

03062



UNIVERSIDAD NACIONAL AUT
DE MEXICO

8

2ej.

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

**CARACTERIZACION DE LAS PIROFOSFATASAS
CITOPLASMICA Y MEMBRANAL DE LA
CIANOBACTERIA *Spirulina maxima***

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE SUSTENTA LA BIOLOGA

ELENA MARIA HILARIO ANDRADE

PARA OBTENER EL GRADO DE:

M. EN C. EN I.B.B. DEL AREA BIOQUIMICA.

MEXICO, D.F.

DICIEMBRE 1992.



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	i
Abreviaturas	ii
Capítulo I Introducción	
1.0 Generalidades	
1.1 Biología de las cianobacterias	1
1.2 La fotosíntesis oxigénica oxidoreductora	6
1.3 Estructura del pirofosfato y su participación en vías metabólicas	9
1.4 Las pirofosfatasa inorgánicas	10
1.5 Evolución de los sistemas transductores de energía	13
1.5.1 Las H ⁺ -PPiases membranales como modelo de la enzima ancestral transportadora de protones	17
Objetivo	21
Capítulo II Materiales y Métodos	
2.1 Cultivo y cosecha de <u>Spirulina maxima</u>	22
2.2 Preparación de membranas tilacoides y solubilización	23
2.3 Determinación de concentración de proteína	24
2.4 Determinación de la actividad de pirofosfatasa	24
2.5 Purificación parcial de la PPiase citoplásmica	25
2.6 Electroforesis nativa y desnaturalizante	26

2.7	Algunas otras cromatografías empleadas para la purificación parcial de la PPiase citoplásmica	29
Capítulo III Resultados		
3.1	Especificidad por sustrato	32
3.2	Determinación de pH óptimo	34
3.3	Efecto de cationes divalentes sobre la hidrólisis	34
3.4	Hidrólisis de otros complejos M^{2+} -PPi por las PPiases citoplásmica y membranal	41
3.5	Efecto de fosfolípidos totales sobre la actividad hidrolítica	41
3.6	Efecto de inhibidores	46
3.7	Movilidad electroforética	51
3.8	Purificación parcial de la PPiase citoplásmica de <u>Spirulina maxima</u>	51
Capítulo IV Discusión		59
Conclusiones y perspectivas		63
Referencias		65

RESUMEN

El presente trabajo muestra la presencia de dos PPIasas inorgánicas distintas en la cianobacteria Spirulina maxima, capaces de hidrolizar selectivamente PPI: una PPIasa citoplásmica y una membranal. La PPIasa citoplásmica hidroliza preferentemente el complejo Mg-PPI, mientras que la PPIasa membranal hidroliza al complejo Zn-PPI, a sus pH óptimos respectivos. Las enzimas muestran perfiles de pH, activación por cationes divalentes y comportamiento frente a inhibidores, muy diferentes. No se observó estimulación de la actividad de la PPIasa membranal con el desacoplante CCCP. La actividad hidrolítica de la PPIasa membranal solubilizada con Triton X-100 se estimula con fosfolípidos, mientras que la PPIasa citoplásmica se inhibe. Se purificó parcialmente la PPIasa citoplásmica por precipitación salina y dos cromatografías de intercambio aniónico diferentes, que permite llegar hasta 54 veces de purificación. En geles nativos revelados por actividad, la PPIasa citoplásmica migra a mayor distancia que la membranal, posiblemente debido a que contiene un número mayor de aminoácidos polares.

Se ha propuesto a la PPIasa membranal como modelo del primer canal translocador de protones a través de la membrana; por otro lado, el pirofosfato es una molécula que pudo haber participado en las primeras transducciones energéticas y como agente condesante en la tierra primitiva. Las cianobacterias aparecieron en la tierra hace 3.5×10^9 años, pero a pesar de no ser descendientes directas de las primeras células, son un buen modelo de organismos (provenientes de un linaje realmente antiguo) donde buscar PPIasas con el fin de determinar la antigüedad de dicha enzima.

ABREVIATURAS

ADP	adenosin difosfato
ATP	adenosin trifosfato
ATPasa	ATP hidrolasa
CCCP	<i>p</i> -triclorometoxi carbonil-cianuro-fenilhidrazona
Da	daltones
DCCD	diciclohexil carbodiimida
DNA	ácido desoxiribonucleico
DEAE	dietilaminoetil
EDC	hidrocloruro de 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil] carbodiimida
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
Fd	ferrodoxina
FEO	feofitina
Fe-S	proteína hierro-azufre
IDP	imidodifosfato
M ²⁺	catión divalente
MDP	metilendifosfato
NAD ⁺ /NADPH	nicotinamida adenin dinucleótido oxidado/reducido
NADP ⁺ /NADPH	nicotinamida adenin dinucleótido fosfato oxidado/reducido
PC	plastocianina
Pi	fosfato inorgánico
PPI	pirofosfato inorgánico
PPIasa	pirofosfato hidrolasa, pirofosfatasa
Q	quinona
RNA	ácido ribonucleico; rRNA, ribosomal; tRNA, transferencia
SDS	dodecil sulfato de sodio
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil etilendiamina
Tricina	<i>N</i> -tris(hidroximetil)-metil glicina
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
Triton X-100	<i>t</i> -octilfenoxipolietoxietanol
3φSn	cloruro de trifenilestaño

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.0 Generalidades

1.1 Biología de las cianobacterias

Las bacterias fotosintéticas aerobias se clasifican de acuerdo a sus características morfológicas (Castenholz y Waterbury, 1987), principalmente :

Grupo I	Cyanobacteria
Orden	Oscillatoriales
	Chroococales
	Pleurocapsales
	Stigonematales
	Nostocales
Grupo II	Prochlorales

Las cianobacterias poseen una pared celular Gram-negativa de 1 a 10 nm de espesor y excepcionalmente de 200 nm. La pared está perforada con orificios en arreglo anular, longitudinal o de un poro único. Tanto la membrana externa como la membrana citoplásmica poseen una gran cantidad de carotenoides. Alrededor de la envoltura celular se encuentra un mucílago formado por microfibrillas de polisacáridos y proteínas, constituyendo una vaina. Algunas cianobacterias acumulan en el mucílago pigmentos rojos, amarillos y azules de composición desconocida, probablemente para protegerse de la luz ultravioleta (Rambler y col., 1977; Muehlstein y Castenholz, 1983).

La mayoría de las cianobacterias se dividen por fisión binaria, produciendo poblaciones unicelulares (cuando carecen de vaina) o "pluricelulares" cuando poseen vaina. En este caso, las células hijas permanecen unidas formando tricomas que se fragmentan y ramifican.

A pesar de que no se han encontrado flagelos en cianobacteria, éstas se mueven en forma deslizante. El mecanismo aún no es claro pero es similar al giro de un tornillo.

La característica distintiva de las cianobacterias, con respecto al resto de las eubacterias fotosintéticas, es la composición, arreglo y disposición del aparato fotosintético.

En la mayoría de las especies, éste se encuentra en las membranas tilacoidales, aparentemente independientes de la membrana citoplásmica y que se encuentran dispuestas en forma concéntrica y espiral alrededor del centro del citoplasma (figura 1). Las membranas tilacoidales están formadas por 2 membranas de 70 Å de grosor, separadas por un espacio de 3 a 5 nm. Se denominaron membranas tilacoides por su similitud con los tilacoides contenidos en los cloroplastos de las plantas. Sobre la membrana tilacoide se encuentran los complejos cosechadores de luz dispuestos en hileras ordenadas y a ambos lados de la membrana, llamados ficobilisomas. El género Gleobacter es la excepción: carece de tilacoides y posee unas estructuras cilíndricas parecidas a ficobilisomas en posición perpendiculares a la membrana citoplásmica (Guglielmi y col., 1981).

Las cianobacterias contienen cuerpos de inclusión: a) gránulos de glucógeno: son ovoides o elongados y generalmente se encuentran entre los tilacoides; b) gránulos de cianoficina: son polímeros de arginina y ácido aspártico; c) carboxisomas: contienen a la enzima ribulosa bifsosfato carboxilasa (RuBisCO) y posiblemente son un reservorio de dicha enzima o el sitio de fijación de CO₂; d) gránulos de polifosfato; e) vacuolas de gas: son vesículas impermeables al agua, de 2 nm de grosor y compuestas por proteínas.

La región central del citoplasma contiene los ribosomas y el genoma circular eubacteriano. El genoma cianobacteriano tiene un peso molecular entre 1.6 y 8.6 x 10⁶ Da.

Dentro de las colonias de cianobacterias pueden encontrarse células especializadas: los heterocistos, los acinetos y las hormogonias. Los órdenes Nostocales y Stigonematales presentan heterocistos, que son células especializadas en fijar N₂, impermeables al O₂. Son células bacterianas que pierden las membranas tilacoidales, los gránulos de cianoficina y los ficobilisomas, retienen solamente la actividad del fotosistema I, principalmente la actividad de fotofosforilación. Los heterocistos se mantienen metabólicamente con carbohidratos y/o ácidos orgánicos provenientes de las células vegetativas a través de poros comunicantes; y ellos exportan el N₂ fijado en forma orgánica (Stewart, 1980).

Los acinetos sólo se encuentran en el orden Nostocales. Son "esporas latentes" producidas en condiciones donde el N_2 escasea. Poseen una pared celular gruesa, contienen cianoficina, glucógeno, lípidos, carotenoides y una alta concentración de RNA. Carecen de polifosfatos y son células resistentes a la desecación, congelación y al almacenamiento en sedimentos anaerobios, y al parecer no requieren de un periodo de reposo antes de germinar.

Las hormogonias son hileras de células sin vaina, fragmentadas y móviles. Su función podría ser de propágulo.

Las cianobacterias son los principales organismos planctónicos, probablemente debido a la capacidad de regular su flotación por medio de las vesículas de gas; y de los tapetes microbianos (McNamara, 1989). En lagos eutróficos son capaces de fijar N_2 cuando éste escasea en forma orgánica, y pueden utilizar bajas intensidades luminosas. Parte de su éxito se debe a que excretan sustancias tales como hidroxamatos y siderocromos, capaces de inhibir el crecimiento de otros organismos y de captar Fe^{2+} en lagos donde este metal es un factor limitante para el crecimiento, respectivamente. Las poblaciones de cianobacterias son controladas por cianófagos específicos, por mixobacterias líticas y por hongos acuáticos.

No existe temperatura óptima para el cultivo de las cianobacterias, ya que pueden vivir desde temperaturas de congelamiento hasta $74^{\circ}C$, en lagunas costeras, en zonas intermareales y en zonas áridas. También pueden vivir en altas concentraciones salinas y tolerar H_2S , que llegan a consumir. Forman relaciones simbióticas con hongos, algas y plantas superiores (con cícadas, por ejemplo), participando como "cloroplastos" o fijando N_2 (Castenholz y Waterbury, 1987).

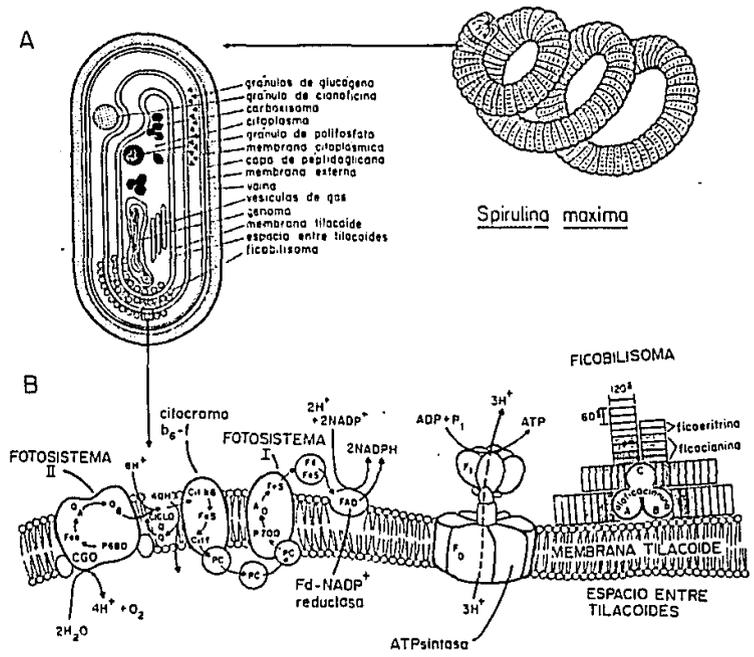


Figura 1 La cianobacteria Spirulina maxima.

A la derecha: esquema de S. maxima; A: estructura celular de una cianobacteria (tomado de Caizenholz y Waterbury, 1989); B: composición del aparato fotosintético cianobacteriano (adaptado de Voet y Voet, 1990, y Glazer, 1989).

Antigüedad de las cianobacterias.

Es muy probable que los primeros organismos que produjeron oxígeno y cambiaron la composición atmosférica, fueron las cianobacterias, antes llamadas algas verde-azules. Dominaron el paisaje durante el Arqueano, en el Proterozoico. El fin de su auge se debe, muy probablemente, al éxito de las algas eucarióticas y plantas que las sucedieron.

Sus restos fósiles se encuentran en los siguientes depósitos:

Polo Norte, Australia	3.5 x 10 ⁹ años
FigTree, Sudáfrica	3.1 x 10 ⁹ años
Bulawayan, Rhodesia	3.0-2.8 x 10 ⁹ años
Guntflint, Canadá	2.5-1.7 x 10 ⁹ años
Bitter Springs, Norte de Australia	0.82 x 10 ⁹ años

Dichos restos forman parte de los estromatolitos que contienen fósiles unicelulares y coloniales, mezclados con lodo, arcilla y restos orgánicos.

Las cianobacterias trascendieron en la historia de la vida por el producto de desecho de su nueva forma de fotosintetizar: el oxígeno. La gran aportación de la fotosíntesis oxidoreductora oxigénica es la integración a la cadena fotosintética de un nuevo centro de reacción (P680, ver más adelante), capaz de absorber luz con alto contenido energético (menor longitud de onda) y equipado con un complejo enzimático que rompe la molécula más abundante en el planeta: el agua (Fogg y col., 1973; Margulis, 1982).

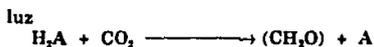
Las cianobacterias forman una unidad filogenética coherente que sólo contiene organismos fotosintéticos que utilizan clorofila a, excepto Prochloron que también contiene clorofila b. El análisis de la secuencia de nucleótidos del 16S rRNA permite establecer que las cianobacterias son un grupo de eubacterias con una baja tasa de sustitución de nucleótidos en la secuencia del 16S rRNA a lo largo de la evolución de dichas eubacterias, ubicándolas en la base de la rama de las eubacterias (fig. 2) (Woese, 1987; Woese y col., 1990).

Descripción del género *Spirulina* Turpin 1829

Spirulina es una cianobacteria filamentosas no-heterocística que se divide exclusivamente por fisión binaria en un plano. Crece en forma de hélice muy enrollada y carece de vaina. La cadena de células puede llegar a medir hasta 5 µm. Su coloración es variable: desde azul-verdoso hasta rojo. Habita en aguas dulces, marinas y salobres, lagos salinos y aguas termales (50°C). Es un género preferentemente acuático y no se conoce ninguna especie que establezca relaciones endo- o exosimbóticas (Castenholz y Waterburg, 1989).

1.2 La fotosíntesis oxigénica óxido-reductora

Todas las cadenas tróficas inician con la captura de la energía solar a través del proceso de la fotosíntesis óxido-reductora. La ecuación general de este proceso fue propuesta por Van Niel (1935):



donde A es el donador de hidrógeno y (CH₂O) representa carbohidrato. En el caso de la fotosíntesis óxido-reductora anaerobia (eubacterias púrpuras y verdes) H₂A puede ser H₂S, S₂O₃, H₂ o ácidos orgánicos. En la fotosíntesis óxido-reductora aerobia (cloroplastos y eubacterias fotosintéticas oxigénicas) H₂A es H₂O (Cramer y Knaff, 1991).

Existe otro tipo de fotosíntesis: la fotosíntesis no-oxidoreductora, que sólo la presentan las arqueobacterias halófilas de la especie Halobacterium halobium (Oesterhelt y Stoeckenius, 1973). El proceso lo lleva a cabo la proteína membranal bacteriorrodopsina, que posee un grupo prostético unido covalentemente: el retinal. Esta molécula cambia de conformación y de protonación del tipo base de Schiff al absorber luz. Dicho cambio de protonación permite protonar y desprotonar residuos vecinos y lograr bombear un protón desde el interior hasta el exterior de la célula. El bombeo genera un ΔpH que consume la

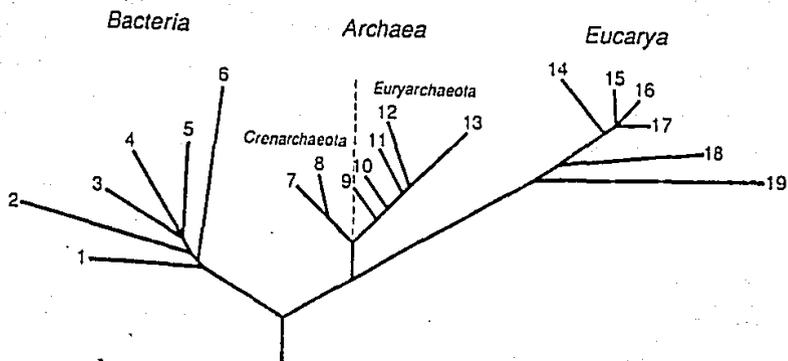


Figura 2 Arbol filogenético mostrando los tres linajes celulares.

