI, como respuesta a la formación de un gradiente de potencial químico ($\Delta\mu$), o a la presencia de un gradiente de potencial eléctrico ($\Delta\psi$) generado por un gradiente de iones K^+ (Strid y col, 1987). Estas evidencias demostraron que la PPIasa es una enzima que cataliza la translocación electrogénica de protones en un proceso totalmente reversible. La PPIasa de membrana de R. rubrum cataliza dos reacciones: hidrólisis del PPI y síntesis del PPI y es posible medir dos reacciones parciales: intercambio radioactivo ^{32}Pi -PPI y el intercambio isotópico pesado de $\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$. El estudio de estas reacciones de intercambio ha sido muy útil, porque ha permitido conocer los pasos intermedios de la actividad de síntesis e hidrólisis del PPI.

a) **Actividad de PPIasa (hidrólisis).**

La hidrólisis del PPI requiere del catión divalente Mg^{2+} , tanto para formar el complejo de hidrólisis, como para activar a la enzima (Randahl, 1979 y Celis y col, 1985). Estudios de Celis y Romero (1987), sobre el efecto de los cationes divalentes y de los protones sobre la actividad de PPIasa y de intercambio Pi -PPI, indican que el Zn^{2+} a bajas concentraciones, es buen sustituto del Mg^{2+} en la hidrólisis, mientras que otros cationes divalentes como el Ca^{2+} , y el Fe^{2+} , no substituyen al Mg^{2+} en la hidrólisis. El pH óptimo para la reacción de hidrólisis en el cromatóforo de R. rubrum es de 6.5, mientras que el pH óptimo para la reacción de recambio ^{32}Pi -PPI es de 7.5. Se ha visto (Celis y Romero, 1987) en la reacción de recambio ^{32}Pi -PPI que la K_m para el Pi varía con el pH,

por lo que se concluye que los cationes divalentes y los protones juegan un papel importante en las modulaciones cinéticas de la enzima. La oligomicina (inhibidor específico de la ATPasa) no modifica la actividad de la PPIasa sino que la estimula en R. rubrum (Baltscheffsky y col, 1968). La actividad de PPIasa es inhibida por la diciclohexil-carbodiimida (DCCD), fosfato (Pi), y arsenato, mientras que la gramicidina, el 2-4 dinitrofenol (2-4 DNP) y el FCCP desacopla que colapsan el gradiente de potencial electroquímico de protones, estimulan la actividad (Baltscheffsky y col, 1966b, Baltscheffsky, 1986, Nyren y col 1984), mientras que los análogos del sustrato como el metilendifosfato (MDP) y el imidodifosfato (IDP) son inhibidores. Randahl (1979) observó que los reactivos de grupos -SH, ejercen una inhibición a 0°C, mientras que a 30°C, casi no inhiben. Esto podría explicarse como resultado de cambios conformacionales dependientes de temperatura, lo que traería como consecuencia la exposición de los grupos -SH de la proteína. Nishikawa y col (1973), han visto que la actividad de PPIasa disminuye en la luz a pesar de que existan condiciones de baja síntesis de PPI. Asimismo se ha visto que el Li⁺, el Na⁺ y el K⁺ estimulan la actividad de PPIasa. La PPIasa de membrana, al igual que la ATPasa, es una enzima que depende de fosfolípidos particulares de la membrana, ya que bajo la acción de la fosfolipasa A, la actividad disminuye y al agregar fosfolípidos totales de soya esta se recupera (Klemme y col, 1971b).

b) Síntesis del PPI.

La síntesis del PPI se lleva a cabo en condiciones de

iluminación y también requiere de $MgCl_2$ para la actividad. La oligomicina no inhibe, sino que estimula. En presencia de luz y bajo condiciones desacoplantes con FCCP y valinomicina se inhibe la síntesis. En presencia de 10 mM de NaF se inhibe totalmente la síntesis (Nyren y col, 1986).

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

Strid y col, (1987) generaron gradientes de potencial eléctrico con el ion K^+ ($\Delta\psi$), y gradientes de protones en los cromatóforos de R. rubrum, logrando las síntesis del PPI y del ATP, ya que los cromatóforos contienen ambas actividades. Al respecto concluyeron: son diferentes las cantidades de protones translocados para formar ATP o PPI; es necesario que la ATPasa se active por el gradiente de potencial de membrana para que se de la síntesis del ATP a diferencia de la PPIasa que con bajos gradiente de potencial de membrana (respecto a la ATPasa) es capaz de sintetizar el PPI.

c) Intercambio P_i -PPI.

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

La reacción se inhibe por desacoplantes de la fosforilación tales como el p-triclorometoxi carbonil-cianuro-fenilhidrazona (CCCP) y el antibiótico S-13 y se estimula por oligomicina. Se inhibe por adición de ADP. Los protones y los cationes divalentes ejercen un papel modulador en las propiedades catalíticas de la enzima (Celis y Romero, 1987), ya que el pH afecta la K_m para el Pi y para el Mg^{2+} . Asimismo, los cationes divalentes como el Mn^{2+} y el Co^{2+} son substitutos del Mg^{2+} para formar el sustrato (con un 50 % de la actividad obtenida con el Mg^{2+}), mientras que los cationes Ca^{2+} y el Zn^{2+} , no sustituyen al Mg^{2+} en la reacción. Por otro lado, los requerimientos de Mg^{2+} añadido a la reacción son mayores que para la actividad hidrolítica (Celis y col, 1985). Los mismos autores sugieren que el sustrato para la actividad de recambio es el $MgHPO_4$ con una K_m de 1.5 mM. Se ha visto que para la actividad de recambio el Mg^{2+} libre es importante y probablemente juega un papel activador.

d) Intercambio $HPO_4^{3-}-H_2O$.

Los cromatóforos de R. rubrum, catalizan un rápido recambio del oxígeno del pirofosfato por el oxígeno del agua. Esta reacción es inhibida por inhibidores de la PPIasa de membrana, como el fluoruro y el metilendifosfato (Harvey y Keister 1981) y se considera una reacción parcial de la hidrólisis del PPI. Se requiere de $MgCl_2$ en una relación $MgCl_2/Pi$ de 0.8 para alcanzar las velocidades óptimas. Harvey y Keister (1981), utilizando inhibidores específicos, encontraron que esta actividad de intercambio en la bacteria fotosintética R. rubrum, se debe

exclusivamente a la PPIasa membranal, a pesar de que la ATPasa tiene el potencial suficiente para llevarla a cabo.

El desacoplante CCCP no presenta un gran efecto sobre la reacción, por lo que podría sugerirse que el intercambio $\text{Pi-H}_2\text{O}$ no depende de un gradiente de protones. Esto parece estar apoyado por el hecho de que la luz no estimula el recambio.

II.9. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es la caracterización cinética de la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa de membrana de Rhodospirillum rubrum, en especial los siguientes aspectos:

- 1) Estudiar la cinética del efecto activador del Mg^{2+} libre sobre la velocidad de hidrólisis, para discriminar el mecanismo cinéticos de activación (esencial o no esencial).
- 2) Determinar la cinética de hidrólisis con respecto al sustrato, manteniendo constante la concentración del activador.
- 3) Determinar el efecto del sustrato sobre la activación debida al Mg^{2+} libre.
- 4) Conocer el orden de adición del sustrato y del activador a la enzima, es decir si es ordenado o al azar.
- 5) Determinar el tipo de inhibición debida al PPI libre, dada la dificultad de determinar directamente la K_i , se emplearán métodos de competencia para evaluar esta constante.
- 6) Confirmar, con inhibidores competitivos para el sustrato y el activador, el tipo de mecanismo cinético obtenido bajo condiciones de equilibrio rápido.
- 7) Determinar si el efecto activador del Mg^{2+} libre, es por la interacción directa del magnesio sobre la enzima, o por el enmascaramiento de la carga de superficie negativa del cromatóforo. Por lo tanto se modificará el potencial de superficie de la membrana del cromatóforo y se estudiará el posible efecto que tenga en la actividad enzimática en estas preparaciones de membrana.

CAPITULO II.

MATERIALES Y METODOS

II.1. CULTIVO DE LAS BACTERIAS

Se utilizó la cepa silvestre (ATCC 11170) de la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum en todos los experimentos.

II.1.1. MEDIOS DE CULTIVO

Los cultivos de esta bacteria se realizaron en medio sólido y líquido:

- A) MEDIO SOLIDO: En un volumen final de 1 litro se disuelven:
- | | |
|--------------------------------------|-----|
| Extracto de Levadura o de Carne..... | 3 g |
| Peptona de gelatina..... | 2 g |
| Agar Bacteriológico..... | 1 % |

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

B) MEDIO LIQUIDO: Se preparó el medio líquido con base al método de Cohen-Bazire y col (1957), el cual es una modificación del propuesto por Hunter (1950). El medio de cultivo requirió preparar las siguientes soluciones:

- 1) Base concentrada. Un volumen de 2 L contiene:

$N(CH_2COOH)_3$	20.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	28.9 g
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	8.7 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.185 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.195 g
Solución de Metales "44".....	100 ml

Se ajusta a un pH de 6.8.

La solución de metales "44" que se utiliza contiene:

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

La solución se afora a 1.0 L con agua destilada y se ajusta el pH a 6.8.

ii) KH₂PO₄, 136.08g se aforan a 1.0 L con agua destilada. se ajusta el pH a 6.8.

iii) Acido succínico, 100g se aforan a 1.0 L con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8.

iv) (NH₄)₂SO₄, 100g se aforan a 1.0 L con agua destilada.

v) NaCl, 50g se aforan a 1.0 L con agua destilada.

vi) Acido L-glutámico, 25g se aforan a 250 ml con agua destilada.

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

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

i)	Base Concentrada.....	250 ml
ii)	KH ₂ PO ₄	250 ml
iii)	Acido Succínico.....	250 ml
iv)	(NH ₄) ₂ SO ₄	62.5 ml
v)	NaCl.....	125 ml
vi)	Acido L-glutámico.....	25 ml
vii)	Acido L-aspártico.....	25 ml
viii)	Extracto de Carne.....	12.5 g
ix)	Acido Nicotínico.....	12.5 mg
x)	Tiamina.....	6.25 mg
xi)	Biotina.....	0.125 mg

El medio se ajustó a un pH de 6.8 y se esterilizó en el

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

II.1.2. SIEMBRA DE BACTERIAS.

La siembra de las bacterias se realizó en placa, en inóculos muy diluidos para formar colonias sencillas. Se tomó una muestra del inóculo para sembrarlas por punción en frascos con medio sólido. Posteriormente se incubaron durante 12 hrs en la obscuridad para consumir el oxígeno debido al crecimiento respiratorio de las bacterias. A continuación se expusieron los inoculos a la luz (focos con filamento de tungsteno de 40 watts colocadas a 30 cm de distancia de los frascos a una temperatura de 30°C.)

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

Se le agrega medio líquido a los frascos de medio sólido y se agitan para desprender alguna colonia. Se guardan los frascos en la obscuridad durante 12 hrs, posteriormente se exponen a la luz a una temperatura de 30°C. A los 6 días aproximadamente se obtiene el cultivo fotosintético, el cual se vacía en matraces de 100 ml con medio líquido, agregando la suficiente cantidad para no mojar el tapon de hule esteril, pero dejando la menor cantidad de oxígeno posible. Se repite de nuevo el ciclo obscuridad-luz indicado para obtener un cultivo en condiciones fotosintéticas.

Este procedimiento se repite trasladando el cultivo a un frasco de 1.0 L y posteriormente a uno de 9 L.

II.1.3. COSECHA DE BACTERIAS.

Se procedió a cosechar el cultivo a los 7 días aproximadamente, cuando este alcanzó la fase logarítmica tardía en la curva de densidad óptica del cultivo contra tiempo. La densidad óptica del cultivo de bacterias se detectó con un fotocolorímetro con filtro rojo (fotocolorímetro Klett-Summerson).

La cosecha se realizó por centrifugaciones sucesivas del medio de cultivo a 8,000 x g durante 15 minutos, obteniéndose pastillas de bacterias, las cuales se lavaron dos veces en un amortiguador MOPS 50 mM, KCl 50 mM pH 7.5. De nuevo se centrifugaron a 8,000 x g durante 15 minutos eliminando así los residuos del medio. Las pastillas son pesadas y registradas como peso húmedo, para ser almacenadas en un ultrarrefrigerador a -70°C.

II.2. OBTENCION DE CROMATOFOROS.

Los cromatóforos se obtienen (Fig 5) a partir de las bacterias utilizando el procedimiento reportado por Baccarini-Melandri y col, (1970):

-Se resuspenden las bacterias en un amortiguador Tris-Cl pH 7.5 en relación 1:10 (peso:volumen), se homogenizan y se les agrega MgSO₄ y DNAasa esta última en proporción de 1 mg por 100 g de peso húmedo de bacterias.

-Se sonicán en volúmenes de 20 ml durante 2 minutos en un

sonicador tipo M.S.E. a la máxima potencia, en un baño de hielo a 0°C (Scholes y col., 1969).

-Se centrifugan a 20,000 x g durante 20 min, para remover las células sin romper, cápsulas, etc, que quedan en el precipitado.

-Se toma el sobrenadante y se centrifuga a 100,000 x g durante 80 min.

-El precipitado de cromatóforos se resuspende en un amortiguador Tris-Cl 10 mM con EDTA 5 mM y EGTA 2mM a pH de 7.5, para remover los cationes divalentes como el Mg^{2+} presentes en la preparación y se centrifuga a 100,000 x g durante 80 min.

-El precipitado obtenido se resuspende en Tris-Cl 50 mM se centrifuga a la 100,000 x g duante 80 min para lavar el exceso de quelantes.

-Se resuspende la pastilla de cromatóforos en el amortiguador del paso anterior a una concentración de proteína aproximada de 25 mg/ml y se almacena a 4°C durante los siguientes tres días en donde conservan su actividad o bien a -70°C en donde conservan su actividad durante 6 meses.

II.3. DETERMINACION DE PROTEINA.

La cantidad de proteína para los ensayos se determinó por el método de Lowry y col, (1951), utilizando estandares de albúmina de suero de bovino (BSA), con un intervalo de sensibilidad de 5 a 400 μ g de proteína/ ml.

Las bacterias se resuspenden en Tris-HCl
10 mM, pH 7.5 en relación 1/10 (p/v)



Se agrega 1 mg de DNAasa y 5 mg de MgSO₄



Se sonicán en lotes de 15 ml durante 2 min a 0°C.



Se centrifuga a 20 000 X g, durante 20 min a 4°C.



Se recupera el Sobrenadante



Se elimina el Precipitado



Se centrifuga a 100 000 X g durante 80 min a 4°C.



Se resuspende el precipitado en EDTA 5mM y
EGTA 3 mM y se centrifuga a 100 000 X g durante
80 min.



Se resuspende el precipitado en Tris HCl 50mM
pH 7.5 y se centrifuga a
a 100 000 X g durante 80 min a 4°C.



Se resuspende el precipitado (cromatóforos) en
Tris HCl 50 mM pH 7.5 en relación 1:3 (p/v)
y se determina la concentración de proteína.

Figura 5. Esquema de la obtención de los cromatóforos.

II.3.1. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE BCL

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

II.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA.

La actividad enzimática se determinó a partir de la cuantificación del fosfato (Pi) liberado, por la hidrólisis del PPI, a 30°C en presencia de MgCl₂.

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

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 0.5 ml, agregando 1mg de proteína de cromatóforo por tubo. El medio de reacción contiene Tris-maléico 50 mM pH 6.5, pirofosfato de sodio, cloruro de magnesio, EDTA, necesario para obtener las concentraciones que se indican en el pie de figura de las gráficas. La reacción se inició con la adición de enzima (cromatóforos) al medio de reacción. El tiempo de reacción correspondió a un avance máximo de la reacción de 15% (velocidades iniciales). La aparición de producto (Pi) bajo las condiciones experimentales, no produjo

ningún efecto inhibitorio. La reacción enzimática se paró agregando al medio de reacción 0.1ml de ácido tricloroacético (TCA) al 30 % (p/v). Finalmente se centrifugó el ensayo a 3,000 rpm durante 10min y se determinó la cantidad de Pi liberado en el sobrenadante. Para la determinación de Pi se utilizó el método de Summer (1944), el cual es una modificación del de Fiskie y Subarrow (1925) con un máximo de detección de fosfatos de 1600 nmoles. El método se basa en la formación del complejo de molibdato-fosfato (color amarillo huevo), el cual se reduce con sulfato de p-metilamino fenol (ELON), que da una coloración azul. la absorbencia se determina a 660 nm de longitud de onda.

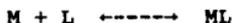
Para la cuantificación se realizaron curvas patrones con estandares de H_3PO_4 . La velocidad de hidrólisis se expresó en nmoles de Pi producido/min/mg de proteína.

II.5. CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS METALES, LIGANDOS LIBRES Y LOS COMPLEJOS PRESENTES EN EL MEDIO DE REACCION.

Para calcular la concentraciones de pirofosfato de sodio, cloruro de magnesio y EDTA necesarias para mantener la concentración del catión libre constante y variar la concentración del complejo Mg-PPi o viceversa, se utilizó el programa de Fabaiato (1988). Asimismo en los experimentos de inhibición, para mantener constante la concentración de los inhibidores (Ca^{2+} libre o Mg-IDP) y variar la concentración del Mg^{2+} libre o el Mg-PPi se utilizó también este programa.

El programa permite calcular, a partir de los equilibrios

químicos entre el metal y ligando,



la concentración del complejo, el cual está caracterizado por una constante de asociación:

$$K_s = [ML] / [M][L]$$

donde: M = metal; L = ligando y ML = complejo metal-ligando.

