

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE MEDICINA

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE MUTANTES
H+PPASA- DE *Rhodospirillum rubrum*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

RODOLFO GARCIA CONTRERAS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. IRMA ROMERO ALVAREZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.,

2005

m.346028



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 bajo la dirección de la Dra. Irma Romero Álvarez, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y algunos experimentos en el laboratorio del Dr. Heliodoro Celis Sandoval, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

A MIS PADRES

A MI FAMILIA

A MIS AMIGOS

A MIS MAESTROS

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irma Romero Álvarez por sus valiosas enseñanzas y por su cariño y amistad.

Al comité tutorial: Dr. Armando Gómez Puyou, Dra. Irma Romero Álvarez y Dra. Rosa Laura Camarena Mejía, por sus recomendaciones y aportaciones al proyecto.

A los miembros del jurado: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía, Dr. Edmundo Chávez Cossío, Dr. Georges Dreyfus Cortés, Dr. Dimitris Georgellis, Dr. Jaime Mariano Martínez Salazar, Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez y Dra. Irma Romero Álvarez, por su revisión crítica y sus recomendaciones al trabajo de tesis.

Al Dr. Heliodoro Celis Sandoval por sus valiosos comentarios acerca del proyecto y de la tesis y por permitirme utilizar su laboratorio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el complemento de beca recibido para los estudios de doctorado y por los donativos de DGAPA (PAPIIT No. IN 216401 y IN 214405-3).

A CONACYT por la beca para los estudios de doctorado.

“Science is a way of trying not to fool yourself. The first principle is that you must not fool yourself, and you are the easiest person to fool.”

Richard Phillips Feynman

ABREVIATURAS.

aa	aminoácidos
AE	actividad específica
ADP	difosfato de adenosina
AMP	monofosfato de adenosina
Amp	ampicilina
Atm	atmósfera
ATP	trifosfato de adenosina
CCCP	p-triclorometoxi-carbonil-cianuro-fenilhidrazona
Cm	cloramfenicol
kDa	kilodaltones
DCCD	N, N'-dicyclohexylcarbodiimida
DMSO	dimetil sulfóxido
DNTPS	desoxiribonucleótidos trifosfatados
EDTA	ácido etilendiamino tetra acético
EGTA	ácido 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
Gm	gentamicina
H ⁺ ATPasa	ATP sintetasa
H ⁺ PPasa	pirofosfatasa membranal bombeadora de protones
IPTG	Isopropil-β -D-tiogalactopiranosido.
Kan	kanamicina
LB	medio Luria-Bertani
MOPS	ácido morfolino propano sulfónico
NADH	dinucleótido de nicotinamida adenina
NADP	fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Pi	fosfato inorgánico
PM	peso molecular
PPasa	pirofosfatasa
PPi	pirofosfato
Rf	frente de corrida
SC	segmento conservado
SDS	dodecil sulfato de sodio
Tet	tetraciclina
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
ΔμH ⁺	potencial electroquímico de protones
ΔG°'	cambio de energía libre en condiciones estándar a pH 7.0
wt	cepa silvestre
Xgal	5' Bromo-4-cloro-3-indolil-β -Δ-galactopiranosido

RESUMEN

Las pirofosfatasa membranales bombeadoras de H^+ ($H^+PPasas$) están presentes en algunas bacterias, en las vacuolas de las plantas y en los acidocalcisomas de los tripanosomátidos. Son enzimas que utilizan la energía de la hidrólisis del enlace de alta energía del PPi para translocar H^+ a través de la membrana en que están situadas. La bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* posee una H^+PPasa no sólo capaz de hidrolizar PPi sino también de sintetizarlo de una manera acoplada al gradiente electroquímico de H^+ y en este sentido es el único modelo alternativo a la ATP sintetasa para el estudio de la transducción energética y de los mecanismos de síntesis de uniones de alta energía. Las $H^+PPasas$ de vacuolas han sido ampliamente estudiadas y su función principal es el bombeo de H^+ hacia el interior de éstas, para mantener la acidificación y proveer de gradiente electroquímico de H^+ para el transporte activo de solutos. Dentro de las bacterias, la H^+PPasa de *R. rubrum* es la que se ha caracterizado más extensamente, sin embargo, su papel fisiológico aun no está definido; se ha propuesto que la función de la enzima es proveer de fuerza protón-motriz en condiciones de baja energía. Sin embargo, no se ha reportado ningún trabajo experimental que demuestre esta hipótesis. En este trabajo se aisló el gen de la H^+ppasa de *R. rubrum* (*hpp*) y se construyó una mutante por remplazamiento genético del alelo silvestre por el alelo *hpp-960::Kan*. La mutante retrasa su crecimiento respecto a la cepa silvestre cuando la intensidad luminosa a la que crece, se disminuye de 21 w/m^2 a 3.6 w/m^2 y fue incapaz de crecer a 2 w/m^2 , este retraso se observó en la fase lag o inicial del crecimiento. El mismo retraso se presentó cuando las bacterias fueron expuestas a condiciones de baja concentración de O_2 . La importancia de la enzima también se vio reflejada cuando las bacterias se traspasan de metabolismo respiratorio a fotosintético anaeróbico, en donde nuevamente la fase inicial de crecimiento de la mutante fue considerablemente mayor que la de la cepa silvestre. Estos resultados indican que la H^+PPasa es importante para el crecimiento de *R. rubrum* en baja energía. Finalmente se discute que la utilización de la H^+PPasa en intensidades luminosas bajas podría ser un mecanismo general para sobrevivir en este grupo de bacterias, ya que solo las especies que poseen la enzima son capaces de crecer a 2 W/m^2 , mientras que aquellas que carecen de H^+PPasa son incapaces de crecer.

ABSTRACT

Membrane-bound H⁺-pumping pyrophosphatases (H⁺PPases) are present in some bacteria, plant vacuoles and acidocalcisomes of the trypanosomatids. These enzymes use the energy of PPI hydrolysis to translocate H⁺ across the membrane in which they are located. The photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* has a H⁺PPase that is not only able to hydrolyze PPI, but also to synthesize it coupling to the electrochemical H⁺ gradient; and in this sense is the only alternative model to the ATP synthetase for the study of energy transduction and of the mechanisms of high energy bounds synthesis. The vacuoles H⁺PPase has been widely studied, and its main function is pumping H⁺ towards its interior, to maintain the acidification of the organelle and to provide electrochemical H⁺ gradient for solutes active transport. Within bacteria, the H⁺PPase of *R. rubrum* is the most extensively characterized; nevertheless, its physiological role is not well defined; it was proposed, that the function of the enzyme is provide proton-motive force in conditions of low energy. Nevertheless, any experimental study has been reported to demonstrate this hypothesis. In this work, the gene of the *R. rubrum* H⁺PPase (*hpp*) was isolated and by genetic replacement of the wild-type allele with the *hpp-960::Kan* allele a mutant was constructed. The mutant delays its growth in relation with the wild-type bacteria when the light intensity of the culture is diminished from 21 w/m² to 3.6 w/m² and its unable of grow at 2 w/m², this effect is observed in the initial phase of growth (lag phase). The same delay in growth appears when bacteria are exposed to low O₂ tension conditions. The importance of the enzyme was also reflected when the bacteria were changed from a respiratory metabolism to an anaerobic photosynthetic one, where again, the mutant initial growth phase was considerably greater than the one of the wild type. These results indicate that the H⁺PPase is important for *R. rubrum* growth in low energy conditions. Finally, we discuss that H⁺PPase utilization at low light intensities, could be a general mechanism of survival for this group of bacteria, since only the species that have the enzyme are able to grow at 2 W/m², whereas those that lack H⁺PPase are incapable to grow.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características de las bacterias púrpura.

Las bacterias púrpura pertenecen a un pequeño grupo de eubacterias gram-negativas que consta de aproximadamente 30 especies, con un contenido de G+C en el DNA que varía del 46% al 73% y alta diversidad genética, se reproducen por fisión binaria, aunque algunas especies lo hacen por gemación y la mayoría son móviles debido a la presencia de flagelos. Considerando sus características fisiológicas y ecológicas, las bacterias púrpura han sido divididas en dos grupos (Pfenning, 1978):

A) Púrpura sulfurosas.

Estas bacterias son anaeróbicas estrictas, con un metabolismo predominantemente fotoautotrófico, basado en el uso de H_2S como donador de electrones. Sus habitats típicos son aguas ricas en sulfuro, producido por bacterias reductoras de sulfato; géneros representativos de este subgrupo son: *Thiospirillum*, *Chromatium*, *Amoebobacter* y *Thiocystis*.

B) Púrpura no sulfurosas.

Tienen un metabolismo fotoheterotrófico y son sensibles al H_2S . Algunos géneros representativos de este subgrupo son: *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter* y *Rhodomicrobium*.

Aunque no forman acumulaciones masivas, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Los cuerpos de agua estáticos como lodos, pantanos, canales y lagos eutróficos donde existe una rápida producción y descomposición de materia orgánica, proveen las condiciones óptimas para su desarrollo.

Su forma varía entre las diferentes especies ya que pueden ser: cocos, ovoides, bacilos y espirilos; la mayoría presenta flagelos polares, poseen membranas internas con estructura lamelar, vesicular o tubular. Su reproducción es por fisión binaria, con excepción de los géneros *Rhodomicrobium* y *Rhodopseudomonas* que se reproducen por gemación (Pfenning, 1978).

La variedad de compuestos orgánicos que pueden fotoasimilar, en su metabolismo fotoheterotrófico es amplia. Bajo condiciones anaeróbicas en la luz, tanto la velocidad de crecimiento como la síntesis de bacterioclorofila están gobernadas por la intensidad de la luz. Conforme ésta se incrementa la velocidad de crecimiento aumenta, mientras el contenido celular de bacterioclorofila disminuye.

La mayoría de las especies también puede crecer en condiciones aeróbicas, mediante respiración. El crecimiento aeróbico conlleva a una pérdida de los pigmentos fotosintéticos, ya que el O₂ es un potente represor de la síntesis de estos. (Pfenning, 1978).

Muchas de las especies son capaces de crecer quimioautótroficamente utilizando H₂ como donador de electrones y algunas otras pueden llevar a cabo desnitrificación y fijación de nitrógeno (Pfenning, 1978).

1.1.1. *Rhodospirillum rubrum*.

De acuerdo a la clasificación de Woese (Woese, 1987; Woese *et al*, 1990); con base en la similitud de la secuencias del RNA ribosomal, *Rhodospirillum rubrum* está clasificada de la siguiente manera:

Dominio:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Subdivisión:	Alfa
Género:	Rhodospirillum
Especie:	rubrum.

El color de los cultivos en anaerobiosis va del rosa al rojo oscuro. Las células completas, tienen un espectro de absorción con máximos a: 375-377, 510-517, 546-550, 807-808 y 881-885 nm, debido a la presencia de los pigmentos fotosintéticos: bacterioclorofila a (esterificada con geranilgeraniol o con fitol) y carotenoides de la serie de las espiriloxantinas.

Crecen a temperatura de 30 a 35 °C a un pH óptimo de 6.9 (en un intervalo de 6 a 8.5). Las células individuales van de la forma vibrioide a la espiral, miden de 0.8-1 µm de ancho por 7-10 µm de largo, una vuelta completa a la espiral se da cada 1.5 a 2 µm y son móviles gracias a flagelos polares (Fig.1). Presentan membranas fotosintéticas del tipo vesicular (cromatóforos) y mediante la ruptura

mecánica de las bacterias se obtienen vesículas selladas, cuya polaridad está invertida con respecto a la de la membrana de las bacterias integras. Esta preparación, también llamada cromatóforos, ha resultado muy útil para el estudio y la caracterización del aparato fotofosforilante, así como de las proteínas integrales y asociadas a membrana que se encuentran en el crecimiento fototrófico.

El crecimiento fotoautotrófico es posible con H_2 como donador de electrones, aunque las células crecen preferentemente de manera fotoheterotrófica bajo condiciones anaeróbicas. El crecimiento en la oscuridad se presenta en condiciones que van de microaeróbicas a aeróbicas y fermentativamente con algunos substratos como el piruvato. El sulfato puede usarse como fuente única de azufre. Requiere de biotina para el crecimiento en cualquier condición.

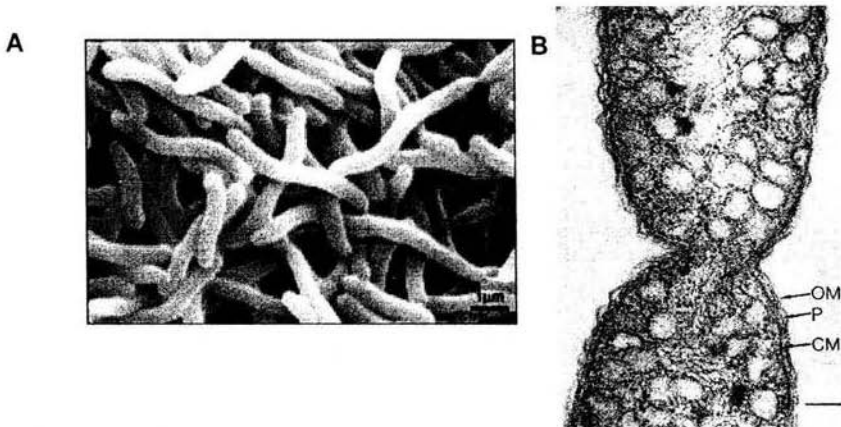
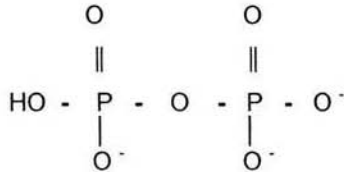


Fig.1. *Rhodospirillum rubrum*. A. Microscopía de barrido de *Rhodospirillum rubrum*. (Tomada de http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/rhoru/rhoru.home.html) B. Microscopía electrónica, corte longitudinal de la bacteria. OM, pared celular externa; P, capa de peptidoglicanos; CM, membrana citoplásmica; la barra representa 0.1 μ m tomada de (Pfenning, 1978).

1.2. El Papel del PPi en el Metabolismo Celular.

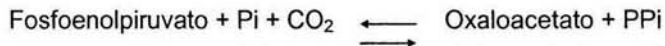
El PPi es el compuesto químico más simple que contiene un enlace fosfoanhídrido, que es la forma química básica en la cual se transmite la energía en las células. Su estructura a pH = 7 es:



Debido a la alta afinidad del PPi por cationes divalentes y a las concentraciones relativamente altas de Mg^{2+} en el citoplasma, el PPi 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 PPi, a pH 7.4 y 25 °C en presencia de Mg^{2+} es de -4 Kcal mol^{-1} y de $-5.7 \text{ Kcal mol}^{-1}$ en ausencia de este (Flodgaard y Fleron, 1974). Esta energía es cercana a la de la hidrólisis del enlace gama del fosfato del ATP. La disminución del ΔG° para la hidrólisis del PPi en presencia de Mg^{2+} , se debe a que el producto de su hidrólisis (2Pi) no se acompleja 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).

En general se consideraba un dogma bioquímico que el PPi producido en las reacciones biosintéticas (síntesis de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, urea, lípidos) era un producto secundario, cuyo único destino era el de ser hidrolizado, para hacer a estas reacciones energéticamente favorables (Kornberg, 1957). De tal forma que la energía del enlace anhídrido del PPi no sería utilizada y se perdería en forma de calor. Sin embargo, en 1962 Sui y Wood descubrieron que la enzima carboxitransfosforilasa utiliza PPi para catalizar la reacción:



Más tarde, en 1968, tres laboratorios descubrieron independientemente (Evans y Wood, 1968; Hatch y Slack, 1968; Reeves, 1968) que la piruvato fosfato dicinasa también utiliza PPi:



Posteriormente, se han identificado más enzimas que utilizan al PPi, principalmente en microorganismos y en plantas (Edwards *et. al*, 1985) (Tabla 1); algunas de ellas son responsables de la fosforilación de intermediarios esenciales de la glucólisis y gluconeogénesis (Baltscheffsky y Nyrén, 1984). Asimismo, 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). No hay que descartar la posibilidad de que estas enzimas que utilizan la energía del PPi estén más extendidas, de lo actualmente reportado.

Tabla 1. Enzimas que utilizan al PPI como donador de energía

Enzima Reacción	Organismo	Referencia
Carboxitranfosforilasa PPI + oxaloacetato ↔ PEP + Pi + CO ₂	<i>Propionibacterium shermanii</i> <i>Entamoeba histolytica</i>	O'Brien, W.E. y Bowien, S. (1975) Fed. Proc. 34: 641. Lawson, J.W.R. y Veech, R.L. (1979) j. Biol. Chem. 254:6528-6537.
Piruvato fosfato dicinasa PPI + AMP + PEP ↔ piruvato + ATP + Pi	<i>Rhodospirillum rubrum</i> Caña de azúcar <i>Bacteroides symbiosus</i> <i>Acetobacter xylinum</i>	Buchanan, B.B. (1974) J. Bacteriol. 119: 1066-1068. Hatch, M.D. y Slack, C.R. (1968) Biochem. J. 106: 141. Reeves, R.E., Menzies, R.A. y Hsu, D.S. (1968) J. Biol. Chem. 243: 5468. Benziman, M. y Palgi, A. (1970) J. Bacteriol. 104:24.
PPi fosfofructocinasa PPI + fructosa-6-P ↔ fructosa-1,6-diP + Pi	<i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Pseudomonas marina</i> y <i>Alcaligenes</i> <i>Bacteroides fragilis</i>	Pleidere, C. y Klemme, J.H. (1980) Z. Naturforsch.35C: 229-238. Sawyer, M.H., Baumann, P. y Baumann, L. (1977) Arch. Microbiol. 112: 169-172. Macy, J.M., Ljungdahl, L.G. y Gottschalk, G. (1978) J. Bacteriol. 134: 84-91.
PPi acetilcinasa PPI + acetato ↔ acetilfosfato + Pi	<i>Entamoeba histolytica</i>	Reeves, R.E., South, D.J., Blytt, H.J. y Warren, L.G. (1974) J. Biol. Chem. 249: 737-7741.
PPi serina cinasa PPI + serina ↔ fosfoserina + Pi	<i>Propionibacterium shermanii</i>	Reeves, R.E. (1968) J. Biol. Chem. 243: 3203.
Acetil-CoA sintetasa Acetato: PPI fosfotransferasa acetato + PPI ↔ acetilfosfato + Pi	<i>Desulfotomaculum</i>	Liu, C.L; Hart, N. Y Peck, H.D.Jr. (1982) Science. 217:363-364.

La concentración de PPI en diferentes células (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 compuestos de alta

energía, como el ATP, 2 a 10 mM (Matthews *et al*, 1982; Zweier y Jacobus, 1987), lo que no concuerda con la idea de que el PPI es solamente un subproducto del metabolismo energético.

Un dato importante en la historia del papel del PPI como donador de energía se estableció cuando (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*. Posteriormente la síntesis de PPI acoplada a la cadena respiratoria se describió en mitocondrias de levadura, de animales y de plantas (Mansurova *et al*, 1975) y el acoplamiento a la cadena de transporte fotosintético fue encontrado en cloroplastos de plantas (Rubtsov *et al*, 1976).

Además, se identificó el 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 muestran que el PPI no es solo un producto secundario de las reacciones de pirofosforólisis, sino un compuesto energético que juega un papel importante en los organismos vivos. (Heinonen, 2001).

Con base en lo anterior, el PPI producido en las células puede seguir los siguientes caminos:

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

b) Ser hidrolizado por la pirofosfatasa de membrana translocadora de H^+ . La energía del gradiente electroquímico de H^+ , puede ser utilizado para mantener varias reacciones endergónicas como: la reversa de transporte de electrones (Baltscheffsky *et al*, 1967 y 1967a), la transhidrogenación (Keister y Yike, 1967a), la reducción de NAD^+ (Keister y Yike, 1967b) y la síntesis de ATP (Keister y Minton, 1971).

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

Adicionalmente, se ha propuesto que puede ser utilizado como fuente de reserva de energía en *R. rubrum* directa (en la formación de gránulos de PPi) o indirectamente (como precursor de la síntesis del polifosfato) (Nyrén y Strid, 1991).

1.3. Las pirofosfatasa.

La pirofosfatasa [E.C. 3.1.1.1] (PPasa) es una enzima que cataliza la hidrólisis y la síntesis de PPi y existen dos clases: las citoplásmicas y las membranales.

1.3.1. Pirofosfatasa citoplásmicas.

La PPasa citoplásmica es una enzima ubicua en la naturaleza, encargada de desplazar el equilibrio de las reacciones biosintéticas en el sentido termodinámicamente favorable (Kornberg, 1957), su importancia en el metabolismo celular se confirmó al demostrarse que es una proteína esencial para el crecimiento de *Escherichia coli* (Chen *et al*, 1990).

El único organismo que se ha reportado que carece de PPasa citoplásmica es *Entamoeba histolytica* (McLaughlin y Aley, 1985), debido a que es capaz de utilizar el PPi como donador de energía para llevar a cabo reacciones endergónicas. En el metabolismo aeróbico de *E. histolytica*, se producen grandes cantidades de PPi, en la biosíntesis de macromoléculas y principalmente durante la formación de oxaloacetato a partir de fosfoenolpiruvato, catalizado por la carboxitransfosforilasa, de los tres moles de PPi que se producen en esta reacción dos son utilizados por la PPi-fosfofructocinasa y uno por la piruvato-fosfatodinicinasa. Además, en el metabolismo anaeróbico existen varias vías que proveen de PPi a estas enzimas (McLaughlin y Aley, 1985).

Cabe destacar que existen otros organismos (la mayoría bacterias) que pueden utilizar al PPi como donador de energía y que estos también cuentan con una PPasa citoplásmica (ver referencias de la Tabla I), lo que sugiere que la contribución de las enzimas que utilizan PPi como donador de energía, no es suficiente para mantener a este compuesto dentro de las concentraciones óptimas

para el crecimiento de las células, por lo que siguen requiriendo de la enzima citoplásmica para realizar esta función.

Las pirofosfatasas citoplásmicas se han clasificado en dos familias; la familia I ampliamente distribuida en procariontes y eucariontes, mientras que la familia II solo se encuentra en algunos procariontes. En procariontes las PPasas de la familia I son homohexámeros u homotetrámeros compuestos por subunidades de 20 kDa y en los eucariontes homodímeros con subunidades de 32 kDa. Las enzimas mejor caracterizadas de cada uno de estos grupos son la de *E. coli* y la de *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente; estas enzimas utilizan el complejo Mg-PPi como sustrato y requieren de Mg^{2+} libre para expresar el máximo de su velocidad (Tabla 2). La estructura tridimensional de las subunidades dentro de esta familia se ha conservado, así como el sitio activo, el cual está constituido de 14 a 16 aminoácidos donde se alojan tres o cuatro iones Mg^{2+} . El mecanismo catalítico de las enzimas de esta familia consiste en la transferencia del grupo fosfato al agua, en un solo paso, sin la formación de un intermediario fosforilado de la enzima. El fluoruro es un inhibidor clásico de estas PPasas (Baykov *et al*, 1999). La familia II incluye únicamente pirofosfatasas de bacterias, que se han descrito en *B. subtilis*, *Methanococcus jannaschii*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus mutans* (Young *et al*, 1998) y en dos especies de bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas (Celis *et al*, 2003). Además mediante análisis de secuencias, se ha encontrado el gen en otras 13 especies de procariontes. La secuencia de aminoácidos de estas PPasas no presenta similitud alguna con las de la familia I; sugiriendo que no tienen un origen evolutivo común. Son homodímeros compuestos de subunidades de 34 kDa y poseen una actividad hidrolítica mayor que la de las enzimas de la familia I, prefieren al Mn^{2+} tanto para formar el sustrato Mn-PPi, como para activarse. A diferencia de las PPasas de la familia I, no son inhibidas por fluoruro en presencia de Mn^{2+} o Co^{2+} (Tabla 2).

Tabla 2. Características de las pirofosfatasas citoplásmicas.

	Familia I		Familia II
	Eucariontes	Procariontes	Procariontes
Organismo representativo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Peso molecular del monómero (kDa)	32	20	34
Estructura cuaternaria	Dímero	Hexámero	Dímero
pH óptimo	7	8-9	8-9
k_{cat} (s^{-1})	300	200-300	1700-3300
K_m para PPI-cación (μM)	<6 ^a	1-6 ^a	90-160 ^b
Actividad específica ^c	100-400	< 1000	~4000
Activador principal	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺ ó Co ²⁺
Sensibilidad a NaF	Si	Si	No ^d
Inhibición por Ca ²⁺	Si	Si	No

^a PPI- Mg como sustrato.

^b PPI- Mn como sustrato.

^c μ moles de PPI hidrolizado min^{-1} mg proteína⁻¹.

^d En presencia de Mn²⁺ o Co²⁺.

En el 2001 se obtuvo la primera estructura cristalográfica de una PPasa citosólica de la familia II (*S. mutans*) (Merckel *et al*, 2001). Al compararla con las PPasas de la familia I (*E. coli* y *S. cerevisiae*), se encontró que las conformaciones tridimensionales de éstas diferían notablemente. Las subunidades de las PPasas de la familia I tienen una estructura de β -barril, con un solo dominio por subunidad y el sitio activo en la parte superior del barril. Por otra parte, las subunidades de las PPasas de la familia II se estructuran en dos dominios (amino y carboxilo) unidos por una asa flexible y en cuya interfase se localiza el sitio activo. Esta estructura ha llevado a proponer que el mecanismo para la actividad de esta enzima implica una conformación cerrada cuando contiene al sustrato y una abierta en su ausencia. A pesar estas diferencias, existe una similitud notable en el sitio activo de las dos familias de PPasas; en ambas, el sitio activo es polar y el arreglo espacial de seis residuos se conserva, así como la presencia de una

molécula de agua coordinada a dos iones metálicos que podría participar en el ataque nucleofílico al sustrato. Esto ha permitido proponer que el mecanismo de reacción de las dos familias de PPasas es análogo (no homólogo), lo cual es un ejemplo claro de evolución convergente (Merckel *et al*, 2001).

Dentro de los organismos que utilizan PPasa citosólica de la familia II, se han identificado microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Vibrio cholera* y *Listeria monocytogenes*; es pues importante la caracterización de esta enzima ya que podría ser útil para el diseño de fármacos específicos contra estas bacterias.

1.3.2. Pirofosfatasas membranales.

Pirofosfatasas asociadas a membrana.

