

89  
2es



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIOS SOBRE LA CATALISIS EN LA F<sub>1</sub>-ATPase DE RHODOSPIRILLUM RUBRUM

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ERNESTO MALDONADO OLVERA



MEXICO, D.F.



1995

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron el pasante(s) Ernesto Maldonado Olivera.

con número de cuenta 8438306-6 con el Título: Estudios sobre la catálisis en la P<sub>1</sub>-ATPasa de Rhodospirillum rubrum.

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dr.	Georges Dreyfus Cortés.		
Director de Tesis			
Dra.	Blanca Lilia Barquera Alcalde.		
M en C.	Silvia Devars Ramos		
M en IBB.	Manuel Miranda Arango.		
Suplente			
M en IBB.	Emma Berta Gutierrez-Cirlos Madrid.		
Suplente			

*Me brota la invención del ansia...*

*Silvio Rodriguez.*

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Georges Dreyfus Cortés, en el Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

**JURADO**

Georges Dreyfus Cortés  
Blanca Barquera Alcalde  
Silvia Devars Ramos  
Emma B. Gutierrez Cirlos Madrid  
Manuel Miranda Arango

**A mis Padres Juan y Ana María**

**A mis hermanos**      **Juan**  
                                 **Gabriel**  
                                 **Josue**  
                                 **Messner.**

**... y a Rosa Estela (con loca pasión)**

**AGRADECICO A...**

**La Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Al Dr. Georges Dreyfus por la dirección de este trabajo y por brindarme de manera incondicional su laboratorio durante tantos años.**

**Al los miembros del Jurado por la revisión y comentarios sobre este trabajo.**

**Al Dr. Ramos y compañeros del CPEP (E.N.P. UNAM) por despertar mi interes en la Bioquímica.**

**A Marcela, Tere, Gerardo, Hilario, Célis, Irma, Ito, Isa, Guillermo, Elenita, Jaime, Juan, lupe, Diego, Miriam, Bere, Iliana, Ember, Erika, Jorge Ramirez, Santiago, José, Geo, Lety, Alejandro, Pachis, Adrian, Issac, Jesús, Rosalinda, Olivia y Laurita, por sus enseñanzas, amistad y compañerismo.**

**A Nora Vazquez-Laslop por enseñarme con afecto, por su amistad y por mostrarme lo divertido que es esto.**

**A Silvia Devars por su ayuda en los pininos de mi carrera.**

**A Bertha Gonzalez-Pedrajo por tu apoyo incondicional, amistad sincera y por iniciar junto conmigo esta experiencia, en fin gracias por todo.**

**A Edgar Vazquez por todo lo convivido durante estos 6 años y pico.**

**A Mariana Peimbert por su ayuda con las figuras de este trabajo y por ser la buena onda conmigo.**

**A los Doctores Marietta Tuena de Gómez-Puyou y Armando Gómez-Puyou por tanto apoyo e interes.**

**Agradezco con admiración y respeto al Dr. Antonio Peña por generar, desarrollar y solidificar este excelente centro de investigación.**

**Al CONACYT por el apoyo económico brindado.**

## ABREVIATURAS

ADP	Adenosín-5'-difosfato
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
AMP-PNP	Adenil $\beta,\gamma$ imidofosfato
BCA	Acido bicincoínico
Bchl	Bacterioclorofila
CCCP	Carbonil-cianuro-fenilhidrazona
CDTA	Acido trans-1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetracético
DBMIB	Dibromotimoquinona
DCCD	Diclohexilcarbodiimida
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoato)
$\Delta\mu_{H^+}$	Potencial electroquímico de protones
$\Delta\mu_{Na^+}$	Potencial electroquímico de sodio
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
EGTA	Acido etilenglicol bis-( $\beta$ -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético
F <sub>0</sub>	Sector hidrofóbico y membranal de la ATPsintetasa
F <sub>1</sub>	Sector hidrofílico extramembranal de la ATPsintetasa
F <sub>0</sub> F <sub>1</sub>	Complejo ATPasa/ATPsintetasa
F-ATPasa	ATPasa tipo F
FCCP	p-trifluorometoxi carbonil-cianuro fenilhidrazona
GTP	Guanosín trifosfato
HEPES	N-2-hidroxi-1-piperazina ácido N-2-etanosulfónico
HHNQ	2-hidroxi-3,1- $\omega$ -ciclohexiloctil-1,4-naftoquinona-N-óxido
HOQNO	2-heptil-4-hidroxiquinolina-N-óxido
Kda	Kilodaltones
$\lambda$	Longitud de onda
NBD-Cl	7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PNB	Bacterias púrpuras no-sulfurosas
RF <sub>1</sub>	Sector F <sub>1</sub> de <i>Rhodospirillum rubrum</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TF <sub>1</sub>	Sector F <sub>1</sub> de PS3 (bacteria termofílica)
TID	3-trifluorometil-m-(iodofenil)diazirina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

## INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
La ATP sintetasa.....	4
Canal $F_0$ .....	7
Arreglo intersubunidades para la translocación de iones en $F_0$ .....	8
Acarreo de iones en $F_0$ .....	12
Sector $F_1$ .....	13
Arreglo intersubunidades bajo la influencia de los sustratos en el sector $F_1$ .....	14
Mecanismo catalítico en $F_1$ .....	23
La ATP sintetasa de <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	25
Bacterias Púrpuras no-sulfurosas (PNSB).....	27
Antecedentes del grupo PNSB.....	27
Ubicación filogenética del grupo PNSB.....	28
Habitat de PNSB.....	31
Fisiología de PNSB.....	32
Fotosíntesis en PNSB.....	33
Síntesis de ATP en PNSB.....	35
OBJETIVOS.....	39
MATERIAL Y METODOS.....	40
Cultivo de <i>Rhodospirillum rubrum</i> (cepa silvestre S1).....	40
Medio de Cultivo.....	40
Mantenimiento de la cepa y siembra de bacterias.....	42
Cosecha de Bacterias.....	43
Obtención de Cromatóforos.....	43
Purificación del sector $RF_1$ de la ATPsintetasa de <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	44
Filtración de $RF_1$ por columnas de sephadex G-50.....	46
Determinación de la cantidad y concentración de Proteína.....	46
Determinación de la cantidad y	

concentración de Bacterioclorofila.....	47
Determinación de la actividad ATPasa.....	47
Determinación del bombeo de Protones (H <sup>+</sup> ) en cromatóforos por apagamiento de fluorescencia.....	48
Determinación de Cisteínas totales y expuestas.....	49
Electroforésis de Proteínas.....	50
Otros procedimientos.....	50
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
Crecimiento de <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	51
Purificación del sector F <sub>1</sub> de la ATP sintetasa de <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	56
Determinación de cisteínas totales y expuestas.....	62
<b>DISCUSION.....</b>	<b>71</b>
Optimización de los cultivos de <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	71
Propiedades del sector F <sub>1</sub> de <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	73
Cambios conformacionales ATP-(EDTA)(Mg <sup>2+</sup> )(Ca <sup>2+</sup> )-dependientes en la RF <sub>1</sub> -ATPasa.....	74
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>80</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>82</b>

## RESUMEN

Las F-ATPasas son enzimas que al disipar los gradientes electroquímicos, generados por cadenas respiratorias o fotosintéticas, derivan de ello la síntesis de ATP organizando la membrana como un circuito protónico quimiosmótico. La ATP sintetasa consta de dos sectores uno embebido en la membrana llamado  $F_0$  (150 kda), el cual es un acarreador iónico y ancla al sector  $F_1$  que es la porción hidrofílica orientada hacia el lado citoplásmico, lugar donde se realiza la catálisis de  $ATP \leftrightarrow ADP + Pi$ . El sentido hidrolítico de esta reacción es preservado por la  $F_1$  aún si se disocia de  $F_0$  (*in vitro*).

En la bacteria púrpura no-sulfurosa *Rhodospirillum rubrum* la porción  $F_1$  se forma por cinco tipos de subunidades  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$  y  $\epsilon$ , mientras que  $F_0$  consta de cuatro subunidades  $a, b, b'$  y  $c_{10a1}$ .

En condiciones fotoheterotróficas esta bacteria desarrolla invaginaciones de su membrana citoplasmática en donde se localizan los complejos fotosintéticos y la ATP sintetasa. Al romper la membrana de las bacterias mediante un tratamiento mecánico, dichas invaginaciones se cierran y forman vésiculas llamadas cromatóforos. La ATPasa bombea protones al interior del cromatóforo como resultado de la hidrólisis de  $ATP \cdot Mg^{2+}$ . Sin embargo la hidrólisis de  $ATP \cdot Ca^{2+}$  no acidifica al cromatóforo y el recambio  $ATP \cdot Pi$  es posible para el  $ATP \cdot Mg^{2+}$  pero no así para el  $ATP \cdot Ca^{2+}$ .

Por otra parte la liberación del sector  $F_1$ -ATPasa de las membranas, altera la dependencia del ATP por el catión divalente ya que la velocidad de hidrólisis disminuye para  $ATP \cdot Mg^{2+}$  y aumenta para  $ATP \cdot Ca^{2+}$ .

El análisis de los datos anteriores ha sugerido que los cationes divalentes tienen un papel importante en la regulación del acoplamiento entre el paso de los protones y la síntesis de ATP en el complejo  $F_0F_1$ .

El presente estudio pretende establecer, por medio del uso de un modificador químico con el que es posible monitorear las cisteínas expuestas al medio, si existen

cambios conformacionales distintos entre la  $F_1$ -ATPasa cuando hidroliza  $ATP \cdot Mg^{2+}$  que cuando lo hace con  $ATP \cdot Ca^{2+}$  como sustrato.

Se implementó un método de purificación para la porción  $F_1$  de la ATPsintetasa de *R. rubrum*, por medio de un tratamiento de la membrana con cloroformo, ultracentrifugación diferencial, un gradiente de densidad y filtración por peso molecular, caracterizándose el complejo por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Al desnaturalizarse la  $F_1$ -ATPasa en presencia del detergente SDS al 2% mostró un total de 13 cisteínas lo que concuerda con la secuencia reportada. Para el caso del complejo  $F_1 \cdot ATP \cdot Mg^{2+}$  no se observa ninguna cisteína expuesta, pero para el complejo  $F_1 \cdot ATP \cdot Ca^{2+}$  se observan 2 al igual que cuando no se agrega ningún catión divalente. También se observó una mayor protección a la desnaturalización por Guanidina-HCl 0.3 M del complejo  $F_1$  con  $ATP \cdot Mg^{2+}$  que con  $ATP \cdot Ca^{2+}$  o sin sustrato alguno.

Se concluye que la hidrólisis de ATP coordinado con  $Mg^{2+}$  provoca un cambio conformacional distinto al que ejerce la catálisis de  $ATP \cdot Ca^{2+}$ .

## INTRODUCCION

Hace miles de millones de años, en este caótico y recién formado lugar, surgió un proceso por el que parte de la energía luminosa del sol, al pasar por nuestro planeta, era transformada en cierta organización de materia, que conjugaba elementos como C, N, O, H, P, S etc. en un orden espacial que se alejaba del equilibrio con el medio, para ello dichos sistemas capturaban parte del continuo flujo circundante de energía convirtiendolo en fuertes interacciones moleculares, generando estructuras que ahora denominamos macromoléculas, y que "de una manera u otra" lograron elaborar copias de si mismas, pero en una continua dinámica de cambio basada en la capacidad de cada una de ellas de abarcar los patrones de estructura básicos permisibles, dados por las restricciones fisicoquímicas reinantes. Las moléculas que se preservaron fueron solo aquellas cuyos patrones estructurales lograron armonizar la posición entre sus componentes con respecto a las reacciones químicas que favorecían su autoreplicación, perpetuando en su forma básica aquellas conformaciones que las alejaban del equilibrio con el entorno.

La vida, tal como la conocemos y aun como la podemos imaginar, posee dos características; la propagación de información y la transducción de energía.

Ahora que sabemos que el ácido ribonucleico (RNA) puede almacenar información y a la vez ser un catalizador de funciones sujetas a selección Darwiniana, posiblemente estemos más cerca de entender el mecanismo de transferencia de información de la primera entidad con vida. Solo con base en la serie de ciclos Darwinianos *mutación-replicación-selección* se puede forjar una evolución adaptativa capaz de explotar nuevos dominios, estableciendo estrategias novedosas, incrementando para ello, la eficiencia de los viejos procesos.

Podemos estar cerca también, de establecer la naturaleza del primer sistema de transformación energética, porque ahora enfrentamos sobre un mejor marco conceptual (*la hipótesis quimiosmótica*) la pregunta acerca de la naturaleza del principal proceso bioenergético.

En todos los organismos en los que se han estudiado los mecanismos de transformación y uso de energía, se ha encontrado que las bicapas fosfolipídicas que constituyen las membranas celulares, juegan un papel central por ser barreras selectivas que permiten la existencia de energía potencial, esta se genera al momento de crearse dos concentraciones distintas de solutos separadas por dichas membrana. Esta energía potencial en forma de gradiente eléctrico y/o químico puede ser disipada por sistemas proteicos transmembranales que a su vez aprovechan dicho flujo y lo convierten en trabajo como el transporte de moléculas y macromoléculas, la comunicación intra e intercelular, o la generación de moléculas de elevado contenido energético (como el ATP) que a su vez sustentan otros procesos como el ensamble de material celular, la autoreplicación o la coordinación misma de todos estos procesos.

La vida es posible entonces por la habilidad de generar dichos potenciales electroquímicos a un menor costo energético que el rendimiento de energía total que de este proceso se obtiene, lo que implica un mecanismo altamente eficiente.

### **La ATPsintetasa**

En casi todos los organismos conocidos la síntesis de ATP es una reacción catalizada principalmente por un complejo enzimático multimérico de 530 Kda y con al menos 21 subunidades; conocido como ATP sintetasa o  $F_0F_1$ -ATPasa. Tiene un tercio de la proteína (150 Kda) insertada en la bicapa lipídica que es un acarreador iónico transmembranal (Factor 0 o  $F_0$ ), que a su vez ancla a un sector hidrofílico de aspecto globular orientado en la cara citoplásmica de la membrana (Factor 1 o  $F_1$ ) de 380 Kda donde se localizan los sitios reguladores y catalíticos de la síntesis e hidrólisis del ATP. El  $F_1$  puede dissociarse del  $F_0$  (por ejemplo tratando las membranas con amortiguadores de baja fuerza iónica y con EDTA) lo cual aumenta la permeabilidad a  $H^+$  de la membrana (revisado en Skulachev y Koslov, 1977). El  $F_1$  solubilizado retiene la capacidad de hidrolizar ATP (por esta razón el mecanismo catalítico se ha estudiado mejor en el sentido hidrolítico de la reacción tratando de extrapolarlo a la síntesis de ATP) y en condiciones muy especiales (solventes distintos

al  $H_2O$ ) de sintetizarlo (Yoshida, 1983; Feldman y Sigman, 1982; Gomez-Puyou et al., 1986; Kandpal et al., 1987), además es capaz, en presencia de  $Mg^{2+}$ , de conectarse nuevamente al  $F_0$  y restablecer la función original (Pullman et al., 1968; Racker, 1962; 1963).

Algunos autores consideran, para fines de nomenclatura, un tercer sector llamado  $F_A$  (componentes asociados) constituido por las subunidades supernumerarias de F-ATPasas mitocondriales y que física y funcionalmente conectan al  $F_0$  con el  $F_1$  (Nagley, 1988; Cox et al., 1992).

Dicha enzima en membranas de mitocondrias, cloroplastos y la mayoría de las eubacterias sintetiza ATP, acoplado la fuerza protón-motriz derivada de disipar la elevada concentración de  $H^+$  preformada por cadenas transportadoras de electrones, respiratorias o fotosintéticas, que bombean protones y generan dicho potencial, este gradiente eléctrico y químico ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) organiza a la membrana como un simple circuito protónico quimiosmótico, tal como lo predice la Teoría Quimiosmótica (Mitchell, 1961). Las F-ATPasas pueden realizar también la función reversa y generar potenciales electroquímicos consumiendo ATP, tal es el caso de la  $H^+$ ATPasa de bacterias anaeróbicas obligadas como *Lactobacillus casei* (Biketov et al., 1982; Tikhonova et al., 1983) o *Clostridium pasteurianum* (Clarke et al., 1979), Estos potenciales protónicos son aprovechados en otros procesos como osmoregulación, transporte de solutos o regulación interna de pH. Bajo condiciones experimentales cualquier ATPsintetasa puede bombear protones al hidrolizar  $ATP-Mg^{2+}$ .

A mediados de la década pasada se encontró que no sólo los gradientes electroquímicos de  $H^+$  ( $\Delta\mu_{H^+}$ ), sino que también los de  $Na^+$  ( $\Delta\mu_{Na^+}$ ) pueden ser utilizados para la síntesis de ATP por las F-ATPasas de ciertos organismos como *Vibrio alginolyticus* (Dibrov et al., 1986; Dmitriev et al., 1989), *Vitreoscilla* sp. (Eftok y Webster, 1992), *Acetobacterium woodii* (Helse et al., 1992), *Methanosarcina mazei* (Becher y Muller, 1994), o *Propionigenium modestum* (Dimroth, 1987) ésta última es una bacteria anaerobia estricta (Schink y Pfennig, 1982) que obtiene su energía de la descarboxilación del succinato a propionato y  $CO_2$ . La energía libre de esta reacción ( $\Delta G^\circ = -20.6$  KJ/mol) es utilizada por una metilmalonil-CoA descarboxilasa de membrana para generar un gradiente de  $Na^+$  (Hilpert et al., 1984) que a su vez es aprovechado para sintetizar ATP

(Laubinger y Dimroth, 1987; 1988).

El canal  $F_0$  de *Propionigenium modestum* posee un sitio de unión para sodio en cada una de sus 10 subunidades tipo "c" (Glu-65) (Klug y Dimroth, 1983; 1984) esta posición corresponde en *E. coli* a la Asp-61 que es a su vez el posible lugar de unión para el protón (Fillingame, 1980). Sin embargo, si la bacteria *E. coli* se crece en condiciones alcalinas, desarrolla una cadena respiratoria bombeara de sodio y puede sintetizar ATP empleando gradientes de  $Na^+$  (Avetisyan et al., 1993). Existen evidencias de que la  $Na^+$ -ATPasa de *P.modestum* bombea  $H^+$  a concentraciones menores de 1 mM de  $Na^+$  (Laubinger y Dimroth, 1989) al igual que lo hace una ATP sintetasa híbrida con un  $F_0$  de *P.modestum* y un  $F_1$  de *E. coli* (Kaim y Dimroth, 1983).

Hay ciertas consideraciones que indican que una  $F_0F_1$ -ATPasa puede bombear  $H^+$  o  $Na^+$  *in vivo* (Kholodenko, 1993). Por las razones antes expuestas, el hecho de que bajo condiciones fisiológicas las  $Na^+$ -ATP sintetasas operen como bombas de  $Na^+$ , es como respuesta a una mayor concentración de iones sodio que de hidrogeniones (Skulachev, 1992).

Se ha descubierto también, que las  $F_0F_1$ -ATPasas de ciertas eubacterias (como *E. coli* o *S. typhimurium*) crecidas en condiciones de anaerobiosis, se asocian física y funcionalmente por medio de puentes disulfuro, con el sistema *trk* de transporte de  $K^+$  para formar un macrocomplejo en la membrana periplásmica, el cual funciona como una bomba  $H^+K^+$  que expulsa  $2H^+$  por el internamiento de un ion  $K^+$  consumiendo para ello la energía de la hidrólisis del ATP y como consecuencia osmoregula a la célula, la acción reversa permitiría sintetizar ATP, no sólo utilizando el  $\Delta\mu_{H^+}$  sino además un  $\Delta\mu_{K^+}$  (Trchounian et al., 1992; Trchounian, 1994).

El mecanismo de síntesis de ATP por la  $F_0F_1$ -ATPasa se puede dividir en tres procesos:

- i) La translocación de protones (o iones) por el canal  $F_0$ .
- ii) La fosforilación del  $ADP \cdot Mg^{++}$  con  $P_i$  dentro de los sitios catalíticos en  $F_1$  con el subsecuente recambio de productos y sustratos.
- iii) El acoplamiento y regulación entre estos dos eventos.

### **CANAL $F_0$**

El  $F_0$  eubacteriano se compone por tres tipos de subunidades que son proteínas transmembranales, llamadas a, b y c o proteolípido y coexisten en una estequiometría de 1a, 2b y 10( $\pm$ 1)c y con un arreglo que les permite, (i) acarrear iones en ambos sentidos, (ii) anclar a  $F_1$  y (iii) participar en el acoplamiento de dicho transporte al evento catalítico de síntesis o hidrólisis de ATP.

El canal  $F_0$  de mitocondrias tiene 9 subunidades b, d, a, e, F6, f, g, A6L y c (de mayor a menor peso molecular) (Collinson et al., 1994); la función de estas subunidades supernumerarias no ha sido descrita.

#### **Subunidad a (PM: 30.3 kda, 271 residuos en *E. coli*)**

Es una proteína sumamente hidrofóbica que se ha propuesto puede formar 4 (Hennig y Herrmann, 1986), 5 (Cox et al., 1986; Howitt et al., 1988), 6 (Vik et al., 1988; Cain y Simoni, 1988; Vik y Dao, 1992) cruces transmembranales de estructuras  $\alpha$ -hélices (Vik y Dao, 1992) (Fig. 1a). En esta subunidad se han identificado residuos que al cambiarse alteran de manera definitiva la función del  $F_0$  (Revisado por Fillingame, 1990; Senior, 1990). Se piensa que esta subunidad, interviene directamente en el paso de protones y existen muchas discrepancias en cuanto a su topología, por ahora, el modelo más convincente es el presentado por Steven B. Vik y Nguyen N. Dao (1992) (Fig. 1a y 1c).

#### **Subunidad b (PM: 17.2 kda, 156 residuos en *E. coli*)**

Entre las sintetasas de ATP bacterianas, algunas tienen dos subunidades b idénticas (Walker et al., 1984), mientras que otras poseen dos subunidades similares b y b' como es el caso de la enzima de *R. rubrum* (Falk y Walker, 1988).

Mientras que el análisis de la polaridad de los residuos para las subunidades a y c indica que son péptidos altamente hidrofóbicos (Walker et al., 1984) la subunidad b tiene un segmento de 30 residuos hidrofóbicos, en el extremo amino terminal mientras que el resto de la proteína es rica en grupos polares cargados, esto ha llevado a sugerir que la parte hidrofóbica emerge de la membrana y participa en la conexión con el sector  $F_1$  (Walker et al., 1982). Esta idea ha sido apoyada por las siguientes evidencias: sólo ésta subunidad es sensible a tratamientos de las

membranas con proteasas, lo que a su vez evita el pegado de  $F_1$  (Hoppe et al., 1983; Hermolin et al., 1983), además si se eliminan los nucleótidos que codifican para los primeros 25 residuos se expresa una proteína soluble (Dunn, 1992).

#### **Subunidad c (PM: 8 kda, 79 residuos en *E. coli*)**

Esta es la subunidad más pequeña, pero presente con el mayor número de copias, posee dos cruces transmembranales (Fig. 1a) conformados por 2 estructuras  $\alpha$ -hélice conectadas por medio de una asa hidrofílica pequeña (9 residuos) ubicada en la misma cara por donde se une al  $F_1$  (Girving et al., 1989). Ciertos aminoácidos de los extremos amino (Tyr-10) y carboxilo (Tyr-73) han sido localizados en el mismo lado, por marcado con tetranitrometano (Deckers-Hoebestreit et al., 1987). Esta estructura tipo "Horquilla" ha sido confirmada por análisis de NMR (Resonancia Magnética Nuclear) en donde la subunidad c disuelta en una mezcla cloroformo-metanol-agua preserva la misma estructura que cuando se localiza en la bicapa lipídica, en dicho trabajo se les ha asignado identificación a 78 de los 79 residuos, además de revelar importantes interacciones funcionales de residuos de la hélice 1 con la hélice 2 (Girving y Fillingame, 1993; 1994). Las subunidades de tipo c por si solas no pueden transportar  $H^+$  (Friedl et al., 1981; Loo y Bragg, 1981).

Esta subunidad tiene una estructura muy similar entre las diferentes especies donde se ha determinado la secuencia del gen que la codifica, es decir que esta altamente conservada a lo largo de la escala filogenética (Recipon et al., 1992).

#### **ARREGLO INTERSUBUNIDADES PARA LA TRANSLOCACIÓN DE IONES EN $F_0$**

Dos modelos diferentes han sido propuestos en cuanto al arreglo entre a, b y c. El primero se basa en el marcaje de las tres subunidades con el reactivo hidrofóbico TID (3-trifluorometil-m-(iodofenil)diazirina) y supone a un oligómero de subunidades c que se encuentra adyacente a un complejo a-b<sub>2</sub> (Hoppe y Sebald, 1984). Por su parte Cox y colaboradores (1984; 1986) han dirigido sus conclusiones hacia un complejo a-b<sub>2</sub> rodeado por un anillo de 6 subunidades c, aunque un intento más reciente de determinar la estequiometría de el proteolípido (subunidad c), reveló que 6 es un

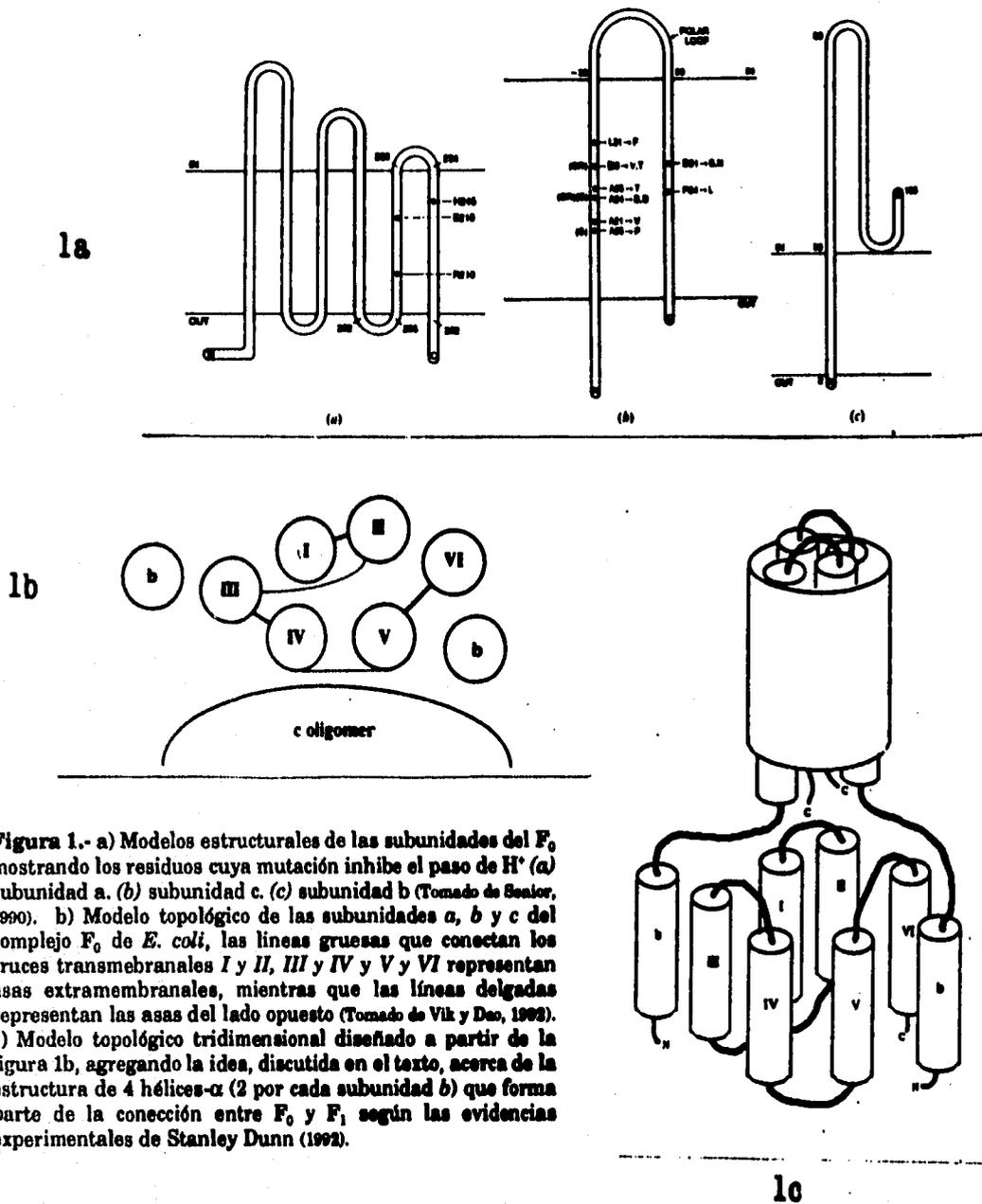
número probablemente incorrecto (Hermolin y Fillingame, 1989).

Recientemente Steven B. Vik y Nguyen N. Dao (1992) utilizaron un análisis de hidrofobicidad y de variación-conservación de residuos para definir la topología transmembranal del sector  $F_0$ , basándose en la hipótesis de que, en las hélices  $\alpha$  las caras de residuos variables permanecen en contacto con los lípidos mientras que las caras de residuos conservados ven otras  $\alpha$ -hélices (Rees et al., 1989; Baldwin, 1993) encontrando que las subunidades **b** deben de estar en la periferia del complejo ya que se predice un amplio contacto de su única  $\alpha$ -hélice transmembranal con la fase lipídica (Fig. 1c). Esto se apoya también en los trabajos de marcaje hidrofóbico con TID (Hoppe y Sebald, 1984), en los que únicamente los residuos del extremo amino-terminal (1-35) se marcan (Hoppe et al., 1984) a excepción de Gln-10 y la Lys-23, que son aminoácidos muy conservados y por tanto posiblemente ubicados en la cara de la  $\alpha$ -hélice que hace interacción proteína-proteína.

Hay estudios que han demostrado que las subunidades **b** forman un dímero, pero las interacciones se dan en la región extramembranal de esta subunidad (Fig. 1c), por lo que se ha propuesto un modelo de 4  $\alpha$ -hélices (2 cada subunidad **b**) formando una especie de trenza (Dunn, 1992), que contribuye con una parte de la estructura que se ha observado por microscopía electrónica, conectando al  $F_0$  y al  $F_1$  (Fig. 1c) (Gogol et al., 1987; Tsuprun et al., 1989; Lucken et al., 1990).

En el arreglo del oligómero de 9, 10 u 11 subunidades **c** (cada una con 2  $\alpha$ -hélices transmembranales), la hélice membranal del extremo amino-terminal contacta en caras opuestas a 2 alfa-hélices de extremos carboxi-terminal, mientras que la hélice  $\alpha$  del c-terminal en una misma superficie contacta 2  $\alpha$ -hélices n-terminales (Vik y Dao, 1992). En este modelo los residuos Tyr-10, Ala-24 y el Asp-61 ven hacia fuera del oligómero de proteolípidos, según el marcaje con TID (Hoppe et al., 1984) y ensayos de mutagénesis dirigida (Miller et al., 1990; Fillingame et al., 1991).

El análisis de hidrofobicidad y aminoácidos conservados, mostró además, que la subunidad unicopia y la más grande (**a**) se forma de 6 cruces transmembranales de hélices  $\alpha$ , de los cuales dos de ellos (II y VI) tienen caras con residuos variables, indicando que existe un contacto entre éstas y la fase lipídica de la membrana,



**Figura 1.-** a) Modelos estructurales de las subunidades del  $F_0$ , mostrando los residuos cuya mutación inhibe el paso de  $H^+$  (a) subunidad a. (b) subunidad c. (c) subunidad b (Tomado de Seedor, 1990). b) Modelo topológico de las subunidades a, b y c del complejo  $F_0$  de *E. coli*, las líneas gruesas que conectan los cruces transmembranales I y II, III y IV y V y VI representan asas extramembranales, mientras que las líneas delgadas representan las asas del lado opuesto (Tomado de Vik y Deo, 1992). c) Modelo topológico tridimensional diseñado a partir de la figura 1b, agregando la idea, discutida en el texto, acerca de la estructura de 4 hélices- $\alpha$  (2 por cada subunidad b) que forma parte de la conexión entre  $F_0$  y  $F_1$ , según las evidencias experimentales de Stanley Dunn (1992).

mientras que las hélices restantes (I, III, IV y V) sólo están en contacto con otras  $\alpha$ -hélices (Fig. 1b y 1c). La secuencia de aminoácidos de estas regiones está más conservada entre las especies comparadas. Los cruces V y VI contienen grupos glutamilo e histidilo que son esenciales para la translocación de protones (Cain y Simoni, 1986; 1988; Howitt et al., 1990;).

Se ha propuesto que las hélices anfipáticas son componentes de canales iónicos (Leonard et al., 1988) aunque este podría no ser el caso para la subunidad a; en el caso de la bacteriorodopsina el canal de protones se forma por 3 de sus 7 cruces de membrana, pero sólo 13 de los 26 residuos en el canal son polares, mientras que 25 residuos polares pertenecen a regiones transmembranales fuera del canal (Henderson et al., 1990). En la subunidad a de la ATP sintetasa sólo el cruce transmembranal III no posee segmentos de carácter anfipático, mientras que el cruce II es la hélice más anfipática, los residuos conservados que se habían propuesto en la hélice IV como parte del canal (Cox et al., 1986) podrían estar, mas bien, formando importantes interacciones proteína-proteína y lo mismo se aplica para el segmento I que tiene regiones anfipáticas notables. Por todo esto se ha propuesto que las  $\alpha$ -hélices transmembranales II, V y VI (Fig. 1b y 1c) son las que proveen la mayoría de los residuos en el canal de protones (Vik y Dao, 1992; Revisado por Stokes y Nakamoto, 1994). Es importante resaltar que el extremo carboxilo-terminal (en el cruce VI) es de vital importancia para la translocación de protones (Cain y Simoni, 1986) además de estar sumamente conservado en todas las secuencias reportadas de la subunidad a. En este modelo (Fig 1c y 1b) los cruces V y VI deben de estar cerca debido al corto tamaño del asa polar que los une (de 4 residuos en *E. coli* a 11 en *S. cerevisiae*), al igual que el cruce III que debe colindar con el IV (segmento 143-GLYKH-147 en *S. cerevisiae*), las hélices transmembranales IV y V (Fig 1b) deben de estar junto al oligómero de subunidades c ya que poseen regiones altamente conservadas (Vik y Dao, 1992).