El programa utiliza en su calculo una serie de aproximaciones sucesivas a través de interacciones, con el fin de obtener la concentración de metal o ligando libre, partiendo de la concentración del complejo especificado, o bien el calculo inverso que consiste en obtener las concentraciones de complejos formados, a partir de las concentraciones de metales y ligandos empleados.

Las constantes de asociación (K_s) utilizadas, se tomaron de Martell y Sillén (1971) y de Fabiato (1988). El logaritmo de la constante de asociación es:

Complejo	Log de la K_s
PPi H	8.3
PPi H ₂	6.0
PPi H ₃	2.7
PPi H ₄	2.5
PPi-Mg	6.0
PPi-Ca	5.46
IDP-Mg	4.5
IDP-Ca	4.39
EDTA-Mg	4.61

II.6. MODIFICACION DEL POTENCIAL DE SUPERFICIE DE LOS CROMATOFOROS.

La carga de superficie de los cromatóforos se modificó, por dos métodos: 1) fusión de los cromatóforos con liposomas (con diferentes proporciones de carga positiva y negativa) e 2) incubación de los cromatóforos con detergentes aniónicos y catiónico.

1-Fusión de liposomas con Cromatóforos:

Se prepararon liposomas sonicando dos gramos de α -L-fosfatidilcolina (Tipo II. obtenida de Sigma Corp, San Luis, Mo) en 10 ml de un amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7.8. La sonicación se realizó en un baño de hielo, con un sonicador modelo Sonifier 250, en la posición número 4, durante tres intervalos de 2 min (para evitar calentamiento de la muestra).

La fusión de liposomas (Fig 6) se realizó mezclando 3 ml de cromatóforos (concentración 3mg/ml) con 3 ml de liposomas a una concentración de 200mg lípido/ml. La mezcla se mantuvo a 30°C y la fusión se inició al disminuir el pH a 6.0, por la adición de HCl. A los 15 y 30 min se agregan dos alícuotas de 1.5 ml de liposomas y se mantuvo el pH en 6.0. A los 45 minutos, el pH se ajustó a 7.8 añadiendo NaOH. Las relaciones p/p en mg de las mezclas que contenían dos lípidos fueron las siguientes: 120mg/40mg por ml de fosfatidilcolina/dicetilfosfato, respectivamente y 120 mg/20 mg por ml de fosfatidilcolina/ estearilamina respectivamente. En el control, se añadió el amortiguador sin liposomas a los cromatóforos y se siguió el cambio de pH mencionado. Este método es una modificación del propuesto por García y Drews (1984).

LA FUSION SE LLEVA ACABO A 30°C

3 ml de cromatóforos a una concentración de 3mg/ml en presencia del amortiguador Tris-Cl 50mM pH 7.8



3 ml de liposomas a una concentración de 200 mg de lipido/ml



SE AÑADE HCL Y SE CAMBIA EL pH A 6.0

0 min

Se inicia la fusión



1.5 ml de liposomas a una concentración de 200 mg lipido/ml, se mantiene el pH en 6.0

15 min



1.5 ml de liposomas a una concentración de 200 mg lipido/ml, se mantiene el pH en 6.0

30 min



SE AÑADE NaOH Y SE LLEVA EL pH A 7.8

45 min

fin de la fusión

Figura 6. Fusión de liposomas con cromatóforos, por el método de cambio de pH.

Para corroborar la fusión de liposomas con los cromatóforos, se corrieron las muestras en gradientes continuos de sacarosa de 10 al 40%, en un rotor SW41 a 35,000 rpm durante 12 hrs. Se fraccionaron las muestras del gradiente de sacarosa y se determinó la bacterioclorofila con la absorbencia a 880nm, que corresponde a los complejos pigmento-proteína del cromatóforo (Clayton, 1963). Se encontraron dos fracciones de diferente densidad, una que correspondió a los cromatóforos intactos con una densidad alta (35% p/v de sacarosa) y otra de menor densidad que corresponde a los proteoliposomas (25% p/v de sacarosa, ver RESULTADOS Y DISCUSION).

2-Incubación de cromatóforos en detergentes aniónicos o catiónicos.

Se precubaron los cromatóforos durante 20 min en agitación suave a 4°C en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) 200µM y en cetil trimetil amonio (CTAB) 200µM, se centrifugaron a 100,000 X g durante 80 min y se resuspendió la pastilla en Tris HCl 10 mM pH 7.5 a una concentración de proteína de 30mg/ml. Este método está reportado por Wojtczak y Nalecz, (1978).

II.7. ESTIMACION DEL CAMBIO DEL POTENCIAL DE SUPERFICIE.

Se estimó el cambio del de superficie, utilizando el 8-anilino-naftaleno sulfonato (ANS), el cual fluoresce cuando se particiona en membranas (Robertson y Rottemberg, 1983). El ANS se ha utilizado de manera amplia para estimar cambios en el potencial de superficie de la membrana (Wojtjak y Nalecz, 1978). Para evaluar

la modificación del potencial de superficie se determinó la fluorescencia a diferentes concentraciones de ANS en las preparaciones de membrana mencionadas, a partir del regrafico de dobles recíprocas, se determinaron K_s para el pegado de ANS. Se utilizó un fluorómetro Perkin-Elmer utilizando una longitud de onda de excitación de 366 nm y de emisión de 460 nm.

CAPITULO III.

RESULTADOS Y DISCUSION.

III.1. CONDICIONES PRELIMINARES.

La actividad hidrolítica de la pirofosfatasa de membrana se midió en el cromatóforo de la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum.

Se realizaron estudios preliminares de la actividad hidrolítica, para determinar las condiciones de velocidades iniciales. El tiempo que se escogió para la incubación fue de 1.5 a 2 min, lo que corresponde a un avance de la reacción del 15%, es decir el 15% del sustrato como máximo se transformo en producto. La medida de la actividad enzimática se realizó incubando a la enzima en presencia del sustrato (Mg-PPi) y del activador (Mg^{2+} libre), a 30°C, en el amortiguador Tris-maléico 50 mM pH 6.5, y la reacción se inició agregando las membranas del cromatóforo como se indica en "MATERIAL Y METODOS".

El pH óptimo para la reacción de hidrólisis es de 6.5 (Celis y Romero 1986). Ya que una parte importante del análisis involucra fijar la concentración del complejo (Mg-PPi) y conjuntamente variar la concentración del metal libre (Mg^{2+}) o viceversa, se utilizó el programa de computadora de Fabiato (1988), con el cual se calcularon las concentraciones totales de $MgCl_2$ y pirofosfato de sodio necesario para obtener las concentraciones deseadas del complejo Mg-PPi y de Mg^{2+} libre.

En las condiciones experimentales descritas en este trabajo, la aparición del producto (Pi), no ejerce ningún efecto inhibitorio

sobre la reacción de la hidrólisis del sustrato. Asimismo, parece que la falta de regulación en la osmolaridad de los ensayos, no ejerce ninguna modificación en las condiciones estudiadas, ya que las determinaciones en presencia de detergentes no modifican la cinética de hidrólisis, es decir las preparaciones probablemente no se encuentran acopladas.

III.2. EFECTO DEL MAGNESIO LIBRE SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA

El sustrato real de la pirofosfatasa de membrana, al igual que para otras pirofosfatasas, es el complejo metal-PPi, en este caso, el complejo Mg-PPi (Randahl, 1979 y Celis y col, 1985). Asimismo se ha visto que los metales libres, como el Mg^{2+} , juegan un papel activador en la cinética de diversas pirofosfatasas (Unguryte y col, 1989, Barry y Dunaway-Mariano, 1987). Por esta razón, se investigó la dependencia de la hidrólisis del sustrato con respecto a la concentración de Mg^{2+} libre. El diseño experimental consistió en variar la concentración del Mg^{2+} libre desde $0.01\mu M$ hasta 1.0 mM , manteniendo constante la concentración del complejo Mg-PPi (0.5 mM). Como se puede observar en la figura 7, el incremento en la hidrólisis del sustrato depende estrictamente de la concentración del Mg^{2+} libre, mostrando una cinética de saturación, con una K_m aparente para el Mg^{2+} libre de 0.28 mM . Además, con 0.5 mM de Mg-PPi no se presenta actividad a concentraciones menores de $10\mu M$, lo cual sugiere fuertemente que el Mg^{2+} libre es un activador esencial

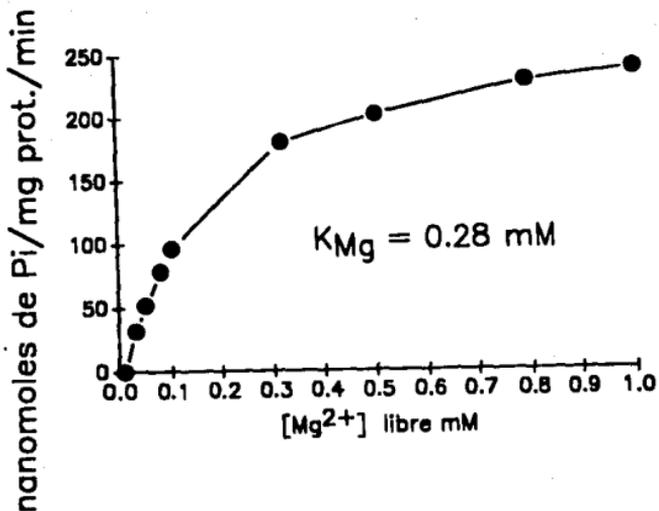


Figura 7. Efecto del Mg^{2+} libre sobre la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa de membrana. Se calculó la cantidad necesaria de $MgCl_2$ y $Na_2P_2O_7$, para mantener la concentración de Mg-PPi en 0.5 mM y la concentración indicada de Mg^{2+} libre. El medio de incubación contiene Tris-maléico 50 mM pH 6.5 y 1 mg de proteína. El tiempo de incubación fue de 1.5 min.

de la reacción de hidrólisis. La nomenclatura de activador esencial proviene de los estudios en equilibrio rápido propuesto por Segel (1975). Este complejo catalítico sería, el complejo ternario enzima-activador-sustrato.

En la pirofosfatasa de membrana, tanto de la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum como de la bacteria Rhodopseudomonas palustris (Schwam y col, 1986), se ha visto que el Mg^{2+} libre es un activador de la reacción de hidrólisis, pero lo que no se había planteado es que el Mg^{2+} libre fuera un activador esencial en Rhodospirillum rubrum.

III.3. EFECTO DEL Mg^{2+} LIBRE EN LA HIDROLISIS DEL COMPLEJO Mg -PPI.

Otro de los objetivos importantes de este trabajo, es caracterizar la cinética de activación de la pirofosfatasa de membrana de Rhodospirillum rubrum, por lo que se consideró al activador y al sustrato como diferentes ligandos de la enzima. Según el efecto que se desee estudiar, se fijó o varió la concentración de cualquiera de estos ligandos. Por lo tanto, para estudiar el efecto del Mg^{2+} sobre la hidrólisis del sustrato, se fijó la concentración del Mg^{2+} libre en cuatro diferentes concentraciones (0.03, 0.1, 0.5 y 1.0 mM) y se varió la concentración del sustrato en cada condición (Fig 8A). Estas cuatro concentraciones de Mg^{2+} libre permitieron estudiar estos efectos en un intervalo amplio de concentración. Es claro que conforme se incrementa la concentración del Mg^{2+} libre la actividad de

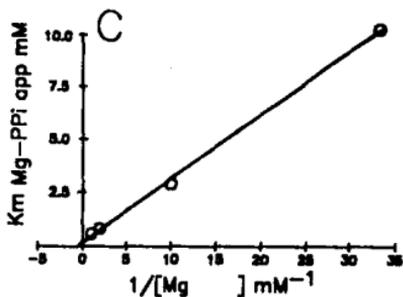
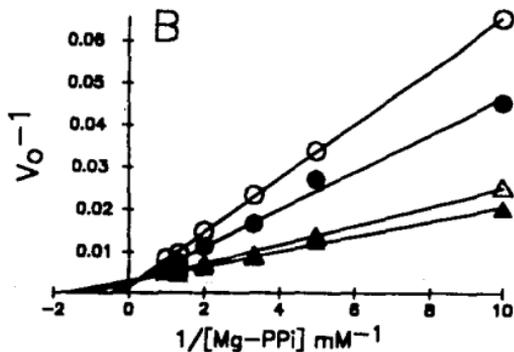
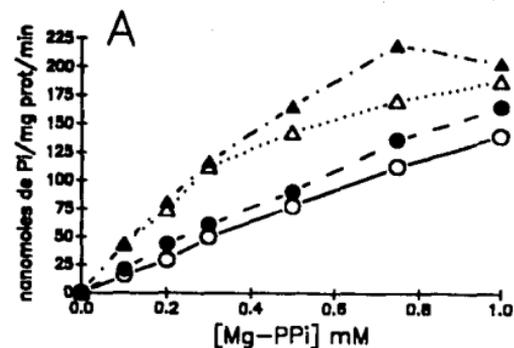


Figura 8. Efecto del Mg²⁺ libre sobre la hidrólisis del del complejo Mg-PPi. A) Las condiciones experimentales fueron las mismas de la figura 1. La concentración del Mg²⁺ libre se mantuvo constante en 0.03mM (○), 0.1mM (●), 0.5 mM (△) 1.0 mM (▲) y se varió la concentración del Mg-PPi como se indica. B)regráfico de Lineaweaver-Burk de la fig 2A. C) Regráfico de la Km aparente contra el inverso de la concentración del Mg²⁺ libre.

hidrólisis aumenta. Esto mismo se ha visto en la bacteria fotosintética Rhodobacter palustris (Schwam y col 1986), lo que sugiere similitudes cinéticas entre estas dos enzimas transductoras de energía.

En la figura 8B se muestran las dobles recíprocas de los datos de la figura 8A, en donde prácticamente la V_{max} no cambia: de 512 a 482 nmol de Pi producido/mg de proteína/min de 0.03 a 1.0 mM de Mg^{2+} libre respectivamente. Mientras que la K_m aparente para el sustrato cambia con la concentración de Mg^{2+} libre, de manera que la K_m para el Mg-PPi disminuye de 10.26 a 0.6 mM conforme la concentración del activador aumenta de 0.03 a 1.0 mM de Mg^{2+} ; es decir, el incremento de Mg^{2+} libre produce un aumento en la afinidad de la enzima por el sustrato. La figura 8C. muestra la relación lineal que existe entre K_m aparente para el sustrato y el inverso de la concentración del Mg^{2+} . La ordenada al origen muestra que el valor de la K_m para el sustrato cuando el Mg^{2+} libre está en concentraciones saturantes es de 0.17 mM, mientras que a baja concentración de Mg^{2+} libre, la enzima pierde afinidad por el sustrato. Este resultado concuerda con la activación esencial por el Mg^{2+} libre, es decir, el complejo catalítico sería un complejo ternario formado por: enzima-(Mg)-(Mg-PPi).

III.3.1 EFECTO DEL SUSTRATO (Mg-PPi) PARA LA ACTIVACION DEBIDA AL Mg^{2+} LIBRE.

Continuando con la caracterización cinética de la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa de membrana, se estudió el efecto

de la concentración del sustrato (Mg-PPi) sobre la activación del Mg^{2+} libre. Para ello se fijó la concentración del Mg-PPi en tres concentraciones, 0.25, 0.5 y 0.75 mM, y se varió en cada condición la concentración del Mg^{2+} libre (Figura 9A). Se escogieron estas concentraciones de sustrato, porque una se encuentra por abajo y otra por arriba de la K_m par el sustrato en condiciones de activación. En los tres casos la actividad de hidrólisis muestra una curva de saturación con respecto a la concentración de Mg^{2+} , con una mayor actividad hidrolítica conforme se presenta mayor concentración del sustrato.