El orden de ramificación y la longitud de cada rama se basan en la comparación de secuencias de rRNA. Bacteria: 1, termotogales; 2, las flavobacterias y bacterias relacionadas; 3, cianobacterias; 4, bacterias púrpuras; 5, bacterias Gram-positivas; y 6, bacterias verdes no-sulfurosas. Archea: el Reino Crenarchaeota: 7, *Pyrodicticum*; y 8, *Thermoproteus*; y el Reino Euryarchaeota: 9, termococales; 10, metanococales; 11, metanobacteriales; 12, metanomicrobiales; y halófilas extremas. Eukarya: 14, animales; 15, ciliados; 16, plantas verdes; 17, hongos; 18, flagelados; y 19, microsporidia. (Tomado de Woese y col., 1990)

ATP sintasa para producir ATP en condiciones de baja concentración de O_2 .

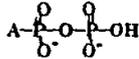
Los componentes de la fotosíntesis oxigénica son: el fotosistema II, formado por los complejos antena, un centro de reacción P680 y un complejo productor de O_2 ; y el fotosistema I, formado por complejos antena y un centro de reacción P700. Entre el fotosistema I y el II existe una cadena transportadora de electrones formada por una poza de quinonas, el citocromo b_6/f y plastocianina, capaz de generar un ΔpH al transferirse los electrones desde P680 hacia P700. Al excitarse el P700 los electrones fluyen a través de dos aceptores, de la proteína hierro-azufre, de la ferredoxina, hasta la ferredoxina-NADP⁺ reductasa para producir NADPH y un ΔpH favorable para la síntesis de ATP (fig. 1) (Cramer y Knaff, 1991)

En las cianobacterias y algas rojas, los complejos captadores de luz son los ficobilisomas, encargados de dirigir la energía de excitación absorbida hacia los centros de reacción. El ficobilisoma está formado por los complejos pigmento-proteína llamados ficobiliproteínas. Dichos complejos se distinguen por el color de los grupos prostéticos (bilinas) unidos a ellos: ficocianobilina (azul), ficoeritrobilina (rojo), ficobiliviolina (púrpura) y ficourobilina (café). Los complejos pigmento-proteína son: aloficocianina, ficocianina, ficoeritrina, ficoeritrocianina, diferenciables por el número y tipo de bilinas unidos a ellos (Glazer, 1989).

El ficobilisoma pesa entre 7×10^5 a 15×10^5 Da y tiene un arreglo triangular: el centro está formado por un trímero de aloficocianina y 6 cilindros formados por ficocianina y ficoeritrina. La transferencia de energía fluye desde los extremos distales de los cilindros hacia el centro del trímero y de éste hacia el centro de reacción P680 integral de membrana (Glazer, 1989).

1.3 Estructura del pirofosfato y su participación en vías metabólicas

La estructura pirofosfato se encuentra como producto en algunas vías metabólicas:



A= AMP, GMP, CMP, TMP, UMP y otros ligandos, o -OH en PPI

El compuesto más sencillo que posee esta estructura es el pirofosfato inorgánico, PPI. Gran parte de las vías en que participa son reversibles y la hidrólisis de PPI puede dirigir la reacción en sentido de la síntesis. Dicha hidrólisis la lleva a cabo la enzima pirofosfatasa inorgánica.

En ausencia de cationes divalentes, la energía libre de hidrólisis de PPI es cercana a la del enlace gamma del ATP ($\Delta G^\circ = - 8.0$ kcal/mol), pero en presencia de Mg^{2+} el ΔG° aumenta (- 4.0 kcal/mol), haciéndose menos negativo debido a que la estabilidad y la constante de afinidad del complejo $\text{Mg}\cdot\text{PPI}$ es mucho mayor que las del producto $\text{Mg}\cdot\text{Pi}$.

El PPI participa en reacciones hidrolíticas y sintéticas en algunas de las vías metabólicas más importantes: en el metabolismo de lípidos por la acetilCoA sintasa; la activación de aminoácidos por la aminoacil(tRNA) sintasa; en la síntesis de DNA por la acción de la DNA polimerasa; en la síntesis de RNA por la RNA polimerasa y en la síntesis de nucleósido-difosfatos por la glucosil-1-P-nucleotidiltransferasa (Baltscheffsky y Nyrén, 1984).

El PPI inorgánico puede participar como donador de Pi o como donador de energía. Las enzimas que utilizan PPI como donador de Pi son: PPI-fosfofructodicasa y la piruvato fosfatodicasa. Como donador de energía participa en las reacciones catalizadas por la ATP-sulfurilasa, por la acetato PPI-fosfotransferasa, por la acetato cinasa, por la acetil CoA sintasa y la PPI-serina-fosfotransferasas (Baltscheffsky y Nyrén, 1984).

En bacterias fotosintéticas anaeróbicas se ha demostrado la formación de PPI a

apartir de Pi inorgánico. Dicha síntesis es dependiente de luz, de ΔpH y $\Delta\psi$ y la lleva a cabo una PPiase membranal (Baltscheffsky y col., 1966; Guillory y Fisher, 1972; Nyrén y col., 1986; Strid y col., 1987; Nore y col., 1990). En Rhodospirillum rubrum se puede acoplar la hidrólisis de PPI a varias reacciones dependientes de energía: transporte de electrones en reversa, corrimiento electrocrómico del caroteno, transhidrogenaciones, reducción de NAD⁺ y síntesis de ATP (Keister y Minton, 1971; Dutton y Baltscheffsky, 1972; Baltscheffsky y Nyrén, 1984).

1.4 Las pirofosfatasas inorgánicas

Existen dos tipos de pirofosfatasas inorgánicas (pirofosfato hidrolasas: E.C.3.6.1.1.): citoplásmicas y membranales. Ambas enzimas hidrolizan, preferentemente, el complejo Mg-PPi. Las PPiases citoplásmicas son enzimas ubicuas en la Naturaleza. Su función es hidrolizar PPI desplazando el equilibrio de reacciones en sentido de la biosíntesis de moléculas (Tabla I) liberando calor.

La primera PPiase membranal reportada fue la de R. rubrum (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966). Después se encontró en algunas otras bacterias fotosintéticas anaeróbicas: Rhodobacter viridis y Rhodobacter blastica (Nore y col., 1990). El sitio activo de la PPiase membranal se encuentra en la misma dirección que la porción F₁ de las F-ATPasas/sintasas. Existen reportes de PPiase membranal en eucariontes: mitocondria y vacuola (ver referencias de la Tabla I). Tanto la hidrólisis como la síntesis de PPI involucra la translocación de H⁺; sin embargo, hasta la fecha no se reportado la síntesis de PPI por las PPiases vacuolares. Es posible estudiar el mecanismo de la enzima por medio de reacciones parciales como el recambio Pi-PPi, que es una reacción parcial tanto de la síntesis como de la hidrólisis (Celis y col., 1985; Celis y Romero, 1987).

Recientemente se reportó una PPiase asociada a la membrana citoplásmica de la arqueobacteria Sulfolobus acidocaldarius (Meyer y Schäfer, 1992). No transloca H⁺, su sitio

activo se encuentra orientado hacia el exterior de la célula y su principal función parece ser la hidrólisis de un sustrato del ciclo de polisisopreno dolicol. Los autores no demuestran que se trate de una pirofosfatasa inorgánica ni especifican si se trata de una proteína anfiprótica o integral de membrana.

Recientemente, Sarafian y col. (1991) clonaron y secuenciaron la PPiase de la membrana vacuolar de Arabidopsis thaliana, y alinearon la secuencia de aminoácidos del sitio de unión de Mg-PPi de dicha enzima contra otras PPiases, tanto membranales como citoplásmicas. Observaron que las PPiases de membrana vacuolar no comparten similitud en la secuencia de aminoácidos con las PPiases citoplásmicas, lo que significa que dichas enzimas pertenecen a dos familias de proteínas que divergieron en épocas muy tempranas en la evolución de las primeras células, es decir, son proteínas filogenéticamente distantes.

Las PPiases citoplásmicas se dividen en dos: las de tipo eubacteriano, representado por homotetrámeros y homohexámeros con subunidades de 19 a 21 kDa; y las de tipo eucariótico, representado por homodímeros con subunidades de 32-35 kDa (Wakagi y col., 1992). Las PPiases arqueobacterianas son similares, al menos estructuralmente, al tipo eubacteriano (Tabla I).

Dado los pocos reportes de PPiases de membrana vacuolar, así como de PPiases membranales eubacterianas, no se han determinado relaciones filogenéticas entre ellas, sin embargo es claro que, con respecto al funcionamiento y en experimentos de reacción cruzada con anticuerpos monoclonales, no están relacionadas con las PPiases citoplásmicas (Nore y col., 1991; Cooperman y col., 1992).

Tabla I Algunas pirofosfatasas inorgánicas

A. Pirofosfatasas citoplásmicas

EURACTERIA	PM	S.U.; PM	Referencia
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	90	n.d.	Klemme y Guest, 1971
<i>Rhodobacter palustris</i>	65	2; 32	Schwarm y col., 1986
<i>Rhodobacter gelatinosa</i>	100	n.d.	Klemme y col., 1971
<i>Rhodobacter capsulata</i>	60	n.d.	Klemme y col., 1971
<i>Rhodobacter spheroides</i>	60	n.d.	Klemme y col., 1971
<i>Escherichia coli</i>	118	6; 20	Wong y col., 1970
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	39	1	Liu y Gall, 1990
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	54	3; 18	Hachimori y col., 1979
PS 3	54	3; 18	Hachimori y col., 1979
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	88	4; 20	Tominaga y Mori, 1977
ARQUEOBACTERIA			
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	110	6; 20.5	Richter y Schäfer, 1992
<i>Thermus aquaticus</i>	84	4; -20	Verhoeven y col., 1986
<i>Thermus flavus</i> 70K	96	4; 24	Kasho y Awaeva, 1984
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	80	4; 21	Wakagi y col., 1992
EUCARIONTES			
Rata, hígado	60-70	2; 35-38	Smirnova y col., 1988
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64	2; 32	Cohen y col., 1978
Bovino, retina	72	2; 36	Yang y Wensel, 1992
<i>Kluyveromyces lactis</i>	-39	n.d.	Stark y Milner, 1989
<i>Arabidopsis thaliana</i>	29.7	n.d.	Keiber y Signer, 1991
<i>Saccharomyces pombe</i>	32.4	n.d.	Kawasaki y col., 1990

Tabla I (continuación)

B. Pirofosfatasa_s membranales

EUBACTERIA	PM	S.U.; PM	Referencia
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	56	n.d.	Nyrén y col., 1991
EUCARIONTES			
<i>Arabidopsis thaliana</i> (vacuola)	64.5-75	1	Sarafian y col., 1992
Mitocondria corazón	I 60 II 185	α 28, β 30 α 28, β 30, γ 40, δ 60	Volk y col., 1983
Mitocondria hígado	60	2; 28-35	Volk y Baykov, 1984
<i>Beta vulgaris</i> (vacuola)	67	1	Sarafian y Poole, 1989; Britten y col., 1989
<i>Vigna radiata</i> (vacuola)	73	1	Maeshima y Yoshida, 1989
<i>Acetabularia acetabulum</i> (vacuola)	73	n.d.	Ikeda y col., 1991

PM: peso molecular en kDa; S.U.: subunidades; n.d.: no determinado.

1.5 Evolución de los sistemas transductores de energía.

Las vías metabólicas de los organismos constituyen una inmensa red de reacciones químicas que permiten extraer energía del medio ambiente para sintetizar las macromoléculas necesarias para perpetuar la vida. Esta compleja red está finamente regulada durante el desarrollo de los organismos. Apesar de que las vías metabólicas están formadas por un sin fin de reacciones, éstas pertenecen sólo a los siguientes tipos: hidrataciones, deshidrataciones, oxido-reducciones, adiciones, sustituciones e isomerizaciones.

La energía libre de una reacción depende de la naturaleza de los reactantes y de su concentración:

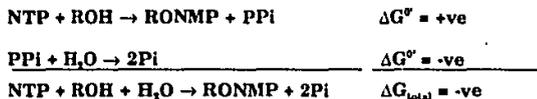
$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln [C][D]/[A][B]$$

Para que una reacción ocurra espontáneamente, la energía libre total debe ser

negativa, la constante de equilibrio de la reacción debe ser mayor de 1, es decir, el equilibrio debe estar desplazado hacia los productos:



Cuando una reacción no ocurre espontáneamente, se puede acoplar a otra cuyo ΔG sea menor, de tal manera que el cambio total en energía libre de la suma de ambas reacciones sea negativo y así ocurra espontáneamente; por ejemplo, las reacciones acopladas a la hidrólisis de PPI:



NMP = nucleótido monofosforilado.

Esta es la estrategia central de todas las vías metabólicas. La energía extraída del medio ambiente se transfiere intermolecularmente a través de grupos fosfato (ATP, PPI, fosfoenolpiruvato, acetilfosfato, glucosa-1-fosfato, etc.) o grupos acilo (coenzima A); y de moléculas que acarrean electrones (NADH, FADH₂, quinonas y grupos hemo) (Cramer y Knaff, 1991).

Acerca de la naturaleza de la primera fuente de energía en el mundo prebiótico, se ha propuesto la participación de la luz UV, descargas eléctricas, ondas de choque y energía geotérmica que llevaron a cabo reacciones reductoras y de síntesis para la aparición de las primeras moléculas de la Vida. Sin embargo, el primer paso importante en las primeras formas de vida fue el acoplamiento de reacciones químicas (de Duve, 1991). Fritz Lipmann propuso que las fosforilaciones a nivel de sustrato utilizando PPI en lugar de ATP fueron las primeras reacciones acopladas (Lipmann, 1941; Lipman, 1965). Existen algunas evidencias que apoyan lo anterior:

a) El PPI posee un valor intermedio de ΔG° (-8.0 kcal/mol, sin Mg²⁺), es decir, es lo

suficientemente estable y al mismo tiempo posee suficiente energía libre para realizar trabajo.

- b) Se puede obtener a partir de PI en sistemas de síntesis abiótica y es probable que se encontrara en la Sopa Primitiva funcionando como agente condensante (Baltscheffsky, 1971; Broda, 1975; Rodríguez y Orgel, 1991).
- c) La síntesis de ATP en condiciones de Tierra Primitiva se cree termodinámicamente desfavorable, ya que existen algunos pasos limitantes: 1) la condensación del HCN para formar los precursores de la adenina. A partir de los primeros experimentos de síntesis prebiótica, se calculó la cantidad de HCN producido ($\sim 4.5 \times 10^9$ kg al año). Sin embargo, tanto el HCN como el H_2CO son sensibles a la luz UV y sólo pudieron participar en condensaciones en microambientes protegidos de la radiación y en donde se acumularan dichos reactivos. El paso limitante es el ataque del CN sobre HCN para formar dímeros, trímeros y tetrámeros activables por luz UV produciendo el precursor de la adenina: 4-aminoimidazol-5-carbonitrilo. 2) La síntesis prebiótica de azúcares: la condensación de H_2CO en presencia de alúmina o $CaCO_3$, produce glucoaldehído, con el cual se inicia una cascada de reacciones autocatalíticas de condensación aldólicas y enolizaciones, produciendo triosas, tetrasas y otros azúcares más complejos. Sin embargo, los azúcares sintetizados se degradarán fácilmente si no se emplean rápidamente en la formación de nucleósidos. 3) La selección de moléculas en mezclas racémicas: α , β , D- o L-; así como la condensación de la base nitrogenada adenina, la ribosa y el fosfato en posición 1' y 5', respectivamente, y no otra cualquiera. En una mezcla donde el número de enantiómeros producidos es grande, la probabilidad de encontrar la molécula que no provocara impedimentos estéricos durante la polimerización de las cadenas de nucleótidos, es baja (Joyce, 1989).

Lo antes expuesto implica que las primeras formas de vida fueron heterótrofas. Sin embargo, existe una hipótesis alterna que propone un organismo ancestral con metabolismo autocatalítico (Wachterhäuser, 1988). Dicha hipótesis pretende explicar cómo las moléculas participantes en el metabolismo autocatalítico reaccionaron sólo en dos dimensiones, es decir, adosadas en la interfase a una superficie cargada y a altas temperaturas. La superficie estaba compuesta por pirita, FeS_2 , producida por la reacción de oxido-reducción entre el Fe^{2+} y el H_2S a través del ciclo del Fe, activado por luz UV (de Duve, 1991). Al ciclo del Fe se acopla la generación de tioésteres, que funcionan como reservorios de energía, como catalizadores y como participantes en reacciones de oxido-reducción y de acilación. En la interfase entre el agua y la pirita se pudieron acumular fosfolípidos que, al saturar la superficie, compartamentalizaron los sustratos de las reacciones antes descritas, logrando desprenderse de la superficie y formar una protocélula. La principal aportación de la hipótesis de Wachterhäuser es que restringe el movimiento de las moléculas a sólo algunas orientaciones posibles debido a su interacción con la superficie, en comparación con el gran movimiento que tendrían si se encuentran en solución. Lo anterior podría ayudar a comprender cómo pudieron aparecer y seleccionarse las primeras moléculas catalíticas (Koshland, 1975). Sin embargo, queda aún sin explicación la quiralidad de las reacciones enzimáticas.

El paso decisivo hacia la aparición de los primeros sistemas vivos fue la formación de una membrana que encapsulara moléculas, permitiendo los siguientes fenómenos: 1) la interacción cooperativa entre diferentes moléculas catalíticas y replicativas, evitando su dispersión y abriendo la posibilidad de llevar a cabo procesos químicos específicos; 2) la creación de microambientes internos substancialmente diferentes del exterior, mantenidos, al menos parcialmente, por diferencias en permeabilidad y por sistemas selectivos de transporte; y 3) la acumulación de moléculas autoreplicativas (Lazcano y col., 1992). La compartamentalización permitió imprimir vectorialidad y asimetría a las reacciones

químicas en los primeros sistemas celulares (Koch y Schmidt, 1991).

