

0036
6
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INHIBICION DE LA PIROFOSFATASA MEMBRANAL DE
Rhodospirillum rubrum POR TRIFENILESTAÑO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A

SILVIA ESCOBEDO MARTINEZ

26208
262066

DIRECTOR: Dra. Irma Romero Alvarez
CODIRECTOR: Dr. Heliodoro Celis Sandoval

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Fisiología Celular en el Departamento de Bioquímica UNAM., bajo la dirección y codirección de:
Dra. Irma Romero Alvarez
y
Dr. Heliodoro Celis Sandoval

El jurado designado por la Dirección de la Facultad de Ciencias (División de Estudios de Posgrado), que aprobó la presente tesis es el siguiente:

Dr. Heliodoro Celis Sandoval
Dr. Alfonso Miguel Torre Blanco
Dra. Irma Romero Alvarez
Dra. María del Rocío Cruz Ortega
Dr. Pedro Ulises Guadalupe Ostoa Saloma
M. en IBB. Jorge Alberto Pérez León
M. en IBB. Bertha María Josefina González Pedrajo

A mi madre por el gran apoyo y ayuda constante que siempre me ha brindado.

Reconocimiento

A la Dra. Irma Romero Alvarez, al Dr. Heliodoro Celis Sandoval y a la Maestra Guadalupe Oliva Ramírez por su gran ayuda y amistad.

Agradecimiento

- A los profesores del jurado por sus opiniones y sugerencias.
- A todas aquellas personas que me brindaron su apoyo y ayuda.
- El presente trabajo fue apoyado por el Donativo de DGAPA (PAPIIT IN 200195).

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

I INTRODUCCION

1.1.	Características de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	2
1.1.1.	Colocación Taxonómica	2
1.1.2.	Características Morfológicas de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	2
1.1.3.	Preparaciones de Membranas	3
1.2.	Hipótesis de Transducción de Energía	5
1.3.	Características del Pirofosfato	8
1.3.1.	El papel del Pirofosfato en el Metabolismo Celular	9
1.3.2.	Utilización del pirofosfato	14
1.4.	Las Pirofosfatasas	14
1.4.1.	Pirofosfatasa Citoplásmica	15
1.4.2.	Pirofosfatasa Membranal	15
	A) Pirofosfatasa Membranal de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	16
	B) Pirofosfatasa de Membrana Mitocondrial	24
	C) Pirofosfatasa de Membrana Vacuolar	27
1.5.	El Pirofosfato y la Pirofosfatasa de Membrana en la Evolución de los Mecanismos Transductores de Energía	30
1.6.	Antecedentes Directos.	32
1.6.1	Inhibidores de la Pirofosfatasa	32
1.6.2.	Efectos del Inhibidor Trifenilestaño	33
	OBJETIVO	35

II MATERIALES Y METODOS

2.1.	Cultivo de Bacterias	37
2.1.1.	Medios de Cultivo	37
2.1.2.	Siembra de Bacterias	40
2.1.3.	Cosecha de Bacterias	41
2.2.	Obtención de Cromatóforos	41
2.3.	Determinación de Proteína	42
2.4.	Solubilización de la Pirofosfatasa Membranal y Precipitación con Polietilenglicol	42
2.5.	Purificación Parcial de la Pirofosfatasa Citoplásmica	43
2.6.	Determinación de la Actividad Hidrolítica de la Pirofosfatasa	46
2.7.	Determinación de la Actividad Hidrolítica de la ATPasa	47

2.8.	Inhibición de la Actividad Pirofosfatasa y ATPasa por Trifenilestaño y DCCD	47
------	---	----

III RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.	Efecto del Trifenilestaño en la Pirofosfatasa Membranal de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	49
3.2.	Efecto del pH	52
3.3.	Sustrato Zn-PPi	52
3.4.	Efecto de la Concentración de Proteína	56
3.5.	Efecto del Trifenilestaño sobre las Propiedades Cinéticas de la Pirofosfatasa Membranal	58
3.6.	Efecto de los Compuestos Tiol en la Inhibición por Trifenilestaño	60
3.7.	Efecto del Trifenilestaño sobre la Pirofosfatasa Membranal Solubilizada	65
3.8.	Comparación entre la Inhibición por Trifenilestaño y DCCD	68

IV CONCLUSIONES

70

V BIBLIOGRAFIA

72

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ASB	Albúmina de suero bovino
Da	Daltones
CCCP	(p-triclorometoxi-carbonil-cianuro -fenilhidrazona)
DCCD	N, N' Diciclohexilcarbodiimida
[¹⁴ C]DCCD	N, N' Diciclohexilcarbodiimida marcada radioactivamente con carbono 14
DNasa	Desoxirribonucleasa
DTE	Ditioeritritol
DTT	Ditiotreitol
EDC	1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida
EDTA	Acido etilen diamino tetra acético
EGTA	Acido etilenglicol bis (amino-etil eter) N N' tetra acético
F ₀	Segmento hidrofóbico de la ATP sintetasa
F ₁	Segmento hidrofílico de la ATP sintetasa
H ⁺	Protón
H ⁺ ATPasa	ATP sintetasa de protones
HPLC	Cromatografia líquida de alta presión
IDP	Imidodifosfato

kDa	Kilodaltones
MDP	Metilendifosfato
MEGA-9	Nonanoil N-metilglucamida
MOPS	Acido morfolino propano sulfónico
NAD	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina
Nbf-Cl	4-cloro-7-nitrobenzo furazan
NEM	N-etilmaleimida
PEG	Polietilenglicol
Pi	Fosfato
PPi	Pirofosfato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCA	Acido tricloro acético
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
$\Delta_{\mu} H^+$	Potencial electroquímico de protones
ΔG°	Cambio de energía libre en condiciones estándar a pH 7.0

RESUMEN

INHIBICION DE LA PIROFOSFATASA MEMBRANAL DE

Rhodospirillum rubrum POR TRIFENILESTAÑO

La pirofosfatasa membranal de *Rhodospirillum rubrum* cataliza la hidrólisis y síntesis de pirofosfato de una manera acoplada a la translocación electrogénica de H^+ en un proceso reversible. Acerca de las características del canal de H^+ de la pirofosfatasa se sabe muy poco, por lo que el uso de inhibidores específicos de esta región sería útil para su caracterización.

Se han descrito algunos inhibidores del sitio activo de la pirofosfatasa membranal, como son NaF y los análogos del sustrato MDP e IDP. Sin embargo, como inhibidores del dominio hidrofóbico que bombea H^+ , sólo se han utilizado DCCD y dietilestilbestrol, los cuales tienen una amplia reactividad, lo que ha limitado su utilización. De tal forma que sería deseable encontrar otros inhibidores más específicos de esta región de la enzima.

El trifenilestaño inhibe a la ATP sintetasa mitocondrial a nivel del sector membranal F_0 inhibiendo la translocación de H^+ , por lo que en este trabajo, el objetivo fue probar el efecto del trifenilestaño sobre la pirofosfatasa membranal de *R. rubrum*, caracterizar su inhibición y analizar si ésta es a nivel del sitio activo o a nivel del canal de H^+ de la enzima. Finalmente comparar su efecto con el del DCCD.

Los resultados demuestran que el trifenilestaño inhibe la hidrólisis de la pirofosfatasa membranal de cromatóforos de una manera dependiente del pH, obteniendo un 100% de inhibición a pH 9.5. La inhibición producida sobre la pirofosfatasa de membrana es muy similar a la producida sobre la ATPasa de cromatóforos del mismo organismo. La pirofosfatasa citoplásmica de *R. rubrum* (que carece de canal de H^+) prácticamente no se inhibe. Los compuestos tiol (DTE y 2-mercaptoetanol) previenen la inhibición de la pirofosfatasa membranal por trifenilestaño, debido a una alteración del inhibidor y no a una modificación de grupos SH de la enzima.

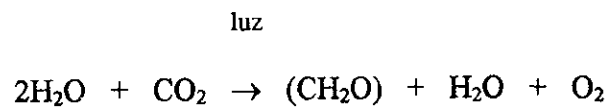
El efecto del trifenilestaño sobre la pirofosfatasa membranal es semejante con $Mg-PPi^{2-}$ o $Zn-PPi^{2-}$ como sustratos y la inhibición es dependiente de la concentración de proteína de los cromatóforos. El trifenilestaño inhibe a la pirofosfatasa membranal de los cromatóforos de forma no competitiva, modificando la V_{max} y no su K_m . El Mg^{2+} libre, que es un activador esencial de la enzima, no revierte la inhibición.

La pirofosfatasa membranal solubilizada también es inhibida por trifenilestaño, aunque con menor eficiencia. Por otro lado, bajo las condiciones experimentales usadas, el trifenilestaño es un inhibidor más efectivo que el DCCD, tanto en la membrana de los cromatóforos como en la enzima solubilizada.

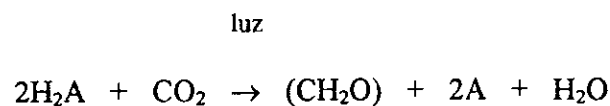
Los resultados indican que el sitio de acción del trifenilestaño no es el sitio activo de la enzima. En analogía con el efecto del trifenilestaño sobre la ATPasa y considerando que ambas enzimas se encuentran acopladas a un gradiente electroquímico de H^+ , se sugiere que el sitio de acción del trifenilestaño pueda ser el canal de H^+ de la pirofosfatasa, la identificación del sitio exacto en la proteína, responsable del pegado del trifeniestaño, requiere más evidencia experimental.

I INTRODUCCION

En el proceso fotosintético, la energía de la radiación electromagnética es transformada en energía química, ya sea en la membrana tilacoidal de los cloroplastos o en la membrana plasmática de las bacterias fotosintéticas. En la fotosíntesis oxigénica (que llevan a cabo las plantas y algunas cianobacterias) se produce oxígeno, el cual se libera durante la fotólisis del agua, de acuerdo a la siguiente reacción :



Sin embargo, existen bacterias que llevan a cabo fotosíntesis anoxigénica en donde no existe una liberación de oxígeno molecular, ya que el agua es reemplazada por otros reductores como el S_2 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, H_2S o por compuestos orgánicos, tales como malato, succinato, β -hidroxibutirato, etc. De tal manera, que el concepto moderno de fotosíntesis estaría correctamente representado por la siguiente reacción de oxido-reducción propuesta por Van Niel (1935):



donde A= donador de electrones

En la fotosíntesis, los eventos involucrados desde la captura de la luz hasta la síntesis de ATP, están comprendidos en cuatro etapas: 1) Captura de la energía radiante por los pigmentos cosechadores de la luz, 2) Transferencia de energía hacia el centro de reacción en donde ocurre el

proceso primario de separación de carga (energía de oxido-reducción), 3) Generación de un gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu\text{H}^+$), acoplado a las reacciones redox, 4) Utilización de la energía del gradiente electroquímico de protones para la síntesis de ATP, transporte de iones, solutos, etc. Es decir, la energía derivada de la luz es utilizada para sintetizar el ATP (fotofosforilación) por la ATP sintetasa, por medio de un circuito de protones análogo al de las mitocondrias y membranas bacterianas. Alternativamente, en la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*, la energía del gradiente electroquímico de protones se acopla a la síntesis de PPi a través de la H^+ pirofosfatasa de membrana (Baltschefskey, 1967a)

1.1. Características de *Rhodospirillum rubrum*

1.1.1. Colocación Taxonómica

La bacteria empleada en este trabajo es *Rhodospirillum rubrum*. De acuerdo a la clasificación de Woese (1987), Woese et al. (1990); la cual está basada en la similitud de la secuencias del ácido ribonucleico ribosomal, *R. rubrum* esta clasificada de la siguiente manera:

Dominio:	Bacteria
Phylum:	Bacterias Púrpuras
Subdivisión:	Alfa
Género:	Rhodospirillum
Especie:	rubrum.

1.1.2. Características Morfológicas de *Rhodospirillum rubrum*

a) Estructura: La forma de la célula es espiral, mide 0.8 μm de ancho por 7 a 10 μm de largo, tiene flagelos polares y es una bacteria gram negativa. Como todas las bacterias, presenta una pared celular separada por el espacio periplásmico, de la membrana celular (Crofts, 1974).

Cuando la bacteria es crecida en condiciones de iluminación, la membrana plasmática desarrolla invaginaciones que se denominan cromatóforos, éste sistema intracitoplásmico de membrana se toma en cuenta como un criterio de clasificación entre especies. En el espacio periplásmico hay proteínas que participan en la cadena de transporte de electrones, por ejemplo el citocromo c_2 .

b) Crecimiento: La bacteria *R. rubrum* es aeróbica facultativa. El crecimiento anaeróbico ocurre en la luz mediante fotosíntesis y el aeróbico en la obscuridad con obtención de la energía de la oxidación de compuestos orgánicos. El color del cultivo es rojo en condiciones fotosintéticas y color rosa en condiciones respiratorias, requiere como factor de crecimiento a la biotina. Su reproducción es asexual por bipartición.

c) Otras características: Las quinonas que contiene son ubiquinona₁₀ y rodoquinona. El carotenoide predominante es espiriloxantina. El espectro total de las células es único en dos aspectos: 1) tiene una banda de absorción prominente a los 550 nm debido a la espiriloxantina (caroteno) y 2) una banda de absorción sencilla y simétrica de bacterioclorofila a los 885 nm.

1.1.3. Preparaciones de Membrana

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

a) Preparación de esferoplastos o protoplastos. La pared puede ser digerida por tratamiento con lisozima (Karunairatnam et al., 1958), quedando intacta la membrana plasmática. Mediante este tratamiento los constituyentes citoplásmicos son retenidos en el interior y se eliminan los componentes periplásmicos como el citocromo c_2 (Fig. 1 B).

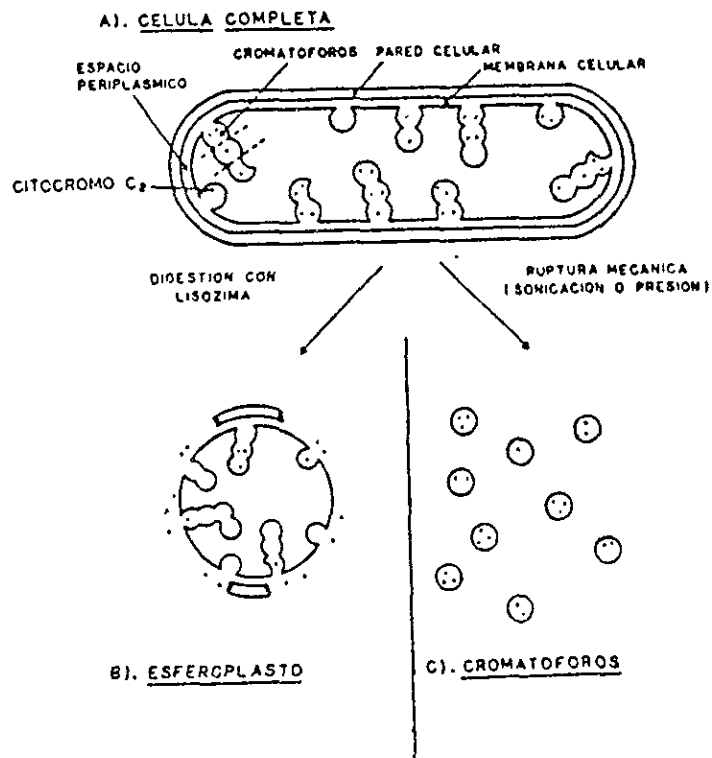


Fig. 1 Esquema General de Bacterias Fotosintéticas que Muestra la Obtención de Cromatóforos y Esferoplastos a Partir de la Célula Entera. Tomado de Crofts, (1974).

b) Preparación de cromatóforos. Los cromatóforos son aislados mediante la ruptura mecánica de las bacterias (Schachmann et al., 1952; Newton y Newton, 1957). En la figura 1, se observa el diagrama para la obtención de esta preparación, donde se muestra que se obtienen vesículas membranales selladas que contienen en el interior al citocromo c_2 (Fig. 1 C). Su tamaño aproximado es de 100 nm y tienen una polaridad inversa a la de la membrana de la bacteria íntegra o del esferoplasto (Mitchell, 1967 y Scholes et al., 1969).

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

La preparación de cromatóforos es de especial interés ya que contiene al aparato fotofosforilante y, por tanto, a la ATP sintetasa y a la pirofosfatasa de membrana, ambas acopladas al gradiente electroquímico de H^+ , por esta razón en este trabajo se utilizaron cromatóforos .

1.2. Hipótesis de Transducción de Energía

El tema central de la Bioenergética en los últimos treinta años ha sido el entender los mecanismos por los cuales la energía de la oxidación de sustratos, o la proveniente de la absorción de la luz, se acopla a la síntesis de ATP.

Aunque la síntesis de ATP ocurre en sistemas enzimáticos solubles, la producción principal de ATP está asociada a complejos enzimáticos ligados a ciertos tipos de membranas llamadas “membranas transductoras de energía”, como la membrana plasmática de las células procarióticas, la membrana mitocondrial interna y la membrana tilacooidal del cloroplasto (Nicholls, 1982).

Peter Mitchell propuso, en 1961, la hipótesis quimiosmótica para explicar el acoplamiento entre la transferencia de electrones y la síntesis de ATP en las membranas transductoras de energía. Esta hipótesis utiliza conceptos de fisiología de membrana, de bioquímica tradicional y de reacciones vectoriales que dan lugar a la transferencia de grupos químicos a través de la membrana (Mitchell, 1961, 1967). Mitchell postuló que el flujo de electrones sucede en una membrana cerrada que es poco permeable a protones (H^+). El arreglo de las moléculas que transfieren electrones e hidrógenos es alternado, de tal forma que a una molécula acarreadora de electrones le sigue una de hidrógenos y así sucesivamente. El H^+ necesario para formar hidrógeno con el electrón se toma en un lado de la membrana y al encontrarse con un acarreador de electrones, se suelta del otro lado de la membrana, produciéndose así un gradiente de H^+ formado por dos componentes: el químico y el eléctrico. La energía total del gradiente de H^+ es la suma de ambos componentes y es la llamada fuerza protonmotriz. Esta es la fuerza que se utiliza para la síntesis de ATP mediante la acción de una enzima de membrana denominada H^+ -ATP sintetasa, que forma el ATP a través de un flujo inverso de H^+ (Fig.2).

Esta hipótesis explica el mecanismo de transducción energética en bacterias, mitocondrias y sistemas fotosintéticos como cloroplastos y bacterias fotosintéticas. Así mismo, se puede extender para explicar el transporte de iones en la membrana plasmática de las células eucarióticas.

Muchas investigaciones han mostrado que los postulados básicos de esta hipótesis son ciertos; sin embargo, algunos detalles siguen en controversia, especialmente en lo que se refiere al mecanismo de síntesis de ATP por la H^+ -ATP sintetasa (Boyer et. al., 1977; Boyer, 1993).

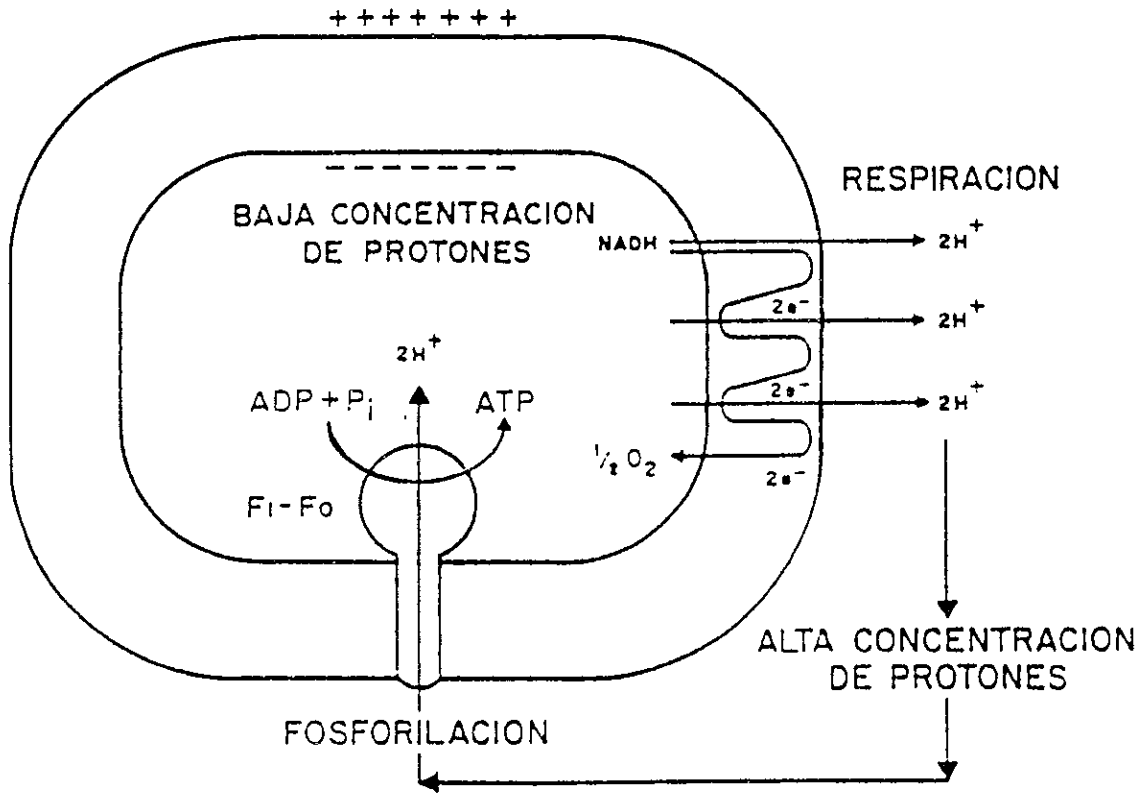


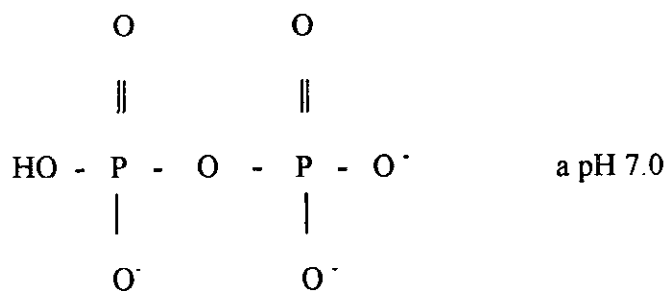
Fig. 2 Acoplamiento entre la Fosforilación y el Transporte de Electrones. La teoría quimiosmótica propone un bombeo de H^+ hacia un lado de la membrana por la cadena transportadora de electrones durante la respiración, creando un gradiente electroquímico de H^+ , el cual es utilizado por la H^+ -ATP sintetasa para sintetizar ATP.

A la fecha se conoce solamente un sistema alternativo a la ATP sintetasa, en las membranas transductoras de energía, éste sistema es la pirofosfatasa membranal y se descubrió en los cromatóforos de las bacterias fotosintéticas. Esta enzima puede usar el gradiente electroquímico de H^+ para sintetizar PPi (Baltscheffsky et al, 1966). Su actividad es reversible, o sea, al hidrolizar PPi genera un gradiente electroquímico y en este sentido es semejante a la H^+ ATPasa.

La ATP sintetasa es una enzima compleja tanto en su estructura oligomérica (8 subunidades al menos) como en su mecanismo cinético y en su regulación (ver Senior, 1988, Futai et al, 1989 y Boyer, 1997, para revisiones detalladas al respecto). En cambio, la pirofosfatasa aparenta ser una enzima más simple, tanto estructuralmente (1 solo polipéptido que contiene el sitio catalítico y el canal de H^+), como en los reactivos y productos que intervienen en la reacción que cataliza (Pi y PPi), por lo que el estudio de este sistema es una opción para el estudio de la transducción energética y de los mecanismos de síntesis de uniones covalentes de alta energía.