Asimismo en la gráfica de dobles recíprocas de la Fig. 9A, se observa un aumento de la V_{max} aparente conforme se incrementa la concentración del sustrato (el valor de la V_{max} aparente es 270.6, 362.9 y 370 nmol de Pi producido/mg de proteína/min para los valores de 0.25, 0.5 y 0.75 mM de Mg-PPi respectivamente). Se observó que la constante de disociación para el Mg^{2+} libre disminuye (0.51, 0.28, 0.12 mM) conforme se incrementa la concentración del sustrato (0.25, 0.5 y 0.75 mM de Mg-PPi respectivamente), como si se presentaran efectos cooperativos entre el activador y el sustrato; es decir, al incrementar la concentración del sustrato se produce un incremento en la afinidad de la enzima con respecto al activador esencial (Mg^{2+} libre). En el regráfico que se muestra en la figura 9B, se aprecia una familia de rectas que intersectan a la izquierda del eje de la ordenadas y dado que la pendiente de estas rectas aumenta al disminuir la

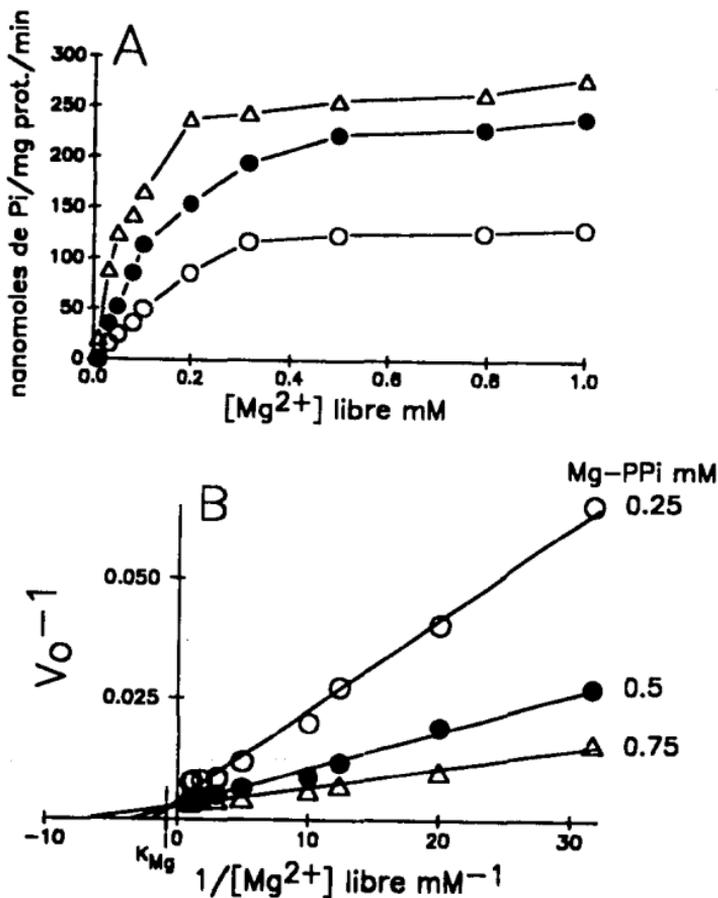


Figura 9. Dependencia de la concentración del Mg-PPi, sobre la activación debida al Mg²⁺ libre en la reacción hidrolítica. A) Las condiciones experimentales son las mismas de la Fig 7. Se fijó la concentración de Mg-PPi en 0.25 mM (○), 0.5 mM (●) y 0.75 mM (△) y se varió la concentración del Mg²⁺ libre como se indica en la figura. B) Re gráfico de Lineaver-Burk para los datos de la figura 9A.

concentración de Mg-PPI, cuando la pendiente tiende a infinito se obtendría una curva "teórica", que permitiría determinar la K_m para Mg^{2+} en ausencia de sustrato (Segel, 1975), por lo que interpolando en el eje de las abscisas por debajo de la intersección, da un valor de 0.73mM, que se interpreta como la constante de disociación para el activador en ausencia del Mg-PPI.

El estudio de enzimas que presentan un activador esencial puede ser tratado bajo las condiciones de equilibrio rápido (Segel, 1975) o bien suponiendo condiciones de estado estacionario (Morrison, 1973).

En condiciones de equilibrio rápido, se puede plantear la ecuación de velocidad para cada uno de los mecanismos posibles: al azar u ordenado. A su vez, la ecuación de velocidad inicial se reorganiza en función de uno de los ligandos (activador o sustrato). De aquí la importancia de fijar la concentración de un ligando y variar la concentración del otro. Para obtener la ecuación de velocidad en función una sola variable, ya sea el activador o el sustrato. Finalmente la ecuación se reorganiza (por ejemplo en Lineaweaver-Burk) y se obtienen los diferentes patrones según el mecanismo cinético (Tabla I). La ecuación de velocidad en función de la concentración de Mg-PPI, suponiendo condiciones de equilibrio rápido y un mecanismo ordenado donde interacciona primero el Mg^{2+} con la enzima es:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{MgPPI}}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_{Mg}}{Mg}\right) \frac{1}{MgPPI} + \frac{1}{V_{max}} \dots \dots \dots (1)$$

En donde se observa que el parámetro de V_{max} no se modifica, mientras que la K_m para el sustrato se modifica en función de la concentración de Mg^{2+} . Por otro lado la ecuación de velocidad en función de Mg^{2+} , suponiendo condiciones de equilibrio rápido y un mecanismo ordenado donde interacciona el Mg^{2+} primero con la enzima, es la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{Mg}}{V_{max}} \left(\frac{K_{MgPPi}}{MgPPi} \right) \frac{1}{Mg} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_{MgPPi}}{MgPPi} \right) \quad (2)$$

En donde se observa que tanto la V_{max} como la pendiente se modifican por el mismo factor de concentración de Mg - PPi .

En este sentido se encontró un regráfico del tipo "competitivo" cuando, la concentración del Mg^{2+} libre se mantiene constante y la del Mg - PPi se varió (Fig 8.B). Asimismo, se observó un patron "mixto" con intersección a la izquierda del eje de las ordenas y con valor positivo, cuando se fijó la concentración del Mg - PPi y se varió la concentración del Mg^{2+} libre (Fig. 9B). Si el sistema se encuentra en equilibrio rápido (Tabla I) entonces la cinética de hidrólisis sigue un mecanismo ordenado de acuerdo con el siguiente esquema:



en donde el Mg^{2+} libre interacciona con la enzima antes que el sustrato, y precisamente la formación del complejo enzima-activador favorece la unión del Mg - PPi , para dar lugar al complejo catalítico enzima-activador-sustrato.

Tabla I. Patrones Cinéticos para los posibles mecanismos de la pirofosfatasa, considerando al Mg-PPi como sustrato y al Mg²⁺ como activador esencial.

Mecanismo:	Variación del Mg ²⁺ Se Fija el Mg-PPi	Variación del MgPPi Se fija el Mg ²⁺
Azar	NC* $\alpha = 1$ M* $\alpha \neq 1$	NC $\alpha = 1$ M $\alpha \neq 1$
Ordenado: Mg ²⁺ libre interacciona, con la enzima antes que el MgPPi	Mixto	Competitivo
Ordenado: MgPPi interacciona con la enzima antes que el Mg ²⁺ libre.	Competitivo	Mixto

* NC= nocompetitivo; M= Mixto

α significa que tanto modifica el pegado del primer ligando al segundo. En $\alpha = 1$ no existe ninguna modificación.

La pirofosfatasa citoplásmica de levadura (Knight y col 1981), también requiere de Mg^{2+} libre como activador y se ha encontrado un mecanismo ordenado para esta enzima, pero a diferencia de la pirofosfatasa de membrana, en la pirofosfatasa citoplásmica se pega primero el sustrato y después el Mg^{2+} libre. Esta diferencia particular en los mecanismos podría tener implicaciones en la posible regulación y en el papel de ambas enzimas "in vivo."

III.4. ESTUDIOS CON INHIBIDORES COMPETITIVOS DEL SUSTRATO Y DEL ACTIVADOR PARA EVIDENCIAR EL MECANISMO CINÉTICO DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA.

Una herramienta muy utilizada en cinética enzimática, son los inhibidores competitivos, con el fin de evidenciar el tipo de mecanismo cinético (Fromm, 1979). En el caso de la cinética de la pirofosfatasa de membrana, se utilizó este enfoque con la idea de confirmar si el mecanismo cinético de la enzima es ordenado, como sugieren los datos de las figuras 8B, 9B, las ecuaciones 1 y 2 y la tabla I.

Se eligió al imidodifosfato ya que es un inhibidor competitivo de la pirofosfatasa citoplásmica (Moe y Butler, 1972). Previamente se observó que el complejo Mg -IDP y el complejo Zn -IDP no son sustratos de la pirofosfatasa de membrana (datos no mostrados). Asimismo, por trabajos previos del laboratorio (Celis y Romero 1987), se sabe que el calcio ejerce un papel inhibitorio, por lo cual se escogió al Ca^{2+} libre como inhibidor de la activación debida al Mg^{2+} .

En este tipo de estudio se escogen inhibidores competitivos de la enzima para el sustrato y para el activador, y posteriormente se estudia el efecto del inhibidor competitivo para e discute que la DP) sobre el activador (Mg^{2+}) y se estudia el efecto del inhibidor competitivo para el activador (Ca^{2+}) sobre el sustrato ($Mg-PPi$). El tipo de patrones inhibitorios (competitivo, nocompetitivo o incompetitivo) es característico de cada mecanismo, ya sea en condiciones de equilibrio rápido o estado estacionario. Dado que se plantearon los diferentes mecanismos cinéticos, se formularon las ecuaciones de velocidad en función del activador o el sustrato suponiendo que el Ca^{2+} libre es un inhibidor competitivo de la activador y el $Mg-IDP$ es inhibidor competitivo del sustrato y se determinó el tipo de patrón inhibitorio correspondiente para cada mecanismo cinético, lo que se resume en la tabla II.

El imidodifostato es un análogo estructural del pirofosfato. Para estudiar su efecto inhibitorio sobre el sustrato se fijó la concentración del $Mg-IDP$ en 0.5 y 1.0 mM y la del Mg^{2+} libre en 1.0 mM, mientras que se varió la concentración del sustrato. La figura 10A, muestra que el $Mg-IDP$ es un inhibidor competitivo, ya que la K_m para el sustrato se incrementa desde 0.68 mM a 2.44 mM cuando se incrementa el $Mg-IDP$ de 0.0 a 1.0 mM, mientras que la V_{max} no cambia (331 mmol de Pi producido/mg de proteína/min). Es claro que el $Mg-IDP$ compite con el $Mg-PPi$ por su unión al complejo enzima-Mg.

Se ha reportado que el Ca^{2+} es un inhibidor de diferentes

Tabla II. Patrones observados y esperados para diferentes mecanismos cinéticos, utilizando inhibidores competitivos para el Mg^{2+} y el Mg -PPi.

Variación de :	Inhibidor	Patron observado+
Mg-PPi	Mg-IDP	C
Mg^{2+}	Ca^{2+}	C
Mg-PPi	Ca^{2+}	UC
Mg^{2+}	Mg-IDP	UC

Patrones Inhibitorios Esperados

Equilibrio Rápido al Azar	Estado Estacionario al Azar	Equilibrio Rápido Ordenado *	Estado Estacionario Ordenado *
C	C	C	C
C	C	C	C
C	NC	C	UC
C	NC	UC	NC

* El Mg^{2+} libre interacciona con la enzima antes que el Mg -PPi

+ Inhibición Competitiva= C ; Inhibición Acompetitiva= UC ;

Inhibición Nocompetitiva= NC

pirofosfatasas (Baykov y col 1989, Moe y Butler, 1972). Se estudió su efecto fijando la concentración del Ca^{2+} libre en 0.05 y 0.1 mM, a una concentración de Mg-PPi de 0.5 mM, mientras que se varió la concentración del Mg^{2+} libre. La figura 10B muestra que el calcio libre es un inhibidor competitivo de la activación por el Mg^{2+} libre, ya que la Km para el Mg^{2+} libre se incrementa siete veces, de 0.25 a 1.71 mM cuando el Ca^{2+} libre varía de 0.0 a 0.1 mM, mientras que la Vmax no cambia (237 nmoles de Pi producido/mg de proteína/min). Este dato muestra que el Ca^{2+} libre se une a la enzima para formar el complejo enzima-Ca, es decir el Ca^{2+} libre compite con el Mg^{2+} libre para formar el complejo enzima-metal.

Ya que en el medio de reacción se encuentra presente el complejo Ca-PPi (posible inhibidor de la reacción), se calculó la concentración de éste complejo bajo las condiciones del experimento anterior (Fig 10B). El complejo Ca-PPi varió de 0.77 hasta 0.007 mM cuando el Ca^{2+} libre se mantuvo constante en 0.05 mM y varió desde 0.15 hasta 0.015 mM cuando el Ca^{2+} libre se fijó en concentración de 0.1 mM. Sin embargo, debido a que se presenta un efecto claramente competitivo del Ca^{2+} libre y no una inhibición mixta, podemos eliminar un posible efecto del Ca-PPi, bajo estas condiciones experimentales.

Para completar este análisis se estudió el efecto del Mg-IDP sobre la activación debida al Mg^{2+} libre, para lo cual se fijó la concentración del inhibidor Mg-IDP en 0.1 y 0.15 mM, mientras que se varió la concentración del activador (Mg^{2+}) a una

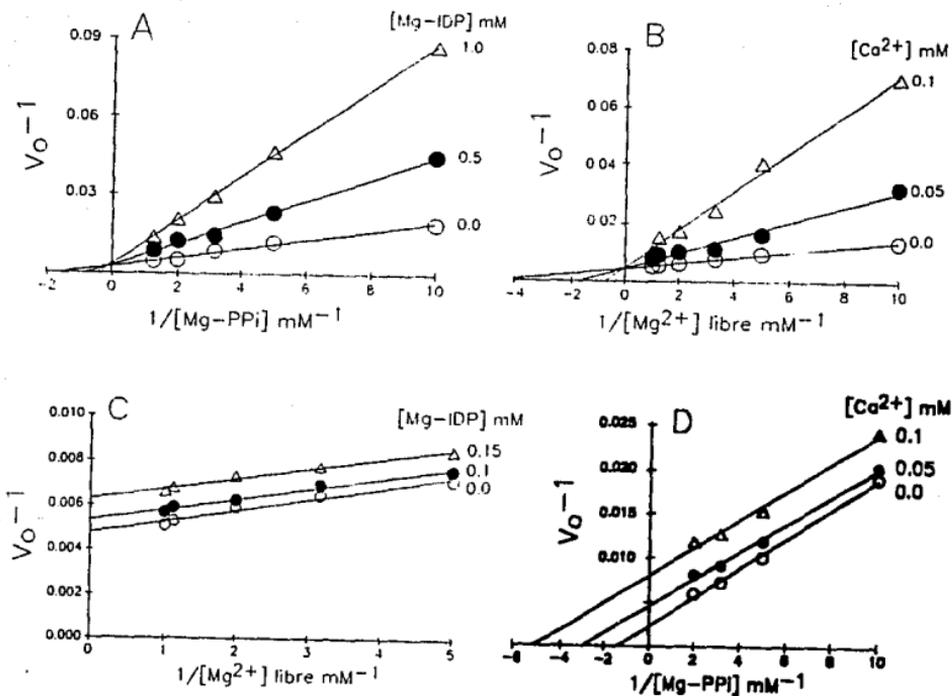


Figura 10. Patrones Inhibitorios, utilizando al Mg-IDP y al Ca²⁺ libre como inhibidores competitivos del sustrato y del activador. Las condiciones experimentales son las de la figura 6. Regráficos de Lineaveer-Burk para : A) Velocidades iniciales (Vo) a concentraciones de Mg-PPi con concentración fija de Mg-IDP; B) Vo a concentraciones de Mg²⁺ libre con concentración fija de Ca²⁺ libre; C) Vo a concentraciones de Mg²⁺ libre con concentración fija de Mg-IDP y D) Vo a concentraciones de Mg-PPi con concentración fija de Ca²⁺ libre

concentración fija del Mg-PPi (0.5 mM). La figura 10C, muestra una inhibición del tipo acompetitivo, ya que la Km cambia de 0.23 a 0.74 y la Vmax también cambia de 201 a 150 nmol de Pi producido/mg de proteína/min desde 0.0 a 0.15 mM de Mg-IDP respectivamente. Este dato sugiere que el Mg²⁺ libre se pega a la enzima antes que el Mg-PPi, lo cual es consistente con el patrón de inhibición esperado para el mecanismo ordenado (tabla II).

Se estudió la inhibición del Ca²⁺ libre sobre la hidrólisis del sustrato, fijando su concentración en 0.05 y 0.1 mM, mientras que la concentración del sustrato se varió en presencia de una concentración fija de Mg²⁺ libre (1.0 mM). El tipo de inhibición es acompetitiva (Fig 10D), ya que la Km para el sustrato disminuye de 0.73 a 0.19 mM, y la Vmax de 433 hasta 113 nmol de Pi/mg de proteína/min. Este dato no es consistente con el patrón de inhibición competitivo esperado (tabla II). Por otro lado el tipo de inhibición acompetitiva sugiere que el Ca²⁺ libre se une al complejo enzima sustrato. Esta discordancia puede deberse a la formación del complejo Ca-PPi. En el medio de reacción se encuentra presente el Ca-PPi a una setenta y siete veces menor que el sustrato cuando la concentración del Ca²⁺ libre es de 0.05 mM, mientras que el Ca-PPi se encuentra a una concentración treinta y tres veces menor que el sustrato en concentraciones de 0.1 mM de Ca²⁺ libre. Al respecto, en la pirofosfatasa de membrana de mitocondria, Unguryte y col, (1989) encuentran al igual que en este trabajo, una inhibición acompetitiva para el Ca²⁺ libre con respecto al sustrato y explican que la formación del complejo Ca-PPi,

podrían interferir en la obtención de efectos limpios en la cinética de inhibición, por lo que es difícil, a través de este tipo de experimentos, determinar las constantes cinéticas para la inhibición del Ca^{2+} libre o del complejo Ca-PPi.

Como está indicado en la tabla II, los patrones de inhibición para el mecanismo ordenado son consistentes, excepto por la inhibición incompetitiva del Ca^{2+} libre cuando el sustrato se varía. Es claro que no se presenta un mecanismo al azar, sino uno ordenado, en donde el Mg^{2+} se interacciona con la enzima antes que el sustrato. Este mecanismo se apoya en el análisis de la cinética en la figura 8A y 9A. Con los datos de la tabla II, no es claro si la simplificación del mecanismo en equilibrio rápido es la más adecuada o se requiere hacer ecuaciones de velocidad en estado estacionario y este es un punto que deberá ser clarificado. Es importante hacer notar que, en la pirofosfatasa citoplásmica de levadura, el estudio con inhibidores competitivos y con sustratos débiles tales como el $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})\text{-PPi}$, sugiere un mecanismo en equilibrio rápido, pero cuando se utiliza el Mg-PPi como sustrato, se encuentra que el mecanismo es en estado estacionario (Barry y Dunaway-Mariano 1987). Este resultado contrasta con el mecanismo en equilibrio rápido propuesto para *R. rubrum* utilizando Mg-PPi como sustrato.