El principal problema que presentaron las primeras células fue el de la regulación osmótica, ya que los diferentes potenciales de difusión de los solutos provocan la acumulación y/o pérdida de H₂O y sales, y finalmente la lisis. Para controlar el volumen celular fue necesario bombear iones a través de la membrana, donde el H⁺ y Na⁺, dado sus altas concentraciones, participaron como co-, anti o simportadores no-selectivos. Dicho transporte se pudo acoplar a la importación de nutrientes hacia la célula cuando éstos se agotaron (Stoeckenius, 1978; Wilson y Lin, 1981). Sin embargo, se desconoce tanto el mecanismo de acoplamiento de los gradientes electroquímicos de H⁺ y/o Na⁺, así como la naturaleza de las primeras moléculas transportadoras a través de la membrana, aunque se puede sospechar que fueron péptidos sencillos de origen prebiótico con un número suficiente de aminoácidos con arreglo en α -hélice anfifílica, conductancia y selectividad por cationes monovalentes (Lear y col., 1988).

1.5.1 Las H⁺-PPiases membranales como modelo de la enzima ancestral transportadora de protones

La H⁺-PPiase de R. rubrum es una enzima que acopla reacciones de oxido-reducción y fosforilación, al igual que lo hacen las F-ATPasas/sintasas (Baitscheffsky y Nyrén, 1982). Sin embargo, su función aparente más importante es conservar el gradiente electroquímico útil para la síntesis de ATP en condiciones donde el complejo fotosintético no se encuentra funcionando al 100%, es decir, funciona como una bomba primaria (Nyrén y Strid, 1991). Las H⁺-PPiases vacuolares son enzimas que al hidrolizar PPI conservan parcialmente la energía del enlace fosfoanhidro, en forma de un gradiente transmembranal de H⁺, útil para el transporte de solutos (Rea y col., 1992; Sarafian y col., 1992).

Por lo tanto es muy probable que, si se llega a demostrar que las pirofosfatasa son enzimas realmente antiguas, existentes en un ancestro común, hayan funcionado como

bombas primarias, regulando el pH interno y generando un gradiente electroquímico de H^+ necesario para el transporte de solutos. Esta idea está apoyada por las siguientes observaciones:

- a) requiere sustratos (PPI) mucho más sencillos que la ATPasa (de Duve, 1991, Joyce, 1989),
- b) es una enzima integral de membrana, translocadora de H^+ , mucho más sencilla, tanto estructural como funcionalmente, que las H^+ -ATPasas (F y V), capaz de realizar el mismo trabajo: acoplar la hidrólisis de un enlace fosfoanhidro para establecer un gradiente electroquímico (Mukohata e Ihara, 1990),
- c) es posible que comparta cierta similitud estructural con el proteolípido c de las F-ATPasas (Nore y col., 1992), aunque la alineación total de las F- y V-ATPasas con las pirofosfatasas de membrana vacuolar de B. vulgaris y V. radiata no es significativa (Rea y col., 1992).

Para establecer relaciones evolutivas sería necesario un análisis más detallado utilizando secuencias consenso o sitios altamente conservados, como son los catalíticos o los cruces transmembranales involucrados con el bombeo de H^+ . Para tal efecto se pueden considerar los trabajos de Sarafian y col., 1992; Denda y col., 1989; Milner y col., 1990 y Rea y col., 1992, donde se ha establecido que el porcentaje de similitud entre las H^+ -PPiasas es considerable, lo que permite afirmar que forman una nueva familia de proteínas translocadores de iones: las PPiasas de membrana vacuolar, que probablemente están emparentadas con la PPiasa de R. rubrum (Rea y col., 1992).

¿Cuál es el origen de las H^+ -PPiasas? Esta es una pregunta que actualmente sólo es posible contestar con cierta especulación, pero que es capaz de imprimir un ambiente de expectación y entusiasmo al campo de la bioenergética, tanto desde el punto de vista fisiológico como desde el evolutivo. Al respecto Baltscheffsky y Nyrén (1982) propusieron

que el primer canal transportador de H^+ a través de la membrana fue una enzima parecida a la PPiase de membrana de R. rubrum, portadora de un canal, relacionada probablemente con la subunidad F_0 de la ATPasa/sintasa. La subunidad F_1 se ensambló al canal, coexistiendo así con la PPiase de membrana, como actualmente ocurre en la eubacteria púrpura R. rubrum. Con el tiempo, algunos organismos pudieron haber perdido la PPiase membranal y prevaleció la ATPasa/sintasa, como en el caso de la eubacteria púrpura Rhodobacter sphaeroides. Por otro lado, Mukohata e Ihara, 1990, han propuesto que la H^+ -ATPasa primigenia, presente en el ancestro común de los 3 linajes celulares, dio origen por duplicación génica a las F- y V-ATPasas ancestrales (Gogarten y col., 1989 a y b) (figura 3). Sin embargo, también es posible que la H^+ -ATPasa primigenia se haya originado, a su vez, a partir de una H^+ -PPiase ancestral que, por duplicación génica dio lugar a las actuales H^+ -PPiasas, por un lado, y por otro a la H^+ -ATPasa ancestral. Aún queda por aclarar cómo se diversificó la familia de las H^+ -PPiasas. Para probar dicha hipótesis deben retomarse los estudios acerca de la evolución de las F/V/A-ATPasas de varios autores (Nelson y Taiz, 1989; Gogarten y col., 1989 a, 1989 b y 1992; Kibak y col., 1992).

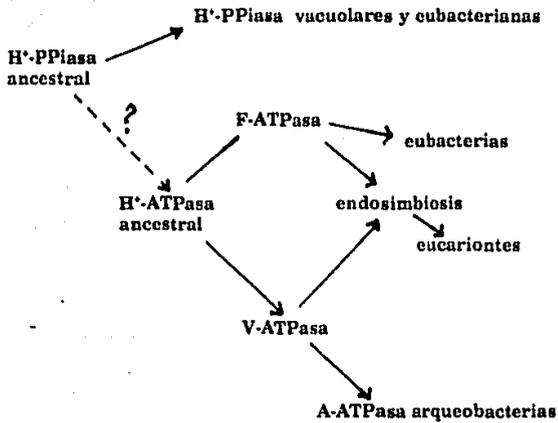


Figura 3 Caminos en la evolución de las ATPasas que confirman sus relaciones de parentesco entre sí y probablemente con las H⁺PPiases. (Adaptado de Mukohata e Ihara, 1990)

OBJETIVO

Hasta la fecha no se ha reportado en la literatura algún trabajo sobre la presencia de pirofosfatasa en la cianobacteria Spirulina maxima, y debido a la gran importancia que tienen dichas eubacterias y las PPiasas en el proceso evolutivo, el presente trabajo tiene como fin determinar la existencia de actividad de pirofosfatasa inorgánica, verificando si la actividad, en caso de estar presente, proviene de 1 o 2 enzimas: de membrana tilacoidal y de citoplasma.

Para lograr el objetivo planteado se abordó el problema estudiando los siguientes puntos que permiten discernir si se trata de 1 o dos enzimas diferentes:

- especificidad por sustrato,
- pH óptimo,
- efecto de cationes divalentes,
- efecto de fosfolípidos,
- efecto de varios inhibidores, y
- movilidad electroforética.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1 Cultivo y cosecha de Spirulina maxima

Los cultivos de Spirulina maxima fueron obsequiados por Bertha Pérez Gómez y el Dr. Carlos Gómez Lojero, del CINVESTAV del IPN, México. La cianobacteria Spirulina maxima se cultivó a 28°C, con luz blanca en el siguiente medio de cultivo, esterilizado 20 min a 15 lb de presión (Vega, 1976):

Reactivo	g/l
NaCl	1.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
CaCl ₂	0.04
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
EDTA	0.08
K ₂ HPO ₄	0.50
NaNO ₃	1.50
K ₂ SO ₄	1.00
Na ₂ CO ₃	16.80
Oligoelementos	1 ml

Agregar 4 ml NaOH 72% antes de agregar el carbonato. Ajustar pH a 10.5-11.0.

Oligoelementos	g/l
Al ₂ BO ₄	2.80
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.075
MoO ₃	0.015

Se burbujó aire para evitar la sedimentación. Se emplearon células cosechadas en

la fase exponencial tardía y se lavaron una vez en Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Se almacenaron a -70°C .

2.2 Preparación de membranas tilacoides y solubilización

Se utilizaron dos métodos para obtener las membranas tilacoides: moliendo con arena y por sonicación. El primer método es muy suave y permite obtener membranas cuya ATPsintasa está acoplada (Lerma y Gómez-Lojero, 1982). El segundo método se utilizó para obtener las membranas tilacoides necesarias para la solubilización de proteínas membranales. Es importante hacer notar que la actividad de PPiase es más estable en el tiempo en membranas obtenidas por el método de arena que por el de sonicación.

- a) Método de arena: por cada gramo de cianobacteria se utilizaron 2 gramos de arena de Ottawa, previamente lavada con HCl 0.5 M y enjuagada con agua destilada. Se molieron 2-3 min en un mortero frío. La mezcla se resuspendió en Manitol 0.5 M, KCl 15 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.6 (MKMGTS.6) a razón de 1 g/10 ml amortiguador, y se dejó sedimentar para decantarla. La suspensión se centrifugó a 365 x g, 5 min. El sobrenadante se centrifugó a 23 400 x g, 20 min. La pastilla se resuspendió a razón de 1 g/3 ml MKMGTS.6, y se conservó en refrigeración por 5 días.
- b) sonicación: las cianobacterias se resuspendieron 1g/10 ml en MKMGTS.6. Se sonicaron alícuotas de 15 ml durante 3 min en un baño de hielo, utilizando un sonicador Branson a 36-45 watts de potencia. La suspensión se centrifugó a 23 000 x g, 5 min. El sobrenadante se centrifugó a 100 000 x g, 80 min; se lavó la pastilla una vez y se resuspendió a 1 g/3 ml en MKMGTS.6, manteniéndolas en refrigeración por 3 días.

Para solubilizar a las proteínas de membrana se empleó el siguiente protocolo:

membranas (4.2 ± 0.2 mg proteína) obtenidas por el método de sonicación se mezclaron en Tris-HCl 40 mM (pH 8.1), etilenglicol 20% (v/v), y Triton X-100 a diferentes concentraciones finales, partiendo de una solución al 20% (v/v) de Triton X-100. La mezcla se agitó suavemente a 4°C durante 20 min y se centrifugó a 100 000 x g, 2 h. Se guardó el sobrenadante a -70°C por 2 meses.

Todos los pH se ajustaron a temperatura ambiente y las centrifugaciones se hicieron a 4°C.

2.3 Determinación de concentración de proteína

Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry y col. (1951), utilizando como estándar albumina de suero bovino, en un intervalo de concentraciones desde 10 hasta 100 µg de proteína.

2.4 Determinación de la actividad de pirofosfatasa

En un volumen final de 0.5 ml se preparó el medio de reacción que contiene 5 mM de Tris ajustado con ácido maleico, la concentración de M^{1+} -PPi y M^{2+} especificado en cada figura o tabla. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido tricloroacético 30% (p/v) y se mantuvo en hielo. Utilizando una centrifuga clínica se centrifugó a 3 000 rpm, 10 min. Se determinó la concentración de Pi liberado en el sobrenadante según el método de Sumner (1944), que es una modificación del método de Fiske y Subbarow (1925), con un intervalo de detección entre 80 a 800 nmol de Pi. El método consiste en formar el complejo molibdato-Pi (amarillo) y reducirlo con *p*-metilaminofenol (ELON, Kodak Eastman Co.), produciendo un color azul. Se midió la absorbancia a 660 nm. Como solución madre se utilizó H_2PO_4 , 2.5 mM. También se utilizó el método de Ames (1968) que detecta entre 10 y 80 nmol de Pi, emplea ácido ascórbico como agente reductor, se mide absorbancia a 820 nm

y se utiliza K_2HPO_4 , 1 mM como solución madre. La actividad hidrolítica en membranas se determinó a 30°C y para la PPiase citoplásmica se utilizó 37°C.

En los experimentos para determinar la especificidad por sustrato de las preparaciones de citoplasma y de membrana, se utilizó como control la fosfatasa alcalina de mucosa intestinal (Sigma, Co.), ya que es una enzima capaz de hidrolizar tanto enlaces fosfoanhídros como sustratos fosforilados tales como: fosfoenolpiruvato, β -glicerofosfato, α -D-glucosa-1-fosfato y el sustrato sintético *p*-nitrofenilfosfato.

La actividad hidrolítica en presencia de fosfolípidos de soya se determinó de la siguiente manera: se disolvieron 60 mg de fosfolípidos totales de soya en 1 ml de agua desionizada, se agitó y se soncó la solución en un sonicador de baño hasta que quedara transparente. A las mediciones de Pi liberado de la hidrólisis se les agregaron 25 μ l de SDS 10% (p/v), así como a los estándares.

Los experimentos en presencia de DCCD y $3\phi Sn$ se realizaron incubando las membranas o la PPiase citoplásmica en un volumen \approx 50 μ l, a 0°C durante 20 min. Se hicieron los respectivos controles utilizando el mismo volumen de etanol, que es el solvente que se utilizó para preparar las soluciones de DCCD y $3\phi Sn$.

2.5 Purificación parcial de la PPiase citoplásmica

Todos los pasos de la purificación se llevaron a cabo en el cuarto frío o en hielo.

De acuerdo al trabajo de Klemme y Guest (1971), donde reportan la purificación de la PPiase citoplásmica de *Rhodospirillum rubrum*, se adoptaron algunas estrategias para la purificación de la PPiase citoplásmica de *S. maxima*: precipitación a 60°C por 5 min, fraccionamiento con $(NH_4)_2SO_4$ y la cromatografía de intercambio aniónico DEAE-celulosa.

A partir del sobrenadante, ya sea obtenido por el método de arena (después de centrifugar a 23 400 x g) o por el método de sonicación (después de centrifugar a 100 000 x g), se tomaron 250 ml que contienen 335 ± 76 mg de proteína. Los 250 ml se repartieron

en alícuotas de 15 ml y se calentaron a 60°C durante 5 min. Inmediatamente después se enfriaron en un baño de hielo. Se centrifugó a 18 000 x g, 20 min y el sobrenadante se fraccionó con (NH₄)₂SO₄ de 0 a 20, 20 a 40 y 40 a 65% de saturación. El último precipitado (p65%) se resuspendió en amortiguador Tris-HCl 20 mM, ZnSO₄ 0.2 mM, β-mercaptoetanol 2 mM pH 8.6 (TZ8.6) hasta un volumen de 8-10 ml. Se dializó contra 2 litros de TZ8.6, 12 h.

Se aplicaron 40.6 ± 2.7 mg proteína a una columna (11.5 x 2.8 cm) de intercambio aniónico, utilizando la resina DEAE-celulosa (Whatman) previamente activada en NaOH 0.1 M, lavada y equilibrada en amortiguador TZ8.6. Se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0 a 0.5 M en TZ8.6, colectando fracciones de 4.5 ml a 1 ml/min. Se determinó la absorbancia a 280 nm, la conductividad y la actividad de PPIasa. Las fracciones que presentaron mayor actividad total se juntaron y se dializaron contra 2 litros de TZ8.6, 12 h. Se concentró la muestra con una membrana AMICON YM 10 (Amicon, Co.) y se aplicó a una segunda columna (1.5 x 10.5 cm) de intercambio aniónico utilizando la resina DEAE-Biogel A (Biorad), previamente lavada y equilibrada. Se eluyó y se colectó de la misma forma que la columna DEAE-celulosa. Las fracciones con mayor actividad total se concentraron a 0.5 ml en CENTRICON 10 (Amicon, Co.) centrifugando a 3 800 x g, 30 min.

Para medir la actividad de PPIasa citoplásmica en las fracciones colectadas de las cromatografías se utilizaron 100 µl de cada fracción, midiendo la actividad en un medio de reacción que contenía: Tris-maleico 50 mM pH 8.0, MgCl₂ 3 mM y PPI-Na 1 mM.

2.6 Electroforesis nativa y desnaturalizante

Los geles de poliacrilamida nativos de 1.5 mm de grosor, corridos a 4°C, se realizaron de acuerdo a Romero y col. (1991) con algunas modificaciones:

Solución concentrada	resolvedor 10%	minigel	concentrador 4%	minigel
Glicerol 79.5% (v/v)	4 ml	1.3 ml	-	-
H ₂ O bideat.	5.8 ml	1.9 ml	5.8 ml	1.7 ml
Acril/bis-acrilamida	10 ml	3.3 ml	1.5 ml	0.45 ml
Tris 1.5 M pH 8.9	10 ml	3.3 ml	-	-
Tris 0.5 M pH 6.5	-	-	2.5 ml	0.75 ml
Persulfato NH ₄ 10%	150 µl	50 µl	100 µl	30 µl
TEMED	15 µl	5 µl	5 µl	1.5 µl

Se agregó un poco de butanol sobre la solución del gel concentrador para evitar que se forme un menisco. En algunos geles se incluyó 0.1 % de Triton X-100 en los geles y en el amortiguador de los electrodos.

Los geles, ya sea nativos o desnaturizantes se corrieron a 50 V 1 h para que la muestra entre al gel concentrador, y a 90-100 V al entrar al gel resolvedor. La corrida de los geles de 16 x 18 cm duró toda la noche, mientras que los minigeles 3.5-4 h.