1.3. Características del Pirofosfato

El pirofosfato es el compuesto químico más simple que contiene una unión fosfoanhídrido



Esta unión fosfoanhídrida es la forma química básica en la cual se transmite la energía en las células. Para entender el significado biológico del pirofosfato es necesario conocer algunos aspectos termodinámicos de su hidrólisis, particularmente en las condiciones de pH y fuerza

iónica semejantes a la de las células. Debido a la alta afinidad del grupo PPi por cationes divalentes y a las concentraciones relativamente altas de Mg^{2+} en el citoplasma, el pirofosfato probablemente se encuentra presente en las células formando un complejo 1:1 con el Mg^{2+} (Lahti, 1983).

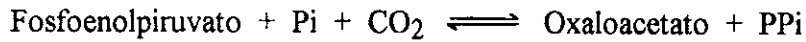
La energía libre de la hidrólisis (ΔG°) del pirofosfato es cercana a la del enlace gamma del fosfato del ATP, sin embargo en presencia de Mg^{2+} , el ΔG° para el pirofosfato se vuelve menos negativo, debido a que el producto de su hidrólisis (2Pi) no forma complejo fuertemente con el Mg^{2+} , a diferencia del ATP en donde el producto (ADP) sí se une fuertemente al Mg^{2+} (Sillén y Martell, 1971). Flodgaard y Fleron (1974) obtuvieron valores muy precisos de ΔG° para la hidrólisis del PPi a pH 7.4 y 25 °C. En presencia de Mg^{2+} , el $\Delta G^{\circ} = -4 \text{ Kcal mol}^{-1}$ pero en ausencia de Mg^{2+} el $\Delta G^{\circ} = -5.7 \text{ Kcal mol}^{-1}$. De Meis (1984) reportó valores similares a los anteriores y encontró que la K observada y el ΔG° de la hidrólisis del PPi varían considerablemente dependiendo del pH y la concentración de catión divalente en el medio.

Teniendo en cuenta sus propiedades termodinámicas, no hay razón para excluir al pirofosfato como una posible fuente de energía para las células.

1.3.1. El Papel del Pirofosfato en el Metabolismo Celular

En general se consideraba un dogma bioquímico que el PPi producido en muchas reacciones biosintéticas (síntesis de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, urea, lípidos) era un producto secundario que debía ser hidrolizado inmediatamente por la pirofosfatasa inorgánica localizada en el citoplasma de las células, para hacer a estas reacciones biosintéticas energéticamente favorables (Kornberg, 1957). De tal forma que la energía del enlace anhidro del PPi no sería utilizada.

En 1962, se inició un nuevo capítulo en la historia del papel del pirofosfato, con el hallazgo de Sui y Wood de la enzima carboxitransfosforilasa que utiliza PPi en la bacteria *Propionibacterium shermanii* y que cataliza la reacción:



Otro ejemplo de una enzima que utiliza PPi fue reportado en 1968 por tres laboratorios independientemente (Evans y Wood, 1968; Hatch y Slack, 1968; Reeves, 1968). Estos investigadores descubrieron la piruvato fosfato dicinasa, que cataliza la siguiente reacción tanto, en microorganismos como en plantas:



Posteriormente se han identificado más reacciones enzimáticas en las que el PPi sustituye al ATP o que son dependientes de PPi. En la Tabla 1 se muestran estas reacciones, así como los organismos en los que se han detectado, algunas de ellas son responsables de la fosforilación de intermediarios esenciales de la glucólisis y gluconeogénesis (Baltscheffsky y Nyrén, 1984). Así mismo se encontró, que la glucosa-6 fosfatasa del hígado es capaz de llevar a cabo la síntesis de glucosa 6-fosfato en una reacción dependiente de PPi (Lawson y Veech, 1979). También se descubrió que estas enzimas dependientes de PPi están ampliamente distribuidas en plantas (Edwards et. al., 1985). En resumen, estos hallazgos muestran que el pirofosfato puede usarse como donador de energía para muchas reacciones y que en algunas otras puede ser utilizado, incluso, en lugar del ATP.

Es posible que las reacciones químicas que utilizan la energía del PPi estén más extendidas de lo que se ha mencionado en la Tabla 1. Por otra parte, la idea de que la irreversibilidad de los

Tabla 1

Reacciones en las que el PPi se Utiliza como Donador de Energía

	REACCION	ENZIMA
1	$\text{PPi} + \text{oxaloacetato} \rightleftharpoons \text{P-enolpiruvato} + \text{Pi} + \text{CO}_2$	Carboxitransfosforilasa
	$\text{ATP} + \text{oxaloacetato} \rightleftharpoons \text{P-enolpiruvato} + \text{ADP} + \text{CO}_2$	P-enolpiruvato carboxicinasa
2	$\text{PPi} + \text{AMP} + \text{P-enolpiruvato} \rightleftharpoons \text{piruvato} + \text{ATP} + \text{Pi}$	Piruvato, fosfato dicinasa
	$\text{ADP} + \text{P-enolpiruvato} \rightleftharpoons \text{piruvato} + \text{ATP}$	Piruvato cinasa
3	$\text{PPi} + \text{fructosa-6-P} \rightleftharpoons \text{fructosa-1,6-diP} + \text{Pi}$	PPi fosfofructocinasa
	$\text{ATP} + \text{fructosa-6-P} \rightleftharpoons \text{fructosa-1,6-diP} + \text{ADP}$	ATP fosfofructocinasa
4	$\text{PPi} + \text{acetato} \rightleftharpoons \text{acetilfosfato} + \text{Pi}$	PPi acetilcinasa
	$\text{ATP} + \text{acetato} \rightleftharpoons \text{acetilfosfato} + \text{ADP}$	ATP acetilcinasa
5	$\text{PPi} + \text{serina} \rightleftharpoons \text{fosfoserina} + \text{Pi}$	PPi serina cinasa
6	$\text{ATP} + \text{Sulfato} \rightleftharpoons \text{APS} + \text{PPi}$	ATP - sulfurilasa
	$\text{acetato} + \text{PPi} \rightleftharpoons \text{acetilfosfato} + \text{Pi}$	acetato: PPi fosfotransferasa
	$\text{ADP} + \text{acetilfosfato} \rightleftharpoons \text{acetato} + \text{ATP}$	acetato cinasa
7	$\text{ATP} + \text{acilato} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{PPi} + \text{acil-CoA}$	Acetil-CoA sintetasa
8	$\text{glucosa} + \text{PPi} \longrightarrow \text{glucosa 6-P} + \text{Pi}$	glucosa 6-fosfatasa

(Continúa en la siguiente página)

Continuación de la Tabla 1

Organismos en que se presenta la reacción	No. de la reacción	Referencia bibliográfica *
<i>Propionibacterium shermanii</i>	1-3,5,7	a,b,k,p,o,n
<i>Entamoeba histolytica</i>	1-4	a,b,p
<i>Pseudomonas marina</i>	3	c
<i>Alcaligenes</i>	3	c
<i>Bacteroides fragilis</i>	3	d
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	3,2	e,j
Hojas de piña	3	f
Caña de azúcar	2	g
<i>Bacteroides symbiosus</i>	2	h
<i>Acetobacter xylinum</i>	2	i
<i>Desulfotomaculum</i>	6	l,m
Organismos que tienen como productos metabólicos finales acetato, propionato y butirato	7	n
Hígado	8	q

* REFERENCIAS DE LA TABLA 1

- a) O'Brien, W.E. y Bowien, S. (1975) Fed. Proc. 34: 641.
- b) Reeves, R.E., South, D.J., Blytt, H.J. y Warren, L.G. (1974) J Biol. Chem 249: 737-7741.
- c) Sawyere, M.H., Baumann, P. y Baumann, L. (1977) Arch. Microbiol. 112: 169-172.
- d) Macy, J.M., Ljungdahl, L.G. y Gottschalk, G. (1978) J. Bacteriol. 134: 84-91.
- e) Pleidere, C y Klemme, J.H. (1980) Z. Naturforsch.35C: 229-238.
- f) Carnal, N.W. y Black, C.C. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 86: 20-26.
- g) Hatch, M.D. y Slack, C.R. (1968) Biochem. J. 106: 141.
- h) Reeves, R.E., Menzies, R.A. y Hsu, D.S. (1968) J. Biol. Chem. 243: 5468
- i) Benziman, M. y Palgi, A. (1970) J. Bacteriol. 104:24.
- j) Buchanan, B.B. (1974) J. Bacteriol. 119: 1066-1068.
- k) Reeves, R.E. (1968) J. Biol. Chem. 243: 3203.
- l) Liu, C.L. y Peck, H.D. Jr. (1981) J. Bacteriol. 145: 966.
- m) Liu, C.L., Hart, N. y Peck, H.D. Jr. (1982) Science. 217: 363-364.
- n) Reeves, R.E. (1976) TIBS. 1: 53-55.
- o) Cagn, L.M. y Friedmann, H C (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 33: 528-533.
- p) Wood, H.G. (1977) Fed. Proceedings. 36: 2197-2205.
- q) Lawson, J.W.R. y Veech, R.L. (1979) J. Biol. Chem. 254: 6528-6537.

procesos biosintéticos depende de que el PPi sea hidrolizado y por tanto de la presencia de una baja concentración de PPi celular, no concuerda con la evidencia experimental. Esto resultó ser más claro cuando se pudo cuantificar la cantidad de PPi en las células.

La concentración de PPi en diferentes células (entre ellas de microorganismos, de animales y de plantas) se encuentra entre 0.1 y 2 mM (Baltscheffsky y Nyrén, 1984). Un caso sobresaliente es el de la arqueobacteria *Methanobacterium thermoautotrophicum* que contiene una concentración de PPi que va de 2.5 a 40 mM en diferentes condiciones de cultivo (Keltjens et al., 1988). Como se puede observar, la concentración de PPi es comparable a la de otros intermediarios del metabolismo energético, tales como el ATP, 2 a 10 mM (Matthews et al., 1982; Zweier y Jacobus, 1987).

El hecho más sobresaliente en la historia del papel del PPi como donador de energía se estableció cuando H. Baltscheffsky y von Stedingk (1966) detectaron la síntesis del PPi dependiente de luz por una pirofosfatasa membranal en la bacteria fotosintética púrpura no sulfurosa *Rhodospirillum rubrum*. La síntesis de PPi acoplada a la cadena respiratoria también se describió en mitocondrias de levadura, de animales y de plantas (Mansurova et al., 1975 b) y el acoplamiento a la cadena de transporte fotosintético fue encontrado en cloroplastos de plantas (Rubtsov et al., 1976).

Otro descubrimiento importante en los últimos años fue la identificación del transporte de PPi a través de la membrana interna mitocondrial en intercambio por ADP vía el translocador de nucleótidos de adenina (Krämer, 1985), así como la generación de un potencial electroquímico a expensas de la energía liberada por la hidrólisis de PPi, a través de las membranas de bacterias

fotosintéticas (Moyle et al., 1972), de la membrana interna de la mitocondria y de las membranas de plantas (Rea y Poole, 1985; Wang et al., 1986).

Estas evidencias acumuladas muestran que el PPI no es solamente un producto secundario de las reacciones de pirofosforólisis, sino que es un compuesto energético que juega un papel importante en los organismos. Por lo tanto, aquel dogma bioquímico es insostenible .

1.3.2. Utilización del Pirofosfato

Tomando en consideración lo anterior, podemos decir que el pirofosfato producido por la célula puede seguir los siguientes caminos:

a) Ser hidrolizado por la pirofosfatasa citoplásmica o soluble, donde la energía liberada de la hidrólisis del enlace anhídrido se pierde como calor.

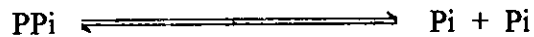
b) Ser hidrolizado por la pirofosfatasa de membrana translocadora de H^+ como la de la bacteria fotosintética *R. rubrum*. La energía del gradiente electroquímico producido al hidrolizarse el PPI por esta enzima puede ser utilizado para mantener varias reacciones dependientes de energía como son: la reversa de transporte de electrones (Baltscheffsky, 1967) , la transhidrogenación (Keister y Yike, 1967a), la reducción de NAD^+ (Keister y Yike, 1967b) y la síntesis de ATP (Keister y Minton, 1971).

c) Puede ser utilizado directamente como fuente de energía en reacciones metabólicas o sustituir al ATP como donador de energía (Tabla 1).

1.4. Las Pirofosfatasas

La pirofosfatasa es una enzima que cataliza la hidrólisis y la síntesis de pirofosfato, de acuerdo con la siguiente reacción:

pirofosfatasa



Existen dos tipos de pirofosfatasa en la célula, una citoplásmica y otra membranal. La citoplásmica solo hidroliza PPi, mientras que la pirofosfatasa membranal sintetiza e hidroliza PPi de una manera acoplada a la energía de la cadena de transporte de electrones.

1.4.1. Pirofosfatasa Citoplásmica

La pirofosfatasa citoplásmica es una enzima ubicua en la naturaleza. Esto se entiende claramente si se considera su importancia en el metabolismo celular, al desplazar el equilibrio de las reacciones biosintéticas en el sentido termodinámicamente favorable (Körnberg, 1957). El mecanismo de reacción, las propiedades estructurales y las propiedades cinéticas de esta importante enzima han sido estudiadas principalmente en la pirofosfatasa de levadura (Cooperman, 1982) También se ha descrito su caracterización molecular, se ha secuenciado el gen y se ha determinado su localización cromosomal (Kolakowski et al., 1988). En levadura, esta enzima es un homodímero con 285 aminoácidos y un peso molecular de 32,042 Da por subunidad. Cataliza la hidrólisis de PPi, el intercambio Pi-H₂O y el intercambio Pi-PPi ; para llevar a cabo estas actividades requiere de Mg²⁺ para formar el sustrato Mg-Pi o Mg-PPi, además de unir dos átomos de Mg²⁺ a sitios reguladores de la enzima (Barry y Dunaway-Mariano, 1987).

1.4.2. Pirofosfatasa Membranal

Se pueden distinguir tres tipos de Pirofosfatasa de membrana :

- A) la del tipo de la bacteria *Rhodospirillum rubrum*
- B) la de mitocondria
- C) la de vacuola

Todas ellas tienen como característica común ser enzimas transductoras de energía; es decir, para llevar a cabo su función se encuentran acopladas al gradiente electroquímico de H^+ generado por la cadena transportadora de electrones, de una manera semejante a la H^+ -ATP sintetasa.

A continuación se describirán las principales características de cada una de ellas.

A) Pirofosfatasa Membranal de *Rhodospirillum rubrum* .

La primera pirofosfatasa de membrana que se reportó fue la de la bacteria fotosintética *R. rubrum* (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966). Sin embargo, ahora se tiene conocimiento de que también está presente en la membrana de otras bacterias fotosintéticas como *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodopseudomonas viridis* y *Chromatium vinosum*.

La enzima de *R. rubrum* es la pirofosfatasa, de tipo membranal, más extensamente estudiada en cuanto a su función. Esta enzima puede llevar a cabo las siguientes reacciones parciales: a) Síntesis de PPI, b) Hidrólisis de PPI, c) Intercambio Pi-PPI y d) Recambio Pi- H_2O , las cuales han permitido conocer más acerca del mecanismo de reacción de la enzima.

a) Síntesis de Pirofosfato

En los cromatóforos (vesículas de membrana con polaridad invertida respecto al organismo) de la bacteria *R. rubrum*, se lleva a cabo la formación de PPI. Esta síntesis se efectúa utilizando la energía del gradiente electroquímico de H^+ generado por el transporte de electrones fotosintético (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966) (Fig. 3). La reacción tiene un pH óptimo de 7.5 y requiere iones Mg^{2+} (Guillory y Fisher, 1972). La síntesis de PPI es inhibida por antimicina (inhibidor del transporte de electrones) y desacoplantes (disipadores del gradiente electroquímico), pero no por oligomicina (inhibidor de la ATPasa), que por el contrario, la estimula (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966).

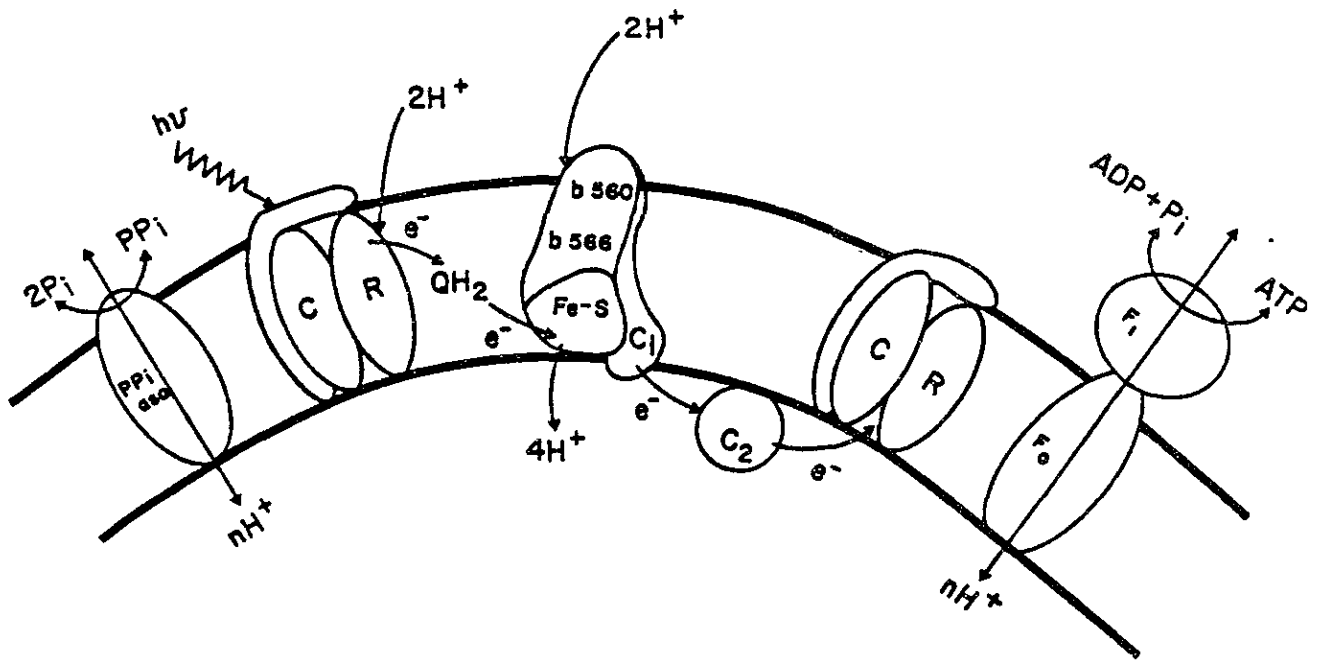


Fig. 3 Esquema de la Transducción Energética en la Bacteria Fotosintética *Rhodospirillum rubrum*. Se muestra a la pirofosfatasa (PPiase), al Centro de Reacción Fotoquímico (CR), a la cadena de transporte de electrones y a la ATPasa en la membrana del cromatóforo. QH₂: ubiquinol, b₅₆₀: citocromo b₅₆₀, b₅₆₆: citocromo b₅₆₆, Fe-S: proteína hierro-azufre de Rieske, c₁: citocromo c₁, c₂: citocromo c₂, F₁: parte hidrofílica de la ATPasa (catalítica), F₀: parte hidrofóbica de la ATPasa (canal de H⁺).

Guillory y Fisher (1972) encontraron que el patrón de saturación de luz para la síntesis del PPi es diferente al de la formación de ATP por la ATP sintetasa, que coexiste con la pirofosfatasa en la membrana de los cromatóforos. Estos autores demostraron además que la formación de PPi se satura a menor intensidad luminosa que la requerida para la síntesis de ATP. Hay que tener en cuenta que *R. rubrum* crece en condiciones naturales a bajas intensidades luminosas, lo que puede sugerir que esta vía alterna, que sintetiza PPi, tenga un significado fisiológico importante.

Recientemente se ha descrito un método para cuantificar la cantidad de PPi sintetizado, que utiliza enzimas acopladas (Nyrén y Lundin, 1985). Utilizando éste método se ha encontrado que se puede inducir la síntesis de PPi por gradientes artificiales de pH o eléctricos (Strid et al., 1987). A diferencia de lo que sucede con la síntesis de ATP inducida por este tipo de gradientes, la síntesis de PPi no necesita un umbral de potencial de membrana para llevarse a cabo; esto sugiere que requiere una fuerza protonmotriz menor que la necesaria para la síntesis de ATP, reflejando un menor ΔG° de la reacción, o bien, que la pirofosfatasa requiere un menor número de H^+ que la H^+ -ATP sintetasa (Strid et al., 1987). Otra posibilidad para explicar este dato sería que, a diferencia de la H^+ -ATP sintetasa la pirofosfatasa carece de un inhibidor natural (Schwerzmann y Pedersen, 1986)

Estudios comparativos de la H^+ -ATP sintetasa con la pirofosfatasa (Nyrén et al., 1986), reportan que a bajas intensidades de luz (10 W/m^2), la velocidad de síntesis de PPi es el doble que la del ATP y que ambas actividades compiten por el gradiente de H^+

La síntesis de PPi y la de ATP utilizan aparentemente el mismo sitio de acoplamiento en la cadena de transporte de electrones, ya que en la oscuridad se puede inducir un flujo reverso de

electrones por la hidrólisis de cualquiera de los dos compuestos. El resultado de esta reacción es una reducción de citocromo b y la oxidación de citocromo c₂ (Baltscheffsky, 1968).

b) Hidrólisis de PPi

Esta reacción se lleva a cabo fundamentalmente en condiciones de oscuridad y la enzima requiere iones Mg²⁺ no sólo para formar el complejo Mg-PPi, que es el sustrato de la enzima, sino también como activador (Randahl, 1979; Celis et al., 1985). La actividad hidrolítica está parcialmente reprimida en la luz, aún en condiciones en las que no hay síntesis de PPi (Nishikawa et al., 1973). Es inhibida por Pi, NaF, por los análogos de PPi: IDP y MDP, así como por butanol, en *R. rubrum* la actividad de hidrólisis de la pirofosfatasa es considerablemente más alta que la de la H⁺-ATP sintetasa y sólo se igualan cuando ambas actividades se estimulan por desacoplantes (Baltscheffsky, 1969b). El pH óptimo para la reacción de hidrólisis es de 6.5 (Celis y Romero, 1987).

La pirofosfatasa transloca H⁺ a través de la membrana en una reacción acoplada a la hidrólisis de PPi, dejando el interior del cromatóforo cargado positivamente con respecto al exterior, de manera semejante a como lo hace la H⁺-ATP sintetasa. La estequiometría H⁺/PPi reportada para la hidrólisis de PPi es de 2 (Sosa y Celis, 1995).