III.5. PAPEL DEL PIROFOSFATO LIBRE EN EL MECANISMO DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA.

Se ha propuesto que el PPI libre es un inhibidor competitivo

para diferentes pirofosfatasas (Lathi, 1983). Por tal motivo se estudió el efecto del pirofosfato libre en la cinética de hidrólisis. Para ello, se fijó la concentración del PPI libre en 0.03, 0.1, 1.0 y 5.0 mM, y se varió la concentración del sustrato. Se eligieron estas concentraciones porque es un intervalo amplio en concentración para estudiar el efecto del PPI. En la figura 10A se aprecia una aparente inhibición del PPI a concentraciones de 1.0 y 5.0 mM, asimismo, se aprecian curvas sigmoideas, en lugar de las curvas hiperbólicas. Para analizar este efecto y el de la inhibición por PPI, se calculó la concentración del Mg^{2+} libre, ya que en el momento de fijar la concentración del PPI libre y variar la concentración del Mg-PPI, se produce un incremento en la concentración del Mg libre y mientras se fije el PPI a mayor concentración la del Mg^{2+} disminuye, acorde con las siguientes ecuaciones:

$$Kd_{Mg-PPI} = [Mg][PPI] / [Mg-PPI] \dots\dots\dots(3)$$

$$Kd_{Mg-PPI} / [PPI] = Constante = [Mg] / [Mg-PPI] \dots\dots\dots(4)$$

A concentraciones de 0.03 y 0.1 mM de PPI libre, no se ve inhibición, ya sea porque el la concentración del PPI libre se encuentra por debajo de su K_i y/o porque la concentración del Mg^{2+} libre es lo suficientemente grande para activar la enzima, (tabla III). Por otro lado, a concentraciones de PPI libre de 1.0 y 5.0 mM se presenta una inhibición, que puede deberse al PPI libre y/o a la disminución del Mg^{2+} libre, ya que, la K_m para Mg libre es de 0.12 mM en presencia de 0.75 mM de sustrato y calculando la K_m para el

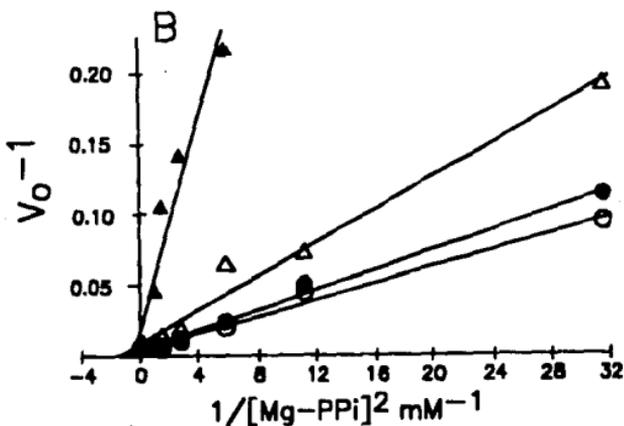
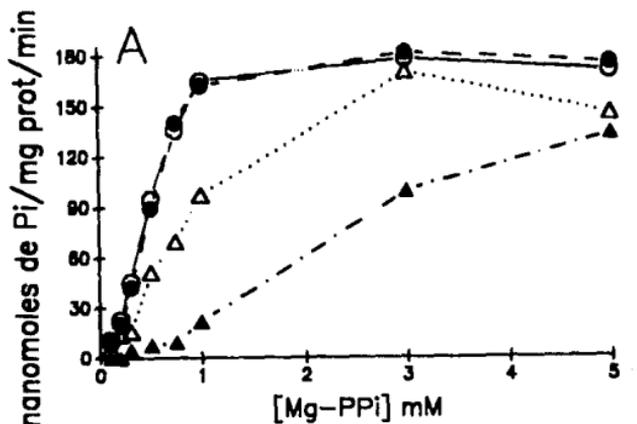


Figura 11. Efecto del PPI libre en la reacción hidrolítica. Las condiciones experimentales son las mismas de la figura 7. A) Se fijó la concentración del PPI libre en cuatro concentraciones, 0.03 mM (○), 0.1 mM (●), 1 mM (△) y 5 mM (▲) y se varió la concentración del Mg-PPI como se indica en la figura. B) Regráfico de Lineweaver-Burk de la Fig 11A.

Mg en presencia de 3.0 o 5.0 mM de MgPPI es 50 y 30 μ M respectivamente (tabla III).

Tabla III. decremento de la concentración de Mg²⁺ libre , bajo las condiciones de la Figura 11A.

PPI constante [mM]	Variación del Mg-PPI [mM]	Constante Mg /Mg-PPI	Variación del Mg libre [mM]
0.03	0.1 a 5.0	3.3×10^{-2}	0.003 - 0.15
0.1	0.1 a 5.0	1.0×10^{-2}	0.001 - 0.005
1.0	0.1 a 5.0	1.0×10^{-3}	0.0001- 0.005
5.0	0.1 a 5.0	2.0×10^{-4}	0.00002-0.001

Es decir, en este tipo de inhibición se pueden presentar efectos mezclados de inhibición por el PPI libre, y una disminución en la concentración del activador esencial.

En la figura 10B, se observa que la gráfica de las dobles recíprocas para estos datos muestra una aparente inhibición no competitiva para el PPI libre, lo cual no concuerda, con la inhibición competitiva reportada para otras pirofosfatasa reportadas (Moe y Butler 1972). Dada esta mezcla de efectos, este enfoque no es un método adecuado para obtener la constante de inhibición del PPI libre.

Se fijó la concentración del sustrato y se varió la concentración del PPI libre, pero como se observa en la ecuación 3, al fijar la concentración del sustrato e incrementar la concentración del PPI libre, se produce una disminución del Mg^{2+} libre. Al calcular la concentración del Mg^{2+} libre presente en el medio de reacción, resultó que el Mg^{2+} libre disminuye en dos ordenes de magnitud de la K_m para el Mg^{2+} . Dicho de otra manera, la inhibición en este diseño experimental (datos no mostrados), se debe a la disminución en la concentración del Mg^{2+} libre, ya que se ha propuesto al Mg^{2+} libre como un activador esencial, por lo que se impide la formación del complejo catalítico: enzima-activador-sustrato.

III.5.1. DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE INHIBICION PARA EL PPI LIBRE.

Dado que por métodos directos no es posible evaluar la constante de inhibición del PPI libre (K_i), se determinó la constante a través de un método indirecto, que consiste en proteger la actividad de la enzima por la inactivación del modificador químico EDC. El diseño de protección consistió en preincubar a la enzima con diferentes concentraciones de PPI, en presencia de EDC. Para realizar la medida de la actividad se completó la cantidad necesaria de $Na_4P_2O_7$ y $MgCl_2$, para mantener la concentración de 1.0 mM del sustrato y 1 mM del Mg^{2+} libre. Este tipo de estudios cinéticos, empleando modificadores químicos irreversibles, permite evaluar las constantes cinéticas con resultados comparables a los

obtenidos con los estudios de velocidades iniciales (Franco y col 1985). La efectividad en la protección depende de la afinidad de la enzima por el ligando, por lo que este método permite evaluar la constante de disociación del ligando a la enzima.

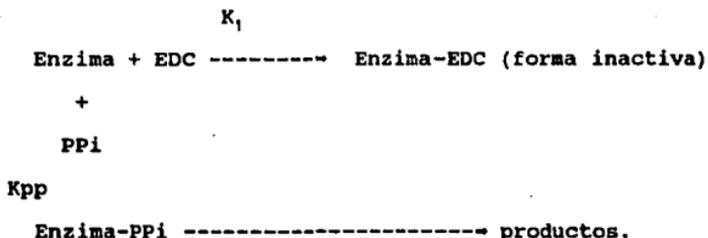
Por trabajos del laboratorio (Romero, I. 1991) se demostró que el EDC es un modificador irreversible de la reacción de hidrólisis del sustrato. A partir de la gráfica del logaritmo del porcentaje de actividad remanente de la inhibición con EDC en función del tiempo, se obtuvieron las constantes de inactivación de pseudoprimer orden para las diferentes concentraciones de EDC. El regráfico de estas constantes de inactivación en función de la concentración del EDC, está determinada por la ecuación:

$$K_A = K (M)^l \dots\dots\dots(5)$$

donde: K_A = la constante de pseudo primer orden; K = la constante de 2º orden; M = la concentración del modificador y l = el orden de la reacción. Este regráfico dió una línea recta (datos no mostrados), lo que quiere decir que el modificador químico no forma un complejo reversible con la enzima (Horique y col, 1979). Asimismo presenta una constante de 2º orden de $36.9 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. A partir del regráfico del logaritmo de la constante de pseudoprimer orden en función del logaritmo de la concentración del modificador, se obtuvo un orden de reacción de 0.9 (Romero, 1991).

Estos datos son importantes para fundamentar la determinación de la constante de disociación del PPI a la enzima (K_{ppi}), ya que el pegado del PPI protege de alguna manera a la enzima de la inhibición por EDC. La reacción que describe la formación del

complejo enzima-EDC y la enzima-PPI-EDC se ilustra de la siguiente manera:



En donde la constante aparente de inactivación esta dada por la ecuación:

$$1/K_{app} = \frac{K_1}{(1 + PPI / K_{pp})} \dots\dots\dots(6)$$

La ecuación rearrreglada en su forma inversa nos da:

$$1/K_{app} = (1/K_1 K_{pp}) [PPI] + 1/K_1 \dots\dots\dots(7)$$

un gráfico del inverso de la K_{app} en función de la concentración del PPI durante la preincubación, nos da una línea recta, en donde su abscisa al origen es el valor negativo de de la constante de disociación del PPI (K_{pp}), y este valor puede ser comparado con una constante de inhibición del PPI

Utilizando este enfoque se determinó la constante de inactivación de pseudo primer orden a diferentes concentraciones

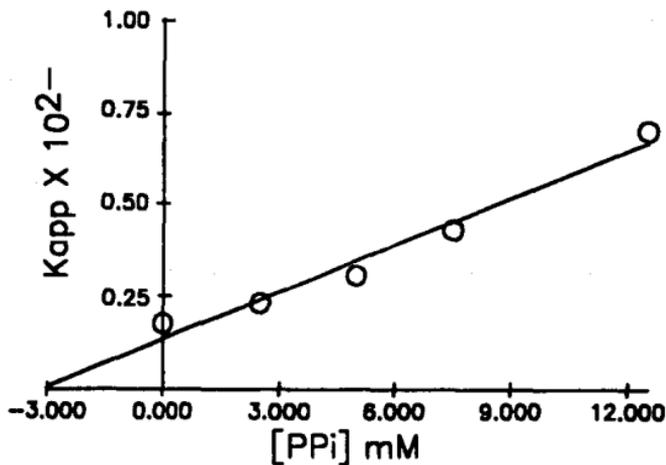
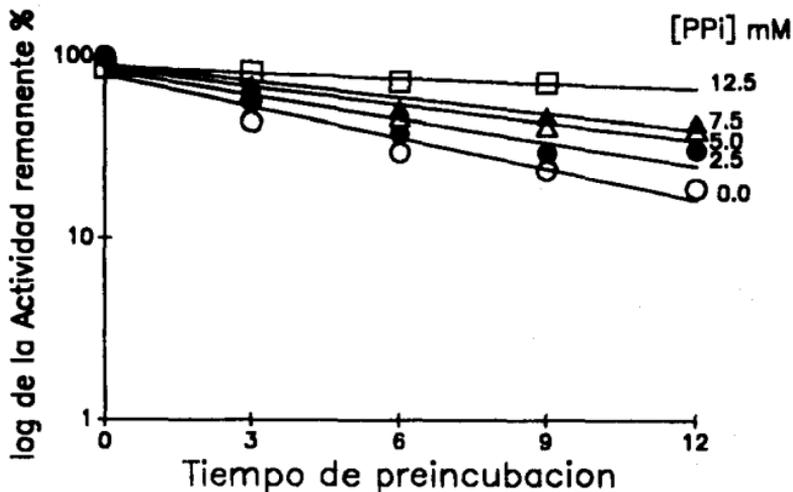


Figura 12. Protección del PPI de la inhibición por el EDC. A) Logaritmo de la actividad remanente de la PPIasa inhibida por EDC (3 mM), en función del tiempo de preincubación, a diferentes concentraciones de PPI. La actividad se midió a 1mM de Mg-PPI y 1mM de Mg^{2+} libre. B) Regráfico de las inverso de la constante de inactivación aparente ($1/K_{app}$) en función de la concentración de PPI preincubado.

del PPI, graficando curso temporal del logaritmo de la actividad remanente (Fig 12). El regráfico del inverso de la constante aparente de inactivación, en función de la concentración del PPI utilizado en la preincubación, es lineal como lo indica la ecuación 7, con una abscisa al origen de 3.16 mM que es la K_d para el PPI, el cual sería el valor de la constante de inhibición.

Este dato es muy importante, ya que establece que las concentraciones del orden milimolar de PPI libre producen efectos inhibitorios. Este valor de 3.16 mM concuerda con la figura 10, ya que solamente a concentraciones mayores de 0.1 mM se observa la inhibición por el PPI libre, mientras que en el orden de μM , no se aprecia inhibición. Asimismo, bajo las condiciones de los experimentos en las figuras 8 y 9, la concentración del PPI libre se encuentra por debajo de concentraciones μM (K_{ppi} es de 3.16 mM), por lo que revalida, que bajo las condiciones empleadas en los experimentos de activación por magnesio, no se presentan efectos de una aparente activación debida a la disminución en la concentración del PPI libre como lo indica la ecuación 3.

III.6. EFECTO DEL POTENCIAL DE SUPERFICIE SOBRE LA ACTIVIDAD DE HIDROLISIS DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA.

Uno de los objetivos de el trabajo, consistió en determinar si el efecto activador atribuido al Mg^{2+} libre, se debía a un efecto directo del Mg^{2+} sobre la enzima o bien al enmascaramiento del potencial de superficie de la membrana del cromatóforo. Dado que la carga de la superficie de la membrana y del sustrato (Mg-PPI^{2-})

son negativas, podrían darse efectos de repulsión entre el sustrato y el potencial de superficie de la membrana. Al agregar el Mg^{2+} libre, estas cargas positivas apantallan la carga de la membrana y así el sustrato fuera más accesible al sitio activo de la enzima (Figura 13). Es importante hacer notar que en diferentes enzimas membranales, el potencial de superficie puede ser un factor que modifique la actividad enzimática (Wotjack y Nalecz 1978), por lo cual fue necesario esclarecer si existía un papel del potencial superficie en la cinética de esta enzima. Para tal estudio se modificó la carga de superficie del cromatóforo de *R. rubrum* con dos técnicas: 1) fusión de liposomas (con diferente proporción de carga) con los cromatóforos y 2) la incubación con detergentes aniónicos (SDS) o catiónicos (CTAB), a concentraciones inferiores a la concentración micelar crítica. El cmc del SDS es 1.0 mM y del CTAB es 8.0 mM.

III.6.1. FUSION DE LIPOSOMAS CON CROMATOFOROS DE LA BACTERIA FOTOSINTETICA *Rhodospirillum rubrum*.

Para la fusión de liposomas con los cromatóforos, se prepararon tres tipos de liposomas: a) liposomas de asolectina fosfatidilcolina (Sigma type III); b) liposomas de asolectina con dicetil fosfato en relación 120 mg/40 mg ml^{-1} y c) liposomas de asolectina con estearilamina en relación 120 mg /20 mg ml^{-1} . El procedimiento de fusión consistió en un cambio de pH, de 7.5 a 6.5 y para el término de la fusión los liposomas se regresaron al pH original, como se describe en "Material y Métodos".

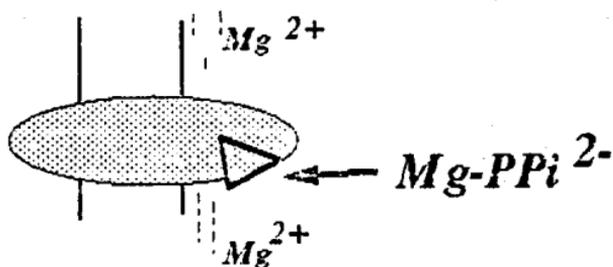
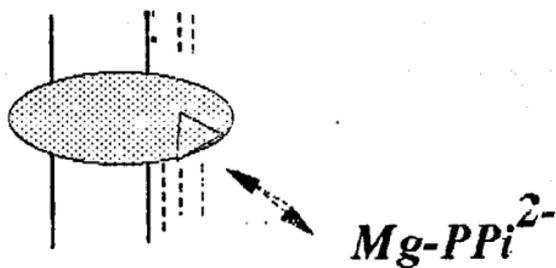


Figura 13. Esquema hipotético de la posible participación del potencial de superficie en la modulación de la enzima.