Para medir la actividad de PPiase en geles (zimogramas) se incubaron en Tris-maleico 50 mM pH 8.0, MgCl₂ 3 mM, PPi-Na 2 mM, a temperatura ambiente, agitando constantemente durante 20 min. Al cabo de ese tiempo se lavaron los geles y se reveló actividad incubando en la siguiente solución: Molibdato de NH₄ 5%, H₂SO₄ 1.1%, 10 ml; H₂SO₄ 0.5 N, 18 ml, ácido ascórbico 1.5 g, aforado a 100 ml. Se detuvo la reacción colorimétrica incubando en H₂SO₄ 0.5 N. Se hizo el barrido con un densitómetro de rayo laser Ultrascan XL (LKB), utilizando el programa GelScan XL (Pharmacia).

Los geles desnaturizantes se hicieron de acuerdo a Schägger y col. (1986) y se corrieron a temperatura ambiente:

Solución concentrada	Resolvidor 16%	minigel	Concentrador 4%	minigel
Acril/bis-acrilamida	16 ml	5.3 ml	1.6 ml	0.53 ml
Amortiguador electroforético	10 ml	3.3 ml	3 ml	1 ml
Glicerol 79.5%	4 ml	1.3 ml	-	-
Persulfato NH ₄ 10%	100 µl	33 µl	100 µl	33 µl
TEMED	10 µl	3.3 µl	10 µl	3.3 µl
H ₂ O bidest.	-	-	7.4 ml	2.45 ml

Para evitar la formación de menisco en el gel concentrador, se virtió un poco de amortiguador electroforético diluido 1:3. Las muestras de proteína, así como los estándares de peso molecular, se mezclaron 1:1 con solución solubilizadora y se hirvieron durante 4-5 min. Los geles se tiñeron durante 1 hora y se destiñeron con ácido acético 10% (v/v) toda la noche.

A continuación se señala la composición de algunas soluciones:

Acril/bisacrilamida:	30:0.8 %, respectivamente
Amortiguador electroforético:	Tris 3 M, HCl 1 M, SDS 0.3%
Amortiguador gel desnaturalizante CATODO:	Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M, SDS 0.1%
Amortiguador gel desnaturalizante ANODO:	Tris-HCl 0.2 M pH 8.9
Sol. solubilizadora:	glicerol 30%, SDS 10%, Tris-HCl 0.1 M, azul bromofenol 0.3%, β-mercaptoetanol 4%
Sol. fijadora:	metanol 50%, ácido acético 10%
Sol. tinción:	isopropanol 25%, ácido acético 10%, azul Coomassie 0.1%
Sol. desteñidora:	ácido acético 10%
Amortiguador gel NATIVO	Tris 9 g, glicina 43.2 g, pH 8.3 y aforar a 3 l.

Se utilizaron 5 µg de proteína de los siguientes estándares de peso molecular (Sigma,

Co.):

Proteína	Peso molecular, kDa
Albúmina de suero bovino	66
Albúmina de huevo	45
Anhidrasa carbónica de eritrocito bovino	29
α-lactalbúmina bovina	14.2

2.7 Algunas otras cromatografías empleadas para la purificación parcial de la PPiase citoplásmica

Con el fin de obtener una preparación más pura de PPiase citoplásmica que permitiera determinar con certeza su movilidad en geles de poliacrilamida, se probaron varios tipos de cromatografías.

La primera fue una cromatografía de afinidad, utilizando aminohexil-Sefarosa 4B conjugada con PPI de acuerdo a la metodología de Nyrén y col. 1991. Se cargó una muestra de la fracción DEAE-Biogel A y se eluyó con PPI 50 mM y MgCl₂ 10 y 20 mM.

La segunda cromatografía empleada fue de exclusión molecular, Ultrogel ACA 44, utilizando como muestra la fracción de la columna DEAE-Biogel A.

La tercera cromatografía empleada fue de intercambio iónico, hidroxilapatita, en 2 modalidades: en presencia de 0.3% (v/v) Triton X-100 y sin detergente. En ambos casos se aplicaron muestras de precipitado a 65% saturación con sulfato de amonio. En el primer caso se eluyó con pulsos de amortiguador, sin y después con MgSO₄ 50 mM. En el segundo caso se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0.5 M NaCl. Gran parte de los pigmentos se retuvieron en la resina.

A continuación se muestran los diagramas de flujo que resumen los tres tipos de cromatografías:

Cromatografía de afinidad (Nyrén, y col., 1991)

Se lavaron y resuspendieron en 38 ml H₂O bidestilada 7.5 g de aminohexil-Sefarosa 4B
 ↓
 se mezcló con 75 ml de PPI-Na 0.1 M pH 8.0
 ↓
 se disolvieron 0.852 g de EDC en 0.5 ml de H₂O bidestilada
 ↓
 se agregó la EDC gota a gota por 5 min., agitando suavemente
 ↓
 se dejó en agitación 24 h a temperatura ambiente
 ↓
 se decantó la resina y se lavó con NaCl 0.5 M y después con H₂O bidestilada
 ↓
 se lavó y se equilibró en Tris-HCl 50 mM pH 8.6, 4°C
 ↓
 se empacó la resina en una columna de 1.5 x 10 cm a 4°C
 ↓
 se equilibró en Tris-HCl 20 mM, β-mercaptoetanol 2 mM, pH 8.6
 ↓
 se cargaron 0.874 mg proteína de la fracción DEAE-Biogel A
 ↓
 se eluyó con 50 ml de amortiguador Tris/β-mercaptoetanol,
 ↓
 con PPI 50 mM MgCl₂ 10 mM en el mismo amortiguador (20 tubos, 4 ml/tubo)
 ↓
 y por último con PPI 50 mM MgCl₂ 20 mM en el mismo amortiguador (40 tubos).

Cromatografía de exclusión molecular

80 ml de Ultrogel ACA 44 se lavaron con 200 ml de agua bidestilada y se equilibró con 2 veces el mismo volumen de amortiguador TZ88.6
 ↓
 se empacó una columna (1.5 x 90 cm) a 4°C, y se equilibró de nuevo. Se ajustó el flujo a 0.25 ml/min.
 ↓
 Se aplicó 0.5 ml (1.5 mg de proteína) de la fracción DEAE-Biogel A con 2 gotas de glicerol 79.5%
 ↓
 se eluyó con el mismo amortiguador, colectando fracciones de 1.5 ml a la misma velocidad.
 ↓
 Se determinó el volumen muerto (V₀) de la columna agregando 0.4 ml de azul dextran 0.5% y se eluyó bajo las mismas condiciones.

Cromatografía de intercambio iónico con hidroxilapatita

A) Sin Triton X-100

Se hidrataron 10 g de hidroxilapatita (Biorad) en 60 ml de etilenglicol 10%, MgSO₄ 10 mM, quitando los polvos finos

↓

se equilibró con 180 ml de TZ08.6

↓

se empacó en una columna de 2.2 cm de diámetro a 1 ml/min, 4°C, y se equilibró de nuevo con 180 ml de amortiguador

↓

se aplicaron 28 mg de proteína de p65% y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.5 M en el mismo amortiguador, 1 ml/min, 4 ml/fracción.

B) Con Triton X-100

10 g de hidroxilapatita se hidrataron de la misma forma que la cromatografía anterior y se empacó en una columna de las mismas dimensiones, a la misma velocidad de flujo

↓

se equilibró con Tris-HCl 20 mM, β-mercaptoetanol 2 mM, Triton X-100 0.3% (v/v), pH 8.6

↓

se aplicaron 39 mg de proteína de p65% y se eluyó 100 ml del amortiguador Tris/β-mercaptoetanol/Triton, 20 fracciones de 4.5 ml cada una, a 1 ml/min

↓

los siguientes 18 tubos se eluyeron con el mismo amortiguador más MgSO₄ 50 mM.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Especificidad por sustrato

La primera aproximación para explorar la posible existencia, así como la especificidad, de pirofosfatasa inorgánicas en preparaciones de membrana tilacoide y de citoplasma de S. maxima, fue determinar la hidrólisis del sustrato clásico de las pirofosfatasa inorgánicas: M^{2+} -PPi, ya sea Mg-PPi o Zn-PPi, en presencia o ausencia de M^{2+} libre. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II.

Tanto la preparación de PPiasa membranal obtenidas por el método de arena, como el precipitado al 65% saturación $(NH_4)_2SO_4$ de PPiasa citoplásmica hidrolizan los complejos M^{2+} -PPi.

La PPiasa membranal muestra mayor actividad hidrolítica con Zn-PPi que con el sustrato clásico de las PPiases membranales: Mg-PPi (Celis y Romero, 1987; Randhal, 1979) a pH 6.5. La presencia de 0.5 mM Zn^{2+} libre estimula su actividad 6 veces, mientras que 1 mM de Mg^{2+} libre no tiene ningún efecto sobre la actividad hidrolítica a dicho pH.

La preparación de PPiasa citoplásmica muestra una actividad específica considerablemente mayor que la preparación de membrana tilacoide, ya sea con Zn-PPi o con Mg-PPi; sin embargo, la presencia de 0.5 mM o 2 mM Zn^{2+} libre a pH 6.5 y pH 8.0, respectivamente, inhiben la actividad hidrolítica significativamente. En comparación, la presencia de 2 mM de Mg^{2+} libre estimula la actividad al doble del valor obtenido en ausencia de dicho catión.

Paralelamente se midió la actividad hidrolítica de la fosfatasa alcalina que, como se muestra en la Tabla II, es capaz de hidrolizar cualquiera de los sustratos utilizados, bajo las mismas condiciones experimentales que se emplearon para medir la hidrólisis de las

TABLA II Especificidad por sustrato de las PPIasas citoplásmica y membranar de Spirulina maxima

SUSTRATO	Actividad (nmolPi/min/mg)				
	M ²⁺ -PPi mM	M ²⁺ , mM	MEMBRANA	CITOP. [■]	F.A. [†]
PPi	0.5	-	0.14 ± 0.28	5 ± 4	393 ± 24
Zn-PPi	0.5	-	7.5 ± 1.7	175 ± 19	337 ± 34
	1.0	-	n.d.	881 ± 89	n.d.
Zn-PPi	0.5	Zn, 0.5	55.4 ± 4.4	156 ± 9	272 ± 20
	1.0	Zn, 2.0	n.d.	557 ± 73	n.d.
Mg-PPi	2.0	-	3.05 ± 0.75	n.d.	n.d.
	2.0	Mg, 1.0	2.22 ± 0.48	n.d.	n.d.
	1.0 [■]	-	n.d.	421 ± 55	n.d.
	1.0 [■]	Mg, 2.0	n.d.	920 ± 48	n.d.
p-NO ₂ -ϕ-P	0.5	Zn, 0.5	0	0	312 ± 24
P-enolpir.	2.0	Zn, 0.5	0.24 ± 0.06	0	137 ± 14
β-glic-P	2.0	Zn, 0.5	0.58 ± 0.25	0	243 ± 25
α-D-gluc1P	2.0	Zn, 0.5	0.73 ± 0.55	0	149 ± 26

p-NO₂-ϕ-P = p-nitrofenilfosfato; P-enolpir. = fosfoenolpiruvato; β-glic-P = β-glicerolfosfato; α-D-gluc1P = α-D-glucosa-1-P; ■ precipitado 65% citoplasma; † fosfatasa alcalina. Medio de reacción: Tris-maleico 50 mM pH 6.5, [■] pH 8.0; 30°C.

preparaciones de membrana y citoplasma. Sin embargo, ninguna de las dos PPIasas de S. maxima son capaces de hidrolizar aquellos los sustratos que hidrolizó la fosfatasa alcalina.

3.2 Determinación de pH óptimo

En la figura 4 se muestra el efecto del pH sobre la hidrólisis de Zn-PPi en algunos de los primeros pasos de la purificación parcial de la PPIasa citoplásmica. El extracto crudo muestra un perfil de pH con una amplia meseta, al igual que el p40-50%. Ninguno de estos pasos de purificación tiene un pH óptimo definido, a diferencia del p50-65% que muestra una meseta desde pH 5.0 hasta 7.5. A pH por arriba de 8.0 no se hidroliza el complejo Zn-PPi.

Con respecto al perfil de pH para la hidrólisis de M^{2+} -PPi en la preparación de PPIasa membranal (figura 5), se aprecia un comportamiento diferente al de PPIasa citoplásmica. En la figura 5 A se observa que la PPIasa membranal sólo hidroliza Mg-PPi a pH alcalinos, entre 9.0 y 10.0, en presencia o ausencia de 1 mM Mg^{2+} libre. La concentración de Mg-PPi hidrolizado al pH óptimo de la PPIasa membranal de R. rubrum (pH 6.5) o de otras PPIasas membranales (~8.0), es considerablemente menor. Por otro lado, a pH 6.5-7.0 se hidroliza, preferentemente, el complejo Zn-PPi, en presencia o ausencia de Zn^{2+} libre (figura 5 B). A valores menores de pH 6.0, la hidrólisis de Mg-PPi o Zn-PPi es muy baja.

3.3 Efecto de cationes divalentes sobre la hidrólisis

Como se puede observar en la Tabla II y en la figura 5 (A y B), las preparaciones de PPIasas de membrana tilacoide y citoplásmica muestran diferente preferencia por los complejos M^{2+} -PPi; mientras que la PPIasa membranal hidroliza preferentemente Zn-PPi a pH 6.5, la PPIasa citoplásmica hidroliza Mg-PPi a pH 8.0.

Lo anterior se exploró con más detalle para determinar el efecto de diferentes

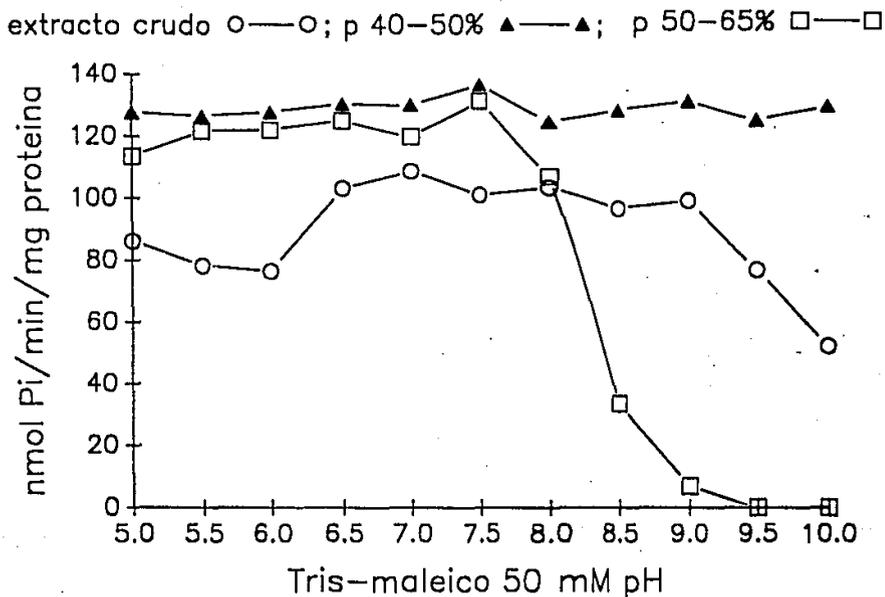


Figura 4 Perfil de pH de las fracciones para extraer la PPIasa citoplásmica.

Condiciones: Tris-maleico 50 mM ajustado a diferentes valores de pH, Zn-PPi 0.5 mM.

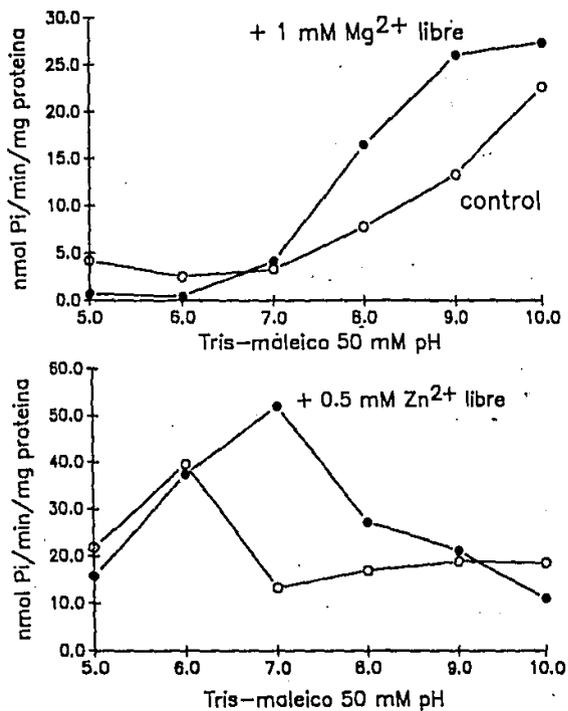


Figura 5 Perfil de pH para la hidrólisis de complejos M^{2+} -PPi, con o sin M^{2+} libre de la PPi_{as} de membrana tilacoide.

A, hidrólisis de Mg-PPi 2 mM; **B**, hidrólisis de Zn-PPi 0.5 mM.

concentraciones de M^{2+} libre sobre la actividad de la PPiase membranal y citoplásmica. En la figura 6 se muestra la actividad de la PPiase membranal con diferentes concentraciones de complejo Zn-PPi en ausencia o presencia de 0.5 mM Zn^{2+} libre (6 A); en 6 B se grafica el efecto de Zn^{2+} libre en la hidrólisis de 0.5 mM Zn-PPi. La actividad hidrolítica en ausencia de Zn^{2+} libre es muy pobre, la presencia desde 0.5 mM hasta 2.5 mM de Zn^{2+} libre estimula la hidrólisis hasta 9 veces; es decir, cuando la relación Zn/PPi es desde 1.2 hasta 6 se estimula la actividad, mientras que a cocientes menores de 1.2 o mayores de 11 inhiben la actividad debido a que existe un exceso de PPi libre, en el primer caso, y de Zn^{2+} libre, en el segundo caso (Celis y Romero, 1987; Sosa y col., 1992).