Han sido encontradas en la membrana plasmática de la bacteria *Sulfolobus acidocaldarius*, en las mitocondrias de *Pisum sativum* (chícharo) y de *S. cerevisiae* y en el tilacoide de *Spinacia oleracea* (espinaca) Estas enzimas son fácilmente extraíbles de la membrana por tratamientos con agentes caotrópicos y detergentes. Su estructura global no se ha determinado, sin embargo, el número y peso molecular de las subunidades catalíticas que se han aislado parece indicar que se trata de un grupo de enzimas más bien heterogéneo (revisado en Maeshima, 2000).

1.3.2.1. Pirofosfatasas integrales de membrana, bombeadoras de protones (H⁺PPasas).

Se encuentran en organelos como: vacuolas de plantas y algas (de la clase de las Caroficeas y en *Acetabularia*). La enzima acidifica el interior de la vacuola y proporciona energía para el transporte activo de solutos (Rea y Poole 1993; Zhen, *et al*, 1997). También se han encontrado en los acidocalcisomas de protozoarios parásitos de la familia de los tripanosomátidos (Scott *et al*, 1998) y del phylum de los apicomplejos (Docampo y Moreno, 2001), de las algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii* (Ruiz, *et al* 2001), de hongos como *Dictyostelium*

discoideum (Marchesini *et al*, 2002) y de la bacterias *Agrobacterium tumefaciens* (Seufferheld *et al*, 2003) y *R. rubrum* (Seufferheld *et al*, 2004).

Las H⁺PPasas, además de existir en éstos organelos, también están presentes en la membrana plasmática de algunas células vegetales, eucariontes unicelulares (Pérez-Castiñeira *et al*, 2002 b) y en las de las bacterias fotosintéticas *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodopseudomonas viridis* y *Chromatium vinosum* (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966; Nore *et al*, 1990).

Se han descubierto PPasas membranales en otros organelos y bacterias extremófilas, por ejemplo: la membrana tilacoidal (Jiang *et al*, 1997) y mitocondrial (Zancani *et al*, 1995) de plantas, en la mitocondria de levadura (Lundin, 1991), así como en las bacterias termófilas *Sulfolobus acidocaldarius* (Meyer y Schafer, 1992), *Pyrobaculum aerophilum* (Drozdowicz *et al*, 1999) y *Thermotoga maritima* (Pérez-Castiñeira *et al*, 2001) y en la bacteria degradadora de benzoato *Syntrophus gentianae* (Schöcke y Schink, 1998). Lo que indica la posibilidad de una distribución amplia de las H⁺PPasas en la naturaleza.

Las H⁺PPasas son proteínas integrales de membrana, las cuales utilizan la hidrólisis del enlace de alta energía del PPi para translocar H⁺ a través de la membrana. Ni la estructura tridimensional, ni la cuaternaria de estas enzimas ha sido descrita aún, sin embargo, sus subunidades catalíticas han sido aisladas de varios organismos. Las H⁺PPasas tanto bacterianas como vacuolares, consisten de una sola cadena polipeptídica de entre 70-80 kDa, hidrolizan al complejo Mg-PPi y requieren de Mg²⁺ libre como cofactor y activador (Celis y Romero, 1987; Maeshima, 2000).

El K⁺ es un cofactor esencial de las H⁺PPasas vacuolares, que estimula la actividad hidrolítica más de tres veces, con una constante de disociación de 1.27 mM, pero esta dependencia no se ha encontrado en la mayoría de las H⁺PPasas bacterianas estudiadas, por lo que se ha dividido a las H⁺PPasas en dependientes e independientes de K⁺. Con base en el análisis bioinformática de 48 secuencias, se ha sugerido que las H⁺PPasas K⁺-dependientes y K⁺-independientes forman dos grupos que evolucionaron de manera separada (origen polifiletico) (Belogurov y Lahti, 2002). El análisis de secuencias de aminoácidos reveló que las H⁺PPasas

K⁺-independientes poseen una lisina y una treonina conservadas, las cuales están ausentes en las H⁺PPasas K⁺-dependientes (Belogurov y Lahti, 2002). La sustitución de la alanina 460 por lisina en la H⁺PPasa K⁺-dependiente de la bacteria *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*, es suficiente para hacer desaparecer la dependencia por éste catión, tanto para la hidrólisis como para el bombeo de H⁺ dependiente de PPi (Belogurov y Lahti, 2002). Sin embargo, es probable que en general, la transición entre las H⁺PPasas K⁺-dependientes y K⁺-independientes no sea tan simple como la sustitución de un aminoácido.

En cuanto a la estructura primaria de las H⁺PPasas, existe un ~40% de identidad entre las de bacterias y las de vacuolas, pero no se ha encontrado homología entre las H⁺PPasas y las PPasas citoplásmicas, a excepción de una pequeña región del sitio catalítico (Maeshima, 2000). Las H⁺PPasas de plantas tienen de 761 a 771 aminoácidos, con pesos moleculares teóricos que van de 79.8 kDa a 80.8 kDa y con un punto isoeléctrico teórico de 5. La secuencia de aminoácidos se encuentra altamente conservada dentro de las plantas terrestres, (86% a 91% de identidad) y la región menos conservada son los primeros 60 residuos del amino terminal.

Por otra parte, la identidad entre las secuencias de aminoácidos de las H⁺PPasas de la bacteria *R. rubrum* (de 660 aminoácidos) (Baltscheffsky *et al*, 1998) y de las algas *Acetabularia acetabulum* y *Chara corallina* (organismos filogenéticamente separados) es de 35-46% (Maeshima, 2000), mientras que su identidad con las PPasas vacuolares de plantas terrestres es de 36-39%.

El análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de las H⁺PPasas ha revelado tres segmentos altamente conservados (Maeshima, 2000). El primero (SC1) incluye el dominio catalítico para la hidrólisis del sustrato, que se encuentra expuesto al citosol; se ha propuesto que la secuencia (E/D)(X)7KXE constituye el sitio catalítico de las PPasas, incluyendo las solubles, la secuencia DVGADLVGKVE de las H⁺PPasas corresponde a esta configuración. El segundo segmento conservado (SC2) probablemente también se localiza en una asa hidrofílica y su función no ha sido determinada aun, aunque se sabe que contiene un residuo involucrado en la translocación de H⁺. El tercer segmento (SC3)

localizado en la parte carboxilo terminal contiene una docena de residuos cargados; experimentos preeliminares muestran que en la H⁺PPasa de frijol mungo el reemplazo de tres ácidos glutámicos por glutaminas provoca la pérdida de la actividad enzimática (Maeshima, 2000). Se piensa que este segmento puede estar expuesto al citosol y que juega un papel crítico en la función catalítica junto con SC1 y SC2.

1.3.3. La H⁺PPasa y el acoplamiento entre la síntesis e hidrólisis de enlaces de alta energía.

Las H⁺PPasas constituyen un modelo para el estudio del mecanismo de la síntesis e hidrólisis de un enlace de alta energía acoplada a la translocación de H⁺, además de ser el único sistema alternativo a la H⁺-ATP sintetasa. Estructuralmente la H⁺PPasa es una enzima relativamente simple que contiene tanto al sitio catalítico como al canal de H⁺ en un solo polipeptido.

La simplicidad estructural del PPI 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 organismos vivos (Baltscheffsky *et al*, 1982).

Por otra parte, también se ha planteado el posible papel de la H⁺PPasa de membrana en la evolución del mecanismo de acoplamiento de la óxido-reducción y la fosforilación. El grupo de (Baltscheffsky *et al*, 1982) ha propuesto que originalmente el sistema de transporte de electrones y el sistema de la PPasa de membrana eran fuentes de energía separadas. Posteriormente, gracias al funcionamiento en reversa de la fosfatasa, se dio 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 PPasa que contenía un canal específico para el paso de H⁺. Durante la evolución, surgió la H⁺-ATP

sinetasa, esto creó una situación en la que coexistieron las dos enzimas (como es el caso de *R. rubrum* actualmente) pero con el tiempo, se perdió la PPasa (tal es el caso de otros sistemas actuales, como *Rhodobacter sphaeroides* 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 PPasa de membrana.

1.3.4. La H⁺PPasa de *Rhodospirillum rubrum*.

La H⁺PPasa de *R. rubrum* es la única enzima bacteriana ampliamente estudiada. Esta enzima puede llevar a cabo la síntesis e hidrólisis de PPi en células completas o en cromatóforos aislados (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966).

• Características bioquímicas

La H⁺PPasa sintetiza el PPi utilizando la energía del gradiente electroquímico de H⁺ generado por el transporte de electrones fotosintético (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966) (Fig.2). La reacción tiene un pH óptimo de 7.5 y requiere iones Mg²⁺ (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 ATP sintetasa), que por el contrario, la estimula (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966).

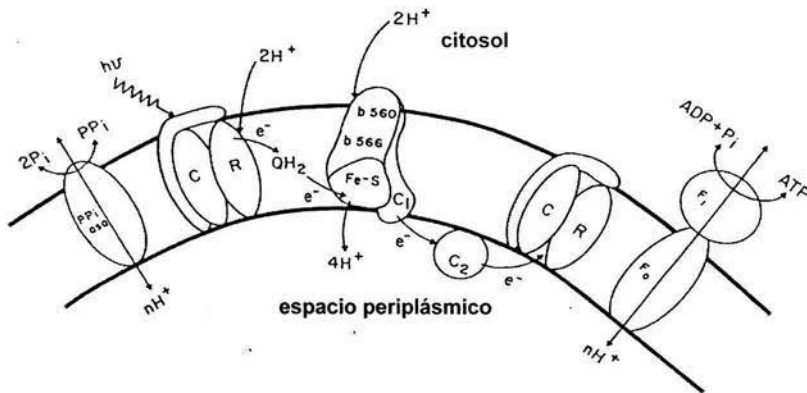


Fig.2. Esquema de la transducción energética en la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*. Se muestra a la H⁺PPasa, al Centro de Reacción Fotoquímica (CR), a la cadena de transporte de electrones y a la ATPasa en la membrana del cromatóforo. QH₂: ubiquinol, b₅₆₀ y b₅₆₆: citocromos b, Fe-S: Proteína hierro azufre de Rieske, c₁ y c₂: citocromos c, F₁ y F₀: parte hidrofílica e hidrofóbica de la ATPasa (tomado de Romero y Celis, 1990).

(Guillory y Fisher, 1972) encontraron que la velocidad máxima de formación de PPi se obtiene con una intensidad luminosa menor que la velocidad máxima para la síntesis del ATP en cromatóforos de *R. rubrum*. Estos autores demostraron además que la formación de PPi se satura a menor intensidad luminosa que la requerida para la síntesis de ATP (aunque la actividad relativa de síntesis de ATP con respecto a la de PPi, aún en intensidades luminosas muy bajas, es por lo menos del doble). Hay que tener en cuenta que *R. rubrum* crece en condiciones naturales a bajas intensidades luminosas, lo que puede sugiere que esta vía tiene un significado fisiológico importante.

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 PPasa requiere un menor número de H⁺ que la ATP sintetasa (Strid *et al*, 1987). Otra posibilidad para explicar este dato sería que, a diferencia de la H⁺-ATP sintetasa la H⁺PPasa carece de un inhibidor natural de la hidrólisis de PPi (Schwerzmann y Pedersen, 1986).

Tanto la hidrólisis del ATP como del PPi, en oscuridad induce flujo reverso de electrones. El resultado de esta reacción es una reducción de citocromo b y la oxidación de citocromo c₂ (Baltscheffsky, 1968).

La hidrólisis de PPi 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 esencial (Lahti, 1983; Randahl, 1979; Celis *et al*, 1985; Sosa *et al*, 1992). 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 H⁺PPasa es considerablemente más alta que la de la H⁺-ATP sintetasa y

sólo se igualan cuando ambas actividades se estimulan por desacoplantes (Baltscheffsky, 1969a y 1969b). El pH óptimo para la reacción de hidrólisis es de 6.5 (Celis y Romero, 1987).

La PPasa 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), el cambio electrocrómico del caroteno (Holmes y Crofts, 1977) y la formación de ATP dirigida por PPi (Keister y Minton, 1971) (Fig.3).

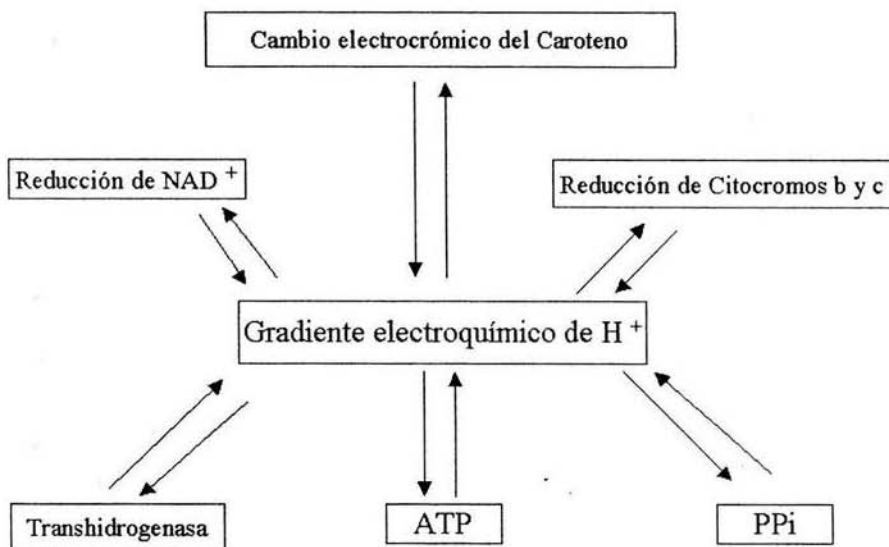
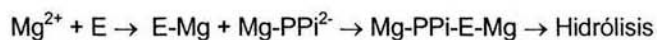


Fig. 3. Reacciones dependientes o asociadas al gradiente electroquímico de H^+ .

El Mg^{2+} libre ejerce un papel regulatorio sobre las propiedades catalíticas de la enzima. (Randahl, 1979) reportó que el Mg^{2+} libre puede actuar como activador en la hidrólisis de PPi y que este catión puede unirse a la H^+PPasa y protegerla contra la inhibición causada por agentes como NEM y Nbf-Cl.

Mediante estudios cinéticos se ha encontrado (Sosa *et al*, 1992) que el Mg^{2+} libre es un activador esencial y ordenado de la actividad hidrolítica de la H^+PPasa , donde primero debe entrar el Mg^{2+} a la enzima para después incorporarse el sustrato $Mg-PPi^{2-}$ y así hidrolizarse:



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

Otros cationes divalentes libres también pueden inducir cambios en las propiedades cinéticas de la enzima. Por ejemplo el Zn^{2+} a pH 5.25 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 Mg^{2+} y Zn^{2+} , no sólo protege 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.

El hecho de que la PPasa transporta H^+ indica que contiene un canal para ellos; sin embargo, las características de este canal han sido muy poco estudiadas y no se sabe prácticamente nada acerca del camino de los H^+ .

En *R. rubrum* el DCCD inhibe a la H^+ PPasa (Nyrén *et al*, 1991) y en analogía con su efecto en la ATP sintetasa (Sebald y Wachter, 1978), su sitio de inhibición podría ser algún carboxilo de su región hidrofóbica bombeadora de H^+ . Asimismo, el trifenilestaño es un compuesto lipofílico que inhibe a la H^+ PPasa en algún componente en la membrana (Celis *et al*, 1998).

Se han identificado varios residuos en las H^+ PPasas de plantas que están implicados con el bombeo de H^+ y la inhibición de la actividad. (Zhen *et al*, 1997), encontraron que la substitución de los residuos Glu-305 y Asp-504 de la enzima de *A. thaliana*, localizados del lado citoplásmico dentro de dominios transmembranales provocan la pérdida de la actividad y del bombeo de H^+ , lo que les llevó a concluir que pueden participar directamente en el pegado del DCCD y son esenciales para la catálisis. Así mismo, la sustitución del Glu-427 por Gln provoca la insensibilidad de la H^+ PPasa al DCCD, reduce la translocación de H^+ y disminuye la actividad de hidrólisis de PPi al 50%. Cabe destacar que este residuo se localiza en el segmento conservado CS2 en todas las H^+ PPasas conocidas incluyendo la de *A. acetabulum* y la de *R. rubrum*.

A pesar de que la primera H^+ PPasa de *R. rubrum* fue descrita hace mucho tiempo (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966), poco se sabe del papel fisiológico que desempeña dentro de la célula. Basándose en datos bioquímicos, se ha propuesto que la H^+ PPasa de bacterias fotosintéticas es la responsable de

mantener el gradiente de H^+ a través de la membrana en condiciones de baja energía (como el crecimiento en intensidades luminosas bajas) para asegurar la sobrevivencia de la célula, utilizando como fuente de PPi gránulos de PPi y polifosfatos que se encuentran en el citosol (Nyrén y Strid, 1990). En estas condiciones, la estimulación de la cadena de transporte de electrones fotosintética es insuficiente, por lo que el bombeo de H^+ disminuye y por ende la síntesis de ATP; así la H^+PPasa actuaría de manera hidrolítica sobre el PPi , generando un gradiente electroquímico de protones que podría ser utilizado, entre otras cosas, para la síntesis de ATP.

Sin embargo, esta última propuesta no ha sido comprobada experimentalmente, por ello la importancia del presente trabajo, cuyo enfoque es brindar información acerca de cuál es el papel de la H^+PPasa en las bacterias fotosintéticas.

• Características genéticas.

En 1998 se publicó la secuencia del gen de la H^+PPasa de *R. rubrum*, el cual se encuentra contenido en un marco de lectura abierto de 2,106 pb, que codifica para una proteína de 702 aa (71,609 Da) (Baltscheffsky, *et al*, 1998). La regulación de la expresión de el gen *hpp* en diferentes condiciones de crecimiento ha sido estudiada y se ha reportado la presencia de: transcrito, proteína y actividad enzimática en condiciones de crecimiento anaeróbicas, en cultivos fotoheterotrofos, fermentativos, así como en respiración anaeróbica, mientras que en cultivos respiratorios aeróbicos, la expresión del gen *hpp* no se observa, desapareciendo tanto el transcrito, como la proteína y la actividad enzimática. Además en condiciones de estrés salino la expresión del gen *hpp* se induce, alcanzando niveles similares a los observados en las condiciones anaerobicas. (López-Marqués *et al*, 2004). Mediante estudios de extensión del cebador, los mismos autores determinaron que en las condiciones de crecimiento fotosintéticas, fermentativas y de respiración anaeróbica el gen *hpp* de *R. rubrum* se transcribe a partir de dos promotores en tandem, con los correspondientes sitios de inicio de la transcripción a -135 (TSP1) y -296 (TSP3) pb del codón de

inicio de la traducción ATG; el análisis de las regiones promotoras correspondientes para TSP1, revela la existencia de secuencias consenso típicas para promotores anaerobios, tales como el sitio de unión de RegA que se encuentra entre los pb -23 y -37 y entre los pb -67 y -79 del promotor. También se encontraron sitios de unión putativos para σ^{54} en las posiciones -13 y -24. Para TSP3, en la posición -63 se encuentra una secuencia similar al sitio de unión del factor de transcripción FNR y una putativa región -10 para el pegado de σ^{70} . Los estudios de extensión del cebador, en cultivos aeróbicos sujetos a estrés salino severo permitieron la identificación de otros dos promotores en tandem a -184 (TSP2) y -301 (TSP3') pb del ATG. Para estos dos promotores se pudieron encontrar regiones -35 para el pegado de los factores σ^B y σ^S , ambos involucrados en la transcripción de genes que responden a estrés (López-Marqués *et al*, 2004). El codón de término es TTA y río abajo de éste se encuentra un terminador transcripcional ρ -independiente el cual consiste en una región invertida repetida, rica en G+C, seguida por una secuencia rica en A+T (Baltscheffsky *et al*, 1998 y López-Marqués *et al*, 2004). Estos estudios, en concordancia con el tamaño del transcrito del gen *hpp* determinado por hibridación tipo Northern (2.5 kb), así como el análisis de la organización genética de la región en el genoma de *R. rubrum*, donde se encuentra *hpp*, indican que este gen se transcribe en un mRNA monocistónico y que por ende no se encuentra incluido en ningún operón (López-Marqués *et al*, 2004).

A partir de la secuencia de aa, se deduce que la H⁺PPasa es una proteína de membrana altamente hidrofóbica y de acuerdo a modelos computacionales, presenta 15 cruces transmembranales, tipo α -hélice, que involucran al 48% de la proteína (Maeshima, 2000).

Aunque la identidad global (en aa) de la H⁺PPasa de *R. rubrum* con respecto a las H⁺PPasas de plantas y algas es de solo 37%; existen 3 regiones conservadas (SC), donde esta identidad es del 80%.

2. OBJETIVOS.

Objetivo general:

Determinar el papel fisiológico de la H⁺PPasa de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum*.

Objetivos particulares:

- A) Obtención de una mutante H⁺PPasa⁻ de *R. rubrum*.
- B) Caracterización de la mutante en diferentes condiciones de crecimiento.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo.

Las bacterias empleadas en este trabajo se incluyen en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas

Cepas	Características relevantes	Referencia/Fuente
Bacterias fotosintéticas		
<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170	cepa silvestre	American Type cell Culture
RG1	Derivada de ATCC 11170 <i>hpp-960::Kan</i>	este trabajo
RG1-P	RG1 (pBBR1MCS-5) Gm ^r	este trabajo
RG1-P1	RG1 (pBBR1MCS-5-HPP-Rr) Kan ^r Gm ^r	este trabajo
RG1-P2	RG1 (pBBR1MCS-5-HPP-Rp) Kan ^r Gm ^r	este trabajo
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1. DSM 158	cepa silvestre	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
<i>Rhodobacter capsulatus</i> DSM 1710	cepa silvestre	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> 2.1.6. DSM 5058	cepa silvestre	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
<i>Rhodomicrobium vannielii</i> DSM 162	cepa silvestre	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
<i>Rhodospirillum fulvum</i> DSM 113	cepa silvestre	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
<i>Rhodopila globiformis</i> DSM 161	cepa silvestre	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
<i>Escherichia coli</i>		
NM522	<i>hsdΔ5, Δ[lac.pro], F⁺, pro⁺lacI^rZΔM15</i>	(Gough y Murray, 1983)
S17-1	Pro ⁺ Res ⁺ Mod ⁺ recA, Sm ^R , plásmido integrado RP4-Tc::Mu-Kan::Tn7	(Priefer et al, 1985)

Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas a 37°C, en aerobiosis y agitación en el medio Luria Bertani (LB, bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l, pH=7.5). En el caso de medios sólidos se agrega 2% de agar al medio. Los antibióticos utilizados, para seleccionar las clonas transformadas con las diferentes construcciones fueron: kanamicina a 20 µg/ml y gentamicina a 30 µg/ml. Las bacterias fotosintéticas fueron crecidas en medio líquido o sólido (agar al 1.5%) en el medio de cultivo reportado por (Hutner, 1950), con las modificaciones de (Cohen-Bazire *et al*, 1957). Este medio está compuesto por: a) Base concentrada (N(CH₂COOH)₃ a 52 mM, MgSO₄7H₂O a 58 mM, CaCl₂6H₂O a 29 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄4H₂O a 0.074 mM, FeSO₄7H₂O a 0.35 mM y * Metales '44' a 50 ml / l). La solución de *Metales '44'. Contiene: EDTA a 6.5 mM, FeSO₄ 7H₂O a 17.9 mM, ZnSO₄ 7H₂O a 0.038 mM, MnSO₄ a 10.1 mM, CuSO₄ 5H₂O a 1.5 mM, Co(NO₃)₂ 6H₂O a 0.85 mM y Na₂B₄O₇ 6H₂O a 0.57 mM. b) KH₂PO₄ a 20.0 mM, c) Acido succínico a 16.9 mM, d) (NH₄)₂SO₄ a 3.7 mM, e) NaCl a 8.5 mM, f) Acido L-glutámico a 1.35 mM y g) Acido L-aspártico a 0.3 mM. Además se añade: Extracto de carne al 0.125 %, Acido nicotínico a 10 µM, Tiamina a 1.5 µM y Biotina a 0.04 µM.

En el caso de las bacterias fotosintéticas que han sido transformadas o modificadas, se agregan los antibióticos gentamicina y/o kanamicina en concentraciones de 15 y 25 µg/ml respectivamente.

3.2. Cultivo de bacterias.

3.2.1. Cultivo de *Escherichia coli*.

Las bacterias se cultivaron en condiciones aeróbicas a 37 °C, en el caso de cultivos en medio líquido se agitaron de 250 rpm.

3.2.2. Cultivo de bacterias fotosintéticas

Las bacterias se siembran en placa por el método de dilución y se incuban a 30 °C para obtener colonias únicas. Una colonia se siembra por punción en los frascos con medio sólido. Se incuban en la oscuridad 12 h para que el crecimiento aeróbico elimine el O₂ del medio. Terminado este período, las bacterias se

exponen a la luz de focos con filamento de tungsteno de 40 W, colocados a 30 cm (intensidad luminosa de 21 W/m²). Estos cultivos pueden mantenerse como reserva o bien, utilizarse para cultivos posteriores.

3.2.2.1. Cultivos en condiciones fotosintéticas.

Para obtener grandes cantidades de bacterias se añade a los frascos de punción medio líquido. Se dejan toda la noche en la oscuridad y a continuación se colocan a la luz. El medio se transfiere a frascos de 100 ml una vez que las bacterias han crecido y se repite el proceso, traspasando el inoculo a frascos de 1 l y de 9 l sucesivamente, siguiendo los pasos descritos con anterioridad.

Para realizar las curvas de crecimiento en condiciones fotosintéticas a diferentes intensidades luminosas (21, 6.25, 3.6 y 2 W/m²), se inoculan tubos para fotocolorímetro de 10 ml con 3 o 4 colonias de bacterias y se crecen de la misma forma. El crecimiento se monitorea midiendo la turbidez del cultivo a intervalos de tiempo con un fotocolorímetro. Los valores de la intensidad luminosa se ajustaron con un reóstato y se utilizó un radiómetro YSI-Kettering, modelo 65A, (Yellow Springs Instrument Co.; Ohio) para determinar la intensidad luminosa.

3.2.2.2. Cultivos en condiciones respiratorias.

Se inocula una colonia en tubos de ensaye con 5 ml de medio líquido, el cultivo se crece a 30 °C con agitación vigorosa (250 rpm) alrededor de 8 horas., si se desea obtener cultivos con mayor volumen, se transfieren los 5 ml del cultivo anterior a 20 ml de medio en matraces nefelométricos (para realizar curvas de crecimiento) con capacidad de 250 ml.