Para comprobar la fusión de los liposomas, se corrió un gradiente de sacarosa de 10 a 40% (p/v) con las muestras fusionadas y se midió la absorbencia a 880 nm que corresponde a los complejos pigmento proteína de los complejos antena que están presentes en los cromatóforos. En la figura 14, se observa dos poblaciones de diferente densidad en el gradiente de sacarosa, la fracción de alta densidad (35% de sacarosa p/v), que corresponde a los cromatóforos intactos, como se aprecia en el control, y la fracción de baja densidad (25% de sacarosa p/v), que corresponde a los cromatóforos fusionados con los liposomas. Una vez demostrada la fusión, se midió la actividad hidrolítica de la enzima con las tres preparaciones de membrana mencionadas, como se observa en la figura 14, la modificación cinética se da en la V_{max} , pero no en la K_m que se mantiene en un valor de 0.29 mM. Es difícil explicar por qué disminuye la V_{max} , pero una posibilidad es la dependencia de lípidos que presenta la pirofosfatasa de membrana para su actividad (Klemme y col, 1971), ya que si ésta se incuba con fosfolipasa "A" se pierde la actividad, y si a la misma preparación se le incuba con fosfolípidos, la actividad se recupera, por lo que la dilución de lípidos durante la fusión de los cromatóforos con los liposomas puede ser un factor en los cambios de la V_{max} . Se hace notar que no existen modificaciones en la K_m , asimismo, se ha visto (Nalecz y col 1980) que las modificaciones cinéticas producidas por el potencial de superficie se dan a nivel de la K_m de las enzimas o las K_m para procesos de transporte, debido a que el potencial repele o atrae los sustratos positivos o negativos, produciendo una

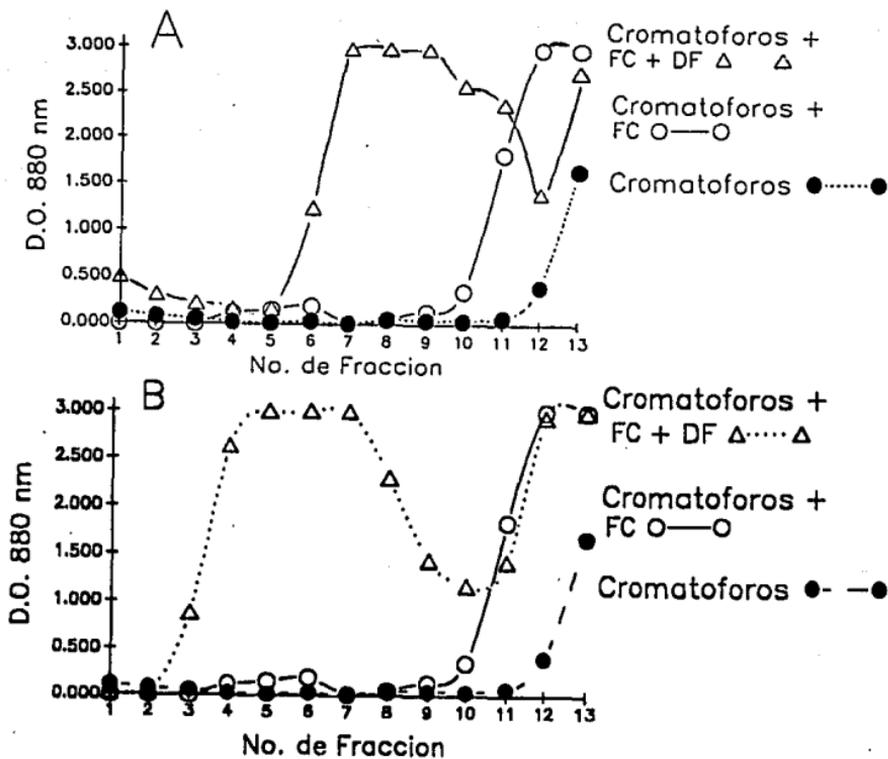


Figura 14. Fusión de los cromatóforos con liposomas. Absorbancia a 880 nm que corresponde a los pigmentos-proteína A) Corresponde a la fusión de liposomas con fosfatidil colina (FC) y dicetil fosfato (DF) . B) Corresponde a la fusión de liposomas con fosfatidilcolina (FC) y estearil amina (EA)

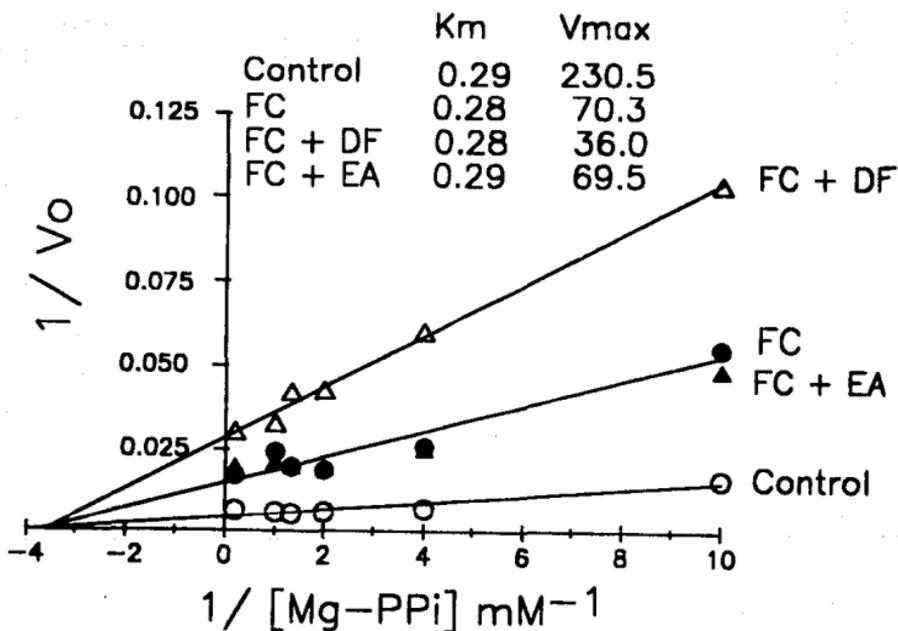


Figura 15. Actividad hidrolítica de la PPIasa de las diferentes preparaciones de membrana. Se varió el sustrato como se indica en la figura y se mantuvo constante la concentración del Mg²⁺ libre en 1.0 mM.

mayor o menor concentración del sustrato (según su carga) en la vecindad de la superficie de la membrana, y por lo tanto, se presenta diferente accesibilidad al sitio activo de las enzimas (Wotjack y Nalecz 1979, Theuvenet y Borst-Puawels, 1976).

III.6.2. ESTIMACION DE LA MODIFICACION DEL POTENCIAL DE SUPERFICIE EN LOS CROMATOFOROS FUSIONADOS CON LIPOSOMAS.

Una parte importante de este estudio consistió en demostrar que el potencial de superficie de los cromatóforos se modificó por el procedimiento de fusión, para lo cual se titularon los cromatóforos con Anilino naftaleno sulfonato (ANS, Fig 16). Esta sustancia fluorescente se ha utilizado para estimar el potencial de superficie de diferentes preparaciones de membrana (Nalecz y col 1980). Debido a la carga negativa del ANS, esta molécula fluoresce cuando interactúa con las cargas de la superficie de la membrana, de tal manera que los cambios en la K_d del ANS se pueden relacionar con la modificación del potencial de superficie en la membrana del cromatóforo.

Cabe aclarar que la magnitud de la modificación de la K_m producida por el efecto del potencial de superficie, debe ser comparable a la magnitud de la modificación de la K_d para el ANS. De acuerdo con la distribución de Boltzman la relación entre la K_d o la K_m y el potencial de superficie está dado por la siguiente ecuación:

$$K_d = K_d^0 \exp (ZF \Delta\psi / RT) \dots \dots \dots (8)$$

Donde K_d = la constante de disociación de la molécula en

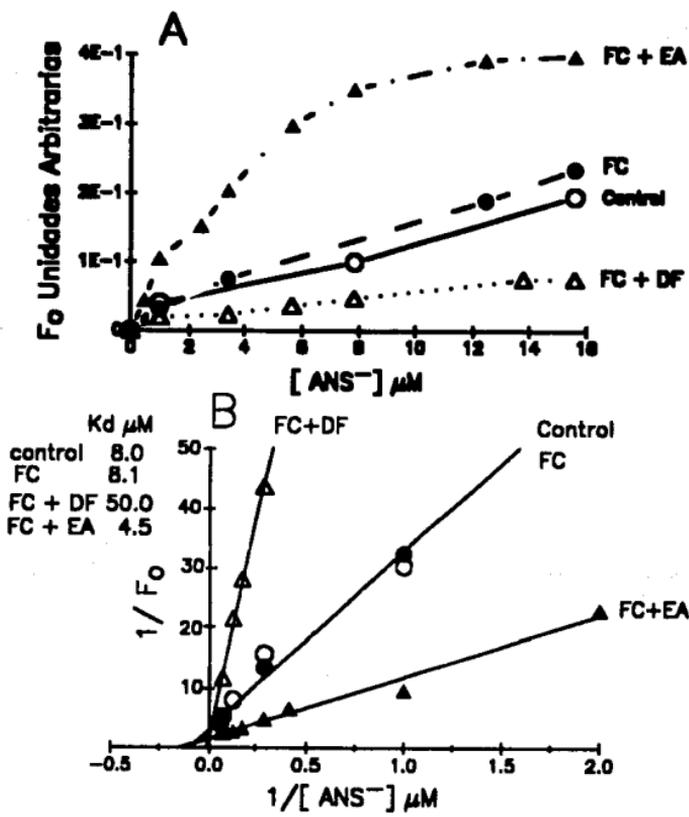


Figura 16. Titulación de los cromatóforos y estimación de K_d para ANS en las diferentes preparaciones de membrana. A) Fluorescencia en unidades arbitrarias a las diferentes concentraciones de ANS. B) gráfico de dobles recíprocos para los datos de la fig 16A.

presencia de potencial de superficie; K^0d es la constante de disociación de la molécula en ausencia de potencial de superficie; $\Delta\psi$ es el cambio en el potencial de superficie.

Por lo tanto, es posible determinar el cambio en el potencial de superficie de acuerdo con el cambio en las Kd para el ANS, con base en la siguiente ecuación:

$$\Delta\psi = RT/ZF \ln(Kd/Kd_0) \dots \dots \dots (9)$$

En donde Kd es igual a la cte de disociación para el ANS en membranas controles y Kd_0 es igual a la cte de disociación del ANS en las preparaciones fusionadas con liposomas.

Asimismo, la ecuación análoga en función de las Km de las diferentes preparaciones de membrana:

$$\Delta\psi = RT/ZF \ln(Km/Km_0) \dots \dots \dots (10)$$

En donde Km corresponde a las membranas sin modificar y la Km_0 corresponde a las preparaciones con la Km modificada.

En la tabla se observan los cambios en el potencial de superficie calculados con la Kd para el ANS, los cuales deberían coincidir con los cambios obtenidos utilizando la Km . Los resultados sugieren que el potencial de superficie no altera la afinidad del sustrato a la enzima. Es decir no se modificó la accesibilidad del sustrato a la enzima.

accesibilidad del sustrato a la enzima.

Diferencias en el potencial de
superficie $\Delta \psi$ en mV

Preparación de membrana	Calculado a partir de la Kd para ANS	Calculado a partir de las Km
Cromatoforos +PC	-0.3	0
Cromatóforos + PC +PC	-46.2	0
Cromatóforos + PC + EA	14.0	0

III.6.3. MODIFICACION DEL POTENCIAL DE SUPERFICIE DEL CROMATOFORO CON DETERGENTES ANIONICOS O CATIONICOS.

Dado que durante la fusión de los liposomas con los cromatóforos se modificó la velocidad máxima de la reacción (V_{max}) y no la K_m , se empleó otro método para alterar la carga de superficie del cromatóforo. El segundo tipo de metodología empleado, consistió en incubar los cromatóforos con detergentes aniónicos o catiónicos como se indica en "Material y Métodos", los cuales se particionan en la membrana del cromatóforo y modifican el potencial de superficie del cromatóforo. Los detergentes empleados fueron el aniónico SDS⁻ y el catiónico CTAB⁺ a una concentración de 200 μM (el cmc del SDS es 1.0 mM y del CTAB es 8.0 mM). Se determinaron las constantes cinéticas en presencia de la variación en la concentración del sustrato y 1mM de Mg^{2+} libre constante en las diferentes preparaciones de membrana: cromatóforos incubados en SDS, cromatóforos incubados en CTAB y el control. En la figura 17A no se observa ninguna modificación en la K_m ni en la V_{max} de estas preparaciones de membrana. Asimismo, al variar el Mg^{2+} libre y fijar la concentración de sustrato en 0.5 mM no aprecia ninguna alteración en la constante de activación de la enzima (Fig 17B).

III.7. ESTIMACION DE LA MODIFICACION DEL POTENCIAL DE SUPERFICIE EN EN LAS DIFERENTES PREPARACIONES DE MEMBRANA.

De igual manera que las membranas fusionadas con liposomas, se procedió a titular con ANS las preparaciones de membrana incubadas con detergentes aniónicos o catiónicos. Se obtuvo la K_a

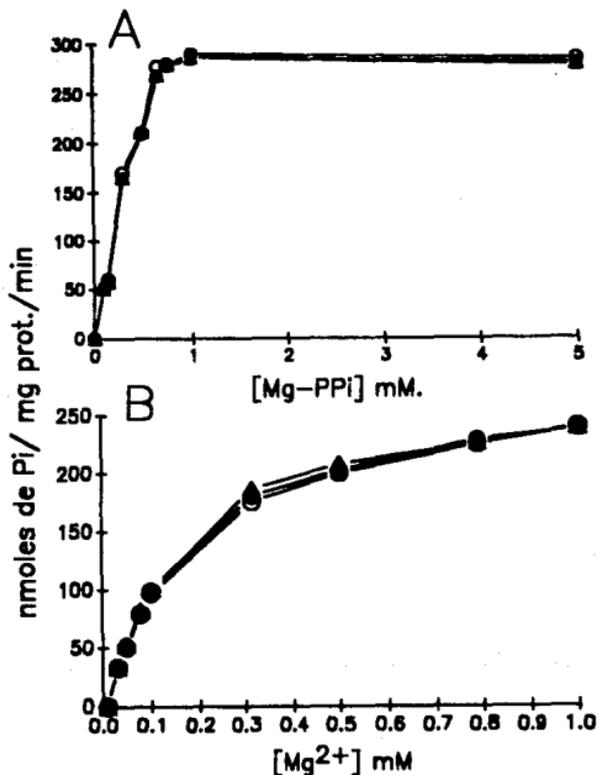


Figura 17. Cinética de las preparaciones de membrana preincubadas en SDS y CTAB. A) Actividad hidrolítica a diferentes concentraciones del complejo Mg-PPi y 1 mM de Mg²⁺ libre. B) Activación de la hidrólisis del Mg-PPi a diferentes concentraciones de Mg²⁺ libre y una concentración fija de Mg-PPi en 0.5 mM

para el ANS en las tres preparaciones de membrana. Se puede apreciar (Fig. 18) que la K_d para las preparaciones con SDS es más grande (29.4 mM) que la K_s del control (10.3 mM). Asimismo para las preparaciones con CTAB la K_d para el ANS (6.3 mM) es menor que la K_d del control (10.3 mM), lo que quiere decir que el potencial de superficie se modificó en las diferentes preparaciones. Dado que la K_m para estas preparaciones y la cinética de activación no se modificó, se concluye que el potencial de superficie no modula la accesibilidad del sustrato a la pirofosfatasa de membrana.

De la misma manera que se calculó, el cambio del potencial de superficie en la fusión de cromatóforos con liposomas, acorde con las ecuaciones 9 y 10, se calculó la diferencia de potencial para estas preparaciones:

Diferencia en el potencial de superficie $\Delta \psi$ en mV.

Preparación de membrana	Calculada a partir de la K_d para ANS	Calculada a partir de la K_m
Cromatóforos incubados con SDS	-26.4 mV	0
Cromatóforos incubados en CTAB	12.4 mV	0

Esta falta en la modulación del potencial de superficie

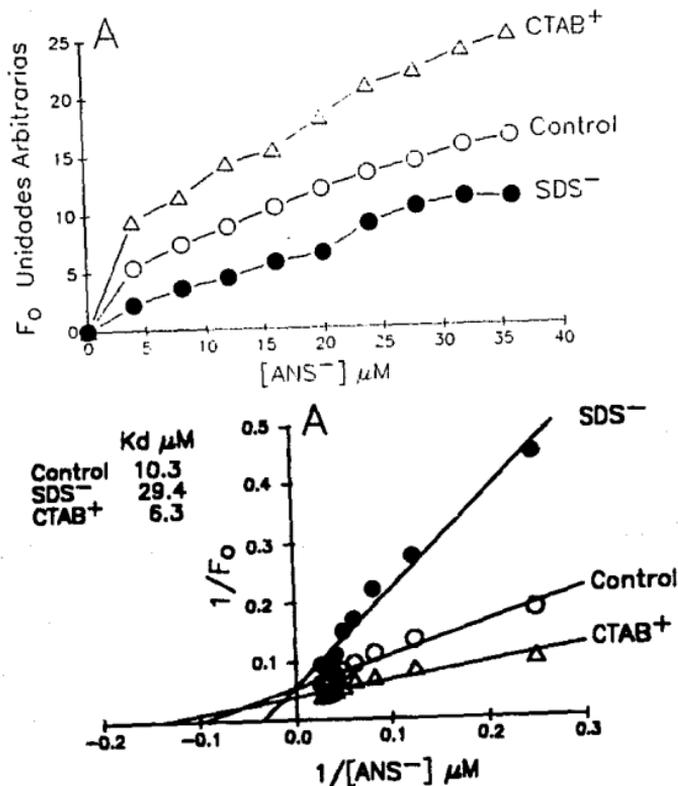


Fig 18. Titulación con ANS de las preparaciones de membrana preincubadas con SDS y CTAB. A) Fluorescencia en unidades arbitrarias a diferentes concentraciones de ANS. B) gráfico en dobles recíprocas de la sección A.

sobre la actividad de hidrólisis, puede deberse a que el sitio activo de la pirofosfatasa de membrana se encuentra a una distancia mayor de los 30 Å de la superficie de la membrana, ya que entre los 0 y los 30 Å es donde el potencial de superficie ejerce su acción. Esto es muy raro, ya que una gran cantidad de enzimas y acarreadores que se encuentran en la membrana son modificados por el potencial de superficie e inclusive enzimas citoplásmicas que son adheridas a una matriz con carga, presentan modificada la K_m para el sustrato por la influencia del potencial de superficie.