Las subunidades b en este modelo, se ubican en la periferia de las hélices de la subunidad a (Fig 1b), una de ellas junto al cruce transmembranal VI, según la evidencia de que una mutación en la prolina 240 de la subunidad a suprime el efecto

que provoca cambiar el ácido glutámico 9 por aspartato en la subunidad b (Kumamoto y Simoni, 1986). La interacción de la subunidad tipo b con la a se ha demostrado también por entrecruzamientos químicos (Hermolin et al., 1983) y porque los anticuerpos anti-a y anti-b precipitan las subunidades b y a respectivamente en una relación a:b 1:2, lo que no sucede cuando la subunidad b lleva la mutación gly-9→asp o cuando la subunidad a se termina 36 residuos antes de lo normal, la interpretación de esto es, que el c-terminal de a (en la hélice VI) interacciona con el N-terminal de al menos una subunidad b (Fig. 1c) (Vik y Simoni, 1987).

#### **ACARREO DE IONES EN $F_0$**

La reconstitución a partir de las tres subunidades del  $F_0$ , a, b y c aisladas indepla membrans, mie suficiente para formar un poro de  $H^+$  funcional (Klionaky et al., 1983; Aris et al., 1985) la falta de alguna de ellas evita el transporte de protones y la conexión correcta con  $F_1$  (Friedl et al., 1981; Lee y Bragg, 1981; Mao et al., 1983; Schneider y Altendorf, 1985). de hecho se ha demostrado la interacción de a (Aris y Simoni, 1983), b (Aris y Simoni, 1983; Dunn, 1992) y c (Fraga y Fillingame, 1989) con algunas de las subunidades del  $F_1$ . Por tanto; aunque posiblemente no todas las subunidades del canal participen en el acarreo de protones, todas (a, b y c) deben estar presentes (Ma et al., 1993).

El mecanismo sugerido para la translocación de protones, desde el punto de vista del acoplamiento con la catálisis en  $F_1$ , puede ser de tipo directo o indirecto; en el primer caso se ha propuesto una interacción directa del  $H^+$  en la reacción química que ocurre en los centros catalíticos (Mitchell y Moyle, 1974; Mitchell, 1985a; 1985b), pero los hallazgos de que las F-ATPasas pueden no sólo transportar  $H^+$  sino también  $Na^+$  (Laubinger y Dimroth, 1989) es un argumento en contraposición con los mecanismos sugeridos de como actuaría el  $H^+$  en las reacciones de fosfo- y desfosforilación en el sitio catalítico. El mecanismo indirecto (Revisado por Boyer et al., 1983) propone que el paso de los protones por  $F_0$  induce un cambio conformacional que es transmitido hasta  $F_1$  provocando cierto arreglo espacial en las interacciones de los sitios catalíticos con sustratos y productos. El mecanismo de paso de iones por  $F_0$  es todavía motivo de

discusión, pero al parecer la balanza se inclina en favorecer un mecanismo de acarreo más que el de un poro o canal (discutido en Kramer, 1994). La evidencia más clara ha sido la detección de sitios de posible pegado de protones con alta cooperatividad (Griwatz y Junge, 1992; Poolman y Konings, 1993), como por ejemplo el ácido aspártico en la posición 61 en la subunidad c que se protona y desprotona durante el transporte de H<sup>+</sup>, es el mismo sitio donde se une la carbodiimida (DCCD) e inhibe totalmente la actividad de la enzima (revisado en Fillingame, 1980; 1990; 1992a; 1992b; Fillingame et al, 1992). En este modelo del paso de H<sup>+</sup> a través de la membrana, por la secuencia de protonación-desprotonación en ciertos residuos, se han sugerido como posibles grupos participantes a los siguientes: en la subunidad a: R-210, E-219 y H-245, y en la subunidad c a D-61 (revisado en Senior, 1990), y más recientemente a A-24 e I-28 (Girving y Fillingame, 1993; 1994).

#### **SECTOR F<sub>1</sub>**

La región F<sub>1</sub> extramembranal es el lugar donde se encuentran los sitios catalíticos que intercambian sustratos y productos de la síntesis o hidrólisis del ATP; está conformada por 5 tipos de subunidades, nombradas: α, β, γ, δ y ε (en orden decreciente de peso molecular), hay una estequiometría bien determinada de 3:3:1:1:1 para casi todas las F-ATPasas descritas (la excepción es la enzima de *Chloroflexus aurantiacus* que aparentemente carece de la subunidad de menor peso molecular, posiblemente ε (Yanyushin, 1988; 1991; 1993). Todas las subunidades son necesarias para la actividad in vivo, según análisis de tipo mutacional en los genes estructurales en que se codifican (Revisado por Senior, 1990 y Cox et al., 1992). El orden de los genes de F<sub>1</sub> es el siguiente: *uncH*, *uncA*, *uncG*, *uncD* y *uncC* y corresponde a las subunidades δ, α, γ, β y ε (Walker et al., 1984). Los pesos moleculares de estas subunidades en *Escherichia coli* son los siguientes: α 55.3 kda (513 residuos), β 50.2 kda (459 residuos), γ 31.4 kda (286 residuos), δ 19.3 kda (117 residuos) y ε 15 kda (138 residuos).

### **ARREGLOS INTERSUBUNIDADES BAJO LA INFLUENCIA DE LOS SUBSTRATOS, EN EL SECTOR $F_1$**

La parte hifrofílica de la  $H^+$ -ATP sintetasa protruye 13.6 nm de la membrana hacia el citoplasma (Telford et al., 1984), posee una forma esférica irregular de aproximadamente 9 nm de diámetro que se conecta al  $F_0$  por medio de un cuello de 40 Å de largo (Fig. 2f) (Gogol et al., 1987). El contorno del  $F_1$  puede observarse por microscopía electrónica de transmisión empleando tinciones negativas (Fernandes Moran, 1962), o también por microscopía crioelectrónica (Fig. 2f) (Gogol et al., 1989a; 1989b). Efraim Racker (1962; 1963) demostró que en partículas submitocondriales sometidas a tratamientos mecánicos, "las esferas adosadas" a la membrana se liberan al soluble y desaparece la capacidad sintética e hidrolítica de ATP, característica de las membranas. Cuando estas partículas, ahora solubles, se incuban con las membranas en presencia de  $ATP \cdot Mg^{2+}$  se reincorporan y rehabilitan a las partículas submitocondriales para ejercer dichas actividades.

El procesamiento de imágenes del sector  $F_1$ , tomadas por microscopía electrónica, revela un complejo con seis masas globulares yuxtapuestas en un arreglo hexagonal que representa las proyecciones de 3 subunidades  $\alpha$  y 3 subunidades  $\beta$  tal como se ven en la imagen del plano paralelo a la membrana (Fig. 2d) (Revisado en Tiedge y Schafer, 1989; Lucken et al., 1990; Boekema y Botcher, 1992), además de una séptima masa en la cavidad central que corresponde mayoritariamente a la subunidad  $\gamma$  (Boekema et al., 1990), esto se confirmó al observar que el complejo  $\alpha_3\beta_3\delta$  carece de dicha cavidad central (Fujiyama et al., 1990). Observaciones por microscopía electrónica, de las partículas  $F_1$  decoradas con anticuerpos (y Fab's) anti- $\alpha$  han evidenciado que en el arreglo hexagonal las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  están alternadas (Fig 2a y 2d-f) (Tiedge et al., 1985; Lunsdorf et al., 1985; Gogol et al 1989b).

El estudio de la topología de las subunidades del  $F_1$  indica la siguiente estructura: En medio de la cavidad que forman las tres subunidades  $\alpha$  entre sí, se encuentran las subunidades menores  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Fig 2d), ubicado todo este conjunto ( $\alpha$ 's,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) en la parte baja del oligómero  $F_1$  (si consideramos abajo la membrana y

arriba el  $F_1$ ) (Fig 2d abajo-izquierda). Pero las subunidades  $\alpha$  no hacen contacto entre sí, sino que se alternan por lo que es la parte inferior de las 3 subunidades  $\beta$  (Fig. 2d y 3f). Por ello la cavidad central que se forma entre las subunidades  $\beta$  es de menor diámetro (Boekema y Botcher, 1992).

Las siguientes evidencias respaldan este modelo: *i)* Al medir la distancia entre los centros de masa de las subunidades  $\alpha$ , se encontró que el triángulo formado es 0.9 nm más grande que el que forman las subunidades  $\beta$  (Boekema y Botcher, 1992). *ii)* Las imágenes laterales de la enzima (perpendiculares al plano de la membrana) muestran al sector  $F_1$  de la ATPasa membranal con forma de trapecio (Fig. 2f) (Tsaprun et al., 1989; Lucken et al., 1990). *iii)* Las subunidades menores ( $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) se encuentran relacionadas físicamente con el sector  $F_0$  (revisado por Senior, 1990). *iv)* Por otra parte están los trabajos de Gromet-Elhanan (revisado en Gromet, 1992) con la ATP sintetasa de *R. rubrum* ( $RF_0F_1$ ) en donde la subunidad  $\beta$  puede ser liberada de la ATPasa por tratamientos con  $LiCl$  y el resto de las subunidades del  $RF_1$  permanecen en las membranas. *v)* La difracción de rayos-X del  $F_1$  soluble a 9 Å de resolución muestra 2 ejes simétricos, en donde cada plano se compone de tres masas de igual tamaño (Amzel et al., 1982; Amzel y Pedersen, 1983), este arreglo de 2 capas equivalentes de trímeros, ha sido observado por microscopía electrónica, (Tsaprun et al., 1984) y por dispersión de rayos X (Harada et al., 1991a), y se ha deducido que la combinación de ambas capas da lugar al arreglo hexagonal.

En la vista perpendicular a la membrana se observan 2 ejes; el inferior (más cercano a la membrana) con tres masas alternadas por la parte baja de tres masas en el eje superior. La vista paralela a la membrana (observado desde arriba (sic)) muestra la imagen hexagonal (Revisado por Tiedge y Schafer, 1989 y por Capaldi et al., 1992). En contradicción con el modelo del complejo  $F_1$  de dos planos de trímeros, existen las imágenes de microscopía crioelectrónica presentadas por el grupo de Capaldi (Gogol et al., 1989b; Lucken et al., 1990) y los análisis por procesamiento de datos obtenidos de micrografías electrónicas de cristales bi-dimensionales de  $TF_1$  (Que es el sector  $F_1$  de la bacteria termófila PS3) (Ishii et al., 1993), en dichos trabajos se muestra una imagen de la vista lateral del complejo de 6 columnas cada una de forma elíptica, todas de

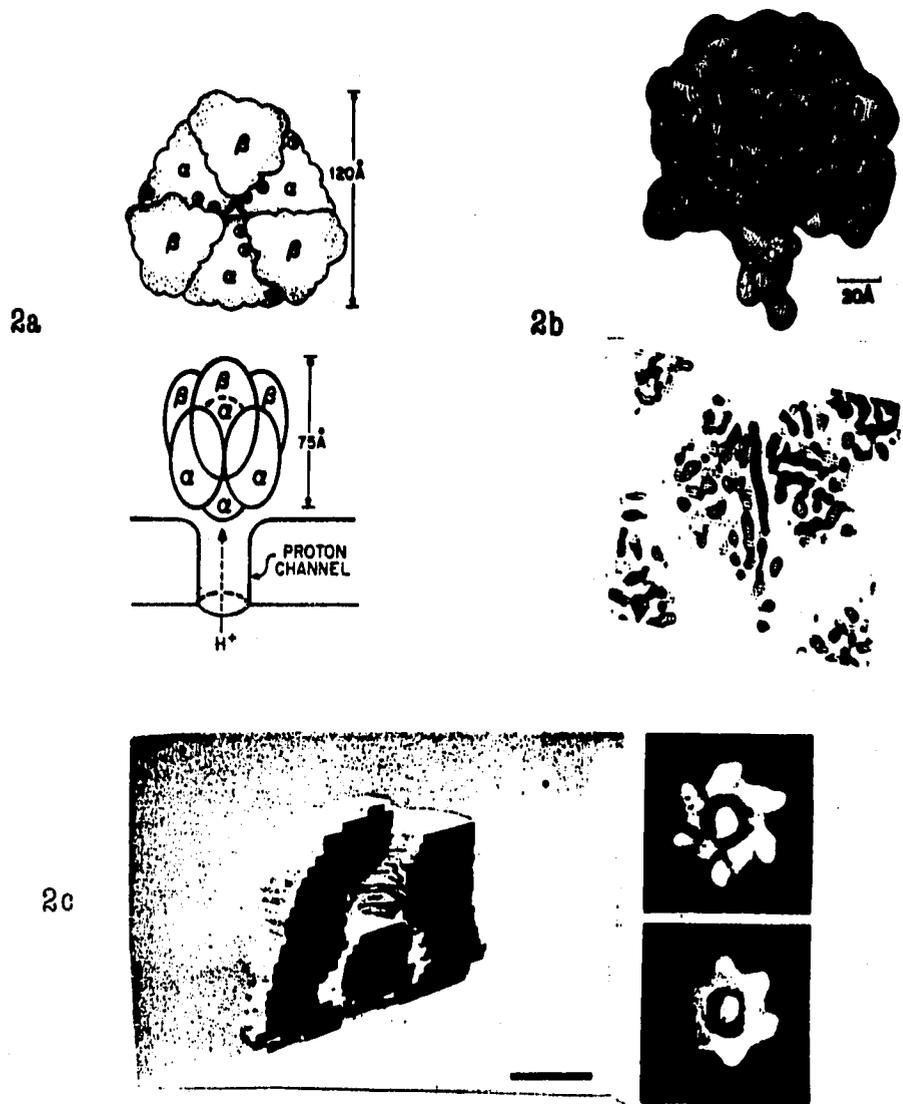
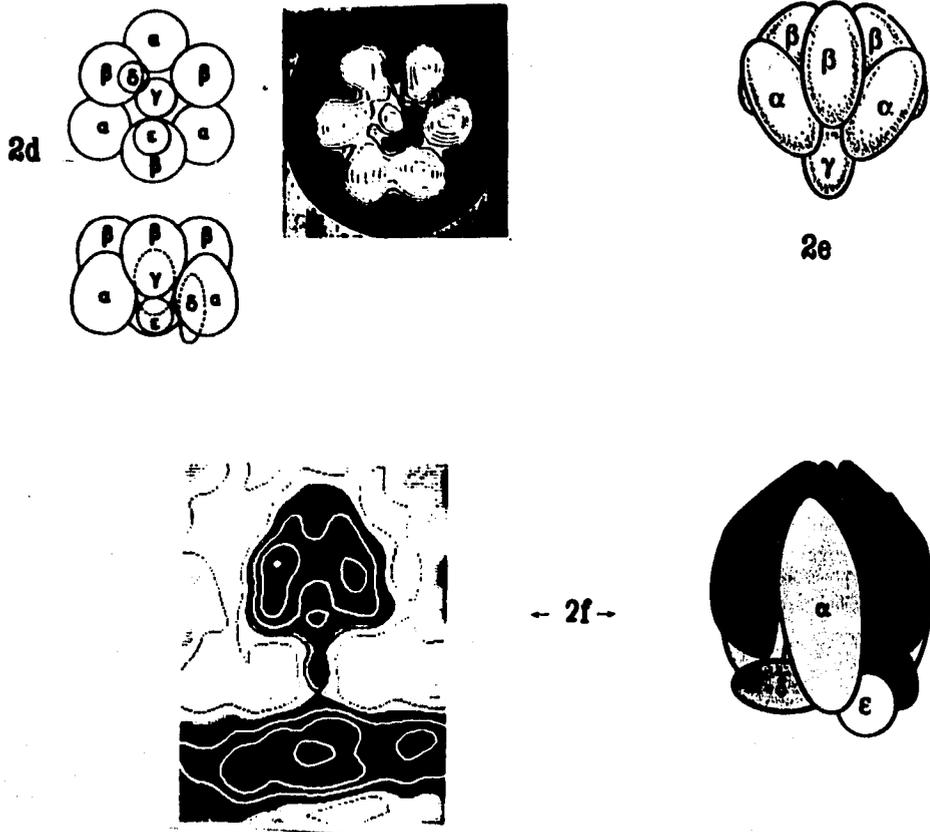


Figura 2.- a) Modelo que resulta de la estructura cristalográfica de la ATP sintetasa de hígado de rata, a 3 Å de resolución, Arriba vista superior. Abajo vista lateral (Tomado de Thomas et al., 1992). b) Modelo que resulta de la estructura del cristal de la ATP sintetasa de corazón de bovino a 6.8 Å de resolución. Arriba enzima completa. Abajo sección del mapa de densidad electrónica donde se aprecia la estructura de 90 Å que recorre de abajo a arriba al complejo (Tomado de Stokes y Nakamoto, 1994). c) Izquierda modelo seccionado en madera balsa, donde se muestra la cavidad central de la F<sub>1</sub>-ATPasa, la barra indica 3nm



*Derecha* imágenes generadas por computadora de la vista superior (*derecha arriba*) e inferior (*derecha abajo*) de la ATPasa. Estas imágenes se obtuvieron a a partir de cristales bidimensionales (Tomado de Ishii et al., 1993). *d*) *Izquierda* esquema de la estructura de la F<sub>1</sub>-ATPasa de cloroplasto mostrando el arreglo de las subunidades según el procesamiento de imágenes de microscopía electrónica, como la que se ve del lado *derecho* (Tomado de Bookema y Botlicher, 1993). *e*) Esquema de la F<sub>1</sub>-ATPasa obtenido a partir de datos de dispersión de rayos-X de ángulo cierto (Tomado de Harada et al., 1992a). *f*) *Izquierda* fotografía obtenida por microscopía crioelectrónica, de una vista lateral del F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa. *Derecha* modelo resultante de las evidencias reportadas por el grupo de Capaldi, tal como se explica en el texto (Tomado de Capaldi et al., 1992).

igual tamaño y paralelas las unas a las otras, lo mismo se visualizó en un estudio del complejo  $F_1$ , analizado por dispersión de rayos X de ángulo corto (small-angle X-ray scattering) (Furuno et al., 1983).

Las subunidades menores  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  están ubicadas en la cavidad central, circundadas por el hexámero  $\alpha_3\beta_3$ , la subunidad  $\gamma$  debe estar expuesta en cierta porción al exterior, lo que se ha demostrado por accesibilidad a anticuerpos monoclonales anti- $\gamma$  (Gogol et al., 1989b). Esta subunidad ocupa mayoritariamente la cavidad central, dos evidencias apoyan lo anterior: *i*) el complejo  $\alpha_3\beta_3\gamma$  (ensamblado a partir de las subunidades aisladas por separado) aun posee la cavidad central (Akey et al., 1983), no así el oligómero  $\alpha_3\beta_3\delta$  (sin  $\gamma$ ) el cual carece de cavidad central (Fujiyama et al., 1990). *ii*) igualmente la masa central prevalece cuando las subunidades  $\delta$  y  $\epsilon$  se han eliminado por proteólisis (Gogol, et al., 1989b).

El procesamiento de imágenes de micrografías electrónicas (vistas perpendiculares al eje  $F_0-F_1$ ) reveló que la subunidad  $\gamma$  tiene una forma elongada de 50 Å de largo y de 25-28 Å de diámetro y recorre verticalmente al complejo  $F_1$ . Por su parte las subunidades  $\delta$  y  $\epsilon$  se localizaron, entre la subunidad  $\gamma$  y uno de los pares  $\alpha/\beta$  (Boekema et al., 1990; Boekema y Bottcher, 1992). La eliminación de la subunidad  $\delta$  provoca una pequeña disminución de 13 Å del diámetro total en la  $F_1$  de cloroplasto ( $CF_1$ ) (Boekema et al., 1990), es decir que la subunidad  $\delta$  influye sobre la posición entre las subunidades mayores  $\alpha$  y  $\beta$ , esto se apoya en las observaciones de que el tiempo de correlación rotacional del  $CF_1$  disminuye un 25% aún cuando la contribución de  $\delta$  a la masa total del  $CF_1$  es de un 5% (Schinkel y Hammes, 1986). El tratar de dilucidar la posición de la subunidad  $\epsilon$ , la mas pequeña del oligómero hidrofílico ( $F_1$ ), ha revelado que es el péptido mas dinámico, ya que su posición varía dependiendo del estado funcional de la enzima, lo cuál se apoya en las observaciones de que el llenado por nucleótidos de los sitios catalíticos modifica la polaridad en torno a un residuo de triptofano en la subunidad  $\epsilon$  (Solaini et al., 1993).

La imagen cristalográfica a 6.5 Å de resolución del sector  $F_1$  de mitocondrias de bovino, obtenida a partir de cristales ortorrómbicos, fue presentada recientemente por el grupo de John. E. Walker (Lutter et al., 1993; Abrahams et al., 1993), previamente el grupo de Mario Amzel reportó la difracción de rayos X de cristales trigonales, mostrando una estructura de la  $F_1$  (de mitocondrias de hígado de rata), a una resolución mayor (3.6 Å) (Bianchet et al., 1991). La discrepancia más importante entre estos dos reportes es que el modelo que presenta Amzel es simétrico, y el de Walker asimétrico.

La  $F_1$  presentada por Amzel y colaboradores (Bianchet et al., 1991) presenta las siguientes características (Fig. 2a): *i*) El oligómero presenta un eje de simetría triple en el cual cada unidad asimétrica consiste de un tercio del complejo  $F_1$ , y la estructura resultante necesariamente revela a una partícula altamente simétrica, en la que cada par  $\alpha/\beta$  adyacente es idéntico a los otros dos, *ii*) las subunidades  $\beta$  no hacen contacto físicamente entre sí, *iii*) las subunidades  $\alpha$  si interaccionan entre sí, pero solo cerca de la cavidad central, *iv*) entre  $\alpha$  y  $\beta$  hay una importante área de contacto, *v*) se determinó por identificación de los grupos SH, que parte importante de los sitios catalíticos se localiza en la interfase  $\alpha/\beta$  y *vi*) no se pueden distinguir las subunidades menores  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Thomas et al., 1992).

En contraste la estructura de la  $F_1$  presentada por Walker (Abrahams et al., 1993) es altamente asimétrica, aunque el complejo de músculo cardíaco de bovino es esencialmente el mismo que el de hígado de rata (98% y 95% de similitud en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente). En este trabajo no se intentó delinear el contorno de las subunidades y establecer con ello la estructura cuaternaria del complejo, sus características principales son las siguientes: Se observa un tallo de 40 Å de largo, en la base y que podría formar parte de el cuello que conecta a  $F_1$  con  $F_0$  (Fig. 2b), junto a esta estructura existe una cavidad que penetra 35 Å, y sugiere un lugar de inserción para parte de la subunidad b (Fig. 1c). La característica más sobresaliente de este modelo es una estructura elongada, de un largo de 90 Å y que atraviesa a  $F_1$  del polo inferior al polo superior. Se constituye por una estructura  $\alpha$ -hélice de aproximadamente 60 aminoácidos, posiblemente de la subunidad  $\gamma$  o  $\delta$

(Abrahams et al., 1993).

Ninguna de las estructuras mencionadas se encuentran en el modelo de Amzel.

Son también notables las discrepancias que hay entre la conformación de las subunidades menores  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (y la cavidad central que ocupan) del modelo cristalográfico del  $F_1$  presentado por el grupo de Walker (Abrahams et al., 1993) con las predicciones de la estructura tridimensional del complejo  $F_1$ -ATPasa de la bacteria termofílica PS3 ( $TF_1$ ) (Ishii et al., 1993), en estos estudios se empleó el procesamiento de imágenes de micrografías electrónicas de cristales bi-dimensionales depositados sobre una superficie de mercurio, contrastados con acetato de uranilo. El modelo que se obtiene a 30 Å de resolución muestra; en la cavidad de  $TF_1$  una masa central de 28 Å de diámetro, ubicada a una profundidad de 34 Å desde el polo superior, esta masa representa un 7-10% del volumen total del complejo (Ishii et al., 1993). En cambio la imagen por difracción de rayos X de Walker muestra una estructura alargada de 90 Å de largo, sumamente delgada que estaría formada por las  $\alpha$ -hélices de las subunidades  $\gamma$  y  $\delta$  (Abrahams et al., 1993).

Las diferencias entre los dos modelos cristalográficos presentados hasta la fecha (discutido por Stokes y Nakamoto, 1994), podrían ser efectos estructurales de las subunidades de menor peso molecular  $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$ , provocados por arreglos distintos inducidos desde los sitios catalíticos. El  $F_1$  de hígado de rata fue cristalizado por el grupo de Amzel, en presencia de ATP y fosfato de potasio, en cambio el grupo de Walker, utilizó AMP-PNP (un análogo no hidrolizable del ATP), ADP y  $Mg^{++}$ . Por lo tanto puede ser que el ATP y el  $P_i$ , no induzcan la perturbación ocasionada por las subunidades menores que si ocasionan el ADP, el AMP-PNP más el  $Mg^{2+}$  y que ejercen un efecto sobre los sitios catalíticos provocando la asimetría. La influencia de los distintos nucleótidos (coordinados o no con el catión divalente) sobre la conformación de la  $F_1$  podría tener un sentido funcional, (*¿inducir arreglos conformacionales?*). Tal como es el caso de los distintos patrones de cristalización de la *Na,K-ATPasa*, provocados por cambios conformacionales de las subunidades menores en respuesta a la adición de nucleótidos, demostrado por un análisis de microscopía electrónica (Hebert et al., 1985).

Las estructuras derivadas de los dos cristales, podrían ser una oportunidad para entender la naturaleza de los cambios conformacionales en el complejo  $F_1$  y el papel de los nucleótidos y cationes divalentes.

Con respecto a la influencia ejercida por el  $ATP \cdot Mg^{2+}$ , sobre la conformación de la enzima, se ha podido determinar por medio del análisis por *dispersión de rayos X* que: desde el primer ciclo catalítico de la  $F_1$ -ATPasa, la enzima se expande un 6% de su tamaño, poco después de entrar en contacto con el sustrato (Neidhardt et al., 1991). El puro hexámero  $\alpha_3\beta_3$  (que es capaz de hidrolizar ATP) en presencia de AMP-PNP-Mg (análogo de ATP) cambia a una conformación más compacta (Harada et al., 1991a; 1991b), estas evidencias de gran plasticidad de la enzima, incluso han llevado a sugerir la existencia de estados compactos y expandidos relacionados con ciertos pasos catalíticos de la reacción de hidrólisis.

Por medio de la técnica de "inactivación por radiación" se determinó el tamaño funcional del complejo  $F_1$ , los resultados de este trabajo mostraron que tanto para la hidrólisis como para el recambio ATP-Pi el tamaño funcional es de  $300(\pm 35)$  kda (Ma et al., 1993). Por tanto, en cuanto a los cambios conformacionales más generales, la hidrólisis presenta un patrón similar al de la síntesis.

Los estudios de la ATP sintetasa de la bacteria termofílica PS3, permitieron inferir en parte los importantes efectos del  $ATP \cdot Mg$ , sobre el sector  $TF_1$ . El complejo de este organismo termoresistente es el único que permite la formación del hexámero ( $\alpha_3\beta_3$ ) a partir de una mezcla de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  1:1, sin requerir de ATP y  $Mg^{2+}$  en el medio, a diferencia del  $F_1$  de organismos mesófilos que sí requiere de dichos sustratos (Dunn y Futai, 1990). Por medio de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se aisló el heterodímero  $\alpha_1\beta_1$  (PM: 106 kda) producto de la disociación del hexámero  $\alpha_3\beta_3$  (PM: 319 kda) por adición de  $ADP \cdot Mg^{2+}$ , por el contrario si al heterodímero (también capaz de hidrolizar ATP) se le agrega  $ATP \cdot Mg^{2+}$  se ensambla un hexámero funcional, y al diluir varias veces dicho hexámero este vuelve a disociarse en  $\alpha_1\beta_1$ , a menos que en lugar de  $ATP \cdot Mg^{2+}$  se adicione el análogo no hidrolizable del ATP, AMP-PNP- $Mg^{2+}$ , por tanto la interconversión hexámero-

heterodímero es reversible. Se concluye que los cambios conformacionales inducidos desde los sitios catalíticos involucran regiones de contacto proteína-proteína (Harada et al., 1991b; revisado por Kagawa et al., 1992).

El grupo de Capaldi ha determinado la influencia que tienen los sustratos y productos de la catálisis, sobre los arreglos de las subunidades menores  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , entre ellas y con respecto a los pares  $\alpha/\beta$ . Las diferencias encontradas entre la  $F_1$ , que ha estado en presencia de ATP·Mg<sup>2+</sup> o ADP + Mg<sup>2+</sup> + Pi, y la enzima con ATP + EDTA, se resumen a continuación:

i) Cuando el AT(D)P·Mg está presente las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$  son inaccesibles a la proteólisis por tripsina, en cambio, si se agrega el quelante EDTA estas mismas subunidades son rápidamente digeridas por la tripsina (Bragg y Hou, 1987; Mendel-Hartvig y Capaldi 1991).

ii) En una mutante de *E. coli* en la que se introduce una cisteína en lugar de la Serina de la posición 8 de la subunidad  $\beta$ , se logra establecer un entrecruzamiento químico con TFPAMs de la subunidad  $\gamma$  con la  $\beta$ , con alta eficiencia si el entrecruzamiento se realiza en presencia de AT(D)P·Mg<sup>2+</sup> y con baja eficiencia si es en un medio de ATP + EDTA.

iii) Las subunidades  $\beta$  y  $\epsilon$  se entrecruzan covalentemente por EDC de manera considerable en presencia de nucleótidos y el cation divalente Mg<sup>2+</sup>, pero no así en presencia de ATP únicamente (Mendel-Hartvig y Capaldi, 1991).

iv) En la  $F_1$  de *E. coli* un cambio en la posición 108 de la subunidad  $\epsilon$  de una serina por cisteína, permite realizar un entrecruzamiento con TFPAMs entre las subunidades  $\epsilon$  y  $\gamma$ , si se ha incubado previamente al complejo con AT(D)P·Mg<sup>2+</sup>. Si la enzima ha estado en contacto solamente con el ATP, entonces el entrecruzamiento  $\epsilon$ - $\alpha$  es poco eficiente, y el  $\epsilon$ - $\gamma$  es alto (Aggeler et al., 1992).

v) La subunidad  $\gamma$  se ve mas cerca al par  $\alpha/\beta$  al cual la subunidad  $\epsilon$  permanece adyacente, cuando el sitio catalítico esta ocupado, pero cuando solo los sitios reguladores estan ocupados, la subunidad  $\gamma$  no muestra preferencia alguna por asociarse al par  $\alpha/\beta$  relacionado con  $\epsilon$  (Gogol et al, 1990).

### **MECANISMO CATALITICO EN $F_1$**

Se han detectado seis sitios capaces de pegar nucleótidos en el complejo  $F_1$  (Wise et al., 1983; Perlin et al., 1984b). En tres de ellos los nucleótidos no se recambian durante la hidrólisis (Cross y Nalin, 1982) ni la síntesis de ATP (*sitios no-catalíticos o no-intercambiables*) (Wise et al., 1983) por lo que se ha propuesto, para los nucleótidos que les ocupan un papel estructural, regulatorio e inclusive funcional. Los otros tres sitios sí se recambian por los nucleótidos del medio (*catalíticos o intercambiables*), aunque está en discusión cual es el número de ellos que son funcionales durante la catálisis.

En cuanto a su localización, se ha determinado por marcaje de afinidad, que los sitios no-catalíticos se encuentran en la interfase  $\alpha$ - $\beta$  pero mayoritariamente en la subunidad  $\alpha$  (Zhuo et al., 1992), también los sitios catalíticos están en la interacción que forman  $\beta$  y  $\alpha$  pero principalmente en  $\beta$ . Esto explica porqué las subunidades aisladas no pueden hidrolizar ATP y los heterodímeros son funcionales (Harada et al, 1991b), además de que resuelve las discrepancias, en cuanto al número de nucleótidos que puede pegar una subunidad  $\alpha$  o  $\beta$  (Gromet-Elhanan, 1992).

Existe una amplia discusión acerca de el número de sitios catalíticos *funcionales* durante la actividad del  $F_1$ .

Por su parte J.H.Wang propone el modelo de un sitio, basandose en la modificación asimétrica del  $F_1$  ya que observa el marcado de sólo una de las subunidades  $\beta$ , empleando el reactivo NBD-Cl (7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole) (Wang, 1985 discutido por Wang, 1988).

Otros grupos han reportado otros marcajes en los que DCCD y un análogo de nucleótidos se unen a 2 de las subunidades  $\beta$  dando lugar a la propuesta para un modelo de 2 sitios (Yoshida et al., 1982; Bullough et al., 1991). La evidencia más convincente, en favor de este mecanismo, son los experimentos efectuados por el grupo de Masakuke Yoshida basados en estrategias de ingeniería genética donde logra tener subunidades  $\beta$  modificadas en el sitio catalítico que pueden reconstituirse en el número deseado (1, 2 ó 3) con los otros tipos de subunidades dando lugar a complejos  $F_1$  con todas las subunidades  $\beta$  modificadas, con sólo 2 subunidades  $\beta$  alteradas y 1

normal o con 1 subunidad  $\beta$  modificada y 2 no modificadas, solo esta última clase de complejo fue funcional (Miwa et al., 1989; discutido por Berden et al., 1991).