Asociadas a la hidrólisis de PPi y a la correspondiente formación de gradiente de H⁺, se han descrito varias reacciones dependientes de energía que incluyen: la transhidrogenación (Keister y Yike, 1967a), la reducción de los citocromos b y c (Baltscheffsky, 1967), la reducción de NAD⁺ ligada a succinato (Keister y Yike, 1967b), el bombeo de H⁺ (Moyle et al., 1972), y la formación de ATP dirigida por PPi (Keister y Minton, 1971) (Fig. 4). Estos datos indican que la pirofosfatasa media la

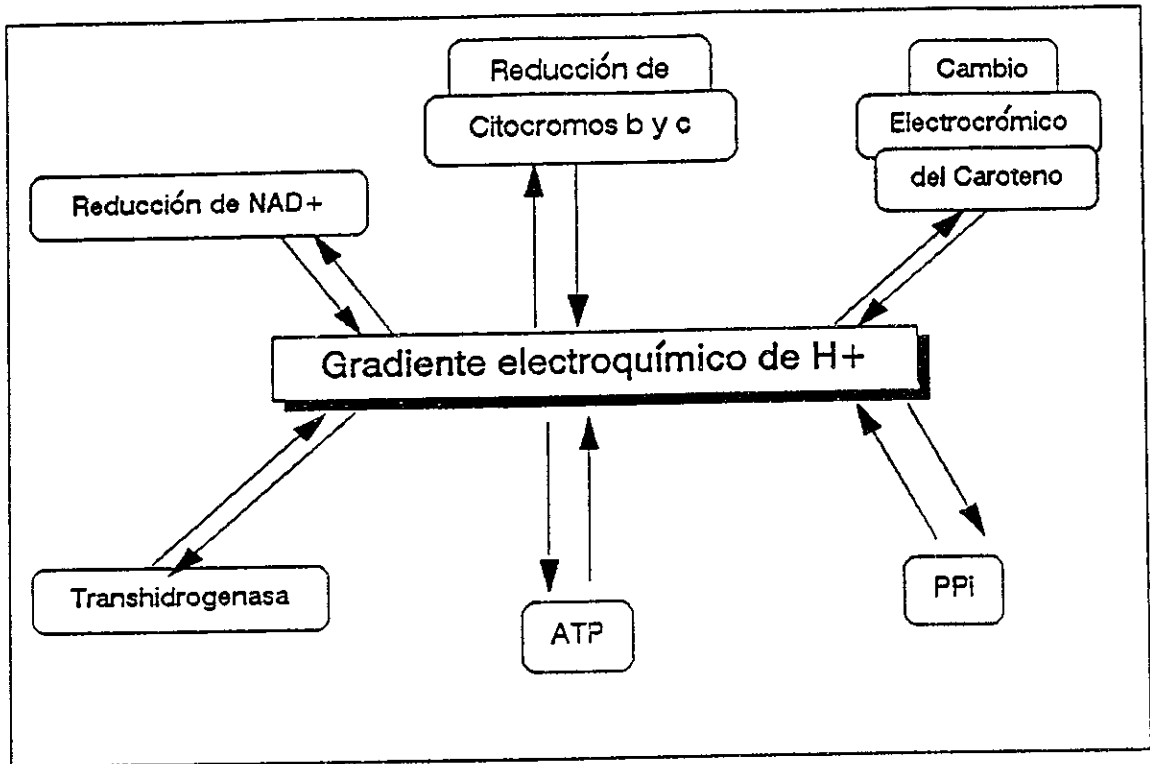


Fig. 4 Reacciones Dependientes o Asociadas al Gradiente Electroquímico de H^+ .

transducción de energía entre la síntesis (o la hidrólisis) de PPI y otras reacciones que generan (o que consumen) energía en la membrana.

c) Intercambio Pi-PPI

Keister y Minton (1971), encontraron que los cromatóforos de *R. rubrum* catalizan el intercambio Pi-PPI en la oscuridad. La reacción es inhibida por desacoplantes de la fosforilación tales como CCCP, el antibiótico S-13, el MDP y el NaF; teniendo un pH óptimo de 8.0. Se estimula por oligomicina y se inhibe por adición de ADP. El intercambio requiere iones Mg^{2+} para formar el complejo Mg-Pi, que es el sustrato verdadero para la reacción, y también Mg^{2+} libre para obtener la máxima actividad. Se requiere aproximadamente de un 75% de PPI hidrolizado para alcanzar el recambio máximo. (Celis et al , 1985).

Celis y Romero (1987), encontraron que otros cationes divalentes como el Mn^{2+} y el Co^{2+} pueden mantener la reacción de intercambio sustituyendo al Mg^{2+} , pero con una eficiencia del 50%. Por otro lado, cationes libres como el Zn^{2+} y el Fe^{2+} ejercen un efecto inhibitorio sobre la reacción.

d) Intercambio Pi-H₂O

Los cromatóforos de *R. rubrum* catalizan un rápido recambio del oxígeno del pirofosfato por el oxígeno del agua. Esta reacción es inhibida por inhibidores de la pirofosfatasa de membrana como el NaF y el MDP (Harvey y Keister 1981). Se requiere de $MgCl_2$ en una relación Mg^{2+}/Pi de 0.8 para alcanzar las velocidades óptimas.

Harvey y Keister (1981), utilizando inhibidores específicos, encontraron que esta actividad de intercambio se debe exclusivamente a la PPIasa membranal, a pesar de que la ATP sintetasa tiene el potencial suficiente para llevarla a cabo.

El desacoplante CCCP no presenta un gran efecto sobre la reacción, por lo que podría sugerirse que el intercambio Pi-H₂O no depende de un gradiente de protones. Esto podría estar apoyado por el hecho de que la luz no estimula el recambio

Regulación de la enzima membranar por cationes divalentes

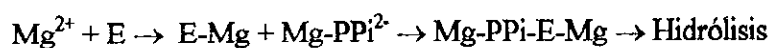
Como todas las pirofosfatasa, citoplásmicas y membranales, la pirofosfatasa de membrana de *R. rubrum* requiere Mg²⁺ para que se formen sus sustratos, Mg-PPi para la hidrólisis o Mg-Pi para la síntesis (Lahti, 1983). Sin embargo, parece que el Mg²⁺ libre ejerce también un papel regulatorio sobre las propiedades catalíticas de la enzima.

Randahl (1979) reportó que el Mg²⁺ libre puede actuar como activador en la hidrólisis de PPi y que este catión puede unirse a la pirofosfatasa y protegerla contra la inhibición causada por agentes como NEM y Nbf-Cl.

Otros cationes divalentes libres también pueden inducir cambios en las propiedades cinéticas de la enzima. Por ejemplo el Zn²⁺ puede formar el complejo Zn-PPi (tan buen sustrato como el Mg-PPi) y cuando está en forma libre inhibe la hidrólisis y el intercambio Pi-PPi (Celis y Romero, 1987, Romero y Celis 1995).

Ordaz et al. (1992), indican que la presencia de Mg²⁺ y Zn²⁺, no sólo protegen a la enzima de su desnaturalización a 70 °C sino que además la activa. Al ser solubilizada la enzima se sigue observando este efecto protector hasta temperaturas de 65°C. Los datos anteriores sugieren la existencia de un sitio regulador en la enzima para estos cationes divalentes.

Mediante estudios cinéticos se ha encontrado (Sosa et al., 1992) que el Mg²⁺ libre es un activador esencial y ordenado de la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa de membrana, donde primero debe entrar el Mg²⁺ a la enzima para después incorporarse el sustrato Mg-PPi²⁻ y así poder hidrolizarse:



Mediante estudios de modificaciones químicas se ha determinado que el sitio para Mg^{2+} libre está dentro o muy cercano al sitio activo (Romero y Celis, 1992).

Canal de H^+ de la Pirofosfatasa Membranal

El hecho de que la pirofosfatasa transporte H^+ acoplada al gradiente electroquímico de H^+ , indica que contiene un canal de H^+ . Las características de este canal han sido muy poco estudiadas y no se sabe prácticamente nada acerca del camino de los H^+ .

El DCCD inhibe a la pirofosfatasa (Nyrén et al, 1991; Baltscheffsky et al, 1992) y en analogía con su efecto en la ATP sintetasa (Sebald y Wachter, 1978), su sitio de inhibición debe ser algún carboxilo de su región hidrofóbica bombeadora de H^+ .

Es de esperar, que el canal de H^+ de la pirofosfatasa sea semejante al de la ATP sintetasa, cuando menos funcionalmente.

Solubilización y Purificación de la Pirofosfatasa Membranal

Al ser la pirofosfatasa una enzima integral de membrana, su purificación ha sido difícil. Rao y Keister en 1978 lograron solubilizarla por primera vez empleando el detergente colato en presencia de Mg^{2+} .

Posteriormente (Nyrén et al., 1984), describieron otro método de solubilización en el que utilizaron el detergente Triton X-100, etilenglicol y altas concentraciones de Mg^{2+} ; obteniéndose un mayor grado de pureza mediante cromatografía en hidroxipatita; sin embargo, la enzima obtenida no era sensible a DCCD, en contraste con su actividad en la membrana del cromatóforo

Finalmente en 1991, Nyrén et al., publicaron un nuevo método de purificación. Este método consistía en solubilizar a la enzima con una mezcla de MEGA-9 y colato, precipitar con polietilenglicol,

una cromatografía de hidroxapatita y una cromatografía de afinidad. Su grado de purificación fue de 92 veces y la actividad específica de $20.4 \mu\text{moles de Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína. La actividad hidrolítica de esta enzima es sensible a DCCD (90% de inhibición con $50 \mu\text{M}$). Se estimula por fosfolípidos y Tritón X-100, siendo la cardiolipina el lípido que brinda la mayor activación (9 veces). Al reconstituir esta enzima en liposomas, se obtiene una actividad hidrolítica estimulada por desacoplantes y sensible a DCCD. La enzima purificada corre en geles de poliacrilamida con SDS y teñidos con plata como una sola banda con un peso molecular aparente de 56 000 Da aunque este peso puede estar siendo subestimado si se considera que las proteínas hidrofóbicas pegan mucho SDS. La estructura oligomérica aún está en discusión.

La actividad fisiológica y catalítica de la pirofosfatasa membranal parece ser equivalente a la de un factor de acoplamiento convencional; por tanto, la resolución estructural, molecular y bioquímica de esta peculiar enzima es de gran interés.

B) Pirofosfatasa de Membrana Mitocondrial

Se ha descrito la síntesis de PPI acoplada a la cadena respiratoria de mitocondrias de levaduras (Mansurova et al., 1975a), de animales (Mansurova et al., 1975b), y de plantas (Kowalczyk y Maslowski, 1984). Cabe comentar aquí, que también se ha reportado la síntesis de PPI acoplada a la cadena de transporte de electrones fotosintética de los cloroplastos de plantas (Rubtsov et al., 1976).

Acorde con esta síntesis de PPI en mitocondrias, se ha descubierto transporte de PPI a través de la membrana interna mitocondrial en intercambio con ADP vía el translocador de nucleótidos de adenina (Krämer, 1985).

La pirofosfatasa de mitocondria ha sido estudiada principalmente por Baykov, Avaeva y Mansurova de la Universidad Estatal de Moscú. El éxito en el estudio de las pirofosfatasas

mitocondriales ha radicado en la implementación de técnicas para su separación y purificación. Existen dos formas de pirofosfatasa presentes en la mitocondria: la de membrana, que no está muy fuertemente unida (mirando hacia la matriz en la membrana interna) y la soluble, localizada en la matriz.

La pirofosfatasa de membrana mitocondrial está unida a la membrana de manera más laxa, que la ATP sintetasa. A los dos minutos de sonicación ya no se encuentra síntesis de PPi en partículas submitocondriales, pero sí, síntesis de ATP. Asimismo, cuando se lavan las partículas con sacarosa 0.25 M, la actividad de hidrólisis y la de síntesis de PPi decrecen considerablemente, lo que indica que esta enzima está laxamente unida a la membrana (Mansurova et al., 1977).

En las mitocondrias de corazón de res (Mansurova et al., 1977), se ha encontrado que las pirofosfatasas tienen los siguientes pesos moleculares: la pirofosfatasa I, soluble y que corresponde al 32% del total de la actividad pirofosfatasa, pesa 60 kDa con dos subunidades α (28 kDa) y β (30 kDa), y con una estructura asignada de $\alpha\beta$. La pirofosfatasa II, con una masa molecular de 185 kDa, se ha podido resolver en 4 tipos de subunidades α (28 kDa), β (30 kDa), γ (40 kDa) y δ (60 kDa). La estructura probable es $\alpha\beta\gamma_2\delta$. Las subunidades α y β son idénticas para ambas enzimas, lo cual se ha determinado por su estructura primaria (Volk y et al., 1983).

La pirofosfatasa I y II de corazón de res tienen en común las subunidades catalíticas $\alpha\beta$. Estas enzimas tienen las siguientes semejanzas: a) ambas utilizan al complejo Mg-PPi como sustrato para la hidrólisis, b) necesitan además 2 iones Mg^{2+} por sitio activo para la catálisis, c) los parámetros cinéticos que describen el pegado del Mg-PPi y Mg^{2+} a ambas enzimas son muy semejantes, d) tienen idénticos puntos isoeléctricos y un pH óptimo de entre 7-9, e) las dos enzimas son inhibidas por NaF y Ca^{2+} y f) se inactivan rápidamente en ausencia de reactivos protectores de grupos sulfhidrilo (Volk et al., 1982).

Sin embargo, existen diferencias en cuanto al peso molecular y al contenido de lípidos (la pirofosfatasa II contiene fosfatidilcolina). En experimentos de reconstitución utilizando partículas submitocondriales sin pirofosfatasa, sólo la forma II reconstituye la síntesis de PPi y el acoplamiento a la cadena respiratoria; mientras que la I no lo hace (Mansurova et al., 1977). Aparentemente, la pirofosfatasa II tiene un componente adicional que facilita su incorporación a la membrana, cuya naturaleza podrían ser los fosfolípidos asociados o bien, las subunidades γ y δ .

A este respecto, Shakhov et al. (1981) al estudiar el efecto de los lípidos sobre las pirofosfatasas de corazón de res, encontraron que la forma I aumenta su actividad y estabilidad térmica en presencia de fosfolípidos (con fosfatidilcolina se obtiene la máxima activación) y que la preincubación de la enzima con fosfolípidos convierte la forma I en la II (determinado electroforéticamente), capaz de incorporarse a partículas submitocondriales y sintetizar PPi.

Todos estos datos parecen sugerir que estas dos proteínas son la misma y existen *in vivo* como formas interconvertibles

Finalmente, la pirofosfatasa membranal de mitocondria de corazón de res es estructuralmente la más compleja que se conoce y parece estar involucrada en la respuesta mediada por Ca^{2+} a ciertas hormonas (Mansurova, 1989).

En las mitocondrias de hígado de rata (Volk y Baykov, 1984) existen también estas dos enzimas; sin embargo, la extracción con colato produce una pirofosfatasa soluble I de matriz y dos formas membranales con masas moleculares de 120 kDa (II) y 210 kDa (III). La pirofosfatasa II, que comprende las subunidades α' (28 kDa) y β' (35 kDa) tiene una posible estructura $\alpha'_2\beta'_2$. Se sugiere que la forma II sea parte de la pirofosfatasa III que tiene una estructura más compleja.

Se ha encontrado también que la pirofosfatasa de membrana mitocondrial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* comparte muchas de las características de la pirofosfatasa membranal de mitocondrias animales (Lundin et al., 1992). Se ha clonado el gen que codifica para la pirofosfatasa mitocondrial en la levadura *S. cerevisiae* utilizando hibridización en condiciones de baja astringencia con el gen PPA1 de la pirofosfatasa citoplásmica de levadura (Lundin et al., 1991). Este nuevo gen, PPA2, está localizado en el cromosoma 13 y codifica para una proteína con una secuencia similar en un 49% a la enzima citoplásmica.

A diferencia de la enzima citoplásmica, la pirofosfatasa mitocondrial de levaduras tiene una secuencia líder rica en residuos básicos e hidroxilados, típica de proteínas mitocondriales. Por otro lado, en levaduras que sobreproducen el gen PPA2 se obtiene un incremento en la actividad de pirofosfatasa de 47 veces. Esta actividad se estimula por desacoplantes. Las células con el gen PPA2 eliminado son viables, aunque no pueden crecer con fuentes de carbono respiratorias; además, estas células pierden su DNA mitocondrial (Lundin et al., 1992).

C) Pirofosfatasa de Membrana Vacuolar.

Se ha descrito una pirofosfatasa translocadora de H^+ en las membranas vacuolares o tonoplastos de plantas (Walker y Leigh, 1981; Wagner y Mulready, 1983; Rea y Poole, 1985; Wang et al., 1986), aunque también se ha encontrado en vacuolas de levaduras.

Esta pirofosfatasa es una proteína intrínseca de membrana que cataliza simultáneamente la hidrólisis de PPi y la translocación electrogénica de H^+ al interior de las vacuolas. Hasta la fecha no se ha demostrado que sintetice PPi . Su actividad es independiente de la ATP sintetasa translocadora de H^+ , que también se localiza en estas membranas.

El potencial de membrana (con el interior positivo) que se genera a través del tonoplasto, ya sea por esta pirofosfatasa o por la H⁺-ATPasa, controla el transporte secundario de iones y regula el pH vacuolar.

Esta pirofosfatasa es específica para el complejo Mg-PPi como sustrato, requiere de Mg²⁺ libre como cofactor esencial para expresar su actividad y mantener su estructura (en presencia de Mg²⁺, la enzima es termoestable y se protege contra la proteólisis). Estos datos sugieren un sitio para Mg²⁺ libre que aún no ha sido determinado, ni el número de cationes necesarios para expresar la actividad óptima (Maeshima, 1991). Se ha reportado que depende de K⁺ para estimular la hidrólisis de Mg-PPi y que se inhibe por fluoruro y MDP como las demás pirofosfatasas (Walker y Leight, 1981). El nitrato, que es un inhibidor específico de la ATPasa de vacuola, no tiene ningún efecto sobre esta pirofosfatasa. La enzima es insensible a oligomicina, molibdato y vanadato

Bajo ciertas condiciones se ha encontrado que el pH generado por la pirofosfatasa es de magnitud semejante al producido por la ATPasa en vesículas de tonoplastos de raíz de avena (Wang et al., 1986). Dupaix et al. (1989), han logrado utilizar el gradiente de H⁺ producido por la pirofosfatasa para sintetizar ATP a través de la ATPasa en tonoplastos de *Catharanthus roseus*.

La pirofosfatasa del tonoplasto de varias especies ha sido purificada (Maslowski y Maslowska, 1987; Sarafian y Poole, 1989; Maeshima y Yoshida, 1989) y en geles de poliacrilamida-SDS se muestra como un solo polipéptido con un peso molecular aparente de entre 64 y 73 kDa. La enzima corresponde a un constituyente que va del 1% (Britten et al., 1989) al 10% (Maeshima y Yoshida, 1989) de la proteína total de la membrana de la vacuola.

La enzima pura es estimulada por fosfolípidos y se inhibe por DCCD, el polipéptido pega [¹⁴C]DCCD. La secuencia amino terminal (30 aminoácidos) de la pirofosfatasa vacuolar de frijol

mungo ha sido determinada. De esta sección, 25 aminoácidos son no polares, indicando que este extremo pueda ser parte de un dominio membranal de la proteína involucrado con el bombeo de H^+ . Esto se apoya en el hecho de que este fragmento no muestra semejanza con la pirofosfatasa citoplásmica de levadura (Maeshima y Yoshida, 1989).

Sarafian et al. (1992), clonaron y secuenciaron el cDNA que codifica para la pirofosfatasa de membrana vacuolar de *Arabidopsis thaliana*. La proteína traducida a partir de la secuencia de nucleótidos está constituida por 770 aminoácidos y tiene un peso molecular de 80,800 Da. Es una proteína integral altamente hidrofóbica, con un perfil hidropático que predice 3 cruces transmembranales. Aparentemente, el gen que codifica para esta proteína está presente en una sola copia en el genoma de *Arabidopsis*. No se han encontrado semejanzas entre la secuencia de la pirofosfatasa de vacuola, translocadora de H^+ y alguna de las bombas de H^+ o enzimas dependientes de PP_i , lo que sugiere un origen evolutivo diferente para esta translocasa.

Acerca del tamaño molecular nativo y funcional de la pirofosfatasa vacuolar, Sato et al., 1991, reportaron una masa molecular de entre 135-139 kDa. Para realizar esta determinación utilizaron tanto filtración en HPLC de la enzima pura de vacuola de calabaza, como inactivación por radiación de la enzima en la membrana vacuolar. Dicho peso molecular sugiere que esta pirofosfatasa pudiera estar funcionando como un dímero, donde el monómero es de 75 kDa. Estos datos concuerdan con los de Maeshima (1990), que al entrecruzar a la pirofosfatasa vacuolar con dimetil suberimidato producía un complejo correspondiente a un dímero cuyo monómero es de 73 kDa. Sin embargo, estos datos están en desacuerdo con Sarafian et al. (1992) que reportan en betabel, utilizando también análisis de inactivación por radiación, un tamaño funcional para la proteína de 82 kDa, lo que sugiere un

monómero como mínima unidad funcional y un tamaño para el transporte de H^+ de 3 ó 4 veces más grande .

Semejanzas estructurales entre los diferentes tipos de pirofosfatasa membranales.

Maeshima (1991), demostró que anticuerpos fabricados contra la pirofosfatasa vacuolar de frijol mungo no reaccionan ni con la pirofosfatasa de mitocondrias de hígado ni con la citoplásmica de levadura. Sin embargo, Nore et al., 1991, encontraron que estos mismos anticuerpos reaccionan con la pirofosfatasa de membrana de *R. rubrum* y no con la pirofosfatasa citoplásmica del mismo organismo. Esto indica, que aunque originadas de diferentes especies, estas dos enzimas de membrana son semejantes topológica y estructuralmente .

1.5. El Pirofosfato y la Pirofosfatasa de Membrana en la Evolución de los Mecanismos Transductores de Energía

Desde hace tiempo, varios autores consideran que el PPi podría ser el compuesto donador de energía más antiguo tanto para los sistemas prebióticos como para las primeras formas de vida (Miller y Parris, 1964; Lipmann, 1965). La simplicidad de su estructura comparada con la del ATP, así como su posible presencia en los minerales de la tierra primitiva, permiten suponer que el PPi fue importante en las transformaciones bioenergéticas primigenias. Esta suposición debe considerarse ahora seriamente a la luz de la evidencia experimental actual, donde encontramos síntesis de PPi y utilización del PPi como fuente de energía en diferentes sistemas vivos.