Por todo esto se concluye que la potencial de superficie no modifica la accesibilidad del sustrato a la enzima, lo que se reflejaría en cambios en la K_m , tanto para el sustrato como para el activador, asimismo, la activación del Mg^{2+} libre demostrada en la primera parte de la tesis, se debe al efecto directo del magnesio sobre la pirofosfatasa, lo cual apoya la presencia de sitios de pegado para el magnesio en diferentes pirofosfatas citoplásmicas, con un papel modulador de la actividad de estas enzimas.

III.8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

El complejo catalítico de la pirofosfatasa de membrana es el complejo ternario formado por pirofosfatasa-(Mg)-(Mg-PPi). La formación de este complejo se lleva a cabo a través mecanismo cinético ordenado en condiciones de equilibrio rápido, en donde el pegado del Mg^{2+} libre precede al del sustrato, es decir sin la adición del Mg^{2+} libre a la enzima, esta no reconoce al sustrato.

El mecanismo de la reacción puede escribirse:



A diferencia del modelo cinético de Randahl (1979) para la pirofosfatasa de membrana de la misma bacteria, se eliminó la formación del complejo E-(Mg-PPi), previo al pegado del Mg^{2+} libre.

El estudio con inhibidores competitivos, permite concluir que la cinética de hidrólisis presenta un mecanismo ordenado, aunque no es claro, si la simplificación de un mecanismo en equilibrio rápido es la más adecuada o se requiere plantear una ecuación de velocidad en estado estacionario, por lo que es importante continuar este análisis.

Es importante hacer notar que las pirofosfatasas, tanto citoplásmicas como de membrana, son activadas por magnesio libre, aunque existen ciertas diferencias, como el intervalo de concentración donde ejercen su papel. Asimismo, en la PPIasa citoplásmica de levadura, se encontró un mecanismo ordenado donde se añade antes el sustrato que el activador. Estas diferencias podrían tener alguna razón en función de la regulación "in vivo"

entre las pirofosfatas.

La modificación de potencial de superficie, no produjo efecto sobre la K_m del sustrato, lo cual indica que las modificaciones en el potencial de superficie no modula la actividad de la enzima. Una explicación de este hecho, sería la magnitud de la distancia entre el sitio activo de la enzima y la superficie de la membrana de la bacteria.

Proponemos que el estudio de la pirofosfatasa de membrana es un modelo experimental de la transducción de energía entre un enlace de alta de energía y la translocación de protones de manera reversible. Es por lo tanto importante considerar al protón como una parte más de la reacción, para lo cual se debería calcular la estequiometría protón/PPi. Asimismo, plantear modelos considerando al sustrato, al activador y al protón. Por lo que sería importante conocer si los efectos de activación del Mg^{2+} libre, se reflejan en el bombeo de protones.

Por otro lado Nyren y col, (1991) reportaron una purificación de la pirofosfatasa de membrana con una columna de afinidad, en el laboratorio hemos reproducido parcialmente la purificación de la proteína, lo que permitiría abrir nuevos enfoques en nuestra investigación, como por ejemplo conocer aspectos de la estructura de esta enzima, conocer el número de subunidades que contiene la proteína, determinar la estequiometría del pegado de los metales a la enzima, y corroborar, por métodos directos el mecanismo propuesto para la enzima. También se podrían hacer estudios de modificación química y espectrofotométricos para correlacionar

aspectos entre la estructura y la función de la proteína.

BIBLIOGRAFIA

- Baccarini-Melandri, A. y Melandri B.A., (1978) En: The photosynthetic Bacteria (Clayton R.K. y Sistrom, W.R eds) Plenum. Press. New York y London, pp. 615-628.
- Barry, B. S. y Dunaway-Mariano, D., (1987) The Kinetics of Yeast Inorganic Pyrophosphatase. Arch. Biochem. Biophys. **259**, 196-203.
- Baltscheffsky, H., von Stedingk, L.V., Heldt, M.W. y Klingenberg, M., (1966a), Inorganic pyrophosphate: Formation in bacterial photophosphorylation, Science, **153**, 1120-1121.
- Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H., y von Stedingk, L.V., (1966b), Light-induced energy conversion and the inorganic pyrophosphatase reaction in chromatophores from Rhodospirillum rubrum, Brookhaven Symp. Biol. **19**, 246-257.
- Baltscheffsky, M., (1967a) Inorganic Pyrophosphate as an Energy in photosynthetic and Respiratory electron transport phosphorylation system. Biochem. Biophys. Res. Commun. **28**,
- Baltscheffsky, M., (1967b) Inorganic Pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from R. rubrum, Nature (London). **216**:241-243.
- Baltscheffsky, M., (1968) Inorganic Pyrophosphatase as energy donor in photosynthetic and respiratory structures, en: Regulatory Functions of Biological Membranes (J. Jarnefelt, ed.) B.B. Libr. **11**:277-286.
- Baltscheffsky, M., (1969) Energy conversion-linked changes of carotenoid absorbance in Rhodospirillum rubrum chromatophores. Arch. Biochem. Biophys. **130**, 646-652.
- Baltscheffsky, M. y Nyren P., (1986a) The synthesis and utilization of inorganic Pyrophosphate en: Bionergetics (ed. Ernester, L.). Elsevier Science Publishers.
- Baltscheffsky, M. y Nyren, P., (1986b). Preparations and Reconstitution of proton-pumping Membrane-Bound Inorganic Pyrophosphatase. en: Methods in Enzymology (Ed. Purich, D.L.) Vol **126**. pp: 538-545 Academic Press. New-york London.
- Black, C.C. (1987) PPI Metabolism and its regulation by fructose 2-6 biphosphate in plants. En Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in microorganisms.

(ed. Torriani-Gorni). American Society for Microbiology. Washington, D.C.

- Baykov, A.A., Volk, E.S. y Unguryte, A.A., (1989) Inhibition of inorganic pyrophosphatase of animal mitochondria by calcium. Arch. Biochem. Biophys. 273, 287-291
- Butler, L.G., (1971) en: The Enzymes (Ed. Boyer, P.D.) 3a. Ed. Vol. 4, pp. 529-541, Academic Press, New York.
- Celis, H., Romero, I., y Gómez-Poyou, A., (1985) The Phosphate-Pyrophosphate exchange and hydrolytic Reactions of the Membrane-Bound Pyrophosphatase of Rhodospirillum rubrum: Effects of Mg²⁺, phosphate and pyrophosphate. Arch. Biochim. Biophys. 236, 766-774.
- Celis, H., y Romero, I., (1987) The phosphate-pyrophosphate Exchange and Hydrolytic reactions of Membrane-bound Pyrophosphatase of Rhodospirillum rubrum: Effects of pH and Divalent Cations. J. Bionerg. Biomech. 19, 225-271.
- Clayton R.K. (1963) Toward the isolation of a photochemical reaction center of Rhodospseudomonas sphaeroides. Biochem et Biophysica. Acta. 75. 312-323.
- Clayton, R.K. y Sistrom W.R. (1978) The Photosynthetic Bacteria. New York y London. Plenum Press.
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.B., Stainer, R.Y., 1957. The kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. J. Cell. Comp. Physiol. 49,
- Cooperman, B.S., Panakal, A., Springs, B., Hann, D.J., (1981) Divalent Metal Binding and Inorganic Phosphate Analogue Binding to Yeast Inorganic Pyrophosphatase. 20, 6051-6060.
- Cooperman, B.S., (1982) The Mechanism of action of Yeast Inorganic Pyrophosphatase. en: Methods in Enzymology (Ed. Purich, D.L.) Vol. 87, Parte C, pp. 526-548, Academic Press. New York y London.
- Dawes, A.E. (1986) Microbial Energetics. Blackie & Sons. Glasgow.
- Dupaix, A. Johannin, G. y Arrio B., (1989) ATP synthesis and pyrophosphate-driven protpn transport in tonoplast-enriched vesicles isolated from Chararantus roseus. FEBS lett. 249, 13-16.
- Eisenbach, M. y Caplan, S.R., (1979) The light driven proton pump of Halobacterium halobium: mechanism and

function. Current Topic in Membranes and Transport. 12, 165-248.

- Fabiato A. (1988) Computer programs for calculating total from specified free or free specified total ionic in aqueous solutions containig multiple metals and ligands. In Methods in Enzymology. (Fleisher S. y Fleisher B. eds.) Vol 157, pp 378-417. Academic. Press. New York y London.
- Fisher, R.R. y Guillory, R.J.,(1969) Partial resolution of energy-linked reactions in Rhodospirillum rubrum chromatophores. FEBS Lett. 3, 27-35.
- Fiskie , C.A. y Subarrow, Y., (1925) The colorimetric determination of phosphorus. J.Biol. Chem. 177, 751-756
- Flodgaard, H. y Fleron, P., (1974) Thermodynamic parameters for the hydrolysis of inorganic pyrophosphate pH 7.4 as a function (Mg²⁺), (K⁺) an ionic strength determined from equilibrium studies of the reaction. Biol. Chem.11, 3465-3474.
- Fromm, J.H. (1979). Use of competitive inhibitors for study substrate bindig order. In Methods in Enzymology. (Purich Ed) Vol 63 pp 234-250. Academic Press. New-York and London.
- García, F.A. y Drews G., (1984) Properties of membrane fractions prepareded by chromatophore-liposome fusion. Z. Naturforsch. 39c,1112-1119.
- Gottschalk. (1986) Bacterial Metabolism. New York and Berlin. Springer Verlang.
- Guillory, R.J. y Fisher, R.R. (1972) Studies on the lighth-dependent synthesis of inorganic pyrophosphatase by Rhodospirillum rubrum. Biochemical Journal 129, 471-481.
- Guyenn, R.W., Veloso, D., Randolph, L. y Veech, R., (1973) The concentration and control of cytoplasmic free inorganic pyrophosphate in rat liver in vivo. Biochem. J. 140, 369- 375
- Harold, F.M., (1972) Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. Bacteriological Rev. 36, 172-230.
- Harold, F.M. (1986) The vital force: a study of bionergetics. New York. Feeman Company. pp 577.

- Harvey, G.W. y Keister, D.L. (1981) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria: Pi - HOH Oxygen Exchange catalyzed by Membrane-bound inorganic Pyrophosphatase of Rhodospirillum rubrum. Arch. Biochem. Biophys. 200, 426-430.
- Isaev, P.I., Liberman, E.A., Samuilov, V.D., Skulachev, V.P. y Tsofina, L.M., (1970) Conversion of Biomembrane produced energy into Electric Form. Biochim. Biophys. Acta. 216, 22-29.
- Johansson, B.C., (1975) Partial resolution of the energy transfer system in chromatophores from R. rubrum, purification and characterization of the "coupling factor" ATPase, Ph.D. Thesis, University of Stockholm.
- Josse, J., (1971) en: The Enzymes, (Ed. Boyer, P.D.) 3era. Ed. Vol. 4, pp. 499-527. Academic Press, New York.
- Keister, D.L. y Yike, N.J., (1967) Energy-Linked reactions in photosynthetic bacteria. II The energy-dependent reduction of oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in chromatophores of R. rubrum. Biochemistry 6, 3847-3857.
- Keister, D.L. y Minton, N.L. (1971) ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in Rhodospirillum rubrum chromatophores. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 932-939.
- Keister, D.L. y Minton, N.L. (1971) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. VI Inorganic pyrophosphate-driven ATP synthesis in Rhodospirillum rubrum. Arch. Biochem. Biophys. 147, 330-338.
- Kelly, S., Feldman, F., Sperow. y Butler., (1973) Kinetic effects of inorganic pyrophosphate analogs on several inorganic pyrophosphate hydrolysing enzymes. Biochemistry. 12, 3338-3341.
- Keltjens T., Erp, R., Mooijart, R., Drift, C. Vogels. (1988) Inorganic pyrophosphate synthesis during methanogenesis from methylcoenzyme M by cell-free extracts of Methanobacterium thermoautotrophicum (strain AH). Eur. J. Biochem. 172, 471-476.
- Klemme, B., Klemme, J.H. y San Pietro, A. (1971). PPIase, ATPase and Photophosphorylation in Chromatophores of R. rubrum: Inactivation by phospholipase A, Reconstitution by phospho lipids. Arch. Biochem. Biophys. 144, 339-342.

- Klemme, J.H. y Gest, H., (1971) Regulation of the Cytoplasmic Inorganic Pyrophosphatase of *Rs. rubrum*. *Eur. J. Biochem.* **22**, 529-537.
- Klemme, J.H., Klemme, B. y Gest, H. (1971) Catalytic Properties and regulatory diversity of inorganic Pyrophosphatases from Photosynthetic Bacteria, *J. Bacteriol.* **100**, 1122-1128.
- Klemme, J.H. y Gest, H. (1971) Regulatory properties of an Inorganic Pyrophosphatase from the Photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 721-725.
- Knighth, W.B., Fitts, W.S. y Dunaway- Mariano (1981) Investigation of the catalytic mechanism of yeast inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry.* **20**, 4079-4086.
- Knight, W.B., Dunaway-Mariano, D., ransom, S.C. y Villafranca, J.J., (1984) Investigations of the metal ion-binding sites of yeast inorganic pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* **259**, 2886-2893
- Lahti, R. 1983. Microbial Inorganic Pyrophosphatases, *Microbiol. Rev.* **47**: 169-179.
- Lawson, J.W.R., Guynn, R.W., Cronell, N. y Veech, R.L. (1976) en: *Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species.*, (Ed. Hanson, R.W. y M.A. Mehlman), pp. 481, Wiley, New York.
- Laskin, A. I. y Lechevalier. 1980. *Handbook of Microbiology.* vol. I CRC Press.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randal, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Mansurova, S.E., Shakhov, Yu, A. y Kulaev, I.S. (1975) Synthesis of inorganic pyrophosphate by animal tissue mitochondria, *FEBS Lett.* **55**, 94-98.
- Merrick, J.M., (1978) *Metabolism of reserve materials en: Photosynthetic Bacteria* (ed. Clayton, K.R. y Sistrom, R.W.) New York-London Plenum Press.
- Martell, A. y Sillen, L.G. (1971) *Stability Constants of Metal-Ion Complexes: Supplement No. 1, Special Publication No. 25.* The Chemical Society, London.
- Mitchell, P., (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Revs.* **41** 445-502.

- Mitchell, P., (1967) Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: Natural Fuel cells and solar cells. Fed. Proc. **26**, 1370-1379.
- Mitchell, P., (1982) Compartamentation and comunicatio in living systems. Ligand conduction: a general catalitic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems. Eur. J. Biochem. **166**, 255-272.
- Moe, O.A. y Butler L.G., (1972) Yeast inorganic pyrophosphatase. II Kinetics of Mg^{2+} activation. J. Biol. Chem. **247**, 7308-7314.
- Morrison, F.J., (1973) Aprouches to kinetics studies on metal activated enzymes. (Ed. Purich). vol 63: 257-294 Elseviers Publishers Amsterdam.
- Moyle, J., Mitchell, R., y Mitchell, P., (1972) Proton-translocating pyrophosphatase of *Rs. rubrum* FEBS Lett. **23**, 233-236.
- Nalecz, M., Zborowski, J., Famulski, K. y Wojtczak, L., (1980) Effect of phospholipid composition onthe surface potential of liposomes and the activity of enzymes incorporated into liposomas. Eur J. Biochem. **112**, 75-80.
- Nicholls, D.G. 1982. Bioenergetics: An introduction chemiosmotic theory. London and New York. Academic Press.
- Nishikawa, K., Hosi, K., Suzuki, J., Yoshimura, S. y Horio, T. (1973) Formation and Descomposition of Pyrophosphate Related to Bacterial Photophosphorylation. J. Biochem. **73**, 537-553.
- Nore, B.F., Husain, I., Nyren, P. y Baltscheffsky, M. (1986) Synthesis of pyrophosphate cojpled to the reverse energy linked transhydrogenase reactions. in: Rhodospirillum rubrum chromathophores. FEBS Lett. **200**, 133-139.
- Nyren, P. y Baltscheffsky, M. (1983) Inorganic pyrophosphate-driven ATP-synthesis in liposomes containing membrane-bound inorganic pyrophosphatase and Fo-F₁ complex from Rhodospirillum rubrum FEBS Lett. **155**, 125-130.
- Nyren, P., Hajnal, K., y Baltscheffsky, M. (1984) Purification of the membrane-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase from *Rs. rubrum* Biochim. Biophys. Acta. **766**, 630-635.