Paul D. Boyer y colaboradores propusieron un mecanismo de tres sitios catalíticos, este esquema se conoce como "el modelo de cambio de afinidad" ("*binding-change model*") e involucra la participación de 3 sitios catalíticos alternándose secuencialmente durante la reacción. (Rosing et al., 1977; Hackney y Boyer., 1978; Cross y Nalin, 1982; Cross, 1988). Un experimento que sin lugar a duda, concuerda con dicho modelo, es el que elaboraron Grubmeyer y Penefsky (1991) que consistió en observar la hidrólisis de la  $F_1$ -ATPasa en condiciones sub-estequiométricas de ATP, es decir colocando el ATP necesario para que sólo un sitio (el de mayor afinidad) sea llenado, a esta condición se le conoce como "*hidrólisis uni-sitio*" presentándose una actividad muy lenta cuyo paso limitante es la liberación del ADP producto de la hidrólisis. Un fenómeno de cooperatividad es evidenciado al agregar ATP extra a la condición uni-sitio, ya que el aumento en la velocidad de consumo de ATP es del rango de seis ordenes de magnitud. De esta forma se llegó a la conclusión que la unión de ATP en un sitio induce la liberación de ADP y Pi del sitio donde la hidrólisis recién ha ocurrido, lo cuál es el paso limitante de la reacción.

Aún se desconoce el mecanismo que cataliza la reacción  $ATP = ADP + Pi$  que ocurre dentro de los sitios catalíticos de la  $F_0F_1$ -ATPasa, a pesar de que se han localizado las zonas de la enzima donde se lleva a cabo (Revisado en Allison et al., 1992 y Gromet-Elhanan, 1992) y los residuos posiblemente involucrados (Revisado por Futai et al., 1989 y Penefsky y Cross 1991), no existe una explicación sobre como la participación de los residuos en el evento químico. Una posible fórmula para la hidrólisis del ATP (que no invoca un intermediario fosforilado) es la *desprotonación* de una molécula de agua por una base en el sitio activo, que induzca un ataque nucleofílico por el  $OH^-$  resultante y la posterior *protonación* del fosfato hidrolizado por un grupo ácido estratégicamente localizado en el dominio catalítico (Knowles, 1980). Los residuos que aportan la base y el ácido en el sitio catalítico no han podido ser identificados con

precisión, en parte porque toda la batería de ensayos de mutagénesis dirigida, con el fin de sustituir residuos y observar sus efectos, han sido planeados sin la estructura detallada del complejo enzimático; por ejemplo, hay mutaciones que alteran fuertemente la cooperatividad y no la catálisis directamente (hidrólisis uni-sitio normal) y que seguramente involucran interacciones proteína-proteína o estabilidad estructural.

### **LA ATP SINTETASA DE *Rhodospirillum rubrum***

*R. rubrum* es un organismo que puede desarrollarse fotoheterotróficamente al igual que como un organismo respiratorio, al parecer para ambos tipos de metabolismo emplea a la misma ATP sintetasa (Baccarini-Melandri y Zanoni, 1978), tanto el mismo sector  $F_1$  (En *Rb. capsulata* Melandri et al., 1971) como el mismo  $F_0$  (Schmid et al., 1981).

La ATP sintetasa esta codificada por un operon bi-cistrónico, una región codifica para las subunidades del sector  $F_1$  (8775 pares de bases) (Falk et al., 1985) y otra lo hace para las subunidades del  $F_0$  (4240 pares de bases) (Falk y Walker, 1989). A diferencia de la enzima de *E. coli* que está codificada en un operón monocistrónico.

El  $F_0F_1$  en la membrana del cromatóforo se encuentra rodeado por un anillo de lípidos con un elevado contenido en ácidos grasos saturados (Oelze et al., 1980). Sintetiza ATP aprovechando el gradiente electroquímico generado por cadenas transportadoras de electrones, requiriendo un  $\Delta\mu_{H^+}$  umbral de 90 mV con una velocidad de 200 molas de ATP por mol de  $F_0F_1$  por segundo (Slooten y Vandenbranden, 1989). Dicho complejo muestra una inhibición en su actividad hidrolítica de  $ATP \cdot Mg^{++}$  de un 70% por Oligomicina y por DCCD (Oren y Gromet-Elhanan, 1977; Schneider et al., 1980) y de un 30% en su hidrólisis  $ATP \cdot Ca^{++}$  (Schneider et al., 1980).

Con un peso molecular de aproximadamente 550 kda y un diámetro de 15.5 nm (Nawroth et al., 1983) el complejo  $F_0F_1$ -ATPasa de *R. rubrum* ( $RF_0F_1$ ) ha sido aislado íntegramente y caracterizado por varios grupos (Oren y Gromet-Elhanan, 1977; 1979; Schneider

et al., 1980). Al purificarse mantiene sus propiedades originales ya que al reconstituirse en vesículas de fosfolípidos recupera la habilidad de acidificar la membrana (Schneider et al., 1980), al hidrolizar ATP-Mg<sup>++</sup> y de sintetizar ATP-Mg<sup>++</sup> como respuesta a gradientes electroquímicos inducidos (Oren et al., 1980).

El sector RF<sub>1</sub> (383 921 daltons) también a sido purificado y caracterizado individualmente (Johansson et al., 1972) y puede ser reintegrado a la membrana recuperando sus características originales (Gromet-Elhanan, 1974). Se ha obtenido la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las subunidades  $\alpha$  (55 026 kda),  $\beta$  (50 852 kda),  $\gamma$  (32 437 kda),  $\delta$  (19 543 kda) y  $\epsilon$  (14 307 kda) (Falk et al., 1985).

Se ha identificado que el oligómero RF<sub>1</sub> tiene grupos sulfhidrilos reactivos (Cortez et al., 1983) así como importantes residuos de tirosinas expuestos (Khananahvilli y Gromet-Elhanan, 1983), además de 2 grupos carboxilos esenciales (Ceccarelli y Vallejos, 1983)

El heterodímero funcional  $\alpha\beta$  de *R. rubrum* puede aislarse por extracciones con LiCl (Andralojc y Harris, 1992) y posee un sitio no-catalítico y uno catalítico o intercambiable (Andralojc y Harris, 1993).

La enzima membranal (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) muestra una mayor actividad en presencia de Mg<sup>++</sup> y la soluble (F<sub>1</sub>) en presencia de Ca<sup>++</sup>. La liberación al soluble del sector F<sub>1</sub> al parecer provoca un cambio en el arreglo de la enzima y de sus propiedades funcionales lo que puede ser observado por el distinto comportamiento cinético en cuanto a la dependencia del catión divalente coordinado al ATP (Johansson et al., 1973), situación que también se cumple en *R. sphaeroides* (Muller et al., 1983).

Como posible explicación a este fenómeno se ha sugerido que la F<sub>1</sub>-ATPasa de *R. rubrum* posee de un sitio regulatorio, para cationes divalentes y las diferencias entre la enzima membranal y la soluble se deben a un cambio en la conformación de este sitio (Edwards y Jackson, 1976), que es sensible al exceso de Mg<sup>++</sup> inhibiendo la cooperatividad entre los sitios catalíticos (Andralojc y Harris, 1993).

Sin embargo la pérdida de capacidad del complejo F<sub>1</sub> de hidrolizar ATP-Mg<sup>++</sup> y la aumentada habilidad de hacerlo para ATP-Ca<sup>++</sup>, no se debe a un cambio en la afinidad por los sustratos ya que la hidrólisis de ATP-Ca es inhibida

competitivamente por  $Mg^{++}$  (Edwards y Jackson, 1976), además de que la subunidad  $\beta$  aislada es capaz de pegar  $ATP-Mg^{++}$  pero no así  $ATP-Ca^{++}$  (Gromet-Elhanan y Weiss, 1989). De hecho la actividad de ATPasa en presencia de magnesio permanece latente y puede estimularse por ciertos detergentes (Norling et al., 1986), lo que paralelamente induce una inhibición de la habilidad de hidrolizar  $ATP-Ca$  (Norling et al., 1989).

Pick y Weiss (1989) reportaron que la actividad de ATPasa de la enzima de Cloroplasto, en presencia de  $Ca^{++}$ , no forma un potencial electroquímico, esta falla en el acoplamiento de la hidrólisis  $ATP-Ca^{++}$  con el bombeo vectorial del protón fue descrita un año después para *R. rubrum* (Strid y Nyren, 1989; Gromet-Elhanan y Weiss, 1989; Montero-Lomeli et al., 1989).

El comportamiento del complejo  $F_0F_1$  en el cromatóforo cambia mucho en relación al catión divalente presente, con  $Ca^{++}$  no es capaz de realizar fotofosforilación (Strid y Nyren, 1989) ni de sostener el recambio  $ATP-^{32}Pi$  (Montero-Lomeli et al., 1989). La única explicación que se ha sugerido a la fecha invoca un mal acomodo del  $ATP-Ca^{++}$  dentro del sitio de unión a nucleótidos en base al tamaño mayor del ión  $Ca^{++}$  con respecto al  $Mg^{++}$  (Strid y Nyren, 1989).

El heterodímero funcional  $\alpha\beta$  de *R. rubrum* muestra una actividad hidrolítica específica de  $110 \text{ nanomoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  y poca discriminación entre  $ATP-Mg^{++}$  y  $ATP-Ca^{++}$  (Andralojc y Harris, 1993).

## **Bacterias Púrpuras no-sulfurosas (PNSB)**

### **ANTECEDENTES DEL GRUPO PNSB**

En 1887 el alemán E. Esmarch buscaba encontrar bacterias putrificantes, para lo cual sumergió a un ratón muerto de septicemia en un recipiente con agua destilada y tras esperar tres meses examinó el resultado, entre los muchos microorganismos que encontró, pudo aislar por medio de una gelatina con nutrientes, colonias de un color púrpura brillante de microbios en forma de espirilos y de carácter heterotrófico (Esmarch, 1887). Bacterias muy similares (bacterias purpuras) habían sido reconocidas

por Engelmann (1833a y 1833b) quien demostró su habilidad fotosintética y sugirió su incapacidad de producir oxígeno (Engelmann, 1834; 1838a; 1838b ; 1838c), esto fue complementado posteriormente en una serie de experimentos que evidenciaron que estos organismos facultativos pueden realizar fotosíntesis pero no producen oxígeno y que dependen de fuentes de carbono para su desarrollo (Molisch, 1907). Sin embargo es hasta 1954 (Johnston y Brown, 1954) cuando, en experimentos con  $^{18}\text{O}$  como marcador, se confirma esta anoxifototrofia.

Estas peculiares bacterias fueron ubicadas en un orden llamado *Rhodobacteria* (Molisch, 1907) que incluía a las actualmente llamadas Bacterias púrpuras no-sulfurosas y a las Bacterias púrpuras sulfurosas. Posteriormente estos grupos fueron separados por Pfennig y Trüper (1971) y PNSB quedó como el orden *Rhodospirillales*, pero como ya se mencionó antes el fenotipo fotosintético no es el único criterio de clasificación y con base en otros aspectos de tipo molecular PNSB se ubicó dentro de los subgrupos  $\alpha$  y  $\beta$  de la clase *Proteobacteria* (Stackebrandt, 1985; Woese, 1987; Stackebrandt et al., 1988) la más compleja colección de fenotipos diferentes y metabolismos variados, cuyos parentescos relativos se contraponen con las clasificaciones clásicas y cuyo ancestro común se piensa era un organismo fototrófico (Gibson et al., 1980; Seewaldt et al., 1982).

#### UBICACIÓN FILOGENÉTICA DEL GRUPO PNSB

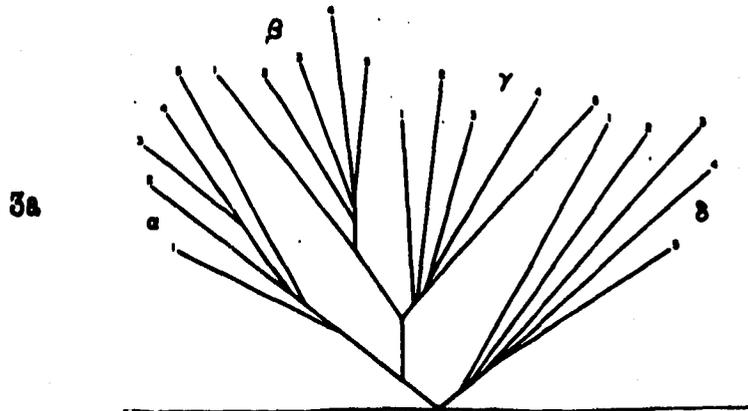
La gran diversidad orgánica puede ser dividida para su estudio en tres grandes *Dominios*: Arquea, Eucaria y Eubacteria, dentro de este último, hay tres grupos principales de bacterias fotosintéticas anaerobias: las bacterias verdes sulfurosas, las bacterias púrpuras sulfurosas y las bacterias púrpuras no-sulfurosas.

Las bacterias púrpuras no-sulfurosas (PNSB) se agrupan en seis géneros que pertenecen a un conjunto natural (*filogenético*) recientemente nombrado *Proteobacteria* (*Proteus*: Dios griego del mar capaz de asumir formas distintas. *Bakterion*: pequeño bastón) que incluye a las "Bacterias púrpuras y a organismos

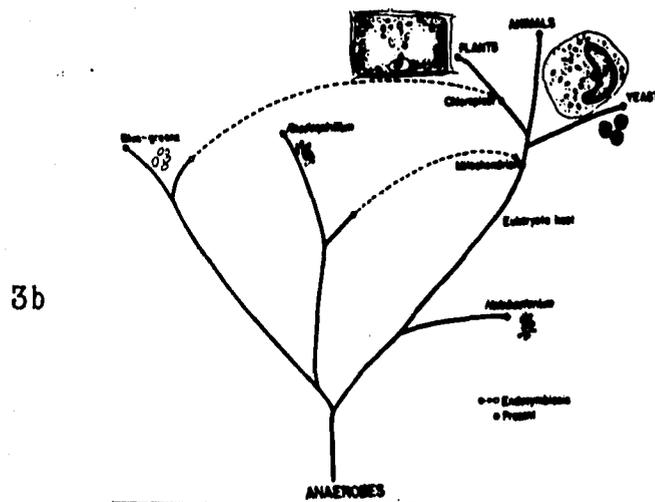
relacionados" y en donde también hay representantes no-fotosintéticos como los géneros *Escherichia*, *Nitrobacter*, *Desulfovibrio*, o *Paracoccus* (Stackebrandt et al., 1988). Existen análisis de comparación de secuencias (Woese et al., 1984a; 1984b; Woese, 1987), basados en catálogos de RNA ribosomal 16S, que demuestran que ciertas especies de bacterias púrpuras no-sulfurosas están más emparentadas con organismos de metabolismo no-fotosintético, como es el caso de *Rhodopseudomonas palustris* y *Nitrobacter winogradskii*, que aunque son líneas filogenéticas muy cercanas, el primero es un organismo fotoheterotrófico facultativo y el segundo un aerobio estricto (Seewaldt et al., 1982; Woese et al., 1984a), otro ejemplo son el fotoheterótrofo *Rhodobacter sphaeroides* y el litoautótrofo *Paracoccus denitrificans* (Woese, 1987). Existe la posibilidad de que estos representantes no-fotosintéticos provengan de especies que perdieron la capacidad de fotosintetizar anoxigénicamente mientras colonizaban ambientes aeróbicos y oscuros (Gibson et al., 1980; Seewaldt et al., 1982; Madigan, 1988).

Las Bacterias púrpuras no-sulfurosas (Pfennig y Truper, 1989) han sido definidas por Imhof y colaboradores (1984) basándose en características moleculares en combinación con otro tipo de atributos; morfológicos y fisiológicos. Sus seis géneros son: *Rhodospirillum*, *Rhodopila*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodomicrobium* y *Rhodocyclus* ubicados en dos de las principales ramas de la clase **Proteobacteria** (Stackebrandt et al., 1988).

Esta clase posee cuatro grupos o ramas principales designadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ ; de ellas sólo las tres primeras albergan representantes fotosintéticos (Fig. 3a). La rama alfa contiene en su mayoría a las PNSB, junto con bacterias no fotosintéticas, ésta a su vez se divide en tres subgrupos; El  $\alpha_1$  contiene a las especies del género *Rhodospirillum*,  $\alpha_2$  las especies de *Rhodopseudomonas* y *Rhodomicrobium*, y en alfa 3 está incluido *Rhodobacter sp.* (Woese et al., 1984a). En la rama  $\beta$  (Woese et al., 1984b) sólo hay un género representante de las Bacterias Púrpuras no-sulfurosas que es *Rhodocyclus* (Fig. 3a) con tres especies muy similares entre sí pero bastante distintas a las otras PNSB, su RNA ribosomal 16S pertenece a la superfamilia IV, mientras que el 16S de las otras PNSB es característico de la superfamilia II (Gillis et al., 1982). Además de que hay evidencias de que los genes del complejo fotosintético de



3a



3b

Figura 3.- a) Arbol filogenético de las 4 subdivisiones de las bacterias púrpuras y organismos emparentados, basado en la comparación de secuencias de RNA ribosomal 16S. En la subdivisión  $\alpha$  se encuentran como representantes: 1, *Rhodospirillum rubrum*. 2, *Agrobacterium tumefaciens*. 3, *Rhodopseudomonas palustris*. 4, *Rps. acidophila*. 5, *Rhodobacter capsulata*.  $\beta$ ; 1, *Neisseria gonorrhoeae*. 2, *Spirillum volutans*. 3, *Nitrosolobus multiformis*. 4, *Rhodocyclus gelatinosa*. 5, *Rbc. purpureus*.  $\gamma$ ; 1, *Chromatium vinosum*. 2, *Legionella pneumophila*. 3, *Pseudomonas aeruginosa*. 4, *Acinetobacter calcoaceticus*. 5, *Escherichia coli*.  $\delta$ ; 1, *Myxococcus xanthus*. 2, *Desulfotribria desulfuricans*. 3, *Beiloutibrio stolpii*. 4, *Desulfotobacter postgatei*. 5, *Desulfuromonas acetoxidans*. Como grupo externo se utilizó a *Thermotoga maritima* y a *Bacillus subtilis* (Tomado de Woese, 1987). b) Representación esquemática del origen de los eucariontes, entre las tres líneas que contribuyeron a dicho origen está la rama de las bacterias púrpuras no-sulfurosas, que son considerados como co-descendientes de las mitocondrias (Tomado de Dayhoff y Schwartz, 1960).

*Rhodocyclus* fueron adquiridos por transporte horizontal de genes provenientes de *Rhodospirillum* (Nagashima et al., 1993).

El grupo  $\alpha$  de Proteobacteria ha sido propuesto como el conjunto filogenético co-descendiente de las mitocondrias (Fig. 3b) (Schwartz y Dayhoff, 1978; Dayhoff y Schwartz, 1980; Villanueva et al., 1985; Yang et al., 1985; Cedergren et al., 1988), ya que los organismos Eucariontes se originaron a partir de un evento endosimbiótico entre un miembro de esta subclase con el organismo predecesor del núcleo-citoplasma (posiblemente el género *Thermoplasma*) (Margulis, 1981; 1993).

Hay pocas variantes morfológicas en PNSB, la mayoría son bastones, cocos o espirilos de distintos tamaños, algunas especies poseen un flagelo polar, subpolar o peritrico, y otras son no mótilas.

#### **HABITAT DE PNSB**

Las Bacterias púrpuras no-sulfurosas también llamadas *Rhodospirillaceae* (Pfennig y Trüper, 1971; 1989; Pfennig, 1978a) son organismos acuáticos que crecen en medios ácidos de un pH entre 5 y 6 y nunca se desarrollan sino es a expensas de organismos estrictamente heterótrofos, debido a que son incapaces de despolimerizar sustancias como la celulosa, la quitina, lípidos o proteínas, de manera que no puede obtener sustratos orgánicos (como fuente de carbono) a menos que lo haya en el medio. Es por eso que *Rhodospirillaceae* coexiste con otros microorganismos heterótrofos con poca abundancia (generalmente menos de  $10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$  (Kaiser, 1966)), en lagos y pantanos meromórficos (donde el fondo nunca se mezcla y no hay recambio) alimentados por mucha materia en descomposición, como agua de cañerías o de desechos industriales (Ruttner, 1963). La composición de estos lagos permite una estratificación en donde el oxígeno disminuye conforme aumenta la profundidad (Pfennig y Trüper, 1971; Pfennig 1978a). En el hipolimnion (el estrato profundo, fangoso y anaerobio) es donde habitan las Bacterias púrpuras no-sulfurosas.

Las bacterias púrpuras no-sulfurosas se encuentran también en aguas de desechos generados por humanos o fuentes industriales que pueden contener cantidades considerables de materia orgánica, como es el caso de la cañería en los

mataderos (Pfennig, 1978b).

Un habitat de Bacterias púrpuras no-sulfurosas se reportó en un lago, donde se vacían desechos de una industria que opera en Minnesota (Jones, 1956), el cual tenía una apariencia fangosa de un intenso color rojizo además de un penetrante olor a putrefacción. Se dedujo que la combinación de abundante carga orgánica junto con cantidades bajas de sulfatos, permitieron el desarrollo de estos organismos.

Basándose en un estudio realizado en una planta de tratamiento de aguas negras en Göttingen (Siefert et al., 1978) se encontró que probablemente los miembros de la familia *Rhodospirillaceae* juegan un papel minoritario en las transformaciones de materia orgánica en comparación con bacterias heterótrofas (presentes en un rango superior de hasta 1000 veces).

En Japón el grupo de Kobayashi (1975) ha demostrado que las aguas negras se pueden procesar utilizando a estas bacterias como catalizadores para remover la materia orgánica, azufre y compuestos nitrogenados. También se ha experimentado con excelentes resultados, en la adición como biomasa de estas bacterias a la comida de aves en granjas avícolas y como fertilizante (fuente de nitrógeno) en cultivos de cítricos y producción vegetal en general (Kobayashi, 1982).

Existe la descripción de una Bacteria púrpura no-sulfurosa endosimbionte de un ciliado marino anaerobio o microaerófilo, llamado *Strombidium purpureum* (Fenchel y Bernard, 1993) dicha PNSB contiene bacterioclorofila *a* y el carotenoide spiriloxantina.

El cultivo de *Rhodospirillum rubrum* ha sido empleado para la producción de  $H_2$  para su empleo como combustible, las bacterias son inmobilizadas en bioreactores de 20 litros (18 Kg de bacterias) donde el  $H_2$  es recuperado en reservorios especiales (Karube y Suzuki, 1988).

#### **FISIOLOGÍA DE PNSB**

Las PNSB son un grupo fisiológico/ecológico definido por su fenotipo característico fotosintético, en el cual su sustrato donador de electrones en vez de  $H_2O$  lo constituyen compuestos como azúcares o ácidos orgánicos (succinato, piruvato,

lactato, etanol, etc.) que además pueden ser la fuente de carbono; así el oxígeno no es un producto de la fotosíntesis (la liberación de O<sub>2</sub> es una característica de las cianobacterias y las plantas debida a que el agua es el donador de electrones para la reducción del NADP a NADPH requerida para la fijación de CO<sub>2</sub>). Estas bacterias no forman glóbulos de azufre elemental en el interior, cuando se desarrollan de forma fotoautotrófa, en contraste con *Ectothiordospiriaceae* (Bacterias púrpuras sulfurosas).

Por lo que respecta al metabolismo las bacterias Púrpuras no-sulfurosas, son quizá, los organismos más versátiles del planeta, en condiciones de anaerobiosis y luz crecen como fotoheterótrofos, utilizando varios substratos orgánicos, o como fotoautótrofos si utilizan hidrógeno molecular o en algunas especies, sulfuro como donador de electrones y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono. Si el azufre elemental es formado como subproducto de la oxidación aparecen glóbulos de sulfuro en el exterior de las células. Bajo condiciones de microaerobiosis a aerobiosis en oscuridad, muchas especies pueden crecer como heterótrofos utilizando compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía.

En Anaerobiosis y oscuridad realizan fermentación e inclusive logran metabolismo litotrófico (Pfennig, 1978a). La mayoría de las especies requieren de factores de crecimiento como biotina, niacina, tiamina o ácido p-aminobenzoico.

#### **FOTOSÍNTESIS EN PNSB**

La reacción generalizada de los organismos fotosintéticos se representa en la ecuación propuesta por Cornelis Bernardus van Niel (van Niel, 1930; 1935; 1936; 1941):



Los tres postulados principales del mecanismo, tal y como fueron propuestos en 1936 (van Niel, 1936; Ormerod, 1967) son:

1) En una típica reacción fotoquímica el pigmento absorbe energía de luz radiante y se activa de forma que actúa como un donador de electrones.

2) Reducción del ácido carbónico por un fotopigmento activado. Esta reacción procede en la oscuridad y transforma al fotopigmento en un complejo oxidado que ya no puede actuar como un donador de electrones, hasta que ha sido reducido y vuelve a su estado inicial.

3) Ahora ocurre una reacción de óxido-reducción en la que el complejo oxidado es reducido con la ayuda de un donador especial de hidrógeno  $H_2A$ . Esta reacción restablece el estado inicial del fotopigmento con la formación simultánea de un producto de oxidación  $A$ .

En cloroplastos y cianobacterias  $H_2A$  corresponde al agua y se produce  $O_2$ , en bacterias fototróficas (fotosíntesis anoxigénica), la bacterioclorofila es reducida a su estado original con hidrógeno derivado de  $H_2S$ ,  $H_2$ , o compuestos orgánicos (succinato, malato, etanol, etc.) con un potencial redox más bajo que el agua; al no ser  $H_2O$  la fuente de hidrógeno no se produce  $O_2$ , esto está vinculado al hecho de que opere un sólo proceso fotoquímico con la utilización de un único fotosistema. Se han reconocido estrechas similitudes entre este complejo fotosintético de bacterias fototróficas y el fotosistema II de cloroplastos (Wraight, 1982).

La transferencia de electrones sin producción neta de especies químicas oxidadas o reducidas, es una característica de la fotosíntesis en Bacterias púrpuras no-sulfurosas (Baccarini-Melandri y Zannoni, 1978; Ames y Knaff, 1988; Prince, 1990) en este proceso la luz es absorbida por un complejo antena bacterioclorofila-proteína y la energía transferida a un centro de reacción fotoquímico P870 (P de pigmento y 870 es la  $\lambda$  del pico de absorción en estado oxidado) en donde ocurre una separación de cargas. P870 se oxida y un aceptor primario de electrones se reduce. Después los electrones son transferidos de manera cíclica (fosforilación cíclica (Gest, 1966)) a través de varios componentes redox (quinonas, ferroproteínas no-hémicas y citocromos), como consecuencia protones son bombeados al interior de invaginaciones de membrana, llamadas cromatóforos (Cohen-Bazire y Kunizawa, 1963), que se acidifican formando así un potencial electroquímico, dicho gradiente es disipado por la enzima ATP sintetasa y como producto de ello se sintetiza ATP.

Los singulares eventos de este proceso han sido dilucidados por técnicas

espectroscópicas, los detalles quedan fuera del principal interés al que se enfoca este texto que es el proceso de fotofosforilación o síntesis de ATP, para una revisión del proceso fotosintético en PNSB y de la estructura de sus componentes revisar a los siguientes autores: Stanier y Cohen-Bazire (1967), Amesz (1978), Clayton (1978), Prince y Dutton (1978), Baccarini-Melandri y colaboradores (1981), Gest (1982), Evans y Heathcote (1983), Parson (1987), Packham y Barber (1987), Prince (1990) y Deisenhofer y Michel (1992).

#### **SÍNTESIS DE ATP EN PNSB**

En el año de 1943 Ruben sugirió que la energía luminosa se puede convertir a energía química en forma de enlaces fosfodiéster durante la fotosíntesis (Ruben, 1943), esto fue demostrado en 1948 utilizando como marcador  $^{32}\text{P}$  que al monitorearse mostró que la iluminación de *R. rubrum* en condiciones de anaerobiosis provoca un consumo de Pi (Gest y Kamen, 1948).

Se pensaba que la capacidad fotofosforilante en Bacterias púrpuras no-sulfurosas estaba asociada a la membrana. Estudios de microscopía electrónica mostraron estructuras lamelares en el interior de las células (Niklowitz y Drews, 1955), este aumento en superficie por invaginación de la membrana citoplásmica, se considera una adaptación a la captación de luz en condiciones fotoheterotróficas ya que las invaginaciones no se observan en los microorganismos crecidos heterotróficamente. Schachman y colaboradores (1962) encontraron que al romper con alumina a *R. rubrum* se podía aislar por ultracentrifugación, una fracción conteniendo todos los pigmentos fotosintéticos, el coeficiente de sedimentación fue de 190 S, el tamaño de las partículas obtenidas era de 60 nm de diámetro y sus espectros de absorción eran idénticos a los de las células intactas a estas vesículas se les llamó **CROMATOFOROS**. Es decir que las invaginaciones tubulares de membrana forman vesículas selladas al momento de romper las células mecánicamente y estas se pueden aislar mediante ultracentrifugación o gradientes de densidad (Schachman et al., 1962; Frenkel y Hickman, 1969; Cohen-Bazire y Kunisawa, 1963; Worden y Siström, 1964).

Los cromatóforos de *R. rubrum* se caracterizan por tener un diámetro promedio de 600 Å, el ancho de su bicapa es de 55 Å y su volumen es de  $1.13 \times 10^8 \text{ Å}^3$  (Nishi et al., 1982). Estos tienen un alto contenido de proteína que va de 70 a 80% y su número varía de 4000 a 6000 por célula dependiendo de la intensidad luminosa en que se desarrolle la bacteria.

Albert Frenkel (durante una estancia sabática con el Dr. Lipmann), descubrió que extractos de *R. rubrum* (cromatóforos) eran capaces de fosforilar ADP cuando se iluminaban bajo condiciones de anaerobiosis, identificando el ATP producido por medio de fosforilación de glucosa catalizada por hexoquinasa (Frenkel, 1954).

La actividad reversa de la síntesis de ATP (su hidrólisis) fue descrita posteriormente para los cromatóforos de *R. rubrum* (Frenkel 1956; Boss y Gest, 1965).

La síntesis de ATP acoplada, por un mecanismo quimiosmótico, al transporte de electrones fotosintético quedó demostrada con los descubrimientos siguientes:

1) Los inhibidores específicos del transporte de electrones, como el HOQNO (2-Heptil-4-hidroxiquinolina-N-óxido) (Smith y Baltscheffsky, 1956; 1959), la antimicina A (Geller y Lipmann, 1960; Baltscheffsky y Baltscheffsky, 1960), el HHNQ (2-Hidroxi-3,1- $\omega$ -ciclohexiloctil-1,4-naftoquinona) (Thore et al., 1968), o el DBMIB (dibromotimoquinona) (Baltscheffsky, 1974) inhiben la fotofosforilación del ADP a ATP.

2) Se observó una inhibición del 50% de la producción de ATP con el desacoplante 2,4 dinitrofenol (Frenkel, 1954) (el efecto del 2,4-dinitrofenol, se postuló, era el mismo que operaba en mitocondrias impidiendo la esterificación del fosfato (Slater, 1963)) además del reporte en que, el 3,5-diiodo-4-hidroxibenzoato (Hoch y Lipmann, 1954), el dicumarol, la gramicidina (Baltscheffsky y Baltscheffsky, 1960) y los ionóforos valinomicina y nigericina (Thore et al., 1968) también inhiben dicha fotofosforilación. Por otro lado el 2,4 dinitrofenol, el CCCP (Fisher y Guillory, 1967), y el FCCP (Thore et al., 1968) además de su efecto como desacoplantes del transporte de electrones con la síntesis, activan la hidrólisis del ATP (en ausencia de luz).

3) El recambio  $\text{ADP} \cdot ^{14}\text{C} \leftrightarrow \text{ATP}$  fue descrito en cromatóforos de *R. rubrum* (Horio et al., 1964), esta reacción es dependiente de la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ , su pH óptimo es

de 8.0 y no es sensible a a desacoplantes (posiblemente cromatóforos no sellados) y a inhibidores del transporte de electrones.

4) Recambio ATP  $\leftrightarrow$   $^{32}\text{P}_i$ . Esta reacción consiste en el intercambio del fosfato y del ATP con  $^{32}\text{P}_i$  libre en el medio, fue descrita por Horio y colaboradores (1965). Este proceso se inhibe por desacoplantes pero no por inhibidores del transporte de electrones, demostrando que la actividad de ATPasa puede por si misma sostener la formación de gradientes de pH necesarios para la síntesis de ATP en cromatóforos sellados. Esta reacción es inhibida por Dio-9 (inhibidor del factor de acoplamiento descrito en mitocondrias) (Fisher y Guillory, 1967) y por un antisuero contra el factor de acoplamiento de la ATPasa (Johansson, 1975).

5) Acoplamiento de tipo quimiosmótico. La actividad de ATPasa de cromatóforos de *R. rubrum* es inhibida por luz (generación de potencial) (Horiuti et al., 1968). El gradiente generado por las cadena de transporte posee los dos componentes anunciados por Mitchell (1961) uno eléctrico y otro químico (Jackson et al., 1968, Melandri et al., 1974), como ya se mencionó la presencia de agentes que colapsen a dicho potencial inhibe la síntesis de ATP (Thore et al., 1968). En el trabajo de Margarita Leiser y Zippora Gromet-Elhanan los cromatóforos se exponen a la luz en un medio sin ADP, posteriormente estos se cambian, en condiciones de oscuridad, a un medio con ADP, Pi y  $\text{Mg}^{2+}$  y se puede determinar la producción de ATP (Leiser y Gromet-Elhanan, 1974).

6) El aislamiento y la caracterización de la ATPsintetasa en cromatóforos de *R. rubrum*, *Rb. sphaeroides* y de *Rb. capsulata*.

Por medio de micrografías electrónicas Fernández del Moran (1962) descubrió unas partículas de 9 nm adosadas a la superficie de la membrana interna mitocondrial, las cuales son requeridas para la síntesis de ATP (Kagawa y Racker, 1966), dos años después Löw y Afzelius (1964) describen que las invaginaciones de membrana de *R. rubrum* (cromatóforos) poseen estructuras muy similares de 12 nm de diámetro sumamente parecidas a las descritas en partículas submitocondriales, posteriormente se reportaron las mismas protuberancias (9 nm) para *Rb sphaeroides*; éstas al liberarse y purificarse mostraron actividad de ATPasa (Reed y Raveed, 1972) y posteriormente en *R. rubrum* se confirmó su presencia (Keister y Raveed, 1981). Esta

## MATERIA

### Cultivo de

#### MEDIO DE CULTIVO

a) Cloruro de

El medio

de gelatina

tiamina 0

D-biotina

Se

a 15 libras

una fue

a 12 m

colonia

estas

mant

por

origi

St

fa

s

partícula en la superficie de las membranas puede ser liberada al medio con lavados de EDTA o con el detergente Triton X-100, perdiendo los cromatóforos su capacidad tanto fotofosforilante como su actividad de ATPasa, tal hidrólisis de ATP se detectó en el soluble; posteriormente se observó que los anticuerpos fabricados contra los factores de acoplamiento se aglutinan en cromatóforos sin tratar (Johansson, 1976; Prince et al., 1975).