3.3. Obtención de cromatóforos (membranas fotosintéticas).

Una vez que las bacterias se encuentran en la fase de crecimiento logarítmica tardía, son cosechadas por centrifugación a 8,000 x g por 15 minutos, la pastilla se resuspende con amortiguador, 50 mM de MOPS, 50 mM de KCl pH 7.0 y se centrifuga a 8,000 x g por 15 min para eliminar por completo los residuos del medio. Las pastillas se pesan y esto se considera como peso húmedo. Si no se utilizan inmediatamente, las bacterias se almacenan a -70°C.

Se siguió el método descrito por (Baccarini-Melandri *et al*, 1978), para la obtención de cromatóforos.

- A. Las bacterias se resuspendieron en amortiguador 50 mM de Tris-HCl, 5 mM de $MgCl_2$, pH 8 en una proporción 1/10 (g bacterias/ ml amortiguador), que contiene 1 mg de DNAasa por 100 g de peso húmedo de bacterias.
- B. Para romper las células se hace lo siguiente: se sonica la suspensión en lotes de 15 ml por 1:45 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 separar 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 50 mM de Tris-HCl, mM de EDTA 5 y 2 mM de EGTA a pH 8 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 50 mM de Tris-HCl pH 8 y se centrifuga a la misma velocidad. Finalmente, los cromatóforos se resuspenden en el mismo amortiguador a una concentración aproximada de 60 mg de proteína/ml.
- G. La preparación de cromatóforos se guarda a 4 °C y se usa en los 3 días siguientes, período durante el cual no hay cambios en la actividad hidrolítica.

*Para la preparación de los cromatóforos cargados con el amortiguador MES, se resuspende a las bacterias en 20 mM de MES pH 6, 7 u 8 antes de que sean sonicadas y se incluye este amortiguador en todos los pasos posteriores de la preparación de los cromatóforos.

3.4. Determinación de proteína.

La cantidad de proteína se cuantifica por los métodos: de (Lowry *et al*, 1951) y (Bradford, 1976), utilizando como estándar albúmina de suero bovino.

3.5. Determinación de la actividad hidrolítica.

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).

El medio de reacción contiene: 50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 1 mM de PPI_{Na} y 1.5 mM de MgCl₂. La reacción se inicia al añadir 0.5 mg de proteína de la preparación de cromatóforos, el medio se incuba a 30 °C durante el tiempo especificado en cada experimento y la reacción se detiene al añadir ácido tricloroacético a una concentración final de 6%. Por último, se centrifuga a 3,000 rpm por 5 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 de proteína⁻¹. Todos los experimentos se repiten por lo menos tres veces.

3.6. Medición del bombeo de protones.

La formación de ΔpH fue ensayada midiendo el apagamiento de la fluorescencia del anaranjado de acridina inducida por la adición de Mg-PPi (actividad de pirofosfatasa) o de Mg-ATP (actividad de ATPasa) en los cromatóforos de *R. rubrum* (Sosa y Celis, 1995). Se incubaron los cromatóforos (1 mg de proteína) en una cubeta con agitación a 30 °C en 2 ml de medio de reacción que contenía: 3 μM de anaranjado de acridina, 20 mM de Tris-HCl pH 7.4, 5 mM de MgCl₂, 200 mM de cloruro de colina y 250 mM de trealosa. Después

de que la señal de la fluorescencia se estabiliza, se inicia la reacción con la adición de 1 mM del sustrato correspondiente (PPi o ATP). El estado estacionario del gradiente de pH se alcanza cuando el valor del apagamiento de la fluorescencia es estable; la fluorescencia se monitoreó utilizando un espectrofluorómetro SLM AMINCO, con una longitud de onda de excitación de 495 nm y una de emisión de 540 nm. El gradiente se disipa rápidamente con la adición de 5 mM de EDTA o bien con la de 2.5 μ M del protonóforo CCCP.

Para calibrar el valor del Δ pH inducido por PPi y ATP, se siguió el protocolo de (Sosa y Celis, 1995) y se prepararon cromatóforos de *R. rubrum* en 20 mM de Tris-MES pH 6, 7 u 8. El medio de reacción contiene: anaranjado de acridina 3 μ M, Tris-MES con pHs que iban de 6 a 8.5, 5 mM de MgCl₂, 200 mM de cloruro de colina y 250 mM de trealosa en un volumen final de 2 ml. La reacción se inicia agregando rápidamente cromatóforos (0.2 y 0.1 mg de proteína) a la cubeta de fluorescencia, que contenía el medio de reacción. Se observó un apagamiento rápido de la fluorescencia, seguido de una lenta recuperación de la fluorescencia a la línea basal y después de aproximadamente 10 minutos se añade 4 mM de NH₄Cl para colapsar cualquier Δ pH residual y determinar la línea basal final. La curva de calibración del Δ pH se construyó graficando el porcentaje de apagamiento máximo, (con respecto a la fluorescencia basal en presencia de NH₄Cl de acuerdo a la siguiente relación: $\log[\%Q/(100-\%Q)]$) contra el Δ pH impuesto. Dicho gráfico en todos los casos resultó ser una línea recta, la cual se utiliza para calcular por medio de la intrapolación el cambio de pH asociado a cualquier porcentaje de apagamiento de la fluorescencia.

3.7. Purificación de DNA genómico de *R. rubrum*.

Para obtener el DNA genómico de *R. rubrum* se siguió el metodo descrito por (Marmur y Doty, 1961), con ligeras modificaciones, este consiste en lisar a las celulas con lisozima, incubando a 50°C, extracciones con fenol-cloroformo y precipitación del DNA genómico con NaCl y Etanol.

3.8. Amplificación de fragmentos de DNA de *R. rubrum* por medio de PCR.

Por medio de PCR se amplificaron 2 fragmentos de DNA cromosomal de *R. rubrum*, el primero de 1939 pb contenía casi la totalidad del gen de la H⁺PPasa de *R. rubrum* se utilizó para la interrupción de éste, mientras que el segundo de 2500 pb contenía además del gen completo las regiones promotora y terminadora de éste y se utilizó para la complementación de la mutante H⁺PPasa⁻ (RG1). Para la amplificación del fragmento de 1939 pb se utilizó el siguiente par de desoxioligonucleótidos: sentido: CAGCGCGGTTTCTCAATCGT (localizado entre los pb 228 y 298 del gen *hpp*) antisentido: GCGACGATGTTGGTGATCTT (localizado entre los pb 2197 y 2216 del gen *hpp*) (Fig. 4) y para el fragmento de 2500 pb se utilizaron: ATTGCCCGCCGTTAGGCC (localizado a -550 pb del ATG de inicio (Fig. 4) y ACATGCCGTTGACCTTTG (localizado 30 pb después del codon de termino TTA), sentido y antisentido respectivamente.

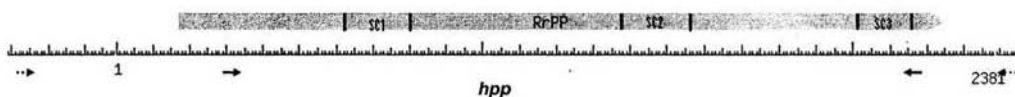


Fig. 4. Localización de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmento por PCR. Se muestra la H⁺PPasa de *R. rubrum* (RrPP), en color gris, indicando las regiones conservadas que comparte con las demás H⁺PPasas (SC1, SC2 y SC3). Debajo de ésta se muestra el gen correspondiente (*hpp*) y la localización de los oligonucleótidos sentido y antisentido para los fragmentos de 1939 pb (flechas continuas) y de 2500 pb (flechas punteadas).

Para las diferentes amplificaciones se utilizaron los siguientes reactivos:

	[Final]
DNA templado	100-200 ng
Desoxioligonucleótido sentido	100 picomolas
Desoxioligonucleótido antisentido	100 picomolas
MgCl ₂	0-0.5 mM
DMSO	10%
Desoxinucleótidos trifosfatados	0.1 mM
Amortiguador Vent 10 X	1 X
Vent DNA Polimerasa	1 unidad
H ₂ O	(aforar a 100 µl totales).

Una vez mezclados los componentes la reacción se lleva a cabo utilizando un termociclador, sometiendo la mezcla a los siguientes ciclos:

95 °C	4 min	1 vez
95 °C	1 min	} 3 veces
55 °C	45 seg	
63 °C	2 min	
95 °C	1 min	} 27 veces
58 °C	45 seg	
63 °C	2 min	
72 °C	10 min	1 vez

Las temperaturas de alineamiento, mas no el número y orden de los ciclos variaron un poco dependiendo de la temperatura media de desnaturalización (T_m) de los diferentes pares de desoxiligonucleótidos utilizados.

El resultado de la amplificación se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa.

3.8.1. Purificación del producto de PCR.

Una vez detectado por electroforesis el producto de PCR esperado se purifica mediante el método de GENECLEAN II (siguiendo las indicaciones de los proveedores) para lo cual, se realiza una electroforesis en gel de agarosa 1% en amortiguador TAE de bajo punto de fusión a 70 V. Se corta la banda del gel y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se agregan 3 volúmenes de solución de NaI, se incuba la banda durante 5 min a 50 °C para disolver la agarosa, se le añaden 5 μ l de la suspensión de "glassmilk" (afin al DNA) y se incuba a 4 °C por 10 min, se centrifuga 5 seg a 14,000 rpm para bajar el complejo DNA-"glassmilk", el producto se lava tres veces con la solución "New Wash" que contiene etanol y se eluye el DNA con el volumen deseado de H₂O precalentada a 50 °C.

3.8.2. Clonación del producto de PCR.

Los productos de PCR se clonan en el vector PCRTMII, utilizando el sistema de TA clonning (Invitrogen). Este método se basa en la propiedad de la enzima *Taq* polimerasa, de añadir una desoxiadenosina (A) a los extremos 3' de fragmentos de DNA de cadena doble, el vector linearizado de este sistema tiene en los extremos 5' una desoxitimidina (T), lo que permite que el producto de PCR se ligue con eficiencia al vector.

En la reacción de amplificación, se utilizó *Vent* polimerasa en lugar de *Taq*, debido a su mayor fidelidad (Eckert y Kunkel, 1991). Dado que *Vent* polimerasa no deja colas de A, es necesario añadir estos extremos a nuestros productos purificados de PCR, utilizando *Taq* polimerasa.

Una vez obtenido el producto de PCR con las colas de A se lleva a cabo la ligación:

- A. Se estima la cantidad del producto de PCR necesario para la ligación con 50 ng (20 fmoles) de vector PCRTMII.
- B. Utilizando la concentración del producto de PCR previamente determinada, se calcula el volumen necesario para la ligación, la cual puede ser hecha con una relación vector/ inserto de 1:1 o 1:3.
- C. Se añade una unidad de ligasa T4 y se incuba la reacción a 14 °C toda la noche.
- D. Se transforma la ligación en células competentes de *E. coli* NM522

3.9. Obtención de células competentes y transformación.

Se utilizó el método descrito por (Sambrook *et al*, 1989), con ligeras modificaciones, este consiste en: Crecer a las bacterias hasta la fase exponencial temprana, tratarlas con CaCl₂ y darles un shock térmico a 42° C para permeabilizar la membrana y que el plásmido penetre a la célula, finalmente las bacterias se plaquean en cajas LB con: los antibióticos necesarios, en el caso de la transformación con PCRTMII, 100 µg/ml de ampicilina; además de 25 µl de Xgal (40 mg/ml) y 25 µl de IPTG 0.1 M, como inductor gratuito; para seleccionar

mediante complementación alfa a las clonas que poseen el plásmido, con el inserto (colonias blancas).

3.10. Obtención de la mutante H⁺PPasa⁻ de *R. rubrum*.

Los plásmidos utilizados la obtención de la mutante RG1 (mediante interrupción del gen *hpp*) y la obtención de las cepas derivadas a partir de la mutante RG1 se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Plásmidos utilizados.

Plásmidos	Características relevantes	referencia
pCRII	vector para clonar 3.9-kb, Ap ^r Kan ^r	Invitrogen
pCR-Hpp	pCRII con fragmento de 1.9-kb del gen <i>hpp</i>	este trabajo
pCR-Hpp-K	pCR- <i>hpp</i> -960::Kan	este trabajo
pUC4K	derivado de pUC18, Ap ^r Kan ^r Fuente del gen para la resistencia a kanamicina	Vieira y Messing, 1982
pSUP202	vector suicida, Mob ⁺ Cm ^r Ap ^r Tc ^r	(Priefer <i>et al</i> , 1985)
pSUP-Hpp-K	pSUP202 con el fragmento de 3.15-kb de <i>hpp</i> -960::Kan, Ap ^r Cm ^r	este trabajo
pBBR1MCS-5	vector para clonar 4.8-kb, Mob ⁺ Gm ^r	(Kovach <i>et al</i> , 1994)
pBBR1-Hpp-Rr	pBBR1MCS-5 (<i>hpp</i>), para complementación homóloga con el gen <i>hpp</i> de <i>R. rubrum</i>	este trabajo
pBBR1-Hpp-Rp	pBBR1MCS-5 (<i>hpp-paf</i>), para complementación heteróloga con el gen <i>hpp</i> de <i>Rps. palustris</i>	este trabajo

Una vez clonado en pCRIITM el fragmento de 1939 pb del gen de la H⁺PPasa de *R. rubrum* (el cual se denominó pCR-Hpp), se localizó un sitio de restricción único, que solamente estuviera en el fragmento de 1939 pb y no en el vector pCRIITM (*Stu*I a 960 pb del inicio del gen) y la construcción se digirió con ésta enzima. Por otra parte, mediante la digestión con *Pst*I del vector pUC4K (Vieira y Messing, 1982) se obtuvo un fragmento de DNA (1250 pb) con la resistencia a kanamicina, que se utilizaría para interrumpir al gen de la H⁺PPasa. Debido a que los sitios de restricción de las enzimas *Stu*I y *Pst*I no son compatibles (la primera deja extremos romos en el DNA y la segunda cohesivos), para poder realizar la ligación de ambos fragmentos, se procedió a volver romos los extremos del fragmento de resistencia a kanamicina (digerido con *Pst*I),

utilizando DNA-polimerasa del fago T4, para digerir los extremos cohesivos dejados por *Pst*I.

la ligación (pCR-Hpp-K), se transformó en células competentes de *E. coli* NM522, de la manera que se indica en las secciones anteriores. Finalmente, después de verificar la interrupción del gen mediante PCR se procedió a subclonar este fragmento de (1250+1939 pb) en el vector suicida pSUP202, para su posterior transformación en la cepa S17 de *E. coli* e inmediatamente la conjugación de esta bacteria con la cepa silvestre de *R. rubrum*.

3.11. Conjugación.

Para obtener a la mutante H⁺PPasa⁻ (RG1) se lleva a cabo el replazamiento genético del alelo silvestre *hpp* por *hpp*-960::Kan, durante la conjugación mediante recombinación homologa; para realizar la conjugación se lleva a cabo la siguiente metodología: Se cultivan las bacteria receptora y donadora hasta la fase logarítmica tardía, se toman alícuotas de ambos cultivos, Se lavan las bacterias, se resuspenden y se mezclan, depositándolas en fragmentos estériles de nitrocelulosa, se mantiene la conjugación de 5 a 24 h a 30 °C. Se resuspenden las bacterias y se cultivan en cajas de Cohen-Bazire con gentamicina a 15 µg/ml y ácido nalidíxico a 20 µg/ml para eliminar a la bacteria donadora.

3.12. Verificación de la interrupción del gen *hpp*.

Para verificar la interrupción del gen se realizan amplificaciones por PCR e hibridación tipo Southern (utilizando métodos descritos en Sambrook *et al*, 1989) marcando las sondas de acuerdo con el protocolo "gene images random prime labelling module" (Amersham). El procedimiento se basa en la utilización de desoxioligonucleótidos de 9 pb con secuencia aleatoria que funcionan como primeros para iniciar la síntesis de DNA utilizando como templado la sonda a marcar; en este sistema la fluoresceína-11-dUTP se incorporó al DNA sintetizado, reemplazando parcialmente al dTTP. La detección de la fluoresceína, se realizó con anticuerpos anti-fluoresceína acoplados a fosfatasa alcalina. Por tratarse de

sondas homologas, tanto la hibridización como los lavados de la membrana se llevaron a cabo en condiciones de máxima severidad a una temperatura de 70°C.

3.13. Obtención de las demás cepas empleadas en los experimentos.

Para poder asegurar que los efectos observados en la mutante RG1 se debieran únicamente a la interrupción del gen *hpp*, se reconstituyó a la mutante con su propio gen *hpp* (complementación homóloga). Además se le añadió el gen de la H⁺PPasa de *Rhodopseudomonas palustris* (complementación heteróloga). Para el primer caso se utilizó el fragmento de ~2500 pb que contenía al gen de la H⁺PPasa de *R. rubrum* con su promotor y se clonó en el vector de amplio espectro pBBR1MCS-5 el cual posee resistencia a gentamicina. Para la complementación heteróloga se utilizó un fragmento de 5,000 pb que contiene al gen de la H⁺PPasa de *R. palustris* que ya se tenía en el laboratorio, (García-Contreras, 2002) y se clonó también en pBBR1MCS-5. Ambas construcciones fueron introducidas a *E. coli* S17 mediante transformación y posteriormente a RG1 mediante conjugación. Las clonas complementadas de forma homóloga y heteróloga fueron denominadas: RG1-P1 y RG1-P2 respectivamente, mientras que la transformada únicamente con el vector fue nombrada RG1-P (ver Tabla 3).

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de la mutante RG1 (H⁺PPasa⁻) de *Rhodospirillum rubrum*.

Estudios previos demostraron la existencia de una sola copia del gen *hpp*, de la H⁺PPasa de *R. rubrum* cuya parte codificante es de 2108 pb (Baltscheffsky *et al*, 1998). En este trabajo se describe la construcción de una mutante, así como su caracterización.

La estrategia para la obtención de la mutante fue por remplazamiento genético del alelo silvestre por el alelo *hpp*-960::Kan. Para ello, en primer lugar se amplificó, mediante PCR, un fragmento de 1939 pb (que contiene alrededor del 90% del gen) (Fig.5 A), el cual se clonó en el vector pCRIITM. Posteriormente, se insertó un fragmento de 1250 pb que codifica para la resistencia a kanamicina en el sitio de *StuI* (entre los nucleótidos 960 y 961 de la parte codificante del gen) (Fig.5 B.).

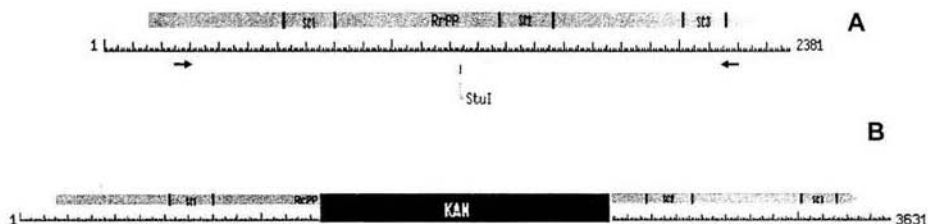


Fig.5. Interrupción del gen *hpp* que codifica para la H⁺PPasa de *R. rubrum*. Se muestra la H⁺PPasa de *R. rubrum* (RrPP), en color gris, indicando las regiones conservadas (SC1, SC2 y SC3). Debajo de ésta se muestra el gen correspondiente (*hpp*) y el sitio único de *StuI* donde se insertó el fragmento de resistencia a kanamicina (en negro). A) alelo *hpp* silvestre, se indica con flechas la localización de los oligonucleótidos sentido y antisentido para el fragmento de 1939 pb, B) alelo interrumpido *hpp*-960::Kan.

Posteriormente el fragmento *EcoRI* de 3189 pb que contenía la construcción *hpp*-960::Kan, fue clonado en el plásmido pSUP202. Este vector es movilizable pero incapaz de replicarse en *R. rubrum* (vector suicida). Este plásmido se introdujo en la cepa S17 de *Escherichia coli* mediante transformación. Finalmente, por medio de conjugación diparental entre S17 y *R. rubrum*, la construcción con el gen interrumpido se transfiere a ésta última. Debido a que pSUP202 es incapaz de replicarse en *R. rubrum*, la única manera de que ésta adquiera la resistencia a

kanamicina es mediante el intercambio del gen silvestre por el interrumpido, por recombinación homóloga. Para seleccionar las clonas de *R. rubrum* que tuvieran únicamente la copia interrumpida del gen en el cromosoma (dobles recombinantes), las exconjugantes se crecieron en placas de medio adicionado con kanamicina y posteriormente se probó su sensibilidad al cloramfenicol (resistencia incluida en el pSUP202 que se presentaría solo en caso de que un fragmento del plásmido, o bien el plásmido completo se hubiese insertado en el cromosoma de *R. rubrum*). De esta manera se seleccionó una clona Km^rCm^s y se denominó RG1. La Fig.6 esquematiza la estrategia utilizada para la interrupción del gen.

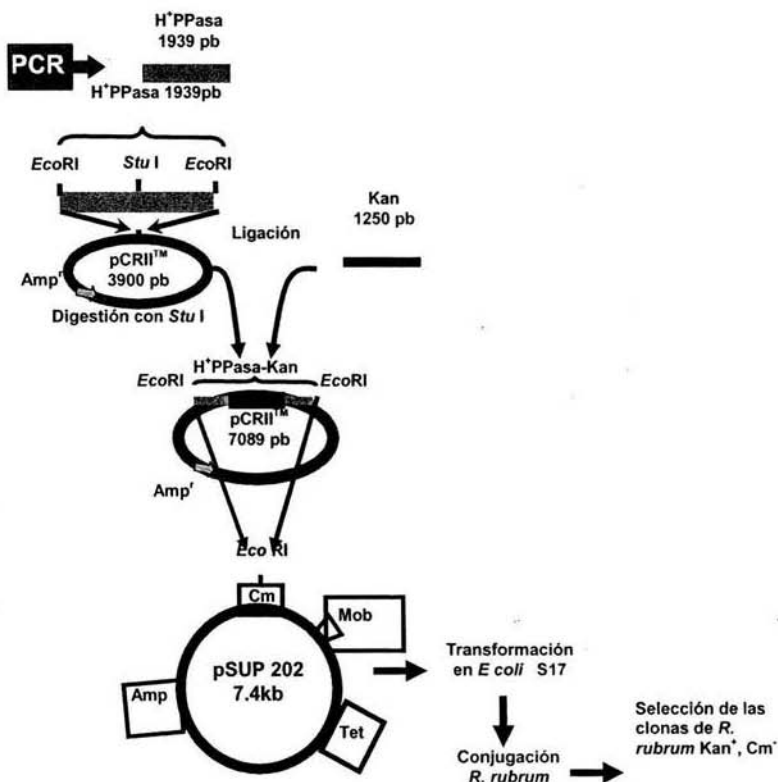


Fig.6. Estrategia utilizada para obtener la mutante H⁺PPasa^r. La mutante fue obtenida mediante la interrupción del gen con un cassette de resistencia a kanamicina, los detalles se especifican en el texto.

La clona con el gen interrumpido se caracterizó con hibridación tipo Southern utilizando como sondas el fragmento de 1939 pb del gen de la H⁺PPasa de *R. rubrum* y el cassette de resistencia a kanamicina de 1250 pb (Fig.7).

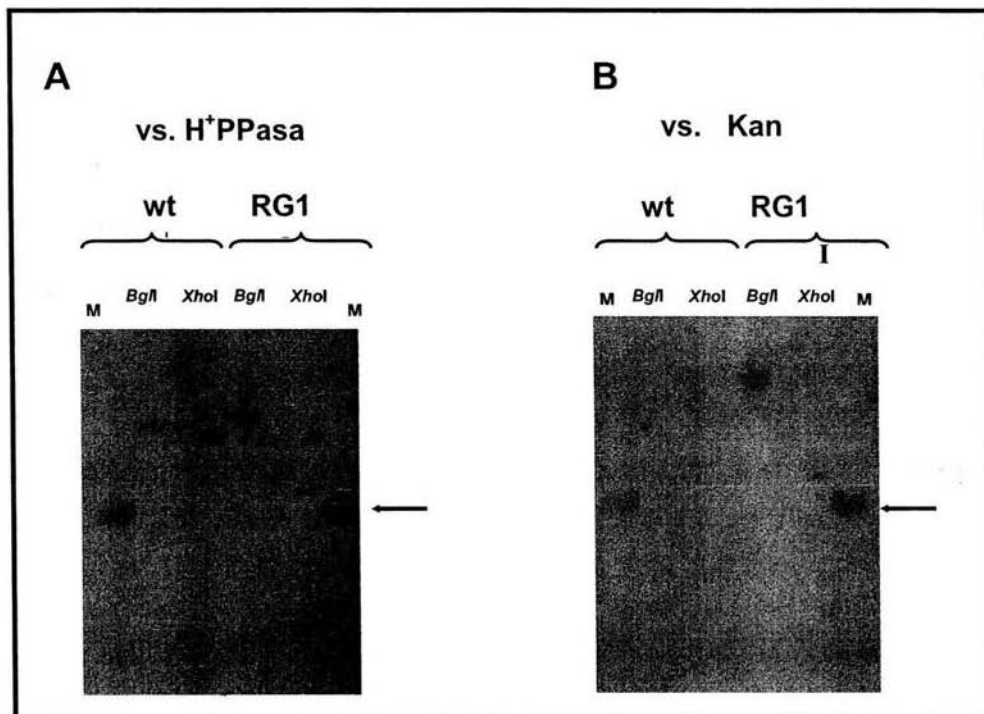


Fig.7. Hibridación tipo Southern del DNA cromosomal de la transconjugante RG1. La hibridación fue realizada, en condiciones de alta severidad y utilizando como sondas el fragmento de 1939 pb del gen de la H⁺PPasa (A) y el de 1250 pb de la resistencia a kanamicina (B); el DNA cromosomal fue digerido con las enzimas de restricción *BglI* y *XhoI*; los carriles marcados con una M se refieren a marcadores de peso molecular, la señal de hibridación inespecífica (indicada con flechas) en estos carriles tiene un peso de 1375 pb.

Como se observa en la Fig.7, cuando el DNA genómico digerido con *BglI* de la cepa silvestre de *R. rubrum* y de la clona RG1 son hibridados contra el fragmento de 1939 pb de *hpp*, aparece una sola banda en ambos casos, con la diferencia de que la correspondiente a RG1 tiene un aumento de tamaño proporcional a los 1250 pb del gen de resistencia a kanamicina (Fig. 8). En cambio, si se utiliza el fragmento de Kan (1250 pb) como sonda, el DNA

cromosomal de la cepa silvestre no presenta señal alguna, pero si se aprecia en el DNA de la exconjugante una banda del mismo peso que cuando se utiliza la sonda de 1939 pb. Cuando se utiliza el DNA cromosomal digerido con la enzima de restricción *Xho*I, en el caso de la cepa silvestre aparece nuevamente una sola banda al hibridar contra la sonda de la H⁺PPasa; sin embargo, en el caso de la exconjugante aparecen dos bandas que suman el equivalente del gen más el fragmento que confiere resistencia a la kanamicina (esto es debido a que este fragmento tiene un sitio de restricción para *Xho*I a 33 pb del inicio de el cassette de kan (Fig. 8). Al hibridizar contra la sonda de kanamicina, solo apareció la banda de menor peso molecular de la transconjugante, que es donde está la mayor parte del fragmento de kanamicina (en concordancia con la Fig.8). Estos resultados indican que efectivamente se realizó correctamente la interrupción del gen de la H⁺PPasa.

