

215
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ACTIVACION POR CATIONES DIVALENTES DE LA
PIROFOSFATASA DE MEMBRANA DE *Rhodospirillum*
rubrum, EVIDENCIADA POR LA HIDROLISIS DE
COMPLEJOS M (III) - PPI**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARIA ISABEL VELAZQUEZ LOPEZ

MEXICO, D. F.

1991

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	ii
CAPITULO 1 : INTRODUCCION	
1.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LA FOTOSINTESIS DE BACTERIAS	1
1.1.1 BACTERIAS FOTOSINTETICAS	2
1.1.2 CLASIFICACION DE BACTERIAS FOTOSINTETICAS DEL ORDEN RHODOSPIRILLALES	4
1.1.3 CLASIFICACION Y DESCRIPCION DE <i>Rhodospirillum rubrum</i>	5
1.2 TRANSDUCCION ENERGETICA EN BACTERIAS FOTOSINTETICAS	8
1.3 GENERALIDADES DEL PPI	11
1.3.1 EL PPI COMO SUBSTITUTO DEL ATP	12
1.3.2 FUENTE DE ENERGIA DEL PPI	13
1.3.3 SINTESIS DE PIROFOSFATO INORGANICO	13
1.4 PIROFOSFATASAS INORGANICAS	14
1.4.1 PIROFOSFATASA CITOPLASMICA	15
1.4.2 PIROFOSFATASA DE MEMBRANA	16
1.5 SOLUBILIZACION Y PURIFICACION DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA	20
1.6 REGULACION DE LA ENZIMA POR CATIONES DIVALENTES	21
1.7 LANTANIDOS	23
1.8 OBJETIVOS	26

CAPITULO 2 : MATERIALES Y METODOS

2.1	CULTIVO DE BACTERIAS	27
2.1.1	MEDIOS DE CULTIVO	27
2.1.2	SIEMBRA DE BACTERIAS	30
2.1.3	COSECHA DE BACTERIAS	31
2.2	OBTENCION DE CROMATOFOROS	31
2.3	DETERMINACION DE PROTEINA	32
2.4	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA DE CROMATOFORO	32
2.5	DETERMINACION DE PRECIPITADOS EN LAS SOLUCIONES	34
2.6	MEDICIONES DE FLUORESCENCIA	36
2.7	CALCULOS DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS ESPECIES LIBRES Y DE LOS COMPLEJOS EN EL MEDIO DE REACCION	36

CAPITULO 3 : RESULTADOS Y DISCUSION

3.1	ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA UTILIZANDO COMO SUSTRATO EL COMPLEJO La-PPi	38
3.2	CINETICA DE LA HIDROLISIS DEL COMPLEJO La-PPi Y LA ACTIVACION POR Mg^{2+} O Zn^{2+}	40
3.2.1	EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE La-PPi, La LIBRE, PPi LIBRE, Mg LIBRE Y Mg-PPi	44
3.2.2	EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE La-PPi, La LIBRE, PPi LIBRE, Zn LIBRE Y Zn-PPi	46

3.3	EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES Y DEL TIPO DE CATION LIBRE EN LA REACCION DE HIDROLISIS DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA UTILIZANDO COMO SUSTRATO La-PPI	49
3.3.1	ANALISIS DE LAS CONCENTRACIONES CALCULADAS DE LOS COMPLEJOS Y ESPECIES LIBRES DE LA FIG. 7	51
3.4	CINETICA DE LA HIDROLISIS DE DIFERENTES COMPLEJOS M (III)-PPI ACTIVADO POR Mg^{2+} LIBRE	55
3.5	CINETICA DE LA HIDROLISIS DE DIFERENTES COMPLEJOS M (III)-PPI ACTIVADOS POR Zn^{2+} LIBRE	58
3.6	FLUORESCENCIA DEL COMPLEJO La-PPI	60
3.7	DETERMINACION DE PRECIPITADOS	63
	CONCLUSIONES	65
	REFERENCIAS	66