En cromatóforos de *R. rubrum* Yamamoto y colaboradores (1972) encontraron ADP firmemente unido que se fosforila rápidamente a ATP con la exposición a la luz. Por su parte Lutz y colaboradores (1974) determinaron que el ATP unido a los cromatóforos está pegado al factor de acoplamiento o ATPasa. Esta enzima en cromatóforos fue aislada de *Rb. capsulata* (Baccarini-Melandri et al., 1970), *R. rubrum* (Johansson, 1972) y *Rb. sphaeroides* (Saphon et al., 1975a; 1975b).

Geller en 1962 detectó la capacidad de síntesis de ATP en *R. rubrum* crecida en condiciones aerobias, por medio de la oxidación de sustratos (fosforilación oxidativa) confirmando así el carácter facultativo de estos organismos (Geller, 1962). Se sabe que exactamente el mismo complejo enzimático, factor de acoplamiento o ATPasa, se comparte en el metabolismo fotosintético y el respiratorio (Melandri et al., 1971; Baccarini Melandri y Zanoni, 1978).

partícula en la superficie de las membranas puede ser liberada al medio con lavados de EDTA o con el detergente Triton X-100, perdiendo los cromatóforos su capacidad tanto fotofosforilante como su actividad de ATPasa, tal hidrólisis de ATP se detectó en el soluble; posteriormente se observó que los anticuerpos fabricados contra los factores de acoplamiento se aglutinan en cromatóforos sin tratar (Johansson, 1976; Prince et al., 1975).

En cromatóforos de *R. rubrum* Yamamoto y colaboradores (1972) encontraron ADP firmemente unido que se fosforila rápidamente a ATP con la exposición a la luz. Por su parte Lutz y colaboradores (1974) determinaron que el ATP unido a los cromatóforos está pegado al factor de acoplamiento o ATPasa. Esta enzima en cromatóforos fue aislada de *Rb. capsulata* (Baccarini-Melandri et al., 1970), *R. rubrum* (Johansson, 1972) y *Rb. sphaeroides* (Saphon et al., 1975a; 1975b).

Geller en 1962 detectó la capacidad de síntesis de ATP en *R. rubrum* crecida en condiciones aerobias, por medio de la oxidación de sustratos (fosforilación oxidativa) confirmando así el carácter facultativo de estos organismos (Geller, 1962). Se sabe que exactamente el mismo complejo enzimático, factor de acoplamiento o ATPasa, se comparte en el metabolismo fotosintético y el respiratorio (Melandri et al., 1971; Baccarini Melandri y Zanoni, 1978).

## OBJETIVOS

La intención principal de este estudio fue confirmar la predicción acerca de un arreglo conformacional distinto, inducido desde los sitios de unión a nucleótidos de la  $F_0F_1$ -ATPasa de *Rhodospirillum rubrum*, provocado por el tipo de catión divalente presente ya sea  $Mg^{++}$  o  $Ca^{++}$ . Para ello se plantearon los siguientes objetivos particulares:

i) Optimizar el crecimiento controlado de cultivos fotoheterotróficos en condiciones anaeróbicas de *R. rubrum* que proporcione bacterias con el fenotipo de expresión más elevado de la enzima *ATP sintetasa*.

ii) Implementar un método de obtención de cromatóforos de *R. rubrum*, a partir de los cuales sea posible aislar el sector  $F_1$  de la ATPsintetasa de dicha eubacteria por medio de estrategias bioquímicas, en cantidades suficientes para caracterizar a la enzima empleando técnicas analíticas confiables.

iii) Establecer el número de cisteínas reactivas que expone la  $F_1$ -ATPasa de *R. rubrum* al incubarse en tres condiciones: Sin sustratos, con  $ATP \cdot Mg^{++}$  y con  $ATP \cdot Ca^{++}$ . Monitoreandolas por medio del marcador de radicales sulfhidrilos DTNB ( 5,5'-ditio-bis-(2 nitrobenzoato) ).

iv) Comparar la velocidad de aparición de cisteínas ocultas de los complejos:  $F_1$ -EDTA,  $F_1$ - $ATP \cdot Mg^{++}$  y  $F_1$ - $ATP \cdot Ca^{++}$ , al exponerse a un tratamiento de desnaturalización con Guanidina-HCl.

v) Desarrollar una explicación congruente, de los resultados experimentales con el mecanismo de acoplamiento de la *ATP sintetasa* de *R. rubrum*.

## MATERIAL Y METODOS

### Cultivo de *Rhodospirillum rubrum* (cepa silvestre S1)

#### MEDIO DE CULTIVO

a) Crecimiento en medio de cultivo sólido y condiciones fotoheterotróficas.

El medio de cultivo sólido contiene agar 2%, extracto de levadura 0.3%, peptona de gelatina 0.2% y los siguientes factores de crecimiento: ácido nicotínico 1 mg/ml, tiamina 0.62 µg/ml y D-biotina 0.01 µg/ml.

Se esterilizan 10 ml de medio en frascos de 20 ml de volumen, durante 15 min a 15 libras de presión. Los frascos se inoculan por punción y se colocan expuestas a una fuente luminosa constante. Con este método se puede mantener a la cepa de 6 a 12 meses con una tasa de crecimiento baja.

También pueden utilizarse cajas Petri que se estrian para la obtención de colonias individuales y se someten al mismo tratamiento que los frascos sólo que estas se crecen en un contenedor en anaerobiosis. Con re-siembras continuas se puede mantener por tiempo indefinido a la cepa.

b) Cultivo líquido para crecimiento en condiciones fotoheterotróficas.

Se utilizó el medio de cultivo descrito para el crecimiento de *Rb. sphaeroides* por W.R. Sistrom (1960) diseñado a partir de modificaciones a un medio que originalmente reportaron Germaine Cohen-Bazire, William R. Sistrom y Roger Y. Stanier (1957) y que a su vez esta basado en un estudio destinado a identificar los factores requeridos por *R. rubrum* para su crecimiento (Hutner, 1944,1950).

A pesar de que el medio implementado está basado en los requerimientos de sodio de *Rb. sphaeroides* (Sistrom, 1960) este permite un excelente crecimiento fotoheterotrófico de *R. rubrum* tal como ha sido reportado por varios autores (Celis y Romero, 1987., Montero-Lomelf y Dreyfus, 1987., Ordaz et al., 1992 y Sosa y Celis, 1993).

Este medio se prepara mezclando las siguientes soluciones, (previamente preparadas) en los volúmenes siguientes:

**Medio de cultivo**

Base concentrada	20 ml
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (136.9 g/l + 20 g de NaOH)	20 ml
Ac. succínico (100 g/l + 70 g de NaOH)	20 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (100 g/l)	5 ml
NaCl (50 g/l)	10 ml
Ac. glutámico (100 g/l)	2 ml
Ac. aspártico (20 g/l)	2 ml
Hidrolizado enzimático de caseína	1 g
Solución de vitaminas	0.1 ml
Agua desionizada	c.b.p. 1 l

**Solución de vitaminas**

Ac. nicotínico	1.00 g
Tiamina-HCl	0.50 g
d-Biotina	0.01 g
Agua desionizada	c.b.p. 100.00 ml

**Base concentrada**

Ac. nitriloacético	10.00 g
$\text{MgSO}_4$	14.45 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.33 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	9.25 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	99.00 mg
Solución de Metales "44"	50.00 ml
Agua desionizada	c.b.p. 1.00 l

Para preparar la solución de base concentrada, el ácido nitriloacético se neutraliza con KOH (aproximadamente 7.3 g) Después de agregar todos los ingredientes se ajusta a pH 6.8.

#### Metales "44"

EDTA	250.00 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1095.00 mg (200 mg Zn)
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	500.00 mg (100 mg Fe)
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	154.00 mg ( 50 mg Mn)
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	39.20 mg ( 10 mg Cu)
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	24.80 mg ( 5 mg Co)
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O	17.70 mg ( 2 mg B )

Se agregan unas pocas gotas de ácido sulfúrico para retardar la precipitación.

#### MANTENIMIENTO DE LA CEPA Y SIEMBRA DE BACTERIAS

Se obtiene una colonia de *R. rubrum* que se ha cultivado en medio sólido (mantenida en caja de Petri en luz y anaerobiosis) y se deposita en un frasco vial de 20 ml de capacidad al cual previamente se le ha agregado medio de cultivo líquido, se completa al máximo de la capacidad del frasco con medio de cultivo líquido y se cierra firmemente con un tapón de rosca, se expone a la luz de un foco de 40 watts.

Cuando este inóculo comienza a desarrollar un color rosado (característico de los cultivos de *R. rubrum* en fase logarítmica) se depositan los 20 ml en un matraz nefelométrico con 250 ml de medio líquido y se deja en iluminación con un foco de 40 watts. Se monitorea el crecimiento del cultivo por medio de un fotocolorímetro Klett-Summerson (utilizando un filtro rojo) y cuando alcanza 400 unidades Klett se procede a sembrar 20 ml de este inóculo por cada litro de cultivo. Para ello se utilizan botellas Pyrex de 1 litro de capacidad de volumen, que después de ponerles el inóculo se rellenan con medio líquido tratando de dejar la menor cantidad de aire entre el nivel

del líquido y el tapón.

El crecimiento se induce iluminando las botellas con tres focos de 100 watts de cada lado (dando un total de 600 watts) y a una distancia promedio de 25 cm y mantenido la temperatura constante a 30°C. Aproximadamente a las 32 horas cuando el cultivo está en fase logarítmica tardía (aproximadamente 300 unidades Klett con filtro rojo) se procede a la cosecha.

#### **COSECHA DE BACTERIAS**

El cultivo de bacterias se centrifuga a 5 500 x g durante 10 minutos a 4°C en un rotor GS-3 Sorvall en 6 botellas de 500 ml c/u, el sobrenadante se desecha y el precipitado se resuspende en el mismo volumen con Tris-HCl 10 mM a pH 8.0 y se centrifuga nuevamente. Este procedimiento se repite durante tres veces. La pastilla final se pesa para obtener el rendimiento en peso húmedo por litro y se guardan en un refrigerador en caso de ser utilizados al día siguiente, si no se pueden almacenar hasta por varios meses en un ultracongelador a -70°C.

#### **Obtención de Cromatóforos**

Se obtienen por el método descrito por Z. Gromet-Elhanan y D. Khananshvili (1986) con ligeras modificaciones.

a) Se resuspenden 8 g de bacterias peso húmedo en un volumen final de 50 ml con amortiguador TS (Tricina-NaOH 50 mM pH 8.0, Sacarosa 250 mM) con MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DNAasa 10 µg/ml y PMSF 1 mM. Esta solución se incuba durante 20 min en agitación constante a 4°C.

b) Se somete la suspensión anterior a ruptura de células en una prensa de French a una presión de 1200 psi y un flujo aproximado de 20 ml por minuto a 4°C.

c) Se centrifuga a 20 000 x g durante 20 minutos en un rotor SS-34 Sorvall, para separar a las células que no se rompieron y que quedan en la pastilla.

d) El sobrenadante del paso anterior se centrifuga a 120 000 x g por 90 min a 4°C y se descarta el sobrenadante.

e) El precipitado se resuspende al volumen original con Amortiguador TS con EDTA 0.5 mM y se centrifuga de igual forma.

f) Se repite el proceso anterior 2 veces, dando un total de 3 lavados a los cromatóforos, este procedimiento reduce la proporción proteína/bacterioclorofila final, lo que significa la eliminación de toda la proteína que no es del cromatóforo.

g) Tras de descartar el sobrenadante de la última centrifugada se resuspende en el mínimo volumen posible de alguno de los amortiguadores que se indican a continuación, dependiendo para lo que se vayan a utilizar los cromatóforos.

**Amortiguador para preparación de RF<sub>1</sub>:**

Glicilglicina-NaOH 200 mM pH 7.4 y glicerol 30%

**Amortiguador si los cromatóforos se utilizan para estudios de generación de potencial de membrana por bombeo de H<sup>+</sup>.**

Hepes-KOH 200 mM pH 8.0

KCl 100 mM

glicerol 30%

**Amortiguador para medir actividad de hidrólisis de ATP.**

Tris-Acetato 25 mM pH 8.0

### **Purificación del sector RF<sub>1</sub> de la ATPsintetasa de *Rhodospirillum rubrum***

El método de purificación empleado se basó según lo reportado por B. Norling y colaboradores (1988) con algunas modificaciones (Maldonado y Dreyfus, 1993,1994). Se inicia con cromatóforos preparados el día anterior.

a) 6 ml de cromatóforos a una concentración de 50 mg proteína/ml o bacterioclorofila 2mM (que equivalen a 300 mg de proteína de cromatóforo o 10 mg de bacterioclorofila) en amortiguador Glicilglicina 200 mM (pH 7.5), se mezclan con 24 ml de Etilenglicol 25%, EDTA 0.2 mM (pH 7.5), y se incuba por 5 minutos a 37°C.

b) Los 30 ml de volumen se reparten en 12 alícuotas de 2.5 ml c/u en tubos a los que previamente se les ha adicionado 50 µl de cloroformo.

c) Se agitan fuertemente en vortex durante 20 segundos.

d) Se centrifuga por 4 min en una centrífuga clínica y se recupera el sobrenadante.

e) El sobrenadante se centrifuga en un rotor 50 Ti a 38 Krpm (133 500 x g) por 1 hora a 4°C.

f) El sobrenadante es translúcido y se recupera cuidadosamente con una pipeta Pasteur. Se mide el volumen (~ 23 ml) y se concentra 8 veces por una membrana de ultrafiltración AMICON YM-100.

g) 0.45 ml de este concentrado se depositan suavemente en 12 ml de un gradiente lineal de glicerol 20-50% (v/v), 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5) y 1 mM de MgCl<sub>2</sub>. Se repite la operación en cada uno de los 5 tubos restantes para el rotor SW-40 (ultra-claros de 14 X 95 mm BECKMAN). Se centrifuga durante 18 horas a una velocidad de 35 000 rpm, a 4°C.

h) El gradiente se colecta en fracciones de 1 ml por medio de un colector de gradientes (Auto densi-flow) y las fracciones picos de proteína con actividad de hidrólisis de ATP-Ca<sup>2+</sup> se someten al siguiente paso.

i) Las fracciones activas se precipitan con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 65% y se incuban por 30 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugan a 15 000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se decanta el sobrenadante y la pastilla resultante se resuspende en 0.1 ml del amortiguador Tricina-NaOH 50 mM pH 8.0, ATP 2 mM y metanol 5%. Después se dializa por 12 horas contra el mismo amortiguador.

j) El extracto resultante de la diálisis (aproximadamente 1.5 mg de proteína) se somete a una cromatografía de exclusión por peso molecular utilizando la resina Bio-Gel A 0.5 m (10-500 Kda BIORAD) en una columna de 1.5 X 50 cm (BIORAD) que previamente se ha equilibrado con 3 volúmenes de Tricina-NaOH 50 mM pH 8.0, ATP 2 mM y metanol 5%.

Se eluye a un flujo de 0.3 ml/min con el mismo amortiguador, el RF<sub>1</sub> eluye en

las fracciones 15 a 19 que corresponden al volumen de elución de 30 a 38 ml.

k) Estas fracciones activas se concentran por ultrafiltración por centrifugación con un CENTRICON-30 (30 kilodaltons, tamaño del poro de exclusión).

### **Filtración de RF<sub>1</sub> por columnas de sephadex G-50**

Con el fin de tener una preparación libre de nucleótidos y cationes divalentes, a excepción de los fuertemente unidos al complejo RF<sub>1</sub>, este se sometió a una filtración por Sephadex G-50 en jeringas de insulina (1 ml) previamente equilibradas con Tris-HCl 10 mM pH 7.5, Sacarosa 150 mM y Glicerol 7.5%, en las cuales se colocaron aproximadamente 100 µg de RF<sub>1</sub> (siempre un volumen de 100 µl) y se centrifugó por 1 minuto a 3000 rpm.

Con este método (Penefsky, 1977) se recupera el 85-90% de la proteína inicial.

### **Determinación de la cantidad y concentración de Proteína**

Se utilizó el método del BCA (ácido bicinconfínico) descrito por Smith y colaboradores (1985).

#### **Solución A:**

bicinconinato de sodio (BCA)	1 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 g
Tartrato de sodio	0.16 g
NaOH	0.4 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.95 g
H <sub>2</sub> O desionizada	c.b.p. 100 ml

#### **Solución B:**

CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.4 g
H <sub>2</sub> O desionizada	c.b.p. 10 ml

Se mezclan 100 volúmenes de la solución A con 2 volúmenes de la solución B.

Se agregan de 2 a 50  $\mu$ l de la solución problema y se completa con H<sub>2</sub>O desionizada a un volumen de 0.5 ml. Posteriormente se añaden 500  $\mu$ l de la mezcla anterior (100 A + 2 B) y se incuba durante 30 minutos a 37°C. Se lee la absorbancia a 562 nm y se extrapola contra una curva patrón de 4 a 24  $\mu$ g de Albúmina de Bovino.

### **Determinación de la cantidad y concentración de Bacterioclorofila.**

Se empleó el método reportado por Cohen-Bazire y colaboradores (1967).

- a) 10-50  $\mu$ l de cromatóforos se agregan a 3 ml de acetona-metanol 7:2 (v/v) (calcular la dilución).
- b) Agitar en vortex algunos segundos.
- c) Centrifugar por 5 minutos a 3 000 rpm a temperatura ambiente.
- d) Leer el sobrenadante a 700 nm de longitud de onda, contra un blanco de acetona-metanol 7:2 se asume un coeficiente de extinción molar  $\epsilon_{770nm}$  de 75 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.
- e) La concentración se calcula con la siguiente fórmula:

(Densidad óptica) (Dilución) (0.893)

----- = mg Bchl/ml

75

### **Determinación de la actividad ATPasa**

Las actividades de hidrólisis tanto de ATP-Mg<sup>2+</sup> como de ATP-Ca<sup>2+</sup>, se realizaron a 30°C en un medio de reacción que contiene, en concentraciones finales: Tris-Ac 25 mM pH 8.0, KOOCH<sub>3</sub> 30 mM, ATP 3 mM y (MgCl<sub>2</sub> 3 mM) o (CaCl<sub>2</sub> 3 mM). El volumen de reacción fue de 0.1 ml final y la reacción se detuvo a los tiempos indicados con el reactivo con que se determina la cantidad de fosfato liberado.

La determinación de fosfato liberado se realizó por el método de Lanzetta (1979) que consiste en agregar 1.6 ml de reactivo de Lanzetta (Hidrocloruro de verde de malaquita 0.045% y Molibdato de amonio 4.2% en HCl 4N en una relación 3 a 1) a

la mezcla de reacción y 30 seg después se agregan 0.2 ml de Citrato de Sodio 34%. Después de incubar 30 min a temperatura ambiente, el fosfato orgánico liberado se cuantificó, intrapolando los valores de densidad óptica ( $\lambda$  660 nm) a una curva de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Cuando se añadió algún componente extra en el medio de reacción se verificó que éste (en diversas concentraciones) no tuviese efecto sobre el sistema de determinación de fosfato, por medio de curvas de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a distintas concentraciones.

Algunas veces se determinó la actividad de hidrólisis del  $\text{ATP-Mg}^{2+}$  por medio de acoplar la actividad ATPasa a la oxido-reducción de NADH a NAD seguida en un espectrofotómetro a  $\lambda = 340$  nm. en presencia de un sistema regenerador de ATP (Pullman et al., 1960). El medio de reacción contiene Tris- $\text{SO}_4$  50 mM pH 7.8, Sacarosa 50 mM, KCl 30 mM,  $\text{MgCl}_2$  3mM, ATP 3 mM, EGTA 1mM, Fosfoenol-Piruvato 0.34 mg/ml, Piruvato Kinasa 32  $\mu\text{g/ml}$ , Deshidrogenasa Láctica 13  $\mu\text{g/ml}$  y NADH 0.147 mg/ml.

En todas las determinaciones de actividad de hidrólisis para  $\text{ATP-Mg}^{2+}$  se incluyó un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM EGTA-NaOH pH 8.0) tal como lo describen Montero-Lomelí y colaboradores (1989). Para el caso de las actividades de ATPasa utilizando como sustrato  $\text{ATP-Ca}^{2+}$ , se adicionó un quelante de  $\text{Mg}^{2+}$  (0.2 mM de CDTA-NaOH pH 8.0) según Vercesi y colaboradores (1990).

### **Determinación del bombeo de Protones ( $\text{H}^+$ ) en cromatóforos por apagamiento de flouescencia**

El apagamiento de la flouescencia de anaranjado de acridina se siguió como índice de la generación de un  $\Delta\text{pH}$  en cromatóforos ocasionado por el bombeo de protones ( $\text{H}^+$ ) de la ATPsintetasa (Perlin et al., 1984a).

Los cromatóforos (250  $\mu\text{g}$  protefna) se incubaron en una cubeta de flouescencia que contenía 2 ml de medio de reacción (KCl 100 mM, HEPES-KOH 20 mM pH 8.0 y anaranjado de acridina 2  $\mu\text{M}$ ) a 30°C y con agitación constante. La reacción se inició al agregar el sustrato. La flouescencia relativa se monitoreó en un

espectrofluorómetro utilizando longitudes de onda de emisión y excitación de 430 y 600 nm respectivamente. La integridad de los cromatóforos se comprobó induciendo el bombeo de protones de la Pirofosfatasa membranar (Strid et al., 1986).

### **Determinación de Cisteínas totales y expuestas**

El número de Cisteínas de la  $F_1$ -ATPasa de *R. rubrum*, tanto totales como expuestas, se determinó por medio del Reactivo de Ellman o DTNB ( 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato) ) (Habeb, 1972 y Riddles et al., 1983) el cual ha demostrado excelentes propiedades de solubilidad en agua, efectividad al emplearse a valores de pH neutros, alta especificidad, reactividad y sensibilidad.

El DTNB es un disulfuro aromático que oxida grupos tioles por medio de una reacción en la que se forma un puente disulfuro entre la cisteína reactante de la proteína y 1 mol de 2-nitro-5-tiobenzoato, este último se produce junto con la liberación del anión  $TNB^{2-}$  (2-nitro-5-tiobenzoato). Cuando esta reacción ocurre se forma 1 mol de  $TNB^{2-}$  por mol de cisteína reactante, este anión posee un intenso color amarillo con un coeficiente de extinción molar de  $13\ 600\ M^{-1}cm^{-1}$  a 412 nm (Habeb, 1972) (el reactivo comercial repurificado tiene un  $\epsilon$  de  $14\ 150\ M^{-1}cm^{-1}$  Riddles et al., 1983), una solución de 0.01  $\mu$ mol de cisteína por ml da una absorbancia de 0.136 (1 cm de paso de luz), la reacción se completa en 2 minutos y el color es estable por dos horas a un pH entre 7 y 8.

Los ensayos de  $F_1$ -ATPasa de *R. rubrum* se realizaron en microcubetas de cuarzo y en un volumen de 150  $\mu$ l, con 36  $\mu$ g de proteína (0.093 nanomoles de  $RF_1$ ) en amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M (pH 8.0), EDTA 2 mM, SDS 2%, DTNB 0.3 mM; para la determinación de cisteínas totales (Habeb, 1972) y con amortiguador de Tris-HCl 10 o 50 mM pH 8.0 para las determinación de cisteínas reactivas y con las concentraciones de sustratos indicadas en los pies de figura. La desnaturalización parcial con Guanidina-HCl 0.3 M se realizó en el mismo amortiguador de Tris. Se monitorearon los cambios de absorbancia a 412 nm a intervalos regulares (indicados en los pies de figura) en un espectrofotómetro modelo

SHIMADZU, a todas las determinaciones se les resta un blanco con todos los componentes excepto la proteína.

Cuando se ensayó el número de cisteínas reactivas en la enzima con su sustrato, este se adicionó a la enzima 3 minutos antes que el marcador de cisteínas.

Se hicieron barridos espectroscópicos para verificar el pico de absorbancia a 412nm y para cada condición se probó la determinación de una cantidad de cisteína conocida dando determinaciones con errores nunca mayores al 1.5%.

Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

### **Electroforésis de Proteínas**

Para determinar el grado de pureza de la  $RF_1$ -ATPasa en los sucesivos pasos de purificación se hicieron geles de Poliacrilamida al 10% se utilizaron geles Dodecilsulfato de Sodio-Poliacrilamida (Laemmli, 1970) para observar rápidamente la pureza de las fracciones ( $\approx$  1.45 hrs con tinción por Nitrato de Plata) y Geles Tricina-Dodecilsulfato de Sodio-Poliacrilamida (Schagger y Von Jagow, 1987) para determinar pesos moleculares, ( $\approx$  5 hrs con tinción de plata), resuelven mejor las bandas entre 10 y 100 Kd (rango donde caen las subunidades de la  $F_1$ -ATPasa). Como marcadores de peso molecular se utilizaron: fosforilasa b (97 400 kd), albúmina sérica de bovino (66 200 kd), ovoalbúmina (45 000), anhidrasa carbónica (31 000), inhibidor de tripsina de soya (21 500) y lisozima (14 400).

Las tinciones se realizaron con Nitrato de Plata (Aizawa, 1993) o con azul de Coomassie tal como lo describen Dabbeni-Sala y colaboradores (1989).

### **Otros procedimientos**

Se consideró un peso molecular para la  $F_1$ -ATPasa de 383 921 kd en todos los cálculos. Así mismo se consideraron los siguientes pesos moleculares para las subunidades de la  $F_1$ -ATPasa:  $\alpha$  55 026,  $\beta$  50 852,  $\gamma$  32 437,  $\delta$  19 543 y  $\epsilon$  14 307 (Falk et al., 1985).

## RESULTADOS

### Crecimiento de *Rhodospirillum rubrum*

Las bacterias púrpuras no-sulfurosas responden a los cambios de intensidad luminosa con una variedad de adaptaciones, tanto en el aparato fotosintético como en la membrana que lo alberga. En *Rb. capsulatus* se ha descrito que la cantidad de  $F_0F_1$ -ATPasa por cromatóforo aumenta con respecto a la de las bacterias que se desarrollan expuestas a menores intensidades luminosas (Riedl et al., 1963; 1965), es decir que en cultivos desarrollados en presencia de altas intensidades luminosas, por cada bacteria (aunque hay menos cromatóforos) cada cromatóforo tiene más  $H^+$ -ATPasas.

En *R. rubrum*, hasta donde sabemos, no se han llevado a cabo este tipo de estudios, por lo cual se procedió a encontrar la intensidad luminosa que lograrse inducir la mayor cantidad de  $H^+$ -ATPasas por cromatóforo, ya que un objetivo posterior planteaba la purificación del sector  $F_1$ -ATPasa a partir de los cromatóforos.

Se diseñó un dispositivo (Fig. 4) que permitiese el desarrollo de cultivos fotoheterotróficos en anaerobiosis, crecidos en dos condiciones de intensidad luminosa; baja (2 focos de 40 watts %) y alta (6 focos de 100 watts %). Con el fin de mantener la temperatura constante, los cultivos se colocaron en una pecera de cristal llena de agua (Fig. 4), que puede albergar 9 botellas de 1 litro %. La temperatura se controló con un ventilador fijo a una altura de 1 metro dirigido sobre la pecera, con el flujo de aire se mantiene la temperatura a  $30^{\circ}C^{±2}$ . Los cultivos (9 botellas de 1 l %) se iniciaron inoculando 10 ml de cultivos en fase logarítmica tardía, las botellas se sellaron con un tapón de hule y se colocaron dentro de la pecera, con el agua previamente templada a  $30^{\circ}C$ , los focos se colocaron a una distancia de 25 cm, y a una altura de 14 cm (Fig. 4). Para la condición de baja luz, se colocó un foco de 40 watts en cada lado de la pecera, y para el cultivo en altas intensidades luminosas, se emplearon 3 focos de 100 watts %, en cada lado de la pecera (Fig. 4). En dos de las 9 botellas se colocaron, mangueras conectadas a tubos que permitiesen la lectura de

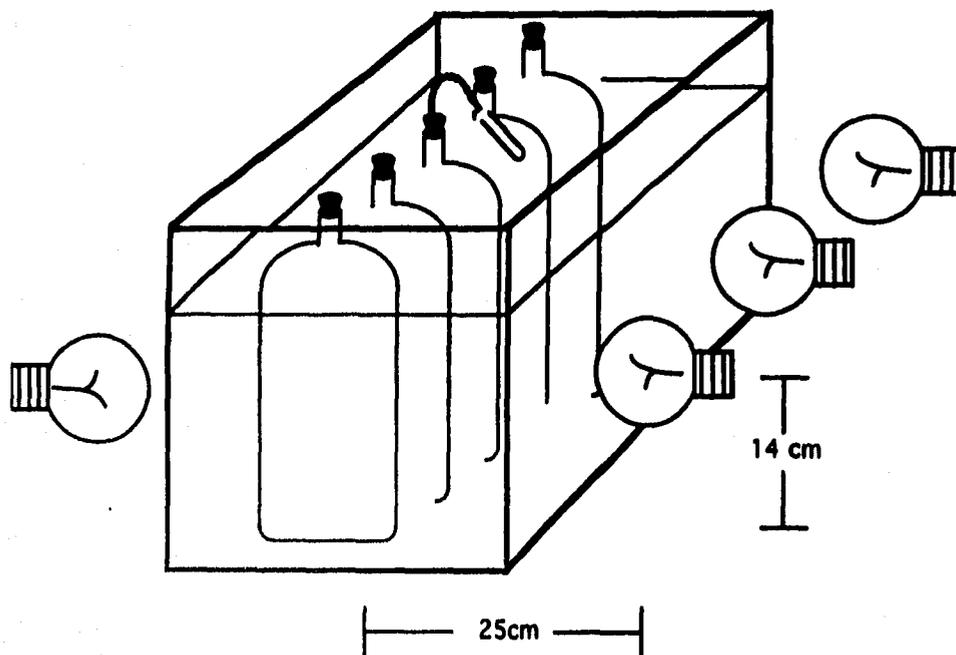


Figura 4.- Sistema empleado para el cultivo fotoheterotrófico de *Rhodospirillum rubrum* en distintas condiciones de intensidad luminosa. Las botellas de 1 l de capacidad se colocaron en una pesera de cristal llena con agua, la temperatura se mantuvo constante por medio de flujo continuo de aire. Para la condición de baja luz se emplearon 2 focos de 40 watts, 1 de cada lado, y en las condiciones de alta luz, se colocaron 3 focos de 100 watts c/u en cada lado.

turbidez, en un lector de *unidades klett* con filtro rojo, como referencia del tiempo de las fases de desarrollo del cultivo.

Se obtuvo la curva de crecimiento del cultivo, para cada condición. Como se muestra en la figura 5, los cultivos de *R. rubrum* crecidos en alta luz se desarrollan en la mitad del tiempo, de lo que le toma a los cultivos de baja luz, mismos que alcanzan la fase estacionaria a una mayor turbidez. El rendimiento con los cultivos de luz baja es menor (3.5 g de peso húmedo/l) a los obtenidos con cultivos en alta luz (5 g de peso húmedo/l), aún cuando los cultivos se cosechan en la misma fase de crecimiento (mismas unidades klett), lo que puede explicarse por una diferente composición intracitoplásmica (Drews, 1986).

Los cromatóforos obtenidos muestran una composición distinta en cuanto a la relación proteína:bacterioclorofila, los de baja luz tienen la mitad (14:1) que los de alta luz (30:1), esto concuerda con lo reportado en la literatura (Holt y Marr, 1965b, Drews, 1986). Para saber, si en los cromatóforos de bacterias cultivadas en altas intensidades luminosas, hay más  $F_0F_1$ -ATPasas se realizaron los siguientes experimentos. El primero de ellos se muestra en la figura 6a. y consistió en determinar la actividad de hidrólisis de ATP con respecto a la proteína total del cromatóforo en un curso temporal de 25 min (Fig. 6a), la actividad específica (en  $\text{nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) para la condición alta luz es de 73 y para la condición de luz baja es de 30.

La segunda evidencia de que los cromatóforos de alta luz tienen más actividad de ATPasa que los de baja luz (Fig. 6b) provino de determinar espectrofluorométricamente la capacidad de bombeo de las ATPasas en ambos tipos de cromatóforos, para ello se monitoreó la acidificación de las vesículas o cromatóforos por medio del apagamiento de la fluorescencia del fluoróforo anaranjado de acridina. Como se muestra en la figura 6b, para la misma cantidad de proteína de cromatóforos, la velocidad de bombeo de  $H^+$  como respuesta a la adición de 4 mM de  $ATP-Mg^{++}$ , es mayor en los cromatóforos de bacterias desarrolladas en alta luz, que en aquellas vesículas provenientes de bacterias desarrolladas con menores intensidades luminosas.