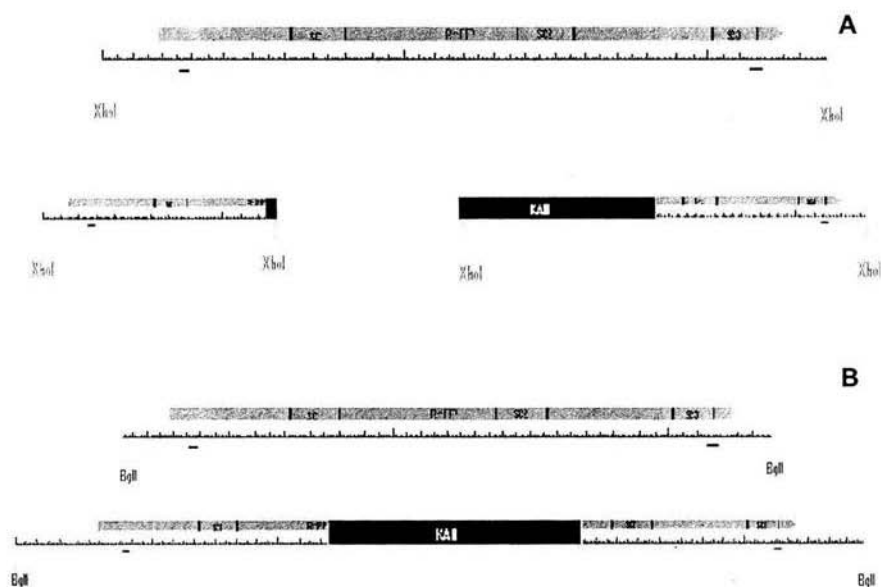


Fig.8. Fragmentos generados en el alelo silvestre y en el *hpp-960::Kan*, por la digestión con las enzimas de restricción empleadas en el análisis de hibridación tipo Southern. A) *Xho*I y B) *Bgl*I. En ambos casos se muestran el alelo silvestre *hpp* (en la parte superior) y el interrumpido *hpp-960::Kan*.

Asimismo, la amplificación por PCR del DNA de RG1, utilizando los desoxioligonucleótidos que sirvieron para amplificar el fragmento de 1939 pb, produjo una sola banda de 3189 pb correspondiente a la suma de los fragmentos de 1939 y 1250 pb (datos no mostrados).

En resumen, tanto el análisis por hibridación, como la amplificación por PCR confirmaron que la transconjugante seleccionada RG1, contenía una sola copia del gen interrumpido con el cassette de resistencia a kanamicina.

No obstante que la localización del gen de la H⁺PPasa de *R. rubrum* (*hpp*) dentro de su genoma parece indicar que se trata de un gen monocistrónico (no forma parte de un operón) ya que en la vecindad inmediata del gen, hacia ambos lados, se encuentran regiones donde no parece haber un marco de lectura abierto. Ninguno de los genes vecinos de *hpp* tienen una relación funcional directa con la H⁺PPasa, por ejemplo, en la región 5' de *hpp*, a 6400 pb se encuentran marcos de lectura abiertos para la enzima tiamina monofosfato cinasa, para un factor de terminación de la transcripción, para la sintetasa de la cadena B- de la riboflavina, etc., mientras que en la región 3', a 2132 pb de éste hay marcos de lectura abiertos para la sintetasa de polihidroxialcanoato, para un gen putativo de una lactato hidrogenasa y varios genes de proteínas no caracterizadas (datos obtenidos de la pagina web del genoma de *R. rubrum* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framik.cgi?gi=51116&db=G>).

Para asegurar que los posibles efectos en el fenotipo de RG1 se debieran exclusivamente a la pérdida de la actividad de H⁺PPasa asociada a la interrupción del gen y no, por ejemplo, a algún efecto polar sobre los genes adyacentes, se procedió a su complementación. Para determinar que el fenotipo de RG1 se debieran exclusivamente a la pérdida de la actividad de H⁺PPasa asociada a la interrupción del gen y no, por ejemplo, a algún efecto polar sobre los genes adyacentes, se generaron cepas conteniendo el gen *hpp* de *R. rubrum* (complementación homóloga) y de *R. palustris* (complementación heteróloga) en el vector pBBR1MCS-5 procediendo de la manera que se detalla en la sección de Materiales y Métodos. Para descartar que los efectos en el fenotipo de la clona H⁺PPasa fueran ocasionados por el vector donde se clonaron los genes se

transformó también a la clona H⁺PPasa⁻ con el vector libre de inserto, esta clona se denominó RG1-P y fue utilizada en todos los experimentos como control negativo. Una vez construidas la mutante RG1 y las mutantes complementadas se procedió a la caracterización.

4.2. Caracterización de la clona RG1 (mutante H⁺PPasa⁻).

4.2.1. Determinación de la actividad de hidrólisis de PPI y de generación de un bombeo de H⁺ en cromatóforos.

Para evaluar si la clona RG1 había perdido la actividad de H⁺PPasa se midió la hidrólisis de PPI en membranas fotosintéticas (cromatóforos), así como el bombeo de H⁺ a expensas de la hidrólisis de PPI. En la Fig.9 se muestra que la actividad hidrolítica se pierde completamente en RG1 y se recupera con la introducción del plasmido pBBR1-hpp-rr que contiene el gen homólogo, el cual restauró la actividad aun 120 %, mientras que con el gen heterólogo *hpp* de *R. palustris* se recupera un 70%.

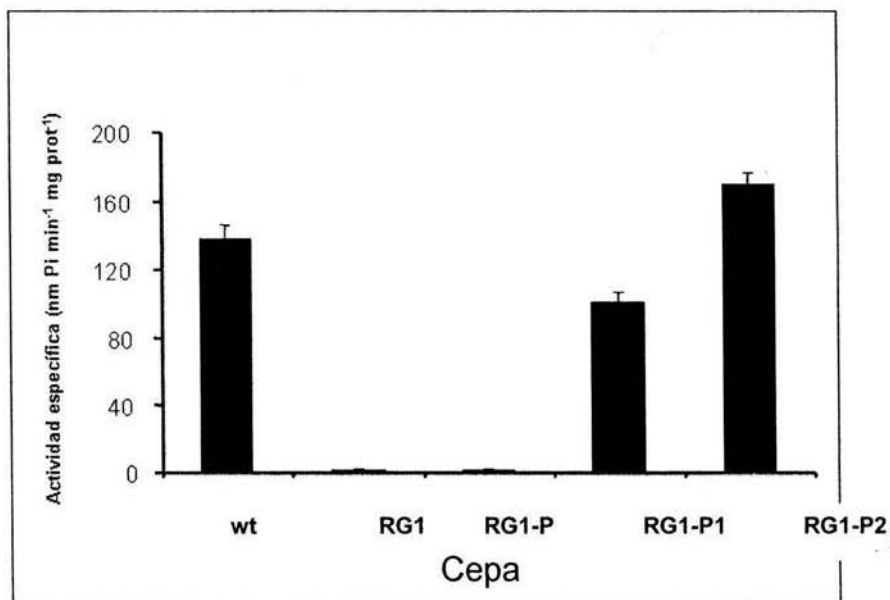


Fig.9. Hidrólisis de PPI en los cromatóforos de las diferentes cepas utilizadas. Se grafican los promedios y las desviaciones estándar de 3 experimentos. wt: cepa silvestre, RG1 (Hpp-960::kan) mutante con el gen de la H⁺PPasa interrumpido, RG1-P: RG1 transformada con el vector pBBR1MCS-5 libre de inserto, RG1-P1: transformada con el gen homólogo de RG1, RG1-P2: transformada con el gen heterólogo de RG1.

La capacidad de bombear H^+ de los cromatóforos de la mutante RG1 utilizando como sustrato PPI, también desaparece (Fig.10 B) y se recupera con la complementación homóloga (Fig.10 C) o la heteróloga (datos no mostrados), el ΔpH generado en estos casos es de 1.65 unidades. Para verificar que la falta de bombeo de H^+ se debiera únicamente a la ausencia de la H^+PPasa y no a que las membranas de la mutante no estuviesen selladas, se determinó la generación de ΔpH utilizando ATP como sustrato (Fig.10 D). En este caso, el ΔpH generado por la

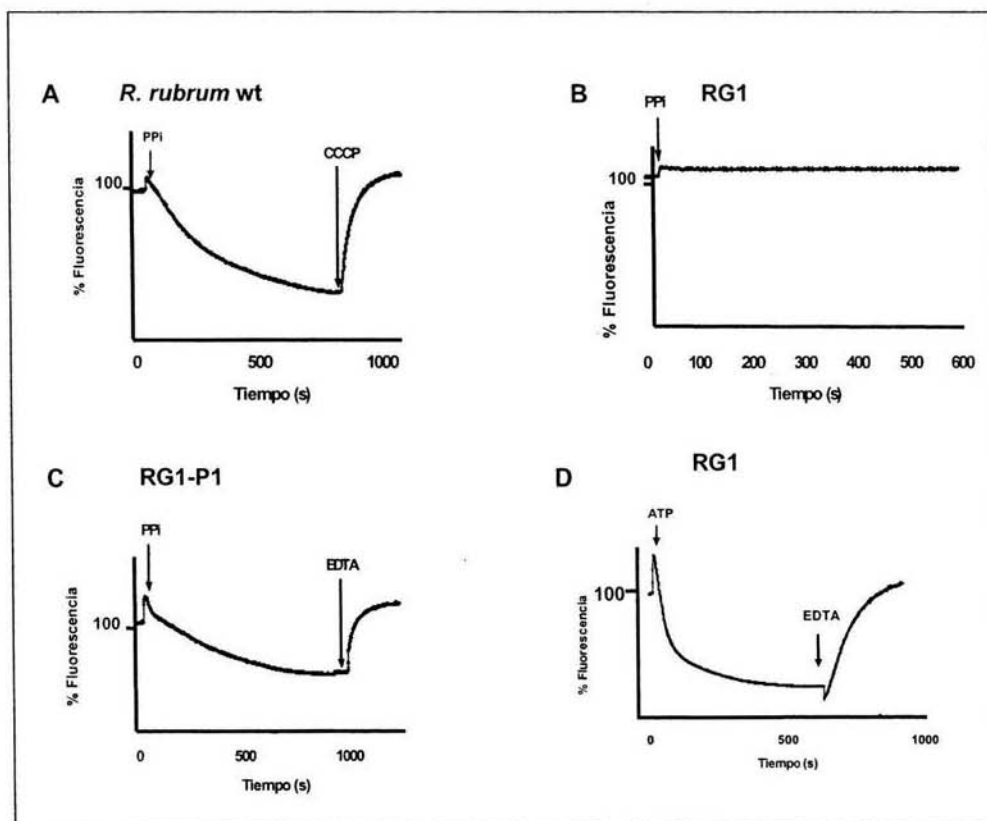


Fig.10. Bombeo de H^+ a expensas de PPI o de ATP en cromatóforos de las diferentes cepas. Se determinó por el apagamiento de la fluorescencia del anaranjado de acridina. La reacción se inició con la adición de 1mM de PPI (Fig.10 A-C) o 2 mM de ATP (Fig.7 D). Los gradientes de pH fueron colapsados con la adición de 2.5 μM de CCCP (Fig.10 A) o 5 mM de EDTA (Fig.10 C y Fig.10 D). A) wt, B) RG1, C) RG1-P1 y D) RG1.

hidrólisis de ATP, es de 1.9 unidades, tanto en los cromatóforos de RG1 como en los de la cepa silvestre, lo que confirma que la pérdida del bombeo de H^+ a expensas de PPi se debe efectivamente a la interrupción del gen.

Una vez que se verificó bioquímicamente que la cepa mutante RG1 carecía de las actividades de la H^+PPasa , se procedió a realizar su caracterización fisiológica.

4.2.2. Crecimiento en condiciones de bajo potencial en los metabolismos fotosintético y respiratorio.

4.2.2.1. Crecimiento fotosintético anaeróbico a diferentes intensidades luminosas.

De acuerdo con la hipótesis de Nyrén y Strid, (1990), el papel de la H^+PPasa de *R. rubrum in vivo*, es el de generar un gradiente electroquímico de H^+ que le proporcione energía en condiciones de bajo potencial, por esta razón se analizó a la mutante RG1 en diferentes condiciones de baja energía. El primer experimento consistió en determinar el efecto de la intensidad luminosa sobre el crecimiento de las diferentes cepas de bacterias. Los resultados muestran que, a intensidades luminosas altas $21 W/m^2$ (normalmente utilizadas para el crecimiento de la bacteria), el crecimiento de RG1 es indistinguible del de la cepa silvestre (Fig.11 A), sin embargo, a medida que la intensidad luminosa disminuye, se observa un retraso en su crecimiento (Fig.11 B y Fig.11 C), hasta que finalmente a una intensidad luminosa muy baja ($2 W/m^2$), RG1 es incapaz de crecer. (Fig.11 D). Las cepas complementadas con los genes *hpp* de *R. rubrum* (RG1-P1 y *R. palustris* (RG1-P2), fueron capaces de crecer de manera similar a la cepa wt a intensidades luminosas De 21, 6.25 y $3.6 W/m^2$, sin embargo a $2 W/m^2$ mostraron un crecimiento menor con respecto a la cepa wt.

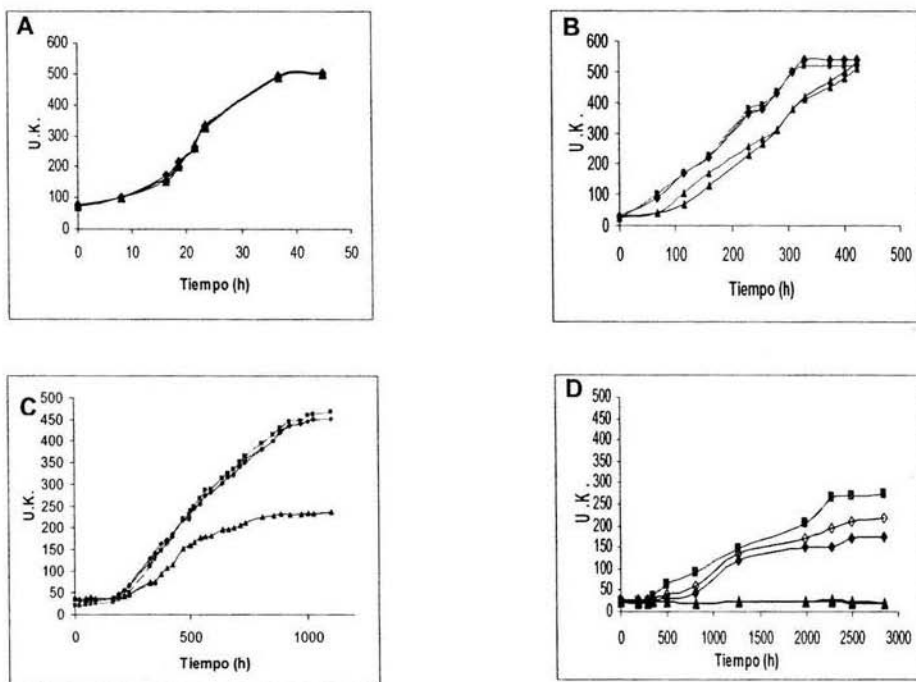


Fig.11 Efecto de la intensidad luminosa en el crecimiento fotosintético anaeróbico de las diferentes cepas. La intensidad luminosa se ajustó con un reóstato y se determinó su valor utilizando un radiómetro. A) 21 W/m², B) 6.25 W/m², C) 3.6 W/m² y D) 2 W/m². ■ wt, ▲ RG1, ▲ RG1-P, ◊ RG1-P1, ◆ RG1-P2.

Los resultados demuestran el papel de la H⁺PPasa en el crecimiento de *R. rubrum* en intensidades luminosas bajas, al grado de ser esencial en intensidades luminosas muy bajas (2 W/m²), mientras que en intensidades luminosas altas (condiciones de alto potencial), la ausencia de esta enzima no afecta a las bacterias.

A partir de las curvas de crecimiento se determinaron los tiempos de duplicación y el tiempo de duración la fase de inicio del crecimiento (lag, tiempo que tardan las bacterias en comenzar el crecimiento exponencial). En la tabla 5 se observa que a medida que la intensidad luminosa disminuye, el tiempo de duplicación de todas las cepas aumenta, debido a que la energía disponible es cada vez menor, este incremento es de la misma magnitud para todas las clonas,

a excepción de RG1 a 2 W/m^2 , intensidad luminosa a la cual no crece. Sin embargo, el efecto de la pérdida de la H^+PPasa se aprecia claramente en la duración de la fase de inicio del crecimiento (lag). En todas las cepas, la duración de la fase inicial aumenta al disminuir la intensidad luminosa, pero en el caso de RG1 este tiempo es mucho mayor, al grado que a una intensidad luminosa de 2 W/m^2 , le resulta imposible comenzar el crecimiento exponencial (por lo menos en el tiempo evaluado). Las bacterias en esta intensidad luminosa aparentemente se mantienen en una fase lag, ya que si, después de un largo período a 2 W/m^2 , son transferidas a una intensidad luminosa alta (21 W/m^2), son capaces de crecer.

Tabla 5. Efecto de la intensidad luminosa en el crecimiento fotosintético.

(W/m ²)	Tiempo de generación (h)				Duración de la fase lag (h)			
	wt	RG1	RG1-P2	RG1-P1	wt	RG1	RG1-P2	RG1-P1
21	10.8	10.8	10.8	10.8	1.5	1.5	1.5	1.5
6.25	43.2	42.3	41.3	42	12	72	12	12
3.6	172	167	160	165	192	343	192	193
2	470	∞	485	480	250	∞	375	350

Otra diferencia en el crecimiento de las cepas carentes de H^+PPasa es que en una intensidad luminosa de 3.6 W/m^2 alcanzan la fase estacionaria en menos tiempo y con menos unidades Klett que la cepa silvestre, lo que indica que la ausencia de H^+PPasa en estas condiciones limita el crecimiento (la generación de biomasa de la mutante RG1 es menor pesar de encontrarse en un medio rico en nutrientes, Fig.11).

4.2.3.1. Crecimiento en ciclos luz-oscuridad.

En la naturaleza las bacterias fotosintéticas están sometidas a la sucesión del día y la noche, por lo que se realizaron cultivos en ciclos de luz -oscuridad (12h-12h). Bajo estas condiciones y a una intensidad luminosa alta (21 W/m^2), se puede observar que todas las cepas crecen mientras están iluminadas y que dejan de hacerlo durante el periodo de oscuridad, observándose incluso una disminución en la lectura de la densidad óptica del cultivo (Fig.12 A). Nuevamente se aprecia que a esta intensidad luminosa el crecimiento de la mutante no se ve afectado con relación al de la cepa silvestre, aunque existe una diferencia significativa entre el crecimiento de todas las cepas en iluminación continua y discontinua, (ver Fig.11). Cuando se utiliza una intensidad luminosa de 3.6 W/m^2 en los ciclos de luz-oscuridad, (Fig.12 B), el efecto en la fase de inicio (lag) de la mutante RG1 es notorio. Presenta una fase de inicio de 580 h, comparada con la duración de la fase de inicio de 343 h que tienen en iluminación continua (Tabla. 5). Estos resultados indican que la H^+PPasa es importante para el crecimiento de *R. rubrum* en ciclos de luz-oscuridad, condiciones prevaletientes en su ambiente natural.

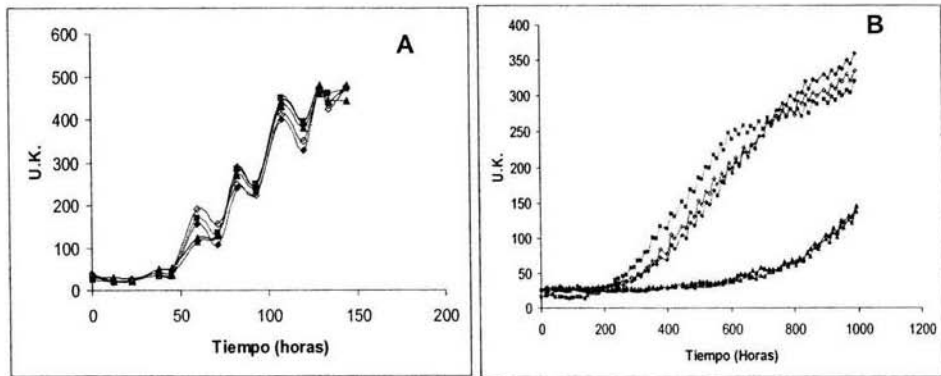


Fig.12. Curvas de crecimiento fotosintético en ciclos de luz-oscuridad. A) 21 W/m^2 , B) 3.6 W/m^2 ■ wt, ▲ RG1, ▲ RG1-P, ◇ RG1-P1, ◆ RG1-P2.

4.2.3.2. Crecimiento respiratorio a diferentes concentraciones de O₂.

En los experimentos anteriores, se demuestra la importancia de la H⁺PPasa para el crecimiento de la bacteria en condiciones de baja energía siempre relacionadas al crecimiento fotosintético-anaeróbico. Previamente se reportó, que en las membranas respiratorias de *R rubrum* también se localiza la H⁺PPasa (Romero *et al*, 1991), por lo tanto, se decidió explorar si la enzima le proporciona a la bacteria alguna ventaja para su crecimiento, en una condición de bajo potencial no inducida por la luz. Para lograr esta condición, se disminuyó la concentración de oxígeno, lo que provocaría un decremento en la concentración del aceptor final de electrones de la cadena respiratoria. Hay que hacer notar que en *R. rubrum*, las oxidasas terminales no han sido estudiadas suficientemente, sin embargo, datos reportados en la bacteria fotosintética *R. sphaeroides* indican que la expresión del gen de la citocromo oxidasa tipo aa₃ se reprime cuando la concentración de O₂ disminuye (Mouncey y Kaplan, 1998) lo que podría contribuir significativamente a la aparición del estado de bajo potencial. No obstante que la afinidad de la citocromo oxidasa de por el O₂ es muy alta, con una km para O₂ de 26 μM, en el caso de la citocromo oxidasa tipo cbb₃ de *R. palustris*. (King y Drews, 1976).

Al disminuir la concentración de oxígeno del 21% (concentración normal de la atmósfera) al 10%, el crecimiento de la cepa silvestre no se ve afectado (Fig.13), sin embargo, la mutante RG1 sufre un efecto negativo notorio. En este caso, a diferencia de los anteriores, se puede apreciar que no es la fase de inicio del crecimiento (lag) la que se ve aumentada en RG1, sino que más bien el efecto principal es en la fase exponencial, ya que la mutante crece a un ritmo mas lento, llega a la fase estacionaria antes y alcanza un menor valor de unidades Klett. Es claro, que la H⁺PPasa en estas condiciones de baja energía podría proporcionarle a la célula una fuente alterna de generación de gradiente electroquímico de H⁺.

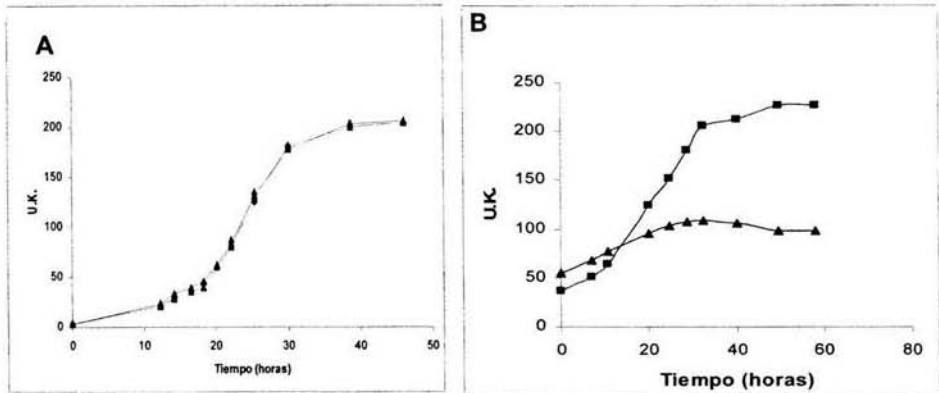


Fig.13. Curvas de crecimiento respiratorio a diferentes tensiones de O₂ A) 21% O₂, B) 10% O₂. Para reducir la concentración de O₂ se reemplazo éste inyectando nitrógeno en una incubadora. ■ wt, ▲ RG1, ▲ RG1-P, ◇ RG1-P1, ◆ RG1-P2.

4.2.4. Transiciones metabólicas.

Una característica de las bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas es que pueden vivir utilizando diferentes metabolismos. Cuando las condiciones ambientales cambian, la bacteria probablemente requiere de un periodo de adaptación al nuevo entorno, durante estas transiciones es posible que se genere una situación de bajo potencial donde la bacteria no pueda obtener energía fácilmente. Con el objetivo de saber si la H⁺PPasa pudiera ser importante durante este periodo de adaptación, se realizaron los siguientes experimentos:

a) Transición del metabolismo fotosintético a respiratorio.

Para realizar este experimento se cultivaron las bacterias en medio líquido en anaerobiosis e iluminación a una intensidad luminosa alta (21 W/m²). Para asegurar que las bacterias estuvieran perfectamente adaptadas al metabolismo fotoheterotrófico se subcultivaron previamente al experimento, por lo menos tres veces. Para realizar la transición, las bacterias adaptadas se dejaron crecer hasta la mitad de la fase exponencial de su crecimiento fotosintético y en ese momento

se transfirieron a condiciones de crecimiento aeróbico en la oscuridad. Como se puede apreciar en la Fig.14 A esta transición no afecta a ninguna de las cepas. Incluyendo a la mutante RG1, ya que prácticamente siguen creciendo al mismo ritmo al trasladarlas a las condiciones aeróbicas y sin que se aprecie algún efecto diferencial en RG1.

b) Transición del metabolismo respiratorio a fotosintético.