RESUMEN

Los cromatóforos de la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum contiene una pirofosfatasa de membrana que sintetiza o hidroliza PPI de una manera acoplada al gradiente de H^+ . El sustrato real para la hidrólisis de PPI es el complejo Mg-PPI, sin embargo, se ha sugerido que el Mg^{2+} ejerce un papel regulador sobre la pirofosfatasa de membrana de Rhodospirillum rubrum. Otros cationes divalentes como Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} entre otros, regulan también a la enzima. En este trabajo se utilizan los complejos M (III)-PPI como son : La-PPI, Tb-PPI, Nd-PPI y Fe-PPI, que prácticamente no son hidrolizables, para evidenciar la activación por el Mg^{2+} y Zn^{2+} libre. Se encontró que estos cationes, dependiendo de su concentración, activan a la enzima y permiten que los complejos M (III)-PPI sean hidrolizados, siguiendo una cinética de saturación. Utilizando las constantes de asociación reportadas se calcularon las concentraciones de las especies involucradas (Mg^{2+} libre ó Zn^{2+} y M (III)-PPI) y se analizaron sus efectos sobre la activación enzimática. Así mismo, se corroboró en nuestras condiciones experimentales la formación del complejo M (III)-PPI utilizando la propiedad que tienen algunos lantánidos de fluorescer al formar un complejo con PPI. Los resultados comprueban un efecto activador del Mg^{2+} y el Zn^{2+} sobre la enzima, modificando sus propiedades cinéticas y selectivas.

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
Bchl	Bacterioclorofila
BSA	Albúmina de suero de bovino
DCCD	Diciclohexilcarbodimida
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
EGTA	Acido etilenglicol bis (amino-etil-eter)
EPR	Resonancia Paramagnética del Electrón
ΔG°	Energía libre en condiciones estandar
H ⁺	Protón
M (III)-PPi	Complejo metal trivalente - pirofosfato
MDP	Metilendifosfato
MOPS	Acido morfolinopropanosulfónico
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
Pi	Fosfato
³² P	Fosforo radioactivo
PPi	Pirofosfato inorgánico
PPiasa	Pirofosfatasa
rpm	Revoluciones por minuto
TCA	Acido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano

1. INTRODUCCION

1.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA FOTOSINTESIS EN BACTERIAS

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual la energía luminosa es convertida a energía química, involucrando para ello la absorción de luz por pigmentos, la transferencia de energía a los centros de reacción y la iniciación de reacciones químicas de oxido-reducción.

El concepto moderno de fotosíntesis surge a partir de los estudios realizados por van Niel sobre bacterias fotosintéticas quien, en 1935, formuló la siguiente ecuación generalizada para la fotosíntesis :



siendo A = donador de electrones.

Las plantas, algas y cianobacterias llevan a cabo una fotosíntesis oxigénica, donde el agua se oxida para reducir el CO_2 a carbohidratos, y se libera el O_2 molecular.

Sin embargo, la mayoría de las bacterias fototróficas llevan a cabo una fotosíntesis anoxigénica en la cual el agua es remplazada por otros reductores como S^{2-} , $S_2O_3^{2-}$ o H_2 . Hay también algunas bacterias fotoheterotróficas que remplazan, además del agua, al CO_2 , reduciendo compuestos orgánicos simples como el malato. Este sistema de fotosíntesis bacteriana es mucho más simple que el de las plantas y algas, ya que sólo tiene un centro de reacción o fotosistema (Gingras, 1978) y un transporte de electrones cíclico (Dutton y Prince, 1978).

Por otro lado, los sistemas de pigmentos de las bacterias fotosintéticas también son diferentes al que presentan las plantas y algas. Los pigmentos clorofílicos de las bacterias se llaman bacterioclorofilas; se han caracterizado cinco clases de bacterioclorofilas (Bchl "a" , Bchl "b" , Bchl "c" , Bchl "d" , Bchl "e"). Estas bacterioclorofilas se parecen mucho a las clorofilas "a" y "b", pero se diferencian por la naturaleza de las cadenas laterales unidas a átomos de carbono. Además, existe una bacterioclorofila carente de magnesio, denominada bacteriofeofitina, en el centro de reacción de todas las bacterias fotosintéticas. Los principales carotenoides son también químicamente diferentes (Hall y Rao, 1963).