Por otra parte, también se ha planteado el posible papel de la pirofosfatasa de membrana en la evolución del mecanismo de acoplamiento de la óxido-reducción y la fosforilación. A este respecto, el grupo de Baltscheffsky (1982), ha propuesto que originalmente el sistema de transporte de electrones y el sistema de la pirofosfatasa de membrana eran fuentes de energía separadas (Fig. 5a). Posteriormente,

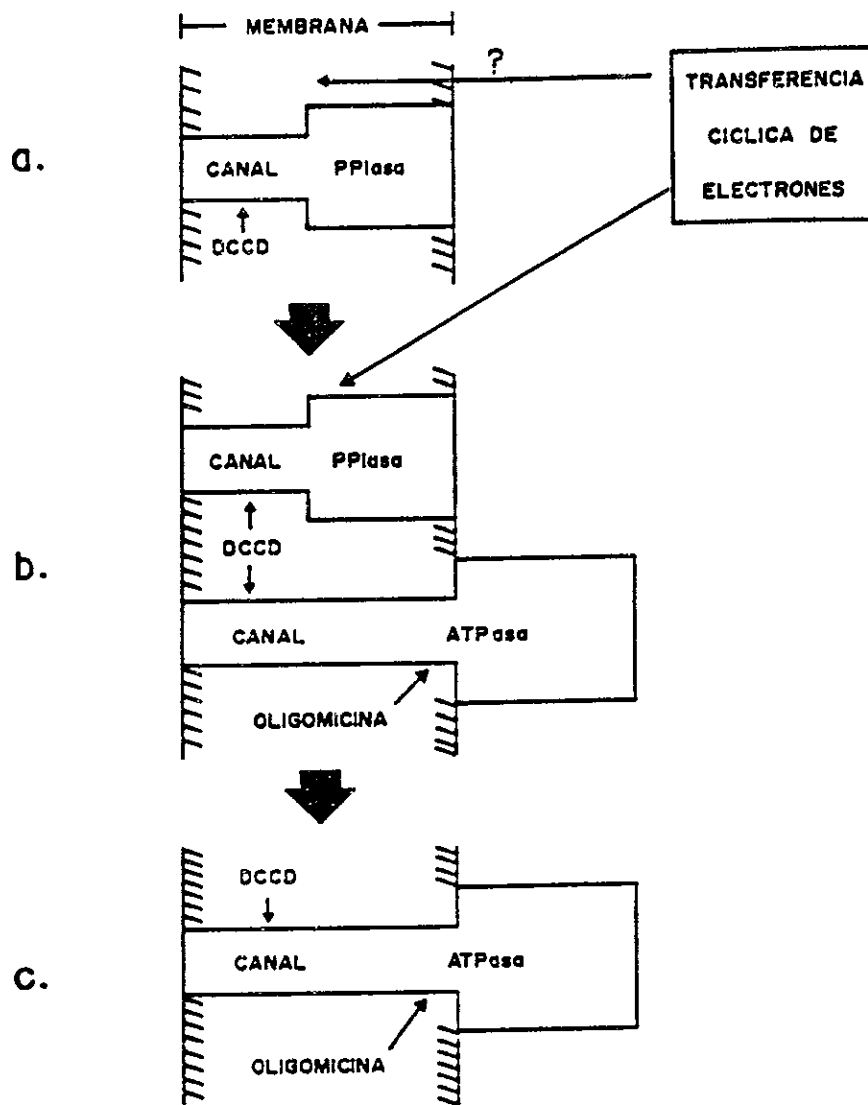


Fig. 5 Posible Mecanismo Evolutivo del Acoplamiento de Energía en Membranas Transductoras. a) Situación hipotética en la que sólo la Pirofosfatasa existía. b) Situación intermedia en la que coexisten la Pirofosfatasa y la H^+ ATPasa en la membrana. c) Situación en la que sólo subsiste la H^+ ATPasa. (Tomada de Baltscheffsky y col., 1982).

gracias al funcionamiento en reversa de la fosfatasa, se dió un acoplamiento entre las dos entidades que funcionaban autónomamente, lo que condujo al primer almacén de energía con la configuración del PPI. Esta hipótesis postula que el primer transporte de H^+ a través de la membrana estuvo representado por la pirofosfatasa que contenía un canal específico para el paso de H^+ . Durante la evolución, surgió la H^+ -ATP sintetasa, esto creó una situación en la que coexistieron las dos enzimas (Fig. 5b) (como es el caso de *R. rubrum* actualmente) pero con el tiempo, se perdió la pirofosfatasa (Fig. 5c) (tal es el caso de otros sistemas actuales, como *Rhodobacter capsulata* que solo tiene H^+ -ATP sintetasa). Esta hipótesis parece lógica; sin embargo, se necesita un estudio más profundo de estas dos enzimas para probarla y poder así ubicar evolutivamente a la pirofosfatasa de membrana.

Una pregunta de gran significado, tanto en el sentido evolutivo como en el mecanístico, es si la traslocación de H^+ de la pirofosfatasa utiliza el mismo canal de H^+ en la membrana del cromatóforo o uno más o menos similar al que usa la ATPasa.

La importancia energética del PPI en el metabolismo celular ha emergido como una alternativa a la del ATP. Es cada vez mayor el número de experimentos que involucran diversos aspectos del PPI en la bioenergética. Así pues, la simplicidad relativa del PPI y de las pirofosfatasas nos ofrecen una oportunidad experimental y conceptual para facilitar nuestro camino hacia un mejor y más completo entendimiento de cómo las células utilizan y transforman la energía.

1.6. Antecedentes Directos

1.6.1. Inhibidores de la Pirofosfatasa

La pirofosfatasa de membrana se inhibe por los siguientes compuestos: NaF, inhibidor clásico de la pirofosfatasa citoplásmica y membranal y análogos del sustrato como son MDP e IDP, estos inhibidores actúan a nivel del sitio activo de la enzima. También se han utilizado DCCD y

dietilestilbestrol como inhibidores de la región hidrofóbica de la enzima. El DCCD inhibe a la pirofosfatasa membranal a nivel de canal de H^+ y es también el inhibidor clásico de la región hidrofóbica de la F_0F_1 ATPasa (Sebald y Wachter, 1978). Este compuesto inhibe a la enzima purificada (Nyrén y Strid, 1991) y a la pirofosfatasa membranal de cromatóforos (Baltscheffsky, et al., 1982). Sin embargo, el DCCD tiene una amplia reactividad con otras proteínas (Azzi y Nalecz, 1984) lo que en ciertos ensayos hace problemático su empleo.

El dietilestilbestrol interactúa con los dominios hidrofóbicos de la pirofosfatasa membranal (Strid, et al., 1987 y 1989) y parece que también con los de proteínas solubles haciendo su efecto inespecífico.

Resulta pues deseable encontrar otro inhibidor del dominio hidrofóbico de la pirofosfatasa membranal, que brinde información sobre esta región de la enzima.

1.6.2. Efectos del Inhibidor Trifenilestaño

Los compuestos orgánicos de estaño han sido reconocidos y usados como fungicidas, bactericidas y acaricidas (Saxena, 1987). Parece que muchas de las manifestaciones de intoxicación por estos compuestos, que tienen tres átomos de carbono enlazados al estaño, se deben a la inhibición de algunas enzimas, especialmente aquellas que sintetizan y/o utilizan ATP y a la alteración de las membranas celulares (Wulf y Byington, 1975).

La acción principal de estos compuestos en sistemas biológicos es inhibir la fosforilación oxidativa y la translocación de H^+ de las ATPasas (Aldrige et al., 1981; Saxena, 1987; Cain et al., 1977; Lorenson y Jacobs, 1984; Emanuel et al., 1984), alterando el funcionamiento mitocondrial.

La inhibición de la fosforilación oxidativa por compuestos orgánicos de estaño se lleva a cabo por dos vías: inhibiendo la síntesis de ATP y promoviendo una reacción de intercambio anión- OH^- a través de la membrana mitocondrial interna (Stockdale et al., 1970). La primera forma de acción involucra

probablemente una acción parecida a la de la oligomicina, o sea, la unión directa a un componente de la ATPasa (Cain et al., 1977; Emanuel, et al., 1984). El segundo mecanismo puede involucrar la difusión de estos compuestos hidrofóbicos en la bicapa de fosfolípidos de la membrana transductora de energía, causando un intercambio anión-OH⁻ (convirtiendo un gradiente de pH transmembranal a un potencial transmembranal). Esto produce un movimiento de cationes o aniones dirigidos por este gradiente de potencial y consecuentemente una disminución de la fuerza protonmotriz (Stockdale et al., 1970; Selwyn et al., 1970; Brierley et al., 1978).

Gould (1976) demostró que, a bajas concentraciones de trifenilestano, se inhibe la formación de ATP y el transporte de electrones acoplado en cloroplastos de espinaca, también se ve inhibida la actividad de la ATPasa dependiente de Mg²⁺ y el intercambio ATP-Pi. Observó también que cloroplastos a los cuales se les había quitado el sector F₁ no eran capaces de acumular H⁺ en la luz, sin embargo la adición de trifenilestano permitía recuperar esta capacidad, indicando que el sitio de acción del compuesto era el canal de H⁺ de la ATPasa (F₀) interfiriendo con el transporte de H⁺ a través de las membrana. De hecho la actividad ATPasa del factor de acoplamiento (F₁) aislado es insensible al trifenilestano.

Estudios realizados por Lerma y Gomez Lojero (1982), sobre los efectos de inhibición del trifenilestano sobre la fotofosforilación de la *Spirulina maxima* indicaron que este compuesto puede bloquear el canal de H⁺ de la ATPasa en una vía similar como la que ocurre en los cloroplastos.

Los compuestos orgánicos de estaño inhiben la síntesis e hidrólisis del ATP y el intercambio ATP-Pi en partículas submitocondriales, pero no inhiben la actividad hidrolítica de el sector F₁ de la ATPasa aislada. El sitio de unión del trifenilestano en el sector F₀ y la naturaleza del grupo modificado por el compuesto de estaño no se conocen (Yagi y Hatefi, 1984).

Se ha postulado que el mecanismo de inhibición de la ATPasa de partículas submitocondriales de corazón de bovino, por compuestos orgánicos de estaño y venturidina, difiere de aquellos con DCCD y oligomicina (Matsuno-Yagi y Hatefi, 1993 a,b). Estos últimos reactivos bloquean la translocación de H^+ a través de F_0 y la transferencia de energía entre F_1 y F_0 inhibiendo la hidrólisis de ATP unisito y multisito en partículas submitocondriales. Sin embargo, la venturidina y los compuestos orgánicos de estaño inhiben solamente la hidrólisis de ATP multisito, y en concentraciones comparables, tienen poco efecto sobre la hidrólisis de ATP unisito.

Los compuestos de azufre son capaces de proteger a la ATPasa mitocondrial de la inhibición por trifenilestaño (Byington, 1971), estos compuestos también protegen las células rojas de mamíferos de la hemólisis inducida por compuestos orgánicos de estaño (Byington et al., 1974).

El trifenilestaño, por sus características, es un inhibidor potencial de la pirofosfatasa de membrana, por tanto consideramos conveniente probarlo en los cromatóforos de *R. rubrum*.

OBJETIVO

El estudio del mecanismo de acción de las enzimas puede lograrse mediante una multitud de métodos experimentales, uno de los que ha brindado gran información es el uso de inhibidores específicos de las enzimas para entender la forma en que funcionan, es por esta razón que en este trabajo el **Objetivo** es:

Estudiar el efecto del trifenilestaño sobre la pirofosfatasa membranal de *R. rubrum* con el objeto de encontrar un inhibidor más específico para la enzima que brinde información adicional del funcionamiento de la enzima.

Caracterizar la inhibición por trifenilestaño en la pirofosfatasa de membrana de *R. rubrum*.
Analizar si la inhibición por trifenilestaño es a nivel del sitio activo o a nivel del canal de H⁺ de la enzima.

Comparar el efecto inhibitor del trifenilestaño con el del DCCD sobre la pirofosfatasa membranal y la pirofosfatasa de membrana solubilizada de *R. rubrum*.

II MATERIALES Y METODOS

2.1. Cultivo de Bacterias

En todos los experimentos se utilizó la cepa silvestre (ATCC 11170) de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*.

2.1.1. Medios de Cultivo

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

A) Medio sólido:

Extracto de levadura o de carne (Bioxon de México)-----3 %

Peptona de Gelatina (Bioxon de México)-----2 %

Agar bacteriológico (Bioxon de México)-----2 %

Biotina-----0.01 µg/ml

El medio se esteriliza en la autoclave por 15 min a 120°C y 15 atmósferas de presión, en frascos con tapa de rosca de 15 a 20 ml de capacidad, que contienen aproximadamente 10 ml de éste

B) Medio líquido

Se prepara el medio líquido por el procedimiento reportado por Cohen-Bazire et al. (1957) el cual es una modificación del propuesto por Hutner (1950).

Para la preparación de este medio se parte de las siguientes soluciones madre:

a) Base concentrada:

$N(CH_2COOH)_3$ -----52 mM

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -----58 mM

CaCl₂·6H₂O-----29 mM

(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O-----0.074 mM

FeSO₄·7H₂O-----0.35 mM

* Metales '44'-----50 ml / l (ver adelante su composición)

Se ajusta el pH a 6.8 con NaOH.

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

EDTA -----6.5 mM

FeSO₄·7H₂O-----17.9 mM

ZnSO₄·7H₂O-----0.038 mM

MnSO₄-----10.1 mM

CuSO₄·5H₂O-----1.5 mM

Co(NO₃)₂·6H₂O-----0.85 mM

Na₂B₄O₇·6H₂O-----0.57 mM

Se añaden aproximadamente 4 gotas de ácido sulfúrico para que se disuelvan los metales y se ajusta el pH a 6.8. El MnSO₄ se puede sustituir por MnCl₂·4H₂O a una concentración de 10.8 mM.

- b) KH₂PO₄ 1.0 M, pH 6.8
- c) Acido succínico 0.84 M, pH 6.8
- d) (NH₄)₂SO₄ 0.75 M
- e) NaCl 0.85 M
- f) Acido L-glutámico 0.679 M, pH 6.8
- g) Acido L-aspartico 0.150 M, pH 6.8

Para preparar 12.5 l del medio líquido, se añaden las siguientes cantidades de las soluciones anteriores:

Concentración final a la que
queda en el medio:

a) Base concentrada	250 ml	
b) KH_2PO_4	250 ml	20.0 mM
c) Acido succínico	250 ml	16.9 mM
d) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	62.5 ml	3.7 mM
e) NaCl	125 ml	8.5 mM
f) Acido L-glutámico	25 ml	1.35 mM
g) Acido L-aspártico	25 ml	0.3 mM

además de:

Extracto de carne	12.5 g	0.125 %
Acido nicotínico	12.5 mg	10 μM
Tiamina	6.25 mg	1.5 μM
Biotina	0.125mg	0.04 μM

Teniendo en cuenta que hay soluciones que no tienen ajustado el pH, se ajusta el pH a 6.8. El medio se esteriliza por 45 min a 120 °C y 15 atmósferas de presión, en frascos del volumen que se requiere. En el medio caliente se forma un precipitado que se disuelve a la temperatura ambiente. El medio es transparente y de color semejante al del extracto de levadura.

2.1.2. Siembra de Bacterias

Las bacterias se siembran en placa por el método de dilución para formar colonias únicas. De ahí se toma una de ellas y se siembra por punción en los frascos con medio sólido. Se incuban en la oscuridad por 12 h para permitir que el crecimiento aeróbico de estos microorganismos elimine parcialmente el O_2 del medio. Terminado este período, las bacterias sembradas se exponen a la luz de focos con filamento de tungsteno de 40 watts, colocadas a una distancia de 30 cm. Una vez observado el desarrollo de la colonia en la punción, estos cultivos pueden mantenerse así por largo tiempo (entre 6 y 12 meses) como reserva, o bien, utilizarse para cultivos posteriores.

Para obtener grandes cantidades de bacterias se cultivan en medio líquido de la siguiente manera: a los frascos que contienen las bacterias en el medio sólido, se les agrega el medio líquido y se agitan. Se dejan toda la noche en la oscuridad y a continuación se colocan a la luz de los focos con filamento de tungsteno de 40 watts a 30 cm de distancia. Después de 7 a 10 días se obtiene crecimiento de las bacterias en el medio líquido. Este medio se transfiere a frascos de 100 ml de capacidad, a los cuales se les agrega medio fresco hasta colmar su capacidad. Se repite el proceso oscuridad-luz y se deja crecer a las bacterias hasta la fase logarítmica tardía. El inóculo bacteriano, así obtenido, se traslada a frascos de 1 l y de 9 l sucesivamente, siguiendo los pasos descritos con anterioridad. Los frascos se cierran con tapones de hule herméticos y se deja el mínimo de aire entre el tapón y el medio de cultivo, para evitar al máximo la presencia de O_2 , ya que el crecimiento fotosintético de estos microorganismos se realiza en condiciones de anaerobiosis. Esta es la razón por la cual, previo al crecimiento en la luz, siempre se deja crecer a los cultivos en la oscuridad por 12 h, aprovechando que la bacteria, por sus procesos metabólicos oxidativos, elimina el O_2 que está presente en el medio. Los cultivos se mantienen a 30 °C

2.1.3. Cosecha de Bacterias

Las bacterias cultivadas en los frascos de 9 l de capacidad se cosechan en una centrífuga de flujo continuo Sharples en la fase de crecimiento logarítmica tardía, la cual se determina por medio de curvas de crecimiento, esto es, midiendo la densidad óptica del cultivo a diversos intervalos de tiempo en un fotocolorímetro.

Una vez cosechadas, las bacterias se lavan con MOPS 50 mM, KCl 50 mM pH 7.0 para eliminar por completo los residuos del medio. Para volver a obtenerlas en una pastilla se centrifugan a 8 000 x g por 15 min. Las pastillas se pesan y esto se considera como peso húmedo. Se almacenan así a -70 °C.

2.2. Obtención de Cromatóforos

Se siguió el método descrito por Baccarini-Melandri et al (1970), para la obtención de cromatóforos

A) Las bacterias se resuspendieron en amortiguador glicilglicina 200 mM pH 7.4 en una proporción 1/10 (bacterias/amortiguador), que contiene 1 mg de DNasa por 100 g de peso húmedo de bacterias y MgSO₄ 1 mM

B) Para romper las células se hace lo siguiente: se sonica la suspensión en lotes de 15 ml por 2.5 min en un sonicador Branson (Sonifier 250) puesto al máximo y enfriando con agua a 4°C (Scholes et al , 1969).

C) Se centrifuga a 20 000 x g durante 20 min para remover las células sin romper, cápsulas, etc. que quedan en el sedimento.

D) El sobrenadante de la centrifugación anterior, se sedimenta a 100 000 x g por 80 min obteniéndose así una pastilla de cromatóforos.

E) La pastilla de cromatóforos se resuspende en glicilglicina 200 mM, EDTA 5 mM y EGTA 5 mM a pH 7.4 y se centrifuga nuevamente a 100 000 x g por 80 min, para quitar los cationes divalentes presentes en la preparación.

F) La pastilla de cromatóforos obtenida del paso anterior se resuspende en glicilglicina 200 mM pH 7.4 y se centrifuga a la misma velocidad. Finalmente, los cromatóforos se resuspenden en glicilglicina 50 mM pH 7.4 a una concentración aproximada de 60 mg de proteína/ml.

La preparación de cromatóforos se guarda a 4 °C y se usa en los 3 días siguientes, periodo durante el cual no hay cambios en la actividad hidrolítica

2.3. Determinación de Proteína

La cantidad de proteína se cuantifica por el método de Lowry et al.(1951), utilizando como estándar ASB.

2.4. Solubilización de la Pirofosfatasa Membranal y Precipitación con Polietilenglicol

Se sigue la metodología descrita por Nyrén y Strid (1991).

Se toman 10 ml de cromatóforos (a una concentración de proteína de 60 mg/ml), los cuales se incuban en 70 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.4 que contiene MEGA-9 1.5 % (p/v) , colato 0.5% , etilenglicol 25 % (v/v), MgCl₂ 0.75 M , EDTA 0.5 mM y DTE 0.2 mM en un baño con hielo, con agitación lenta, durante 20 min. Posteriormente esta suspensión se centrifuga a 200 000 x g por una hora y el sobrenadante, que contiene a las proteínas solubilizadas, se colecta.

Las proteínas solubilizadas se precipitan con PEG 4000, para lo cual se prepara una solución de PEG 50 % en Tris-HCl 0.1 M pH 8.4 a 4 °C. La solución de PEG se agrega al sobrenadante (proteína solubilizada) para quedar a una saturación de 11.75 % y la mezcla se agita

durante 20 min en un baño con hielo, antes de ser centrifugada a 30 000 x g por 20 min. La pastilla se elimina y el sobrenadante se lleva a 14 % de saturación, se agita y se centrifuga como en el paso anterior.

El precipitado enriquecido en pirofosfatasa se colecta y resuspende a una concentración de proteína de 25 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, pH 8.4 a 4°C, glicerol 30 % (v/v), EDTA 0.2 mM, DTE 0.4 mM, tritón X-100 2 % (v/v) y MgCl₂ 0.1 M. Esta preparación corresponde a la pirofosfatasa solubilizada y se almacena a - 80 °C.

2.5. Purificación Parcial de la Pirofosfatasa Citoplásmica

Para la purificación parcial de la pirofosfatasa citoplásmica de *R. rubrum* se sigue básicamente el método descrito por Klemme y Gest (1971), a excepción de la columna de ω-aminohexil agarosa-PPi.

El procedimiento se realiza de la siguiente manera:

a) 80 g de bacterias (peso húmedo) se resuspenden en 450 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.6, MgCl₂ 10 mM y ZnSO₄ 0.4 mM, se les agrega DNasa (1 mg de DNasa por cada 10 gramos de peso húmedo de bacterias) y se sonicán en lotes de 15 ml por 2.5 min en un sonicador Branson (sonifier 250) puesto al máximo y enfriando con agua a 4 °C (Scholes et al., 1969).

b) La suspensión anterior se centrifuga 80 min a 100 000 x g a 4 °C para eliminar restos celulares.

c) Se recupera el sobrenadante y se ajusta el pH a 8.6 .

d) El sobrenadante se distribuye en tubos de ensayo en volúmenes de 15 ml y se calientan a 60 °C en un baño de temperatura constante durante 5 min. En esta etapa se desnaturalizan muchas proteínas, pero la pirofosfatasa citoplásmica resiste el tratamiento. La presencia de ZnSO₄

a una concentración de entre 0.2 mM a 0.4 mM es esencial para la protección de la pirofosfatasa contra la inactivación térmica.

e) La proteína desnaturizada se elimina por centrifugación a 20 000 x g por 20 min a 4°C.

f) Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El sobrenadante resultante de la etapa anterior se lleva a 40 % de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido y la proteína precipitada es separada por centrifugación (20 000 x g, 20 min). La concentración del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el sobrenadante se aumenta a 50 % y la proteína precipitada se separa nuevamente. La proteína se lleva a 65% de saturación, es centrifugada de la misma manera y la fracción de proteína precipitada se disuelve en 15 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8.6, ZnSO_4 0.1 mM y 2-mercaptoetanol 2 mM. Por último, la muestra se dializa en 4 litros del mismo amortiguador a 4 ° C con agitación lenta durante toda la noche.

g) Se prepara una columna de afinidad ω -aminohexil agarosa-PPi de la siguiente manera:

1. Se utiliza un volumen de 110 ml de ω -aminohexil agarosa y se lava con agua bidestilada varias veces.
2. A la solución de ω -aminohexil agarosa se le agregan 220 ml de PPi Na 0.1 M pH 6.0. Se agita suavemente y se verifica que el pH se mantenga entre 4.5 y 6.0.
3. Después se le agrega un volumen pequeño de EDC 0.1 M gota a gota durante 5 min y se continua agitando suavemente por una hora verificando que el pH se mantenga entre 4.5 y 6.0. Se deja agitando suavemente a temperatura ambiente por 24 horas.
4. Posteriormente el gel se lava con: NaCl 0.5 M, agua bidestilada y Tris-HCl 20 mM pH 8.6 (se usan en el orden que están escritos).

5. Por último se empaqueta en una columna de (2.8 x 23.5 cm), equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH 8.6, ZnSO₄ 0.1 mM y 2-mercaptoetanol 2 mM.

h) Después la columna se lava con:

1. 50 ml Tris-HCl 20 mM pH 8.6
2. 200 ml Tris-HCl 20 mM pH 8.6 con MgCl 0.4 M
3. 100 ml Tris-HCl 20 mM pH 8.6 con NaCl 1 M
4. 200 ml Tris-HCl 20 mM pH 8.6
5. 50 ml Tris-HCl 20 mM pH 8.6 con ZnSO₄ 0.1 mM y 2-mercaptoetanol 2 mM

i) La muestra dializada se carga a la columna y se lava con los siguientes amortiguadores

1. 200 ml Tris-HCl 20 mM, pH 8.6
2. 200 ml Tris-HCl 20 mM, pH 8.6, PPiNa 100 mM, ZnSO₄ 0.1 mM y 2-mercaptoetanol 2 mM
3. 150 ml Tris-HCl 20 mM, pH 8.6, que contenía ZnSO₄ 0.1 mM y 2-mercaptoetanol 2 mM

j) Para eluir a la pirofosfatasa citoplásmica se hace un gradiente de concentración de sales de 0 a 1.2 M de NaCl y se colectan fracciones de 200 gotas por tubo.

k) A las fracciones resultantes se les mide la proteína a 280 nm en un espectrofotómetro (LKB-Biochrom-Ultrospec II) y la actividad de pirofosfatasa que contengan.

l) Las fracciones con actividad pirofosfatasa se combinan y se dializan en 4 l de Tris-HCl 20 mM, pH 8.6, ZnSO₄ 0.1 mM y 2-mercaptoetanol 2 mM. La enzima dializada se guarda en alícuotas a -80 °C.