- Nyren, P., Nore, F.B. y Baltscheffsky, M., (1986) Inorganic pyrophosphate synthesis after a short light flash in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Photobiology and Photobiophysics* **11**, 185-196.
- Nyren, P., Nore, F. y Strid, A., (1991) Proton pumping N.N'-dicyclohexylcarbodiimida-sensitive inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: purification, Characterization and reconstitution. *Biochemistry* **30**, 2883-2887.
- Pnefinig, N., y Truper, H.G., (1971) Higher taxa of the phototrophic bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**, 17.
- Pfennig, N., y Truper, H.G., (1974) The phototrophic bacteria, en: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed. (Editores: R.E. Buchanan y N.E. Gibbons), pp. 24-64. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Randahl, H. (1979) Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in *Rhodospirillum rubrum*, *Eur. J. Biochem.* **102**, 251-256.
- Rao, P.V., y Keister, D.L. (1978) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. Solubilization of the Membrane-bound energy-linked inorganic pyrophosphatase of *Rs. rubrum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84**, 465-473.
- Rapoport, T.A., Hühne, W.E., Heitman, P.R., Rapoport, S.M., (1972) A kinetic model for the action of the inorganic pyrophosphatase from baker's yeast. The activity influence of magnesium ions. *Eur J. Biochem.* **26**, 237-246.
- Rea, P.A., y Poole, J.R. (1985) Proton translocating inorganic pyrophosphatase in red beet (*Beta vulgaris* L.) Tonoplast vesicles. *Plant Physiol.* **77**, 46-52.
- Reeves, E.R., South, J.S., Blytt, J.H., Warren, G.C. (1974) Pyrophosphate: D-fructuosa 6-phosphate 1-phosphotransferasa. *J. Biol. chem.* **249**, 7737-7741.
- Reeves, E.R., (1976). How useful is the energy in inorganic pyrophosphate? *Trends in Biochemical Sciences* **1**, 53-55.
- Renosto, F., Seubert A. P. y Segel H.I. (1985) Adenosine 5'-phosphosulfate kinase form *Penicillium chrysogenum*. Determinating ligand dissociation constants of binary and tertiary complexes from the kinetics of enzyme inactivation. *J. Biol. Chem.* **260**, 11903- 11913.

- Ridlington, W.J. y Butler, G.L. (1972) Yeast inorganic pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* **247**, 7303-7307.
- Robertson, E.D. y Rottemberg, H., (1983) Membrane potential and surface potential in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **258**, 11039-11048.
- Rogers, A.J., (1983). *Bacterial cell structure*. Workingham: Van Nostrand Reinhold (U.K.)
- Romero I, Gomez-Priego a, Celis, H. (1991) A membrane-bound pyrophosphatase from respiratory membranes of Rhodospirillum rubrum. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2611-2616.
- Segel, I. (1975) *Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme kinetics*. New York. John Wiley & Sons.
- Schiff, J.A., (1972) A green safelight for the study of Chloroplast Development and other Photomorphogenetic Phenomena, en: *Methods in Enzymology* (Ed. San Pietro, A.) Vol. 24, Parte B, pp. 321-322. Academic Press. New York, London.
- Scholes, P. Mitchell, P. y Moyle, J. (1969) The polarity of proton translocation in some Photosynthetic microorganisms. *Eur. J. Biochem.* **8**, 450-454.
- Schwarm, H. S., Vogenschow y Knobloch, K., (1986) Kinetics characterization and partial purification of the membrane-bound inorganic pyrophosphatases from Rhodospseudomonas palustris. *J. Biol. Chem.* **367**, 127-133.
- Shakov, Y.A., Nyren, P. y Baltscheffsky, M. (1982) Reconstitution of highly purified proton translocating pyrophosphatase from Rhodospirillum rubrum. *FEBS. Lett.* **146**, 177-180.
- Strid, A. Karlsson, M.J. y Baltscheffsky, M (1987) Demonstration of pH and induced synthesis of inorganic pyrophosphatase from Rhodospirillum rubrum. *FEBS. Lett.* **224**, 348-352.
- Summer, J.B. (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science.* **100**, 413-415.
- Trupper, H.G. (1971) Higher taxa of the phototrophic bacteria. *Int. Syst. Bacteriol.* **21**, 217-220
- Theuvsenet, A. y Borst-Pawlows, G. (1976) The influence of surface charge on the kinetics of ion translocation across biological membranes. *J. Theor. Biol.* **57**, 313-329.

- Unguryte, A. Smirnova, N, Baykov, A., (1989) Kinetics models of action of cytosolic and mitochondrial inorganic pyrophosphatases of rat liver. Arch. Biochem. Biophysics. 273,292-300.
- van Niel, C.B., (1935) Photosynthesis of bacteria, Harbor Symp. Quant. Biol. 3, 138-150.
- Volk, S.E., Baykov, A., Duzhenico, S., Avaeva, M., (1982) Kinetics studies on the interaction of two forms of inorganic pyrophosphatases of heart mitochondria with physiological ligands. Eur. J. Biochem. 125, 215-220.
- Woese, C.R., (1987) Bacterial Evolution. Microbiol. Rev. 51. 221-271.
- Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, W.L. (1990). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87. 4576-4579.
- Wood, H.G., (1977) Some reactions in wich inorganic pyrophosphate replaces ATP and serves as source of energy. Fed. Proc. 36, 2197-2205.
- Wotczack, L. y Nalecz, M., (1979) Surface charge of biological membranes as possible regulator of membrane-bound enzymes. Eur. J. Biochem. 96, 99-107.

Mg²⁺ is an essential activator of hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*

Alejandro SOSA, Héctor ORDAZ, Irma ROMERO and Helodoro CELIS*

Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F. México

The substrate for the hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase is the PP_i-Mg²⁺ complex. The enzyme has no activity when the free Mg²⁺ concentration is lower than 10 μM (at 0.5 mM-PP_i-Mg²⁺), and therefore free Mg²⁺ is an essential activator of the hydrolytic activity. The K_m for the substrate changes in response to variation in free Mg²⁺ concentration, from 10.25 to 0.6 mM when free Mg²⁺ is increased from 0.03 to 1.0 mM respectively. The K_m for Mg²⁺ depends on the substrate concentration: the K_m decreases from 0.52 to 0.14 mM from 0.25 to 0.75 mM-PP_i-Mg²⁺ respectively. The extrapolated K_m for Mg²⁺ in the absence of the substrate is 0.73 mM. Imidodiphosphate-Mg²⁺ and free Ca²⁺ were used as competitive inhibitors of substrate and activator respectively. The equilibrium binding kinetics suggest an ordered mechanism for the activator and the substrate: Mg²⁺ ions bind the enzyme before PP_i-Mg²⁺ in the formation of the catalytic complex, membrane-bound pyrophosphatase-(Mg²⁺)-(PP_i-Mg²⁺).

INTRODUCTION

Membrane-bound pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) of *Rhodospirillum rubrum* chromatophores catalyses not only the hydrolysis of pyrophosphate but also the synthesis of pyrophosphate with energy derived from photosynthetic electron transport (Balscheffsky, 1978; Baccarini-Melandri & Melandri, 1978). Pyrophosphate hydrolysis in the chromatophore membrane is linked to the electrogenic translocation of protons in a fully reversible process (Balscheffsky 1968; Keister & Minton, 1971; Moyle *et al.*, 1972).

Most inorganic pyrophosphatases, both cytoplasmic and membrane-bound, use the PP_i-Mg²⁺ complex as the real substrate for hydrolysis; free PP_i⁻ is an inhibitor of this reaction (Lathi, 1983).

Randhal (1979) suggested that Mg²⁺ ions modulate the properties of the enzyme. Indeed, it has been shown (Celis *et al.*, 1985) that P_i/PP_i exchange reaction and pyrophosphate hydrolysis catalysed by membrane-bound pyrophosphatase have sharply different requirements for Mg²⁺ ions. In the same way, Celis & Romero (1987) have demonstrated that the two reactions have a markedly different pH requirement.

Studies on the effect of bivalent cations on the hydrolytic reaction and P_i/PP_i exchange (Celis & Romero, 1987) show that Mn²⁺ and Co²⁺ partially support the P_i/PP_i exchange reaction (50%), whereas bivalent cations such as Zn²⁺ and Ca²⁺ do not. In the hydrolytic reaction, Zn²⁺ at low concentration can replace Mg²⁺ in the formation of the substrate. In the presence of high concentrations of substrate for the hydrolysis (PP_i-Mg²⁺), free bivalent cations are inhibitory.

These sets of observations suggest that bivalent cations and protons regulate the catalytic properties of membrane-bound pyrophosphatase. However, it is difficult to determine the regulatory effect of free Mg²⁺ on hydrolytic activity because, as has been stated, it also forms the substrate complex. The regulatory properties and kinetics of Mg²⁺ activation of cytoplasmic pyrophosphatase have been studied previously (Klomme & Gest, 1971; Moe & Butler, 1972a; Barry & Dunaway-Mariano, 1987). However, to our knowledge, these properties have not been studied for a membrane-bound pyrophosphatase. Since this

pyrophosphatase is coupled to the proton gradient, whereas the cytoplasmic enzyme is not, the study of the regulation of the membrane-bound enzyme is important for the understanding of the mechanism of energy transduction. In the present work, the role of free Mg²⁺ as an essential activator of the hydrolytic reaction of membrane-bound pyrophosphatase was studied. An ordered mechanism for the hydrolytic activity of the enzyme is suggested in which Mg²⁺ binds to the enzyme before PP_i-Mg²⁺ in the formation of the catalytic complex.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial growth and preparation of chromatophores from wild-type *R. rubrum*

Wild-type *R. rubrum* A.T.C.C. 11170 was grown anaerobically in the light (tungsten lamps of 40 W at 30 cm) at 30 °C in a medium described by Cohen-Bazile *et al.* (1957). Bacterial cells were harvested in the late-exponential phase.

The cells were washed with 50 mM-KCl/50 mM-Mops buffer, pH 7.5, and chromatophores were prepared by sonication for 2 min in an MSE sonicator at full power, in 10 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.5. After centrifugation at 26000 g for 20 min, the supernatant was collected and centrifuged at 105000 g for 90 min. The residual Mg²⁺ was eliminated from the chromatophores by washing with 5 mM-EDTA/5 mM-EGTA/10 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.5, followed by a second washing with 10 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.5. The final pellet was resuspended in 10 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.5, at a protein concentration of 30–35 mg/ml. The chromatophore preparation was kept at 4 °C and used within the next 3 days. No change in the hydrolytic activity was detected within this time. Protein was determined by the method of Lowry *et al.* (1951), with BSA as standard.

Hydrolysis of pyrophosphate

The hydrolytic reaction was determined in the dark with a green safety light under the conditions described in the Results and discussion section. The reactions were initiated by adding the chromatophores to the reaction medium, and were arrested with 6% (w/v) trichloroacetic acid (final concentration). Phosphate was determined in the supernatant as described by

* To whom correspondence should be addressed.

Flake & Subbarow (1925). In the initial-velocity studies, the maximum amount of PP_i - Mg^{2+} complex hydrolysed was only 15% in 1.5 min; in this period the product formation (phosphate) had no effect on the hydrolytic velocity. Initial velocities are defined as nmol of P_i produced/min per mg of protein.

Calculation of free metal ions, ligands and complex

Concentrations of metal ion complex and free ions in the reaction media were calculated with the computer program of Fabiato (1988), using published association constants for all components of the reaction media. All values were taken from Martell & Sillén (1971) except for the association constant for the formation of Mg^{2+} -EDTA complex, which was taken from Fabiato (1988). In the computations, adjusted values of the association constants suitable to temperature and pH of reaction media were used. The program was run in an IBM AT computer with an arithmetic co-processor.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of free Mg^{2+} on the hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase

The substrate for the hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase is the PP_i - Mg^{2+} complex, and free Mg^{2+} has an apparent activating effect (Randahl, 1979; Celis *et al.*, 1985; Celis & Romero, 1987). In order to investigate the effect of free Mg^{2+} on the hydrolytic activity, free Mg^{2+} concentration was increased from 0.01 μ M to 1.0 mM, keeping PP_i - Mg^{2+} constant at 0.5 mM (Fig. 1). It can be observed that the hydrolytic activity depends strictly on free Mg^{2+} concentration; the apparent K_m for Mg^{2+} ($K_{m,app}$) is 0.28 mM. No PP_i - Mg^{2+} hydrolysis occurs when free Mg^{2+} concentration is lower than 10 μ M. Therefore Mg^{2+} could serve as an essential activator for the hydrolytic activity of the membrane-bound pyrophosphatase, given the Mg^{2+} requirement for substrate recognition by the enzyme.

Effect of free Mg^{2+} on PP_i - Mg^{2+} hydrolysis

In order to determine the effect of free Mg^{2+} on the hydrolytic activity, free Mg^{2+} was fixed at four different concentrations, and for each case the concentration of PP_i - Mg^{2+} was varied (Fig. 2a). An increase in free Mg^{2+} produced an enhanced hydrolytic activity, but hydrolysis depended on substrate concentration in a saturable manner; this is in agreement with the report by

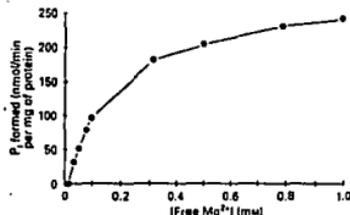


Fig. 1. Effect of free Mg^{2+} on the hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase.

The necessary concentrations of sodium pyrophosphate and $MgCl_2$ were calculated to maintain the PP_i - Mg^{2+} concentration at 0.5 mM and the indicated free Mg^{2+} concentration in presence of 1.0 mM-EDTA. The incubation medium contained 50 mM-Tris/maleate buffer, pH 6.5, and 1 mg of chromatophore protein. Incubation time was 1.5 min.

Schwarm *et al.* (1986) working with the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. The data shown in Fig. 2(a) were replotted as Lineweaver-Burk plots. A small change in K_m was obtained (515 to 482 nmol of P_i /min per mg of protein at fixed Mg^{2+} concentrations of 0.03 to 1.0 mM respectively). When the free Mg^{2+} concentration was raised, the apparent K_m for PP_i - Mg^{2+} ($K_{m,app}$) decreased. The calculated K_m values were 10.25, 2.92, 0.84 and 0.6 mM at free Mg^{2+} concentrations of 0.03, 0.1, 0.5 and 1 mM respectively. Fig. 2(c) shows a linear relationship between the apparent K_m for PP_i - Mg^{2+} obtained from Fig. 2(b) and the reciprocal fixed free Mg^{2+} concentration. The intercept on the ordinate axis (0.17 mM) gives the K_m for PP_i - Mg^{2+} at saturating concentrations of free Mg^{2+} . This is in agreement with the role of free Mg^{2+} as an essential activator for PP_i - Mg^{2+} hydrolysis.

Free Mg^{2+} activation and its dependence on PP_i - Mg^{2+} concentration

The effect of various free Mg^{2+} concentrations was studied at three concentrations of PP_i - Mg^{2+} (Fig. 3a). The increase in hydrolytic activity depended on free Mg^{2+} , but the hydrolytic activity also increased as the concentration of PP_i - Mg^{2+} increased. The calculated V_{max} values were 270.6, 362.9 and 367.3 nmol of P_i /min per mg of protein at 0.25 mM, 0.5 mM- and 0.75 mM- PP_i - Mg^{2+} respectively. The apparent K_m for Mg^{2+} decreased as PP_i - Mg^{2+} concentration increased; the $K_{m,app}$ was 0.51, 0.28 and 0.12 mM for PP_i - Mg^{2+} at 0.25, 0.5 and 0.75 mM respectively. The K_m for Mg^{2+} in the absence of substrate was calculated by interpolation of the intersection point to the abscissa, and a value of 0.73 mM was obtained.

Segel (1975) has described rapid-equilibrium analysis between an essential activator and a substrate, and we have applied this approach to determine the type of mechanism. If the activator concentration is fixed and that of the substrate is varied giving rise to a competitive pattern, and if the substrate concentration is fixed and that of the activator is varied giving rise to a mixed type in the double-reciprocal plot (Figs. 2b and 3b), these patterns are characteristic of an obligate ordered mechanism for the binding of free Mg^{2+} and PP_i - Mg^{2+} , in which Mg^{2+} binds to the enzyme before PP_i - Mg^{2+} . This mechanism contrasts with the pattern described for the yeast cytoplasmic pyrophosphatase, in which the substrate binds to the enzyme before Mg^{2+} ions (Knight *et al.*, 1981).

Imidodiphosphate- Mg^{2+} and free Ca^{2+} as competitive inhibitors of PP_i - Mg^{2+} hydrolysis and activation by free Mg^{2+}

In order to substantiate the ordered mechanism in the formation of the catalytic complex, an imidodiphosphate- Mg^{2+} complex was used as a competitive inhibitor of PP_i - Mg^{2+} hydrolysis. In addition, the effect of Ca^{2+} ions was studied on the activator effect of free Mg^{2+} . The cross-inhibitory patterns (imidodiphosphate- Mg^{2+} versus free Mg^{2+} and free Ca^{2+} versus PP_i - Mg^{2+}) were analysed to clarify whether the binding of PP_i - Mg^{2+} and free Mg^{2+} is ordered or random and whether it is in rapid equilibrium or in a steady state (Segel, 1975; Morrison, 1979).

Imidodiphosphate has been reported to inhibit the cytoplasmic pyrophosphatase of yeast (Kelly *et al.*, 1973). The effect of imidodiphosphate- Mg^{2+} on the hydrolytic activity was analysed by fixing its concentration at 0.5 mM and 1.0 mM while that of the PP_i - Mg^{2+} was varied at fixed free Mg^{2+} concentration (1.0 mM). Fig. 4(a) shows imidodiphosphate- Mg^{2+} as a competitive inhibitor of PP_i - Mg^{2+} hydrolysis, since the K_m for PP_i - Mg^{2+} increased from 0.68 mM to 2.44 mM, whereas V_{max} did not change (331 nmol of P_i /min per mg of protein). These data clearly

Mg²⁺ activation of membrane-bound pyrophosphatase

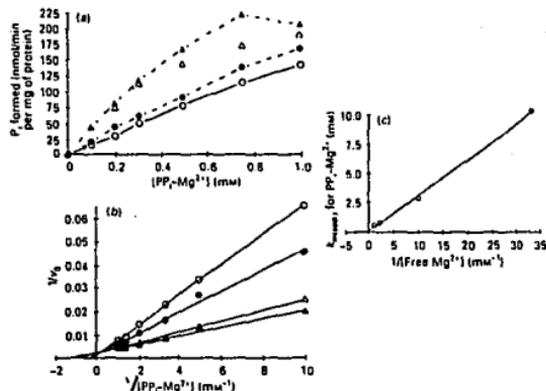


Fig. 2. Effect of free Mg²⁺ ions on the hydrolysis of the PP_i-Mg²⁺ complex

(a) The experimental conditions were as in Fig. 1, but the concentrations of sodium pyrophosphate and MgCl₂ were calculated to have four different concentrations of free Mg²⁺: 0.03 mM (○), 0.1 mM (●), 0.5 mM (△) and 1.0 mM (▲). The apparent K_m for the substrate obtained in (a) was replotted in (c).