En este experimento se subcultivaron varias veces a las bacterias en condiciones aeróbicas en la oscuridad, de manera similar al experimento anterior, para su adaptación. Posteriormente, al llegar a mitad de la fase exponencial, se transfirieron a condiciones de crecimiento anaeróbicas en la luz (21 W/m^2). En este caso se presenta un retardo considerable de todas las cepas antes de que puedan iniciar el crecimiento fotoheterotrófico exponencial (Fig.14 B). La duración de esta nueva fase de inicio es mayor en el caso de la mutante RG1 (40 h) con respecto al de las cepas que poseen H⁺PPasa (14 h). Además las cepas con H⁺PPasa comienzan antes la nueva fase de crecimiento exponencial, lo hacen con un tiempo de duplicación menor (10.5 vs. 12 horas) que las clonas que no poseen H⁺PPasa (comparar las pendientes en la parte que corresponde a la nueva fase exponencial). Lo que indica que en este tipo de transición, la H⁺PPasa es muy importante para reducir el tiempo en que las bacterias se adaptan a las nuevas condiciones de crecimiento.

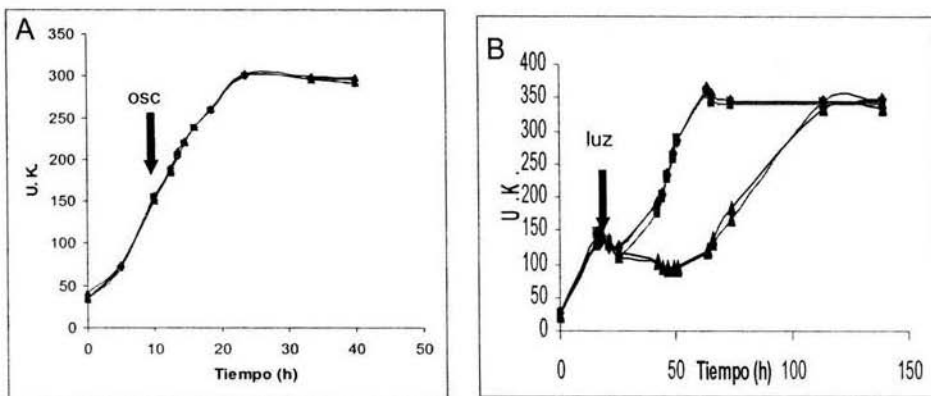


Fig.14 Transiciones de un tipo de metabolismo a otro. A) De fotosíntesis a respiración. 25 ml de cultivo fotosintético se transfirieron a matraces con capacidad de 250 ml y se agitaron a 250 rpm. En oscuridad. B) De respiración a fotosíntesis. 10 ml de cultivo respiratorio se transfirieron a tubos de ensaye en condiciones aeróbicas y con luz. En el caso de las condiciones fotosintéticas se uso una intensidad luminosa de 21 W/m². ■ wt, ▲ RG1, ▲ RG1-P, ◇ RG1-P1, ◆ RG1-P2.

4.3. Crecimiento de diversas especies de bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas en intensidades luminosas bajas.

Dentro de la familia de las bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas, existen especies con y sin H⁺PPasa. En el caso de *R. rubrum* la presencia de la enzima es importante para su crecimiento en condiciones de bajo potencial (fotosintéticas o aeróbicas) y esencial en intensidades luminosas bajas, por lo tanto, surge la pregunta ¿las especies que carecen de la enzima naturalmente son incapaces de crecer en estas condiciones?. Para determinar esto, se realizaron curvas de crecimiento en iluminación muy baja (2 W/m²) utilizando diversas especies con (*Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum fulvum*, *Rhodospila globiformis*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodomicrobium vanielli*) y sin (*Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodobacter capsulatus*) H⁺PPasa respectivamente. La Fig.15 muestra que, únicamente aquellas especies que poseen H⁺PPasa fueron capaces de crecer en la intensidad luminosa muy baja, aunque son capaces de crecer en intensidad luminosa de 21 W/m² (datos no mostrados) lo que abre la posibilidad de que la presencia de la enzima sea un factor

determinante dentro de las especies de esta familia bacteriana para su crecimiento fotosintético en intensidades luminosas muy bajas.

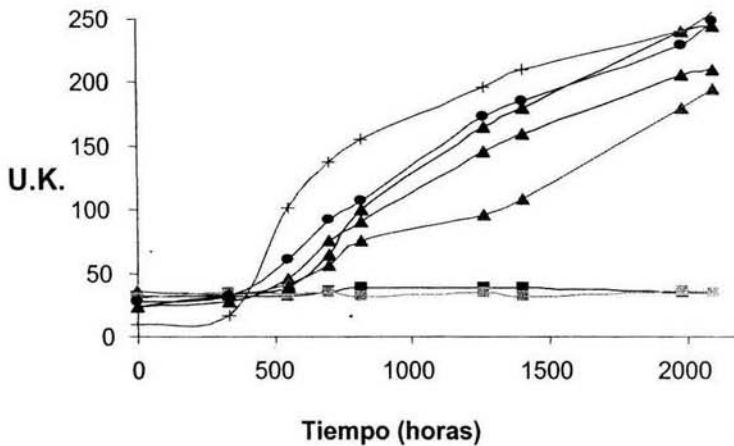


Fig.15. Curvas de crecimiento de diferentes especies de bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas a intensidad luminosa de 2 W/m². Especies con H⁺PPasa: ▲ *Rhodospirillum rubrum*, + *Rhodospirillum fulvum*, ● *Rhodopila globiformis*, ▲ *Rhodopseudomonas palustris* y ▲ *Rhodomicrobium vanielli*. Especies sin H⁺PPasa: ■ *Rhodobacter sphaeroides* y ■ *Rhodobacter capsulatus*.

Una manera alternativa de estudiar este fenómeno es introducir el gen *hpp* a una bacteria fotosintética que no la tenga y determinar si esta enzima es capaz de conferir la capacidad de crecer en intensidades luminosas muy bajas. Para ello el plásmido pBBR1-Hpp-Rp se transfirió *R. sphaeroides* (García-Contreras, 2002), sin embargo, aunque la actividad de hidrólisis de PPi que se obtiene de esta expresión heteróloga en *R. sphaeroides* es del 20% con respecto a la obtenida en cromatóforos de *R. palustris*, la cepa fue incapaz de crecer a una intensidad de 2 W/m², no obstante, es interesante que en intensidades luminosas más altas (3.6 y 6.25 W/m²) la introducción de la H⁺PPasa le confiere a *R. sphaeroides* la capacidad de tolerar una concentración mayor de gentamicina que la cepa que contiene únicamente al vector (datos no mostrados).

5. DISCUSIÓN.

En este trabajo se clonó en gen *hpp* de *Rhodospirillum rubrum* que codifica para la H⁺PPasa, posteriormente se realizó la construcción y caracterización de una mutante H⁺PPasa⁻ de *R. rubrum*. La mutante creció de la misma manera que la cepa wt en condiciones medio de cultivo rico, anaerobiosis, iluminación alta y continua, temperatura constante de 30 °C, etc. Indicando que la H⁺PPasa no es esencial, a diferencia de la PPasa citosólica. Sin embargo, en condiciones donde la energía es limitada, esta enzima resulta de gran importancia para la proliferación de la bacteria, estas condiciones son más parecidas a las de su medio ambiente natural (Fig.12),

La mutante RG1 obtenida mediante la interrupción del gen, se caracterizó, tanto molecular como bioquímicamente y resultó de gran utilidad para estudiar el papel fisiológico de la H⁺PPasa en la bacteria fotosintética *R. rubrum*. El gen *hpp* es muy importante para que las bacterias inicien la fase de crecimiento exponencial, como se puede observar en el crecimiento en intensidades luminosas bajas (2 - 6.25 W/m²) (Fig.11 B-D) y en la transición de metabolismo aeróbico a fotosintético-anaeróbico (Fig.14 B). A medida que la disponibilidad de la energía disminuye, la importancia de la enzima se vuelve más evidente, a tal grado que llega a ser esencial cuando esta es muy escasa, como ocurre durante el crecimiento en intensidades luminosas muy bajas (2 W/m², Fig.11 D) donde solamente la cepa silvestre y las complementadas son capaces de crecer. Cabe mencionar que cuando las condiciones experimentales se aproximan a las del ambiente natural de la bacteria, (anaerobiosis, intensidad luminosa baja y ciclos de luz-oscuridad), la enzima se vuelve un factor muy importante para el crecimiento de *R. rubrum* (Fig. 12).

En el caso de la transición del metabolismo fotosintético a respiratorio (Fig.14 A) la H⁺PPasa no es importante en la adaptación al cambio en el metabolismo. Esto puede explicarse porque prácticamente todos los componentes, así como la maquinaria enzimática necesaria para que las bacterias puedan obtener energía quimioheterotróficamente, se encuentran presentes en las bacterias que crecen en

el metabolismo fotoheterotrófico, por ejemplo, algunos de los componentes de la cadena de transporte de electrones fotosintética y respiratoria son los mismos, como el complejo bc₁ y el citocromo c (Pfenning, 1978), las enzimas denominadas complejo I y II (NADH y succinato deshidrogenasas) (Pfenning, 1978), utilizados para la respiración, también se encuentran presentes durante el crecimiento fotosintético y el único componente que faltaría para poder obtener energía en condiciones aeróbicas sería una oxidasa terminal. Por consiguiente, y como se observa en los resultados obtenidos (Fig.14 A), la bacteria nunca se encontraría en una situación de bajo potencial, además, hay que tomar en cuenta que al aumentar la concentración de O₂, de acuerdo a (López-Marqués *et al*, 2004) los niveles de H⁺PPasa disminuirían drásticamente por lo que esta enzima en aerobiosis, podría no tener relevancia fisiológica para las bacterias.

Cuando analizamos la transición del metabolismo aeróbico al fotosintético-anaeróbico, se observa que las bacterias tardan en adaptarse a las nuevas condiciones, antes de iniciar el crecimiento y la ausencia de la H⁺PPasa aumenta la duración de este periodo (Fig.14 B). En este caso, la bacteria tiene que sintetizar muchos componentes esenciales para el crecimiento fotoheterotrófico que no están presentes cuando crecen aeróbicamente, como son los pigmentos que captan la luz, el centro de reacción bacteriano, los complejos cosechadores de luz, los cromatóforos (invaginaciones de la membrana fotosintética) (Pierson y Castenholz, 1978; Golecki y Oelze, 1975) e incluso la misma H⁺PPasa, ya que la expresión del gen *hpp* se ve inducida al pasar del crecimiento aeróbico a anaerobiosis, (López-Marqués *et al*, 2004). De tal manera, que en el momento de la transición y durante el tiempo que la bacteria tarda en sintetizarlos, es probable que se genere un estado transitorio de baja energía (bajo potencial); en donde la generación de gradiente electroquímico de H⁺ por la H⁺PPasa sería útil para obtener energía en forma de ATP y así poder acelerar la síntesis de estos componentes y concomitantemente disminuir el tiempo de retardo para que las bacterias inicien el crecimiento exponencial.

Finalmente, cuando la condición de bajo potencial se genera al disminuir la concentración de O₂ (Fig.13 B), también es importante la presencia de la H⁺PPasa

para el crecimiento adecuado de estas bacterias. Recientemente (López-Marqués *et al*, 2004), estudiaron la regulación de la H⁺PPasa y de la PPasa citoplásmica de *R. rubrum* en diferentes tipos de metabolismo, determinando los niveles de transcrito de los genes, la cantidad de proteína y la actividad específica de ambas enzimas. Ellos encuentran que estas enzimas parecen regularse de manera muy diferente, tanto en el patrón temporal de expresión, como en los niveles de la actividad, en las diferentes condiciones metabólicas. Por ejemplo, la expresión de la PPasa citoplásmica en las diferentes condiciones de crecimiento (aeróbicas, anaeróbicas, fotosintéticas, respiratorias y fermentativas) se da de manera constitutiva, mientras que la H⁺PPasa se expresa preferencialmente en condiciones de anaerobiosis, lo que probablemente se deba a que la expresión del gen *hpp* esté controlado por las proteínas reguladoras FNR (que responde directamente a los niveles de O₂, induciendo la transcripción de genes que se requieren en anaerobiosis), así como el sistema de dos componentes RegB/RegA (que controla la expresión de varios genes, entre ellos los requeridos para el metabolismo fotosintético de *R. capsulatus* y *R. sphaeroides*, haciendo que la transcripción de estos aumente cuando la concentración de O₂ disminuye).

Además, otro aspecto importante en la regulación de la expresión del gen *hpp* es que cuando las bacterias se crecen quimioheterotróficamente, y se le añade al medio 1M de NaCl, el transcrito del gen de la H⁺PPasa aumenta dramáticamente, transcribiéndose a partir de dos promotores en tandem distintos a los que se utilizan para la transcripción del gen *hpp* en anaerobiosis, los cuales poseen sitios de unión para factores σ involucrados con estrés (López-Marqués *et al*, 2004); lo que sugiere que la enzima le confiere una ventaja a la bacteria durante el estrés salino. La exposición de estas bacterias a niveles tan elevados de NaCl en la naturaleza es poco probable, no obstante es muy importante el hecho de que los niveles y actividad de esta enzima pueden responder a las condiciones medioambientales y específicamente a un tipo de estrés. Por otra parte, los resultados del presente trabajo, utilizando una mutante carente de la H⁺PPasa, muestran que la enzima es importante para *R. rubrum* en situaciones de estrés provocadas por la limitación de energía, acortando la duración de la fase de

inicio del crecimiento (lag) y/o permitiéndole a la bacteria crecer en condiciones de bajo potencial (García-Contreras *et al*, 2004). Tomando en cuenta que el medio ambiente en el que vive *R. rubrum* es cambiante, que la bacteria está expuesta a situaciones de estrés y que tanto la concentración de oxígeno como la disponibilidad de luz pueden variar, (lo que induciría cambios en los niveles de expresión del gen *hpp* (López-Marqués *et al*, 2004)), esta proteína podría ser de importancia vital para la supervivencia de la bacteria en la naturaleza, más aún, si se toma en cuenta que el aprovechamiento de los nutrientes para la generación de biomasa se ve disminuido en la mutante RG1 en intensidades luminosas intermedias como 3.6 W/m^2 donde esta es capaz de replicarse (Fig.11 C). La determinación de la expresión del gen *hpp* y del gen de la PPasa citoplásmica, axial como de la actividad de las enzimas en nuestras condiciones experimentales nos ayudaría a comprender de mejor manera el papel de esta enzima en el metabolismo de *R. rubrum*; ya que no se puede descartar una regulación de estos factores dependiendo por ejemplo de la intensidad luminosa o la fase de crecimiento. Tal y como sucede en respuesta a la concentración de O_2 , (López-Marqués *et al*, 2004), axial pues, por poner un ejemplo, los niveles de *hpp* y la actividad de H^+ PPasa probablemente estén disminuidos en los cultivos que crecen aeróbicamente (con los niveles mas bajos cuando la concentración de O_2 es alta) y cambien drásticamente en los experimentos de las transiciones metabólicas.

En cuanto al mecanismo que explicaría cómo la enzima puede ayudar a la célula a crecer en las condiciones de bajo potencial, nosotros proponemos que: en condiciones de muy baja energía, que pueden presentarse porque las cadenas de transporte de electrones fotosintética y respiratoria no funcionan a su máxima capacidad, o bien porque la concentración de ATP no es suficiente para sustentar el metabolismo celular (baja producción o alto consumo), la H^+ PPasa funcionaría en el sentido hidrolítico, proporcionando un gradiente electroquímico de H^+ que permitiría compensar estas deficiencias y utilizarse, entre otras cosas, para sintetizar ATP (Fig.16). (Nyrén y Strid, 1991) habían propuesto este mecanismo para explicar el papel de la enzima de *R. rubrum* en condiciones de bajo potencial impuesto al disminuir la intensidad luminosa. Al hidrolizar PPi , la enzima

cooperaría para disminuir la concentración de este metabolito y por ende favorecería el funcionamiento de las reacciones biosintéticas al evitar que el equilibrio termodinámico de estas reacciones se alcance.

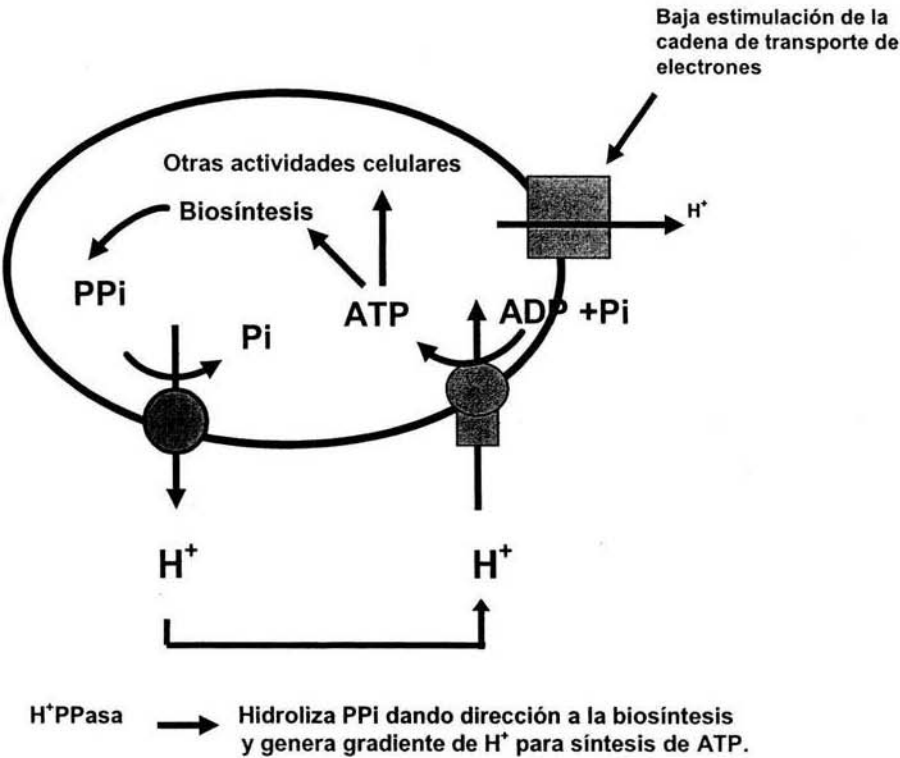


Fig.16. Posible mecanismo mediante el cual la H⁺PPasa de *R. rubrum* puede ejercer su efecto en el metabolismo de la bacteria, en condiciones de bajo potencial.

Aunque no existe ninguna evidencia experimental directa que demuestre que los efectos observados en la mutante RG1, durante el crecimiento en condiciones de baja energía, se deben a la pérdida de la actividad hidrolítica de PPI y a la falta de un gradiente electroquímico de H⁺ generado por la H⁺PPasa, esta razón parece ser la más probable, tomando como base los antecedentes acerca de H⁺PPasas

de *R. rubrum* y de otros organismos (Baltscheffsky, 1967a y 1968; Baltscheffsky y Nyrén, 1984; Nyrén y Strid, 1991, Maeshima 2000). Aunque la enzima de *R. rubrum* sea capaz de sintetizar PPI aprovechando el gradiente de H^+ , (actividad que al menos las H^+ PPasas vacuolares no pueden realizar *in vitro*), la síntesis de este metabolito podría llevarse a cabo únicamente en condiciones donde la estimulación de la cadena de transporte de electrones fuera suficiente como para producir un gradiente de H^+ significativo, en estos casos la H^+ PPasa contribuiría a la producción y mantenimiento de la poza intracelular de PPI. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que, de acuerdo con los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas de síntesis e hidrólisis de PPI, la ruptura de PPI tendría una eficiencia catalítica 2 ordenes de magnitud mayor que la de su síntesis; ya que la velocidad máxima para la síntesis y la hidrólisis de PPI por la H^+ PPasa de *R. rubrum* es de: 1.2 y 12 μM de PPI min^{-1} μmol de bacterioclorofila $^{-1}$ sintetizado o hidrolizado respectivamente; mientras que las constantes de disociación para los diferentes sustratos son, para la hidrólisis 65 μM de PPI y para la síntesis 600 μM de Pi (Nyrén y Strid, 1991). Por otra parte, no hay que olvidar que la síntesis es dependiente de la existencia de un gradiente de H^+ , por lo que esta actividad, en las condiciones de crecimiento reales de la bacteria (bajo potencial), podría resultar poco significativa. Para detallar un poco más el mecanismo mediante el cual la H^+ PPasa de *R. rubrum* es capaz de ejercer sus efectos fisiológicos, se podría diseñar una mutante puntual de la H^+ PPasa, como la reportada por (Zhen *et al*, 1997) en la H^+ PPasa vacuolar que esta afectada principalmente en la actividad de bombeo de H^+ (95% de la actividad se pierde) y que conserva alrededor del 50% de la hidrólisis de PPI. Este tipo de mutante resultaría muy útil para determinar si la generación del gradiente de H^+ es lo que le confiere a la bacteria la posibilidad de crecer en condiciones de bajo potencial, o bien si la hidrólisis por sí sola es la que juega el papel más importante.

Por otra parte, el hecho de que sólo las especies de bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas que presentan H^+ PPasa pueden crecer en iluminación muy baja (2 W/m^2 , Fig. 15), podría significar que esta enzima es un requerimiento esencial y general dentro de este grupo de bacterias para permitir la adaptación al

crecimiento en intensidades luminosas bajas. Esto podría verse reflejado en diferencias en los habitats de estas bacterias, las especies con H⁺PPasa, podrían proliferar en condiciones donde la intensidad luminosa fuera mas baja que la mínima necesaria para el crecimiento de las especies que carecen de la enzima. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que lo que determine el crecimiento en un nicho específico sean otros factores, como el tipo de PPasa citoplásmica o diferencias en el aparato fotosintético y/o en las unidades cosechadoras de luz. Para validar la posibilidad de que la H⁺PPasa sea un factor importante para la adaptación al crecimiento en intensidades luminosas bajas, a nivel de este grupo de bacterias, es necesario realizar otros experimentos, como probar el crecimiento en condiciones de bajo potencial de un mayor número de especies, generar mutantes H⁺PPasa⁻ en otras especies, expresión de la H⁺PPasa en especies que no la posean naturalmente (como es el caso de la introducción del gen *hpp* de *R. palustris* a *R. sphaeroides*, en donde debido a que la expresión heteróloga de esta enzima es baja, no podemos estar seguros de que con una mayor nivel de actividad de esta enzima se le logre conferir a *R. sphaeroides* la capacidad de crecer a intensidades luminosas bajas).

Además de la correlación descrita anteriormente (presencia de H⁺PPasa y crecimiento en intensidades luminosas muy bajas), se ha encontrado que aquellas especies que poseen H⁺PPasa tienen una PPasa citoplásmica de la familia I (Romero *et al*, 2003), mientras que aquellas que carecen de la enzima membranal, poseen una PPasa citoplásmica de familia II (Celis *et al*, 2003). A pesar de que ambas clases de PPasas solubles funcionan hidrolizando al PPI intracelular, estas familias no son homólogas y son muy diferentes entre si. Por un lado, a nivel de la secuencias nucleotídica y peptídica, carecen de homología, mientras que a niveles estructural y bioquímico presentan muchas diferencias, como el estado de agregación, la actividad específica, el requerimiento de cationes, la sensibilidad a inhibidores naturales como algunos intermediarios del ciclo de Calvin y artificiales como el fluoruro, o a los análogos de sustrato (Merckel *et al*, 2001; Young *et al*, 1998), lo que podría indicar una diferente regulación de estas enzimas *in vivo*. De manera que las bacterias que poseen PPasa citoplásmica de la familia I tendrían

que regular estrictamente a esta enzima para dejarle suficiente sustrato a la H^+PPasa cuando funcione de manera hidrolítica, (este es uno de los puntos mas cuestionados de la hipótesis de (Nyrén y Strid, 1991). En cambio, en las bacterias que poseen PPasa citoplásmica de familia II no se necesitaría una regulación muy precisa de la enzima, esto quizá se ve reflejado en su mayor actividad específica, así como en la insensibilidad a inhibidores que afectan la actividad de la PPasa de familia I. Es probable que estas diferencias en la regulación tengan que ver con el hecho de que solo las PPasas solubles de Familia I coexisten con las $H^+PPasas$ en las bacterias las poseen. Una forma para dilucidar si esta correlación tiene relevancia fisiológica sería intercambiar la PPasa soluble de *R. rubrum* por una de la familia II y estudiar el comportamiento de esta quimera.