2.6. Determinación de la Actividad Hidrolítica de la Pirofosfatasa

La actividad hidrolítica o actividad de pirofosfatasa, se cuantifica como la liberación de Pi a partir de PPI a 30°C, en presencia de MgCl₂.

La determinación de la actividad se lleva a cabo en la oscuridad. Para lograr estas condiciones se utiliza un cuarto iluminado con luz verde de seguridad (Schiff, 1972).

Las condiciones exactas del medio de reacción se especifican en los pies de figura de los resultados. En general contiene: Tris-maléico 50 mM pH 6.5 ó 9.5, PPI_{Na} 2 mM, MgCl₂ 3 mM y la preparación que contenga a la pirofosfatasa (que puede ser cromatóforos, pirofosfatasa solubilizada o pirofosfatasa citoplásmica).

La reacción se inicia al añadir PPI, el medio se incuba a 30 °C durante 10 min y la reacción se detiene al añadir TCA a una concentración final de 6 %. Por último, se centrifuga a 1500 x g por 10 min y se cuantifica en el sobrenadante el Pi presente con el método de Sumner (1944). La actividad específica se refiere como nmoles Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína

Las variables del ensayo que se utilizaron dependiendo de la preparación que contiene a la pirofosfatasa son las siguientes: para el caso de la pirofosfatasa membranal en el cromatóforo se utiliza 0.5 mg de proteína, en el caso de la pirofosfatasa solubilizada se emplearon 0.27 mg de proteína y para la pirofosfatasa citoplásmica, 8.0 µg de proteína. Para la determinación de la actividad de la pirofosfatasa citoplásmica se utiliza pH 8.6 y 37 °C que son las condiciones óptimas para la enzima. Cualquier otra modificación se especifica en los pies de figura de la sección de Resultados y Discusión. Todos los experimentos se repiten por lo menos tres veces.

2.7. Determinación de la Actividad Hidrolítica de la ATPasa

La determinación de la actividad hidrolítica o ATPasa se lleva a cabo en la oscuridad. El medio de reacción contiene lo siguiente: Tris-acetato 50 mM, pH 8.0, MgCl₂ 3 mM y 0.5 mg de proteína de cromatóforos. La reacción se inicia al agregar ATP 2 mM pH 8.5. El medio se incuba a 30°C durante 15 min y la reacción se detiene con TCA a una concentración final de 6%. Por último, se centrifuga a 1500 x g durante 10 min. El Pi presente en el sobrenadante desproteinizado se mide colorimétricamente con el método de Sumner (1944).

2.8. Inhibición de la Actividad Pirofosfatasa y ATPasa por Trifenilestaño y DCCD

Las soluciones etanólicas de cloruro de trifenilestaño recristalizado se preparan antes de cada experimento. En todos los casos, la concentración final de etanol en el ensayo es de 1%.

Los ensayos de inhibición por trifenilestaño se realizan preincubando por 5 min a los cromatóforos o a la pirofosfatasa citoplásmica (en su medio de reacción) con trifenilestaño o con etanol (para el caso del control), antes de iniciar la reacción con la adición del sustrato. La determinación de la actividad se realiza como ya se indicó en los números 2.6 y 2.7 de esta sección. Para el caso de la pirofosfatasa solubilizada, la preincubación fue de 3 horas. Las modificaciones de las condiciones de cada experimento están indicadas en los correspondientes pies de figura.

Para el caso de la inhibición por DCCD, el compuesto también se prepara en solución etanólica, quedando la concentración final de etanol al 1%. Las variantes con respecto a la inhibición con trifenilestaño son: un tiempo de preincubación de 3 h y un pH de 7.5, que es el óptimo para la reacción de inhibición.

Los valores correspondientes al 50% de la actividad en presencia del inhibidor, se refieren como I_{50} .

III RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Efecto del Trifenilestaño en la Pirofosfatasa Membranal de *Rhodospirillum rubrum*.

El primer experimento que se realizó para probar el efecto del trifenilestaño sobre la pirofosfatasa membranal en los cromatóforos, se diseñó utilizando dos pHs. Esta decisión se tomó considerando que la enzima tiene un pH óptimo para la hidrólisis del Mg-PPi^{2-} que va desde 6.5 a 9.0, con una actividad específica de $200 \text{ nmoles Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Celis y Romero, 1987), por lo que en un primer intento se utilizaron los pHs extremos.

En la Fig. 6. se muestra que la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa de membrana se inhibe por el trifenilestaño. A pH 9.5, la enzima es inhibida hasta el 90 % por concentraciones micromolares de trifenilestaño con una I_{50} de $14.4 \mu\text{M}$, mientras que a pH 6.5 se observa una menor inhibición con una I_{50} de $43.8 \mu\text{M}$.

Considerando que se había reportado la inhibición de la H^+ ATPasa por trifenilestaño en otras membranas transductoras de energía, como se indicó en la introducción, probamos el efecto del compuesto orgánico de estaño sobre la ATPasa de cromatóforos y lo comparamos con la inhibición obtenida con la pirofosfatasa membranal a pH 9.5 y con la pirofosfatasa citoplásmica del mismo organismo.

En la Fig. 7 se observa que la H^+ -ATPasa se inhibe de manera muy semejante a la pirofosfatasa membranal, con valores de I_{50} de $10 \mu\text{M}$ y $14.4 \mu\text{M}$ respectivamente, mientras que la pirofosfatasa citoplásmica solo se inhibe ligeramente. Este es el primer reporte de inhibición de la ATPasa de cromatóforos de *R. rubrum* por trifenilestaño.

Considerando que el trifenilestaño actúa sobre la H^+ -ATPasa a nivel de su canal (Gould, 1976) y observando los patrones de inhibición para ambas enzimas, se podría sugerir que los

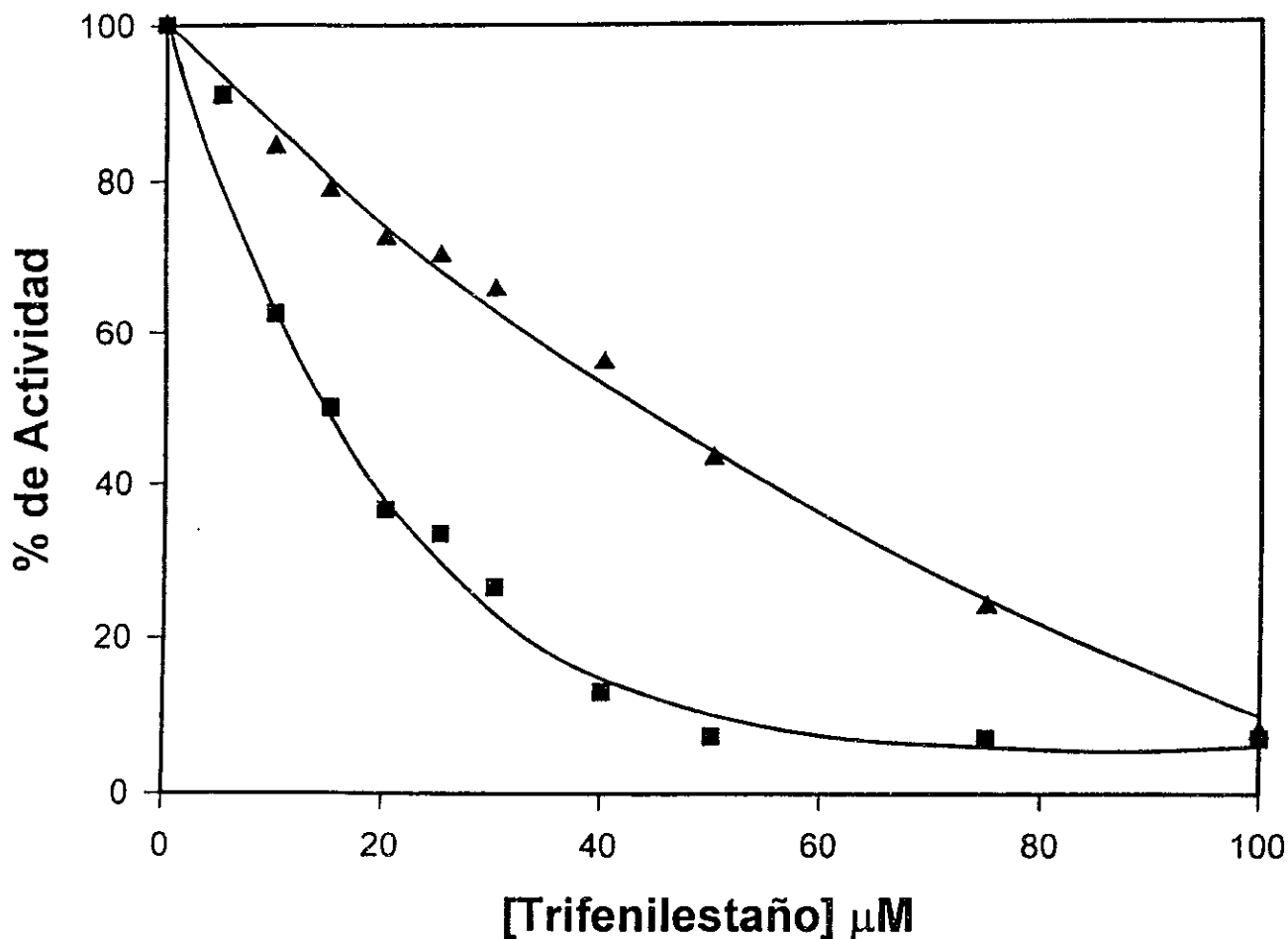


Fig. 6 Efecto del Trifenilestaño sobre la Actividad de la Pirofosfatasa Membranal de *Rhodospirillum rubrum*. El medio de reacción contiene: Tris-maléico 50 mM pH 9.5 (■) o pH 6.5 (▲), MgCl₂ 3 mM, las concentraciones indicadas de trifenilestaño y 0.5 mg de proteína cromatóforos. La reacción se inicia añadiendo 2 mM de Na-PPi y se incuba por 10 min a 30°C. La actividad se mide como se indica en Materiales y Métodos. Las actividades específicas de la pirofosfatasa membranar sin inhibidor fueron de 117 nmoles Pi min⁻¹mg⁻¹ a pH 9.5 y de 178 nmoles Pi min⁻¹ mg⁻¹ a pH 6.5.

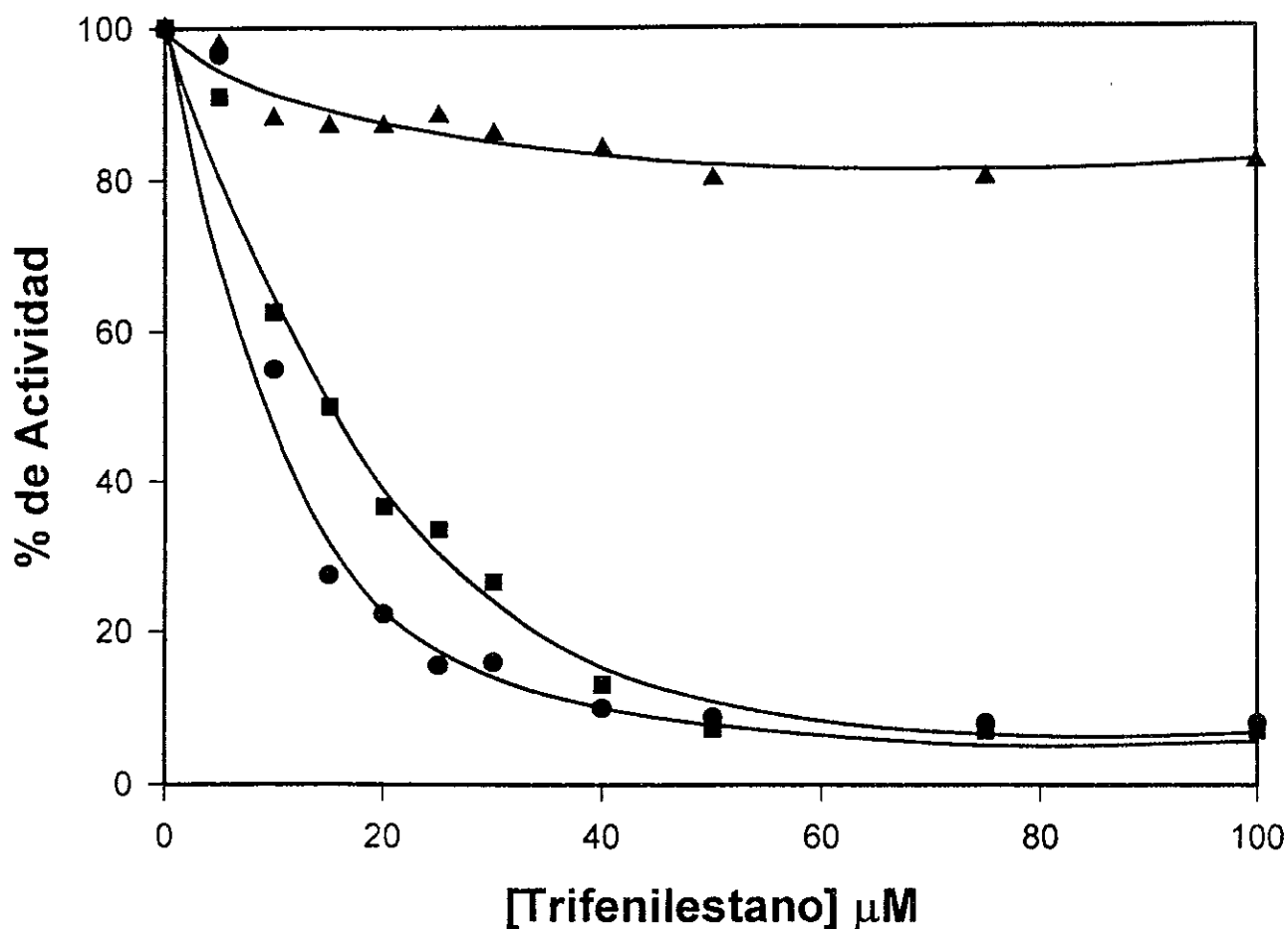


Fig. 7 Efecto del Trifenilestano sobre la Actividad de la Pirofosfatasa de Membrana, Citoplásmica y H^+ -ATPasa de *Rhodospirillum rubrum*. Las condiciones experimentales para la pirofosfatasa membranal son iguales que en la figura 6 a pH 9.5 (\blacksquare). Para la pirofosfatasa citoplásmica (\blacktriangle), el medio contiene Tris-Cl 50 mM, pH 8.6, MgCl_2 3 mM y Na-PPi 2 mM. El medio de la H^+ -ATPasa (\bullet) contiene Tris-acetato 50 mM; pH 8, MgCl_2 3 mM y ATP 2 mM. La temperatura de incubación es de 30°C para la pirofosfatasa membranal y ATPasa y 37°C para la pirofosfatasa citoplásmica. Las actividades específicas de cada una de las enzimas sin inhibidor fueron: 117 nmoles $\text{Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para la pirofosfatasa membranal, 200 $\mu\text{moles Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para la pirofosfatasa citoplásmica y 13.66 nmoles $\text{Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para la H^+ -ATPasa.

canales de la pirofosfatasa y H^+ -ATPasa puedan ser funcionalmente semejantes. Esto se vería apoyado analizando el efecto del trifenilestaño sobre la pirofosfatasa citoplásmica ya que ésta es una enzima soluble que, si bien tiene un sitio activo semejante al de la pirofosfatasa membranal, carece de un canal de protones.

3.2. Efecto del pH.

Retomando los datos de la Fig. 6 donde se observa que la inhibición por trifenilestaño es más efectiva a pH básico que a pH ácido y con el objeto de encontrar un pH óptimo para la inhibición, decidimos realizar una curva de pH. En la Fig. 8 puede observarse que la máxima inhibición es a pH 9.5 mientras que entre pH 5.5 y 6.0 la inhibición es de alrededor del 50 %. Este hecho podría indicar que el compuesto reacciona de mejor manera con algún residuo de aminoácido de la enzima a pH básico, también podríamos interpretar que el trifenilestaño inhibe el canal de H^+ de la pirofosfatasa, por tanto, el H^+ competiría por el trifenilestaño en la inhibición, de tal manera que a pH básico, hay menos protones y la inhibición es mayor.

Con base en el perfil de pH obtenido, los experimentos de inhibición se realizaron a pH, de 8.5 a 9.5

3.3. Sustrato Zn-PPi

Los experimentos anteriores se realizaron usando al sustrato clásico de las pirofosfatasas: el Mg-PPi²⁻. Sin embargo, se ha demostrado que el Zn-PPi²⁻ es tan buen sustrato como el Mg-PPi²⁻ a su pH óptimo de 5.25, con una actividad específica de 200 nmoles Pi min⁻¹ mg⁻¹, donde la hidrólisis de Mg-PPi²⁻ es del 10 % de su máximo. El perfil de pH de la hidrólisis de Zn-PPi²⁻ es de tipo campana, obteniendo a pH 9.5, un 15 % de la actividad óptima (Celis y Romero, 1987, Romero y Celis, 1995).

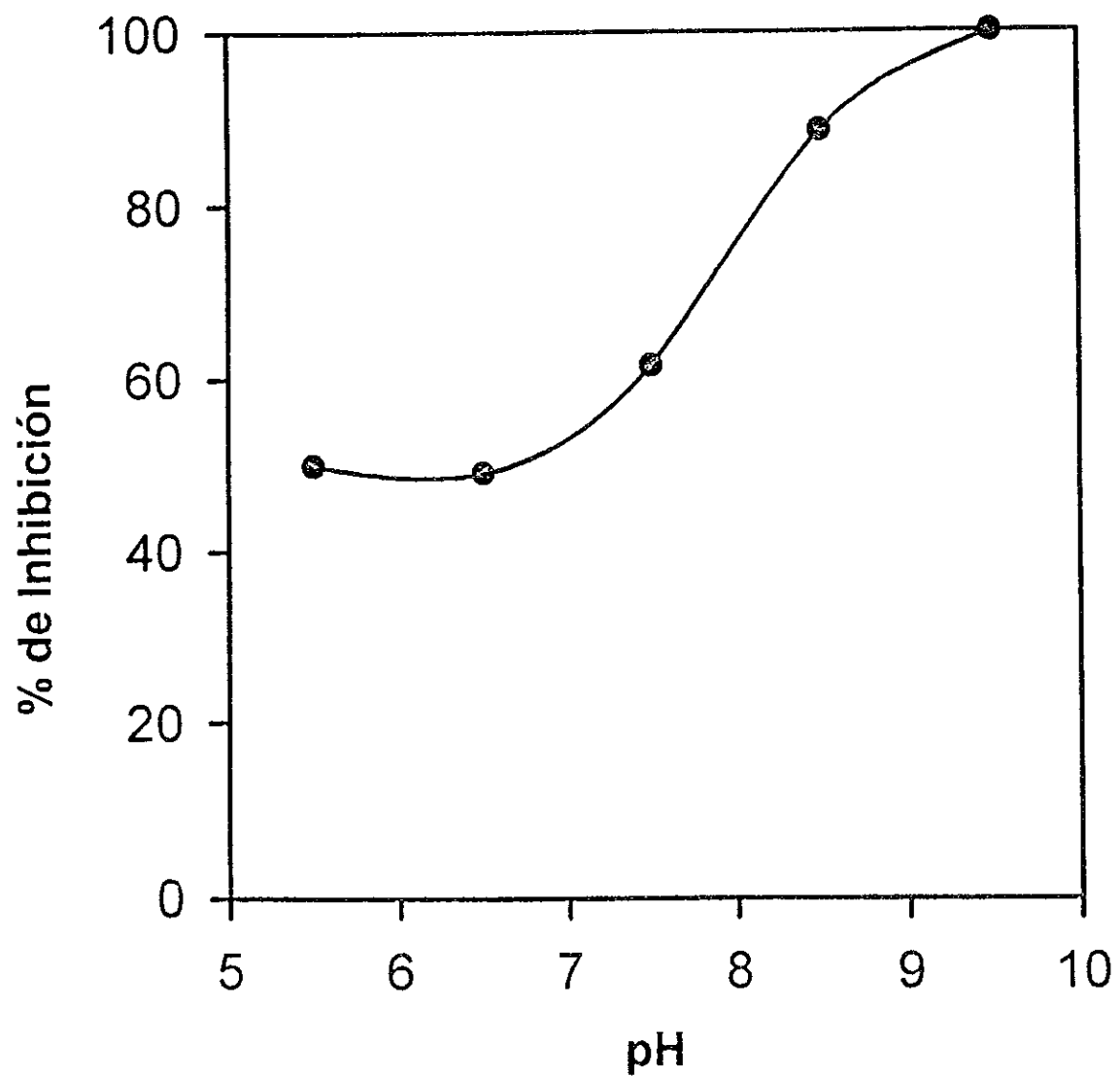


Fig. 8 Dependencia del pH en la Inhibición de la Pirofosfatasa Membranal por trifenilestaño. Las condiciones experimentales son como en la figura 6, con Tris-maléico 50 mM a los valores de pH indicados y a una concentración de 50 μ M de trifenilestaño.

Además del diferente perfil de pH, la hidrólisis del Zn-PPi^{2-} presenta diferencias en cuanto a su cinética y en cuanto a que es insensible al NaF, por lo que debe haber diferencias en cuanto a su sitio de unión a la enzima con respecto al sustrato Mg-PPi^{2-} . Teniendo en cuenta esto, consideramos importante saber si existían diferencias en cuanto a la inhibición por trifenilestaño utilizando este sustrato.

Para poder hacer comparativos los resultados obtenidos para la hidrólisis de Mg-PPi^{2-} , se hicieron curvas de inhibición por trifenilestaño a pH 6.5 y 9.5, a pesar de no estar en el pH óptimo para la hidrólisis de Zn-PPi^{2-} .

En la Fig. 9 se presentan los resultados, donde se observa que la hidrólisis de Zn-PPi^{2-} se inhibe un 87 % con 100 μM de trifenilestaño a los dos pHs usados, aunque el decaimiento de la actividad es diferente dependiendo del pH (siendo más efectivo nuevamente, a pH 9.5).

En la Tabla 2, se muestra una comparación de los I_{50} obtenidos para ambos sustratos. A pH 9.5, los valores de I_{50} con ambos sustratos son similares, a pH 6.5 la sensibilidad al inhibidor es ligeramente menor para Zn-PPi^{2-} , sin embargo, se encuentran los valores en el mismo orden de magnitud. Lo anterior sugiere que la hidrólisis de ambos sustratos está acoplada al transporte de protones de la misma forma.