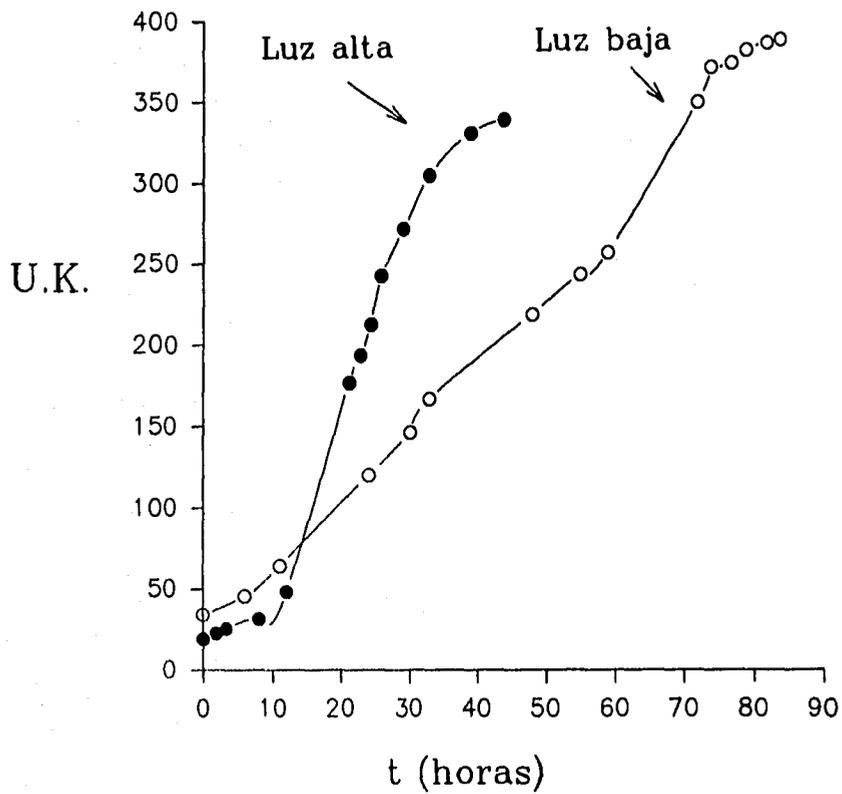


Figura 5.- Crecimiento fotoheterotrófico anaerobio de *R. rubrum* a dos intensidades luminosas. Se muestran las curvas de crecimiento de dos cultivos de *R. rubrum* en condiciones de alta y baja intensidad luminosa. Las lecturas de turbidez se tomaron con un lector Summerson Klett con filtro rojo. Los cultivos se realizaron como se indica en la sección de Material y Métodos.

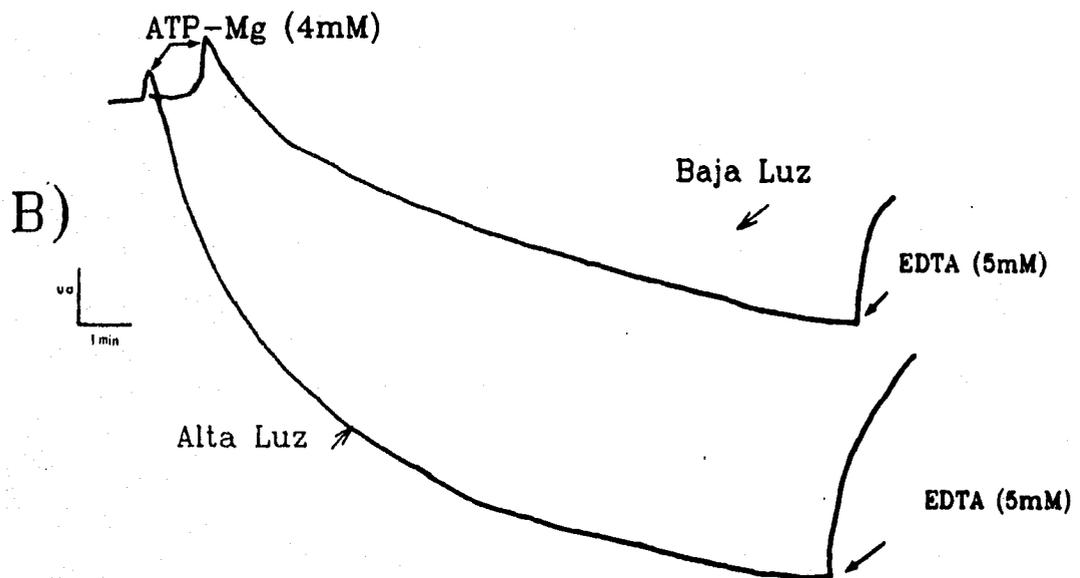
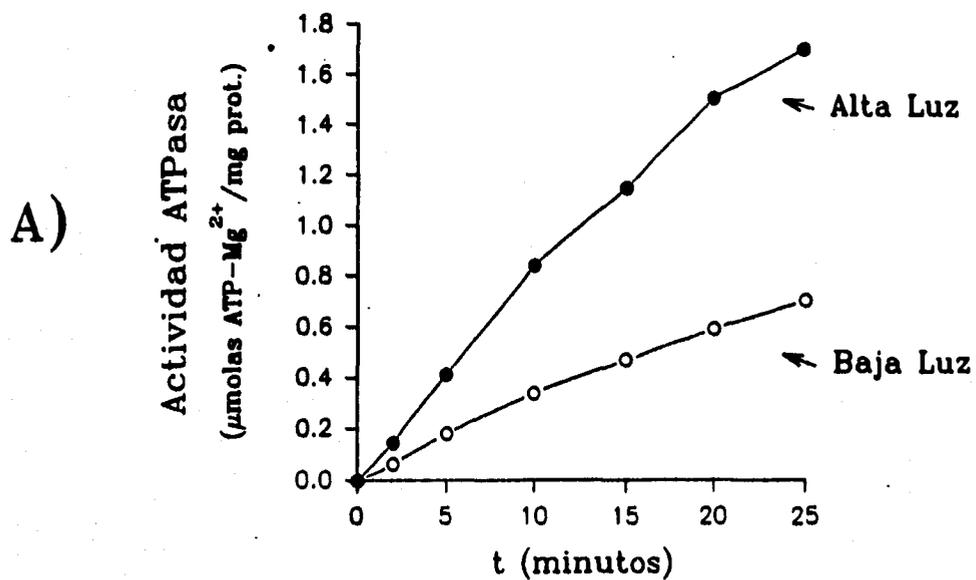


Figura 6.- A) Se comparan dos cursos temporales de la actividad hidrolítica de  $ATP \cdot Mg'$  de la ATPasa en cromatóforos provenientes de bacterias crecidas en dos condiciones distintas de intensidad luminosa. B) Apagamiento de fluorescencia de *anaranjado de acridina* como índice de la generación de potenciales electroquímicos en cromatóforos de *R. rubrum* de dos intensidades de luz. El gradiente fue generado por la ATP sintetasa al hidrolizar  $ATP \cdot Mg'$ , ya que al eliminar el sustrato (quelando al  $Mg'$  con EDTA 5mM) se detiene el bombeo de protones.

## **Purificación del sector $F_1$ de la ATP sintetasa de *Rhodospirillum rubrum***

Para la obtención del sector  $F_1$  de la ATPsintetasa de *R. rubrum* ( $RF_1$ ) se emplearon los cromatóforos de los cultivos de altas intensidades luminosas. Para ello se implementó el método descrito por Norling y colaboradores (1988) que es una modificación del método descrito por Fisher y colaboradores (1981) para la ATPasa de hígado de rata. El protocolo se desglosa en la figura 7 y consiste en la extracción con cloroformo de proteínas periféricas a la membrana de los cromatóforos (1  $\mu$ l/0.5 mg prot.) a los que previamente se les ha verificado su integridad morfológica y funcional (Fig 6, 11 y 12). La extracción se lleva a cabo tras de incubarlos por 5 min a 37°C en presencia de etilenglicol, para después separar las membranas por medio de ultracentrifugación, el sobrenadante se concentra 8 veces por ultrafiltración, para después someterse a un gradiente lineal de glicerol. De éste último paso se obtienen 12 fracciones a las cuales se les determinó la concentración de proteína, así como la actividad de hidrólisis para ATP-Ca<sup>++</sup>, tal como se observa en la figura 8a; las fracciones 3 y 4 muestran la mayor actividad ATPasa dependiente de Ca<sup>++</sup> y son de las que más proteína se obtiene. Por otra parte la electroforésis en geles desnaturizantes de poliacrilamida 10%, demostró que dichas fracciones son las únicas donde se encuentra el complejo  $RF_1$  íntegro, por su parte las fracciones 5-9 presentan a un oligómero  $F_1$  muy probablemente incompleto ya que tienen muy poca actividad.

Las fracciones 3 y 4 se precipitaron con sulfato de amonio al 65% de saturación a 4°C, para posteriormente dializarse por 12 horas, contra Tricina-NaOH 50 mM a pH 8.0, ATP 2 mM y metanol 5%.

El extracto obtenido hasta este paso se sometió a una cromatografía de exclusión por peso molecular (Fig 9). De las 50 fracciones analizadas, las fracciones 14, 15 y 16 contenían al sector  $F_1$  puro, esto se demostró electroforéticamente.

El rendimiento durante los distintos pasos de la marcha de purificación se muestran en la Tabla I y los patrones electroforéticos de los mismos en la figura 10.

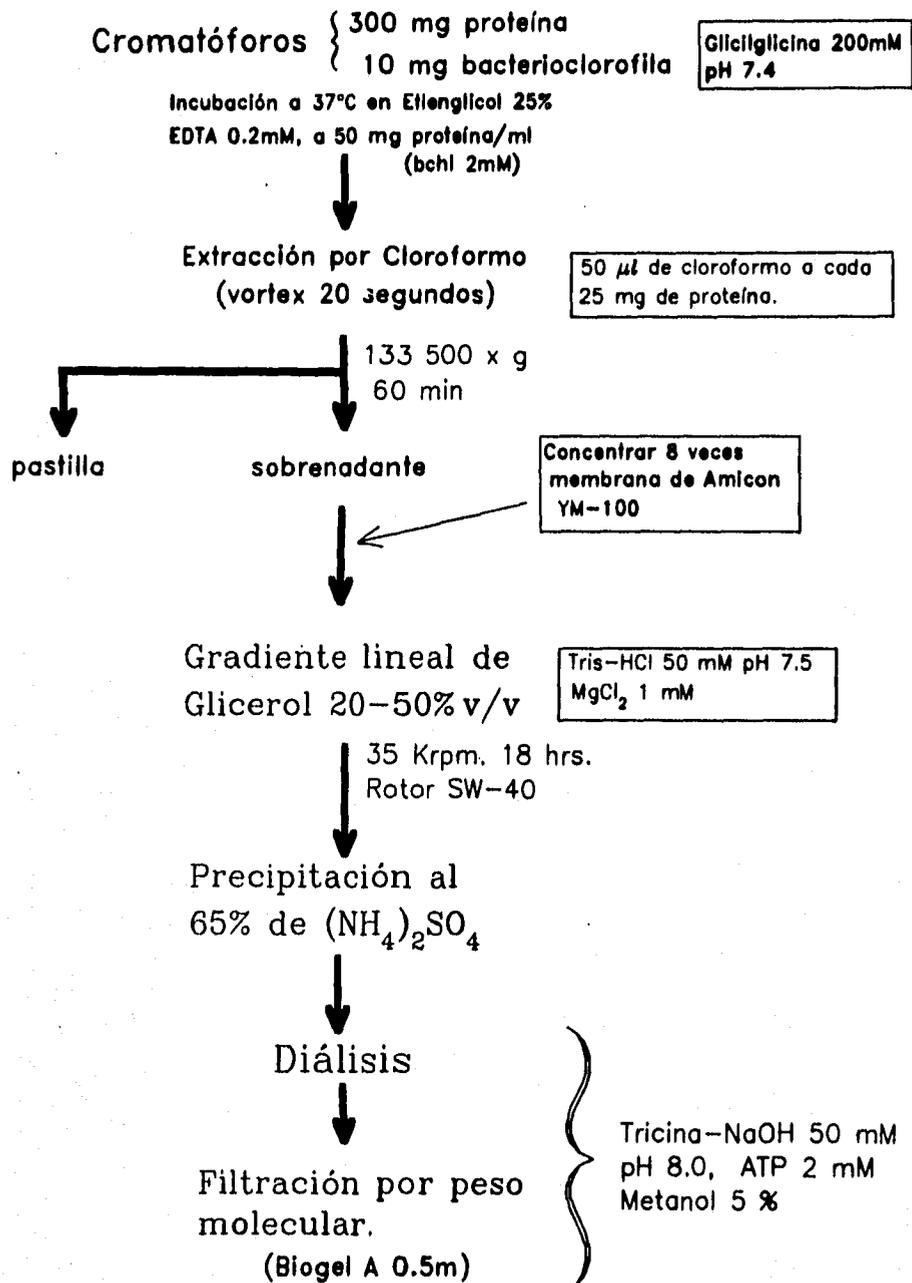
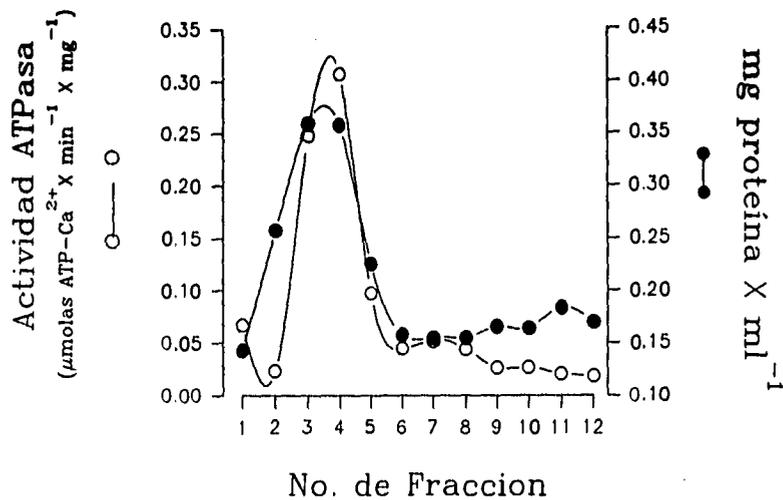


Figura 7.- Diagrama de flujo para la extracción y marcha de purificación del sector F<sub>1</sub> de la ATPsintetasa de *R. rubrum*. Los detalles se especifican en la sección de Material y Métodos.

A)



B)

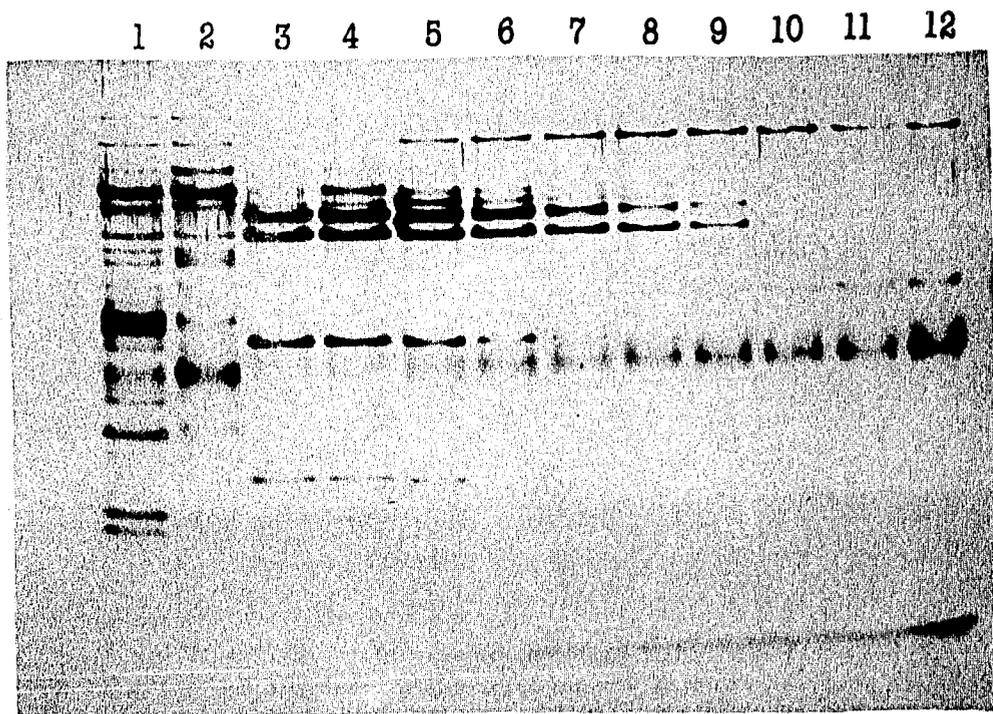


Figura 8.- A) Perfil de la actividad hidrolítica ATP-Ca<sup>2+</sup> (○—○) y concentración de proteína (●—●) de las 12 fracciones obtenidas del gradiente de glicerol (20-50%). La mayor actividad se obtiene en las fracciones 3 y 4. B) Gel desnaturalizante de poliácridamida 10%, 1.5 mm de espesor, teñido con Nitrato de Plata, en donde se observa el patrón electroforético de las 12 fracciones del mismo gradiente de glicerol. En cada carril se colocaron 7 μg de proteína; el carril 1 corresponde a la fracción 1 y así sucesivamente. Las fracciones 3, 4 y 5 presentan al sector R<sub>F</sub> de la ATP sintetasa.

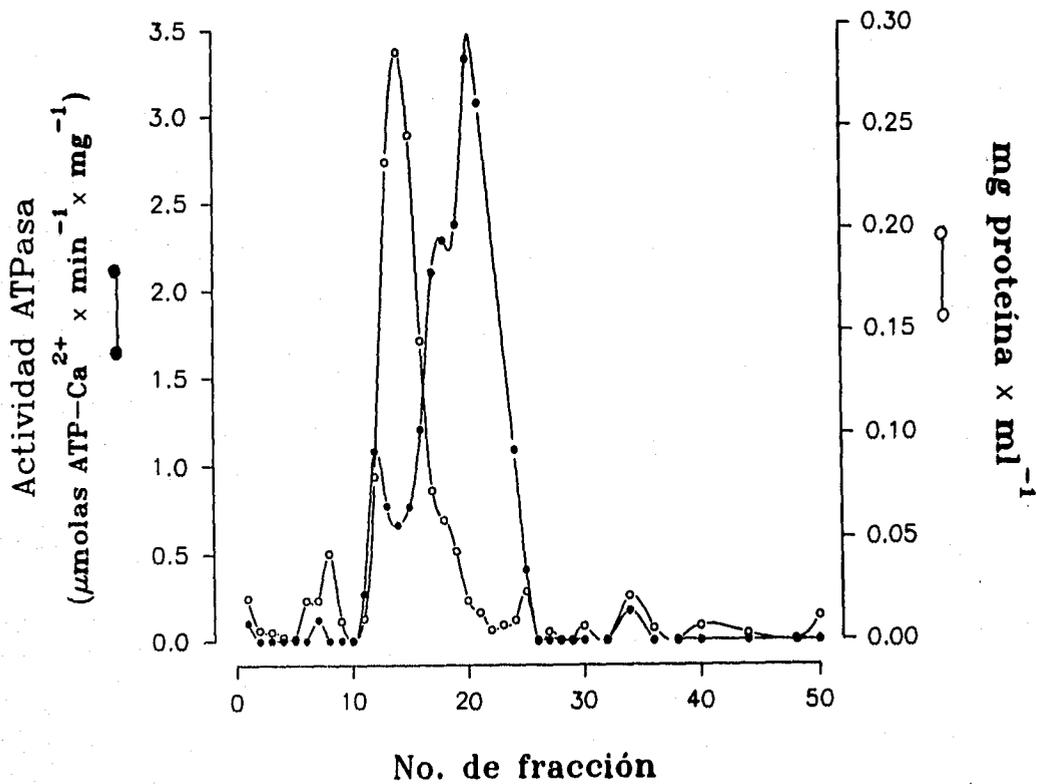


Figura 9.- Perfil de elución de la columna de Filtración por peso molecular. Se observa el perfil de actividad hidrolítica de ATP-Ca<sup>2+</sup> (●—●) y el de concentración de proteína (○—○) de las 50 fracciones obtenidas de la columna de filtración molecular (Biogel A 0.5m) con un límite de exclusión de 10-500 kda. Por medio de electrofóresis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida se determinó que las fracciones 14, 15 y 16 contenían el F<sub>1</sub> puro.

## Tabla I

Tabla de los rendimientos obtenidos durante los sucesivos pasos de purificación de la  $F_1$ -ATPasa de *R. rubrum*.

	Proteína (mg)	Rendimiento (%)	Actividad ATPasa	
			ATP-Ca <sup>2+</sup> ( $\mu\text{molas} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ )	ATP-Mg <sup>2+</sup> ( $\mu\text{molas} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ )
Cromatóforos	300	100	0.011 0.03 (con CCCP)	0.072 0.18
Extracto de Cloroformo	12.3	4.1	0.22	0.03
Fración activa del Gradiente de Glicerol	4.3	1.4	0.27	0.09
Concentrada por precipitación salina	2.3	0.76	0.29	0.1
Fración activa de Filtración por peso molecular	1	0.33	4.8	0.4

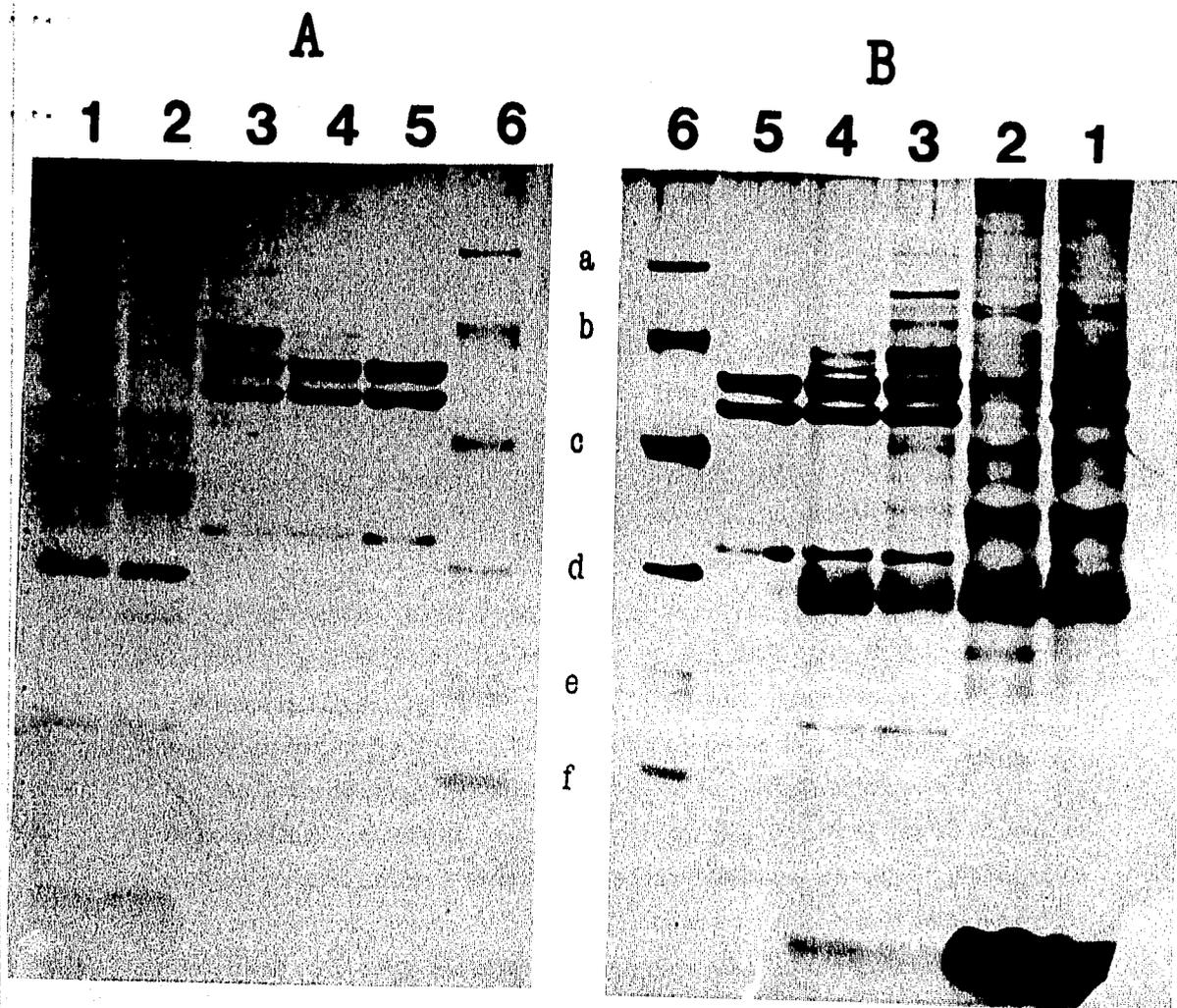


Figura 10.- Electroforésis en geles desnaturalizantes de tricina-dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida 10% de 1.5 mm de espesor, de los sucesivos pasos de purificación del RF. A y B son el mismo gel pero teñidos con Azul de Coomasie (lado izquierdo) y por Nitrato de Plata (lado derecho). Carriles 1. 14.1 µg de cromatóforos. 2. 12.2 µg de cromatóforos - RF. 3. 7 µg Extracto de cloroformo. 4. 7 µg Fracción activa del gradiente de glicerol (20-50%). 5. 7 µg de RF, eluida de la columna de filtración molecular. 6. Estándares de peso molecular a.- Fosforilasa b (97'400 kd), b.- Albumina sérica de bovino (66'200 kd), c.- Ovoalbúmina (45'000), d.- Anhidrasa carbónica (31'000), e.- Inhibidor de Tripsina de Soya (21'500) y f.- Lisosima (14'400).

Se obtuvo un complejo  $RF_1$  con un peso molecular de 396.8 kda, que muestra 12 veces más actividad hidrolítica para el sustrato  $ATP \cdot Ca^{2+}$  que para  $ATP \cdot Mg^{2+}$ , los pesos moleculares obtenidos para cada subunidad son:  $\alpha$  57.1 kda,  $\beta$  51.6 kda,  $\gamma$  35.1 kda,  $\delta$  20.2 kda y  $\epsilon$  15.4. Los pesos moleculares son muy similares a los obtenidos según la secuencia de DNA que los codifica ( $\alpha$  55 026,  $\beta$  50 852,  $\gamma$  32 437,  $\delta$  19 543 y  $\epsilon$  14 307) (Falk, 1985).

### **Determinación de cisteínas totales y expuestas**

Debido a que en la literatura se había mostrado que la hidrólisis de  $ATP \cdot Mg^{2+}$ , difiere en cuanto a su magnitud con respecto a la hidrólisis de  $ATP \cdot Ca^{2+}$  en el  $RF_1$  y en cuanto a la capacidad de bombear protones en el  $F_0F_1$ , se decidió monitorear el número de cisteínas expuestas al medio en el  $RF_1$  con ATP (con  $Mg^{2+}$  o con  $Ca^{2+}$ ), para ello se utilizó el ensayo descrito por Habeeb (1972) en el que por medio del reactivo DTNB (5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato)) se pueden marcar las cisteínas accesibles. El número total de cisteínas del complejo  $RF_1$ , de acuerdo a la secuencia de nucleótidos es de 13 (Falk et al., 1985) y su distribución se muestra en la tabla II. Esto se confirmó al determinar que el número de cisteínas del complejo purificado en este trabajo y desnaturalizado en presencia de SDS 2% (Fig 13) es de 13.1 cisteínas/mol  $RF_1$ .

Con el fin de comprobar que ninguno de los componentes añadidos durante las determinaciones (nucleótidos, cationes divalentes, etc.) interfería con el ensayo, se realizaron controles, determinando una cantidad de cisteína conocida en presencia de cada uno de los sustratos y en las concentraciones del ensayo. Los datos obtenidos se presentan en la tabla III, el componente que más afectó la determinación fue el  $CaCl_2$ , pero solo en un valor de 0.2 cisteínas menos en el ensayo con la enzima.

En la figura 14 se muestra que para la enzima  $RF_1$  sin ATP ni catión divalente ( $RF_1$ -EDTA) se marcan un número aproximado a 2 cisteínas, cuando se preincuba a la enzima con  $ATP \cdot Ca^{2+}$  son 1.7 las cisteínas marcadas, solo que para el primer caso la desnaturalización gradual posterior comienza a darse 22 minutos más tarde que para el  $RF_1$  con  $ATP \cdot Ca^{2+}$ .

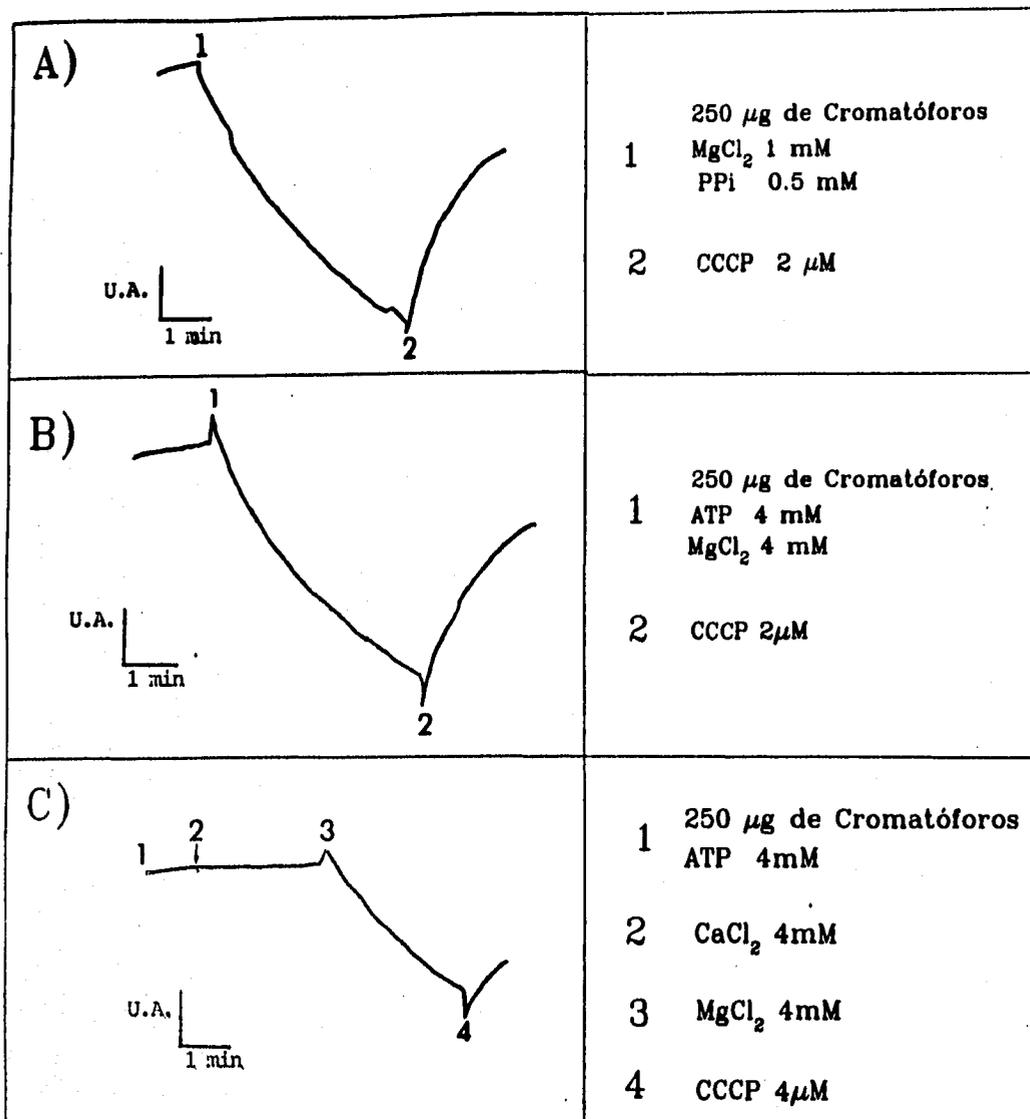


Figura 11.- Espectros de la fluorescencia del anaranjado da acridina, como indicador de la generación de potencial electroquímico en cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum* generado por la Pirofosfatasa de membrana (A) y la ATP sintetasa (B y C). A) 250  $\mu\text{g}$  de proteína de cromatóforos, utilizando como sustrato  $\text{MgCl}_2$  1 mM y PPi 0.5 mM. B) 250  $\mu\text{g}$  de prot. de cromatóforos, ATP- $\text{Mg}^{2+}$  4 mM y C) 250  $\mu\text{g}$  de prot. de cromatóforos, ATP 4 mM,  $\text{CaCl}_2$  3 mM y posteriormente  $\text{MgCl}_2$  4 mM. Obsérvase como la hidrólisis del ATP- $\text{Ca}^{2+}$  no genera al potencial que se induce con ATP- $\text{Mg}^{2+}$ . En todos los casos (A, B y C) el gradiente se disipó con el protonóforo CCCP (2  $\mu\text{M}$ ).

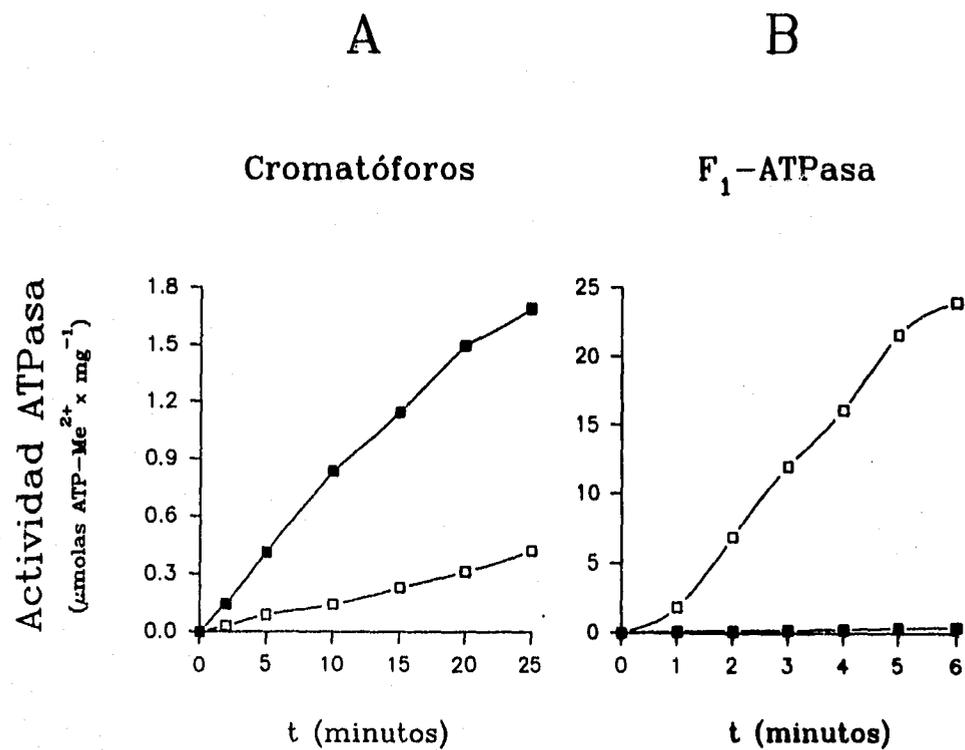


Figura 12.- Actividad hidrolítica de  $\text{ATP} \cdot \text{Mg}^{2+}$  (■—■) y de  $\text{ATP} \cdot \text{Ca}^{2+}$  (□—□) por cromatóforos de *R. rubrum* (A) y por el sector  $\text{RF}_1$ -ATPasa puro (B).