La energía de la luz es usada para generar ATP (por ejemplo en la fosforilación) por medio de un circuito de protones análogo al de la mitocondria y cloroplasto. Así, la fuerza protón-motriz generada a través de la membrana impermeable a protones es utilizada por la ATP sintetasa translocadora de protones (Daves, 1986).

1.1.1. BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS

La fotosíntesis microbiana está representada en seis familias de bacterias: Rhodospirillaceae, Chromatiaceae, Chlorobiaceae, Chloroflexaceae, Halobacteriaceae y Cyanobacteriaceae.

De las familias antes mencionadas, son las cianobacterias las únicas bacterias que llevan a cabo fotosíntesis oxigénica, presentando dos fotosistemas (Avron, 1967) y es el agua su donador

de electrones. Presentan asimismo clorofila "a" y ficobiliproteínas, además de caroteno.

La familia Chromatiaceae o bacterias púrpuras sulfurosas realizan fotosíntesis anoxigénica, teniendo como pigmentos bacterioclorofila tipo "a" y carotenos, los cuales se encuentran en sistemas de membrana que son continuas a la membrana citoplásmica. Su donador de electrones pueden ser compuestos de azufre o hidrógeno molecular. Tienen la capacidad de fotoasimilar algunas sustancias orgánicas simples.

La familia Chlorobiaceae o bacterias verde sulfurosas presentan fotosíntesis anoxigénica, siendo sus pigmentos bacterioclorofila "c", "d" o "e" y se localizan en vesículas de la membrana llamadas "clorobium". Son fotoautotróficas y utilizan como reductores compuestos de azufre, hidrógeno y sustratos orgánicos simples (Kelly, 1974).

La familia Rhodospirillaceae o bacterias púrpuras no sulfurosas son principalmente fotoheterótrofas y pueden reducir compuestos orgánicos simples. A diferencia del resto de las familias, son capaces de crecer quimioheterotróficamente en presencia de O_2 y multiplicarse en la oscuridad, obteniendo su energía de la oxidación de compuestos orgánicos. Algunas especies son capaces de utilizar el H_2 para reducir el CO_2 (Clayton y Sistrom, 1978).

La familia de Chloroflexaceae, presenta una sola especie Chloroflexus auricantus, que es capaz de crecer fotoautotróficamente con compuestos de sulfato como donadores de electrones, y es fundamentalmente un organismo fotoorganotrófico,

que puede crecer con fotosíntesis anoxigénica o bien en condiciones respiratorias en oscuridad.

En la familia Halobacteriaceae se encuentran organismos que se desarrollan en concentraciones salinas elevadas (4.3 M de NaCl). Las bacterias del género Halobacterium son las que realizan fotosíntesis anoxigénica y su aparato fotosintético es muy diferente al resto de los demás procariontes fotosintéticos (Blaurock y Stoeckenius, 1971), ya que presentan una fotosíntesis no oxidativa que únicamente funciona como bomba de protones. Además en lugar de bacterioclorofila o clorofila, presenta una proteína asociada a membrana llamada bacteriorodopsina. Esta proteína comprende el 75% del peso seco de la membrana y se encuentra regularmente dispuesta en parches. La proteína tiene un peso molecular de 26 kilodaltones (Eisenbach y Caplay, 1979).

1.1.2. CLASIFICACION DE LAS BACTERIAS FOTOSINTETICAS DEL ORDEN RHODOSPIRILLALES

Las bacterias fotosintéticas usadas en este trabajo pertenecen al orden Rhodospirillales y llevan a cabo fotosíntesis anoxigénica y de acuerdo a la clasificación de Pfenning y Trüper de 1971 este orden incluye dos subordenes que son: Rhodospirillineae y Chlorobieneae.

El Suborden Rhodospirillineae comprende organismos que contienen bacterioclorofila "a" o "b" , estos pigmentos están localizados en sistemas de membrana que se invaginan al interior del citoplasma y que se denominan cromatóforos. Este suborden contiene dos familias: Rhodospirillaceae y Chromatiaceae.