Recientemente el grupo de Docampo (Seufferheld *et al*, 2004) reportó que la H^+PPasa de *R. rubrum*, además de estar presente en la membrana plasmática, se localiza en unas vesículas intracelulares llamadas acidocalcisomas. Esta información abre la posibilidad de que parte de su papel en la fisiología bacteriana sea acidificar el interior de estos "organelos" (Fig. 17 B), de manera que la mutante H^+PPasa^- no podría llevar a cabo esta función, a menos de que, al igual que en las vacuolas, coexistiera con una V-ATPasa bombeadora de H^+ (Fig.17 C). Ahora bien, en condiciones de bajo potencial, donde la disponibilidad de ATP estaría disminuida, la bomba dependiente de ATP no funcionaría y la H^+PPasa se convertiría en la principal bomba acidificadora del acidocalcisoma (Fig.17 E). El hecho de que en condiciones de alta energía tanto la mutante RG1 como la cepa silvestre tienen el mismo patrón de crecimiento, podría deberse a dos posibilidades, que la H^+PPasa sea la única bomba que acidifique el interior de los acidocalcisomas y que en alta luz este proceso no fuera importante para la célula, o bien que la $H^+ATPasa$ u otra bomba capaz de internalizar H^+ , pudiera sustituir a la H^+PPasa y llevar a cabo la acidificación del acidocalcisoma (Fig.17 D). Si este fuera el caso (coexistencia de ambas enzimas), no se podría descartar que parte

Condiciones de alta energía

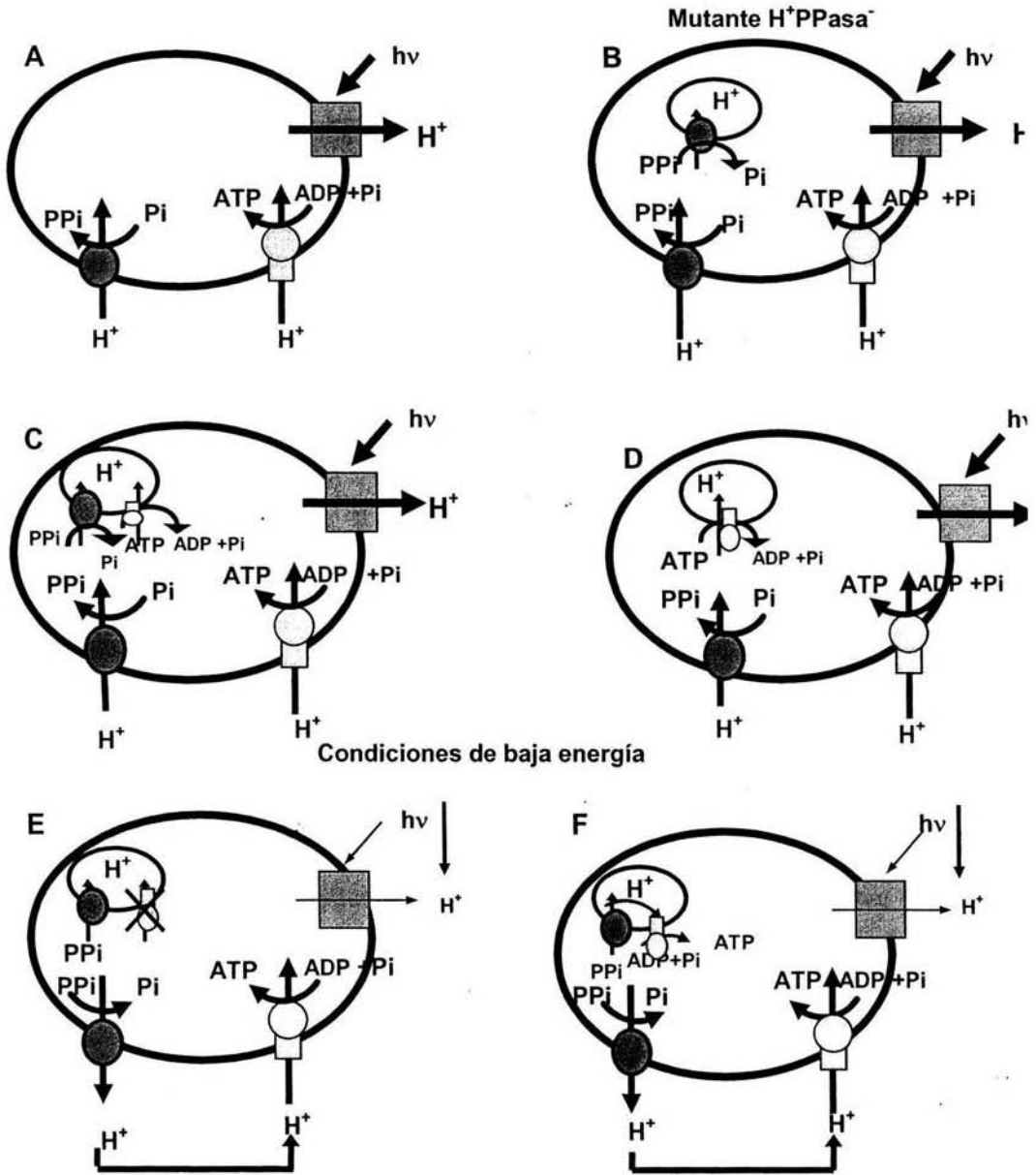


Fig.17. Los acidocalcisomas de *Rhodospirillum rubrum* y la H⁺PPase. A. Ubicación exclusiva de la H⁺PPase en la membrana plasmática, B) Ubicación de la H⁺PPase tanto en la membrana plasmática como en los acidocalcisomas, C) coexistencia de la H⁺PPase y una V-ATPase bombeadora de H⁺ en las membranas de los acidocalcisomas, D) En la mutante H⁺PPase⁻ la ATPase podría llevar a cabo la acidificación de los acidocalcisomas, E) En condiciones de bajo potencial, la H⁺PPase sería la principal bomba de H⁺ acidificadora de los acidocalcisomas, F) En condiciones de bajo potencial, la hidrólisis de PPI en los acidocalcisomas podría proporcionar la energía para la síntesis del ATP. « Cadena fotosintética de transporte de electrones, ● H⁺PPase, ◻ V-H⁺ATPase.

de la energía proveniente de la hidrólisis de PPi fuera utilizada para la síntesis de ATP (Fig.17 F), lo que en bajo potencial sería un aporte energético importante, tal como lo plantearon Nyrén y Strid, (1991) que en su momento se desconocía tanto la existencia de acidocalcisomas en *R. rubrum* como la presencia de la H⁺PPasa en las membranas de estos organelos.

Sin embargo, todas estas posibilidades son especulaciones y faltan evidencias experimentales, como la determinación de la actividad de la H⁺PPasa del acidocalcisoma, su capacidad de bombeo de H⁺ y su contribución (en comparación con la H⁺PPasa de la membrana plasmática) al metabolismo del PPi, para poder determinar su papel real en la bacteria. Así como determinar la presencia de una H⁺ATPasa u otra bomba capaz de internalizar H⁺ en el acidocalcisoma.

Para analizar con más detalle el papel de la H⁺PPasa de *R. rubrum* es necesario correlacionar los cambios en las concentraciones del PPi y otros compuestos fosforilados con la actividad *in vivo* de las enzimas que metabolizan al PPi en las diferentes condiciones experimentales, tanto en la cepa silvestre como en la mutante.

5.1. Una visión general de la función fisiológica de las H⁺PPasas.

Actualmente se considera que el papel fisiológico de las H⁺PPasas de plantas es hidrolizar al PPi y bombear H⁺ al interior de las vacuolas para acidificar el medio y generar un gradiente que permita el transporte activo secundario de moléculas. En este modelo se ha estudiado tanto la regulación de la expresión del gen de la H⁺PPasa como su actividad, en diferentes condiciones de crecimiento de las plantas (Maeshima, 2000). Se sabe que en los tonoplastos de tejidos en crecimiento tanto la cantidad como la actividad de la H⁺PPasa es mucho mayor que en los tejidos maduros, lo cual correlaciona con un aumento de la transcripción del gen. Así, en la mayoría de los tejidos jóvenes, la H⁺PPasa constituye la principal bomba de H⁺ de las membranas vacuolares, pero a medida que se desarrolla el tejido, la concentración de ésta disminuye, al mismo tiempo

que la de la H⁺ATPasa vacuolar aumenta hasta convertirse en la principal bomba de H⁺ de los tejidos maduros.

La interpretación que se le ha dado a este hecho es que cuando la planta es joven, la H⁺PPasa vacuolar hidroliza el PPi del citosol (que proviene de la biosíntesis de ácidos nucleicos, proteínas, celulosa y otras biomoléculas), utilizándolo como una fuente de energía para el transporte activo de H⁺ hacia el interior de las vacuolas en expansión, de esta manera, las plantas mantienen su crecimiento activo. Una vez que la planta ha madurado, la actividad biosintética disminuye y el PPi deja de producirse en grandes cantidades; la tasa de transporte de solutos al interior de la vacuola también desciende y la expansión de las vacuolas termina; asimismo, la cantidad de ATP disponible aumenta (al no tener que ser utilizado para la biosíntesis), lo que correlaciona con el hecho de que la actividad de H⁺PPasa se reduzca mientras que la de la H⁺ATPasa vacuolar aumente en los tejidos vegetales maduros (Fig.18) (Nakanishi y Maeshima,1998; Maeshima,1990; Shiratake *et al*,1997).

Por otra parte, la concentración de la H⁺PPasa vacuolar en plantas se ve aumentada bajo condiciones de estrés (Colombo y Cerana, 1993). Por ejemplo, se ha reportado que en las plantas cultivadas en condiciones limitadas de nutrientes minerales como: K⁺, NO₃⁻ y Ca²⁺, tanto la actividad de hidrólisis de PPi como el bombeo de H⁺ dependiente de PPi, se incrementan tres veces con respecto a los niveles observados en plantas cultivadas en condiciones normales. Sin embargo, en este caso, el aumento en la actividad no correlaciona con un aumento en la cantidad de enzima, por lo que debe de tratarse de una activación postraduccional, la cual se ha sugerido que posiblemente esté modulada por Ca²⁺ o citocinasa (Kasai *et al*, 1998).

Otra condición de estrés que se ha estudiado es la anoxia, en donde se ha observado un incremento de 75 veces en la actividad de la H⁺PPasa vacuolar después de 6 días de tratamiento. A medida que estas células vuelven a oxigenarse, la H⁺PPasa vacuolar recupera sus niveles originales. Debido a que la actividad de la H⁺ATPasa vacuolar no se ve modificada, se ha propuesto que la H⁺PPasa pudiera estar remplazando a la ATPasa en esta condición, para

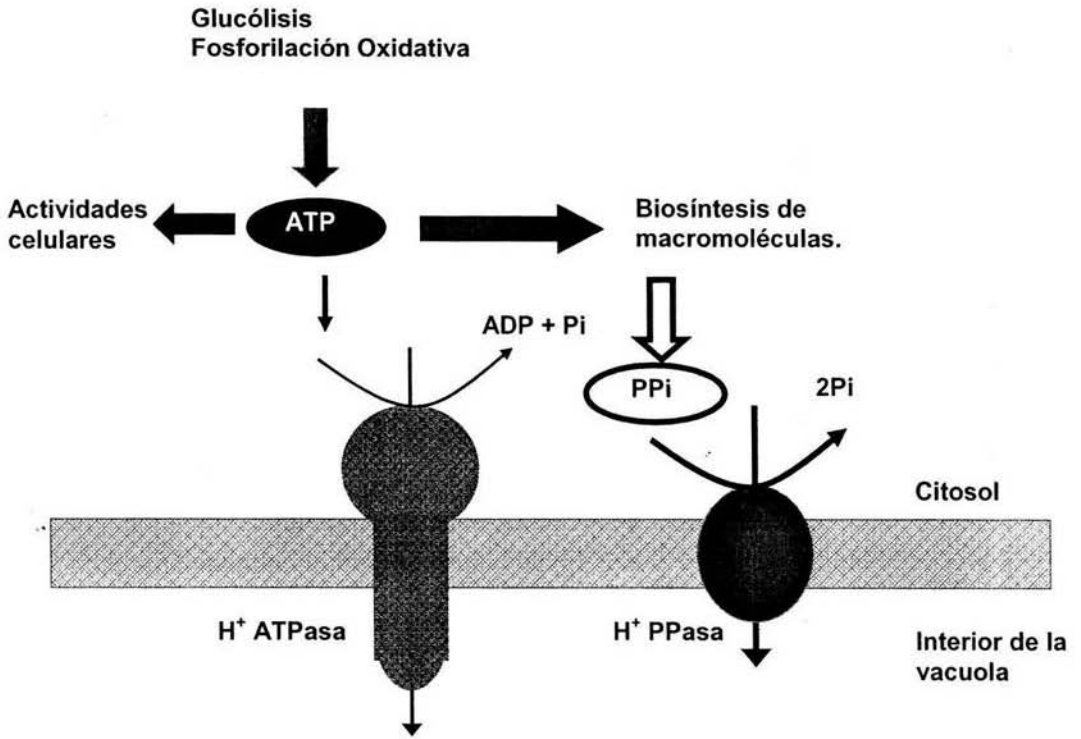


Fig.18. Papel de las H⁺PPasas en el crecimiento de los tejidos vegetales. En los tejidos en desarrollo, el ATP se utiliza principalmente para la biosíntesis de macromoléculas y para las funciones celulares, por lo que la hidrólisis del PPI es la fuente principal para la acidificación de las vacuolas. En tejidos maduros la producción de PPI intracelular disminuye, concomitantemente con la cantidad y actividad de la H⁺PPasa (ver el texto).

mantener la acidez de la vacuola, debido a que durante la anoxia la concentración de ATP disminuye y probablemente éste tiene que ser utilizado primordialmente para otras funciones celulares (Carystinos *et al*, 1995; Rea y Poole, 1993). Finalmente, se ha estudiado el efecto de la exposición de las plantas a bajas temperaturas, observándose que durante el estrés por frío, la actividad de H⁺PPasa se incrementa alrededor de 2 veces en hipocotilos de frijol mungo expuestos a bajas temperaturas (4 °C), mientras que la actividad de la H⁺ATPasa vacuolar permanece constante. Se piensa que este incremento se presenta porque ocurre un cambio de metabolismo respiratorio a fermentativo en los

hipocotilos, y por ende la generación de ATP se ve disminuida y nuevamente la célula hace uso de la hidrólisis del PPI para compensar la carencia de este metabolito (Darley *et al*, 1995; Maeshima, 2000).

Sin embargo, a pesar de que se sabe tanto acerca de la función y de la regulación de estas enzimas en el modelo vegetal, sólo recientemente se demostró que las H⁺PPasas tanto de plantas como bacterianas, son capaces de hidrolizar PPI *in vivo* e incluso sustituir la función de la PPasa soluble esencial en levadura (Pérez-Castiñeira *et al*, 2002a). Esto se demostró en levaduras, a través de la generación de una mutante condicional de la PPasa citoplásmica, en la que primero se introdujo un plásmido con el gen de la PPasa citoplásmica expresado bajo un promotor que se activa sólo en presencia de galactosa y posteriormente se interrumpió el gen cromosómico de la PPasa soluble, quedando solo la copia plasmídica. De acuerdo a lo esperado, las levaduras solo pudieron crecer en presencia de galactosa, es decir cuando se expresaba la PPasa (lo que confirmaba que la PPasa soluble es esencial); cuando se complementó esta mutante con la H⁺PPasa vacuolar de *Arabidopsis thaliana* o con la de la bacteria fotosintética *Chloroflexus aurantiacus*, las levaduras recuperaron el crecimiento en ausencia de galactosa, lo que demuestra que tanto las H⁺PPasas de plantas (que *in vitro* solamente funcionan hidrolíticamente), como las de bacterias pueden funcionar hidrolíticamente *in vivo*, removiendo el PPI del citosol, lo que le permite a la levadura crecer.

En cuanto a la función y regulación de las H⁺PPasas de bacterias hay un ejemplo que merece ser resaltado es el de la bacteria *Syntrophus gentianae*, en cuya membrana plasmática se ha encontrado también actividad de "H⁺PPasa"; sin embargo, no se puede afirmar que se trate de una H⁺PPasa con homología a las ya conocidas, ya que no se tiene el gen. Esta enzima, al igual que la de *R. rubrum*, es capaz de sintetizar y de hidrolizar PPI de una manera acoplada al gradiente electroquímico de H⁺ y además utiliza este gradiente para sintetizar ATP; la particularidad de este organismo es que su metabolismo está basado en la degradación de alcoholes, ácidos grasos, benzoato y otros compuestos aromáticos a metano y CO₂, y se encuentra en asociación estricta con bacterias

metanógenas. Sin embargo, debido a que, para iniciar la degradación de los sustratos debe de activarlos primero, pegándoles un ATP y liberando PPI, la energía que pueden obtener con estas reacciones es muy escasa (menos de un ATP por reacción), con una ganancia que va de 1/3 a 2/3 de ATP/ molécula de sustrato degradado. De tal manera que el PPI liberado en la reacción de activación es aprovechado por su H⁺PPasa de membrana, produciendo un gradiente de H⁺ que puede ser utilizado para sintetizar ATP, con lo que se recupera alrededor de 1/3 de la energía de cada ATP (Schöcke y Schink, 1998). Este ejemplo es representativo de un organismo que solo puede vivir en la naturaleza en condiciones de bajo potencial y que utiliza la hidrólisis de PPI por una H⁺PPasa como una parte fundamental en la obtención de su energía. Este es hasta el momento, el único ejemplo conocido de este tipo de enzimas en bacterias quimiótroficas-anaeróbicas.

En cuanto a las bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas, el trabajo de (López-Marqués *et al*, 2004), muestra que el gen *hpp* de *R. rubrum* se puede expresar diferencialmente de acuerdo a las condiciones del medio ambiente, relacionadas con la concentración de O₂, así como en situaciones de estrés salino. Así mismo, los resultados de el presente trabajo, evidencian la importancia de la H⁺PPasa en el crecimiento de *R. rubrum* en condiciones de crecimiento de baja energía, lo que complementándose con lo que se sabe acerca de la expresión del gen, indica que esta enzima juega un papel fundamental en el crecimiento y resistencia a estrés de las bacterias fotosintéticas en su medio ambiente.

Gracias a la continua publicación de genomas de diferentes organismos, se ha encontrado la presencia de H⁺PPasas en una gran cantidad de organismos de diversos phyla (Serrano *et al*, 2004), lo que indica que estas enzimas parecen tener una distribución más amplia de lo que se pensaba.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo y los antecedentes acerca de la función de estas enzimas en el metabolismo de las plantas y otras bacterias, apuntan en la dirección de una bioenergética de estrés basada en el PPI, que podrían constituir una estrategia importante de los organismos para la conservación, obtención de energía y resistencia a diferentes situaciones de

estrés, lo que amplía el concepto de la utilización e importancia de este compuesto de alta energía, anteriormente catalogado como un subproducto del metabolismo celular.

6. BIBLIOGRAFIA.

- Baccarini, A. y 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 energy in photosynthetic and respiratory electron transport phosphorylation system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28: 270-
- Baltscheffsky, M. (1968) Inorganic pyrophosphatase as energy donor in photosynthetic and respiratory structures. En: *Regulatory functions of biological membranes* (J. JRNAefelt, 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 Nyrén, P. (1984) The synthesis and utilization of inorganic pyrophosphate. En: *Bioenergetics* (Ed. L. Ernster) pp 187-206, Elsevier, Amsterdam.

- Baltischefsky, M., Nadanaciva, S. y Schultz, A. (1998) A pyrophosphate synthase gene: molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1364:301-306.
- Baykov, A.A., Cooperman, B.S., Goldman, A. y Lathi, R. (1999) Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 23:127-50.
- Belogurov, G.A. y Lahti, R. (2002) A lysine substitute for K⁺. A460K mutation eliminates K⁺ dependence in H⁺-pyrophosphatase of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *J. Biol. Chem.* 277:49651-49654.
- 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. (1997) The ATP synthase a splendid molecular machine. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 717-749.
- Bradford, M.M. (1976) A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle for protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Carystinos, G.D.; MacDonald, H.R., Monroy, A.F., Dhindsa, R.S. y Poole, R.J. (1995) Vacuolar H (+)-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant. Physiol.* 108:641-649.
- 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.
- Celis, H., Escobedo, S. y Romero, I. (1998) Triphenyltin as an inhibitor of the membrana-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 358:157-163.

- Celis, H, Franco, B, Escobedo, S y Romero, I. (2003) *Rhodobacter sphaeroides* has a family II pyrophosphatase: comparison with other species of photosynthetic bacteria. Arch. Microbiol. 179:368-76.
- Chen, J., Brevet, A., Fromant, M., Leveque, F., Schmitter, J.M., Blanquet, S., y Plateau, P. (1990) Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172:5686-5689.
- Pfenning, N. General physiology and ecology of photosynthetic bacteria (1978) The photosynthetic bacteria. (Editores: Clayton, R.K y Sistrom, W.R). p.p: 3-14. Plenum press New york and London.
- 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.
- Colombo, R. y Cerana, R. (1993) Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatase in NaCl-grown cells of *Daucus carota*. J. Plant. Physiol. 142: 226-229.
- Darley, C.P., Davies, J.M y Sanders, D. (1995) Chill-Induced Changes in the Activity and Abundance of the Vacuolar Proton-Pumping Pyrophosphatase from Mung Bean Hypocotyls. Plant .Physiol. 109(2):659-665.
- Docampo, R. y Moreno, S.N.J. (2001) The acidocalcisoma Mol. Biochem. Parasitol. 114,151-159.
- Drozdowicz, Y., Lu, Y., Patel, V., Fritz-Gibbon, S., Miller, J. y Rea, A. (1999) A thermostable vacuolar-type membrana pyrophosphatase from the archeon *Pyrobaculum aerophilum*: implications for the origins of pyrophosphate-energized pumas. FEBS. Lett. 460: 505-512.
- Edwards, G. E., Nakamoto, H., Burnell, J. N. y Hatch, M. D. (1985) Pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C₄ Photosynthesis: Properties and mechanism of light dark regulation. Ann. Rev. Plant Physiol. 36: 255-286.
- Eckert, K.A. y Kunkel, T.A. (1991) DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. PCR Meth. and App. 1:1, 17-24.

- 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 for 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. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 111-136.
- García-Contreras, R. (2002) Caracterización bioquímica y molecular de la pirofosfatasa membranal de *Rhodospseudomonas palustris*. Tesis de Licenciatura. Investigación Biomédica Básica, UNAM. pp: 105.
- García-Contreras, R., Celis, H. y Romero, I. (2004) Importance of *Rhodospirillum rubrum* H^+ -Pyrophosphatase under low-energy conditions. *J. Bacteriol.* 186:6651-6655.
- Golecki, J.R. y Oltze, J. (1975) Quantitative determination of cytoplasmic membrana invaginations in phototrophically growing *Rhodospirillum rubrum*. A freeze-etch study. *J. Gen. Microbiol.* 88:253-258.
- Gough, J.A. y Murray, N.E. (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J. Mol. Biol.* 166: 1-19.
- 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.

- Heinonen, J. K. (2001) Biological role of inorganic pyrophosphate. Kluwer Academic Publishers, USA, p 97.
- Holmes, N.G. y Crofts, A.R. (1977) The carotenoid shift in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Change induced under continuous illumination. *Biochim. Biophys. Acta.* 461:141-50.
- Hutner, S. H. (1950) Anaerobic and aerobic growth of purple bacteria (Athiorhodaceae) in chemically defined media. *J. Gen. Microbiol.* 4: 286-293.
- Jiang, S., Fan, S., Yang, S. y Kuo, S. (1997) Purification and Characterization of Thylakoid Membrane-bound Inorganic Pyrophosphatase from *Spinacia oleracea*. *L. Arch. Biochem. Biophys.* 346:105-112.
- Kasai, M., Nakamura, T., Kudo, N., Sato, H., Maeshima, M. y Sawada S. (1998) The activity of the root vacuolar H⁽⁺⁾-pyrophosphatase in rye plants grown under conditions deficient in mineral nutrients. *Plant. Cell. Physiol.* 39:890-894.
- 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.
- Kornberg, A. (1957) Pyrophosphorylases and phosphorylases in biosynthetic reactions. *Adv. Enzymol.* 18:191-240.

- Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop, R.M. y Peterson, K.M. (1994) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector PBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.
- 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.
- Lipmann, F. (1965) The origin of prebiological systems, p. 259, Academic, Nueva York y Londres.
- Lopéz-Marqués, R., Pérez-Castiñeira, J.R., Losada, M. y Serrano A. (2004) Differential regulation of soluble and membrana-bound inorganic pyrophosphatase in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* provides insights into pyrophosphate-based stress bioenergetics. *J. Bacteriol.* 186:5418-5426.
- 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.* 266: 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. (1990) Oligomeric structure of H(+)-translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. *Biochem Biophys Res Commun.* 168:1157-62.

- Maeshima M. (2000) Vacuolar H⁽⁺⁾-pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:37-51.
- Mansurova, S. E., Shakhov, Yu. A. y Kulaev, I. S. (1975) Synthesis of inorganic pyrophosphate by animal tissue mitochondria. *FEBS Lett.* 55: 94-98.
- Mansurova, S. E. (1989) Inorganic pyrophosphate in mitochondrial metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 977: 237-247.
- Marchesini, N., Ruiz, F.A., Vieira, M. y Docampo, R. (2002) Acidocalcisomes are functionally linked to the contractile vacuole of *Dictyostelium discoideum* *J. Biol. Chem.* 277, 8146-8153.
- Marmur, J. y Doty, P. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3:208-18..
- Matthews, P. M., Williams, S. R., Seymour, A. M., Schwartz, A., Dube , G., Gadian, D. G. y Radda, G. K. (1982) A ³¹P-NMR study of some metabolic and functional effects of the inotropipinefrine and ouabain, and the ionophore RO2-2985 (X537A) in the isolated perfused rat heart. *Biochim. Biophys. Acta* 720: 163-171.
- McLaughlin, J. y Aley, S. (1985) The biochemistry and functional morphology of the Entamoeba. *J. Protozool.* 32:221-40.
- Merckel, M.C, Fabrichniy, I.P., Salminen, A., Kalkkinen, N., Baykov, A.A., Lahti, R. y Goldman, A (2001) Crystal structure of *Streptococcus mutans* pyrophosphatase: a new fold for an old mechanism. *Structure (Camb)* 9:289-297.
- Meyer, W, y Schafer, G, (1992) Characterization and purification of a membrane-bound archaeobacterial pyrophosphatase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur. J. Biochem.* 207: 741-746.
- 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.
- Mouncey, N. y Kaplan, S. (1998) Oxygen regulation of the *ccoN* gene encoding a component of the *ccb₃* oxidase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1^T: Involvement of the FnrL protein. J. Bacteriol. 180: 2228-2231.
- Moyle, J., Mitchell, R. y Mitchell, P. (1972) Proton-translocating pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. FEBS Lett. 23: 233-236.
- Nakanishi, Y. y Maeshima, M. (1998) Molecular cloning of vacuolar H(+)-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean. Plant. Physiol. 116:589-97.
- 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 phyrophosphate related to bacterial photophosphorylation. J. Biochem. 73: 537-553.
- Nore, B., Nyrén, P., Salih, G.F. y Strid, A. (1990) Photosynthetic formation of inorganic phyrophosphate in phototrophic bacteria. Photosynth. Res. 24:75-80.
- 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., 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. y Strid, A. (1991) Proton-pumping N, N' dicyclohexylcarbodiimide-sensitive inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: Purification, characterization and reconstitution. Biochemistry 30: 2883-2887.

- Nyrén, P. y Strid, A. (1991) Hypothesis: the physiological role of the membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase in some phototrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 77:265-270.
- 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.
- Pérez-Castiñeira, J.R., López-Marques, R.L., Losada, M. y Serrano, A. (2001) A thermostable K(+)-stimulated vacuolar-type pyrophosphatase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *FEBS Lett.* 496:6-11.
- Pérez-Castiñeira, J.R., López-Marqués, R., Villalba, J.M., Losada, M. y Serrano, A (2002a) Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase and plant H⁺-translocating pyrophosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:15914-15919.
- Pérez-Castiñeira, J.R., Alvar, J., Ruiz-Pérez, L.M., y Serrano, A. (2002b) Evidence for a wide occurrence of proton-translocating pyrophosphatase genes in parasitic and free-living protozoa. *Biochem. Biophys. Research Comm.* 294:567-573.
- Pierson, K.B. y Castenholz, W. (1978) Photosynthetic apparatus and cell membranes of the green bacteria, en: R. K. Clayton, W. R. Sistrom (Eds.), *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum Press, New York and London, pp 615-628.
- Priefer, U.B., Simon, R. y Puhler, A. (1985) Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions. *J. Bacteriol.* 163:324-330.
- Randahl, H. (1979) Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in *Rhodospirillum rubrum*. *Eur. J. Biochem.* 102: 251-256.
- Rea, P. y Poole, R. (1985) Proton-translocating inorganic pyrophosphatase in red beet (*Beta vulgaris*) tonoplast vesicles. *Plant. Physiol.* 77: 46-52.
- Rea, P. y Poole, R. (1993) Vacuolar H⁺-Translocating Pyrophosphatase. *Ann. Rev Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 4:157-180.