## Tabla II

Contenido de Cisteínas de la RF <sub>1</sub> -ATPasa de <i>R. rubrum</i> .		
Subunidad	Posición en <i>R. rubrum</i> .	Posición en <i>E. coli</i> .
$\alpha$	C-202	C-193
	C-252	A-243
	C-445	L-446
$\gamma$	C-91	C-88
	C-120	M-118
	C-173	L-169
$\epsilon$	C-77	V-77

Claramente es distinto el monitoreo del complejo  $RF_1\text{-ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$ ; durante los primeros 45 minutos no se observa ninguna cisteína expuesta, en este momento se presenta un proceso de desnaturalización parcial (seguido por la aparición de cisteínas) hasta los 95 minutos, de ahí y hasta donde se pudo continuar el monitoreo (180 min) solo se observaron 6 cisteínas, a diferencia del complejo sin sustrato, que a los 140 minutos ya había expuesto sus 13 cisteínas.

Con el fin de estudiar en detalle las distintas conformaciones de los complejos  $RF_1\text{-EDTA}$ ,  $RF_1\text{-ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$  y  $RF_1\text{-ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$ , parte de este estudio se enfocó en la estabilidad de los mismos, para ello se procedió a realizar exactamente el mismo ensayo, pero en presencia de un agente desnaturalizante (*hidrocloruro de guanidina*) a bajas concentraciones ( $0.3M$ ), con la intención de que actuara lentamente y permitiese monitorear la aparición gradual de cisteínas. Como se muestra en la figura 15, los complejos más lábiles resultaron ser  $RF_1\text{-ATP}\cdot\text{EDTA}$  y  $RF_1\text{-ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$  en comparación con el complejo y  $RF_1\text{-ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$ , que tuvo una resistencia a la desnaturalización por mucho mayor tiempo (170 min), a diferencia de los otros complejos  $RF_1\text{-EDTA}$  y  $RF_1\text{-ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$  que a los 111-126 minutos ya habían expuesto sus cisteínas totales.

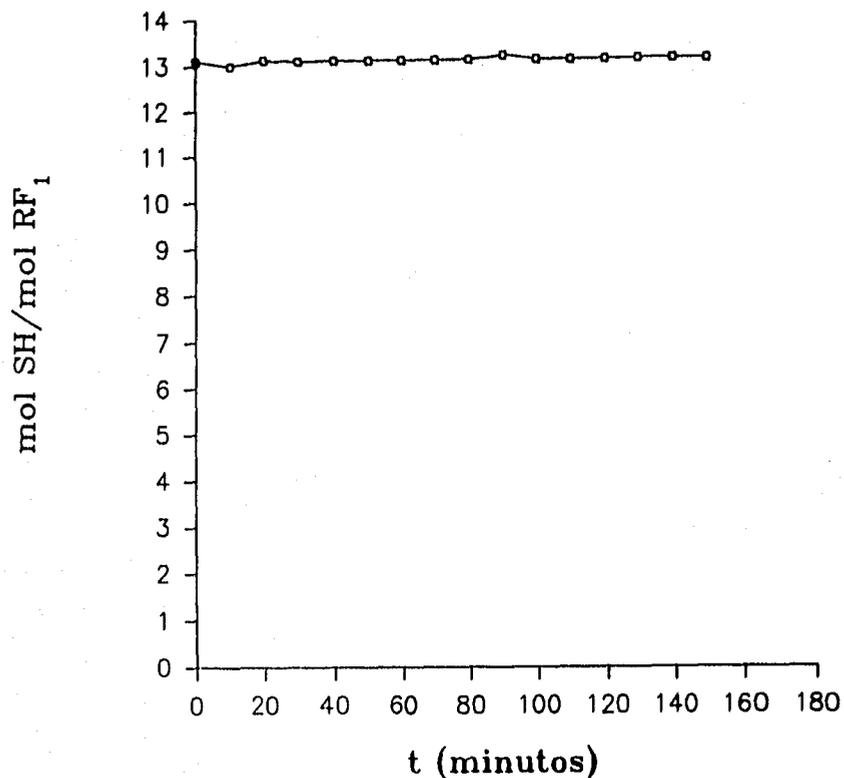


Figura 13.- Determinación por medio del reactivo *DTNB* de las cisteínas totales del sector RF<sub>1</sub>-ATPasa desnaturalizado en presencia de SDS 2%. 36 µg de RF<sub>1</sub> (0.093 nanomolas), EDTA 2 mM, SDS 2%, DTNB 0.3 mM en amortiguador de fosfatos de sodio 0.08 M pH 8.0. Volumen 125 µl. El ensayo se realizó a temperatura ambiente monitoreando la absorbancia a una  $\lambda$  de 410 nm. Se consideró un coeficiente de extinción molar de  $13\ 600\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$  y un peso molecular de 383 921 kda para el RF<sub>1</sub> en todos los calculos. La reacción se siguió durante todo el tiempo como control de la estabilidad del reactivo.

## Tabla III

Efecto de los sustratos agregados y la Guanidina-HCl, sobre el ensayo de determinación de cisteínas

Substrato	Cys-esperadas (nanomoles)	Cys-obs. (nanomoles)
MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM	3	2.95
CaCl <sub>2</sub> 2 mM	3	2.95
ATP-Mg <sup>2+</sup> 1.5 mM	3	2.86
ATP-Ca <sup>2+</sup> 2 mM	3	2.66
ATP 2 mM	3	2.97
Guanidina -HCl 0.3 M	3	2.89

El amortiguador empleado fue Tris-HCl 10 mM pH 8.0. En todos los ensayos se agregó 3 nanomoles de L-Cys (Sigma Ca.). La cantidad de cisteína se determinó por el método de Habeeb (1972) con DTNB, se siguió la absorbancia a 412 nm y se consideró un valor de 13'600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> como coeficiente de extinción molar.

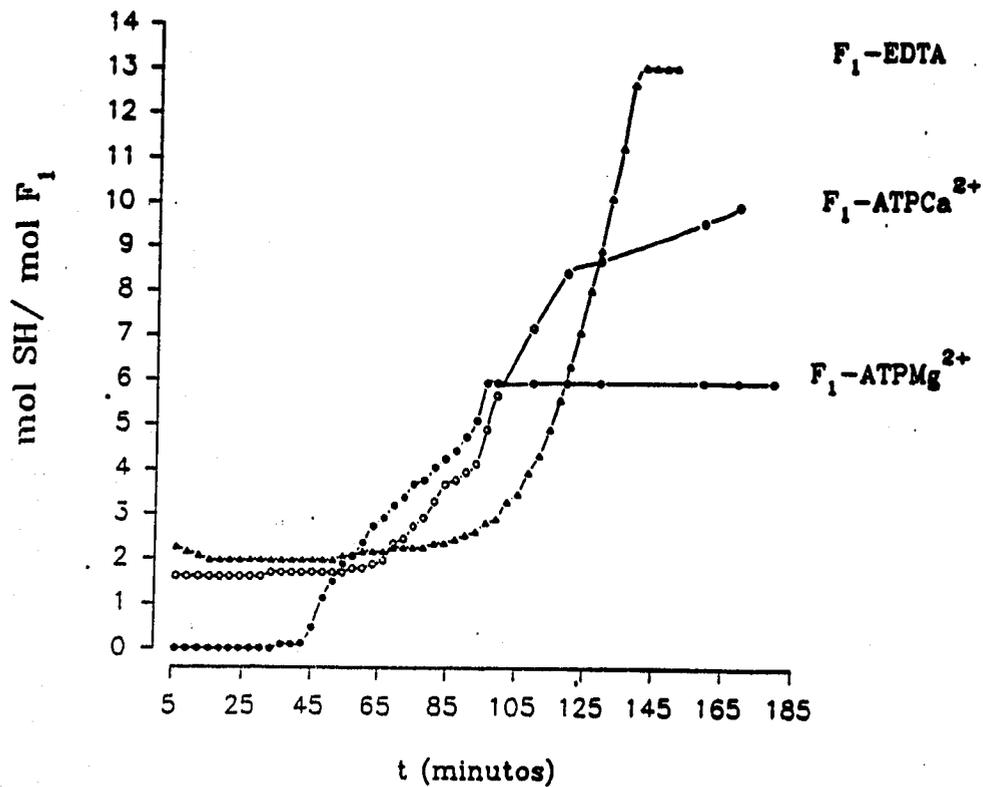


Figura 14.- Cisteínas accesibles a marcaje por *DTNB* de los complejos  $RF_1$ -EDTA ( $\Delta$ — $\Delta$ ),  $RF_1$ -ATP·Mg<sup>2+</sup> (●—●) y  $RF_1$ -ATP·Mg<sup>2+</sup> (○—○). Los ensayos se realizaron en amortiguador Tris-HCl 10mM a pH 8.0, con 36  $\mu$ g de  $RF_1$  (0.093 nanomolas), *DTNB* 0.3mM y a temperatura ambiente, la enzima se preincubó durante 3 min. con los sustratos indicados antes de añadir el *DTNB*.  $RF_1$ -EDTA. EDTA 2mM.  $RF_1$ -ATP·Mg<sup>2+</sup>. ATP 2.5mM y MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM.  $RF_1$ -ATP·Ca<sup>2+</sup>. ATP 2mM y CaCl<sub>2</sub> 2mM. Se tomó la absorbancia a una  $\lambda$  de 410 nm y se consideró un coeficiente de extinción molar de 13 600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> y un peso molecular de 383 921 kda para el  $RF_1$ , en todos los cálculos.

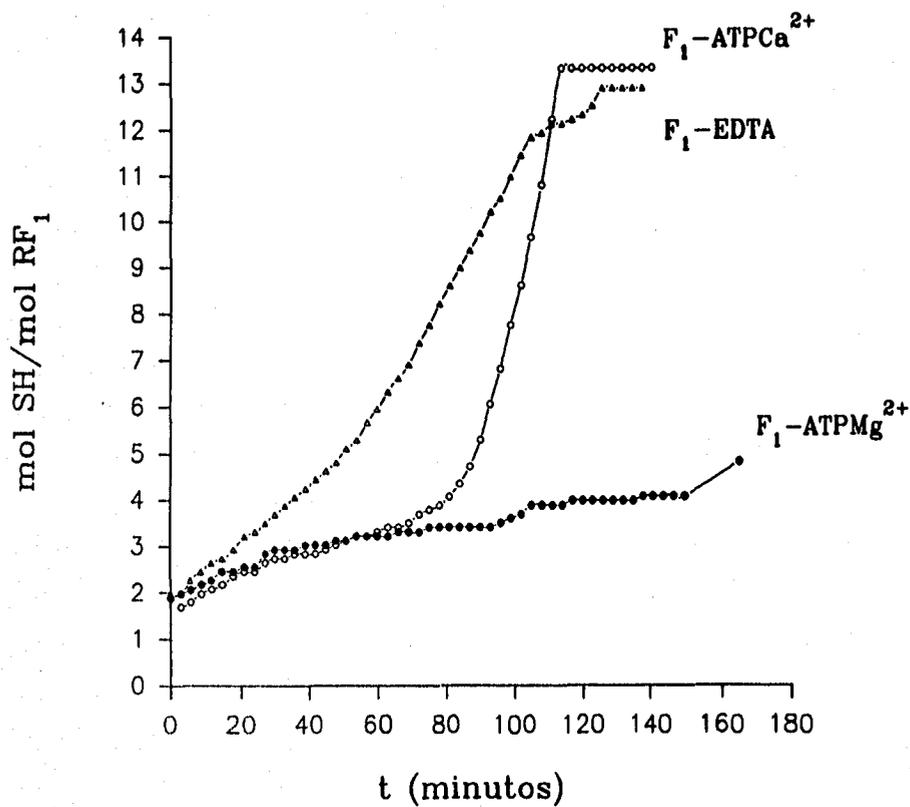


Figura 15.- Efecto de la Guanidina-HCl sobre la accesibilidad a cisteínas. Aparición gradual de cisteínas monitoreado por DTNB al someter los complejos; RF<sub>1</sub>-EDTA (▲—▲), RF<sub>1</sub>-ATP·Mg<sup>2+</sup> (●—●) y RF<sub>1</sub>-ATP·Ca<sup>2+</sup> (○—○), a desnaturalización con Guanidina-HCl 0.3 M. Los ensayos se realizaron de igual forma como se describe en la figura 14, con excepción de que la Guanidina-HCl se adicionó al final, a partir de una solución 3 M.

## DISCUSION

### Optimización de los cultivos de *Rhodospirillum rubrum*

Todos los organismos fotosintéticos se adaptan a cambios en la intensidad luminosa. En el caso de las bacterias púrpuras no-sulfurosas *Rb. capsulatus* y *Rb. sphaeroides* (Revisado por Drews, 1986 y por Kiley y Kaplan, 1988 respectivamente) la reducción de la intensidad luminosa induce de inmediato los siguientes cambios: El área de membrana intracitoplásmica se incrementa seis veces, y el número de unidades fotosintéticas (centros de reacción y pigmentos antena) aumenta 5 veces en proporción con las células cultivadas en altas intensidades luminosas, se ha sugerido que dichos cambios pueden limitar la incorporación de otros componentes como el complejo bc<sub>1</sub> y la ATPsintetasa.

Los diferentes niveles de fotofosforilación observados en los cromatóforos de estas bacterias cultivadas a diferentes intensidades luminosas, se deben a un cambio en la proporción de los componentes de la cadena de transporte de electrones con respecto a los centros de reacción. Lo que resulta, para la condición de alta luz, en un transporte de electrones y un bombeo de protones más rápido, debido a un mayor número de transportadores de electrones y de ATPasas (Riedl et al., 1983; 1985; García et al., 1987)

En el caso de *R. rubrum* no existen evidencias de que un aumento en la luz incidente sobre los cultivos, causa un aumento paralelo a la cantidad de ATPsintetasas en la membrana del cromatóforo. Sólo existe un reporte de que el pulso de crecimiento aeróbico (2-4 generaciones) de un cultivo que previamente se ha desarrollado fotoheterotrófico y anaerobio, induce un mayor número de ATPasas por cromatóforo, lo anterior fue demostrado por micrografías electrónicas de cromatóforos y por un aumento en la actividad de hidrólisis de ATP de los cromatóforos que va de 56 a 130 nmolas·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> de proteína. (Kaister y Raveed, 1981). Estos datos concuerdan con un aumento en la actividad de ATPasa de los cromatóforos que se observó en este trabajo, de 30 a 73 nmoles·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> de proteína, pero en este caso como efecto del

incremento en la luz incidente sobre los cultivos de *R. rubrum* (Fig 6a).

Sin embargo no se puede relacionar de manera directa que un incremento en la actividad de hidrólisis de ATP por los cromatóforos con un mayor número de ATPasas en éstos, ya que dicho fenómeno se puede explicar también por un aumento en la velocidad de hidrólisis y bombeo de protones de cada oligómero  $F_0F_1$  (Fig 6). En los cromatóforos de *Rb. sphaeroides* se ha observado que un aumento en la proporción proteína:fosfolípido, provoca una disminución en los niveles de hidrólisis de la ATPasa, mientras que un decremento de dicha relación, tiene el efecto contrario, es decir eleva la eficiencia de las ATPasas (Hoger et al., 1987).

Paralelo a las diferencias en las actividades hidrolíticas y el bombeo de protones entre los cromatóforos obtenidos a partir de cultivos crecidos en baja y alta luz (Fig. 6), se encontró una disminución en la cantidad del pigmento bacterioclorofila (bchl) (de 71  $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot. a 33  $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot.) con respecto a la cantidad de la proteína total del cromatóforo, ahora bien si asumimos que los cambios en la luz incidente sobre las bacterias, no alteran la cantidad de bacterioclorofila en los cromatóforos (Holt y Marr., 1965b), entonces lo que se produce, es un aumento en la concentración de proteína de cromatóforo, y ocurriría un incremento en la cantidad de ATPasa.

El aumento en la proteína del cromatóforo, induciría a su vez un incremento en la proporción proteína:fosfolípido y un posible efecto inhibitorio sobre la actividad de hidrólisis como el que se describió en los cromatóforos de *R. sphaeroides* (Hoger et al., 1987), pero en nuestro trabajo se observó un aumento de la actividad (Fig 6), lo que sugiere nuevamente el incremento de ATPasas en nuestro sistema.

Aun así es difícil afirmar que a mayor luz incidente sobre los cultivos, haya más cantidad de ATP sintetasa por cada cromatóforo, como se ha demostrado en *Rb. capsulata* y *Rb. sphaeroides*.

Existen procedimientos para determinar la cantidad de  $F_0F_1$ -ATPasa por cromatóforo (por ejemplo Norling et al., 1989), pero esto no se contempló en este estudio.

Por otra parte se confirmaron observaciones anteriores de este laboratorio (González-Pedrajo, 1993) de que un aumento en la intensidad luminosa en los cultivos de bacterias púrpuras no-sulfurosas, disminuye la cantidad de pigmentos y por tanto

facilita la purificación de otros complejos proteicos, de la membrana del cromatóforo como el complejo *bc<sub>1</sub>* (González-Pedrajo, 1993) y el sector  $F_1$  de la ATPsintetasa (este trabajo).

### **Propiedades del sector $F_1$ de *Rhodospirillum rubrum***

Se obtuvo un complejo  $RF_1$  puro del que se identificaron sus 5 subunidades, para ello se empleó un método que después de múltiples repeticiones demostró ser completamente reproducible (Norling et al., 1988), aunque el rendimiento de aproximadamente 0.33% de la proteína inicial (de cromatóforos), parece ser muy bajo (Tabla I), esto considerando un estudio en el cual se determinó que el 14% de la proteína total de cromatóforos es  $RF_1$  (Norling et al., 1989), u otro en el cual se encontró que el 2-5% de la proteína de cromatóforos de *Rb. sphaeroides* es  $F_1$  (Hoger et al., 1987).

Con respecto a la extracción con cloroformo, dicho procedimiento sí libera a la mayor parte de  $RF_1$  de las membranas, tal como se aprecia en la figura 10, si se comparan los carriles 1 (cromatóforos) y 2 (cromatóforos tratados con cloroformo) de las electroforésis de los pasos de purificación (figura 10a y 10b), se observa que después del tratamiento desaparecen de los cromatóforos 2 bandas de 51.6 y 57.1 kda que corresponden a las subunidades  $\beta$  y  $\alpha$  del  $RF_1$ . Dichos péptidos aparecen en el soluble de dicha extracción (carril 3 Fig. 10a y 10b), lo que se aprecia mejor en la tinción con Azul de Coomassie.

Por otro lado se ha reportado que el método para liberar al sector  $RF_1$  de los cromatóforos con cloroformo es una mejor alternativa que hacerlo por sonicación, ya que ésta última técnica provoca que el complejo  $RF_1$  pierda a la subunidad  $\delta$ , a diferencia de la extracción con cloroformo de la cual se obtiene un oligómero íntegro (Fig. 10a y 10b carril 5) (Muller et al., 1979).

En este trabajo el peso molecular para la subunidad  $\epsilon$  (15.4 kda Fig 10a y 10b) determinado por geles desnaturalizantes de poliacrilamida, es similar al reportado según la secuencia nucleotídica (14.3 kda), por una diferencia de 1 kda. En cambio Johansson y Baltscheffsky (1975) determinaron un peso de 7.5 kda, estas diferencias posiblemente se deben a las distintas técnicas electroforéticas empleadas (este trabajo,

Schagger y Von Jagow, 1987; en el trabajo de Johanson y Baltacheffsky se utilizó el sistema de Laemmli, 1970).

El complejo  $RF_0F_1$  en el cromatóforo se comportó de acuerdo a lo esperado en cuanto a lo reportado en la literatura. Se estableció también la integridad de los cromatóforos, ya que 2 bombas de protones (la pirofosfatasa membranal y la  $H^+$ -ATP sintetasa) mostraron ser capaces de generar un gradiente de pH, determinado espectrofluorimetricamente (Fig. 11a y 11b). Mientras que la hidrólisis de  $ATP \cdot Mg^{2+}$  ( $0.18 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) genera un potencial electroquímico al bombear  $H^+$  al interior del cromatóforo, la hidrólisis de  $ATP \cdot Ca^{2+}$  ( $0.03 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) falló en translocar protones (Fig. 11c) tal como ha sido descrito por Gromet-Elhanan y Weiss (1989), Strid y Nyren (1989) y Montero-Lomeli y colaboradores (1989).

Otro efecto esperado fue el hecho de que al solubilizar y purificar al sector  $RF_1$ , éste invierte su habilidad de hidrolizar mejor al  $ATP \cdot Mg^{2+}$  que al  $ATP \cdot Ca^{2+}$  y ahora muestra una aumentada actividad de hidrólisis de  $ATP \cdot Ca^{2+}$  que es inhibida competitivamente por  $Mg^{2+}$ , ésta inversión se aprecia claramente en la figura 12.

### **Cambios conformacionales $ATP \cdot (EDTA)(Mg^{2+})(Ca^{2+})$ -dependientes en la $RF_1$ -ATPasa**

¿Porqué la hidrólisis del  $ATP \cdot Ca^{2+}$  por el  $RF_0F_1$  en los cromatóforos falla en inducir el bombeo de protones, mientras que la hidrólisis de  $ATP \cdot Mg^{2+}$  sí logra catalizar la translocación del protón?, ¿La hidrólisis  $ATP \cdot Mg^{2+}$  y  $ATP \cdot Ca^{2+}$ , del  $RF_0F_1$  de cromatóforo y en el  $RF_1$  soluble, aunque de diferente magnitud, provocan los mismos cambios conformacionales?

Los estudios de comparación de la reacción catalítica entre  $F_0F_1$  y  $F_1$ , han demostrado que son sumamente similares, pero las enzimas son algo distintas en cuanto al arreglo inter-subunidades del sector hidrofílico (Pedersen et al., 1987; Dreyfus et al., 1988).

También se ha comprobado, analizando el comportamiento en presencia de

detergentes, que los arreglos estructurales generales son distintos entre los complejos activos  $RF_0F_1\text{-ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$  y  $RF_0F_1\text{-ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$ , tanto solubilizado como en los cromatóforos (Montero Iomelí y Dreyfus, 1987).

El presente trabajo pretende determinar si el arreglo conformacional del sector  $RF_1\text{-ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$  y del sector  $RF_1\text{-ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$  son diferentes.

El método que se utilizó para ello se basa en el marcaje con DTNB de las cisteínas accesibles, existen buenos ejemplos de estudios donde se ha determinado, utilizando este reactivo, el número total de cisteínas de una enzima en la que se conoce con exactitud su peso molecular, así como el número de grupos SH cuya reactividad se altera según el estado conformacional (Deakin y colaboradores, 1963; DeLuca y McElroy, 1966; Soper y colaboradores, 1979; Martin y colaboradores, 1989; Clayshulte y colaboradores, 1990).

Con el empleo de éste marcador se logró determinar que cada oligómero  $RF_1$ , desnaturalizado por SDS 2% posee 13 cisteínas (Fig. 13) lo cual concuerda con el número de cisteínas que se reporta en la secuencia nucleotídica (Falk et al., 1985). Se puede predecir que no todos los residuos de cisteínas son accesibles al marcador de cisteínas (DTNB), esto dependerá del arreglo conformacional de la enzima, y se sugiere que éste puede depender también del tipo de catión divalente ( $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Ca}^{2+}$ ) coordinado al ATP como sustrato de la hidrólisis.

En el presente estudio se demostró la existencia de dos tipos de conformaciones generales, una para la enzima  $RF_1$  que hidroliza  $\text{ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$  y otra para la  $RF_1$  que hidroliza  $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$ . Esta última pudiera ser la misma que tiene la enzima que no está hidrolizando ATP. En otras palabras, es probable que el  $\text{ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$  induzca un cambio conformacional que el  $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$  no induce. Estas proposiciones se basan en dos observaciones que son: i) Tanto en la enzima que no ha visto sustrato ( $RF_1\text{-EDTA}$ ) como en el  $RF_1$  que hidroliza  $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$  (El DTNB no inhibe la actividad de ATPasa. Dato no mostrado) se marcan un número aproximado de 2 cisteínas/mol de  $RF_1$ . Por otro lado el  $RF_1$  que cataliza la hidrólisis de  $\text{ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$  no muestra ninguna cisteína accesible al marcador DTNB (Fig. 14). ii) En experimentos de desnaturalización con

Guanidina-HCl 0.3 M de los complejos  $RF_1$ -EDTA,  $RF_1$ -ATP·Mg<sup>2+</sup> y  $RF_1$ -ATP·Ca<sup>2+</sup>, se observa un efecto protector del ATP·Mg<sup>2+</sup> que no ejerce en igual medida el ATP·Ca<sup>2+</sup> y mucho menos el  $RF_1$ -EDTA (Fig. 15).

Como ya se había mencionado, el  $RF_0F_1$  en cromatóforos no tiene la misma actividad en presencia de otros cationes divalentes distintos al Mg<sup>2+</sup>, como el Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> o Fe<sup>2+</sup>. Sin embargo aunque los niveles de hidrólisis de ATP·Mg<sup>2+</sup> y ATP·Ca<sup>2+</sup> no parecen ser tan distintos (con Ca<sup>2+</sup> es sólo 3.8 veces menor que con Mg<sup>2+</sup>); sí existen diferencias funcionales, como por ejemplo, ambas actividades hidrolíticas se inhiben en diferente porcentaje con DCCD y Oligomicina, el complejo  $RF_1$ -ATP·Mg<sup>2+</sup> se inhibe 70% y el complejo  $RF_1$ -ATP·Ca<sup>2+</sup> 30% (Schneider et al., 1980), ni son igualmente sensibles a la activación por detergentes (Montero-Lomelí y Dreyfus, 1987). Sobre todo la hidrólisis en presencia del metal Ca<sup>2+</sup>, no induce el bombeo de protones al interior de la vesícula (Fig. 11c), mientras que con Mg<sup>2+</sup> esto sí ocurre (Fig. 11b) (Strid y Nyren, 1989; Gromet-Elhanan y Weiss, 1989; Montero-Lomelí et al., 1989). Todo lo anterior plantea que el Ca<sup>2+</sup> sustituyendo al Mg<sup>2+</sup> (coordinado al nucleótido) en el sitio catalítico de la ATPasa, o en sitios para Mg<sup>2+</sup> de carácter regulador (por ejemplo los que proponen Pedersen et al., 1987), no ejerce los mismos efectos.

Por el contrario a como ocurre en los cromatóforos, la actividad hidrolítica del complejo soluble  $RF_1$ -ATP·Ca<sup>2+</sup> es 8 (Norling et al., 1989), 60 (*este trabajo* Fig. 12b) o incluso 158 veces mayor (Andralojc y Harris, 1993) que la del complejo  $RF_1$ -ATP·Mg<sup>2+</sup>, sin embargo la actividad de hidrólisis de ATP·Mg<sup>2+</sup> del  $F_0F_1$ -membranal es de la misma magnitud (en cuanto al número de recambio) que la llamada "actividad latente" ATP·Mg<sup>2+</sup> del  $RF_1$ -soluble (7 y 9.6 moléculas de ATP·Mg<sup>2+</sup> hidrolizado (*seg*)<sup>1</sup> respectivamente) (Norling et al., 1989).

Una explicación a este fenómeno fue propuesta por Strid y Nyren (1989) donde se sugirió que la causa era la diferencia en los tamaños de dichos metales divalentes coordinados al ATP, el Ca<sup>2+</sup> (0.99 Å) más grande que el Mg<sup>2+</sup> (0.69 Å), provoca un arreglo distinto en el sitio catalítico, además hay que considerar que la capa de hidratación del Mg<sup>2+</sup> es de 350 veces su radio iónico mientras que la capa del Ca<sup>2+</sup> de

25-30 veces su radio iónico, por tanto el volumen del  $Mg^{2+}$  hidratado es mayor que el del  $Ca^{2+}$  (Maguirre et al., 1992).

Si además del tamaño consideramos que las constantes de disociación del  $Ca^{2+}$  ( $K_d$ ,  $1.8 \text{ M} \times 10^{-4}$ ) y del  $Mg^{2+}$  ( $K_d$ ,  $0.67 \text{ M} \times 10^{-4}$ ) con el ATP son tan distintas (Bridger y Henderson, 1983), no es difícil suponer que la diferente estructura del nucleótido con  $Ca^{2+}$ , tiene efectos sobre el sitio catalítico que inducen un cambio conformacional distinto al que ejerce el nucleótido con  $Mg^{2+}$ , ocasionando el desacoplamiento entre el evento catalítico y el acarreo del protón.

¿A qué nivel de la enzima ocurren estas diferencias en los arreglos conformacionales?. Esta no es una pregunta fácil de contestar sin embargo se sabe que mutaciones en la subunidad  $\alpha$  y de la ATP sintetasa de *Escherichia coli* alteran el acoplamiento entre la catálisis y la formación del gradiente electroquímico, sin afectar del todo la actividad hidrolítica de la enzima. Tales mutaciones se han generado en el extremo carboxilo terminal (Gln-269 por Leu) y también en el amino terminal (Met-23 por Arg o Lys) (Iwamoto et al., 1990 y Shin et al., 1992 respectivamente), por otra parte hay evidencias de que la subunidad  $\alpha$  interacciona con la subunidad  $\beta$  (Aris y Simoni, 1983), además de que, en experimentos con agentes entrecruzadores químicos, se encontró que dicha interacción ocurre entre el extremo carboxilo de la subunidad  $\alpha$  y la región 144-155 de una de las subunidades  $\beta$  (Aggeler et al., 1993). Esto se obtuvo solamente cuando la  $F_1$  se incubó con  $ADP + Mg^{2+}$  y no cuando el catión divalente está ausente (Aggeler y Capaldi, 1993). Los datos anteriores implican que dicha región (144-155) en la subunidad  $\beta$  es parte del sitio catalítico (Duncan y Cross, 1992; Futai et al., 1992) en la región conocida como el *asa rica en glicinas* ("glycine-rich loop"). Esto concuerda con las evidencias de que el  $Mg^{2+}$  y el ADP provocan cambios cinéticos y conformacionales importantes tanto locales (Ida et al., 1991) como generales (Yoshida y Allison, 1983 Gómez-Puyou et al., 1983; Feinstein y Moudrianakis, 1984; Dreyfus, 1985; Hisabori y Mochizuki, 1993).

Evidencia reciente indica que el sitio catalítico en  $F_1$  es sumamente parecido al sitio que une GTP en la proteína *Ras* (Fry et al., 1988; Duncan y Cross, 1992), la estructura cristalográfica de dicha proteína está disponible y se ha generado

información acerca del evento de hidrólisis del  $\text{GTP}\cdot\text{Mg}^{2+}$  (Wittinghofer y Pal, 1991). En analogía con la un dominio de la proteína *Ras*; la *región rica en glicinas* del  $\text{F}_1$  uno los fosfatos  $\beta$  y  $\gamma$  del ATP y el  $\text{Mg}^{2+}$ , lo que provoca re-arreglos con otros dominios cercanos.

Las evidencias presentadas en este trabajo (Fig 14 y 15), indican que en el sector  $\text{RF}_1$  la hidrólisis del  $\text{ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$  induce una conformación distinta comparada con la de el  $\text{RF}_1$  que hidroliza  $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$ , y podría ser que la primera de ellas sí indujera la transmisión de un supuesto cambio conformacional que sería comunicado al canal  $\text{F}_0$  para promover la translocación de protones.

Esta especulación extrapolada al complejo  $\text{F}_0\text{F}_1$  en el cromatóforo, explica porqué la hidrólisis del  $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$  falla en inducir el bombeo de protones (Fig. 11c), mientras que la acción de hidrolizar  $\text{ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$  sí logra hacer que el  $\text{F}_0$  transloque  $\text{H}^+$ .

La razón de la elevada actividad de hidrólisis de  $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$  por el oligómero soluble  $\text{RF}_1$ , con respecto a la de  $\text{ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$ , se podría explicar sugiriendo que la *enzima que hidroliza  $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$* , al no provocar un cambio conformacional (el que sí ocurre con  $\text{ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$ ) se ahorra un evento cinético o un paso de la catálisis, al no provocar el cambio conformacional que sí induce el  $\text{ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$  (lo cual explica nuestra observación de 2 cisteínas expuestas con  $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$  o sin él) y por ello el  $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$  se hidroliza más rápidamente. Lo anterior se apoya en la observación de que la velocidad de hidrólisis del heterodímero  $\alpha/\beta$  para el  $\text{ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$  y para el  $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$  son iguales (Andralojc y Harris, 1993). Esto es una evidencia de que la causa de la diferencia en la hidrólisis  $\text{ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$  por el complejo  $\text{RF}_1$  es la distinta interacción entre el complejo *sitio-catalítico-ATP(Metal-divalente)* con la *subunidad  $\gamma$* , que es la responsable (junto con las otras subunidades menores  $\delta$  y  $\epsilon$ ) de inducir el cambio conformacional transmitido al  $\text{F}_0$ , que provoca el bombeo de protones en la hidrólisis.