En el caso de la PPiase citoplásmica 2 mM de Zn^{2+} libre inhiben la hidrólisis del complejo Zn-PPi (figura 6 D); mientras que la misma concentración de Mg^{2+} libre estimula la hidrólisis del complejo Mg-PPi a concentraciones desde 0.25 mM (figura 6 C).

En la figura 7 se grafica el efecto de Zn^{2+} libre al hidrolizar 0.5 mM de Zn-PPi por la PPiase membranal y la citoplásmica. En el primer caso se observa que desde 0.1 mM hasta 10 mM de Zn^{2+} libre estimula la actividad. En el caso de la PPiase citoplásmica sólo bajas concentraciones de Zn^{2+} libre logran estimular la actividad; por arriba de 2.5 mM de Zn^{2+} libre, dicho catión ejerce un efecto inhibitorio considerable.

Se obtuvieron los valores de K_m y V_{max} para ambas enzimas (Tabla III). En el caso de la PPiase citoplásmica, la presencia de Zn^{2+} libre modifica ligeramente los valores de K_m y V_{max} . La presencia de Mg^{2+} libre aumenta un orden de magnitud el valor de K_m y 4 órdenes de magnitud la V_{max} , es decir, la enzima es menos afín por el sustrato pero transforma un número mayor de moléculas de sustrato por unidad de tiempo.

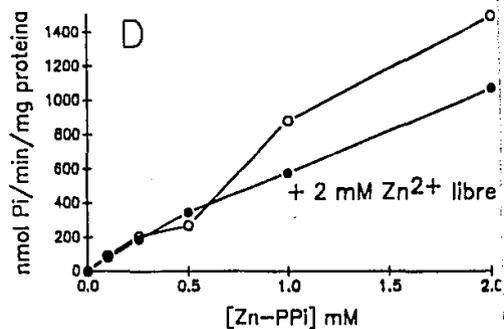
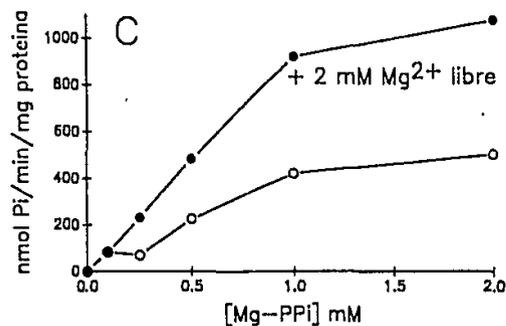
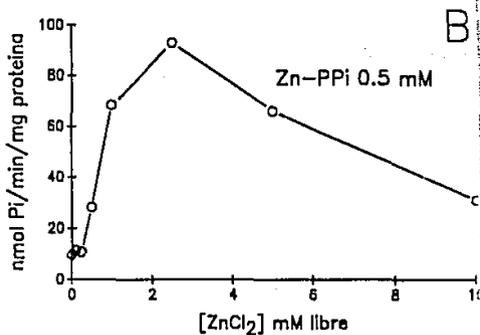
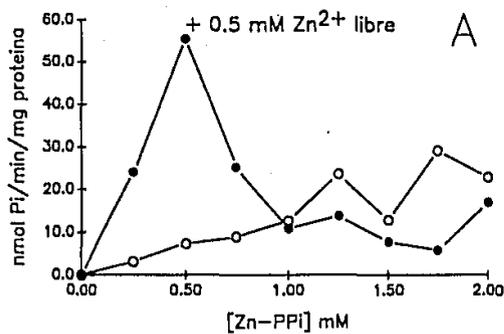


Figura 6 Estimulación de la actividad de PPiasea membranal y citoplásmica por M²⁺ libre.

A y B, PPiasea de membrana tilacoide; C y D, PPiasea citoplásmica.

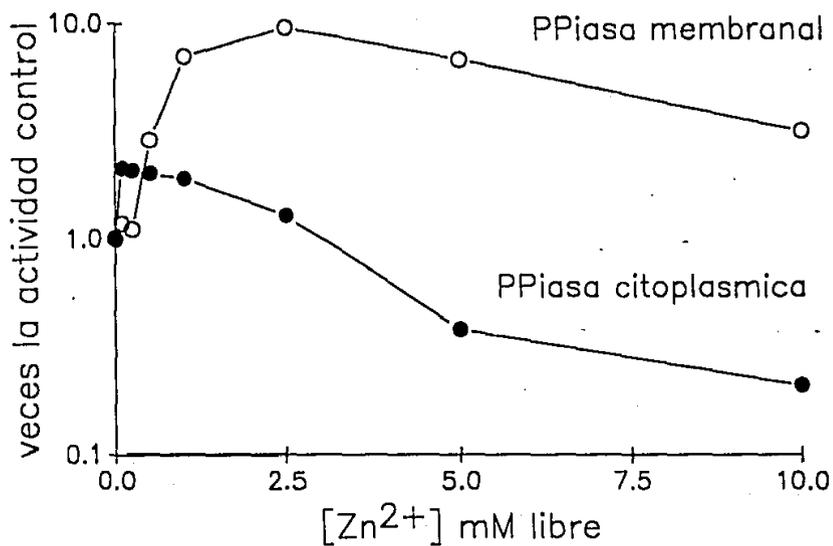


Figura 7 Efecto de Zn²⁺ libre en la actividad de las PPiases membranales y citoplásmica.

Condiciones: Zn-PPi 0.5 mM, Tris-maléico 50 mM pH 6.5 (o), pH 8.0 (.)

TABLA III K_m y V_{max} para las PPiases citoplasmica y membranal de Spirulina maxima.

PPiase	K_m , mM	V_{max} , nmolPi/min/mg
Membrana tilacoide [Zn-PPi]	8.06	101.01
citoplasmica, p65%		
[Zn-PPi]	2.20	2000
+ 2 mM Zn^{2+}	3.16	2640
[Mg-PPi]	0.58	0.588
+ 2 mM Mg^{2+}	4.60	4600

3.4 Hidrólisis de algunos otros complejos M^{2+} -PPi por las PPIasas citoplásmica y membranal de Spirulina maxima

En la figura 9 se muestra el curso temporal de la hidrólisis de 1 mM de diferentes complejos M^{2+} -PPi: Co-PPi, Mn-PPi y Ca-PPi. Tanto la PPIasa citoplásmica (fig. 8 A) como la membranal (fig. 8 B) hidrolizan preferentemente Co-PPi, seguido por Mn-PPi y ninguna de las dos hidroliza Ca-PPi.

3.5 Efecto de fosfolípidos totales sobre la actividad hidrolítica

Cuando las proteínas integrales de membrana se extraen de su medio hidrofóbico con detergentes, es necesario mantener la conformación nativa para conservar su actividad (Gennis, 1989). Esto se logra, en algunos casos, adicionando fosfolípidos. La elección de los fosfolípidos debe semejar lo más posible la composición de la membrana de la cual se extrae la proteína; sin embargo, como primera aproximación se recomienda adicionar fosfolípidos totales, ya que éstos contienen una mezcla de varios fosfolípidos comunes (Gennis, 1989). Por ejemplo, la actividad de la H^+ -PPIasa membranal de R. rubrum purificada se estimula al añadir fosfolípidos al medio de reacción, principalmente si se agrega cardiolipina. Otros fosfolípidos tales como el fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y *O*-ornitilfosfatidilglicerol estimulan la actividad en menor proporción que la cardiolipina; además, junto con ésta, son los principales fosfolípidos de la membrana de dicha eubacteria. También es posible reconstituir la enzima y obtener actividad hidrolítica de la PPIasa en presencia de Triton X-100 (Nyrén y col., 1991). Los autores interpretan que tanto los fosfolípidos como el detergente cubren las partes hidrofóbicas de la enzima, sobre todo en el caso de la cardiolipina, necesario para recuperar la actividad catalítica.

Con el fin de determinar si la actividad de PPIasa encontrada en las membranas tilacoides se debía a una enzima integral de membrana, se solubilizaron las proteínas

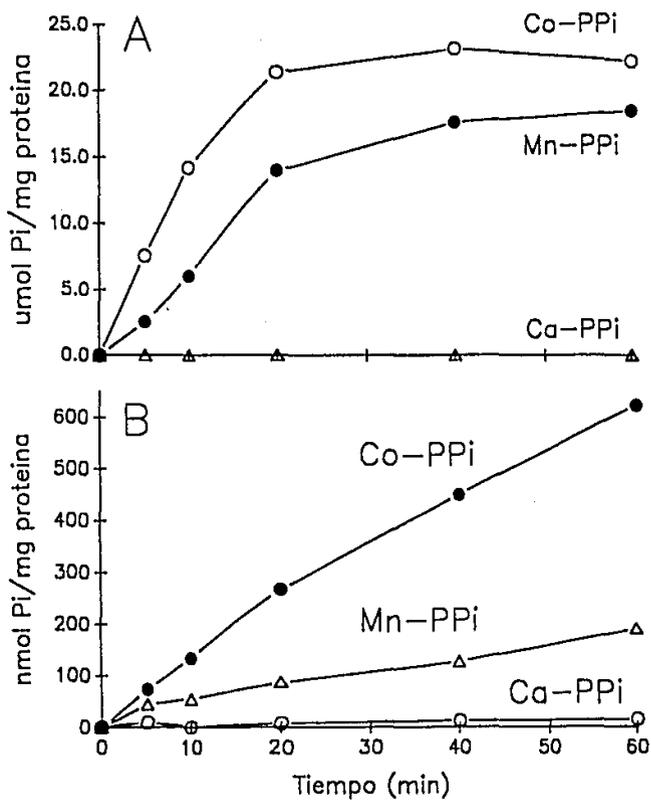


Figura 8

Curso temporal de la hidrólisis de diferentes complejos M^{2+} -PPi.

A, PPIasa citoplásmica pH 8.0; B, PPIasa membranal pH 6.5.

membranales de acuerdo a un protocolo similar al reportado por Baltscheffsky y Nyrén (1986) para solubilizar la PPIasa membranal de R. rubrum; excepto que se omitió $MgCl_2$ 1.3 M, ya que este agente inhibió la actividad PPIasa en S. maxima. Dicho protocolo consiste en solubilizar las proteínas con el detergente no-iónico Triton X-100 en presencia de 20% de etilenglicol y 0.1 M Tris-HCl pH 8.1. En la figura 9 se muestra una gráfica de solubilización con diferentes soluciones porcentuales de Triton X-100. A 0.5% de Triton X-100 se obtiene la mayor actividad hidrolítica, pero la mayor estimulación con fosfolípidos totales de soya se obtiene en el solubilizado a 0.75% de Triton X-100. A mayores concentraciones de detergente es posible obtener una mayor concentración de proteína en el solubilizado, sin embargo, la actividad disminuye. Altas concentraciones de detergente ejercen un efecto inhibitorio.

Para descartar la posibilidad de que las membranas estuvieran contaminadas por la PPIasa citoplásmica, se examinó el efecto de los fosfolípidos sobre dicha enzima. La PPIasa citoplásmica es una enzima soluble y, hasta la fecha, no se ha reportado que los fosfolípidos ejerzan algún efecto sobre las PPIasas citoplásmicas. Sin embargo, al determinar la actividad hidrolítica de los primeros pasos de purificación de la PPIasa citoplásmica en presencia de la misma concentración de fosfolípidos empleada en la estimulación de los solubilizados, se observó una inhibición considerable (Tabla IV), en especial en los precipitados 50 y 65%, que son las fracciones con mayor actividad específica. Se observó el mismo efecto al utilizar fosfatidil glicerol puro (no se muestran datos).

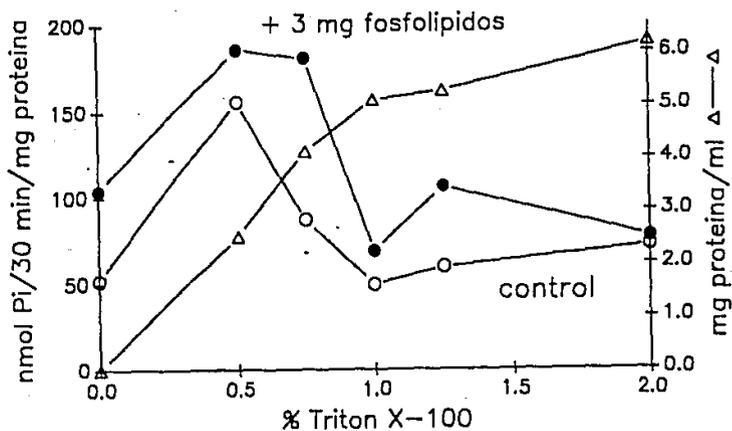


Figura 9 Estimulación de la actividad hidrolítica de los solubilizados de membrana tilacoide con fosfolípidos totales de soya.

Condiciones: Tris-maléico 50 mM pH 6.5, Zn-PPi 0.5 mM.

TABLA IV Efecto de los fosfolípidos sobre la actividad PPIasa citoplásmica de Spirulina maxima.

FRACCION	nmol Pi / min / mg protefna		
	CONTROL	+ 3 mg fosfolípidos	% INHIBICION
p 60°C	9.62 ± 7	10.37 ± 7	0
p 40%	24.94 ± 10	11.17 ± 10	55
p 50%	728.89 ± 81	47.11 ± 14	93
p 65%	1332.09 ± 21	71.61 ± 2	94

Medio de reacción: ZnCl₂ 2 mM, PPi 2 mM, Tris-maléico 50 mM pH 8.0, p = precipitado con sulfato de amonio

3.6 Efecto de inhibidores

Un criterio más para diferenciar la PPiase citoplásmica de la membranal es probar su sensibilidad a los inhibidores clásicos de las PPiases: NaF, IDP, MDP, y en el caso especial de las membranales: DCCD y butanol (Baltscheffsky, 1968; Keister y Minton, 1971; Nyrén y col., 1984). En la Tabla V se muestra el efecto de dichos inhibidores en la PPiase citoplásmica y en la membranal.

El NaF inhibe considerablemente a ambas enzimas, sin embargo, se necesitan concentraciones mayores para inhibir a la PPiase membranal debido a que la proporción de enzima del total de proteína es menor que en el caso de la preparación de PPiase citoplásmica.

Baltscheffsky (1968), utilizó el butanol para determinar diferencias entre la ATPasa y la PPiase membranal de R. rubrum: la PPiase membranal es más sensible que la ATPasa, mientras que la PPiase citoplásmica de la misma eubacteria no modifica su actividad en presencia del solvente. Es posible que la PPiase membranal de R. rubrum sea más sensible a daños en la estructura que la ATPasa del mismo organismo. El butanol inhibe entre 16-30% la actividad de la PPiase membranal de S. maxima, probablemente debido a que a 10% de butanol se separan las fases orgánica y acuosa y esto provoque la disgregación de la membrana, así como daños en la estructura de la PPiase. La PPiase citoplásmica no modificó su actividad en presencia de butanol, a pesar de que también se observó la separación de fases durante el experimento.

Tanto IDP como MDP son análogos del PPI, poseen enlaces Pi-NH-Pi y Pi-CH₂-Pi, respectivamente. IDP es un inhibidor competitivo del sustrato de la PPiase membranal de R. rubrum (Sosa y col., 1992) La actividad de la PPiase membranal de S. maxima se inhibió significativamente en presencia de IDP y MDP, mientras que dichos análogos del sustrato no ejercieron ningún efecto sobre la actividad de la enzima citoplásmica.

El DCCD es una carbodiimida hidrofóbica capaz de bloquear el movimiento

TABLA V Efecto de algunos inhibidores sobre las PPIasas de *Spirulina maxima*

INHI- BIDOR -	concen- tración	PPIasa MEMBRANAL		PPIasa CITOPLASMICA	
		actividad *	% inhibi- ción	actividad **	% inhibi- ción
ninguno		33.58 ± 1		1.85 ± 0.13 [§]	
NaF	2.5 mM	19.10 ± 1	43	0.11 ± 0.02	93
	10 mM	8.30 ± 1	75	0.06 ± 0.05	96
	20 mM	2.97 ± 1	91	0.02 ± 0.03	98
But.	6 %	28.30 ± 3	16	2.06 ± 0.11	0
	10 %	23.53 ± 2	30	2.04 ± 0.13	0
IDP	0.1 mM	28.05 ± 4	17	1.76 ± 0.11	0
	0.5 mM	23.00 ± 4	32	1.71 ± 0.06	0
MDP	0.1 mM	26.77 ± 3	21	1.78 ± 0.05	0
	0.5 mM	13.44 ± 1	60	1.73 ± 0.10	0
	1.0 mM	5.77 ± 1	82	1.84 ± 0.07	0
3φSn	200 μM	52.03 ± 2	59	2.06 ± 0.10	0
	400 μM	68.90 ± 2	111	1.77 ± 0.09	0
DCCD	0	33.58 ± 1	0	0.47 ± 0.02 [†]	0
	200 μM [†]	45.33 ± 2	31	0.48 ± 0.04	0
	500 μM [†]	60.66 ± 2	75	n.d.	n.d.