- Reeves, R. (1968) A new enzyme with the glycolytic function of piruvate kinase. *J. Biol.Chem.* 243: 3202-3204.
- Romero, I. y Celis, H. (1990) El pirofosfato y la pirofosfatasa una opción en la bioenergética. *Ciencia* 41: 297-305.
- Romero, I., Gómez-Priego, A. y Celis, H. (1991) A membrane-bound pyrophosphatase from respiratory membranes of *Rhodospirillum rubrum*. *J. of Gen. Microbiol.* 137: 2611-2616.
- 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 $Zn-PPi^{2-}$ and the $Mg-PPi^{2-}$ as substrates and the effect of free cations upon membrane bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochimie.* 77: 949-952.
- Romero, I.; García-Contreras, R. y Celis, H. (2003) *Rhodospirillum rubrum* has a family I pyrophosphatase: purification, cloning, and sequencing. *Arch. Microbiol.* 179:377-80.
- Rubtsov, P., Efremovich, N. y Kulaev, I. (1976) *Akad. Nauk SSSR* 230: 1236-1237.
- Ruiz, F.A., Marchesini, N., Seufferheld, M., Govindjee, y Docampo, R. (2001) The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. *J. Biol. Chem.* 276, 46196-46203.
- Sarafian, V., Kim, Y., Poole, R. y Rea, P. (1992) 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.
- Scott, D.A., de Souza, W., Benchimol, M., Zhong, L.; Lu, H.G., Moreno, S.N. y Docampo, R. (1998) Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Tripanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 273:22151-22158.

- Serrano, A., Pérez-Castiñeira, J.R., Baltscheffsky, H. y Baltscheffsky, M. (2004) Proton-pumping inorganic pyrophosphatase in some archaea and other extremophilic prokaryotes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36:127-133.
- Seufferheld, M.L., Lea, C.R., Vieira, M., Oldfield, E., Docampo, R. (2004) The H(+)-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* is predominantly located in polyphosphate-rich acidocalcisomes. *J. Biol. Chem.* 279:51193-202.
- Seufferheld, M., Vieira, M., Ruiz, F.A., Rodrigues, C.O., Moreno, S.N.J. y Docampo, R. (2003). Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 278:29971-29978.
- 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 .
- Schöcke, L. y Schink, B. (1998) Membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase of *Syntrophus gentianae*, a syntrophically benzoate-degrading fermenting bacterium. *Eur. J. Biochem.* 256:589-594.
- 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. (1988) ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol. Rev.* 68: 177-231.

- Shiratake, K., Kanayama, Y., Maeshima, M. y Yamaki, S. (1997) Changes in H(+)-pumps and a tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit. *Plant. Cell. Physiol.* 38:1039-45.
- 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) Mg²⁺ 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⁺/PPi Stoichiometry of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 316: 421-427.
- Staley, T.S., Bryant, M.P., Pfennig, N. y Holt, J.G. (1989) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 3. Williams and Wilkings. pp:1658-1682.
- Strid, A., Karlsson, I. y Baltscheffsky, M. (1987) ΔpH and $\Delta\psi$ induced ATP and PPi synthesis in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Acta Chem. Scandinavica B41*: 116-118.
- Sui, P.M.L. y Wood, H.G. (1962) Phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase, a CO₂ 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.
- Vieira, J. y Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion, mutagenesis, and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* 19: 259-268.
- 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.
- Young, T.W., Kuhn, N.J., Wadson, A., Ward, S., Burges, D. y Cooke, G.D. (1998) *Bacillus subtilis* ORF yybQ encodes a manganese-dependent

inorganic pyrophosphatase with distinctive properties: the first of a new class of soluble pyrophosphatase?. *Microbiology* 144:2563-2571.

- Zancani, M., Macri, F., Dal Belin Peruffo, A. y Vianello, A. (1995) Isolation of the catalytic subunit of a membrane-bound H⁽⁺⁾-pyrophosphatase from pea stem mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 228:138-43.
- Zhen, R.G., Kim, E.J. y Rea, P.A. (1997) Acidic residues necessary for pyrophosphate-energized pumping and inhibition of the vacuolar H⁺ pyrophosphatase by N', N'- dicyclohexylcarbodiimide *J. Biol Chem* 272: 22340-22380.
- 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.

7. ANEXO: PUBLICACIONES DURANTE EL PERIODO DEL DOCTORADO

- Romero, I.; García-Contreras, R. y Celis, H. (2003) *Rhodospirillum rubrum* has a family I pyrophosphatase: purification, cloning, and sequencing. Arch. Microbiol. 179, 5: 377-380.

- García-Contreras, R.; Celis, H. y Romero, I. (2004) Importance of *Rhodospirillum rubrum* H⁺-Pyrophosphatase under low-energy conditions. J. Bacteriol.186, 19: 6651-6655.

Irma Romero · Rodolfo García-Contreras
Heliodoro Celis

***Rhodospirillum rubrum* has a family I pyrophosphatase: purification, cloning, and sequencing**

Received: 23 July 2002 / Revised: 19 February 2003 / Accepted: 19 February 2003 / Published online: 26 March 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract The cytoplasmic pyrophosphatase of the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* was purified to electrophoretic homogeneity. The enzyme is a homohexamer of 20-kDa monomers. The gene was cloned and sequenced. Alignment of the deduced 179-amino-acid protein with known bacterial pyrophosphatases revealed conservation of all residues in the active site. Attempts to obtain an insertion mutant of the cytoplasmic pyrophosphatase gene did not yield any cell completely devoid of cytoplasmic pyrophosphatase activity. The mutants obtained showed 50% of the enzymatic activity and grew in twice the generation time of wild-type cells. This suggests that the membrane-bound pyrophosphatase of *Rsp. rubrum* is not sufficient for a normal growth rate, whereas the cytoplasmic enzyme is essential for growth. The characteristics of the gene and the encoded protein fit those of prokaryotic family I pyrophosphatases.

Keywords *Rhodospirillum rubrum* · Family I pyrophosphatases · Photosynthetic bacteria · Inorganic pyrophosphatase gene

Abbreviations PPase Pyrophosphatase · Kan Kanamycin · Cm Chloramphenicol · Ap Ampicillin · Tc Tetracycline

Introduction

Inorganic pyrophosphatase (E.C. 3.6.1.1. PPase) is an essential enzyme (Chen et al. 1991) for energy metabolism in all cells; it catalyzes the hydrolysis of PP_i that is released during various biosynthetic reactions maintaining the thermodynamic direction of cell metabolism (Kornberg 1962).

Cytoplasmic PPases from a wide variety of sources have been studied and divided into two families. Family I includes prokaryotic and eukaryotic PPases (classes A and B according to Young et al. 1998), of which the enzymes of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* are the best-characterized representatives. Members of this family share the same structure and have a highly conserved active site formed by 14–16 amino acid residues, three to four Mg²⁺ ions, and very similar catalytic properties. In general, eukaryotic PPases are homodimers composed of 30–35-kDa subunits, whereas prokaryotic PPases are homotetramers or homohexamers composed of 20-kDa subunits. Family II PPases (or class C, Young et al. 1998) currently include only prokaryotic enzymes of *Bacillus subtilis*, *Methanococcus jannaschii*, *Archaeoglobus fulgidus* and *Streptococcus gordonii*, and around 13 more homologues. These PPases do not share any sequence similarity with those of family I; they are homodimers composed of 34-kDa subunits and have 10–20 times more hydrolytic activity. They are also insensitive to inhibition by fluoride in the presence of Mn²⁺ or Co²⁺.

Some purple non-sulfur photosynthetic bacteria, such as *Rhodospirillum rubrum*, have, besides the cytoplasmic PPase, a membrane-bound H⁺-translocating PPase (H⁺PPase) (Baltscheffsky et al 1966). This enzyme is unique in its capability to synthesize and hydrolyze PP_i coupled to the electrochemical H⁺ gradient. This condition would subject *Rsp. rubrum* cytoplasmic PPase to some kind of specific regulation. Klemme et al. (1971) described some properties of soluble PPases in five purple non-sulfur photosynthetic bacteria and identified two groups of enzymes that differ in molecular mass and in their response to divalent cation stabilizers. This work details a procedure for the purification of the cytoplasmic PPase of

I. Romero (✉) · R. García-Contreras
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,
Edificio D 2º Piso Universidad Nacional Autónoma de México,
04510, D.F. Mexico, México
Tel.: +52-55-56232511, Fax: +52-55-56162419,
e-mail: iromero@ifisiol.unam.mx

H. Celis
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70-243, 04510, D.F. Mexico, México

Rsp. rubrum, the cloning of the gene, and the construction of a mutant in the PPase gene.

Materials and methods

Bacteria and plasmids

Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *Rsp. rubrum* cells were grown anaerobically in the light (tungsten lamp of 40 W at 30 cm), in the medium described by Cohen Bazire et al. (1957) at 32 °C; 25 µg chloramphenicol (Cm)/ml and 20 µg kanamycin (Kan)/ml were added as required. *E. coli* strains were grown at 37 °C in LB broth; ampicillin (Ap) (100 µg/ml), Kan (50 µg/ml) or Cm (25 µg/ml) was added as required.

Enzyme purification and PPase assay

Bacteria (80 g wet wt.) were suspended in 450 ml of buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8.6, 10 mM MgCl₂, 0.4 mM ZnCl₂) with 4 mg DNase II. Cells were sonicated for 3 min in an ice bath (Branson Sonifier 250, with an output of 40). The crude extract was centrifuged at 100,000g for 80 min at 4 °C and the supernatant was collected, adjusted to pH 8.6, and warmed to 60 °C for 5 min. Denatured protein was removed by centrifugation (27,000g for 20 min at 4 °C). The supernatant was fractionated with ammonium sulfate in three steps: 0–40%, 40–50% and 50–65% saturation (w/v). The precipitate of the final saturation step was resuspended in 15 ml of buffer B (20 mM Tris-HCl, pH 8.6, 0.1 mM ZnCl₂, 2 mM mercaptoethanol) and dialyzed overnight against buffer B. The dialyzed sample was loaded onto an α-aminohexylagarose-PP_i affinity-exchange column and washed with buffer B, buffer B plus 100 mM PP_iNa, and again with buffer B. Bound protein was eluted with a 0–1.2 M NaCl gradient in buffer B. Fractions containing PPase activity were dialyzed, concentrated, and applied to an FPLC Mono Q HR 5/5 anion-exchange column (Pharmacia) equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 8.6. Protein was eluted with a 0–1 M NaCl gradient in 20 mM Tris-HCl, pH 8.6, at a flow rate of 0.5 ml/min. Active fractions were dialyzed overnight against buffer B.

Hydrolytic activity was determined at 37 °C in 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1 mM NaPP_i, pH 8, and 2 mM MgCl₂. Phosphate was determined by the method of Sumner et al. (1944).

N-terminal sequencing and molecular mass determination

FPLC-purified PPase was loaded onto a native polyacrylamide gel and transferred onto a ProBlott membrane. The PPase band was excised and subjected to N-terminal sequence analysis at the Laboratoire de Microséquençage des Protéines, Institut Pasteur, France by Dr. J. d'Alayer. Standard SDS-PAGE and a Sephacryl S-300 column were used to determine the molecular mass of the subunits and the native enzyme respectively.

DNA manipulation

Rsp. rubrum chromosomal DNA was isolated as described previously (Davis et al. 1980). Part of the PPase gene was amplified by PCR, using two degenerated oligonucleotides synthesized according to the N-terminal amino acid sequence of *Rsp. rubrum* PPase: 5'-ATGGAYATCAAGAAGATCCCSGKGGCAAG-3', and 5'-SGGATYTCGATGATVACRTT-3'. The PCR product (69 bp) was purified and ligated into pCRII vector (Invitrogen).

SalI-digested genomic DNA of *Rsp. rubrum* was separated in 1% agarose gels and blotted onto nylon membranes. Southern hybridization was carried out using a fluorescein-labeled PCR product as probe and an Amersham labeling and detection system. DNA in the base-pair range of the hybridizing fragment was excised from an agarose gel and cloned into *E. coli* NM522 using pT7/T3α-19 plasmid. Positive clones were identified by colony screening with the fluorescein-labeled PCR product. Nucleotide sequences were analyzed with the GCG package (Madison, Wis., USA).

Insertion mutants

The PPase gene insertion mutant (IPYR 11) was constructed by introducing a blunt-ended, *PstI*-cleaved Kan-resistance cartridge into the unique *BsrgI* site (281 bp from the initiation codon) of pT7S1.8, generating pT7S1.8-Kan. The *SalI* fragment from the latter plasmid was subcloned into the Tc-resistance locus of the suicide vector pSUP202, yielding pSUP1.8-Kan. An *E. coli* S17-1 transformant carrying pSUP1.8-Kan was used as donor to mobilize the plasmid into *Rsp. rubrum*. Exconjugates were tested for co-transfer of Kan resistance and Cm sensitivity.

Table 1 Bacterial strains and plasmids

	Relevant characteristics	Reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
NM522	<i>hsdΔ5, Δ[lac-pro], F', pro⁺ lacI^qZΔM15</i>	Gough and Murray (1983)
S17-1	<i>Pro⁺ Res⁺ Mod⁺ recA, Sm^R, Integrated plasmid RP4-Tc::Mu-Kan::Tn7</i>	Prierer et al. (1985)
<i>Rhodospirillum rubrum</i>		
ATCC 11170	Wild-type	
IPYR 11	ATCC 11170 derivative plus PPase-Kan	This work
Plasmids:		
pT7/T3α-19	pUC19 derivative Ap ^R	Lobet et al. (1989)
pT7S1.8	PT7-T3α-19 containing a 1.8-kb <i>SalI</i> <i>Rsp. rubrum</i> DNA fragment including the PPase gene	This work
pT7S1.8-Kan	pT7S1.8 derivative in which a Kan cassette was introduced in the <i>BsrgI</i> site of PPase gene	This work
pUC4K	pUC18 derivative Ap ^R , Kan ^R ; source of Kan resistance	Vieira and Messing (1982)
pSUP202	<i>mob, Cm^R, Ap^R, Tc^R</i>	Prierer et al. (1985)
pSUP1.8-Kan	pSUP202 containing <i>SalI</i> fragment derived from PT7S1.8-Kan	This work

Table 2 Purification of cytoplasmic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*

Purification step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Specific activity [$\mu\text{mol P}_i \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$]	Purification (-fold)
Crude extract	230.0	1,809.00	0.44	1.0
Supernatant from heat denaturation	210.0	864.30	1.10	2.5
Ammonium sulfate fraction	16.0	251.10	1.32	3.0
ω -Aminoethylagarose -PP _i	5.0	1.54	73.00	165.0
Mono Q HR 5/5	1.1	0.17	150.50	342.0

Results and discussion

The cytoplasmic PPase of *Rsp. rubrum* was purified to homogeneity in four steps (Table 2). The enzyme was purified 342-fold to a specific activity of $150.5 \mu\text{mol P}_i \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$, which is in the lower range of specific activities reported for class A prokaryotic PPases (Young et al. 1998). The enzyme is stable for months at -80°C . The relative molecular mass of the native PPase, estimated by gel filtration, was 119 kDa; by SDS-PAGE, the purified enzyme had a relative molecular mass of 20 kDa. This suggests that the native cytoplasmic enzyme of *Rsp. rubrum* is a hexamer of identical 20-kDa monomers, comparable to the *E. coli* enzyme.

The N-terminal sequence of the PPase was MDIKKIP-VGKNPPQDVNVIIIEPLLAXPVKYEYEV (X denotes an unidentified residue) that partially aligns with the N-terminal sequences of *Bartonella bacilliformis* and *E. coli* PPases. Based on this information, two degenerated oligonucleotide probes were constructed and used for PCR amplification with genomic DNA as template. A single 69-bp product was obtained and used as a probe to screen *SalI*-digested DNA of *Rsp. rubrum*; a single band of 1.8 kb was detected after electrophoresis. This fragment was isolated, subcloned into pT7/T3 α -19, and sequenced, yielding the complete sequence of the PPase gene (540 bp) (GeneBank accession no. AF115341).

The ORF begins at position 577 of the *SalI* fragment, with an ATG initiation codon. The G+C content of the gene is 60.5 mol%, agreeing with the reported 60.5–65.8 mol% content of *Rsp. rubrum* (Trüper and Imhoff 1985). A putative ribosome binding site sequence (AGGA), complementary to the 3'-end of *Rsp. rubrum* 16S rRNA (Gibson et al. 1997), lies 12 bp upstream of the initiation codon. The incomplete *Rsp. rubrum* genome sequence (<http://genome.ornl.gov/microbial/rubf/>), shows that a 608-bp ORF upstream of the cytoplasmic PPase gene best fits with a transcriptional regulator (TetR family) from *Agrobacterium tumefaciens*, and an ORF downstream of the PPase gene best fits with a putative AmpG protein gene from *Caulobacter crescentus*. Since these adjacent genes do not seem to be functionally related to the PPase, it is possible that the cytoplasmic PPase gene is monocistronic and transcribed independently from its own promoter. Baltschiffsky et al. (1997) analyzed promoter sequences of five different *Rsp. rubrum* genes and proposed a consensus sequence for the -35 and -10 sequences of the promoters.

No such sequences are present upstream of the PPase gene. Downstream of the termination codon TAA is a *rho*-independent transcriptional terminator consisting of an 8-bp, GC-rich inverted repeat region, followed by an AT-rich sequence.

The PPase gene encodes a 179-amino-acid protein with a calculated molecular mass of 20,335 Da, correlating with the molecular mass determined for the purified protein by SDS-PAGE. Alignment of the derived amino acid sequence with the sequences of family I cytoplasmic PPases from bacteria and archaea (not shown) revealed that the 15 invariant amino acids of the catalytic site are well conserved in *Rsp. rubrum*. Sivula et al. (1999) have reported a subgroup of prokaryotic PPases that contain two additional residues (Lys-113 and Leu-114); the *Rsp. rubrum* sequence also contains these residues, and our alignment also included the enzymes from *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Buchnera aphidicola* and *Aeropyrum pernix* in the subgroup. Amino acids His-136, His-140, and Asp-143 of *E. coli* PPase, which are important for the oligomeric structure of the enzyme (Kankare et al. 1996), are conserved in the *Rsp. rubrum* sequence (His-137, His-141, and Asp-144).

Mutants of cytoplasmic PPase are valuable to elucidate the metabolic role of the enzyme. Efforts to isolate PPase null mutants in *E. coli* have been unsuccessful; only mutants with higher and lower levels of PPase activity have been obtained (Josse and Wong 1971; Kukko-Kalske and Heinonen 1985). Chen et al. (1990) obtained a temperature-sensitive mutant, demonstrating that a null mutant is not viable. For the photosynthetic bacterium *Rsp. rubrum*, the presence of a membrane-bound PPase could be enough to maintain the metabolic biosynthetic reactions of the cell. To obtain a soluble PPase mutant, plasmid pSUP1.8-Kan was constructed and introduced into *Rsp. rubrum* by conjugation.

Fifteen Kan-resistant *Rsp. rubrum* exconjugants were selected from several conjugation experiments, but none of these colonies were sensitive to Cm, revealing that double-crossover events did not occur. The exconjugants possessed two copies of the PPase gene, one corresponding to the wild-type gene and the other to the gene with the Kan insert, as shown by Southern hybridization, and showed 50% of the cytosolic PPase activity expressed by wild-type bacteria [$1.2 \mu\text{mol P}_i \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$]. The membrane-bound PPase activity of the exconjugants was not significantly different from wild-type membrane-bound PPase activity [$0.31 \mu\text{mol P}_i \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$].

In addition, the generation time for exconjugants grown photosynthetically (20 h) was twice that of the wild-type (10 h). These results contrast with those obtained by Josse and Wong (1971) with an *E. coli* mutant (obtained by mutagenic agents) that showed only 2% of wild-type PPase activity and grew quite normally under different conditions. This difference could be explained by the specific activity of the *E. coli* PPase, which is 18 times higher than that of *Rsp. rubrum*. The diminished PPase activity seems to be insufficient to manage PP_i produced by biosynthetic reactions. Intracellular PP_i quantification experiments are required to study this.

The fact that a double-crossover event could not be obtained indicates that, although *Rsp. rubrum* has a membrane-bound PPase, its activity might not be sufficient to provide a normal growth rate, suggesting that the soluble PPase of *Rsp. rubrum* is essential for cell growth, as in *E. coli*.

This is the first cytoplasmic PPase gene reported in a purple non-sulfur photosynthetic bacterium. The characteristics of the PPase of *Rsp. rubrum* fit those of the prokaryotic family I PPases. The PPase mutant of a photosynthetic bacterium described in this report could be valuable to study the regulation of PPase activity.

Acknowledgments We thank DGAPA IN-216401 for partial financial support, Teresa Ballado, Julio Carrasco, and Silvia Escobedo for their help with some of the experiments, and Dr. Georges Dreyfus for critically reading the manuscript.

References

- Baltscheffsky H, von Stedingk LV, Heldt HW, Klingenberg M (1966) Inorganic pyrophosphate: formation in bacterial photophosphorylation. *Science* 153:1120-1123
- Baltscheffsky M, Broshé M, Hultman T, Lundvik L, Nyrén P, Sakai-Nore Y, Severin A, Strid A (1997) A 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase gene in the photosynthetic bacterium *Rsp. rubrum*. *Biochim Biophys Acta* 1337:113-122
- Chen J, Brevet A, Fromant M, Leveque F, Schmitter J M, Blanquet S, Plateau P (1990) Pyrophosphatase is essential for growth in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172:5686-5689
- Cohen-Bazire G, Sistrom W R, Stainer RY (1957) The kinetics studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J Cell Comp Physiol* 49:25-68
- Davis RW, Botstein D, Roth JR (1980) *Advanced bacterial genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Gibson J, Stackebrandt E, Zablen LB, Gupta R, Woese CR (1979) A phylogenetic analysis of purple photosynthetic bacteria. *Curr Microbiol* 3:59-64
- Gough JA, Murray NE (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol* 166:1-19
- Josse J, Wong SCK (1971) Inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. In: Boyer PD (ed) *The enzymes*, vol 4. Academic, New York pp 499-527
- Kankare J, Salminen T, Lahti R, Cooperman BS, Baykov AA, Goldman A (1996) Structure of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallogr D* 52:551-563
- Klemme J H, Klemme B, Gest H (1971) Catalytic properties and regulatory diversity of inorganic pyrophosphatases from photosynthetic bacteria. *J Bacteriol* 108:1122-1128
- Kornberg A (1962) On the metabolic significance of phosphorolytic and pyrophosphorolytic reactions. In: Kasha H, Pullman B (eds) *Horizons in biochemistry*. Academic, New York, pp 251-264
- Kukko-Kalske E, Heinonen J (1985) Inorganic pyrophosphate and inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. *Int J Biochem* 17:575-580
- Lobet Y, Peacock MG, Cieplak W (1989) Frame-shift mutation in the *lac Z* gene of certain commercially available pUC18 plasmids. *Nucleic Acid Res* 17:4897
- Priever UB, Simon R, Puhler A (1985) Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions. *J Bacteriol* 163:324-330
- Sivula T, Salminen A, Parfenyev AN, Pohjanjoki P, Goldman A, Cooperman BS, Baykov A, Lahti R (1999) Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. *FEBS Lett* 454:75-80
- Sumner JB (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* 100:413-415
- Trüper HG, Imhoff JF (1989) Genus *Rhodospirillum*. In: Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 3. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 1662-1666
- Vieira J, Messing J (1982) The pUC plasmids, and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19:259-268
- Young T W, Kuhn NJ, Wadson A, Ward S, Burges D, Cooke GD (1998) Open reading frame yybQ of *Bacillus subtilis* encodes a soluble inorganic pyrophosphatase with distinctive properties: the first of a new class of pyrophosphatases? *Microbiology* 144:2563-2571

Importance of *Rhodospirillum rubrum* H⁺-Pyrophosphatase under Low-Energy Conditions

Rodolfo García-Contreras,¹ Heliodoro Celis,² and Irma Romero^{1*}

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,¹ and Instituto de Fisiología Celular,² Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

Received 23 March 2004/Accepted 29 June 2004

The physiological role of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* was investigated by the characterization of a mutant strain. Comparisons of growth levels between the wild type and the mutant under different low-potential conditions and during transitions between different metabolisms indicate that this enzyme provides *R. rubrum* with an alternative energy source that is important for growth in low-energy states.

Pyrophosphatases (PPases) are divided into two groups according to their localization in the cell. Cytosolic PPases are present in nearly all cells; they hydrolyze the inorganic pyrophosphate (PP_i) produced by biosynthesis of macromolecules, such as proteins and DNA, thus displacing the equilibrium of the PP_i-producing reactions (14). Membrane-bound pyrophosphatases are found in the membranes of some organelles, such as acidocalcisomes of trypanosomatids (26), and in plant tonoplast membranes (16). These enzymes utilize the energy of the hydrolyzed anhydride bond of PP_i to translocate protons across their respective membranes, generating an electrochemical proton gradient for the active transport of solutes. The membranes of some species of purple nonsulfur photosynthetic bacteria also have membrane-bound, proton-translocating PPases (H⁺ PPases). These enzymes hydrolyze and synthesize PP_i, generating or consuming an electrochemical proton gradient (1). The H⁺ PPase of *Rhodospirillum rubrum* is the most intensively studied enzyme of this kind (2, 4, 10, 20, 29), but its physiological role is not completely understood. Nyrén and Strid (19) hypothesized that the main function of the H⁺ PPase of *R. rubrum* is to maintain the proton motive force in light-grown cells under conditions of low energy. The present work is the first experimental attempt to elucidate the physiological role of the H⁺ PPase in photosynthetic bacteria by using an *R. rubrum* H⁺ PPase null mutant.

Construction and characterization of H⁺ PPase mutant strain. The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Photosynthetic bacteria and derivative strains were grown anaerobically or aerobically in the medium described by Cohen-Bazire (7) at 30°C. Ampicillin (100 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), chloramphenicol (25 µg/ml), and gentamicin (15 µg/ml) were added as required.