El suborden Chlorobiniales comprende bacterias con bacterioclorofila "c", "d" o "e". Tales pigmentos están localizados en estructuras especiales llamadas vesículas de "chlorobium", las cuales están unidas a la membrana citoplásmica. Este suborden contiene dos familias: Chlorobiaceae y Chloroflexaceae (Trüper, 1976).

1.1.3. CLASIFICACION Y DESCRIPCION DE Rhodospirillum rubrum

La clasificación de la bacteria utilizada es este trabajo es:

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

Rhodospirillum rubrum, posee una forma espiral y mide 0.8 μm de ancho por 7 a 10 μm de largo; se multiplica por fisión binaria; presenta flagelos polares y una pared celular separada de la membrana celular por un espacio periplásmico; la membrana celular envuelve al citoplasma y contiene al sistema de transporte de electrones. Si el crecimiento de la bacteria se lleva a cabo en condiciones de baja concentración de oxígeno o sin él, la membrana plasmática presenta unas invaginaciones que se denominan cromatóforos (Schachaman y col., 1952; Newton y Newton, 1957) y que constituyen una continuación de la misma (fig.1). En el espacio periplásmico existen proteínas que participan en el transporte de electrones como el citocromo C_2 (Vernon, 1953). En

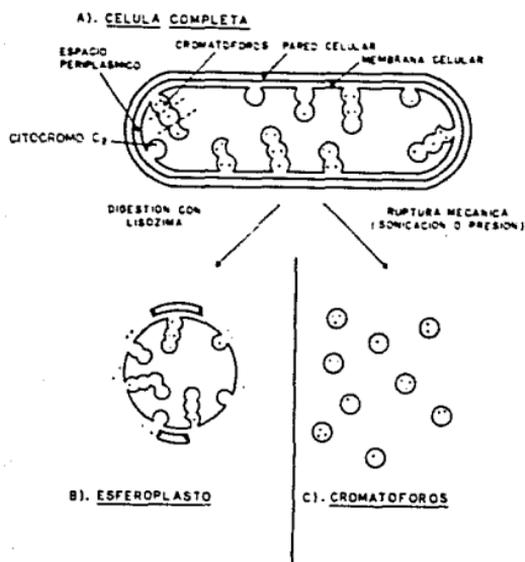


Fig. 1 Esquema General de las Bacterias Fotosintéticas que muestra la obtención de Cromatóforos y Esferoplastos a partir de la célula entera. Tomado de Crofts, 1974.

condiciones aeróbicas sin luz las bacterias, obtienen energía a partir de la oxidación de sustratos orgánicos. En la fase respiratoria, no se desarrollan las invaginaciones llamadas cromatóforos y la presencia de pigmentos está notablemente disminuida, obteniéndose cultivos con débil coloración o incoloros dependiendo, en este caso, de las presiones parciales de oxígeno en que creció dicho cultivo (Oelze y Drews, 1972).

Una población de *R. rubrum* en un amortiguador fisiológico sin alimento tiene una vida media de 344 hrs. con luz y de 12 hrs. sin luz (Dawes, 1976). Esta bacteria almacena glucógeno o Poli β -hidroxibutirato como reservorio de energía (Merrick, 1978) y requiere biotina para su crecimiento.

Puede utilizar como donadores de electrones y como fuente de carbono los siguientes compuestos : acetato, butirato, propionato, piruvato, lactato, succinato, y etanol, y, como fuente de nitrógeno, puede utilizar los aminoácidos : aspartato, glutamato y arginina o bien amonio o N_2 ; por lo tanto esta bacteria es fijadora de nitrógeno molecular.

Bajo condiciones respiratorias presenta las siguientes actividades enzimáticas: NADH oxidasa, fumarato reductasa dependiente de NADH, NADH deshidrogenasa, deshidrogenasa succínica y citocromo c oxidasa (Laskin y col., 1980).

Los principales fosfolípidos que forman parte de la membrana del cromatóforo de *R. rubrum* son fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol, encontrándose en un porcentaje menor difosfatidilglicerol (cardiolipina) y fosfatidilcolina. Al igual que todas las bacterias gram-negativas, posee una cubierta de peptidoglicano de 2 nm de grosor que cubre la pared celular y

juntas, estas dos estructuras, le dan rigidez y su forma característica.