TABLA 2

	Mg-PPi^{2-}	Zn-PPi^{2-}
I_{50} pH 6.5	43.8 μM	26.5 μM
I_{50} pH 9.5	14.4 μM	13.4 μM

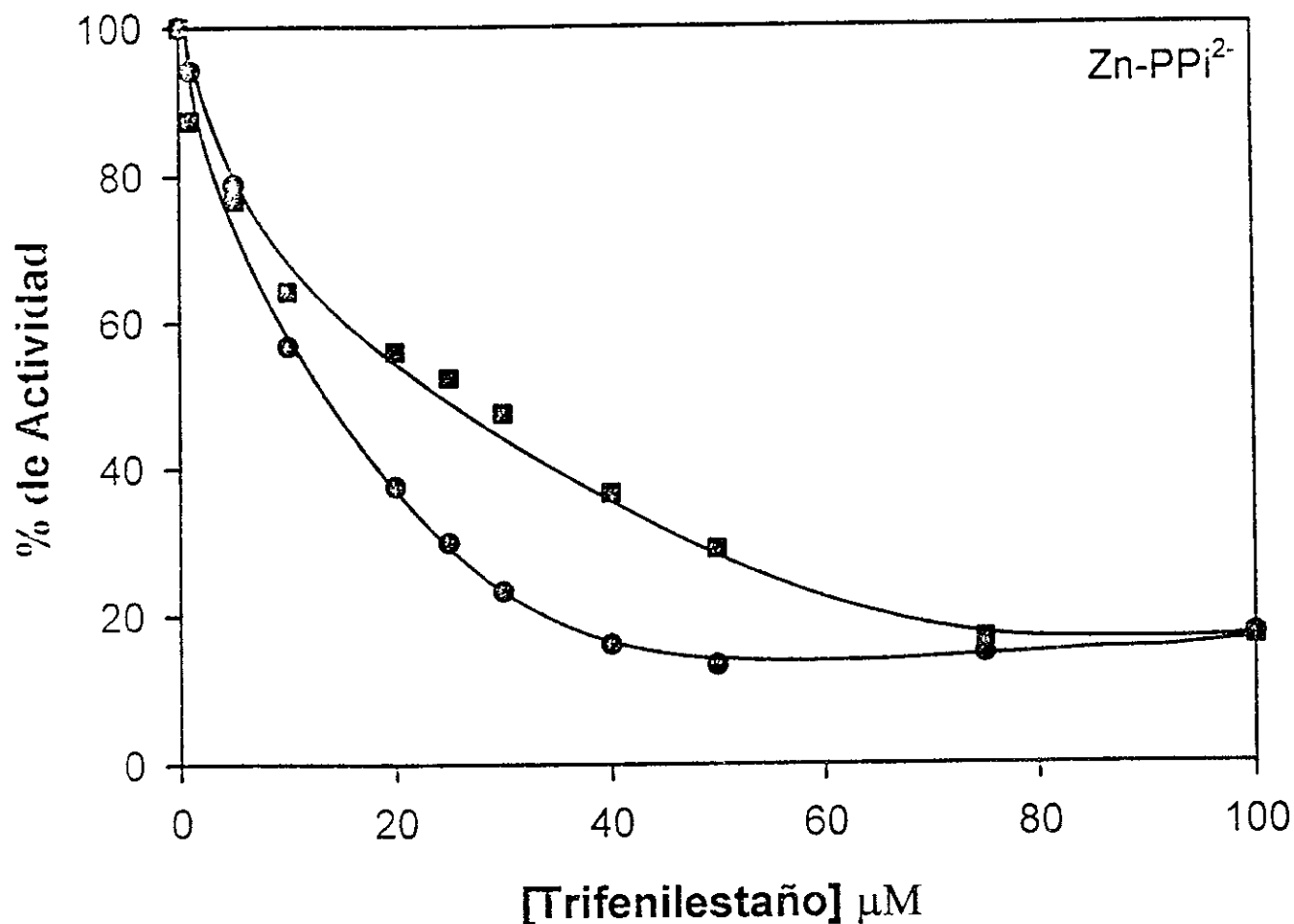


Fig. 9 Efecto del Trifenilestaño Sobre la Pirofosfatasa Membranal Utilizando como Sustrato Zn-PPi²⁻. Los cromatóforos (0.5 mg de proteína) se incuban en Tris-maléico 50 mM, pH 6.5 (■) o pH 9.5 (●), ZnCl₂ 2 mM y 2 mM Na-PPi. Las actividades específicas fueron 71.5 nmoles Pi min⁻¹ mg⁻¹ a pH 6.5 y 15.5 nmoles Pi min⁻¹ mg⁻¹ a pH 9.5.

3.4. Efecto de la Concentración de Proteína

Debido a que los experimentos se realizan en la membrana de los cromatóforos, en donde, además de la pirofosfatasa se encuentran otras proteínas y fosfolípidos, el efecto del trifenilestaño podría ser indirecto a través de estas otras moléculas. Una manera de dar evidencias a favor o en contra de esta posibilidad, es registrando la inhibición por trifenilestaño a diferentes concentraciones de proteína.

En la Fig. 10 se presentan las curvas de inhibición a 3 concentraciones diferentes de proteína, observando que la inhibición es mayor a baja concentración de proteína. En el recuadro observamos los valores de I_{50} de estas curvas, graficados en contra de la concentración de proteína en miligramos. La relación directa entre el inhibidor y la concentración de proteína nos indica que el efecto del trifenilestaño es un efecto directo sobre la enzima.

Gould, J. (1976) demostró que la inhibición de la ATPasa en cloroplastos depende de la concentración de proteína. Nuestros valores de I_{50} están de acuerdo con otros obtenidos para las ATPasas. Experimentos realizados por Yagi y Hatefi (1984) demostraron que el cloruro de trifenilestaño a una concentración de 10 μM produce el 50% de inhibición en la actividad de la H^+ -ATPasa de partículas submitocondriales (usando 10 mg/ml de partículas submitocondriales). En cloroplastos, la concentración que se requiere para inhibir el 50% de la actividad de la H^+ -ATPasa es de 1 μM , utilizando 10 μg de clorofila/ml (Gould, J., 1976) y en el caso de *Vibrio alginoliticus* la I_{50} reportada para trifenilestaño fue de 0.33 μM (Capozza, G., et al, 1991).

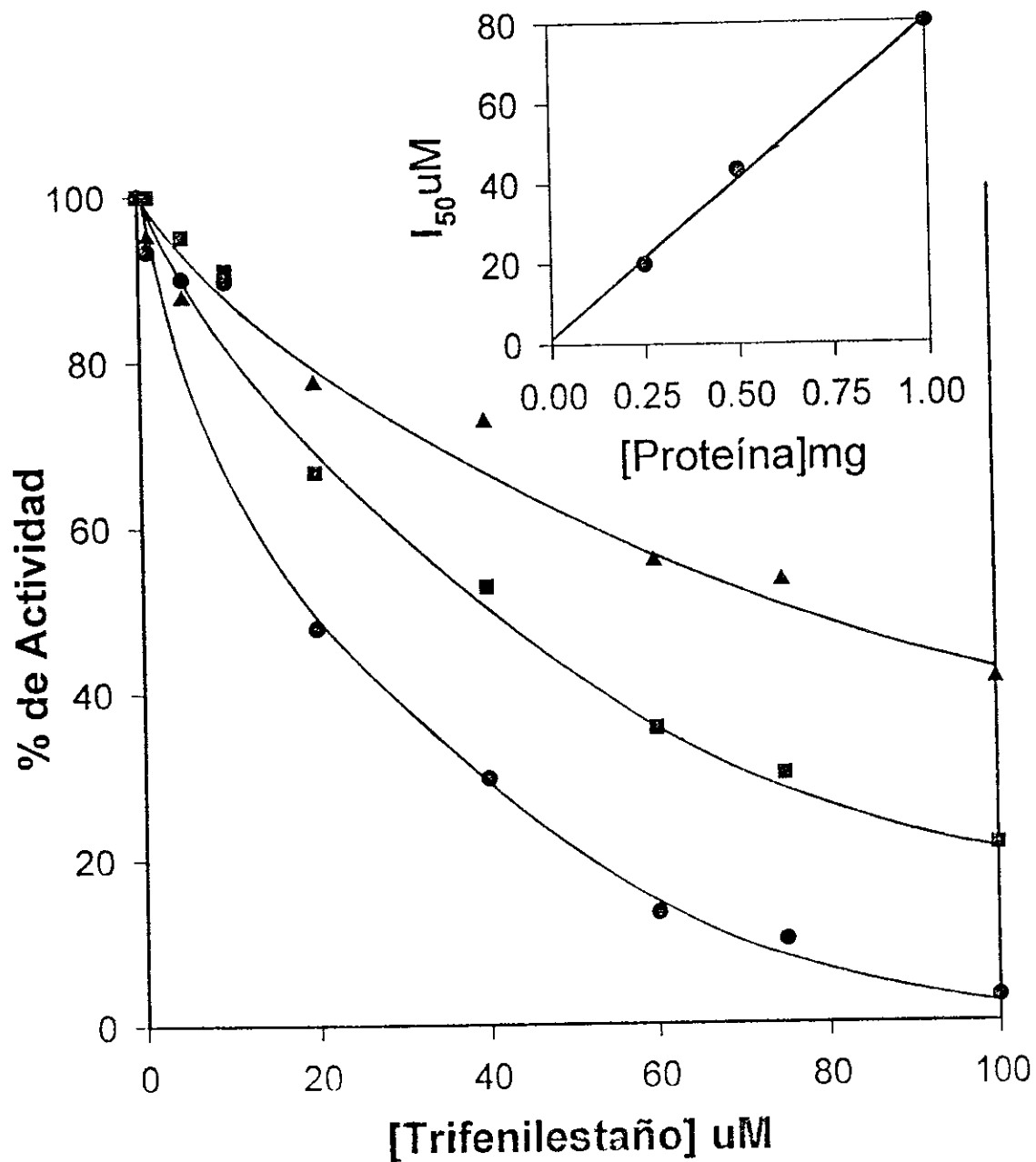


Fig. 10 Efecto de la Concentración de Proteína en la Inhibición de la Pirofosfatasa de Membrana por Trifenilestaño. Los experimentos fueron realizados a pH 8.6 bajo las mismas condiciones de la Fig. 6. Las concentraciones de cromatóforos fueron 0.25 mg (●), 0.5 mg (■) y 1 mg (▲) de proteína total. El recuadro muestra la relación entre la I_{50} y la concentración de la proteína del cromatóforo.

3.5. Efecto del Trifenilestaño sobre las Propiedades Cinéticas de la Pirofosfatasa Membranal.

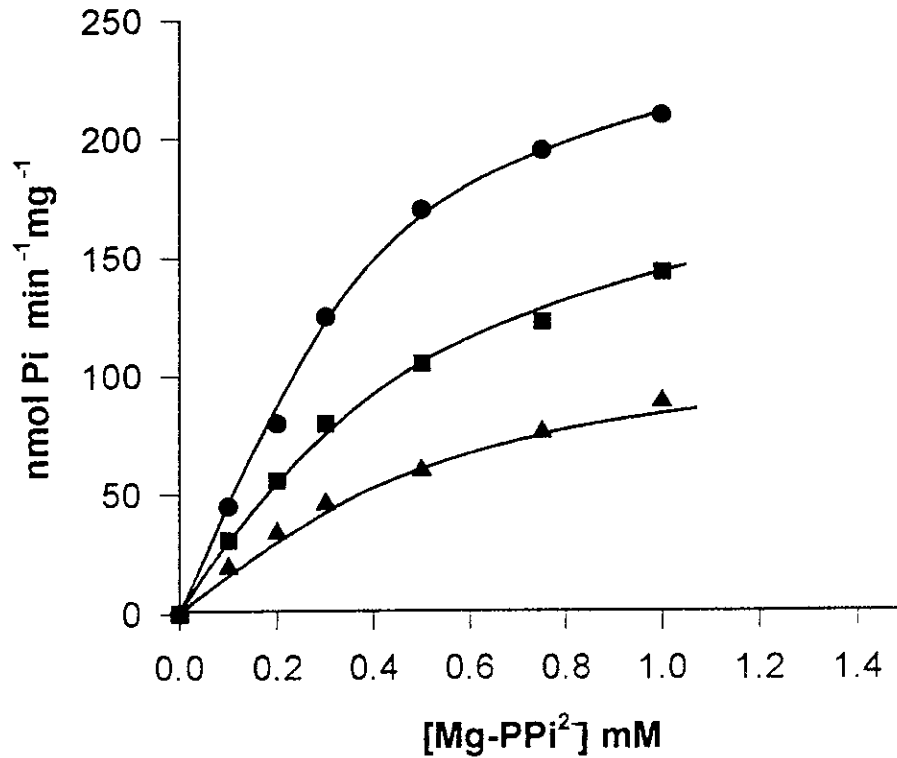
Para estudiar el efecto del trifenilestaño sobre las constantes cinéticas de la enzima en el cromatóforo, se realizó el experimento de la Fig. 11. En la Fig. 11 A se muestra el efecto de dos concentraciones de trifenilestaño (10 y 25 μM) sobre la velocidad de la hidrólisis de pirofosfato en cromatóforos, utilizando concentraciones de Mg-PPi^{2-} de 0 a 1 mM, manteniendo libre 1 mM de Mg^{2+} . La representación en doble-recíproca del experimento (Fig. 11 B), muestra un efecto de inhibición no competitiva. Es decir, las pendientes de las rectas son diferentes y no comparten un punto de intersección común sobre el eje $1/V_0$. El valor de la intersección sobre dicho eje es mayor para la enzima inhibida que para la no inhibida (control), lo que indica que la V_{max} decrece en presencia del trifenilestaño. En cambio, todas las rectas se unen en un punto en el eje de las x, indicando que la K_m no sufre modificación

Los valores de K_m y V_{max} aparentes obtenidos son los siguientes:

	K_m [mM]	V_{max} (nmoles Pi min^{-1} mg^{-1})
Control (sin trifenilestaño)	1.0	452.6
+ 10 μM trifenilestaño	1.0	344.0
+ 25 μM trifenilestaño	0.86	242.3

Estos resultados indican que el trifenilestaño se une a la enzima en un sitio diferente al sitio activo. En analogía con el efecto reportado del trifenilestaño sobre la ATP sintetasa, en donde éste inhibidor actúa a nivel del canal de H^+ (Gould, 1976), el hecho de que en la pirofosfatasa membranal se comporte como un inhibidor no competitivo, hace suponer que también aquí actúa de la misma forma.

A



B

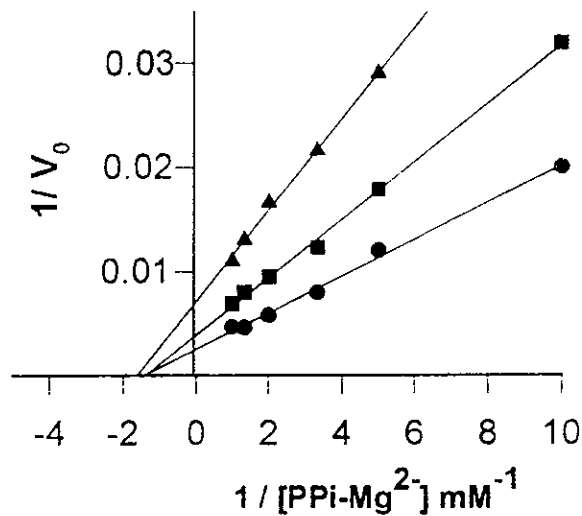


Fig. 11 Efecto del Trifenilestaño Sobre la Cinética de Hidrólisis de Mg-PPi²⁻. A. Las concentraciones de Na-PPi y MgCl₂ se calcularon para obtener las concentraciones de MgPPi²⁻ indicadas en la abcisa y mantener 1 mM de Mg²⁺ libre en el medio. El medio de reacción contiene Tris-maléico 50 mM, pH 8.6, 0.5 mg de proteína de cromatóforos y el tiempo de incubación es de 4 min. B. Gráfica de Doble -recíprocas. Control (●), trifenilestaño 10 μM (■) y trifenilestaño 25 μM (▲).

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, Sosa y cols. (1992) demostraron que el Mg^{2+} libre es un activador esencial y ordenado de la pirofosfatasa membranal de *R. rubrum* y en ese mismo año, Romero y Celis (1992) proponen que el sitio activador de la enzima se encuentra dentro del sitio activo. Con base en estos trabajos, decidimos ver si la variación en concentración de Mg^{2+} libre modificaba el efecto inhibitorio del trifenilestaño. En la Fig. 12 se muestra el experimento realizado utilizando dos concentraciones de trifenilestaño (10 y 25 μM). Para realizar el experimento se mantuvo la concentración de $Mg-PPi^{2-}$ cerca de 1 mM y la concentración de Mg^{2+} libre se incrementó de 0.03 mM hasta 1.0 mM. Como se observa, en las dos concentraciones de trifenilestaño usadas, la inhibición no disminuye, sino que al contrario se observa un ligero aumento. El hecho de que el Mg^{2+} libre no reduzca la inhibición por trifenilestaño, sugiere que el sitio de acción del compuesto no es el mismo que el sitio para Mg^{2+} libre que se localiza dentro del sitio activo.

3.6. Efecto de los Compuestos Tiol en la Inhibición por Trifenilestaño.

Algunos trabajos indican que los compuestos tiol son capaces de revertir la inhibición ejercida por los compuestos orgánicos de estaño sobre las ATPasas (Stockdale, et al., 1970; Cain, et al, 1977; Siebenlist y Taketa, 1983; Yagi y Hatefi, 1984). Los monotioles y ditioles como 2-mercaptoetanol, dihidrolipoamida y DTT revierten la inhibición por cloruro de trifenilestaño de la actividad de intercambio $ATP-^{32}Pi$ de las partículas submitocondriales (Stockdale, et al, 1970) y también revierten la inhibición de la fosforilación oxidativa y ATPasa mitocondrial por el cloruro de dibutilestaño (Cain, et al., 1977; Byington, 1971).

Con base en esta información, utilizamos al DTE y al 2-mercaptoetanol para ver si estos compuestos podían prevenir la inhibición de trifenilestaño sobre la actividad de la pirofosfatasa

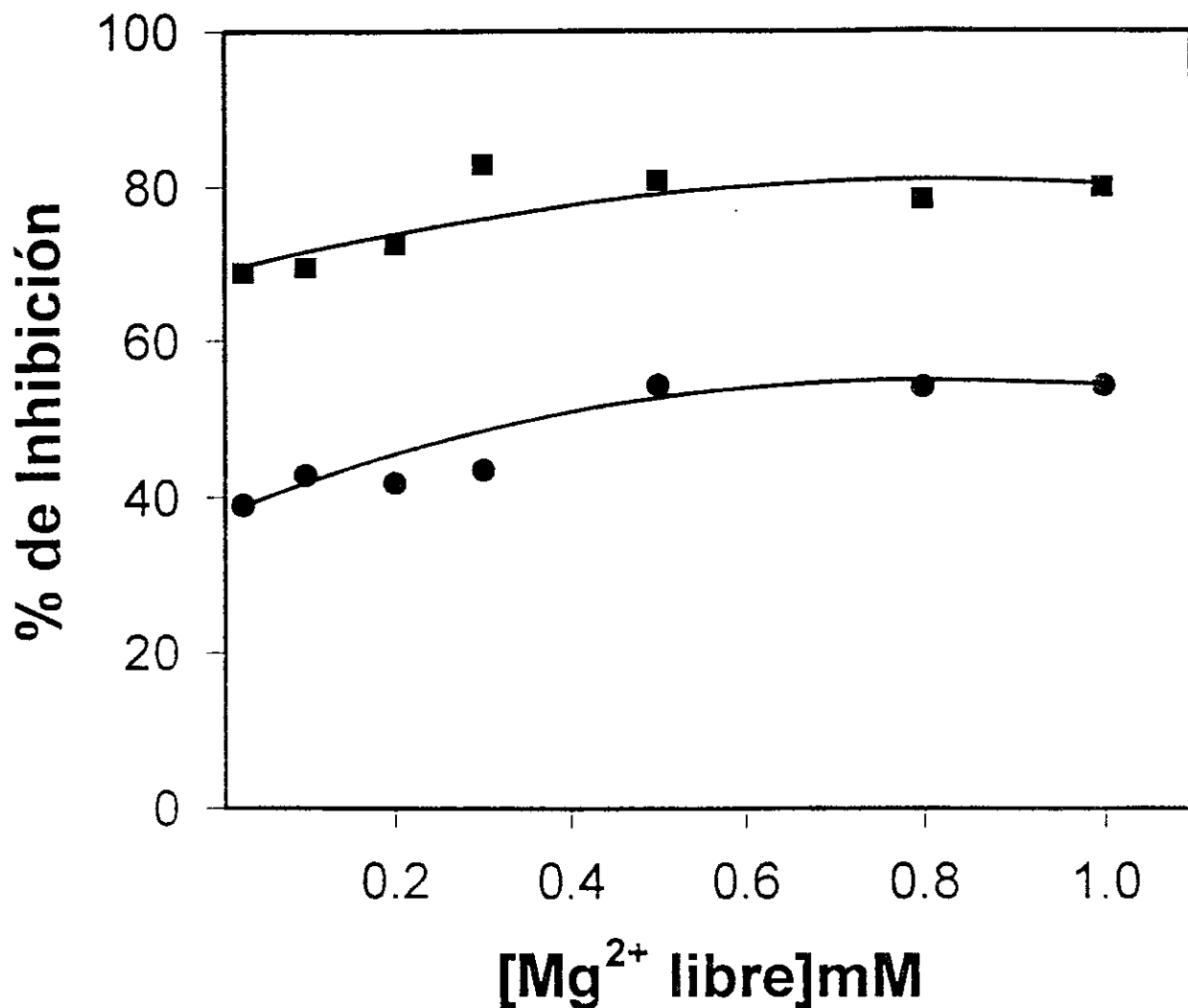


Fig. 12 Efecto del Mg²⁺ Libre sobre la Inhibición de la Pirofosfatasa Membranar por Trifenilestaño en Cromatóforos. El medio contiene: Tris-maléico 50 mM, pH 9.5, NaPPi 1 mM y trifenilestaño a 10 µM (●) o 25 µM (■). La concentración de MgCl₂ se varía de 1 mM a 2 mM y la concentración del Mg²⁺ libre fue calculada. En todas las concentraciones de Mg²⁺ libre, hay aproximadamente 1 mM de Mg-PPi²⁻ presente en el medio.

membranal en los cromatóforos de *R. rubrum*. La Fig. 13 muestra el efecto de estos agentes reductores sobre la inhibición de la pirofosfatasa membranal por trifenilestaño. La inhibición de la actividad enzimática por trifenilestaño en presencia de DTE fue menor que en presencia de trifenilestaño solo, alcanzando una inhibición del 10% con 25 μM de trifenilestaño, la cual no aumenta con concentraciones mayores del inhibidor. En presencia de 2-mercaptoetanol, la actividad de la enzima disminuye al ir aumentando la concentración del inhibidor, alcanzando hasta 75 % de inhibición con 100 μM de trifenilestaño pero los niveles de inhibición nuevamente son menores que con el inhibidor solo. Estos resultados se pueden interpretar de dos formas a) que los compuestos tiol modifican grupos SH de la enzima donde actúa y así previenen el efecto inhibitor del compuesto, o bien, b) que los agentes reductores pudieran interactuar directamente con el trifenilestaño y así afectar su acción inhibitoria sobre la pirofosfatasa. Para decidir entre estas dos posibilidades se diseñaron los siguientes experimentos. En el primero los cromatóforos se preincubaron durante 10 minutos con DTE o 2-mercaptoetanol y se lavaron por ultracentrifugación antes de medir la actividad de pirofosfatasa en presencia de diferentes concentraciones de trifenilestaño (25, 50 y 100 μM). Si los compuestos reductores estuvieran modificando grupos SH de la proteína durante los 10 minutos de preincubación, esta modificación no permitiría tener una inhibición posterior por trifenilestaño.