Si los eventos catalíticos de la hidrólisis del ATP fueran equivalentes entre  $\text{RF}_0\text{F}_1$  y  $\text{RF}_1$ , entonces entender las diferencias de dichas hidrólisis (en dependencia del metal divalente) en el sector  $\text{RF}_1$  podría llevarnos a explicar, las diferencias en la

**actividad ATPasa del  $RF_0F_1ATP\cdot Mg^{2+}$  y del  $RF_0F_1-ATP\cdot Ca^{2+}$  o las diferencias entre una hidrólisis que acopla la catálisis en  $F_1$  con el bombeo de  $H^+$  en  $F_0$  y una que no lo hace, todo con la finalidad de explicar dicho proceso de acoplamiento.**

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Una de las preguntas centrales en cuanto a la síntesis de ATP por el complejo  $F_0F_1$ -ATPasa, es acerca de la naturaleza del cambio conformacional que acopla la fuerza protón-motriz (en  $F_0$ ) con la síntesis de  $ATP \cdot Mg^{2+}$  en los sitios catalíticos (en  $F_1$ ) de dicho complejo enzimático. Este proyecto intentó aproximar una respuesta, por medio de encontrar las diferencias de dos tipos de hidrólisis en el  $RF_1$ , inducidas por el distinto catión divalente coordinado al ATP ( $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ ). Al estudiar dicho fenómeno en el sector  $F_1$ , es posible que las diferencias se preserven dado el distinto comportamiento cinético observado en la hidrólisis de  $ATP \cdot Mg^{2+}$  con respecto a  $ATP \cdot Ca^{2+}$ . Este estudio mostró la posibilidad de que existan dos conformaciones o arreglos estructurales distintos entre la actividad de hidrólisis de  $ATP \cdot Mg^{2+}$  y la de  $ATP \cdot Ca^{2+}$ , para ello se monitorearon las cisteínas reactivas en cada caso (2 para el complejo  $RF_1$ - $ATP \cdot Ca^{2+}$  y ninguna para el  $RF_1$ - $ATP \cdot Mg^{2+}$ ), se especula además la posibilidad de que el estado o conformación-general dependiente de  $Ca^{2+}$  sea el mismo que impera en dicha enzima en estado latente o sin sustrato, o lo que es lo mismo que el  $ATP \cdot Mg^{2+}$  induce un cambio conformacional local en el sitio catalítico que promueve un re-arreglo inter-subunidades, mismo que el  $ATP \cdot Ca^{2+}$  no logra inducir del mismo modo.

Para poder comprobar dicha hipótesis se propone realizar lo siguiente: *i)* Determinar cuales son las cisteínas que se están marcando en cada caso y con ello determinar si son las mismas en el caso de  $RF_1$ - $ATP \cdot Ca^{2+}$  y  $RF_1$ -EDTA. *ii)* Empleando una metodología distinta (como el empleo de Dicroísmo Circular y realizando entrecruzamientos químicos) confirmar si existen cambios conformacionales distintos en el  $RF_1$  que hidroliza  $Ca^{2+}$  comparado con el que hidroliza  $Mg^{2+}$ . *iii)* Determinar la actividad hidrolítica para  $ATP \cdot Mg^{2+}$  y para  $ATP \cdot Ca^{2+}$  del tipo unisito, lo que nos hablaría del evento cinético en un solo sitio catalítico, sin interaccionar con los demás sitios. y *iv)* Buscar alterar la hidrólisis de  $ATP \cdot Ca^{2+}$  (mutagénesis dirigida, anticuerpos o con solventes distintos al agua) de manera que ahora si induzca el

bombeo de protones, ya que entender en que consiste dicha alteración podría llevarnos a entender como se conectan ambos eventos, la hidrólisis del ATP y el bombeo de iones.

## LITERATURA CITADA

- Abrahams, J.P., Lutter, R., Todd, R.J., van Raaij, M.J., Leslie, A.G.W. y Walker, J.E. (1993) Inherent asymmetry of the structure of  $F_1$ -ATPase from bovine mitochondria at 6.5 Å resolution. *EMBO J.* **12**, 1775-1780
- Aggeler, R., Chicas-Cruz, K., Cai, S.-X., Keana, J.F.W. y Capaldi, R.A. (1992) Introduction of reactive cysteine residues in the  $\epsilon$  subunit of *Escherichia coli*  $F_1$  ATPase, modification of these sites with Tetrafluorophenyl Azide-Maleimides, and examination of changes in the binding of the  $\epsilon$  subunit when different nucleotides are in catalytic sites. *Biochemistry* **31**, 2956-2961
- Aggeler, R., Cai, S.-X., Keana, J.F.W., Koike, T. y Capaldi, R.A. (1993) The  $\gamma$  subunit of the *Escherichia coli*  $F_1$ -ATPase can be cross-linked near the glycine-rich loop region of a  $\beta$  subunit when ADP +  $Mg^{2+}$  occupies catalytic sites but not when ATP +  $Mg^{2+}$  is bound. *J. Biol. Chem.* **268**, 20831-20837
- Aggeler, R. y Capaldi, R.A. (1993) ATP hydrolysis-linked structural changes in the N-terminal part of the gamma subunit of *Escherichia coli*  $F_1$ -ATPase examined by cross-linking studies. *J. Biol. Chem.* **268**, 14576-14579
- Aizawa, S. (1993) Comunicación Personal
- Allison, W.S., Jault, J.-M., Zhuo, S. y Paik, S. (1992) Functional sites in  $F_1$ -ATPases: Location and interactions. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 469-477
- Amesz, J. (1978) Fluorescence and energy transfer. En: *The Photosynthetic bacteria*. (Editores Clayton and Sistrom) Plenum Press. New York. páginas 333-340
- Amesz, J. y Knaff, D.B. (1988) Molecular mechanisms of bacterial photosynthesis. En: *Biology of Anaerobic Microorganisms* (Editor A.J.B. Zehnder) John Wiley & Sons. USA. páginas 113-178
- Amsel, L.M., McKinney, M., Narayanan, P. y Pedersen, P.L. (1983) Structure of the mitochondrial  $F_1$  ATPase at 9-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 5852-5856
- Amsel, L.M. y Pedersen, P.L. (1983) Proton ATPases: structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 801-824
- Andralojc, P.J. y Harris, D.A. (1992) Isolation and characterization of a functional  $\alpha\beta$  heterodimer from the ATP synthase of *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett.* **310**, 187-192
- Andralojc, P.J. y Harris, D.A. (1993) Preparation and characterization of an  $\alpha\beta$  heterodimer from the ATP synthase of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 51-61
- Aris, J.P. y Simoni, R.D. (1983) Cross-linking and labeling of the *Escherichia coli*  $F_1F_0$ -ATP synthase reveal a compact hydrophilic portion of  $F_0$  close to an  $F_1$  catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* **258**, 14599-14609
- Aris, J.P., Klionsky, D.J. y Simoni, R.D. (1985) The  $F_0$  subunits of the *Escherichia coli*  $F_1F_0$ -ATP synthase are sufficient to form a functional proton pore. *J. Biol. Chem.* **260**, 11207-11215
- Avetisyan, A.V., Bogachev, A.V., Murtasina, oments esulachev, V.P. (1993) ATP-driven  $Na^+$  transport and  $Na^+$ -dependent ATP synthesis in *Escherichia coli* grown at low  $\mu_{H_2}$ . *FEBS Lett.* **317**, 267-270
- Baccarini Melandri, A., Gest, H. y San Pietro, A. (1970) A coupling factor in bacterial photophosphorylation. *J. Biol. Chem.* **245**, 1224-1226
- Baccarini Melandri, A. y Zannoni, D. (1978) Photosynthetic and respiratory electron flow in the dual functional membrane of facultative photosynthetic bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **10**, 109-138



**Bioenerg. Biomembr. 24, 435-439**

Ceccarelli, E. y Vallejos, R.H. (1983) Two types of essential carboxyl groups in *Rhodospirillum rubrum* proton ATPase. Arch. Biochem. Biophys. 224, 382-388

Cedergren, R., Gray, M.W., Abel, Y. y Sankoff, D. (1988) The evolutionary relationships among known life forms. J. Mol. Evol. 28, 98-112

Celis, H. y Romero, I. (1987) The Phosphate-Pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of the membrane-bound Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: effects of pH and divalent cations. J. Bioenerg. Biomembr. 19, 255-272

Clarke, D.J., Fuller, F.M. y Morris, J.G. (1979) The proton-translocating adenosine triphosphatase of the obligately anaerobic bacterium *Clostridium pasteurianum* 1. ATP Phosphohydrolyase Activity. Eur. J. Biochem. 98, 597-612

Clayshulte, T.M., Taylor, D.F. y Henzi, M.T. (1990) Reactivity of cysteine 18 in Oncomodulin. J. Biol. Chem. 265, 1800-1805

Clayton, R.K. (1978) Physicochemical mechanisms in reaction centers of photosynthetic bacteria. En: The Photosynthetic bacteria. (Editores Clayton and Sistrom) Plenum Press. New York. páginas 387-396

Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.R. y Stanier, R.Y. (1957) Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. J. Comp. Cell. Physiol. 49, 25-68

Cohen-Bazire, G. y Kunizawa, R. (1963) The fine structure of *Rhodospirillum rubrum*. J. Cell. Biol. 18, 401-419

Collinson, I.R., Runswick, M.J., Buchanan, S.K., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., van Raaij, M.J., Griffiths, D.E. y Walker, J.E. (1994) F<sub>0</sub> membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition and reconstitution with F<sub>1</sub>

**ATPase. Biochemistry 33, 7971-7978**

Cortez, N., Lucero, H.A. y Vallejos, R.H. (1983) Inactivation of *Rhodospirillum rubrum* coupling factor by 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. Modification of a tyrosine protected by phosphate. Biochim. Biophys. Acta 724, 396-403

Cox, G.B., Jans, D.A., Fimmel, A.L., Gibson, F. y Hatch, L. (1984) The mechanism of ATPsynthase conformational change by rotation of the b-subunit. Biochim. Biophys. Acta 768, 201-208

Cox, G.B., Fimmel, A.L., Gibson, F. y Hatch, L. (1986) The mechanism of ATPsynthase: a reassessment of the functions of the b and a subunits. Biochim. Biophys. Acta 849, 62-69

Cox, G.B., Devenish, R.J., Gibson, F., Howitt, S.M. y Nagley, P. (1982) The structure and assembly of ATP synthase. En: Molecular Mechanisms in Bioenergetics (Editor. L. Ernster) Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. páginas 283-315

Crook, S.M., Tremi, S.B. y Collins, M.L.P. (1986) Immunocytochemical ultrastructural analysis of chromatophore membrane formation in *Rhodospirillum rubrum*. J. Bacteriol. 167, 89-95

Cross, R.L. y Nalin, C.M. (1983) Adenine nucleotide binding sites on beef heart F<sub>1</sub>-ATPase. Evidence for three exchangeable sites that are distinct from three noncatalytic sites. J. Biol. Chem. 257, 2874-2881

Cross, R.L. (1982) The reaction mechanism of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthases. En: Molecular Mechanisms in Bioenergetics (Editor. L. Ernster) Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. páginas 317-330

Dabbeni-Sala, F., Vasquez-Laslop, N., Fachinetti, A., Devars, S. y Dreyfus, G. (1989) Modulation of mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> catalysis by boundary and bulk phase phospholipids. Biochem. Biophys. Res. Commun. 158, 1013-1020

- Dayhoff, M.O. y Schwartz, R.M. (1980) Early biological evolution derived from chemical structures. En: *Biological Chemistry of Organelle Formation*. (Editores. Th.Bucher, W.Sebald, H.Weiss) Springer-Verlag, New York. páginas 71-86
- Deakin, H., Ord, M.G. y Stocken, L.A. (1983) 'Glucose 6-Phosphate-Dehydrogenase' Activity and thiol content of thymus nuclei from control and X-irradiated rats. *Biochem. J.* **89**, 296-304
- Deckers-Hobestreit, G., Schmid, R., Kiltz, H.H. y Altendorf, K. (1987)  $F_0$  portion of *Escherichia coli* ATP synthase: Orientation of subunit c in the membrane. *Biochemistry* **26**, 5486-5492
- Deisenhofer, J. y Michel, H. (1992) High-resolution crystal structures of bacterial photosynthetic reaction centers. En: *Molecular Mechanisms in Bioenergetics* (Editor. L. Ernster) Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. páginas 103-120
- DeLuca, M. y McElroy, W.D. (1966) The sulfhydryl groups of Tryptophan-Transfer Ribonucleic Acid Synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 103-107
- Dibrov, P.A., Lazarova, R.L., Skulachev, V.P. y Verkhovskaya, M.L. (1986) The Sodium Cycle II.  $Na^+$ -dependent oxidative phosphorylation in *Vibrio alginolyticus*. *Biochim. Biophys. Acta* **850**, 458-465
- Dimroth, P. (1987) Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria. *Microbiol. Rev.* **51**, 320-340
- Dmitriev, O.Y., Grinkevich, V.A. y Skulachev, V.P. (1989) The  $F_1$ -ATPase of *Vibrio alginolyticus*. (Purification and N-terminal sequence of major subunits) *FEBS Lett.* **258**, 219-222
- Dreyfus, G. (1985) Regulation of the  $P_i$ -ATP exchange and hydrolytic reactions in  $F_0F_1$  reconstituted liposomes. *J. Biol. Chem.* **260**, 12112-12117
- Dreyfus, G., Guimarrès-Motta, H. y Silva, J.L. (1988) Effect of hydrostatic pressure on the mitochondrial ATP synthase. *Biochemistry* **27**, 6704-6710
- Draws, G. (1986) Adaptation of the bacterial photosynthetic apparatus to different intensities. *TIBS* **11**, 255-257
- Duncan, T.M. y Cross, R.L. (1992) A model for the catalytic site of  $F_1$ -ATPase based on analogies to nucleotide-binding domains of known structure. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 453-461
- Dunn, S. y Futai, M. (1980) Reconstitution of a functional coupling factor from the isolated subunits of *Escherichia coli*  $F_1$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **255**, 113-118
- Dunn, S. (1992) The polar domain of the b subunit of *Escherichia coli*  $F_1F_0$ -ATPase forms an elongated dimer that interacts with the  $F_1$  sector. *J. Biol. Chem.* **267**, 7630-7636
- Edwards, P.A. y Jackson, J.B. (1976) The control of the adenosine triphosphatase of *Rhodospirillum rubrum* chromatophores by divalent cations and the membrane high energy state. *Eur. J. Biochem.* **63**, 7-14
- Efiok, B.J.S. y Webster, D.A. (1992) Sodium coupled ATP synthesis in the Bacterium *Vitreoscilla*. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**, 102-106
- Engelmann, Th. W. (1883a) *Bacterium photometricum*. Ein Beitrag zur vergleichenden Physiologie des Licht und Farbensinnes; *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **30**, 90.
- Engelmann, Th. W. (1883b) Farbe und Assimilation. *Bot. Ztg.* **41**, 1-17
- Engelmann, Th. W. (1884) Untersuchungen über die quantitativen Beziehungen zwischen Absorption des Lichtes und Assimilation in Pflanzenzellen. *Bot. Ztg.* **42**, 81-87
- Engelmann, Th. W. (1888a) *Arch. ges. Physiol.* **43**, 183. Citado en: Van Nisil, C.B. (1935) *Photosynthesis of Bacteria*. En: *Photochemical*

Reactions. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 8, páginas 138-150

Engelmann, Th. W. (1888b) Arch. Neerland. 26, 151. Citado en: Van Niel, C.B. (1935) Photosynthesis of Bacteria. En: Photochemical Reactions. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 8, páginas 138-150

Engelmann, Th. W. (1888c) Die Purpurbakterien und ihre Beziehungen zum Licht. Bot. Ztg. 46, 661-677

Esmarch, E. (1887) Über die Reinkultur eines *Spirillum*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. infektiöskr. Hyg. Abt. Orig. 1, 225-230

Evans, M.C.W. y Heathcote, P. (1963) The early photochemical events in bacterial photosynthesis. En: The Phototrophic Bacteria: Anaerobic Life in the Light. (Editor. J.G. Ormerod) University of California Press, Berkeley and Los Angeles, páginas 35-60

Falk, G., Hampe, A., Walker, J.E. (1985) Nucleotide sequence of the *Rhodospirillum rubrum* atp operon. Biochem. J. 228, 391-407

Falk, G. y Walker, J.E. (1988) DNA sequence of a gene cluster coding for subunits of the  $F_0$  membrane sector of ATP synthase in *Rhodospirillum rubrum*. Support for modular evolution of the  $F_1$  and  $F_0$  factors. Biochem. J. 254, 109-122

Feinstein, D.L. y Moudrianakis, E.N. (1984) Response of the adenosine triphosphatase activity of the soluble latent  $F_1$  enzyme from beef heart mitochondria to changes in  $Mg^{2+}$  and  $H^+$  concentrations. J. Biol. Chem. 259, 4230-4236

Feldman, R.I. y Sigman, D.S. (1982) The synthesis of enzyme-bound ATP by a soluble chloroplast coupling factor. J. Biol. Chem. 257, 1676-1683

Fenchel, T. y Bernard, C. (1993) Endosymbiotic purple non-sulphur bacteria in an anaerobic ciliated protozoan. FEMS Microbiol. Letts. 110, 21-25

Fernandes Moran, H. (1963) Cell membrane ultrastructure: Low-temperature electron microscopy and X-ray diffraction studies of lipoprotein components in lamellar systems. Circulation 26, 1039

Fillingame, R.H. (1960) The proton-translocating pumps of oxidative phosphorylation. Annu. Rev. Biochem. 49, 1079-1113

Fillingame, R.H. (1960) Molecular mechanics of ATP Synthesis by  $F_1F_0$ -Type  $H^+$ -transporting ATP Synthases. En: The Bacteria Vol. XII (Editor. T.A. Krulwich) Academic Press, Inc. USA. páginas 345-390

Fillingame, R.H., Oldenburg, M. y Fraga, D. (1991) Mutation of Alanine-24 to Serine in subunit c of the *Escherichia coli*  $F_1F_0$  ATP synthase reduces reactivity of Aspartyl 61 with dicyclohexylcarbodiimide. J. Biol. Chem. 266, 20934-20939

Fillingame, R.H., Girving, M.E., Fraga, D. y Zhang, Y. (1992) Correlations of structure and function in  $H^+$  translocating subunit c of  $F_1F_0$ -ATP synthase. En: Ion-motive ATPases: Structure, function, and regulation. (Editores. A. Scarpa, E. Carafoli, S. Papa) Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 671. The New York academy of sciences. New York. páginas 323-333

Fillingame, R.H. (1992a) Subunit c of  $F_1F_0$  ATP synthase: Structure and role in transmembrane energy transduction. Biochim. Biophys. Acta 1101, 240-243

Fillingame, R.H. (1992b)  $H^+$  transport and coupling by the  $F_0$  sector of the ATP synthase: Insights into the molecular mechanism of function. J. Bioenerg. Biomembr. 24, 485-491

Fisher, R.R. y Guillory, R.J. (1967) Inhibition of the energy conservation reactions of *Rhodospirillum rubrum* by Dio-9. Biochim. Biophys. Acta 149, 654-656

Fisher, R.J., Liang, A.M. y Sundstrom, G.C.

(1981) Selective disaggregation of the H<sup>+</sup>-translocating ATPase. Isolation of two discrete complexes of the rutamycin-insensitive ATPase differing in mitochondrial membrane-binding properties. *J. Biol. Chem.* **256**, 707-715

Fraga, D. y Fillingame, R.H. (1983) Conserved polar loop region of *Escherichia coli* subunit c of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> H<sup>+</sup>-ATPase. Glutamine 42 is not absolutely essential, but substitutions alter binding and coupling of F<sub>1</sub> to F<sub>0</sub>. *J. Biol. Chem.* **258**, 6797-6803

Friedl, P., Bienhaus, G., Hoppe, J., Schairer, H.U. (1981) The dicyclohexylcarbo-diimide-binding protein c of ATP synthase from *Escherichia coli* is not sufficient to express an efficient H<sup>+</sup> conduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6643-6646

Frenkel, A.W. (1954) Light induced phosphorylation by cell-free preparations of photosynthetic bacteria. *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 5568-5569

Frenkel, A.W. (1956) Photophosphorylation of adenine nucleotides by cell-free preparations of purple bacteria. *J. Biol. Chem.* **222**, 823-834

Frenkel, A.W. y Hickman, D.D. (1959) Structure and photochemical activity of chlorophyll-containing particles from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**, 285-290

Fry, D.C., Kuby, S.A. y Mildvan, A.S. (1986) ATP-binding site of adenylate kinase: Mechanistic implications of its homology with *ras*-encoded p21, F<sub>1</sub>-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 907-911

Fujiyama, Y., Yokohama, K., Yoshida, M., Wakabayashi, T. (1990) Electron microscopy of the reconstituted complexes of the F<sub>1</sub>-ATPase with various subunit constitution revealed the location of the  $\gamma$  subunit in the central cavity of the molecule. *FEBS Lett.* **271**, 111-115

Furuno, T., Ikegami, A., Kihara, H., Yoshida, M. y Kagawa, Y. (1983) *J. Mol. Biol.* **170**, 137-

153

Futai, M., Noumi, T. y Maeda, M. (1980) ATP synthase (H<sup>+</sup>-ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 111-136

Futai, M., Iwamoto, A., Omoto, H. y Maeda, M. (1992) A Glycine-rich sequence in the catalytic site of F-type ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 463-467

García, A.F., Venturoli, G., Gad'on, N., Fernandez-Velasco, J.G., Melandri, B.A. y Drews, G. (1987) The adaptation of the electron transfer chain of *Rhodospseudomonas capsulata* to different light intensities. *Biochim. Biophys. Acta* **890**, 335-345

Geller, D.M. y Lipmann, F. (1960) Photophosphorylation in extract of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **235**, 2478-2484

Geller, D.M. (1962) Oxidative phosphorylation in extracts of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **237**, 2947-2954

Gest, H. y Kamen, M.D. (1948) Studies on the phosphorus metabolism of green algae and purple bacteria in relation to photosynthesis. *J. Biol. Chem.* **176**, 299-318

Gest, H. (1966) Comparative Biochemistry of Photosynthetic processes. *Nature (London)* **209**, 879-882

Gest, H. (1982) The comparative biochemistry of photosynthesis: milestones in a conceptual zigzag. En: *From Cyclotrons to Cytochromes: Essays in Molecular Biology and Chemistry*. (Editores. N.O. Kaplan y A. Robinson) Academic Press. New York, páginas 305-321

Gibson, J., Stackebrandt, E., Zablen, L.B., Gupta, R. y Woese, C.R. (1980) A genealogical analysis of the purple photosynthetic bacteria. *Current Microbiol.* **3**, 59-66

Gillis, M., Dejonghe, J., Smet, A., Onghena, G. y DeLey, J. (1983) Intra- and Intergeneric

similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons in the Rhodospirillaceae. Abstract A16, IV Inter. Symp. Photosynthetic Prokaryotes, Bombannes-Bordeaux.

Girving, M.E., Hermolin, J., Pottorf, R. y Fillingame, R.H. (1989) Organization of the  $F_0$  sector of *Escherichia coli*  $H^+$ -ATPase: The polar loop region of subunit c extends from the cytoplasmic face of the membrane. *Biochemistry* **28**, 4320-4343

Girving, M.E. y Fillingame, R.H. (1993) Helical Structure and folding of subunit c of  $F_1F_0$  ATP synthase:  $^1H$  NMR Resonance Assignments and NOE Analysis. *Biochemistry* **32**, 12167-12177

Girving, M.E. y Fillingame, R.H. (1994) Hairpin folding of subunit c of  $F_1F_0$  ATP synthase:  $^1H$  Distance measurements to nitroxide-derivatized Asparyl-61. *Biochemistry* **33**, 665-674

Gogol, E.P., Lucken, U. y Capaldi, R.A. (1987) The stalk connecting the  $F_1$  and  $F_0$  domains of ATP synthase visualized by electron microscopy of unstained specimens. *FEBS Lett.* **219**, 274-278

Gogol, E.P., Lucken, U., Bork, T. y Capaldi, R.A. (1989a) Molecular architecture of *Escherichia coli*  $F_1$  adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* **28**, 4709-4716

Gogol, E.P., Aggeler, R., Sagermann, M. y Capaldi, R.A. (1989b) Cryoelectron microscopy of *Escherichia coli* adenosinetriphosphatase decorated with monoclonal antibodies to individual subunits of the complex. *Biochemistry* **28**, 4717-4724

Gogol, E.P., Johnston, E., Aggeler, R. y Capaldi, R.A. (1990) Ligand-dependent structural variations in *Escherichia coli*  $F_1$  ATPase revealed by cryoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9585-9589

Golecki, J.R. y Oelze, J. (1975) Quantitative determination of cytoplasmic membrane invaginations in phototrophically growing *Rhodospirillum rubrum*. A freeze-etch study. *J.*

*Gen. Microbiol.* **69**, 253-258

Gomez-Puyou, A., Ayala, G., Muller, U. y Gomez-Puyou, M.T. (1988) Regulation of the synthesis and hydrolysis of ATP by mitochondrial ATPase. Role of  $Mg^{2+}$ . *J. Biol. Chem.* **263**, 13673-13679

Gomez-Puyou, A., Gomez-Puyou, M.T. y De Meis, L. (1986) Synthesis of ATP by soluble mitochondrial  $F_1$  ATPase and  $F_1$ -inhibitor-protein complex in the presence of organic solvents. *Eur. J. Biochem.* **159**, 133-140

Gonzalez-Pedrajo, B.M.J. (1989) Purificación y caracterización del complejo  $bc_1$  de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. UNAM. 110 páginas

Griwatz, C. y Junge, W. (1992) Cooperative transient trapping of protons by structurally distorted chloroplast ATPase: Evidence for the proton well?. *Biochim. Biophys. Acta* **1101**, 244-248

Gromet-Elhanan, Z. (1974) Role of photophosphorylation coupling factor in energy conversion by depleted chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **249**, 2522-2527

Gromet-Elhanan, Z. y Khananshvil, D. (1986) Selective extraction and reconstitution of  $F_1$  subunits from *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Methods in enzymology* **126**, 528-538

Gromet-Elhanan, Z. y Weiss, S. (1989) Regulation of  $\Delta p_{H^+}$ -coupled ATP synthesis and Hydrolysis: role of divalent cations and of the  $F_0F_1$ -8 subunit. *Biochemistry* **28**, 3645-3650

Gromet-Elhanan, Z. (1992) Identification of subunits required for the catalytic activity of the  $F_1$ -ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 447-452

Grubmeyer, C.H. Penefsky, H.S. (1981) Cooperativity between catalytic sites in the mechanism of action of beef mitochondrial

adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **256**, 3718-3727

Harris, D.A. (1988) The "non-exchangeable" nucleotides of  $F_1F_0$  ATP synthase. Cofactors in hydrolysis?. *FEBS Lett.* **316**, 209-215

Habeeb, A.F.S.A. (1972) Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *Methods Enzymol.* **25**, 457-464

Hackney, D.D. y Boyer, P.D. (1978) Subunit interaction during catalysis. Implications of concentration dependency of exchanges accompanying oxidative phosphorylation for alternating site cooperativity. *J. Biol. Chem.* **253**, 3164-3170

Harada, M., Ito, Y., Sato, M., Aono, O., Ohta, S. y Kagawa, Y. (1991a) Small-angle X-ray scattering studies of Mg-ATP(D)P-induced hexamer to dimer dissociation in the reconstituted  $\alpha_3\beta_3$  complex of ATP synthase from thermophilic bacterium PS3. *J. Biol. Chem.* **266**, 11455-11460

Harada, M., Ohta, S., Sato, M., Ito, Y., Kobayashi, Y., Sone, N., Ohta, T. y Kagawa, Y. (1991b) The  $\alpha_3\beta_3$  heterodimer, the unit of ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1056**, 279-284

Hebert, H., Skriver, E. y Maunsbach, A.B. (1985) Three-dimensional structure of renal Na,K-ATPase determined by electron microscopy of membrane crystals. *FEBS Lett.* **187**, 182-186

Heise, R., Muller, V. y Gottschalk, G. (1992) Presence of a sodium-translocating ATPase in membrane vesicles of the homeoacetic bacterium *Acetobacterium woodii*. *Eur. J. Biochem.* **206**, 553-557

Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E. y Downing, K.H. (1990) *J. Mol. Biol.* **213**, 899-929

Hennig, J. y Hstrmann, R.G. (1986) Chloroplast ATP synthase of spinach contains nine non-identical subunits species, six of which

are encoded by plastid chromosomes in two operons in a phylogenetically conserved arrangement. *Mol. Gen. Genet.* **209**, 117-128

Hermolin, J., Gallant, J. y Fillingame, R.H. (1983) Topology, Organization and function of the Psi subunit in the  $F_0$  sector of the  $H^+$ -ATPase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **258**, 14550-14555

Hermolin, J. y Fillingame, R.H. (1989)  $H^+$ -ATPase activity of *Escherichia coli*  $F_1F_0$  is blocked after reaction of dicyclohexylcarbodiimide with a single proteolipid (subunit c) of the  $F_0$  complex. *J. Biol. Chem.* **264**, 3896-3903

Hilpert, W., Schink, B. y Dimroth, P. (1984) Life by a new decarboxylation-dependent energy conservation with  $Na^+$  as coupling ion. *EMBO J.* **3**, 1665-1680

Hisabori, T. y Mochizuki, K. (1993) Magnesium regulates both the nucleotide binding and the enzyme activity of isolated chloroplast coupling factor 1. *J. Biochem.* **114**, 808-812

Hoch, F.L. y Lipmann, F. (1954) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40**, 909

Hoger, J.H., Tai, S-P. y Kaplan, S. (1987) Membrane adenosine triphosphatase in synchronous cultures of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* **898**, 70-80

Holt, S.C. y Marr, A.G. (1985a) Location of chlorophyll in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **89**, 1402-1412

Holt, S.C. y Marr, A.G. (1985b) Effect of light intensity on the formation of intracytoplasmic membrane in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **89**, 1421-1429

Hoppe, J., Friedl, P., Schairer, H.U., Sebald, W., von Meyenburg, K. y Jorgensen, B.B. (1983) The topology of the proton translocating  $F_0$  component of the ATP synthase from *Escherichia coli* K12: studies with proteases. *EMBO J.* **2**, 105-110

- Hoppe, J., Brunner, J. y Jørgensen, B. (1984) Structure of the membrane embedded  $F_0$  part of the  $F_0F_1$  ATP synthase from *Escherichia coli* as inferred from labeling with 3-(Trifluoromethyl)-3-(*m*-[ $^{18}O$ ]iodophenyl)diazirine. *Biochemistry* **23**, 5610-5616
- Hoppe, J. y Sebald, W. (1984) The proton conducting  $F_0$  part of bacterial ATP synthases. *Biochim. Biophys. Acta* **766**, 1-27
- Horio, T., Nishikawa, K. y Yamashita, J. (1984) Adenosine diphosphate-adenosine triphosphate exchange reaction with chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biochem.* **85**, 327-332
- Horio, T., Nishikawa, K., Kataumata, M. y Yamashita, J. (1985) Possible partial reactions of the photophosphorylation process in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* **94**, 371-382
- Horiuti, Y., Nishikawa, K. y Horio, T. (1988) Oxidation-Reduction Potential-Dependent adenosine triphosphatase activity of chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biochem.* **64**, 577-587
- Howitt, S.M., Gibson, F. y Cox, G.B. (1988) The proton pore of the  $F_0F_1$ -ATPase of *Escherichia coli*: Ser-206 is not required for proton translocation. *Biochim. Biophys. Acta* **936**, 74-80
- Howitt, S.M., Lightowlers, R.N., Gibson, F. y Cox, G.B. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1015**, 264-268
- Hutner, S.H. (1944) Growth requirements of the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem.* **3**, 439-444
- Hutner, S.H. (1950) Anaerobic and aerobic growth of purple bacteria (Athiorodaceae) in chemically defined media. *J. Gen. Microbiol.* **4**, 286-293
- Ida, K., Noumi, T., Maeda, M., Fukui, T. y Futai, M. (1991) Catalytic site of  $F_1$ -ATPase of *Escherichia coli*. Lys-155 and Lys-201 of the  $\delta$ -subunit are located near the  $\gamma$ -phosphate group of ATP in the presence of  $Mg^{2+}$ . *J. Biol. Chem.* **266**, 5424-5429
- Imhof, J.F., Truper, H.G. y Pfennig, N. (1984) Rearrangement of the species and genera of the phototrophic "Purple nonsulfur bacteria". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 340-343
- Ishii, N., Yoshimura, H., Nagayama, K., Kagawa, Y. y Yoshida, M. (1988) Three-dimensional structure of  $F_1$ -ATPase of thermophilic bacterium PS3 obtained by electron crystallography. *J. Biochem.* **113**, 245-250
- Iwamoto, A., Miki, J., Maeda, M. y Futai, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 5043-5048
- Jackson, J.B., Crofts, A.R. y von Stedingk, L.V. (1988) Ion transport induced by light and antibiotics in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Eur. J. Biochem.* **6**, 41-54
- Johansson, B.C. (1973) A coupling factor from *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *FEBS Lett.* **30**, 339-340
- Johansson, B.C., Baltacheffsky, M., Baltacheffsky, H., Baccarini-Melandri, A. y Melandri, B.A. (1973) Purification and properties of a coupling factor ( $Ca^{2+}$ -dependent adenosine triphosphatase) from *Rhodospirillum rubrum*. *Eur. J. Biochem.* **40**, 109-117
- Johansson, B.C. y Baltacheffsky, M. (1975) On the subunit composition of the coupling factor (ATPase) from *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett.* **53**, 221-224
- Johansson, B.C. (1975) Partial resolution of the energy transfer system in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. Purification and characterization of the "coupling factor" ATPase. Tesis Doctoral, University of Stockholm, Suecia.
- Johnston, J.A. y Brown, A.H. (1984) The effect of light on the oxygen metabolism of the

photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. *Plant. Physiol.* **29**, 177-183

Jones, E.R. (1936) Studies of pigmented non-sulfur purple bacteria in relation to cannery waste lagoon odors, *Sewage Ind. Wastes.* **28**, 263-263

Kagawa, Y. y Racker, E. (1966) Partial reconstitution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. X. Correlation of morphology and function in submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* **241**, 2475-2483

Kagawa, Y., Ohta, S., Harada, M., Sato, M., y Itoh, Y. (1968) The  $\alpha_3\beta_3$  and  $\alpha_2\beta_2$  complexes of ATP synthase. In: Ion-motive ATPases: Structure, function, and regulation. (Editors. A. Scarpa, E. Carafoli, S. Papa) *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol. 671. The New York academy of sciences. New York. páginas 366-376

Kaim, G. y Dimroth, P. (1983) Formation of a functionally active sodium-translocating hybrid  $F_1F_0$  ATPase in *Escherichia coli* by homologous recombination. *Eur. J. Biochem.* **218**, 937-944