Las quinonas que contienen son ubiquinonas y rodoquinonas, muestran que el caroteno predominante es la espiriloxantina. La Ubiquinona 10 (UQ₁₀) se encuentra tanto en condiciones fotosintéticas como en condiciones respiratorias, pero su concentración es mayor durante la fase fotosintética. La actividad de NADH -oxidasa disminuye por destrucción de la (UQ₁₀) por luz ultravioleta (Nishikawa y col., 1973).

El espectro total de la célula es muy especial debido a que: a) presenta una banda de absorción predominantemente a 550 nm debido a la espiriloxantina y b) presenta un pico de absorción sencillo y simétrico de bacterioclorofila a los 825 nm.

I.2. TRANSDUCCION ENERGETICA EN BACTERIAS FOTOSINTETICAS

GENERALIDADES

En la actualidad se ha profundizado bastante en el conocimiento del conjunto de reacciones que conducen a la síntesis de ATP en la célula.

En todos los sistemas estudiados hasta la fecha se requiere que se extraigan electrones de algún donador, ya sea el H₂O, moléculas orgánicas, H₂, compuestos sulfurosos reducidos, etc., los cuales son llevados, a través de una serie de acarreadores de electrones, a un aceptor, formando los productos reducidos correspondientes.

De todas formas, la transferencia de electrones proporciona la suficiente energía para la formación de ATP. Las etapas del

metabolismo que comienzan con la transferencia de electrones y finalizan con la síntesis de ATP, en bacterias y mitocondrias, se denomina fosforilación oxidativa; cuando este proceso es fotoinducido y la energía requerida para la síntesis de ATP proviene de la energía radiante que se transforma en energía redox, se denomina fotofosforilación y se presenta en bacterias fotosintéticas y cloroplastos.

La hipótesis que ofrece una mejor explicación sobre el acoplamiento entre la transferencia de electrones y la síntesis de ATP es la llamada hipótesis quimiosmótica propuesta por Mitchell en 1961. Esta hipótesis utiliza conceptos de fisiología de membranas, bioquímica tradicional y un concepto de reacciones vectoriales que da lugar a la transferencia de grupos químicos a través de la membrana (Mitchell, 1961 y 1967).

Los postulados básicos de esta hipótesis son:

- a) Las reacciones redox suceden en una membrana cerrada, escasamente permeable a OH^- ó H^+ .
- b) El arreglo de las moléculas transferidoras de electrones e hidrógenos es alternada, de tal forma que a una molécula acarreadora de electrones le sigue una de hidrógenos y así sucesivamente.
- c) El H^+ necesario para formar hidrógeno con el electrón es tomado de un lado de la membrana, y al encontrarse con un acarreador de electrones, es soltado del otro lado de la membrana; así se produce un gradiente de H^+ formado por dos componentes: el químico y el eléctrico.
- d) La energía total del gradiente de H^+ es la suma de ambos

componentes y es la llamada fuerza protón-motriz.

e) Esta es la fuerza que se utiliza para la síntesis de ATP mediante la acción de una enzima de membrana denominada ATP sintetasa de H^+ (ATPasa de H^+) que, a través de un flujo inverso de H^+ forma el ATP.

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

Muchas investigaciones han mostrado que los postulados básicos de esta hipótesis son ciertos; sin embargo, algunos detalles siguen en controversia, especialmente en lo que se refiere al mecanismo de síntesis de ATP por la ATPasa de H^+ (Boyer y col., 1977). La hipótesis quimiosmótica le valió a Mitchell el Premio Nobel de Química en 1978.

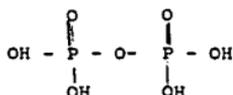
En la bacteria fotosintética se encontró que la membrana transductora de energía, aparte de sintetizar ATP, puede utilizar el gradiente electroquímico de H^+ para sintetizar pirofosfato (PPi) (Baltscheffsky y col, 1966) a través de la enzima membranaral llamada pirofosfatasa (PPiasa). Esta es una enzima reversible que al hidrolizar PPi genera un gradiente electroquímico. En este sentido, la PPiasa es una enzima semejante a la ATPasa de H^+ .