* Actividad = nmolPi/30min/mg, Zn-PPi 0.5 mM, pH 6.5; ** Actividad = μmol Pi/min/mg, Mg-PPi 1 mM, pH 8.0; [†] la actividad de ATPasa en partículas submitocondriales (Smith, 1967) con ATP 3mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7.8 se inhibió 80% usando las mismas soluciones de DCCD; But. = 1-butanol; § Zn-PPi 0.5 mM, pH 6.5; n.d. = no determinado.

transmembranal de protones catalizada por la F_1F_0 de mitocondria (Catell y col., 1971), cloroplasto (Sigrist-Nelson y Azzi, 1980), Escherichia coli (Senior, 1985), Streptococcus faecalis (Harold y col., 1969), la H^+ -PPiase membranal de R. rubrum (Nyrén y col., 1991), y de algunas otras enzimas tales como la citocromo c oxidasa mitocondrial (Casey y col., 1980), la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa mitocondrial (Pennington y Fischer, 1981; Phelps y Hatefi, 1981), el complejo bc₁ de corazón de bovino (Nalecz y col., 1983), así como de algunas otras H^+ -ATPasas (Schizosaccharomyces pombe y Saccharomyces cerevisiae; Goffeau y Slayman, 1981). Sin embargo, en la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de Neurospora crassa (Goffeau y Slayman, 1981; Sussman y Slayman, 1983), la actividad catalítica se inhibe pero no la translocación de H^+ , lo que sugiere que dicha H^+ -ATPasa posee un sitio sensible a DCCD ajeno al paso de H^+ a través de la enzima. La Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarcoplásmico se puede modificar químicamente con DCCD y perder la actividad catalítica, así como la del transporte de Ca^{2+} . Sin embargo, bajas concentraciones de Ca^{2+} protegen a la enzima de la inhibición por DCCD, por lo que se ha postulado que dicha carbodiimida interactúa con un carboxilo involucrado con el sitio de alta afinidad por Ca^{2+} (Sachs y col., 1976).

Por otro lado, en la bacteriorrodopsina de Halobacterium halobium, que es uno de los mejores ejemplos de enzima translocadora de H^+ , el DCCD no inhibe la translocación ni interactúa covalentemente con la bacteriorrodopsina inmersa en su membrana nativa (Solioz, 1984). Es claro que la presencia de un sitio sensible a DCCD no es una característica común que compartan las enzimas translocadoras de H^+ , debido a que una vez que el DCCD reacciona con un carboxilo y se forma el aducto O-acilurea, este puede seguir varias rutas: a) el aducto se reorganiza y forma N-acilurea; b) que reaccione con una amina, como nucleófilo, y forme diciclohexilurea; c) que el nucleófilo sea agua y se revierta la reacción, quedando el carboxilo intacto. Sin embargo, el uso del DCCD para detectar posibles proteínas translocadoras de protones ha sido un método diagnóstico ampliamente

aplicado, pero es necesario establecer con claridad qué tipo de ruta puede seguir la reacción, así como los sitios específicos de interacción con la proteína (Soliöz, 1984),

Como primera aproximación para dilucidar si la PPiase membranal detectada en S. maxima translocaba H⁺, se probó su sensibilidad a dos inhibidores clásicos del canal: el DCCD y 3 Φ Sn, éste último inhibe la ATPsintasa de S. maxima (Lerma y Gómez Lojero, 1982). Lejos de inhibir, ambas moléculas estimulan la actividad hidrolítica de la PPiase membranal hasta 75 y 111%, respectivamente, dentro de un intervalo de concentraciones donde el DCCD y 3 Φ Sn inhiben entre el 80 y 90% la actividad de ATPasa en partículas submitocondriales preparadas según Smith (1967), utilizando como sustrato ATP 3 mM y MgCl₂ 5 mM en Tris-sulfato 70 mM y con sistema regenerador (fosfoenolpiruvato y piruvato cinasa); y en S. maxima. Es posible que el DCCD interactúe con algún carboxilo involucrado en la regulación de la PPiase, ya sea en el sitio catalítico o en la proximidad de éste; sin embargo, esta es una posibilidad que queda abierta para dilucidarse en estudios posteriores.

La actividad hidrolítica de la PPiase membranal no se estimuló con el desacoplante CCCP (figura 10). Las vesículas de membrana tilacoide obtenidas por el método de arena están selladas, ya que al iluminarlas con luz actínica, a 30°C, es posible detectar alcalinización del medio externo, debido al bombeo de H⁺ hacia el interior de la vesícula por parte de la maquinaria fotosintética. Dicha alcalinización se evitó al incubar las membranas tilacoides con 100 μ M CCCP (no se muestran datos).

Ni el DCCD ni el 3 Φ Sn inhibieron la actividad hidrolítica de la PPiase citoplásmica.

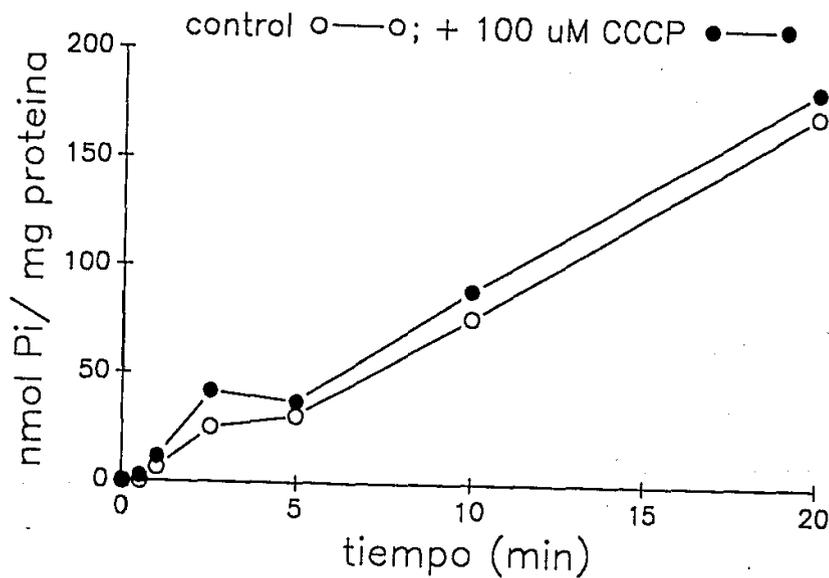


Figura 10 Efecto del desacoplante CCCP sobre la actividad de la PPIasa membranal.

Condiciones: PPI 0.5 mM, ZnCl₂ 1 mM, Tris-maléico 50 mM pH 6.5.

3.7 Movilidad electroforética

Otro método para detectar la presencia de PPiases es registrar su actividad hidrolítica en geles de poliacrilamida en condiciones nativas e incubando en el medio de reacción a pH 8.0. Se utilizó como sustrato 1 mM Mg-PPi y 2 mM Mg²⁺ libre, ya que por alguna razón, no es posible detectar actividad con Zn-PPi, a pesar de que *in vitro* sí se detecta.

En la figura 11 se muestra el barrido densitométrico de las bandas donde se encontró la actividad de PPiase del solubilizado de proteínas membranales a 0.75% Triton X-100 y del precipitado 40-65% del citoplasma, en presencia de 0.1% Triton X-100 en el gel, los amortiguadores y en la muestra de PPiase citoplásmica, con el fin de descartar algún posible efecto causado por el detergente. Se observa que la PPiase citoplásmica migra a una distancia mayor (21.2 mm) que la membranal (19.4 mm). Es posible que la PPiase citoplásmica posea un número mayor de residuos polares con carga que la membranal y por esa razón migre a mayor distancia en geles nativos donde influye tanto la carga como el peso molecular.

3.8 Purificación parcial de la PPiases citoplásmica de Spirulina maxima

Como se mostró en el punto anterior, la diferenciación física de las PPiases de S. maxima requiere preparaciones más puras, por lo que se hicieron intentos para aislar a la PPiase citoplásmica.

A pesar de que la PPiase citoplásmica es una enzima ubicua en la Naturaleza, no existe consenso acerca de alguna estrategia para su purificación. Existen reportes en los que utilizan agentes reductores, otros no lo hacen, algunos utilizan cromatografías de intercambio aniónico o catiónico o de afinidad, hidroxilapatita, exclusión molecular, etc., cada uno con amortiguadores de composición muy variada (ver Tabla I). En el presente

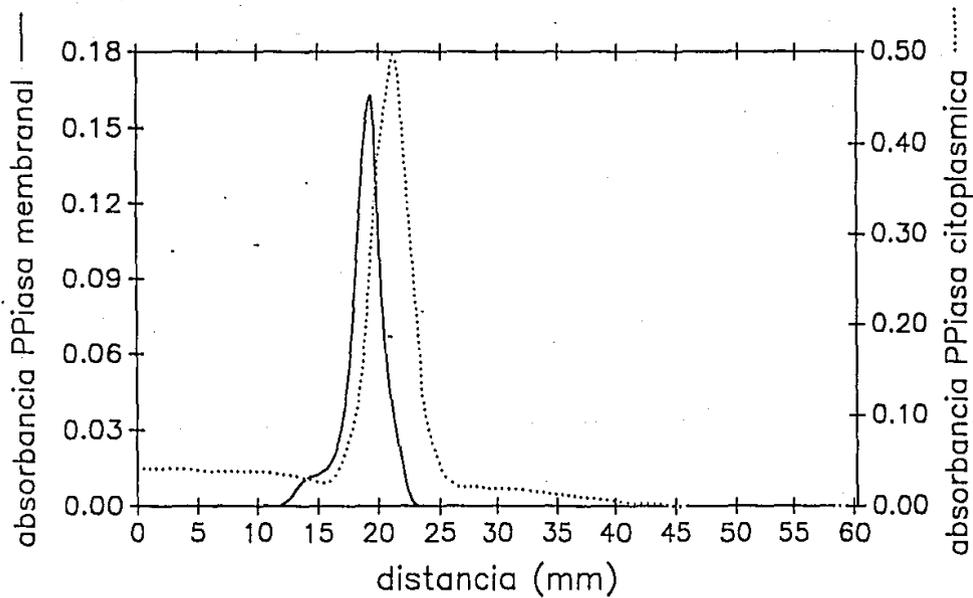


Figura 11 Barrido densitométrico de la actividad de PPIasa membranal y citoplásmica en gel de poliacrilamida nativo.

El barrido densitométrico se obtuvo con el programa UltraScan XL (LKB).

trabajo se optó por seguir un protocolo similar al reportado para la purificación de la PPiase citoplásmica de R. rubrum (Klemme y Guest, 1971), que consiste en precipitar a 60°C el extracto crudo de citoplasma, y después fraccionarlo con sulfato de amonio. El precipitado con mayor actividad específica se sometió a dos cromatografías sucesivas de intercambio aniónico: DEAE-celulosa y DEAE-Biogel A.

En la Tabla VI se muestra el resumen de la purificación parcial. Se puede observar que partiendo de una actividad específica de 0.29 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ es posible llegar hasta 15.74 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ después de la cromatografía de DEAE-Biogel A, es decir, se logra purificar 54 veces a la enzima. En la figura 12 se muestra un perfil de elución típico de la columna de DEAE-Biogel A. Sin embargo, no se observa el enriquecimiento de ninguna banda de proteína en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (figura 13). El par de bandas de 18-20 kDa que se observan claramente, son las ficocianobilinas que se copurifican con la PPiase citoplásmica. Es posible observar su color durante la electroforesis, antes de teñir los geles.

La muestra de DEAE-Biogel A contiene contaminantes de alto peso molecular, por lo que se intentó una cromatografía de exclusión molecular en Ultrogel ACA 44, con un intervalo de exclusión de 10 a 130 kDa. Sin embargo, las fracciones que contenían proteína se colectaron dentro del volumen de exclusión (V_e) de la columna (36-38 ml) determinado con azul Dextran (2 000 kDa). En la figura 14 A se muestra el gel desnaturalizante de las únicas fracciones que contuvieron proteína de la 19 a la 24. Es posible observar que los componentes de alto peso molecular se excluyen en las fracciones 20 y 21, y los de bajo peso molecular eluyen en las fracciones 22, 23 y 24; sin embargo, ninguna de las fracciones obtuvo una actividad específica mayor que la muestra de DEAE-Biogel A que se aplicó a la columna.

Se observó que es posible purificar el citoplasma de los pigmentos ficocianina y aloficocianina, utilizando una columna de hidroxilapatita, que es una resina de intercambio

TABLA VI Purificación parcial de la PPiase citoplásmica de Spirulina maxima

Paso de purificación	Proteína, mg	Actividad U	Rendimiento %	U/mg proteína	x
extracto crudo	335 ± 76	84.16 ± 35	100	0.29 ± 0.1	1
p 65%	40.6 ± 2.7	74.09 ± 15	87	1.86 ± 0.5	6.4
DEAE-celulosa	13.9 ± 7.4	46.00 ± 23	52	3.36 ± 0.1	11.6
DEAE-Biogel A	1.6 ± 0.5	26.9 ± 11	32	15.74 ± 2	54.5

Actividad, U = actividad total, $\mu\text{mol Pi}/\text{min}$; U/mg proteína = actividad específica, $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ proteína; x = veces purificación.

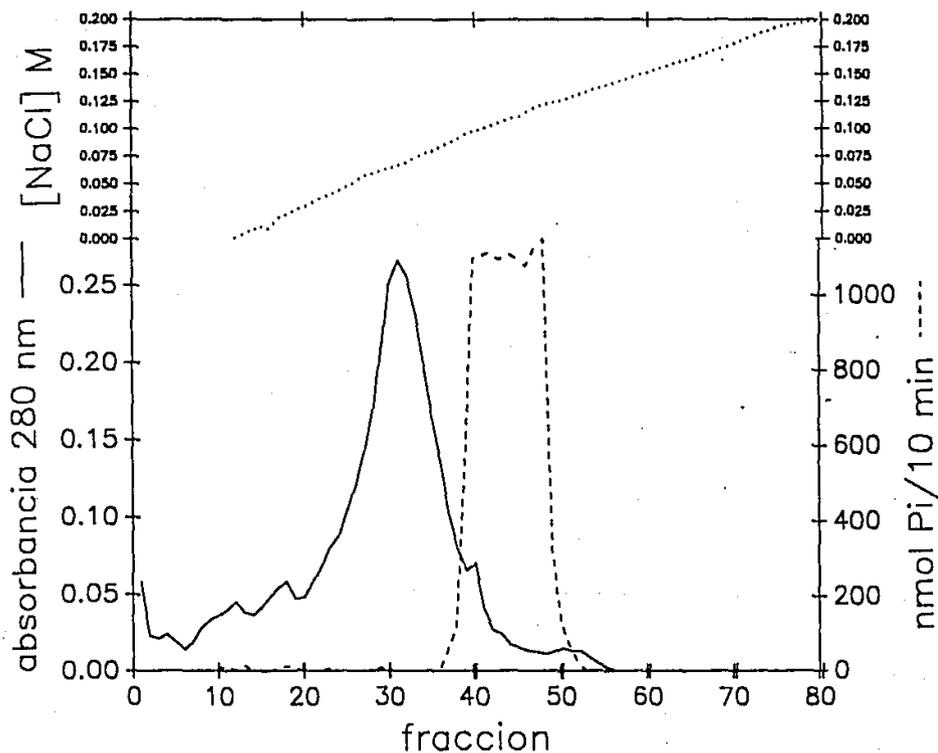


Figura 12 Perfil de elución típico de la cromatografía de intercambio aniónico, DEAE-Biogel A de la purificación parcial de la PPIasa citoplásmica de Spirulina maxima. Las condiciones de elución y de actividad hidrolítica se especifican en Materiales y Métodos.

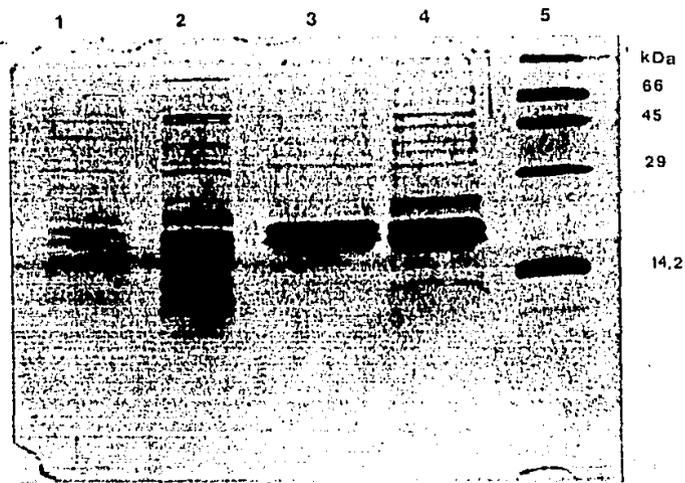


Figura 13 Gel de poliacrilamida desnaturalizante de los diferentes pasos de la purificación parcial de la PPiase citoplásmica de *Spirulina maxima*. Carril 1, extracto crudo; 2, p65%; 3, DEAE-celulosa; 4, DEAE-Biogel A; 5, estándares de peso molecular (5 µg proteína). Cada carril contiene 20 µg proteína; el gel se tiñó con azul de Coomassie.

iónico en donde se quedan adheridos los pigmentos. Una muestra de p65% se eluyó en una columna de hidroxilapatita con TZ38.6 y un gradiente lineal de NaCl; sin embargo, no se obtuvo ninguna fracción con actividad de PPIasa, aunque sí con proteína. Dado que la columna de hidroxilapatita está formada por fosfato de calcio, y se eluye Pi durante el experimento, es posible que éste haya inhibido la enzima. Se probó la misma cromatografía en presencia de Triton X-100, como la reportaron Nyrén y col. (1991) para la purificación de la PPIasa membranal de R. rubrum. Aunque sí se eluyó proteína, es decir, la ficocianina y aloficocianina no se adhirieron a la resina (figura 14 B), ninguna fracción presentó un enriquecimiento notable en actividad específica con respecto al p40-65% con que se cargó la columna.