Los resultados del experimento se muestran en la Fig. 14 A, en donde se observa que en presencia de ambos agentes reductores, la inhibición por trifenilestaño es igual al control, por lo que el DTE y el 2-mercaptoetanol, no previenen la inhibición por trifenilestaño por modificación de grupos SH en la proteína. En el segundo experimento, los cromatóforos fueron preincubados con trifenilestaño a concentraciones de 25, 50 y 100 μM durante 10 minutos, posteriormente los

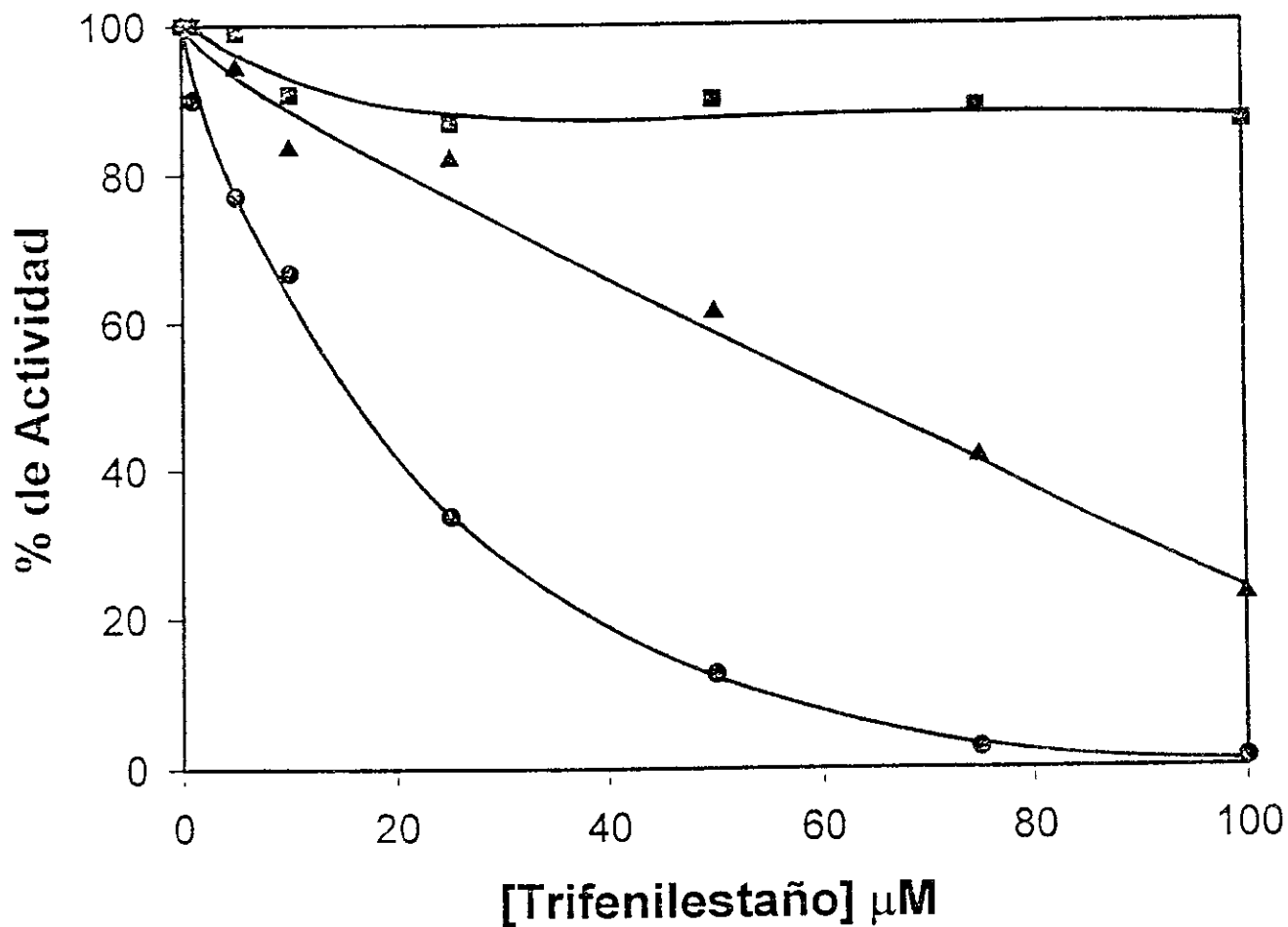


Fig. 13 Efecto de Agentes Reductores sobre la Inhibición por Trifenilestaño de la Pirofosfatasa Membranal de Cromatóforos. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Fig. 6 a pH 9.5, excepto por la adición de 2-mercaptoetanol 1 mM (▲) o DTE 1 mM (■) al medio de reacción. Control, (●) contiene sólo la adición del trifenilestaño, sin agente reductor.

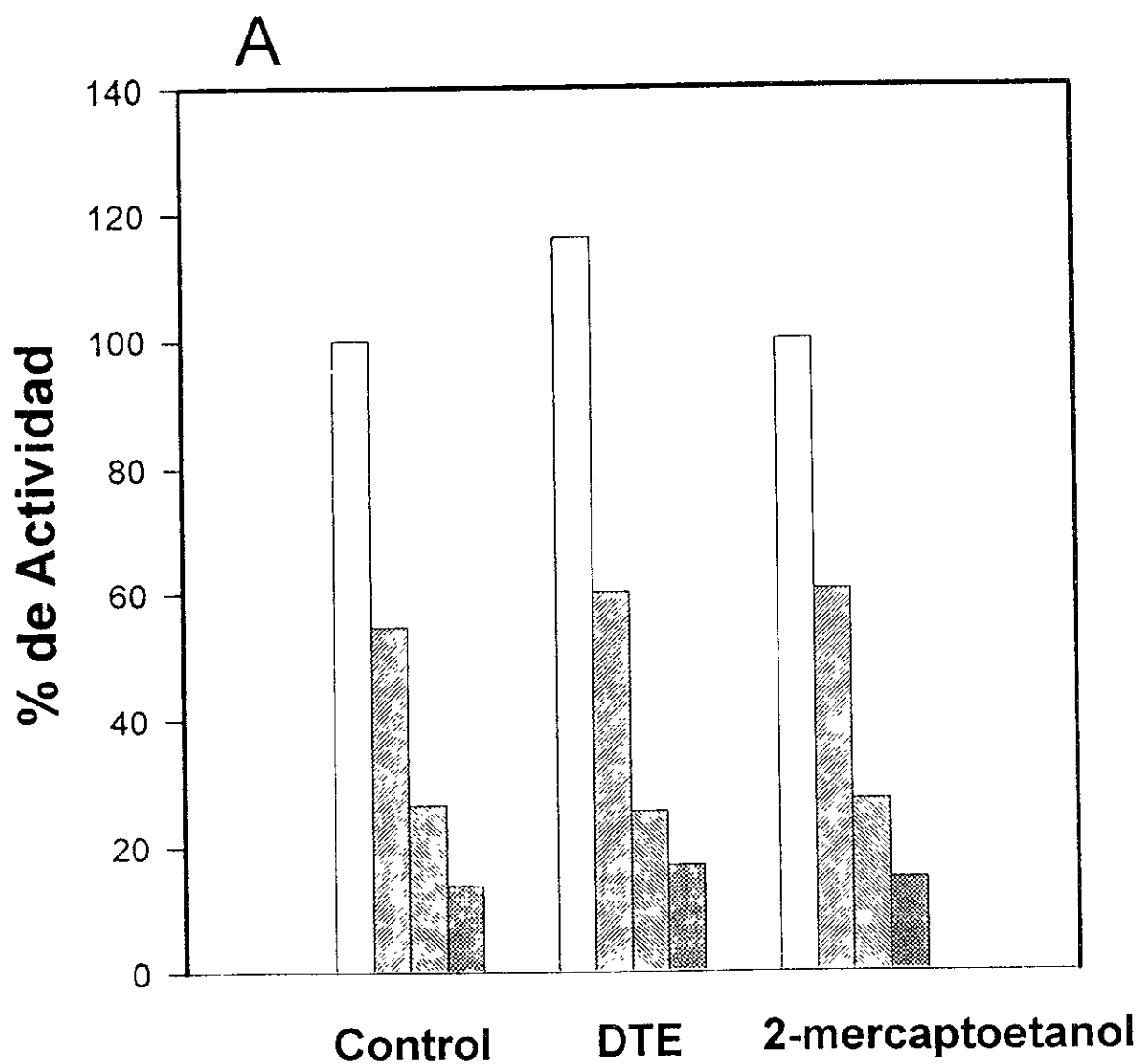


Fig. 14 A Efecto de DTE y 2-mercaptoetanol Agregados Antes de la Adición de Trifenilestaño. Los cromatóforos se preincubaban 10 min con DTE 1 mM o 2-mercaptoetanol 1 mM y se lavan por ultracentrifugación. Posteriormente la actividad de la pirofosfatasa se mide a diferentes concentraciones de trifenilestaño, 0 , 25 μM , 50 μM , y 100 μM .

cromatóforos se lavaron por ultracentrifugación y la actividad de la pirofosfatasa se determinó en presencia de DTE y 2-mercaptoetanol. Esto se hizo para que el trifenilestaño ejerciera su efecto inhibitor en el sitio donde actúa y ver si la adición posterior de los agentes reductores podían sacar al inhibidor de su sitio de acción. Los resultados (Fig. 14B) muestran que la inhibición es prácticamente la misma independientemente de la adición de DTE y 2-mercaptoetanol por lo que esto indica, que una vez que el trifenilestaño está en su sitio inhibitorio, no puede ser desplazado por los compuestos reductores y que el efecto que se observó en la Fig. 13 en donde el DTE y el 2-mercaptoetanol disminuyen la inhibición de la pirofosfatasa por trifenilestaño, se debe a una interacción directa entre los compuestos reductores y el trifenilestaño libre en el medio previniendo su acción inhibitoria y no a un efecto sobre algún grupo tiol de la enzima. Se ha reportado que entre los compuestos orgánicos de estaño y los compuestos tiol se pueden producir compuestos de estaño-azufre inactivos (Wulf y Byington, 1975, Chandra y col. 1989), alterando de esta manera el efecto inhibitorio de los compuestos orgánicos de estaño sobre las enzimas, lo que apoya los resultados obtenidos en este trabajo.

3.7. Efecto del Trifenilestaño sobre la Pirofosfatasa Membranal Solubilizada.

Una vez definida la inhibición de la pirofosfatasa por trifenilestaño en la membrana del cromatóforo decidimos probar si esta inhibición se obtenía en la enzima solubilizada. En la Fig. 15, se observa que la pirofosfatasa membranal solubilizada también es inhibida por trifenilestaño, sin embargo, es menos sensible a este compuesto que cuando se encuentra en la membrana del cromatóforo. La concentración requerida para obtener una inhibición del 50% de la pirofosfatasa solubilizada es 6.7 veces más alta que la concentración que se requiere para inhibir a la enzima membranal, con un valor de $I_{50} = 94 \mu\text{M}$. Estas diferencias en sensibilidad al trifenilestaño entre

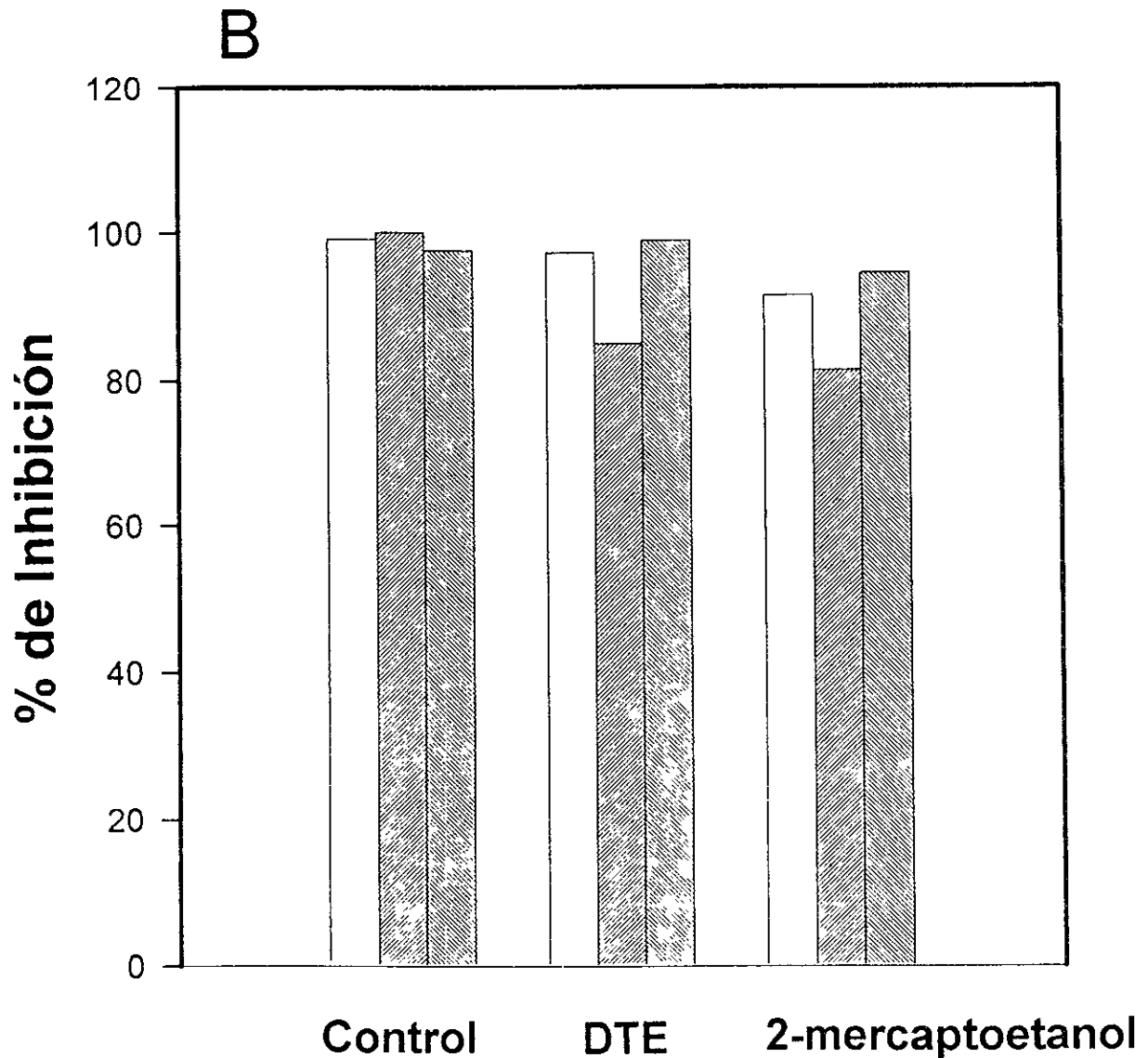


Fig. 14 B Efecto de DTE y 2-mercaptoetanol Agregados Después de la Adición de Trifenilestaño. Los cromatóforos se preincubaban 10 minutos con 25 μM □, 50 μM ▨, y 100 μM ▩, de trifenilestaño y se lavan por ultracentrifugación. La actividad de la pirofosfatasa se mide sin el agente reductor, con DTE 1 mM o 2-mercaptoetanol 1 mM. Todas las actividades se cuantifican como se describe en Materiales y Métodos.

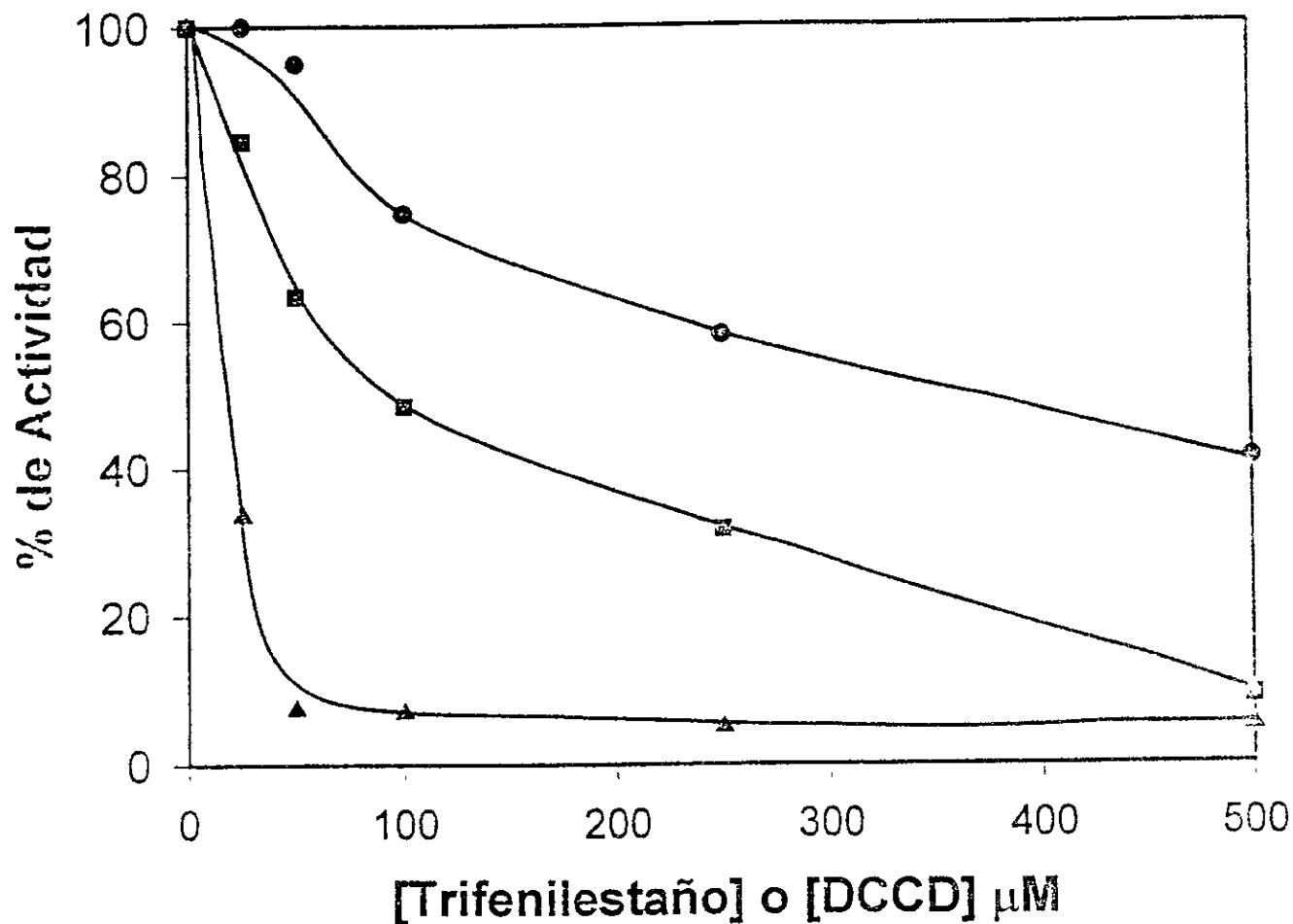


Fig. 15 Inhibición por Trifenilestaño y DCCD de la Pirofosfatasa Membranal Solubilizada. La enzima solubilizada (0.27 mg proteína) se preincuba 3 horas con las concentraciones indicadas de los inhibidores y se agrega el sustrato para iniciar la reacción. El experimento se realiza a pH 7.5. Pirofosfatasa membranar sin solubilizar en presencia de trifenilestaño (▲), pirofosfatasa solubilizada en presencia de trifenilestaño (■) y DCCD (●).

ambas formas de la enzima pueden deberse a varios factores: 1) el canal de protones de la enzima puede estar poco modificado por la solubilización con el detergente y por lo tanto ser menos sensible al inhibidor, 2) la solubilidad del trifenilestaño en la membrana pudo ser más alta que en las micelas del detergente en la enzima solubilizada y 3) podría haber un efecto inhibitorio indirecto sobre la membrana que resulta en una inhibición mas eficiente.

3.8. Comparación entre la Inhibición por Trifenilestaño y DCCD

En la Fig. 15 se incluye el efecto inhibitorio de DCCD sobre la pirofosfatasa solubilizada. Como ya mencionamos en la Introducción, este compuesto modifica algún grupo carboxilo en la región del canal de H⁺ de la enzima (Baltscheffsky et al, 1982)

De acuerdo a Nyrén et al (1991) la pirofosfatasa solubilizada y purificada es inhibida por DCCD con una I₅₀ de aproximadamente 5 µM. En nuestro experimento, se obtiene una I₅₀ = 360 µM para la inhibición por DCCD, sin embargo la preparación que utilizamos es parcialmente pura y contiene 2% de Triton X-100, lo que puede estar interfiriendo con la sensibilidad al DCCD.

De cualquier manera, al comparar la inhibición ejercida por el trifenilestaño y el DCCD (Fig 15), es muy claro que la pirofosfatasa solubilizada es más sensible a trifenilestaño que al DCCD bajo las mismas condiciones (I₅₀= 94 µM contra I₅₀= 360 µM respectivamente)

Para determinar si realmente el efecto inhibitorio del trifenilestaño era más potente que el del DCCD, se comparó su efecto sobre la pirofosfatasa membranal de los cromatóforos, bajo las mismas condiciones. Los valores de I₅₀ obtenidos fueron. 40 µM para la inhibición con trifenilestaño y 87 µM para la inhibición con DCCD. Además, con trifenilestaño la inhibición es casi total (97% con 100 µM), mientras que con DCCD queda una actividad residual asintótica del 25% (aún con 500 µM de DCCD). Los resultados de este experimento indican que la hidrólisis de

pirofosfato en los cromatóforos es más sensible a la inhibición por trifenilestaño que a la de DCCD.

Baltscheffsky et al (1982), obtienen una I_{50} de 15 μM para la inhibición por DCCD de la pirofosfatasa membranal de cromatóforos y la máxima inhibición con 500 μM del compuesto es de 80%. Como puede apreciarse, la I_{50} para la inhibición por DCCD que obtenemos es 5.8 veces mayor que la reportada por ellos. Es conveniente hacer notar que en múltiples experimentos, utilizando condiciones similares a las suyas y variandolas, en ningún caso hemos obtenido sus valores de I_{50} . Por otro lado, el porcentaje de la actividad residual encontrada por Baltscheffsky et al (1982), y el nuestro no difieren notablemente (20 y 25%, respectivamente).

En resumen, los resultados comparativos entre la inhibición con trifenilestaño y DCCD en la pirofosfatasa de *R. rubrum*, indican que el trifenilestaño es un inhibidor más efectivo que el DCCD, bajo condiciones similares

IV CONCLUSIONES

El trifenilestaño es un potente inhibidor de la pirofosfatasa membranal de los cromatóforos de la bacteria *Rhodospirillum rubrum*, también inhibe a la pirofosfatasa solubilizada, aunque con menor eficiencia.

Teniendo en cuenta las características altamente lipofílicas de este inhibidor, así como los efectos ya reportados de este compuesto sobre el canal de H^+ de ATPasas, el sitio más probable de inhibición del trifenilestaño sobre la pirofosfatasa de membrana debe ser un componente membranal de la enzima. Esto se apoya en los siguientes resultados que se obtuvieron:

- 1) La pirofosfatasa de membrana del cromatóforo es inhibida, mientras que la pirofosfatasa citoplásmica de la misma bacteria, que carece de canal de H^+ no lo es (Fig. 7).
- 2) El sitio activo de la pirofosfatasa membranal parece no ser el sitio de interacción del inhibidor con la enzima dado que la K_m para el sustrato no se afecta considerablemente (Fig. 11).
- 3) La presencia de Mg^{2+} libre, activador de la enzima que actúa en el sitio activo, no disminuye la inhibición por el trifenilestaño (Fig. 12).