Sin embargo, la ATPasa de H^+ es una enzima muy compleja tanto molecularmente, como en su mecanismo cinético y su regulación (Senior, 1988; Futai y col., 1989). En contraste, PPiasa de membrana es una enzima más simple, tanto molecularmente como en los reactivos y productos que intervienen, por lo que el

estudio de este sistema viene a ser una alternativa para el análisis de los mecanismos de síntesis de uniones de alta energía.

I.3. GENERALIDADES DEL PPI

El PPI es el compuesto químico más simple que contiene una unión fosfoanhidra



En ausencia de Mg^{2+} la energía libre de la hidrólisis ($\Delta G''$) del PPI es cercana a la del enlace gama del ATP; sin embargo, en presencia de Mg^{2+} , el $\Delta G''$ para el PPI se vuelve menos negativo, ya que a diferencia del ATP, en donde el producto (ADP) sí se une fuertemente al Mg^{2+} , el producto de la hidrólisis del PPI (2 Pi) no se acompleja fuertemente con el Mg^{2+} (Smith y Martell., 1981). Flodgaard y Fleron (1974) obtuvieron valores muy precisos de $\Delta G''$ para la hidrólisis del PPI a pH 7.4 y 25°C. En presencia de Mg^{2+} el $\Delta G'' = -4.0 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ pero en ausencia de Mg^{2+} el $\Delta G'' = -5.7 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. Consecuentemente el pirofosfato tiene una energía libre que podría reemplazar al ATP en muchas reacciones biosintéticas (Dawes, 1986).

El PPI es el subproducto de reacciones biosintéticas como la síntesis de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Ya que muchas de estas reacciones son reversibles, se pensó durante mucho tiempo, que el único papel del PPI era el de

ser hidrolizado por las pirofosfatasa citoplásmicas , formando una barrera termodinámica que impide la reversa de estas reacciones (Reeves, 1976).

Sin embargo, hay evidencias que indican que el PPI tiene importancia en el metabolismo: 1) El PPI es usado en ciertas reacciones en lugar del ATP; 2) Es usado como fuente de energía, y 3) El PPI es sintetizado durante la fotosíntesis y fosforilación oxidativa.

1.3.1. EL PPI COMO SUBSTITUTO DEL ATP

Ejemplos interesantes de la substitución del ATP por el PPI se encuentran en los parásitos Entamoeba histolytica y Propionibacterium shermanii. Ambos son organismos fermentativos y catalizan una reacción en la cuál el PPI reemplaza el ATP en la fosforilación de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6 difosfato por la enzima PPI fosfofructocinasa (Reeves y col.,1974)

fructosa 6-fosfato + PPI \rightleftharpoons fructosa 1,6 difosfato + Pi
y así mismo, en estos organismos esta presente la piruvato fosfato dicinasa catalizando la reacción:

fosfoenolpiruvato + AMP + PPI \rightleftharpoons piruvato + ATP + Pi
y la reacción:

oxaloacetato + PPI \rightleftharpoons fosfoenolpiruvato + CO₂ + Pi
catalizada por la enzima carboxitransfosforilasa.

En algunos microorganismos hay enzimas específicas dependientes del PPI, responsables de la fosforilación de intermediarios de la glucólisis o gluconeogénesis. Simultáneamente se encontró que la enzima glucosa 6-fosfatasa es

polifuncional, ya que es capaz de efectuar síntesis de glucosa 6-fosfato, dependiente de PPI y de ATP (Lawson y Veech., 1979). Por otro lado, Cruden y col (1983), encuentran que bacterias del género Clostridium, contienen las siguientes enzimas dependientes de PPI: la carboxitransfosforilasa, la piruvato fosfodioxinasa y la PPI-fosfofructocinasa. También se descubrió que estas enzimas dependientes de PPI están ampliamente distribuidas en plantas (Edwards y col., 1985).