El último tipo de cromatografía empleada fue la de afinidad, reportada por Nyrén y col. (1991), cargando una muestra de las fracciones obtenidas con la columna de DEAE-Biogel A. No se eluyó ninguna fracción con actividad de PPIasa, posiblemente debido a que la enzima se unió fuertemente al PPI conjugado a la resina aminohehil Sefarosa 4B (no se muestran los datos).

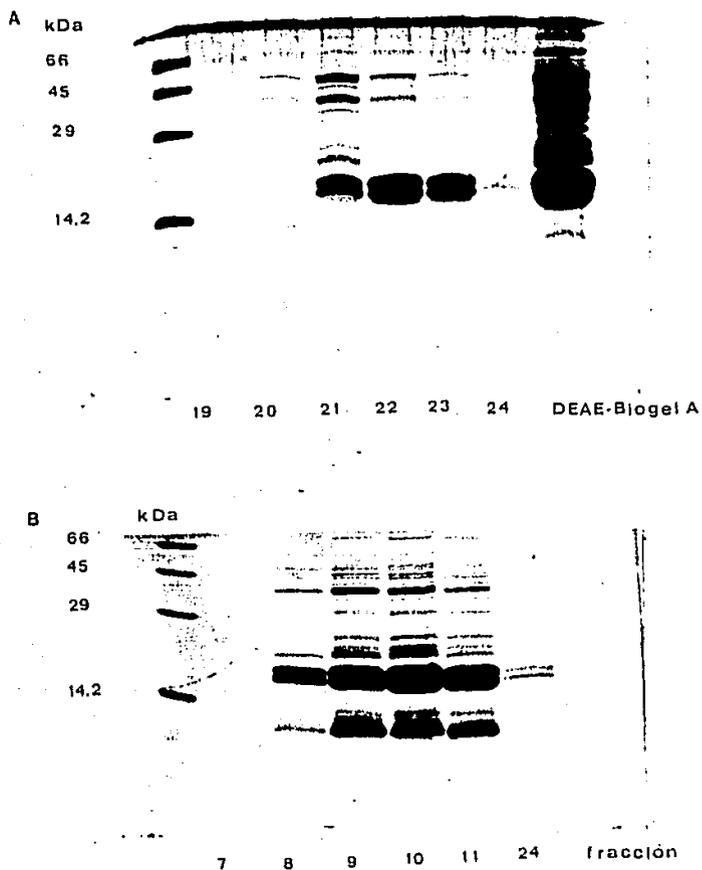


Figura 14 Gel de poliacrilamida desnaturalizante de las fracciones de las columnas de Ultrogel ACA 44 (A) y de hidroxilapatita (B).
Cada carril contiene 25 μ l de cada fracción.

CAPITULO IV

DISCUSION

Existen pocas especies en las que se haya demostrado la presencia de dos pirofosfatasa, la citoplásmica y la membranal, por ejemplo: Rhodospirillum rubrum, mitocondria de corazón y de hígado, y en Arabidopsis thaliana (para referencias ver Tabla I). La PPiase citoplásmica es ubicua en la naturaleza, por lo que muy probablemente se encuentren en las especies en donde sólo se ha reportado la enzima membranal. Lo interesante es explicar por qué coexisten dos enzimas con la misma actividad catalítica en una célula, y con características cinéticas y estructurales diferentes.

Hasta el momento no se han reportado PPiases en cianobacterias, por lo que el presente trabajo, de ser publicado, podrá contribuir al campo de la bioenergética al describir dos PPiases en Spirulina maxima. Por medio de experimentos de especificidad por sustrato se determinó que existe hidrólisis selectiva de M^{2+} -PPi tanto en citoplasma como en preparaciones de membrana tilacoidal, ya que no se observó hidrólisis inespecífica como en el caso de la fosfatasa alcalina utilizada como control.

La PPiase membranal de R. rubrum muestra un pH óptimo de 6.5 para la hidrólisis, mientras que para la reacción de recambio Pi-PPi es de 7.5 (Celis, Romero y Gómez-Puyou, 1985; Celis y Romero, 1987). Las PPiases inorgánicas de membrana vacuolar hidrolizan su sustrato en medios de reacción cuyo pH es cercano a la neutralidad o ligeramente básico (Britten y col., 1989; Ikeda y col., 1991., Maeshima y Yoshida, 1989; Sarafian y Poole, 1989; Volk y col., 1983); sin embargo, en dichos trabajos no se buscó con intención un pH óptimo.

Por otro lado, las PPiases citoplásmicas hidrolizan su sustrato a pH 8.0 o cercano (Kasho y Awaeva, 1984; Klemme y Guest, 1971; Verhoeven y col., 1986); excepto la PPiase citoplásmica de Sulfolobus acidocaldarius cepa 7, que muestra un pH óptimo de 6.5 a 6°C

(Wakagi y col., 1992).

En el caso de las PPIasas de S. maxima se encontró que el pH óptimo para la hidrólisis es de 8.0, y en la membranal de 6.5-7.0. Sin embargo, debe hacerse notar el hecho de que las vesículas membranales se prepararon en un amortiguador que contenía Tris-HCl 10 mM pH 8.6 y que al momento de agregarlas al medio de reacción (que contiene Tris-maleico 50 mM pH 6.5), se forma un Δ pH transitorio, que quizás sólo dure pocos segundos, pero el cual probablemente repercuta en la actividad catalítica de la enzima. Sin embargo, con los experimentos reportados en esta tesis aún no queda completamente establecido que la PPIasa membranal posea actividad translocadora de H^+ al hidrolizar el sustrato.

Con respecto al efecto de los cationes divalentes sobre la hidrólisis se debe resaltar que ambas PPIasas de S. maxima hidrolizan Zn-PPi con valores de actividad comparables al sustrato clásico de las PPIasas: Mg-PPi. También es notoria la actividad hidrolítica de ambas enzimas con otros complejos M^{2+} -PPi: Co-PPi y Mn-PPi, que al igual que el Zn, dichos metales pertenecen al grupo de los metales de transición. Sería interesante ahondar en la posible relación entre el tamaño del radio iónico del metal, el tamaño del complejo M^{2+} -PPi y la forma en que el sustrato se acomoda en el sitio catalítico de ambas enzimas, para dilucidar la selectividad por cationes divalentes acomplejados con PPi.

No se ahondó en la razón por la cual los fosfolípidos inhiben a la PPIasa citoplásmica; sin embargo se puede observar claramente que, mientras la actividad de PPIasa membranal se estimula, la citoplásmica se inhibe, y esta es una forma más de diferenciar ambas enzimas. Existe la posibilidad de que la PPIasa citoplásmica de S. maxima se comporte en forma similar a las lipoproteínas. Dichas proteínas solubles contienen sitios de unión para fosfolípidos y entran en contacto, frecuentemente, con la membrana citoplásmica con el fin de transferir lípidos a ésta, aunque siempre permanecen en solución (Tanford, 1980). Así, es posible que el efecto inhibitorio que ejercen los fosfolípidos sobre la PPIasa citoplásmica sea un mecanismo de regulación de la actividad

hidrolítica.

Es claro que ambas enzimas se comportan de forma diferente frente a complejos Zn-PPi y Mg-PPi, así como a los inhibidores butanol, IDP, MDP, $3\phi\text{Sn}$ y DCCD, por lo que será interesante determinar sus repercusiones en la cinética de las enzimas. Es importante resaltar que ambas enzimas se inhiben con NaF, inhibidor clásico para PPiases, lo que apoya los resultados obtenidos en los experimentos de especificidad por sustrato: tanto en citoplasma como en membranas existe una actividad de PPiasa específica.

Acerca de su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida nativos, se hace notar que se obtuvo el mismo resultado al agregar la misma concentración de Triton X-100 que contenía el solubilizado de proteínas membranales, tanto en la muestra de PPiasa citoplásmica como en el gel y los amortiguadores, lo que permite descartar la posibilidad de que el detergente provoque una migración anómala de las proteínas del solubilizado. El resultado sugiere que la PPiasa membranal es una proteína más hidrofóbica, con un número de aminoácidos cargados menor que la PPiasa citoplásmica. Lo anterior está apoyado por los trabajos de Sarafian y Poole (1989) y Sarafian y col., (1992), donde se reporta la purificación de la PPiasa vacuolar de *A. thaliana* y la clonación del gene que codifica para dicha enzima, revelando un carácter fuertemente hidrofóbico, ya que el perfil de hidropatía sugiere 13 cruces transmembranales.

Durante la purificación de la PPiasa citoplásmica se copurifican ficobiliproteínas que, por los valores de área relativa obtenidos de los barridos densitométricos de los geles de poliacrilamida desnaturalizantes, oscilan entre 60-70% (no se muestran los datos). Debido a que no se observa el enriquecimiento de ninguna banda de proteína correspondiente a la PPiasa citoplásmica, no es posible estimar la proporción de PPiasa/ficobiliproteínas en cada paso de la purificación parcial.

Por último es necesario determinar cuál es la causa por la cual no se observó el enriquecimiento de ninguna banda de proteína en geles de poliacrilamida

desnaturalizantes, a pesar de que conforme aumentan los pasos de purificación de la PPiase citoplásmica, la actividad específica aumente significativamente. La posibilidad de que puentes disulfuro provoquen la formación de oligómeros se puede descartar debido a que los amortiguadores empleados durante la purificación contienen β -mercaptoetanol. Asimismo, las interacciones iónicas entre proteínas que provoquen la formación de acúmulos debido a la presencia de sales también se podría descartar, ya que las muestras y fracciones colectadas de las cromatografías se dializan. Sin embargo, podría intentarse una purificación en presencia de agentes quelantes para descartar completamente esta posibilidad. Dado que las cromatografías de exclusión molecular y de afinidad empleadas no fueron de gran utilidad, debe recurrirse a otro tipo de estrategias, tales como: resinas hidrofóbicas, electroelución y geles en dos dimensiones.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Existen dos pirofosfatasas, una citoplásmica y otra membranal, en la cianobacteria Spirulina maxima diferenciables por las siguientes características:

- a) ambas son PPiasas inorgánicas que hidrolizan complejos M^{2+} -PPi; la citoplásmica hidroliza Mg-PPi a pH 8.0 y Mg^{2+} libre la activa, mientras que la membranal hidroliza Zn-PPi a pH 6.5 y requiere Zn^{2+} para su actividad e hidroliza Mg-PPi a pH alcalinos,
- b) la presencia de fosfolípidos estimula la actividad del solubilizado al 0.75% Triton X-100 pero inhiben a la PPiasa citoplásmica, lo que sugiere existe una PPiasa asociada a la membrana; sin embargo, acerca de su actividad translocadora de H^+ no es posible afirmar nada con certeza aún, ya que ni los inhibidores clásicos de canales de H^+ , DCCD y $3\phi Sn$, ni el desacoplante CCCP, ejercen un efecto inhibitorio (en el primer caso), ni estimulador de la actividad (en el segundo caso),
- c) Ambas enzimas son sensibles a NaF, y la membranal lo es a IDP y MDP.
- d) Es posible diferenciar físicamente por movilidad electroforética a ambas enzimas; la PPiasa citoplásmica se caracteriza por migrar a mayor distancia que la membranal, debido posiblemente a que contiene un mayor número de residuos polares.

Las perspectivas de trabajo son numerosas. Es posible abordar el estudio de las propiedades cinéticas de ambas enzimas, su dependencia por M^{2+} libre y su respuesta a diferentes inhibidores. Con respecto a la PPiasa membranal, es necesario responder la pregunta a cerca de si la hidrólisis del sustrato está acoplada al bombeo de H^+ , como ocurre en las demás PPiasas membranales reportadas, y estudiar el efecto del componente

eléctrico del potencial electroquímico, si es que ocurre que éste participe en la reacción. Se sugiere el empleo de técnicas espectrofluorométricas, utilizando anaranjado de acridina, 9-aminoacridina o rojo Cresol para medir ΔpH , y metiltrifenilfosfonio o tetrafenilborato para $\Delta\psi$ (Cramer y Knaff, 1991). Es necesario responder cuál es la orientación de la PPiase membranaral, aunque todo parece indicar que su sitio activo se encuentra mirando hacia el citoplasma, al igual que la ATPsintasa; sin embargo, debe ratificarse con más experimentos. Asimismo, se debe estudiar más a fondo si la actividad de PPiase encontrada en la membrana se debe a una proteína intrínseca o a una periférica. Dicho estudio se sugiere ya que se requirió un porcentaje bajo de detergente para obtener la preparación con actividad estimulable por fosfolípidos. Sin embargo, se sugiere que la PPiase membranaral de S. maxima es una proteína integral de membranaral. Debe estudiarse con más detenimiento el efecto inhibitorio o regulatorio que ejercen los fosfolípidos totales de soya sobre la actividad de la PPiase citoplásmica.

Por último, se requiere de preparaciones más puras que permitan diferenciar físicamente ambas enzimas, por lo que se deben realizar experimentos tendientes a su purificación. Con preparaciones puras es posible explorar la posibilidad de entrecruzamiento de anticuerpos entre PPiases, citoplásmicas y membranarales, así como con las subunidades catalíticas de las F₁V₀A-ATPasas y con las subunidades del canal de las H⁺-ATPasas. Lo anterior abre la posibilidad de iniciar estudios comparativos con un enfoque evolutivo, con el fin dilucidar el parentesco entre las H⁺-ATPasas y las PPiases, así como las relaciones filogenéticas entre las PPiases.

REFERENCIAS

- Ames, B.N. (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Meth. Enzymol.* Neufeld, E.F. y Ginsburg, V. eds. Academic Press, New York. VIII: 115-118.
- Baltscheffsky, H. (1967) Inorganic pyrophosphate and the evolution of biological energy transformation. *Acta Chem. Scand.* 21: 1973-1974.
- Baltscheffsky, H., von Stednigk, L.V., Heldt, H.W. y Klingenberg M. (1966) Inorganic pyrophosphate formation in bacterial photophosphorylation. *Science* 153: 1120-1124.
- Baltscheffsky, H. (1971) Inorganic pyrophosphate and the origin and evolution of biological energy transformation. En: *Chemical Evolution and the Origin of Life*. Buvet, R. y Ponamperuma, C. eds. North Holland Publishing Co. 466-474 pp.
- Baltscheffsky, M. (1968) Inorganic pyrophosphate as energy donor in photosynthetic and respiratory structures. En: *Regulatory function of biological membranes*. Jarnefelt, J. ed. *Biochem. Biophys. Acta Library*, Elsevier Publ. Co. II: 277-286.
- Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H. y Boork, J. (1982) Evolutionary and mechanistic aspects on coupling and phosphorylation in photosynthetic bacteria. En: *Electron transport and photophosphorylation*. Barber, J. ed. Elsevier Biomedical Press, The Netherlands. pp. 249-272.
- Baltscheffsky, M. y Nyrén, P. (1984) The synthesis and utilization of inorganic pyrophosphate. En: *Bioenergetics*, Ernster, ed. Elsevier Sci. Publ. pp. 197-206.
- Baltscheffsky, M. y Nyrén, P. (1986) Preparation and reconstitution of proton-pumping membrane-bound inorganic pyrophosphatase. En: *Meth. Enzymol.* Purich D.L., ed. Academic Press, New York. 126: 538-545.
- Britten, C.J., Turner, J.C. y Rea, P.A. (1989) Identification and purification of substrate-binding subunit of higher plant H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase. *FEBS Lett.* 256: 200-206.
- Broda, E. (1975) *The evolution of the bioenergetic processes*. Pergamon Press, Oxford. 231 pp.
- Catell, K.J., Lindop, C.R., Knight, I.G. y Beechey, R.B. (1971) The identification of the site of action of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide as a proteolipid in mitochondrial membranes. *Biochem. J.* 125: 169-177.

Castenholz, R.W. y Waterbury, J.B. (1989) Section 19 Oxigenic photosynthetic bacteria. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. 3. Stanley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. y Holt, J.G. eds. Williams & Wilkins, Baltimore. pp.1710-1774.

Casey, R.P. Thelen, M. y Azzi, A. (1980) Dicyclohexylcarbodiimide binds specifically and covalently to cytochrome c oxidase while inhibiting its H⁺-translocating activity.

Celis, H., Romero, I. y Gómez-Puyou, A. (1985) The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of membrane-bound pyrophosphatase of Rhodospirillum rubrum: effects of Mg²⁺, phosphate and pyrophosphate. *J. Bioenerg. Biomem.* 19: 225-271.

Celis, H. y Romero, I. (1987) The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic membrane-bound pyrophosphatase of Rhodospirillum rubrum: effects of pH and divalent cations. *J. Bioenerg. Biomem.* 19: 225-271.

Cohen, S.A., Sterner, R., Keim, P.S. y Heinrichson, R.L. (1987) Covalent structural analysis of yeast inorganic pyro-phosphatase. *J. Biol. Chem.* 253: 889-897.

Cooperman, B.S. (1982) The mechanism of action of yeast inorganic pyrophosphatase. En: *Meth. Enzymol.* Purich, D.L., ed. Academic Press, New York. 87: 526-548.

Cooperman, B.S., Baykov, A.A. y Lahti, R. (1992). Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatases. *Trend. Biochem. Sci.* 17: 262-266.

Cramer, W.A. y Knaff, D.B. (1991) Energy transduction in biological membranes. Springer-Verlag, New York. 579 pp.

de Duve, C. (1991) Blueprint for a cell: the nature and origin of life. Capítulo 7. Patterson, N. publ. Carolina Biological Supply Co. Burlington, North Carolina. 147-170 pp.