Kaiser, P. (1966) Ecologie des bactéries photosynthétiques. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* **3**, 409-472

Kandpal, R.P., Stempel, E.K. y Boyer, P.D. (1967) Characteristics of the formation of enzyme-bound ATP from medium inorganic phosphate by mitochondrial  $F_1$  Adenosinetriphosphatase in the presence of Dimethyl Sulfoxide. *Biochemistry* **26**, 1512-1517

Karube, I. y Suzuki, S. (1966) Biochemical energy conversion by immobilized Photosynthetic bacteria. *Methods Enzymol.* **137**, 668-674

Kaister, D.L. y Raveed, D. (1981) Effect of a short aerobic growth period on ATPase activity in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. In: Photosynthesis II. Electron Transport and Photophosphorylation. (Editor. G. Akoyunoglou) Balaban Int. Sci. Services,

Philadelphia, páginas 753-757

Khananashvili, D. y Gromet-Elihanan, Z. (1968) The interaction of 4-chloro-7-nitrobenzofuranan with *Rhodospirillum rubrum* chromatophores, their soluble  $F_1$ -ATPase, and the isolated purified S subunit. *J. Biol. Chem.* **243**, 3714-3719

Kholodenko, B.N. (1980) Kinetic models of coupling between  $H^+$  and  $Na^+$ -translocation and ATP synthesis/hydrolysis by  $F_1F_0$ -ATPases: can a cell utilize both delta mu  $H^+$  and delta mu  $Na^+$  for ATP synthesis under in vivo conditions using the same enzyme? *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**, 295-305

Kiley, P.J. y Kaplan, S. (1968) Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiol. Rev.* **32**, 50-69

Klemme, B., Klemme, J.H. y San Pietro, A. (1971) PPase, ATPase and Photophosphorylation in chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*: Inactivation by phospholipase A; reconstitution by phospholipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **144**, 339-343

Klienaky, D.J., Brusilow, W.S.A. y Simoni, R.D. (1969) Assembly of a functional  $F_0$  of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **244**, 10136-10143

Kluge, C. y Dimroth, P. (1983) Kinetics of inactivation of the  $F_1F_0$  ATPase of *Propionigenium modestum* by dicyclohexylcarbodiimide in relationship to  $H^+$  and  $Na^+$  concentration: probing the binding site for the coupling ions. *Biochemistry* **22**, 10376-10386

Kluge, C. y Dimroth, P. (1984) Modification of isolated subunit c of the  $F_1F_0$ -ATPase from *Propionigenium modestum* by dicyclohexylcarbodiimide. *FEBS Lett.* **240**, 245-248

Knowles, J.R. (1980) Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions. *Annu. Rev.*

Biochem. 49, 877-919

Kobayashi, M. (1978) Role of photosynthetic bacteria in foul water purification. *Prog. Water Technol.* 7, 309-315

Kobayashi, M. (1982) The role of phototrophic bacteria in nature and their utilization. En: *Advances in agricultural microbiology*. (Editor: S. Subba rao) London. páginas 643-666

Kramer, R. (1984) Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* 1185, 1-34

Kumamoto, C.A. y Simoni, R.D. (1986) Genetic evidence for interaction between the a and b subunits of the  $F_0$  portion of the *Escherichia coli* proton translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 261, 10037-10042

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680

Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S. y Candia, O.A. (1979) *Anal. Biochem.* 100, 96-97

Laubinger, W. y Dimroth, P. (1987) Characterization of the  $\text{Na}^+$ -stimulated ATPase of *Propionigenium modestum* as an enzyme of the  $F_1F_0$  type. *Eur. J. Biochem.* 168, 475-480

Laubinger, W. y Dimroth, P. (1988) Characterization of the ATPase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump. *Biochemistry* 27, 7531-7537

Laubinger, W. y Dimroth, P. (1989) The sodium ion translocating adenosinetriphosphatase of *Propionigenium modestum* pump protons at low sodium ion concentrations. *Biochemistry* 28, 7194-7198

Leiser, M. y Gromet-Elhanan, Z. (1974) Demonstration of acid-base phosphorylation in chromatophores in the presence of a  $\text{K}^+$  diffusion potential. *FEBS Lett.* 43, 267-270

Leonard, R.J., Labarca, C.G., Charnet, P., Davidson, N. y Lester, H.A. (1988) Evidence

that the M2 membrane-spanning region lines the ion channel pore of the nicotinic receptor. *Science* 242, 1576-1581

Lee, T.W. y Bragg, P.D. (1981) The DCCD-binding polypeptide alone is insufficient for proton translocation through  $F_0$  in membranes of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 53-59

Liw, H. y Ahelius, B.A. (1984) Subunits of the Chromatophore membranes in *Rhodospirillum rubrum*. *Exptl. Cell Res.* 85, 431-434

Lucks, F.K. y Klemme, J.H. (1978) Coupling factor adenosine-5'-triphosphatase from *Rhodospirillum rubrum*: a simple and rapid procedure for its purification. *Z. Naturforsch.* 33c, 372

Lucken, U., Gogol, E.P. y Capaldi, R.A. (1980) Structure of the ATP synthase complex ( $\text{ECF}_1F_0$ ) of *Escherichia coli* from cryoelectron microscopy. *Biochemistry* 19, 5339-5343

Lunsdorf, H., Ehrig, K., Friedl, P. y Schairer, H.U.H. (1988) Use of monoclonal antibodies in immune-electron microscopy for the determination of subunit stoichiometry in oligomeric enzymes. There are three  $\alpha$ -subunits in the  $F_1$ -ATPase of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 178, 131-136

Lutter, R., Abrahams, J.P., van Raaij, M.J., Todd, R.J., Lundqvist, T., Buchanan, S.K., Leslie, A.G.W. y Walker, J.E. (1988) Crystallization of  $F_1$ -ATPase from bovine heart mitochondria. *J. Mol. Biol.* 220, 787-790

Lutz, H.U., Dahl, J.S. y Bachofen, R. (1974) Synthesis of free ATP from membrane bound ATP in chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* 347, 359-370

Ma, J.T., Wu, J.J., Tsong, C.M. y Pan, R.L. (1988) Functional site analysis of  $F_1$ -ATPase from *Escherichia coli* by radiation inactivation. *J. Biol. Chem.* 263, 10803-10807

Madigan, M.T. (1988) *Microbiology, Physiology and Ecology of Phototrophic bacteria*. En:

**Biology of Anaerobic Microorganisms** (Editor A.J.B. Zehnder) John Wiley & Sons. USA. páginas 39-111

Maguire, M.E., Snavely, M.D., Leizman, J.B., Gura, S., Bagga, D., Tao, T. y Smith, D.L. (1983)  $Mg^{2+}$  Transporting P-type ATPases of *Salmonella typhimurium*. Wrong way, wrong place enzymes. En: Ion-motive ATPases: Structure, function, and regulation. (Editores. A. Scarpa, E. Carafoli, S. Papa) Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 671. The New York academy of sciences. New York. páginas 244-255

Maldonado O.E. y Dreyfus, G. (1983) Purificación de la  $F_1$ -ATPasa de *Rhodospirillum rubrum*. Memorias del VIII Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Mor. México pagina 87

Maldonado-Olvera, E. y Dreyfus, G. (1984) La hidrólisis de ATP en la  $F_1$ -ATPasa de *Rhodospirillum rubrum* bajo la influencia de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . Memorias del VII Congreso Nacional Estudiantil de Investigación en el Area de la Salud. Gaceta Medica de México 130, (supl.2) 18

Mao, D., Wachter, E. y Wallace, B.A. (1982) Folding of the mitochondrial proton adenosinetriphosphatase proteolipid channel in phospholipid vesicles. Biochemistry 21, 4960-4968

Margulis, L. (1981) Symbiosis in Cell evolution. W.H. Freeman, New York.

Margulis, L. y Schwartz, K.V. (1988) Five Kingdoms: an illustrated guide to the Phyla of life on Earth. 2a Ed. W.H. Freeman, New York.

Margulis, L. (1983) Origins of species: acquired genomes and individuality. BioSystems 31, 121-125

Martin, R.L., Daley, L.A., Lovric, Z., Wailes, L.M., Renosto, F. y Segel, I.H. (1980) The "Regulatory" sulfhydryl group of *Penicillium chrysogenum* ATP sulfurylase. Cooperative

ligand binding after SH modification; chemical and thermodynamic properties. J. Biol. Chem. 264, 11768-11775

Melandri, B.A., Baccarini Melandri, A., San Pietro, A. y Gest, H. (1971) Interchangeability of phosphorylation coupling factors in Photosynthetic and respiratory energy conversion. Science 174, 514-516.

Melandri, B.A., Zannoni, D., Casadio, R. y Baccarini-Melandri, A. (1974) Energy conservation and traneduction in photosynthesis and respiration of facultative photosynthetic bacteria. En: Proceedings of the Third International Congress on Photosynthesis. (Editor. M. Avron) Elsevier, Amsterdam, páginas 1147-1162

Mendel-Hartvig, J. y Capaldi, R.A. (1981) Catalytic site nucleotides and inorganic phosphate dependence of the conformation of the  $\epsilon$  subunit in *Escherichia coli* adenosinetriphosphatase. Biochemistry 20, 1278-1284

Miller, M.J., Oldenburg, M. y Fillingame, R.H. (1980) The essential carboxyl group in subunit c of the  $F_1F_0$  ATP synthase can be moved and  $H^+$ -translocating function retained. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4900-4904

Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature 191, 144-148

Mitchell, P. y Moyle, J. (1974) The mechanism of proton translocation in reversible proton-translocating adenosine triphosphatases. Biochem. Soc. Spec. Suppl. 4, 91-111

Mitchell, P. (1985a) The correlation of chemical and osmotic forces in biochemistry. J. Biochem. 97, 1-18

Mitchell, P. (1985b) Molecular mechanics of protonmotive  $F_0F_1$  ATPases. Rolling well and turnstile hypothesis. FEBS Lett. 182, 1-7

Miwa, K., Ohtsubo, M., Denda, K., Hisabori, T.,

- Data, T. y Yoshida, M. (1980) Reconstituted  $F_1$ -ATPase complexes containing one impaired  $\beta$  subunit are ATPase-active. *J. Biochem.* **108**, 679-683
- Molisch, H., (1907) Die Purpurbakterien nach neueren Untersuchungen. Gustav Fisher Verlag, Jena, pp. 1-95
- Montero-Lomeli, M. y Dreyfus, G. (1987) Activation of Mg-ATP hydrolysis in isolated *Rhodospirillum rubrum*  $H^+$ -ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* **257**, 345-351
- Montero-Lomeli, M., Martins, O.B. y Dreyfus, G. (1990) Coupling of ATP hydrolysis to phosphate uptake in *Rhodospirillum rubrum* Chromatophores under the influence of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ . *J. Biol. Chem.* **264**, 21014-21017
- Muller, H.W., Schmitt, M., Schneider, E. y Dose, K. (1979) Immunological and reconstitution studies on the adenosine triphosphate complex from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* **545**, 77-85
- Muller, H., Neufang, H. y Knobloch, K. (1983) Kinetic studies on the membrane-bound and the purified coupling factor-ATPase from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Arch. Biochem. Biophys.* **224**, 283-289
- Nagashima, K.V.P., Shimada, K. y Matsuura, K. (1993) Phylogenetic analysis of photosynthetic genes of *Rhodocyclus gelatinosus*: Possibility of horizontal gene transfer in purple bacteria. *Photosynthesis Res.* **36**, 185-191
- Nagley, P. (1988) Eukaryote membrane genetics: the  $F_0$  sector of mitochondrial ATP synthase. *Trends Genet.* **4**, 46-52
- Nawroth, T., Conrad, H., Vienken, J. y Dose, K. (1983) Neutron small scattering of matched proteoliposomes with incorporated  $F_0F_1$  ATPase complex from *Rhodospirillum rubrum* FR1. An approach to the structure of membrane proteins in their natural environment. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**, 923-931
- Neidhardt, A., Nawroth, T., Hutsch, M. y Dose, K. (1991) Structural dynamics in  $F_1$ -ATPase during the first reaction cycle of ATP hydrolysis. *FEBS Lett.* **280**, 179-182
- Niklowits, W. y Drews, G. (1965) Zur Elektronenmikroskopischen Darstellung der Feinstruktur von *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Mikrobiol.* **23**, 123-129
- Nishi, N., Soe, G., Kakuno, T. y Yamashita, J. y Horio, T. (1983) Active components bound to the chromatophore membrane of *Rhodospirillum rubrum*. In: From Cyclotrons to Cytochromes. Essays in Molecular Biology and Chemistry. (Editores. N.O. Kaplan y A. Robineon) Academic Press. New York, páginas 367-380
- Norling, B., Strid, A. y Nyren P. (1988) Conversion of coupling factor 1 of *Rhodospirillum rubrum* from  $Ca^{2+}$ -ATPase into a  $Mg^{2+}$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **985**, 123-129
- Norling, B., Strid, A. y Nyren P. (1989) Amount and turnover rate of the  $F_0F_1$ -ATPase and the stoichiometry of its inhibition by oligomycin in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Eur. J. Biochem.* **186**, 333-337
- Oelze, J., Kaiser, I. y Schrader, M. (1980) Differences in activation energies of membrane-bound and solubilized ATPases of *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**, 145-147
- Ordaz, H., Sooa, A., Romero, I. y Celis, H. (1992) Thermostability and activation by divalent cations of the membrane-bound inorganic Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Int. J. Biochem.* **24**, 1633-1638
- Oren, R. y Gromet-Elhanan, Z. (1977) Coupling factor Adenosine triphosphatase complex of *Rhodospirillum rubrum*. Isolation of an oligomycin sensitive  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATPase. *FEBS Lett.* **79**, 147-150
- Oren, R. y Gromet-Elhanan, Z. (1979) Coupling factor ATPase complex of *Rhodospirillum*

*rubrum*. Purification and characterization of an oligomycin and *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ( $\text{Ca}^{++} + \text{Mg}^{++}$ )-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **548**, 106-118

Oren, R., Weiss, S., Garty, H., Caplan, R. y Gromet-Elhanan, Z. (1990) ATP synthesis catalyzed by the ATPase complex from *Rhodospirillum rubrum* reconstituted into phospholipid vesicles together with bacteriorhodopsin. *Arch. Biochem. Biophys.* **205**, 503-509

Ormerod, J. (1987) Orbitalary. Cornelis Bernardus van Niel (1897-1965). En: *The Light Reactions*. (Editor. J. Barber) Elsevier. New York. páginas xi-xii

Packham, N.K. y Barber, J. (1987) Structural and functional comparisons of anoxygenic and oxygenic organisms. En: *The Light Reactions*. (Editor. J. Barber) Elsevier. Amsterdam, páginas 2-30

Parson, W.W. (1987) The bacterial reaction center. En: *Photosynthesis*. (Editor. J. Amesz) Elsevier, Amsterdam, páginas 43-62

Podersen, P.L., Williams, N. y Hüllihen, J. (1987) Mitochondrial ATP synthase: dramatic  $\text{Mg}^{++}$ -induced alterations in the structure and function of the F1-ATPase moiety. *Biochemistry* **26**, 8631-8637

Penefsky, H.S. (1977) Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **252**, 2891-2899

Penefsky, H.S. y Cross, R.L. (1991) Structure and mechanism of  $\text{F}_0\text{F}_1$ -Type ATP synthases and ATPases. En: *Advances in Enzymology and related areas of Molecular Biology*. Vol.64 (Editor. A.Meister) John Wiley & Sons, Inc. New York. páginas 173-214

Perlin, D.S., Kasamo, K., Brooker, R.J. y Slayman, C.W. (1984a) Electrogenic  $\text{H}^+$  translocation by the plasma membrane ATPase of *Neurospora*. Studies on plasma membrane vesicles and reconstituted enzyme. *J. Biol. Chem.* **259**, 7884-7892

Perlin, D.S., Latchney, L.R., Wise, J.G. y Senior, A.E. (1984b) Specificity of the proton-adenosine triphosphatase of *Escherichia coli* for adenine, guanine, and inosine nucleotides in catalysis and binding. *Biochemistry* **23**, 4998-5003

Pfennig, N. (1978a) General physiology and ecology of photosynthetic bacteria. En: *The Photosynthetic bacteria*. (Editores Clayton and Sistrom) Plenum Press. New York. páginas 3-18

Pfennig, N. (1978b) *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a ring-shaped vitamin  $\text{B}_{12}$ -requiring of the family Rhodospirillaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**, 283-288

Pfennig, N. y Trüper, H.G. (1971) Higher taxa of the phototrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**, 17-18

Pfennig, N. y Trüper, H.G. (1980) Anoxygenic Phototrophic bacteria. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3 (Editores. Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. y Holt, J.G.) Williams & Wilkins Co. Baltimore. páginas 1635-1709

Pick, U. y Weiss, M. (1988) A light-dependent dicyclohexylcarbodiimide-sensitive Ca-ATPase activity in chloroplasts which is not coupled to proton translocation. *Eur. J. Biochem.* **173**, 623-628

Poolman, B. y Konings, W.N. (1983) Secondary solute transport in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1183**, 5-39

Prince, R.C., Baccarini-Melandri, A., Hauska, G.A., Melandri, B.A. y Crofts, A.R. (1975) Asymmetry of an energy transducing membrane: The location of cytochrome *c*, in *Rhodospseudomonas sphaeroides* and *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biochim. Biophys. Acta* **387**, 212-227

Prince, R.C. y Dutton, P.L. (1978) Physical, chemical and structural descriptions of energetic processes in photosynthetic bacteria: comparisons with green plants and respiratory

systems. En: *Light Transducing Membranes*. (Editor. D.W. Deamer) Academic Press, New York, páginas 167-186

Prince, R.C. (1980) Bacterial Photosynthesis: From Photons to ap. En: *The Bacteria Vol XII: Bacterial Energetics* (Editor. T.A. Krulwich) Academic Press, California. páginas 111-149

Pullman, M.E., Penefsky, H. y Racker, E. (1980) A soluble protein function required for coupling phosphorylation to oxidation in submitochondrial fragments of beef heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, 227-232

Pullman, M.E., Penefsky, H., Datta, A. y Racker, E. (1980) Partial Resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **255**, 3322-3329

Racker, E. (1962) Studies of factors involved in oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1659-1663

Racker, E. (1963) A mitochondrial factor conferring oligomycin sensitivity on soluble mitochondrial ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **10**, 345-347

Recipon, H., Perasso, R., Adoutte, A. y Quetier, F. (1992) ATP synthase subunit *c*/III/9 gene sequences as a tool for interkingdom and metaphytes molecular phylogenies. *J. Mol. Evol.* **34**, 292-303

Reed, D.W. y Raveed, D. (1972) Some properties of the ATPase from chromatophores of *Rhodospseudomonas spheroides* and its structural relationship to the bacteriochlorophyll proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **283**, 79-91

Rees, D.C., Komiya, H., Yeates, T.O., Allen, J.F. y Feher, G. (1989) The bacterial photosynthetic reaction center as a model for membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 607-633

Riedl, H., Golecki, J.R. y Drews, G. (1983) Energetic aspects of photophosphorylation capacity and reaction center content of *Rhodospseudomonas capsulata*, grown in a turbidostat under different irradiances. *Biochim. Biophys. Acta* **735**, 455-463

Riedl, H., Golecki, J.R. y Drews, G. (1985) Composition and activity of the photosynthetic system of *Rhodospseudomonas capsulata*. The physiological role of the B900-850 light-harvesting complex. *Biochim. Biophys. Acta* **806**, 328-333

Rosing, J., Kayalar, C. y Boyer, P.D. (1977) Evidence for energy-dependent change in phosphate binding for mitochondrial oxidative phosphorylation based on measurements of medium and intermediate phosphate-water exchanges. *J. Biol. Chem.* **252**, 2478-2485

Ruben, S. (1949) Photosynthesis and phosphorylation. *J. Amer. Chem. Soc.* **65**, 279-282

Ruttner, F. (1963) *Fundamentals of limnology*, 3a. ed. University of Toronto Press, Toronto Canada.

Saphon, S., Jackson, J.B., Lerbs, V. y Witt, H.T. (1975a) The functional unit of electrical events and phosphorylation in chromatophores from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta* **408**, 58-66

Saphon, S., Jackson, J.B. y Witt, H.T. (1975b) Electrical potential changes, H<sup>+</sup> translocation and phosphorylation induces by short flash excitation in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta* **408**, 67-82

Schachman, H.K., Pardee, A.B. y Stanier, R.Y. (1963) Studies on the molecular organization of microbial cells. *Arch. Biochem.* **39**, 213-221

Schagger, H. y Von Jagow, G. (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel electrophoresis for the separation of proteins in a range from 1 to 100 Kda. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379

- Schink, B. y Pfennig, N. (1982) *Protonigenium modestum* gen. nov., sp. nov., a new strictly anaerobic nonsporing bacterium growing on succinate. Arch. Microbiol. 133, 209-216
- Schinkel, J.E., y Hammes, G.G. (1986) Chloroplast coupling factor 1: dependence of rotational correlation time on polypeptide composition. Biochemistry 25, 4066-4071
- Schmid, R., Kilts, H.H., Schneider, E. y Altendorf, K. (1981) Characterization of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive protein from *Rhodospirillum rubrum* grown in the light and in the dark. FEBS Lett. 125, 97-100
- Schneider, E., Friedl, P., Schwulera, U. y Dose, K. (1980) Energy-linked reactions catalyzed by the purified ATPase complex ( $F_0F_1$ ) from *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. 108, 331-336
- Schneider, E. y Altendorf, K. (1985) All three subunits are required for the reconstitution of an active proton channel ( $F_0$ ) of *Escherichia coli* ATP synthase ( $F_0F_1$ ). EMBO J. 4, 515-518
- Schwartz, R.M. y Dayhoff, M.O. (1978) Origins of Prokaryotes, Eukaryotes, Mitochondria and Chloroplasts. Science 199, 395-403
- Seewaldt, E., Schleifer, K.H., Bock, E. y Stackebrandt, E. (1982) The close phylogenetic relationship of *Nitrobacter* and *Rhodospseudomonas palustris*. Arch. Microbiol. 131, 287-290
- Senior, A.E. (1983) Secondary and tertiary structure of membrane proteins involved in proton translocation. Biochim. Biophys. Acta 726, 81-95
- Senior, A.E. (1990) The proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. Annu. Rev. Biophys. Chem. 19, 7-41
- Shin, K., Nakamoto, R.K., Maeda, M. y Futai, M. (1992)  $F_0F_1$ -ATPase  $\gamma$  subunit mutations perturb the coupling between catalysis and transport. J. Biol. Chem. 267, 20835-20839
- Siefert, E., Irgens, R.L. y Pfennig, N. (1978) Phototrophic purple and green bacteria in a sewage treatment plant. Appl. Environ. Microbiol. 35, 38-44
- Sistrom, W.R. (1968) A requirement for sodium in the growth of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. J. gen. Microbiol. 23, 778-785
- Skulachev, V.P. y Kozlov, I.A. (1977)  $H^+$ -ATPase and membrane energy coupling. Biochim. Biophys. Acta 463, 29-59
- Skulachev, V.P. (1992) Chemiosmotic systems and the basic principles of cell energetics. En: Molecular Mechanisms in Bioenergetics (Editor. L. Ernster) Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. paginas 37-73
- Slater, E.C. (1963) Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain. Nature 178, 975-978
- Slooten, L. y Vandenbranden, S. (1989) ATP synthesis by proteoliposomes incorporating *Rhodospirillum rubrum*  $F_0F_1$ , as measured with firefly luciferase: dependence on delta mu and delta pH. Biochim. Biophys. Acta 976, 150-160
- Smith, L. y Baltschoffsky, M. (1956) Respiration and phosphorylation in extracts of *Rhodospirillum rubrum*. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 15, 357
- Smith, L. y Baltschoffsky, M. (1959) Respiration and light-induced phosphorylation in extracts of *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. J. 224, 1575
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallie, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. y Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using Bicincheninic acid. Anal. Biochem. 150, 76-85
- Solaini, G., Barraca, A., Castelli, G.P. y Strambini, G. (1993) Tryptophan phosphorescence as a structural probe of mitochondrial  $F_1$ -ATPase  $c$ -subunit. Eur. J. Biochem. 214, 729-734

- Soper, T.S., Jones, W.M. y Manning, J.M. (1970) Effects of substrates on the selective modification of the cysteinyl residues of D-Amino Acid Transaminase. *J. Biol. Chem.* **244**, 10901-10905
- Sosa, A. y Celis, H. (1983) Surface charge modifications do not affect the hydrolytic activity of membrane-bound Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **30**, 1135-1141
- Stackebrandt, E. (1985) Phylogeny and phylogenetic classification of prokaryotes. En: *Evolution of Prokaryotes* (Editores. K.H. Schleifer y E. Stackebrandt) Academic Press, Orlando Florida. páginas 309-334
- Stackebrandt, E., Murray, R.G.E. y Truper, H.G. (1988) *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "Purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 321-325
- Stanier, R.Y. y Cohen-Bazire, G. (1967) The role of light in the microbial world: some facts and speculations. En: *Microbial Ecology. Seventh Symposium of the Society for General Microbiology Held at the Royal Institution, London. Society for General Microbiology at the University Press, Cambridge.* páginas 56-89
- Stokes, D.L. y Nakamoto, R.K. (1984) Structures of P-type and F-type ion pumps. *Current Opinion in Structural Biology* **4**, 197-203
- Strid, Å., Nyrén, P., Boork, J. y Baltscheffsky, M. (1983) Kinetics of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *FEBS Lett.* **196**, 337-340
- Strid, Å. y Nyrén, P. (1989) Division of divalent cations into two groups in relation to their effect on the coupling of the  $F_0F_1$ -ATPase of *Rhodospirillum rubrum* to the protonmotive force. *Biochemistry* **28**, 9718-9724
- Telford, J.N., Langworthy, T.A. y Racker, E. (1984) Three proton pumps, morphology and movements. *J. Bioenerg. Biomembr.* **16**, 335-351
- Thomas, P.J., Bianchet, M., Garboczi, D.N., Hulihan, J., Amzel, L.M. y Pedersen, P.L. (1982) ATP synthase structure-function relationships. *Biochim. Biophys. Acta* **1101**, 226-231
- Thore, A., Koester, D.L., Shavit, N. y San Pietro, A. (1988) Effects of antibiotics on ion transport and photophosphorylation in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochemistry* **7**, 3499-3507
- Tiedge, H., Lunsdorf, H., Schafer, G. y Schairer, H.U. (1985) Subunit stoichiometry and juxtaposition of the Photosynthetic coupling factor 1: immunoelectron microscopy using monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7874-7878
- Tiedge, H. y Schafer, G. (1988) Symmetry in  $F_1$ -type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **977**, 1-9
- Tikhonova, G.V., Biketov, S.F., Kasho, V.N., Koslov, I.A., Miloykovskaya, E.I., Ostrovsky, D.N., Simakova, I.M. y Skulachev, V.P. (1983) Subunit composition of  $H^+$ ATPase from the anaerobic bacterium *Lactobacillus casei*. *Biokhimiya* **48**, 1560-1567
- Trchounian, A.A., Ogandjian, E.S. y Mironova, G.D. (1982) An electrochemical study of energy-dependent potassium accumulation in *E.coli*. Part XIII. On the interaction of  $H^+$ ATPase complex  $F_0F_1$  with Trk proteins in anaerobically grown cells. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **27**, 367-372
- Trchounian, A.A. (1984) A direct interaction between the  $H^+$ - $F_0F_1$ -ATPase and the  $K^+$  transport within the membrane of anaerobically grown bacteria. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **33**, 1-10
- Tsuprun, V.L., Mesyanshina, I.V., Koslov, I.A. y Orlova, E.V. (1984) Electron microscopy of beef heart mitochondrial  $F_1$ -ATPase. *FEBS Lett.* **167**, 285-290

- Teuprun, V.L., Orlova, E.V. y Mesyanshinova, I.V. (1989) Structure of the ATP-synthase studied by electron microscopy and image processing. *FEBS Lett.* **244**, 279-282
- van Niel, C.B. (1930) Photosynthesis of Bacteria. En: *Contributions to Marine Biology*. Stanford Univ. Press, Stanford, páginas 161-169
- van Niel, C.B. (1935) Photosynthesis of Bacteria. En: *Photochemical Reactions*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **3**, páginas 138-150
- van Niel, C.B. (1936) Les Photosynthèses Bactériennes. *Bull. Assoc. diplômés de microbiol. faculté pharm. Nancy*, **13**, 3-18
- van Niel, C.B. (1941) The bacterial Photosynthesizers and their importance for the general problem of Photosynthesis. En: *Advances in Enzymology Vol I*. (Editores. E.F. Nordy C.H. Werkman) Interscience Publishers, New York. páginas 263-328
- Vercesi, A.E., Hermes-Lima, M., Meyer-Fernandes, J.R. y Vieyra, A. (1990) Calcium inhibition of the ATP  $\rightarrow$  [ $^{32}$ P]Pi exchange and of net ATP synthesis by bovine submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta* **1020**, 101-106
- Vik, S.B. y Simoni, R.D. (1987) F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase from *Escherichia coli* with mutant F<sub>0</sub> subunits. Partial purification and immunoprecipitation of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> complexes. *J. Biol. Chem.* **262**, 8340-8346
- Vik, S.B., Cain, B.D., Chun, K.T. y Simoni, R.D. (1988) Mutagenesis of the  $\alpha$  subunit of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase from *Escherichia coli* mutations at Glu-196, Pro-190 y Ser-199. *J. Biol. Chem.* **263**, 6599-6605
- Vik, S.B. y Dao, N.N. (1992) Prediction of transmembrane topology of F<sub>0</sub> proteins from *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase using variational and hydrophobic moment analyses. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 199-207
- Villanueva, E., Luehrsen, K.R., Gibson, J., Delihias, N. y Fox, G.E. (1985) Phylogenetic origins of the plant mitochondrion based on a comparative analysis of 5S ribosomal RNA sequences. *J. Mol. Evol.* **23**, 46-52
- Walker, J.E., Saraste, M. y Gay, N.J. (1983) *E. coli* F<sub>1</sub>-ATPase interacts with a membrane protein component of a proton channel. *Nature* **306**, 867-869
- Walker, J.E., Saraste, M. y Gay, N.J. (1984) The *unc* operon nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **788**, 164-200
- Wang, J.H. (1984) Functionally distinct  $\beta$  subunits in F<sub>1</sub>-Adenosinetriphosphatase. *J. Biol. Chem.* **260**, 1374-1377
- Wang, J.H. (1988) Chemical modification of active sites in relation to the catalytic mechanism of F<sub>1</sub>. *J. Bioenerg. Biomembr.* **20**, 407-422
- Webster, G.D., Edwards, P.A. y Jackson, J.B. (1977) Interconversion of two kinetically distinct states of the membrane bound and solubilized H<sup>+</sup>-translocating ATPase from *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett.* **76**, 29-35
- Wise, J.G., Duncan, T.M., Latchney, L.R., Cox, D.N. y Senior, A.E. (1983) Properties of F<sub>1</sub>-ATPase from the *uncD412* mutant of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **215**, 343-350
- Wittinghofer, A. y Pai, E.F. (1991) The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *TIBS*, **16**, 382-387
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Madigan, M.T., Fowler, V.J., Hahn, C.M., Blanz, P., Gupta, R., Neelsen K.H. y Fox, G.E. (1984a) The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**, 315-326
- Woese, C.R., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Hahn, C.M., Taner, R.S., Krieg, N.R., Koops, H.-P., Harms, H. y Stackebrandt, E. (1984b) The phylogeny of purple bacteria: the beta subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**, 327-336

- Woese, C.R. (1987) Bacterial Evolution. *Microbiol Rev.* **51**, 221-271
- Worden, P.B. y Siström, W.R. (1964) The preparation and properties of bacterial chromatophore fractions. *J. Cell Biol.* **23**, 135-150
- Wraight, C.A. (1983) Current Attitudes in Photosynthetic research. En: "Photosynthesis" Vol I. (Editor Govindjee) Academic Press, New York, páginas 19-61
- Yamamoto, N. yoshimura, S., Higuti, T., Nishikawa, K. y Horio, T. (1972) Role of bound ADP in photosynthetic ATP formation by chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biochem.* **72**, 1397-1406
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J. y Woese, C.R. (1985) Mitochondrial Origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 4443-4447
- Yanyushin, M.F. (1988) Isolation and characterization of F<sub>1</sub>-ATPase from the Green nonsulfur photosynthesizing bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Biokhimiya* **53**, 1288-1295
- Yanyushin, M.F. (1991) ATP synthase of the Green nonsulfur photosynthesizing bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Biokhimiya* **56**, 1131-1139
- Yanyushin, M.F. (1993) Subunit structure of ATP synthase from *Chloroflexus aurantiacus*. *FEBS Lett.* **335**, 85-88
- Yen, G.S.L., Cain, B.D. y Kaplan, S. (1984) Cell-cycle-specific biosynthesis of the photosynthetic membrane of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Structural implications. *Biochim. Biophys. Acta* **777**, 41-55
- Yoshida, M., Allison, W.S., Esch, F.S. y Futai, M. (1982) The specificity of carboxyl group modification during the inactivation of the *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase with Dicyclohexyl<sup>14</sup>Ccarbodiimide. *J. Biol. Chem.* **257**, 10033-10037
- Yoshida, M. y Allison, W.S. (1983) Modulation by ADP and Mg<sup>2+</sup> of the inactivation of the F<sub>1</sub>-ATPase from the thermophilic bacterium, PS3 with dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* **258**, 14407-14412
- Yoshida, M. (1983) The synthesis of enzyme-bound ATP by the F<sub>1</sub>-ATPase from the thermophilic bacterium PS3 in 50% Dimethylsulfoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**, 907-912
- Zhuo, S., Garrod, S., Miller, P. y Allison, W.S. (1992) Irradiation of the bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase previously inactivated with 5'-p-Fluorosulfonylbenzoyl-8-azido-[<sup>3</sup>H] adenosine cross-links His-8427 to Tyr-8345 within the same  $\delta$  subunit. *J. Biol. Chem.* **267**, 12916-12927