I.3.2. FUENTE DE ENERGIA DEL PPI

El PPI se utiliza como fuente de energía cuando se adiciona en el medio de cultivo de algunos microorganismos. Lui y col., (1982) encontraron que las bacterias del género Desulfotomaculum crecían pobremente en medios ausentes de PPI, mientras que en presencia de PPI crecían de manera abundante. Varma y col., (1983) encontraron que en Clostridium el crecimiento fue limitado (0.12 mg de proteína/ml) en ausencia de PPI y abundante (0.65 mg de proteína/ml) si se le adicionaba el PPI. En relación a esta acción promotora del crecimiento por el PPI, Varma sugiere que puede deberse a un sistema simple que genera ATP, o que el PPI sea transportado al interior de la célula en donde es usado para reacciones dependientes de energía.

I.3.3. SINTESIS DE PIROFOSFATO INORGANICO

Como se mencionó anteriormente, el PPI es un subproducto durante la síntesis de polisacáridos, lípidos, proteínas, RNA y DNA. Por otra parte, el PPI puede ser sintetizado de la misma

manera que el ATP, usando la energía radiante de la luz. En 1966, Baltscheffsky y von Stedingk demostraron que los cromatóforos de Rhodospirillum rubrum podían sintetizar PPI a través de una PPIasa membranal de una manera acoplada al transporte de electrones inducido por la luz (Baltscheffsky y col., 1967). La síntesis dependiente de energía también ocurre en organismos no fotosintéticos, como lo demuestran las investigaciones de Mansurova y col., (1976) con levaduras y en mitocondrias de hígado.

Otros descubrimientos importantes en los últimos años han sido:

- 1-. La identificación del transporte del PPI a través de la membrana interna mitocondrial en intercambio por ADP vía el translocador de adenín nucleótidos (Asimakis y Aprille., 1980)
- 2-. La generación de un potencial electroquímico a través de la membrana de bacterias fotosintéticas (Moyle y col., 1972), de la membrana interna de la mitocondria y de la membrana de plantas (Rea y Poole., 1985; Wang y col., 1986) a expensas de la energía liberada por la hidrólisis de PPI

Estas evidencias han mostrado que el PPI no sólo tiene un papel secundario en las reacciones de pirofosforólisis, sino que es un compuesto energético que juega un papel importante en la bioenergética de los organismos.

I.4. PIROFOSFATASAS INORGANICAS

Son las enzimas encargadas de catalizar la hidrólisis y la síntesis del PPI, de acuerdo con la siguiente reacción:



Existen dos tipos de pirofosfatasa en la célula, una citoplásmica y otra de membrana. La citoplásmica sólo hidroliza PPI mientras que la pirofosfatasa de membrana hidroliza y sintetiza PPI de una manera acoplada a la cadena de transporte de electrones.

I.4.1. PIROFOSFATASA CITOPLÁSMICA

Esta enzima, que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, es la encargada de desplazar el equilibrio de las reacciones biosintéticas en el sentido termodinámicamente favorable (Kornberg, 1957).

El mecanismo de reacción, las propiedades estructurales y las propiedades cinéticas de esta importante enzima han sido principalmente estudiadas en la pirofosfatasa de levadura (Cooperman, 1982). También se ha descrito su caracterización molecular, su clonación y su localización cromosómica (Kolakowski y col, 1988). En levadura, esta enzima es un homodímero con 285 aminoácidos y peso molecular de 32,042 daltones por subunidad.

Las reacciones parciales de la enzima en levadura son:
a) Hidrólisis del PPI, b) Recambio del oxígeno $\text{Pi-H}_2\text{O}^{18}$ y
c) Recambio ^{32}Pi -PPI (Cooperman, 1982).

La PPIasa citoplásmica de la bacteria fotosintética *R. rubrum* requiere de Zn^{2+} para su estabilidad y Mg^{2+} para formar el sustrato de la enzima (Klemme y Gest., 1971) y se ha propuesto una regulación alostérica debida al efecto de los cationes divalentes.