Sin embargo, se requiere más evidencia experimental para identificar el sitio específico en la proteína, responsable del pegado del trifenilestaño

En las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, el trifenilestaño es un inhibidor más eficaz que el DCCD.

El presente trabajo es una contribución a la caracterización de nuevos inhibidores de la sección hidrofóbica de la pirofosfatasa que está asociada a la translocación de H^+ . Su empleo, permitirá entender más acerca del mecanismo de translocación de H^+ y de la transducción energética por la enzima, mecanismos que a la fecha han sido poco explorados.

Otra conclusión que obtuvimos , aunque no era parte de los objetivos de este trabajo, es que la ATPasa del cromatóforo también se inhibe por trifenilestaño. Este es el primer reporte al respecto.

V BIBLIOGRAFIA

- Aldrige, W. N., Street, B. W. y Noltes, J. G. (1981) The action of 5-coordinate triorganotin compounds on rat liver mitochondria. *Chem. Biol. Interact.* 34: 223-232.
- Azzi, A. y Nalecz, M. J. (1984) Is dicyclohexylcarbodiimide a probe for proton-translocating enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 9: 513-514.
- Baccarini, A., Melandri, B. A. (1978) Coupling Factors, en: R. K. Clayton, W. R. Sistrom (Eds.), *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum Press, New York and London, pp 615-628.
- Baltscheffsky, H. y von Stedingk, L. V. (1966) Bacterial photophosphorylation in the absence of added nucleotide. A second intermediate stage of energy transfer in light-induced formation of ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22: 722-728.
- Baltscheffsky, M. (1967) Inorganic pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Nature (London)*. 216: 241-243.
- Baltscheffsky, M. (1967a) Inorganic pyrophosphate as an energy in photosynthetic and respiratory electron transport phosphorylation system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28.
- Baltscheffsky, M. (1968) Inorganic pyrophosphatase as energy donor in photosynthetic and respiratory structures. En: *Regulatory functions of biological membranes* (J. Jarnefelt, ed.) B. B. Libr. 11: 277-286.
- Baltscheffsky, M. (1969a) Energy conversion-linked changes of carotenoid absorbance in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Arch. Biochem. Biophys.* 130: 646-652.
- Baltscheffsky, M. (1969b) Reversed energy conversion reaction of bacterial photophosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 133: 46-53.
- Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H. y Boork, J. (1982) Evolutionary and mechanistic aspects on coupling and phosphorylation in photosynthetic bacteria. En: *Electron transport and photophosphorylation. Topics in Photosynthesis. Vol. 4* (Ed. Barber, J.) Cap. 7, pp.249-272. Elsevier Biomedical Press., Amsterdam, New York, Oxford.
- Baltscheffsky, M. y Nyren, P. (1984) The synthesis and utilization of inorganic pyrophosphate. En: *Bioenergetics* (Ed. L. Ernster) pp 187-206, Elsevier, Amsterdam.

- Baltscheffsky, M. y Nyrén, P. (1986) Preparation and reconstitution of the proton-pumping membrane-bound inorganic pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum* Methods in Enzymol. 126: 538-545.
- Barry, R. J. y Dunaway-Mariano, D. (1987) The kinetic mechanism of yeast inorganic pyrophosphatase. Arch. Biochem. Biophys. 259: 196-203.
- Boyer, P. D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E. y Slater, E. C. (1977) Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Ann. Rev. Biochem. 46: 955-1026.
- Boyer, P. D. (1993) The binding change mechanism for ATP synthase - Some probabilities and possibilities Biochim Biophys. Acta 1140: 215-250
- Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase a splendid molecular machine. Annu. Rev. Biochem. 66: 717-749.
- Brierley, G. P., Jurkowitz, M. y Jung, D. W. (1978) Osmotic swelling of heart mitochondria in acetate and chloride salts. Evidence for two pathways for cation uptake. Arch Biochem. Biophys. 190: 181-192.
- Britten, C. J., Turner, J. C. y Rea, P. A. (1989) Identification and purification of substrate-binding subunit of higher plant H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase. FEBS Lett. 256: 200-206.
- Byington, K. H. (1971) Effects of triphenyltin compounds on the adenosine triphosphatase activity of beef heart submitochondrial particles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42: 16-22.
- Byington, K. H., Yeh, R. Y. y Forte, L. R. (1974) The hemolytic activity of some trialkyltin and triphenyltin compounds. Toxicol. Appl. Pharmacol. 27: 230-240.
- Cain, K., Partis, M. D. y Griffiths, D. E. (1977) Dibutylchloromethyltin chloride, a covalent inhibitor of the adenosine triphosphate synthase complex. Biochem. J. 166: 593-602.
- Capozza, G., Dmitriev, O. Y., Krasnoselskaya, I. A., Papa, S. y Skulachev, V. P. (1991) The effect of F₀ inhibitors on the *Vibrio alginoliticus* membrane ATPase. FEBS Lett. 280: 274-276.
- Celis, H., Romero, I. y Gómez-Puyou, A. (1985) The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: Effects of Mg²⁺, phosphate and pyrophosphate. Arch. Biochem. Biophys. 236: 767-774.

- Celis, H. y Romero, I. (1987) The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: Effects of pH and divalent cations. *J. Bioenerg. Biomembr.* 19: 255-272.
- Clayton, R. K. y Sistrom, W. R. (1978) The photosynthetic bacteria. New York y London Plenum Press. 946 pp.
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W. R. y Stainer, R. Y. (1957) The kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.* 49: 25-68.
- Cooperman, B. S. (1982) The mechanism of action of yeast inorganic pyrophosphatase, en: *Methods in Enzymology* (Ed. Purich, D.) Vol. 87, Parte C, pp.526-548, Academic Press. New York y London.
- Crofts, A. R. (1974) The electron transport system as a pump in the photosynthetic bacteria, en: *Perspectives in Membrane Biology* (Editores: S. Estrada y C. Gitler), pp. 373-412, Academic Press New York, San Francisco y London.
- Chandra, S., Polya, G. M., James, B. D. y Magee, R. J. (1989) Inhibition of oxidative phosphorylation by organotin thiocarbamates. *Chem. Biol. Interac.* 71: 21-36.
- De Meis, L. (1984) Pyrophosphate of high and low energy Contributions of pH, Ca^{2+} , Mg^{2+} and water to free energy of hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 259: 6090-6097.
- Dupaix, A., Johannin, G. y Arrio, B. (1989) ATP synthesis and pyrophosphate-driven proton transport in tonoplast enriched vesicles isolated from *Catharanthus roseus*. *FEBS Lett.* 249: 13-16.
- Edwards, G. E., Nakamoto, H., Burnell, J. N. y Hatch, M. D. (1985) Pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C_4 Photosynthesis: Properties and mechanism of light dark regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 255-286.
- Emanuel, E. L., Carver, M. A., Solani, G. C. y Griffiths, D. E. (1984) Differential inhibition of F_0F_1 ATPase -catalyzed reactions by bovine heart submitochondrial particles by organotin compounds. *Biochim. Biophys. Acta* 766: 209-214
- Evans, H. J. y Wood, H. G. (1968) The mechanism of the pyruvate, phosphate dikinase reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61: 1441-1453.

- Floodgard, H. y Fleron, P. (1974) Thermodynamic parameters for the hydrolysis of inorganic pyrophosphate pH 7.4 as a function $[Mg^{2+}]$, $[K^+]$ and ionic strength determined from equilibrium studies of the reaction. *J. Biol. Chem.* 249: 3464-3465.
- Futai, M., Noumi, T. y Maed, M. (1989) ATP synthase (H^+ -ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 111-136.
- Gould, J. M. (1976) Inhibition by triphenyltin chloride of a tightly-bound membrane component involved in photophosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 62: 567-575.
- Guillory, R. J. y Fisher, R. R. (1972) Studies on the light dependent synthesis of inorganic pyrophosphate by *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochem. J.* 129: 471-481.
- Harvey, G. W. y Keister, D. L. (1981) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria: $P_i = HOH$ oxygen exchange catalyzed by membrane-bound inorganic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 208: 426-430.
- Hatch, M. D. y Slack, C. R. (1968) A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C_4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem. J.* 106: 141-146.
- Hinkle, P. C. y McCarty, R. E. (1978) How cells make ATP. *Sci. Am.* 20: 58-75.
- Hutner, S. H. (1950) Anaerobic and aerobic growth of purple bacteria (Athiorhodaceae) in chemically defined media. *J. Gen. Microbial.* 4: 286-293.
- Karunairatnam, M. C., Spizizen, J. y Gest, H. (1958) Preparations and properties of protoplasts of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* 29: 649.
- Keister, D. L. y Yike, N. J. (1967a) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. I. Succinate-linked ATP-driven NAD^+ reduction by *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 415-422 .
- Keister, D. L. y Yike, N. J. (1967b) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. II. The energy-dependent reduction of oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide in chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* 6: 3847-3857.
- Keister, D. L. y Mynton, N. L. (1971) ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42: 932-939.
- Keltjens, J. T., van Erp, R., Mooijart, R. J., van der Drift, Ch. y Vogels, G. D. (1988) Inorganic pyrophosphate synthesis during methanogenesis from methylcoenzyme M by cell-free

- extracts of *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain AH). Eur. J. Biochem. 172: 471-476.
- Klemme, J. H., Klemme, B. y Gest, H. (1971) Catalytic properties and regulatory diversity of inorganic pyrophosphatases from photosynthetic bacteria. J. Bacteriol. 108: 1122-1128.
- Kolakowsky Jr., L. F., Schloesser, M. y Cooperman, B. S. (1988) Cloning molecular characterization and chromosome localization of the inorganic pyrophosphatase (PPA) gene from *S. cerevisiae*. Nucl. Acid. Res. 22: 10441-10452.
- Kornberg, A. (1957) Pyrophosphorylases and phosphorylases in biosynthetic reactions, en Advances in Enzymology Vol. 18 (Ed. F. F. Nord) pp. 191-240. Interscience, Nueva York.
- Kowalczyk, S. y Maslowsky, P. (1984) Oxidation-linked formation of inorganic pyrophosphate in maize shoot mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 766: 570-575.
- Krämer, R. (1985) Characterization of pyrophosphate exchange by the reconstituted adenine nucleotide translocator from mitochondria. Biochim. Biophys. Res. Commun. 127: 129-135.
- Lahti, R. (1983) Microbial inorganic pyrophosphatases. Microbiol. Rev. 47: 169-179.
- Lawson, J. W. R. y Veech, R. L. (1979) Effects of pH and free Mg^{2+} on the K_{eq} of the creatine kinase reaction and other phosphate hydrolysis and phosphate transfer reactions. J. Biol. Chem. 254: 6528-6537.
- Lerma, C. y Gómez Lojero, C. (1982) Photosynthetic phosphorylation by a membrane preparation of the cyanobacterium *Spirulina maxima*. Biochim. Biophys. Acta 680: 181-186.
- Lipmann, F. (1965) The origin of prebiological systems, p 259, Academic, Nueva York y Londres
- Lorenson, M. Y y Jacobs, L. S. (1984) Inhibitor studies with adenohipophyseal granule membrane ATPase. Evidence for a membrane environment wich modulates sensitivity to inhibitors. Biochim. Biophys. Acta 769: 479-485.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randal, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

- Lundin, M., Baltscheffsky, H. y Ronne, H. (1991) Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* 226: 12168-12172.
- Lundin, M., Deopujari, S. W., Lichko, L. Pereira da Silva, L. y Baltscheffsky, H. (1992) Characterization of a mitochondrial inorganic pyrophosphatase in *Sacharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 217-223.
- Maeshima, M. y Yoshida, S. (1989) Purification and properties of vacuolar membrane proton translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. *J. Biol. Chem.* 264: 20068-20074.
- Maeshima, M. (1990) Oligomeric structure of H⁺ translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168: 1157-1162.
- Maeshima, M. (1991) H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. Inhibition by Ca²⁺, stabilization by Mg²⁺ and immunological comparison with other inorganic pyrophosphatases. *Eur. J. Biochem.* 196: 11-17.
- Maeshima, M., Mimura, T. y Sato, T. (1994) Distribution of vacuolar H⁺- pyrophosphatase and membrane integral protein in a variety of green plants. *Plant Cell. Physiol.* 35: 323-328.
- Mansurova, S. E., Ermakova, S. A., Zvyagil'skaya, R. A. y Kulaev, I. S. (1975a) *Microbiology, USSR.* 44: 874-879.
- Mansurova, S. E., Shakhov, Yu. A. y Kulaev, I. S. (1975b) Synthesis of inorganic pyrophosphate by animal tissue mitochondria. *FEBS Lett.* 55: 94-98.
- Mansurova, S. E., Shakhov, Yu. A. y Kulaev, I. S. (1977) Mitochondrial pyrophosphatase is a coupling factor of respiration and pyrophosphate synthesis. *FEBS Lett.* 74: 31-34.
- Mansurova, S. E. (1989) Inorganic pyrophosphate in mitochondrial metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 977: 237-247.
- Maslowsky, P. y Maslowska, H. (1987) Purification and some properties of proton-translocating pyrophosphatase from microsomal vesicles of corn seedlings. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 182: 73-84.
- Matsuno-Yagi, A. y Hatefi, Y. (1993a) Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. Different effects of F₀ inhibitors on unisite and multisite ATP hydrolysis by bovine submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 268: 1539-1545.

- Matsuno-Yagi, A. y Hatefi, Y. (1993b) Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. ATP synthesis by submitochondrial particles inhibited at F_0 by venturicidine and organotin compounds. *J. Biol. Chem.* 268: 6168-6173.
- Matthews, P. M., Williams, S. R., Seymour, A. M., Schwartz, A., Dube, G., Gadian, D. G. y Radda, G. K. (1982) A ^{31}P -NMR study of some metabolic and functional effects of the inotropic agents epinefrine and ouabain, and the ionophore RO2-2985 (X537A) in the isolated perfused rat heart. *Biochim. Biophys. Acta* 720: 163-171.
- McCarty, R. E. y Racker, E. (1967) Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 242: 3435-3439.
- Miller, S. L. y Parris, M. (1964) Synthesis of pyrophosphate under primitive earth conditions. *Nature* 204: 1248-1250.
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by the chemiosmotic type mechanism. *Nature* 191: 144-148.
- Mitchell, P. (1967) Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: Natural fuel cells and solar cells. *Fed. Proc.* 26: 1370-1379.
- Moyle, J., Mitchell, R. y Mitchell, P. (1972) Proton-translocating pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett.* 23: 233-236.
- Newton, J. W. y Newton, G. A. (1957) Compression of the photoactive subcellular particles from Chromatium. *Arch. Biochem. Biophys.* 71: 250-265.
- Nicholls, D. G. (1982) *Bioenergetics*. Academic Press, Nueva York. pp. 1-22.
- Nishikawa, K., Hosi, K., Suzuki, J., Yoshimura, S. y Horio, T. (1973) Formation and decomposition of pyrophosphate related to bacterial photophosphorylation. *J. Biochem.* 73: 537-553.
- Nore, B. F., Sakai-Nore, Y., Maeshima, M., Baltscheffsky, M. y Nyrén, P. (1991) Immunological cross-reactivity between proton-pumping inorganic pyrophosphatases of widely phylogenetic separated species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 962-967.
- Nyrén, P., Hajnal, K. y Baltscheffsky, M. (1984) Purification of the membrane-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* 766: 630-635.

- Nyrén, P. y Lundin, A. (1985) Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Anal. Biochem.* 151: 504-509.
- Nyrén, P., Nore, B. y Baltscheffsky, M. (1986) Studies of photosynthetic inorganic pyrophosphatase formation in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochim. Biophys. Acta* 851: 276-282.
- Nyrén, P., Nore, B. F. y Strid, A. (1991) Proton-pumping N, N' dicyclohexylcarbodiimide-sensitive inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: Purification, characterization and reconstitution. *Biochemistry* 30: 2883-2887.
- Ordaz, H., Sosa, 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.
- Randahl, H. (1979) Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in *Rhodospirillum rubrum*. *Eur. J. Biochem.* 102: 251-256 .
- Rao, P. y Keister, D. (1978) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. Solubilization of the membrane-bound energy-linked inorganic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84: 465-473.
- Rea, P. y Poole, R. (1985) Proton-translocating inorganic pyrophosphatase in red beet (*Beta vulgaris L.*) tonoplast vesicles. *Plant Physiol.* 77: 46-52.
- Reeves, R. (1968) A new enzyme with the glycolytic function of piruvate kinase. *J. Biol.Chem* 243: 3202-3204.
- Romero, I. y Celis, H. (1992) Evidence of an essential carboxyl residue in membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 617-624.
- Romero, I. y Celis, H. (1995) Comparison of the hydrolysis of Zn-PPi²⁻ and the Mg-PPi²⁻ as substrates and the effect of free cations upon membrane bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* . *Biochimie.* 77. 949-952
- Rubtzov, P., Efremovich, N. y Kulaev, I. (1976) *Akad. Nauk SSSR* 230: 1236-1237.
- Sarafian, V. y Poole, R. J. (1989) Purification of an H⁺ translocating inorganic pyrophosphatase from vacuole membranes of red beet. *Plant Physiol.* 91: 34-38.

- Sarafian, V., Kim, Y., Poole, R. y Rea, P. (1992b) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphatase-energized vacuolar membrane proton-pump of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1775-1779.
- Sarafian, V., Potier, M. y Poole, R. (1992) Radiation inactivation analysis of vacuolar H⁺ and H⁺-pyrophosphatase from *Beta vulgaris L.* Biochem. J. 283: 493-497.
- Sato, M., Maeshima, M., Ohsumi, Y. y Yoshida, M. (1991) Dimeric structure of H⁺ translocation pyrophosphatase from pumpkin vacuolar membranes. FEBS Lett. 290: 177-180.
- Saxena, A. (1987) Organotin compounds: toxicology and biomedical applications. Appl. Organometal. Chem. 1: 39-56.
- Schachmann, H. K., Pardee, A. y Stanier, R. (1952) Studies on macromolecular organization of microbial cells. Arch. Biochem. Biophys. 38: 245-260.
- Schiff, J. A (1972) A green safelight for the study of chloroplast development and other photomorphogenetic phenomena, en: Methods in Enzymology (Ed. San Pietro, A.) Vol. 24, Parte B, pp.321-322, Academic Press. New York, London .
- Scholes, P., Mitchell, P. y Moyle, J. (1969) The polarity of proton translocation in some photosynthetic microorganisms. Eur. J. Biochem. 8: 450-454.
- Schwerzmann, K y Pedersen, P. L. (1986) Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex. Arch. Biochem. Biophys. 250: 1-18.
- Sebald, W. y Watcher, E. (1978) Energy conservation in biological membrane en: G. Schäfer, M. Klingenberg (Eds.) Springer-Verlag, Berlin. pp 228-236
- Selwyn, M. J., Davson, A.P., Stockdale, M. y Gains, N. (1970) Chloride-hydroxide exchange across mitochondrial, erythrocyte and artificial lipid membranes mediated by trialkyl-and triphenyltin compounds. Eur. J. Biochem. 14: 120-126.
- Senior, A. E. (1981) Divalent metals in beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 256: 4763-4767.
- Senior, A. E. (1988) ATP synthesis by oxidative phosphorylation. Physiol. Rev 68: 177-231.
- Shakhov Yu, A., Mansurova, S. E. y Kulaev, I. S (1981) Lipid-dependent mitochondrial pyrophosphatase Biochem. Int. 3: 139-145.
- Siebenlist, K. R. y Taketa, F. (1983) The effects of triethyltin bromide on red cell and brain cyclic AMP-dependent protein kinases. J Biol. Chem. 258: 11384-11390.

- Sillén, L. G. y Martell, A. (1971) Stability constants of metal-ion complexes: Supplement No. 1, Special publication No. 25. The Chemical Society, London.
- Sosa, A., Ordaz, H., Romero, I. y Celis, H. (1992) Mg^{2+} is an essential activator of hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. J.* 283: 561-566.
- Sosa, A. y Celis, H. (1995) H^+/PP_i Stoichiometry of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 316: 421-427.
- Stockdale, M., Davson, A. P. y Selwyng, M. J. (1970) Effects of trialkyltin and triphenyltin compounds on mitochondrial respiration. *Eur. J. Biochem.* 15: 342-351.
- Strid, A., Karlsson, I. y Baltscheffsky, M. (1987) ΔpH - and $\Delta \Psi$ induced ATP and PP_i synthesis in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Acta Chem. Scandinavica B41*: 116-118.
- Strid, A. y Baltscheffsky, M. (1988) Diethylstilbestrol. Interactions with membranes and proteins and the different effects upon Ca^{2+} and Mg^{2+} -dependent activities of the F_1 -ATPase from *Rhodospirillum rubrum*. *Eur. J. Biochem.* 176: 281-285.
- Sui, P. M. L. y Wood, H. G. (1962) Phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase, a CO_2 fixation enzyme from propionic acid bacteria. *J. Biol. Chem.* 237: 3044-3051.
- Sumner, J. B. (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* 100: 413-415.
- Van Niel, C. B. (1935) Photosynthesis of bacteria. *Harbor Symp. Quant. Biol.* 3: 138-150.
- Volk, S. E., Baykov, A. A., Duzhenko, V. S. y Avaeva, S. M. (1982) Kinetic studies on the interactions of two forms of inorganic pyrophosphatase of heart mitochondria with physiological ligands. *Eur. J. Biochem.* 125: 215-220.
- Volk, S. E., Baykov, A. A., Kostenko, E. B. y Avaeva, S. M.. (1983) Isolation subunit structure and localization of inorganic pyrophosphatase of heart and liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 744: 127-134.
- Volk, S. E. y Baykov, A. A. (1984) Isolation and subunit composition of membrane inorganic pyrophosphatase from rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 791: 198-204.
- Wagner, G. J. y Mulready, P. (1983) Characterization and solubilization of nucleotide-specific Mg^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -pyrophosphatase of tonoplast. *Biochim. Biophys. Acta* 728: 267-280.

- Walker, R. R. y Leight, R. A. (1981) Mg^{2+} -dependent cation-stimulated inorganic pyrophosphatase associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet *Beta vulgaris L.* *Planta* 153: 150-155.
- Wang, Y., Leigh, R., Kaestner, K. y Sze, H. (1986) Electrogenic H^+ -pumping pyrophosphatase in tonoplast vesicles of oat roots. *Plant Physiol.* 81: 497-502.
- Watling-Payne, A.S. y Selwyn, M. J. (1975) Decrease of proton permeability of CF_1 -deficient chloroplast particles by triphenyltin. *FEBS Lett.* 58: 57-61.
- Woese, C. R. (1987) Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, W. L. (1990) Bacterial Evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576-4579.
- Wulf, R. y Byington, K. (1975) On the structure-activity relationships and mechanism of organotin induced, nonenergy dependent swelling of liver mitochondria. *Arch. Biochem Biophys.* 167: 176-185.
- Yagi, T. y Hatefi, Y. (1984) Thiols in oxidative phosphorylation: Inhibition and energy-potentiated uncoupling by monothiol modifiers. *Biochemistry* 23: 2449-2455.
- Younis, H., Weber, G. y Boyer, I. (1983) Activity and conformational changes in chloroplast coupling factor induced by ion binding: Formation of a Magnesium-Enzyme-Phosphate Complex. *Biochemistry* 22: 2505-2511.
- Zweier, J. L. y Jacobus, W. E. (1987) Substrate-induced alterations of high energy phosphate metabolism and contractile function in the perfused heart. *J. Biol. Chem.* 262: 8015-8021.