Denda, K., Konishi, J., Oshima, T., Date, T. y Yoshida, M. (1989) A gene encoding the proteolipid subunit of Sulfolobus acidocaldarius ATPase complex. *J. Biol. Chem.* 264 (13): 7119-7121.

Dutton, L.E. y Baltscheffsky, M. (1972) Oxidation-reduction potential dependence of pyrophosphate-induced cytochrome and bacteriochlorophyll reactions in Rhodospirillum rubrum. *Biochim. Biophys. Acta* 267: 172-178.

Fiske, L.A. y Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* LXVI (2): 375-408.

Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P. y Walsby, A.E. (1973) The blue-green algae. academic Press, London & New York. 459 pp.

- Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R., Magrum, L., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, P.A., Luehrs, K.R., Chen, N.K. y Woese, C.R. (1987) The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209: 457-463.
- Glazer, A.N. (1989) Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J. Biol. Chem.* 264 (1): 1-4.
- Gennis, R.B. (1989) Biomembranes. Molecular structure and function. Springer-Verlag, New York. pp. 85-103.
- Goffeau, A. y Slayman, C.W. (1981) The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 689: 197-213.
- Gogarten, J.P., Kibak, H., Ditrach, P., Taiz, L., Bowman, E.J., Bowman, B.J., Manolson, M.F., Poole, R.J., Date, T., Oshima, T., Konishi, J., Denda, K. y Yoshida, M. (1989a) Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implication for the origin of eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6661-6665.
- Gogarten, J.P., Rausch, T., Bernasconi, P., Kibak, H. y Taiz, L. (1989b) Molecular evolution of H⁺-ATPases. I Methanosarcina and Sulfolobus are monophyletic with respect to eukaryotes and eubacteria. *Z. Naturforsch* 44c: 641-650.
- Gogarten, J.P., Starke, T., Kibak, H., Fishmann, J. y Taiz, L. (1992) Evolution and isoforms of V-ATPase subunits (en revisión editorial).
- Guglielmi, G., Cohen-Bazire, y Bryant, D.A. (1981) The structure of Gliobacter violaceus and its phycobilisomes. *Arch. Microbiol.* 129: 181-189.
- Guillory, R.J. y Fisher, R.R. (1972) Studies on the light-dependent synthesis of inorganic pyrophosphate by Rhodospirillum rubrum. *Biochem. J.* 129: 471-481.
- Hachimori, A., Shiroya, Y., Hirato, A., Miyahara, T. y Samejima, T. (1979) Effects of divalent cations on thermophilic inorganic pyrophosphatase. *J. Biochem.* 86: 121-130.
- Harold, F.M., Baarda, J.R., Baron, G. y Abrams, A. (1969) Inhibition of membrane bound adenosine triphosphatase and of cation transport in Streptococcus faecalis by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* 244: 2261-2268.
- Ikeda, M., Satoh, S., Maeshima, M., Mukohata, Y. y Moritani, Ch. (1991) A vacuolar ATPase and pyrophosphatase in Acetabularia acetabulum. *Biochem. Biophys. Acta* 1070: 77-82.
- Jones, W.J., Nagle, D.P. y Whitman, W.B. (1987) Methanogens and the diversity of

Archeobacteria. *Microbiol. Rev.* 51: 135-177.

Joyce, G.F. (1989) RNA evolution and the Origins of Life. *Nature* 338: 217-224.

Kasho, V.N. y Avaeva, S.M. (1984) Inorganic pyrophosphatase II. Purification and studies of some properties of the enzyme isolated from thermophilic bacterium *Thermus flavus* 70K. *Int. J. Biochem.* 16 (3): 315-321.

Kawasaki, I., Adachi, N. e Ikeda, H. (1990) Nucleotide sequence of *S. pombe* inorganic pyrophosphatase. *Nucleic Acid Res.* 18: 5888.

Keiber, J.J. and Signer, E.R. (1991) Cloning and characterization of an inorganic pyrophosphatase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 16: 345-348.

Keister, D.L. y Minton, N.J. (1971) ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 45 (5): 932-939.

Kibak, H., Taiz, L., Starke, T., Bernasconi, P. y Gogarten, J.P. (1992) Evolution of structure and function of V-ATPases. *J. Bioenerg. Biomem.* 24 (2): 415-424.

Klemme, J.H. y Gest, H. (1971) Regulation of the cytoplasmic inorganic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* *Eur. J. Biochem.* 22: 529-537.

Klemme, J.H., Klemme, B. y Gest, H. (1971) Catalytic properties and regulatory diversity of inorganic pyrophosphatases from photosynthetic bacteria. *J. Bacteriol.* 108 (3): 1122-1128.

Koch, A.L. y Schmidt, T.M. (1991) The first cellular bioenergetic process: primitive generation of a proton-motive force. *J. Mol. Evol.* 33: 297-304.

Koshland, D.E. (1975) The evolution of function in enzymes. *Fed. Proc.* 35: 2104-2111.

Krishnan, V.A. y Gnanam, A. (1988) Properties and regulation of Mg²⁺ dependent chloroplast inorganic pyrophosphatase of *Sorghum vulgare*. *Arch. Biochem. Biophys.* 260: 277-284.

Lahti, R. (1983) Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol. Rev.* 47: 169-179.

Lazcano, A., Fox, G.E., y Oró, J. (1992) Life before DNA: the origin and evolution of early archean cells. En: *The evolution of metabolic function*. Mortlock, R.P., ed. The Telford Press, Caldwell, New Jersey, pp 237-295.

Lear, J.D., Wasserman, Z.R. y DeGrado, W.F. (1988) Synthetic amphiphilic peptide models for protein ion channels. *Science* 240: 1177-1181.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

69

Lerma, C. y C. Gómez-Lojero (1982) Photosynthetic phosphorylation by a membrane preparation of the cyanobacterium Spirulina maxima. Biochem. Biophys. Acta 680:181-186.

Lipmann, F. (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. Adv. Enzymol. 1: 100-162.

Lipmann, F. (1964) Projecting backward from the present stage of Evolution of Biosynthesis. En: The origins of prebiological systems and their molecular matrices. (Fox, S.W. ed.) Academic Press, New York. pp 259-280.

Liu, M.Y. y Le Gall, J. (1990) Purification and characterization of two proteins with inorganic pyrophosphatase activity from Desulfovibrio vulgaris: rubrerythrin and a new highly active enzyme. Biochem. Biophys. Res. Comm. 171 (1): 313-318.

Lübben, M. y Schäfer, G. (1987) A plasma membrane associated ATPase from the thermoacidophilic archaeobacterium Sulfolobus acidocaldarius. Eur. J. Biochem. 164: 533-540.

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.

MacNamara, K. (1990) Survivors of the primordial soup. New Scientist 8: 50-52.

Maeshima, M y Yoshida, Y. (1989) Purification and properties of vacuolar proton translocating pyrophosphatase from mung bean. J. Biol. Chem. 264: 20068-20073.

Mansurova, S.E., Shakhov, Y.A. y Kulaev, I.S. (1975) Synthesis of inorganic pyrophosphate by animal tissue mitochondria. FEBS Lett. 55:94-98.

Margulis, L. (1982) Early life. Science Books Int. Boston. 160 pp.

Martell, A.E. y Sillen, L.G. (1971) Stability constants of metal-ion complexes. The Chemical Society, London. pp. 865.

Meyer, W. y Schäfer, G. (1992) Characterization and purification of a membrane-bound archaeobacterial pyrophosphatase from Sulfolobus acidocaldarius. Eur. J. Biochem. 207: 741-746.

Millner, M.J., Oldenburg, M. y Fillingame, R.H. (1990) The essential carboxyl group in subunit c of the F_1F_0 ATPsynthase can be moved and H^+ -translocating function retained. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4900-4904.

Muehlstein, L. y Castenholz, R.W. (1983) Sheath pigment formation in blue green alga

Lyngbya aestuarii, as an adaptation to high light. Biol. bull. 165: 521-522.

Mukohata, Y. e Ihara, K. (1990) Situation of archaebacterial ATPase among ion-translocating ATPases. En: Bioenergetics. Kim, C.H. y Ozawa, T. eds. Plenum Press, New York. pp. 205-216.

Natecz, M.J., Casey, R.P. y Azzi, A. (1983) Effects of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide on isolated and reconstituted cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 724: 75-82.

Nelson, N. y Taiz, L. (1989) The evolution of H⁺-ATPases. Trends Biochem. Sci. 14: 113-116.

Nore, B.F., Nyrén, P., Salih, G.F. y Strid, A. (1990) Photosynthetic formation of inorganic pyrophosphate in phototrophic bacteria. Photosynthesis Res. 24: 75-80.

Nore, B.F., Sakai-Nore, Y., Maeshima, M., Baltscheffsky, M. y Nyrén, P. (1991) Immunological cross-reactivity between proton-pumping inorganic pyrophosphatases of widely phylogenetic separated species. Biochem. Biophys. Res. Comm. 181 (3): 962-967.

Nyrén, P., Hajnal, K. y Baltscheffsky, M. (1984) Purification of the membrane bound H⁺-pyrophosphatase from Rhodospirillum rubrum. Biochem. Biophys. Acta 766: 630-635.

Nyrén, P., Nore B.F. y Baltscheffsky, M. (1986) Studies on photosynthetic inorganic pyrophosphate formation in Rhodospirillum rubrum chromatophores. Biochem. Biophys. Acta 851: 276-282.

Nyrén, P., Nore, B.F. y Strid, A. (1991) Proton-pumping N,N'-dicyclohexylcarbodiimide sensitive inorganic pyrophosphatase from Rhodospirillum rubrum: purification, characterization and reconstitution. Biochemistry 30: 2883-2887.

Nyrén, P. y Strid, A. (1991) Hypothesis: the physiological role of the membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase in some phototrophic bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 77: 265-270.

Oesterhelt, D. y Stoerkenius, W. (1973) Functions of a new photoreceptor membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 (10): 2853-2857.

Pennington, R.M. y Fisher, R.R. (1981) Dicyclohexylcarbodiimide modification of bovine heart mitochondria thanshydrogenase. J. Biol. Chem. 256: 8963-8969.

Phelps, D.C. y Hatefi, Y. (1981) Inhibition of the mitochondrial nicotinamide nucleotide thanshydrogenase by dicyclohexylcarbodiimide an diethylpyrocarbonate. J. Biol. Chem. 256: 8217-8221.

- Pättner, I., solioz, M., Carafoli, E. y Ludwig, B. (1983) Dicyclohexylcarbodiimide does not inhibit proton pumping by cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans. Eur. J. Biochem. 134: 33-37.
- Rambler, M., Margulis, L. y Barghoorn, E.S. (1977) Natural mechanism of protection of a blue-green alga against ultraviolet light. En: Chemical Evolution of the early Precambrian (C. Ponamperuma, ed.) Academic Press, London. p. 133-141.
- Rea, P.A., Kim, Y., Sarafian, V., Poole, R.J., Davies, J.M. y Sanders, D. (1992) Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocases. Trends Biochem. Sci. 17: 348-353.
- Richter, O.M. y Schäfer, G. (1992) Purification and enzymatic characterization of the cytoplasmic pyrophosphatase from the thermophilic archaeobacterium Thermoplasma acidophilum. Eur. J. Biochem. 209: 343-349.
- Rodriguez, L. y Orgel, L. (1991) Pyrophosphate formation as the most efficient condensation reaction of activated nucleotides. J. Mol. Evol. 32:102-104.
- Romero, I., Gómez-Priego, A. y Celis, H. (1991) A membrane-bound pyrophosphatase from respiratory membranes of Rhodospirillum rubrum. J. Gen. Microbiol. 137: 2611-2616.
- Sachs, G., Chang, H.H., Rabon, E., Schackman, R., Lewin, M. y Saccomani, G. (1976) A non-electrogenic H⁺-pump in plasma membranes of Hog stomach. J. Biol. Chem. 251: 7690-7698.
- Sarafian, V. y Poole, R.J. (1989) Purification of an H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from vacuole membranes of red beet. Plant Physiol. 91: 34-38.
- Sarafian, V., Yongcheol, K., Poole, R.J. y Rea, P.A. (1992) Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding the pyrophosphatase energized vacuolar membrane H⁺-pump of Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1775-1779.
- Schägger, H., Link, T.A., Engel, W.D. y von Jagow, G. (1986) Isolation of the eleven protein subunits of the bc₁ complex from beef heart. Meth. Enzymol. Fleischer, S. y Fleischer, B. eds. 126: 224-237.
- Schwarm, H.M., Vigerschow, H. y Knobloch, K. (1986) Purification and properties of a soluble inorganic pyrophosphatases from Rhodospseudomonas palustris. J. Biol. Chem. 367: 119-126.
- Senior, A.E. (1985) The proton-ATPase of Escherichia coli. En: Curr. Top. Memb. Transport (Adelberg, E.A. y Slayman, C.W., eds.) 23: 135-151.

- Sigrist-Nelson, K. y Azzi, A. (1980) The proteolipid subunit of the chloroplast adenosine triphosphatase complex: reconstitution and demonstration of proton-conductive properties. *J. Biol. Chem.* 255: 10638-10643.
- Smith, A.L. (1967) Preparation, properties and conditions for assay of mitochondria: slaughterhouse material, small-scale. En: *Meth. Enzymol.* Academic Press, New York. X: 81-86.
- Smirnova, I.N., Kudryavsteva, N.A. Komissarenko, S.V., Tarusova, N.B. y Baykov, A.A. (1988) Diphosphonates are potent inhibitors of mammalian inorganic pyrophosphatases. *Arch. Biochem. Biophys.* 267: 280-284.
- Soloz, M. (1984) Dicyclohexylcarbodiimide as a probe for proton translocating enzymes. *Trend. Biochem. Sci.* 8 (Julio): 309-312.
- Sosa, A., Ordaz, H., Romero, I. y Celis, H. (1992) Mg²⁺ is an essential activator of hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of Rhodospirillum rubrum. *Biochem. J.* 283: 561-566.
- Stark, M.J.R. y Milner, J.S. (1989) Cloning and analysis of the Kluyveromyces fragilis TRP1 gene: a chromosomal locus flanked by genes encoding inorganic pyrophosphatase and histone H3. *Yeast* 5: 35-50.
- Stewart, W.D.P. (1980) Some aspects of structure and function in N₂-fixing cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 497-536.
- Stoeckenius, W. (1978) Speculations about the evolution of halobacteria and of chemiosmotic mechanism. En: *Light transducing membranes. Structure, function and evolution.* Deamar, D.W., ed. Academic Press, New York. 127-139 pp.
- Strid, A., Karlson, I.M. y Baltscheffsky, M. (1987) Demonstration of ΔpH and Δψ induced synthesis of inorganic pyrophosphate in chromatophores from Rhodospirillum rubrum. *FEBS Lett.* 224 (2): 348-352.
- Sumner, J.B. (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science.* 100: 413-415.
- Susman, M.R. y Slayman C.W. (1983) Modification of the Neurospora crassa plasma membrane [H⁺]-ATPase with N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* 258: 1839-1843.
- Tanford, C. (1980) The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. John Wiley & Sons, New York. 233 pp.

Taiz, L., Gogarten, J.P., Kibak, H., Struve, I., Bernasconi, P., Rausch, T., Taiz, S.L., Fichman, J. y Diltrich, P. (1989) Structure, function and evolution of the vacuolar H⁺-ATPases. En: Plant water relations and growth under stress. Memorias de la XXII conferencia de la Fundación Científica Yamada, Osaka, Japón. 57-64 pp.

Tominaga, N. y Mori, T. (1977) Purification and characterization of inorganic pyrophosphatase from Thiobacillus thiooxidans J. Biochem. 81: 477-483.

van Niel, C.B. (1935) Photosynthesis of bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 3: 138-150.

Vega, E. (1976) Determinación de la velocidad específica de crecimiento de la alga verde-azul Spirulina maxima en diferentes condiciones experimentales. Tesis licenciatura de la Univ. Autónoma de San Luis Potosí, México.

Verhoeven, J.A., Schenck, K.M., Meyer, R.R. y Trela, J.M. (1986) Purification and characterization of an inorganic pyrophosphatase from the extreme thermophilic Thermus aquaticus. J. Bacteriol. 168 (1): 318-321.

Voet, D. y Voet, J.G. (1990) Biochemistry. John Wiley & Sons, New York. 1223 pp.

Volk, S.E., Baykov, A.V., Kostenko, E.B. y Avaeva, S.M. (1983) Isolation, subunit structure and localization of inorganic pyrophosphatase of heart and liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 744: 127-134.

Volk, S.E. y Baykov, A.V. (1984) Isolation and subunit composition of membrane inorganic pyrophosphatase from rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 791: 198-204.

Wakagi, T., Lee, C.H. y Oshima, T. (1992) An extremely stable inorganic pyrophosphatase purified from the cytosol of a thermoacidophilic archaeobacterium Sulfolobus acidocaldarius strain 7. Biochim. Biophys. Acta 1120: 289-296.

Wilson, T.H. y Lin, E.C.C. (1980) Evolution of membrane bioenergetics. J. Supramol. Struct. 13: 421-446.

Woese, C.R., Kandler, O. y Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural systems of organisms: proposal for the domains Archea, Bacteria y eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4576-4579.

Woese, C.R. (1987) Bacterial Evolution. Microbial Rev. 51 (2): 221-271.

Wong, S.C.K., Hall, D.C. y Josse, J. (1970) Constitutive inorganic pyrophosphatase of Escherichia coli III. Molecular weight and physical properties of enzyme & subunits. J. Biol.

Chem. 245: 4335-4345.

Yang, A. y Wensel, T.G. (1992) Aminoacid and cDNA sequence analysis of bovine retinal inorganic pyrophosphatase. FASEB J. 6 (1): A468.