The *hpp* gene was amplified by PCR from chromosomal DNA of *R. rubrum*. The PCR product was cloned into the pCRII plasmid and sequenced. The gene was interrupted by

introducing a blunt-ended PstI-cleaved kanamycin resistance cartridge, generating pCR-Hpp-K. The *hpp-960*:Kan allele was subcloned as an EcoRI fragment into the pSUP202 plasmid, yielding pSUP-Hpp-K. This construction was introduced into *R. rubrum* by conjugation. The mutant strain was designated RG1. Southern blot and PCR analyses were performed to confirm the interruption. The viability of this mutant showed that the H⁺ PPase is not essential for the growth of *R. rubrum*, in contrast with the essential cytoplasmic PPase (6, 24).

To determine whether the interruption of the *hpp* gene abolishes PPase activity and PP_i-mediated H⁺-pumping activity, chromatophores from the RG1 mutant strain were isolated. The hydrolytic activity of the mutant was completely abolished with respect to the activity of the wild type (140 nmol of P_i min⁻¹ mg of protein⁻¹). However, hydrolytic activity resumed when the mutant strain was complemented with the wild-type gene from *R. rubrum* (120% of wild-type hydrolytic activity). Although the plasmid utilized for complementation is a medium-copy-number vector, the expression of extra copies of the gene that may lead to a significant increase in H⁺ PPase activity was not observed in the complemented RG1 mutants. As with activity results, we found that the RG1 mutant failed to exhibit PP_i-mediated H⁺-pumping activity, as monitored by acridine orange fluorescence quenching (Fig. 1A to C), but not when it was quenched with ATP (Fig. 1D). This result indicates that the loss of PP_i-supported H⁺ pumping is due to the lack of the enzyme and not to leakage of H⁺ across membranes.

The observed percentage of quenching with PP_i in chromatophores of wild-type *R. rubrum* was 60%, and for the complemented mutant it was around 50%; these percentages correspond to changes in pH (ΔpH) of 1.9 and 1.6 pH units, respectively (according to a calibration plot constructed as described in reference 28 [data not shown]). With ATP, the average percentage of quenching in all strains was 72%, corresponding to a ΔpH of 2.4. The H⁺ PP_i and H⁺ ATP stoichiometries reported for *R. rubrum* chromatophores are 2 and 3.6, respectively (28), explaining the greater acidification obtained with ATP than with PP_i. Nevertheless, the PP_i-dependent ΔpH might be used to synthesize important amounts of ATP, as was demonstrated previously (11).

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Edificio D, 2° Piso, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., México. Phone: (52 55) 5623 2511. Fax: (52 55) 5616 2419. E-mail: iromero@ifisiol.unam.mx.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s) ^a	Reference or source
Strains		
Photosynthetic bacterial strains		
<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170	Wild type	
RG1	ATCC 11170 derivative, <i>hpp-960::Kan</i>	This work
RG1-P	RG1(pBBR1MCS-5) Gm ^r	This work
RG1-P1	RG1(pBBR-Hpp-Rr) Kan ^r Gm ^r	This work
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1.	Wild type	
<i>Rhodobacter capsulatus</i> DSM 1710	Wild type	
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> 2.1.6.	Wild type	
<i>Rhodomicrobium vannielii</i> DSM 162	Wild type	
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>pro thi hsdR hsdM⁺ recA</i> [RP4-2 Tc::Mu-Kan::Tn7(Tp ^r Sm ^r) Tra ⁺]	22
Plasmids		
pCRII	3.9-kb cloning vector, Ap ^r Kan ^r	Invitrogen
pCR-Hpp	pCRII 1.9-kb fragment of <i>hpp</i>	This work
pCR-Hpp-K	pCRII- <i>hpp-960::Kan</i>	This work
pUC4K	pUC18 derivative, Ap ^r Kan ^r	30
pSUP202	Suicide vector, Mob ⁺ Cm ^r Ap ^r Tc ^r	22
pSUP-Hpp-K	pSUP202 carrying 1.9-kb fragment of <i>hpp-960::Kan</i> , Ap ^r Cm ^r	This work
pBBR1MCS-5	4.8-kb cloning vector, Mob ⁺ Gm ^r	15
pBBR-Hpp-Rr	pBBR1MCS-5 (<i>hpp</i>)	This work

^a *hpp*, *R. rubrum* wild-type H⁺PPase gene.

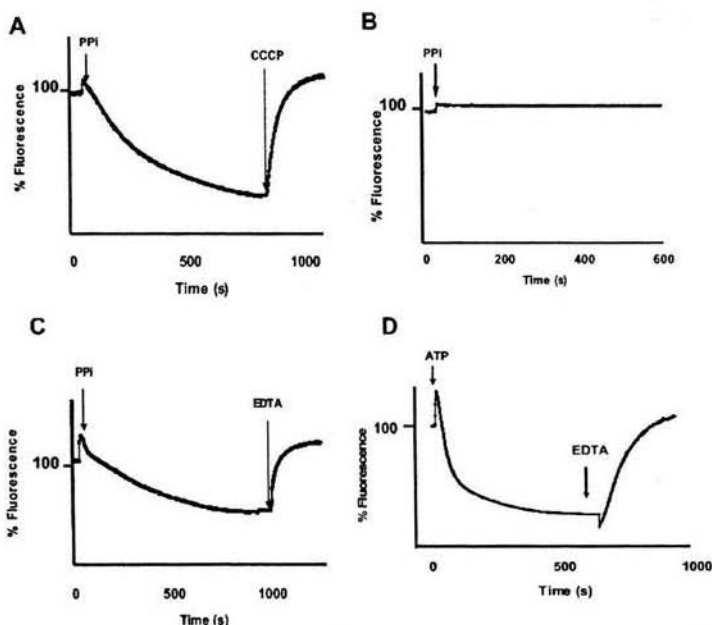


FIG. 1. Δ pH in chromatophores of the different strains. Assay conditions were a solution containing 2 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.25 M trehalose, 0.2 M choline chloride, 5 mM MgCl₂, 3 μ M acridine orange, and 0.5 mg of protein/ml of chromatophores and a temperature of 25°C. The reaction was initiated by the addition of 1 mM PPI (A to C) or 2 mM ATP (D). Gradients were collapsed by the addition of 2.5 μ M carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) (A) or 5 mM EDTA (C and D). Excitation and emission wavelengths were set at 495 and 540 nm, respectively. (A to C) PPI-dependent Δ pH in the wild type (A), the RG1 mutant (B), and RG1-P1 (complemented mutant) (C); (D) ATP-dependent Δ pH in RG1.

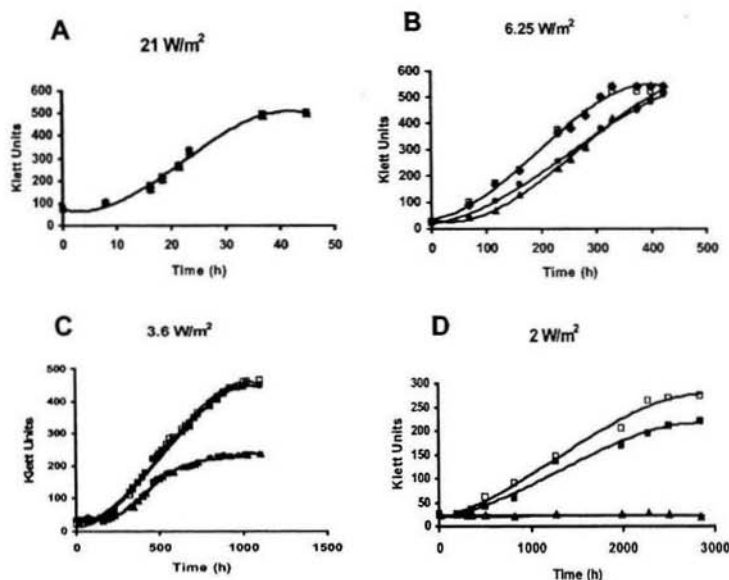


FIG. 2. Effect of decreasing light intensity on photosynthetic growth of *R. rubrum* strains. Bacteria were grown in high light intensity before being subcultured and transferred to different light intensities. Light intensity was measured with a YSI-Kettering model 65A radiometer (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, Ohio) and was adjusted by rheostat control of two tungsten 40-W lamps at a 30-cm distance. □, wild type; ●, RG1 mutant; ■, RG1-P1 (complemented mutant); ▲, RG1-P (mutant with empty vector). Growth curves are representative of the results of one of at least four identical experiments.

Effect of light intensity on RG1 mutant photosynthetic growth. According to the hypothesis of Nyren and Strid (19), under low-potential conditions, such as low light intensities, the H^+PPase of *R. rubrum* could be used to generate a ΔpH that suffices to maintain bacterial growth. To test this hypothesis, the growth of the mutant was monitored at different light intensities (Fig. 2). At 21 W/m^2 (high intensity), the growth of the mutant strain was similar to the growth of the wild type. However, at 6.25 and 3.6 W/m^2 , the mutant exhibited a considerable delay in growth, and at a very low light intensity (2 W/m^2), the RG1 mutant did not grow. The plots of Fig. 2 were used to calculate the replication times and the length of the lag phase at each light intensity (Table 2). No significant differences were observed between the replication times of the mutant and the wild type at light intensities of 21 to 3.6 W/m^2 . The effect of mutation was on the lag phase. It became longer at light intensities below 21 W/m^2 , and at an intensity of 2 W/m^2 ,

a permanent "latent" lag phase was observed. The mutant strain was able to grow after it was transferred from 2 W/m^2 to high light intensity. The particular characteristics of the mutant strain were restored by homologous complementation.

These results indicate that the presence of the H^+PPase is important for *R. rubrum* growth under low-energy conditions. Particularly, during growth at very low light intensity, the enzyme seems to be essential during the lag phase to achieve the exponential growth phase. Mechanistically, it could be that during the lag phase at low light, the photosynthetic electron transport H^+ gradient is not high enough to synthesize the ATP that is needed to produce all the cellular components required for the low-light adaptation and, therefore, to permit exponential growth. Under these conditions, the H^+PPase may hydrolyze PP_i , establishing an H^+ gradient to generate this critical amount of ATP. During the exponential phase, the contribution of H^+PPase may be less prominent, since the activity of the cytoplasmic $PPase$ may become an important factor in the removal of cytoplasmic PP_i in order to sustain active growth, leaving less substrate for the H^+PPase . In addition, the H^+ gradient generated by the photosynthetic electron chain may be the main driving force for the generation of ATP. At 2 W/m^2 , the H^+ gradient from the photosynthetic electron transport chain is very low, so the PP_i -dependent H^+ gradient produced by H^+PPase might become the main energy source. It might also be the main energy source in the exponential growth phase, but this would not be the case for the mutant strain.

TABLE 2. Effect of light intensity on photosynthetic growth

Light intensity (W/m^2)	Generation time (h)			Lag phase length (h)		
	Wild type	RG1	RG1-P1	Wild type	RG1	RG1-P1
21	10.8	10.8	10.8	1.5	1.5	1.5
6.26	43.2	42.3	41.3	12	72	12
3.6	172	167	160	192	343	192
2	470	∞^a	485	250	∞	375

^a ∞ , the strain did not grow.

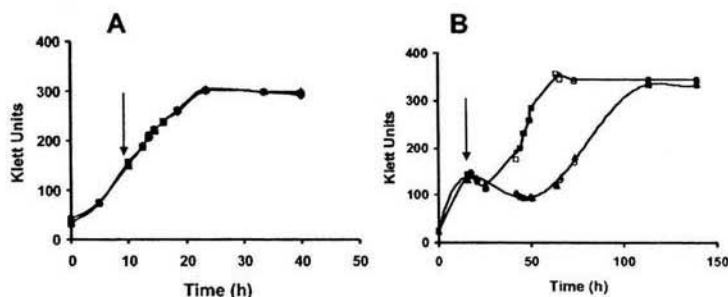


FIG. 3. Effect of metabolic shifts in the growth of *R. rubrum* strains. (A) Photosynthetic to respiratory metabolic shift; (B) respiratory to photosynthetic metabolic shift. To adapt bacteria to the first metabolism, they were subcultured in it three times before the experiment. The experiment started when the bacteria were transferred to a fresh medium under the same metabolic condition. When the culture reached the early exponential phase, the metabolic shift was imposed (arrow), and it continued until the stationary phase was achieved. Light intensity was 21 W/m^2 . □, wild type; ○, RG1 mutant; ■, RG1-P1 (complemented mutant); ▲, RG1-P (mutant with an empty vector).

Importance of H^+ PPase during metabolic shifts. Purple nonsulfur photosynthetic bacteria are very versatile organisms. There are members of this group, such as *R. rubrum*, that can perform photosynthesis under anaerobic conditions, as well as respiration and fermentation (21). Since H^+ PPase is present in growing photosynthetic and respiratory cells of *R. rubrum* (23), we examined whether H^+ PPase is central in obtaining energy during metabolic shifts. When a photosynthetic to respiratory metabolic shift was imposed (Fig. 3A), all the studied strains grew without an appreciable lag phase. However, in the case of a respiratory to photosynthetic metabolic shift (Fig. 3B), all the strains showed a lag phase, which was considerably longer for the RG1 mutant strain (40 versus 14 h). In this metabolic transition, many of the enzymes and other complex components that are essential for photosynthetic growth, such as chromatophores, are absent. They must be synthesized before growth begins. In fact, the time needed for the synthesis of about 60% of the chromatophores in *R. rubrum* is the same as the lag phase time observed in wild-type bacteria after the metabolic shift (9). Hence, during adaptation, the H^+ PPase probably hydrolyzes PP_i , providing the energy to synthesize these components, and thus reduces the length of the lag phase.

The lack of an appreciable lag phase during the photosynthetic to aerobic shift might be explained by the fact that bacteria adapt easily to the new metabolism, since almost all the proteins of the respiratory chain are in the photosynthetic chain (probably all but the terminal oxidases).

Effect of a low oxygen concentration on RG1 mutant aerobic growth. To establish a different low-potential condition that did not depend on light intensity, bacteria were exposed to low oxygen tension during aerobic growth. As expected, at a normal air O_2 concentration (about 21%), the growth of the RG1 mutant and that of the wild type were similar. However, the RG1 mutant exhibited a delay in growth when the O_2 concentration was lowered to 10% (Fig. 4). Under these conditions, the H^+ gradient generated by respiratory electron transport would not suffice to sustain the normal growth of the mutant strain. It is also noted that, similar to the findings under the photosynthetic low-potential condition, normal growth was restored by complementation of the mutant strain (data not

shown). These results confirm that, regardless of the mechanism by which the low energy condition is induced, the H^+ PPase is important for growth.

Growth of other photosynthetic purple nonsulfur bacteria at very low light intensity. Among the purple nonsulfur photosynthetic bacteria, there are species, such as *R. rubrum*, *Rhodospseudomonas palustris*, and *Rhodomicrobium vannielii*, that have H^+ PPase, and others, like *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*, that do not have it (18, 25). Thus, it was considered relevant to explore whether the presence of the H^+ PPase confers the ability to grow at very low light intensities (2 W/m^2), as is the case for *R. rubrum* (Fig. 2). Figure 5 shows that only those species with H^+ PPase were able to grow under this condition. Therefore, these data, together with the results with the mutant strain (Fig. 2), suggest that the presence of H^+ PPase in purple nonsulfur bacteria is central for growing under low light intensity and, probably, under other low-energy conditions. Nevertheless, we cannot rule out the possibility that other factors, such as differences in the photosynthetic unit sizes and light-gathering abilities among the species, could have contributed to the growth under conditions of low light intensity (Fig. 5).

As for physiological implications, these results suggest that in purple nonsulfur photosynthetic bacteria, which usually

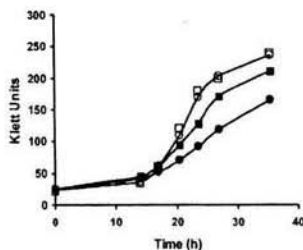


FIG. 4. Effect of oxygen tension in aerobic growth of *R. rubrum* strains. Bacteria were grown in the dark with continuous shaking in a TS Autoflow CO_2/O_2 incubator (NuAire, Inc). Oxygen levels were controlled by injecting air and N_2 . Open symbols, 21% O_2 ; filled symbols, 10% O_2 ; ■, wild type; ●, RG1 mutant.

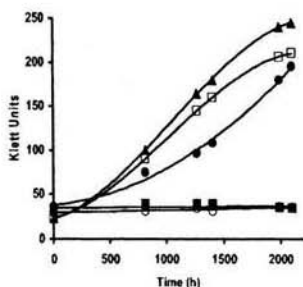


FIG. 5. Photosynthetic growth of different species of purple non-sulfur bacteria at a light intensity of 2 W/m². The species for this experiment were selected based on the presence (□, *R. rubrum*; ●, *Rhodospirillum rubrum*; ▲, *Rhodospirillum rubrum*) or absence (○, *Rhodospirillum rubrum*; ○, *Rhodospirillum rubrum*) of H⁺ PPase in them.

grow in ponds or meromictic lakes exposed to different partial oxygen pressures and variable light intensity (21), the existence of H⁺ PPase is fundamental for development in such changing environments.

It is interesting that all tested species with H⁺ PPase, which grow at very low light intensities, have the classical family I cytoplasmic PPase but that the *Rhodospirillum rubrum* species that does not grow under that condition possesses the newly described family II cytoplasmic PPase (5, 24). The structural and biochemical characteristics of both families are very different, but family I cytoplasmic PPase is less active and seems to be highly regulated (5, 12, 13). Whether this type of cytoplasmic enzyme exists only in cells that have H⁺ PPase remains to be elucidated.

It has been proposed that in plants, vacuolar H⁺ PPase may replace vacuolar ATPase under energy stress, such as anoxia and chilling, and in growing tissues to maintain vacuole acidity (3, 8, 17, 27). Under these conditions, plant cells may have some difficulty in obtaining from ATP the needed energy to survive; hence, they utilize PP_i (an abundant by-product of anabolism) to generate an electrochemical H⁺ gradient to safeguard ATP. This work provides evidence that the physiological roles of bacterial enzymes could be the same, that is, to hydrolyze preferentially PP_i under low-energy conditions when ATP concentration is low and, therefore, insufficient to cover all the energy requirements of the cell.

This work was partially supported by DGAPA grant IN-216401 from UNAM.

We are grateful to Rosa Laura Camarena and Armando Gómez-Puyou for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Baltschetsky, H., L. V. von Stedingk, H. W. Heldt, and M. Klingenberg. 1966. Inorganic pyrophosphate: formation in bacterial photophosphorylation. *Science* 153:1120-1122.
- Baykov, A. A., N. V. Sergina, O. A. Evtushenko, and E. B. Dubnova. 1996. Kinetic characterization of the hydrolytic activity of the H⁺ pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* in membrane-bound and isolated states. *Eur. J. Biochem.* 236:121-127.
- Carystinos, G. D., H. R. MacDonald, A. F. Monroy, R. S. Dhindsa, and R. J. Poole. 1995. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant Physiol.* 108:641-649.
- Celis, H., and I. Romero. 1987. The phosphate-pyrophosphate exchange and

hydrolytic reactions of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: effects of pH and divalent cations. *J. Bioenerg. Biomembr.* 19:255-272.

- Celis, H., B. Franco, S. Escobedo, and I. Romero. 2003. *Rhodospirillum rubrum* has a family II pyrophosphatase. Comparison with other species of photosynthetic bacteria. *Arch. Microbiol.* 179:368-376.
- Chen, J., A. Brevet, M. Fromant, F. Lévêque, J.-M. Schmitter, S. Blanquet, and P. Plateau. 1990. Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:5686-5689.
- Cohen-Bazire, G., W. R. Sistrom, and R. Y. Stainer. 1957. The kinetics studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell Comp. Physiol.* 49:25-68.
- Darley, C. P., J. M. Davies, and D. Sanders. 1995. Chill-induced changes in the activity and abundance of the vacuolar proton-pumping pyrophosphatase from mung bean hypocotyls. *Plant Physiol.* 109:659-665.
- Golecki, J. R., and J. Oelze. 1975. Quantitative determination of cytoplasmic membrane invaginations in phototrophically growing *Rhodospirillum rubrum*. A freeze-etch study. *J. Gen. Microbiol.* 88:253-258.
- Guillory, R. J., and R. R. Fisher. 1972. Studies on the light-dependent synthesis of inorganic pyrophosphate by *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochem. J.* 129:471-481.
- Keister, D. L., and J. N. Minton. 1971. ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42:932-937.
- Klemme, J. H., and H. Gest. 1971. Regulation of the cytoplasmic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Eur. J. Biochem.* 22:529-537.
- Klemme, J. H., B. Klemme, and H. Gest. 1971. Catalytic properties and regulatory diversity of inorganic pyrophosphatases from photosynthetic bacteria. *J. Bacteriol.* 108:1122-1128.
- Kornberg, A. 1962. On the metabolic significance of phosphorylating and pyrophosphorylating reactions, p. 251-264. In H. Kasha and B. Pullman (ed.), *Horizons in biochemistry*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop II, and K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175-176.
- Maeshima, M. 2000. Vacuolar H⁽⁺⁾-pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:37-51.
- Nakanishi, Y., and M. Maeshima. 1998. Molecular cloning of vacuolar H⁽⁺⁾-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyls of mung bean. *Plant Physiol.* 116:589-597.
- Nore, B. F., P. Nyrrén, G. F. Salih, and A. Strid. 1990. Photosynthetic formation of inorganic pyrophosphate in phototrophic bacteria. *Photosynth. Res.* 24:75-80.
- Nyrrén, P., and A. Strid. 1991. Hypothesis: the physiological role of the membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase in some phototrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 77:265-270.
- Nyrrén, P., B. F. Nore, and M. Baltschetsky. 1986. Studies on photosynthetic inorganic pyrophosphate formation by *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochim. Biophys. Acta* 851:276-282.
- Pfennig, N. 1978. General physiology and ecology of photosynthetic bacteria, p. 3-18. In R. Clayton and W. R. Sistrom (ed.), *The photosynthetic bacteria*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Priefer, U. B., R. Simon, and A. Pühler. 1985. Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions. *J. Bacteriol.* 163:324-330.
- Romero, I., A. Gómez-Priego, and H. Celis. 1991. A membrane-bound pyrophosphatase from respiratory membranes of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Gen. Microbiol.* 137:2611-2616.
- Romero, I., R. García-Contreras, and H. Celis. 2003. *Rhodospirillum rubrum* has a family I pyrophosphatase: purification, cloning and sequencing. *Arch. Microbiol.* 179:377-380.
- Schwarm, H.-M., H. Vigneschow, and K. Knobloch. 1968. Kinetic characterization and partial purification of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367:127-133.
- Scott, D. A., W. de Souza, M. Benchimol, L. Zhong, H. G. Lu, S. N. Moreno, and R. Docampo. 1998. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 273:22151-22158.
- Shiratake, K., Y. Kanayama, M. Maeshima, and S. Yamaki. 1997. Changes in H⁽⁺⁾-pumps and a tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during development of pear fruit. *Plant Cell Physiol.* 38:1039-1045.
- Sosa, A., and H. Celis. 1995. H⁽⁺⁾/PP_i stoichiometry of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 316:421-427.
- Sosa, A., H. Ordaz, I. Romero, and H. Celis. 1992. Magnesium is an essential activator of hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. J.* 283:561-566.
- Vieira, J., and J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion, mutagenesis, and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19:259-268.

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	3
1. INTRODUCCIÓN.	4
1.1. Características de las bacterias púrpura.	4
A) Púrpura sulfurosas.	4
B) Púrpura no sulfurosas.	4
1.1.1. <i>Rhodospirillum rubrum</i> .	5
1.2. El Papel del PPI en el Metabolismo Celular.	7
1.3. Las pirofosfatasa.	11
1.3.1. Pirofosfatasa citoplásmicas.	11
1.3.2. Pirofosfatasa membranales.	14
1.3.2.1. Pirofosfatasa integrales de membrana, bombeadoras de protones (H ⁺ PPasa)	14
1.3.3. La H ⁺ PPasa y el acoplamiento entre la síntesis e hidrólisis de enlaces de alta energía.	17
1.3.4. La H ⁺ PPasa de <i>Rhodospirillum rubrum</i> .	18
• Características bioquímicas.	18
• Características genéticas	23
2. OBJETIVOS.	25
3. MATERIALES Y METODOS.	26
3.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo.	26
3.1.1. Medios de cultivo.	26
3.2. Cultivo de bacterias.	27
3.2.1. Cultivo de <i>Escherichia coli</i> .	27
3.2.2. Cultivo de bacterias fotosintéticas.	27
3.2.2.1 Cultivos en condiciones fotosintéticas.	28
3.2.2.2. Cultivos en condiciones respiratorias.	28
3.3. Obtención de cromatóforos (membranas fotosintéticas).	29
3.4. Determinación de proteína.	30
3.5. Determinación de la actividad hidrolítica.	30
3.6. Medición del bombeo de protones.	30
3.7. Purificación de DNA genómico de <i>R. rubrum</i> .	31
3.8. Amplificación de fragmentos de DNA de <i>R. rubrum</i> por medio de PCR.	32

3.8.1. Purificación del producto de PCR.	33
3.8.2. Clonación del producto de PCR.	34
3.9. Obtención de células competentes y transformación.	34
3.10. Obtención de la mutante H ⁺ PPasa ⁻ de <i>R. rubrum</i>	35
3.11. Conjugación.	36
3.12. Verificación de la interrupción del gen <i>hpp</i> .	36
3.13. Obtención de las demás cepas empleadas en los experimentos.	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Obtención de la mutante RG1 (H ⁺ PPasa ⁻) de <i>Rhodospirillum rubrum</i> .	38
4.2. Caracterización de la clona RG1 (mutante H ⁺ PPasa ⁻).	43
4.2.1. Determinación de la actividad de hidrólisis de PPi y de generación de un bombeo de H ⁺ en cromatóforos.	43
4.2.2. Crecimiento en condiciones de bajo potencial en los metabolismos fotosintético y respiratorio.	45
4.2.2.1. Crecimiento fotosintético a diferentes intensidades luminosas.	45
4.2.3.1. Crecimiento en ciclos luz-oscuridad.	48
4.2.3.2. Crecimiento respiratorio a diferentes concentraciones de O ₂ .	49
4.2.4. Transiciones metabólicas.	50
a) Transición del metabolismo fotosintético a respiratorio.	50
b) Transición del metabolismo respiratorio a fotosintético.	51
4.3. Crecimiento de diversas especies de bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas en intensidades luminosas bajas.	52
5. DISCUSIÓN.	54
5.1. Una visión general de la función fisiológica de las H ⁺ PPasas.	63
6. BIBLIOGRAFÍA.	69
7. ANEXO: PUBLICACIONES DURANTE EL PERIODO DEL DOCTORADO	82