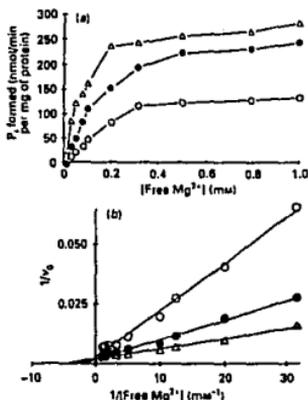


Fig. 3. Dependence of PP_i-Mg²⁺ concentration on the activation of free Mg²⁺

(a) The experimental conditions were as in Fig. 1. The concentrations of sodium pyrophosphate and MgCl₂ were calculated to give three fixed concentrations of PP_i-Mg²⁺: 0.25 mM (○), 0.5 mM (●) and 0.75 mM (▲). (b) Lineweaver-Burk plot of the results from (a)

indicate that imidodiphosphate-Mg²⁺ competes with PP_i-Mg²⁺ for binding to the enzyme-Mg²⁺ complex.

Ca²⁺ is an inhibitor of several types of pyrophosphatase (Banykov *et al.*, 1989; Moe & Butler, 1972b). The effect of free Ca²⁺ on PP_i-Mg²⁺ hydrolysis was analysed by using fixed free Ca²⁺ concentrations while that of free Mg²⁺ was varied and

PP_i-Mg²⁺ was kept at 0.5 mM (Fig. 4b). Lineweaver-Burk analysis shows that free Ca²⁺ acts as a competitive inhibitor of Mg²⁺ activation, since the K_m for Mg²⁺ increased 7-fold, from 0.25 to 1.71 mM, whereas the V_{max} did not change (237 nmol of P_i/min per mg of protein). Free Ca²⁺ binds to the enzyme to form an enzyme-Ca²⁺ complex, competing with free Mg²⁺ binding. The PP_i-Ca²⁺ complex was present in the reaction medium at concentrations ranging from 0.77 mM to 0.907 mM when free Ca²⁺ was fixed at 0.05 mM, and from 0.15 mM to 0.015 mM when free Ca²⁺ was fixed with 0.1 mM. Since a clearly competitive effect of free Ca²⁺ for the activation of free Mg²⁺ is observed, and a mixed-type inhibition is not present, an effect of PP_i-Ca²⁺ on the enzyme can be ruled out.

To complete the analysis, the effect of imidodiphosphate-Mg²⁺ on Mg²⁺ activation and free Ca²⁺ on the substrate was studied. Imidodiphosphate-Mg²⁺ concentration was fixed at 0.1 and 0.15 mM and free Mg²⁺ concentration was varied at PP_i-Mg²⁺ 0.5 mM. Fig. 4(c) shows a change in K_{m,app} from 0.23 to 0.074 mM and a decrease in V_{max} (201 to 150 nmol of P_i/min per mg of protein) showing uncompetitive inhibition. This inhibition pattern is in agreement with rapid equilibrium for the ordered mechanism, indicating that PP_i-Mg²⁺ binds to the enzyme after free Mg²⁺.

Free Ca²⁺ concentration was fixed at 0.05 and 0.1 mM while that of the substrate was varied (with free Mg²⁺ fixed at 1.0 mM). The inhibition pattern again is uncompetitive (Fig. 4a). The K_{app} for Ca²⁺ decrease changed from 0.73 to 0.19 and the V_{max} also decreased from 433 to 118 nmol of P_i/min per mg of protein. These data are not consistent with the predicted inhibition pattern (Table 1); they indicate that free Ca²⁺ binds to the enzyme-substrate complex, but that the PP_i-Ca²⁺ is formed in the reaction medium at a concentration 70 times lower than the substrate at a free Ca²⁺ concentration of 0.05 mM, and 33 times lower than that of PP_i-Mg²⁺ at a free Ca²⁺ concentration of 0.1 mM. For this reason binding constants relevant for Ca²⁺ inhibition in the presence of PP_i-Ca²⁺ are difficult to analyse (Banykov *et al.*, 1989).

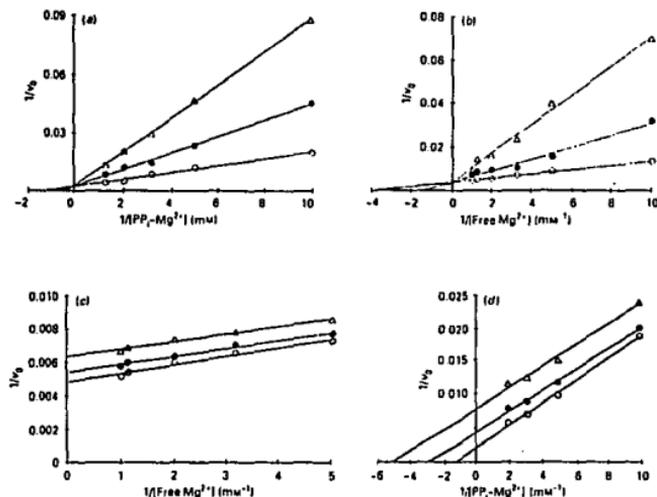


Fig. 4. Inhibition patterns for imidodiphosphate-Mg²⁺ and free Ca²⁺ as inhibitors for the substrate and the activator effect of free Mg²⁺.

The experimental conditions were as in Fig. 1. (a) Lineweaver-Burk plot of initial velocity versus [PP_i-Mg²⁺] at imidodiphosphate-Mg²⁺ concentrations of 0 mM (O), 0.5 mM (●) and 1.0 mM (Δ). (b) Lineweaver-Burk plot of initial velocity versus free Mg²⁺ at free Ca²⁺ concentrations of 0 mM (O), 0.05 mM (●) and 0.1 mM (Δ). (c) Lineweaver-Burk plot of initial velocity versus [free Mg²⁺] at imidodiphosphate Mg²⁺ concentrations of 0 mM (O), 0.1 mM (●) and 0.15 mM (Δ). (d) Lineweaver-Burk plot of initial velocity versus [PP_i-Mg²⁺] at free Ca²⁺ concentrations of 0 mM (O), 0.05 mM (●) and 0.1 mM (Δ).

Table 1. Predicted and observed inhibition patterns from the data of Fig. 4

Types of inhibition: competitive (C), uncompetitive (UC) and non-competitive (NC).

Substrate whose concentration was varied	Inhibitor	Observed inhibition pattern	Predicted inhibition patterns			
			Rapid equilibrium random	Steady-state random	Rapid equilibrium ordered	Steady-state ordered
PP _i -Mg ²⁺	Imidodiphosphate-Mg ²⁺	C	C	C	C	C
Mg ²⁺	Ca ²⁺	C	C	C	C	C
PP _i -Mg ²⁺	Ca ²⁺	UC	C	NC	C	UC
Mg ²⁺	Imidodiphosphate-Mg ²⁺	UC	C	NC	UC	NC

Effect of free PP_i on hydrolytic activity

Free PP_i is present in the reaction medium, and it is an inhibitor of pyrophosphatases (Ridington & Butler, 1972; Lathi, 1983). The concentration of free PP_i was fixed at 0.03, 0.1, 1.0 and 5.0 mM, and that of PP_i-Mg²⁺ was varied for each case (Fig. 5a). An increase in free PP_i has an apparent inhibitory effect on the hydrolytic activity. When free PP_i concentration was kept constant and that of PP_i-Mg²⁺ was varied, there was a decrease in free Mg²⁺ concentration in a constant ratio described by eqn. (1):

$$K_{PP_i, Mg^{2+}} = \frac{[Mg^{2+}][PP_i]}{[PP_i-Mg^{2+}]} = \frac{K_{PP_i, Mg^{2+}}}{[PP_i]} = \frac{[Mg^{2+}]}{[PP_i-Mg^{2+}]} \quad (1)$$

There were no apparent inhibitory effects at 0.03 and 0.1 mM

PP_i, but the corresponding free Mg²⁺ concentrations were enough for the enzyme to recognize the substrate ($K_{m, S}$ at 0.75 mM substrate is 0.12 mM). At 1.0 and 5.0 mM free PP_i, the corresponding concentrations of free Mg²⁺ were at the lower limit for substrate recognition by the enzyme (Table 2). Although there was a high concentration of free PP_i (5.0 mM), the enzyme activity increased in response to variations in substrate concentration. Therefore free PP_i seems to be a weak inhibitor. Since free Mg²⁺ is essential for hydrolytic activity, its decrement produces an inhibitory effect.

The inverse of PP_i-Mg²⁺ concentrations from Fig. 5(a) were squared, and a modified Lineweaver-Burk plot was obtained (Fig. 5b). The latter data indicate an apparent non-competitive inhibition. This effect is not consistent with the previously

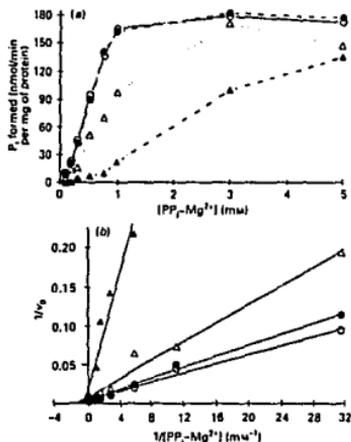


Fig. 5. Effect of the free PP_i on the hydrolytic activity

The experimental conditions were as in Fig. 1. (a) Concentrations of sodium pyrophosphate and $MgCl_2$ were calculated to give four concentrations of free PP_i : 0.1 mM (O), 0.5 mM (●), 1.0 mM (Δ) and 5.0 mM (▲). (b) Double-reciprocal plots of the results from (a).

Table 2. Decrease in Mg^{2+} concentration in the experiment of Fig. 5(a)

Constant PP_i (mM)	Variation in PP_i-Mg^{2+} (mM)	$C = \frac{[Mg^{2+}]_0}{[PP_i]_0 - [Mg^{2+}]_0}$	Variation in free Mg^{2+} (mM)
0.03	0.1 to 5.0	3.3×10^{-2}	0.003 to 0.165
0.1	0.1 to 5.0	1×10^{-2}	0.001 to 0.05
1.0	0.1 to 5.0	1×10^{-3}	0.0001 to 0.005
5.0	0.1 to 5.0	2×10^{-4}	0.00002 to 0.001

reported competitive inhibition for other pyrophosphatases (Josse, 1966). The observed inhibition is probably due to a decrease in Mg^{2+} concentration, although an additional inhibitory effect by free PP_i cannot be ruled out.

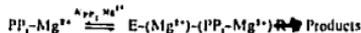
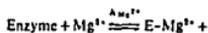
CONCLUSION

Free Mg^{2+} is an essential activator for the hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of *R. rubrum*. The catalytic complex is enzyme-(Mg^{2+})-(PP_i-Mg^{2+}). The binding of Mg^{2+} modifies the enzyme's affinity for the substrate; a similar effect was described from cytoplasmic pyrophosphatase of yeast (Knight *et al.*, 1981) and for cytosolic and mitochondrial pyrophosphatases (Unguryte *et al.*, 1989). In the above-mentioned pyrophosphatases, three bivalent cations per active site are required for activity (Cooperman, 1982; Unguryte *et al.*, 1989). One of these metal ions binds to PP_i to form the substrate. For *R. rubrum*, the number of Mg^{2+} ions that bind to the enzyme is not known.

The binding of the substrate (PP_i-Mg^{2+}) produces an increase in free Mg^{2+} affinity for the enzyme (Fig. 3a). The K_m for Mg^{2+}

is 0.73 mM in the absence of substrate. The rapid-equilibrium treatment between the essential activator and the substrate suggests an ordered mechanism in which free Mg^{2+} binds to the enzyme before the substrate. For the cytoplasmic pyrophosphatase of yeast, Barry & Dunaway-Mariano (1987) proposed an ordered mechanism in which the substrate binds to the enzyme before Mg^{2+} . In the case of slow substrates such as $C(11)_2O_2PP_i$, the binding steps are in rapid equilibrium, whereas for PP_i-Mg^{2+} , the binding steps are in a steady state. In contrast, in *R. rubrum*, when PP_i-Mg^{2+} is used as the substrate, the binding steps are in rapid equilibrium. Studies of competitive inhibition suggest an ordered mechanism which may be rapid equilibrium or steady state. Formulation of a complete model should be the goal of future research.

The proposed model for rapid-equilibrium kinetics for the hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of *R. rubrum* is:



In a different way from Randall's (1979) model, the enzyme-(PP_i-Mg^{2+}) complex is ruled out, since it predicts that, in the absence of free Mg^{2+} , the K_m for the substrate approaches infinity. Indeed, all other routes for catalytic complex-formation were eliminated from our model.

Randall (1979) proposed PP_i inhibition of pyrophosphatase of *R. rubrum*. We suggest an additional strong inhibitory effect due to the decrease in free Mg^{2+} in experimental conditions: direct determination of the inhibition constant for PP_i is impracticable.

Both membrane-bound and cytoplasmic pyrophosphatases of several organisms require free metal for activation (Rapoport *et al.*, 1972; Unguryte *et al.*, 1989), and their substrate is a metal ion- PP_i complex. In spite of similar requirements for all kinds of pyrophosphatases, specific differences in their kinetic properties could be important in their regulation. Since the membrane-bound pyrophosphatase provides the simplest model for the study of hydrolysis and synthesis of phosphonhydro bonds, the characteristics and properties of this enzyme are relevant in the mechanism of energy transduction.

This work was partially supported by Grant D11-903553 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. A.S. was a fellow of D.G.A.P.A., U.N.A.M. We thank Susana Magallón and Dr. Diego González-Halphen for helping us with the English.

REFERENCES

- Baccarini-Melandri, A. & Melandri, B. A. (1978) In The Photosynthetic Bacteria (Clayton, R. K. & Sistrom, W. R., eds), pp. 615-628. Plenum Press, New York and London.
- Baltscheggky, M. (1968) In Regulatory Functions of Biological Membranes (Dainoff, J., ed.), vol. 2, pp. 277-286. Elsevier Amsterdam, New York and London.
- Baltscheggky, M. (1978) In The Photosynthetic Bacteria (Clayton, R. K. & Sistrom, W. R., eds), pp. 598-613. Plenum Press, New York and London.
- Barry, R. J. & Dunaway-Mariano, D. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259, 196-203.
- Baykov, A. A., Volk, S. E. & Unguryte, A. (1989) Arch. Biochem. Biophys. 273, 287-291.
- Celis, H. & Romero, J. (1987) J. Bioenerg. Biomembr. 19, 255-272.
- Celis, H., Romero, J. & Gómez-Puyou, A. (1985) Arch. Biochem. Biophys. 236, 766-774.
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W. R. & Stamer, R. V. (1957) J. Cell Comp. Physiol. 49, 25-68.
- Cooperman, B. S. (1982) Methods Enzymol. 87, 526-548.

- Fabio, A. (1988) *Methods Enzymol.* 157, 378-417
- Fiske, C. A. & SubbaRow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.* 117, 751-766
- Josse, J. (1966) *J. Biol. Chem.* 214, 1948-1957
- Keister, D. L. & Minton, N. J. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 147, 330-338
- Kelly, S. J., Feldman, F., Seposu, J. W. & Butler, L. G. (1973) *Biochemistry* 12, 3338-3340
- Klemme, J. H. & Gest, N. J. (1971) *Eur. J. Biochem.* 22, 529-537
- Knight, B. W., Fitts, S. W. & Dunaway-Mariano, D. (1981) *Biochemistry* 20, 4079-4086
- Lathi, R. (1983) *Microbiol. Rev.* 47, 169-179
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Martell, A. & Sillen, L. G. (1971) *Spec. Publ. Chem. Soc.* 25, Suppl. 1, pp 117-120. The Chemical Society, London.
- Moe, O. A. & Butler, L. G. (1972a) *J. Biol. Chem.* 247, 7308-7314
- Moe, O. A. & Butler, L. G. (1972b) *J. Biol. Chem.* 247, 7315-7319
- Morrison, J. F. (1979) *Methods Enzymol.* 63, 257-294
- Moyle, J., Mitchell, R. & Mitchell, P. (1972) *FEBS Lett.* 23, 233-236
- Randahl, H. (1979) *Eur. J. Biochem.* 102, 251-256
- Rapaport, T. A., Hohne, W. E., Heitman, P. R. & Rapaport, S. M. (1972) *Eur. J. Biochem.* 26, 237-246
- Ridlington, J. W. & Butler, G. L. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 7303-7307
- Schwarm, H., Vigerschow, H. & Knobloch, K. (1986) *Biol. Chem.* 367, 127-133
- Segel, I. H. (1975) in *Enzyme Kinetics: Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, pp. 227-272, John Wiley and Sons, New York
- Ungurte, A., Smirnova, I. N. & Baykov, A. A. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 273, 292-300

Received 10 July 1991/30 September 1991; accepted 14 October 1991