1.4.1 PIRÓFOSFATASA DE MEMBRANA

La existencia de este tipo de pirofosfatasa se reportó por primera vez en la bacteria fotosintética *R. rubrum* (Baltcheffsky y von Steding , 1966). Sin embargo, ahora se conoce su presencia en otras especies fotosintéticas como *Chromatium vinosum* (Knaff y Carr, 1979), *Rhodospseudomonas blastica* y *Rhodobacter capsulatus* (Nore y col., 1990); en mitocondria de levadura (Mansurova y col.,1975), en mitocondrias de hígado de rata y corazón de res (Mansurova y col.,1975; Mansurova y col.,1977) y en cloroplastos (Rubtsov y col.,1976).

Probablemente la pirofosfatasa de membrana mejor estudiada es la de *R. rubrum*. Esta enzima es funcionalmente semejante a la ATPasa de H^+ (presente además en la membrana de esta bacteria), pero con una estructura más sencilla, sustratos más simples e insensible al inhibidor clásico de la ATPasa de H^+ , la oligomicina. Esta enzima puede llevar a cabo las siguientes reacciones parciales: a) Síntesis de PPI, b) Hidrólisis de PPI, c) Intercambio $^{32} Pi-PPI$ y d) Recambio $Pi-H_2O^{18}$.

a) Síntesis del PPI

La formación de PPI se efectúa utilizando la energía del gradiente electroquímico de H^+ presente en las invaginaciones de la membrana plasmática de la bacteria (cromatóforos) en condiciones de iluminación (Baltcheffsky y von Stedingk.,1966) (Fig. 2). El sustrato de la enzima es el complejo $Mg-Pi$ y la reacción requiere también de Mg^{2+} libre para obtener velocidades

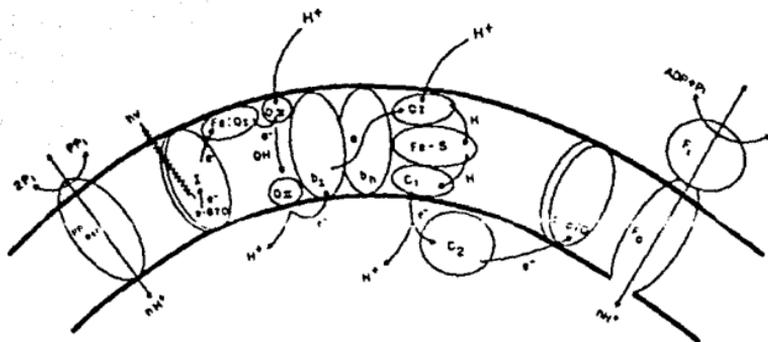


Fig. 2 Esquema de la transducción Energética en Bacterias Púrpuras no Sulfurosas. Se muestra a la H^+ ATPasa, a la PPiase y al Sistema de Transporte de electrones de la Membrana de Cromatóforo.

Simbología:

- P₈₇₀: Centro de Reacción Fotoquímico
- I: Intermediario (probablemente Bacteriofeofitina)
- Fe:Q₁: Aceptor primario, hierro ubiquinona
- Q_{II}: quinona secundaria
- b₁: b_L: citocromos b
- Q₂: ubiquinona terciaria
- Fe-S: complejo hierro-azufre de Rieske
- C₁: citodromo C₁
- F₁: Parte hidrofílica de la ATPasa (subunidades catalíticas)
- F₀: Parte hidrofóbica de la ATPasa (canal de H⁺)
- PPiase: Pirofosfatasa

máximas. El pH óptimo es de 7.5, y la síntesis de PPI es inhibida por antimicina (que es un inhibidor del transporte de electrones) y desacoplantes (disipadores del gradiente electroquímico) pero no por oligomicina que, por el contrario, la estimula (Baltscheffsky y von Stedingk.,1966).

Guillory y Fisher (1972), encontraron que el patrón de saturación de luz para la síntesis del PPI es diferente que el de la formación de ATP. Estos autores demostraron además que la formación de PPI se satura a menor intensidad luminosa que la requerida para la síntesis de ATP.

b)Hidrólisis de PPI

La enzima requiere iones Mg^{2+} no sólo para formar el complejo Mg-PPI, que es el sustrato de la enzima, sino también como activador (Randahl,1979; Celis y col.,1985). Estudios realizados por Celis y Romero (1987) sobre la hidrólisis de diferentes sustratos Metal-PPI, demostraron que el Zn^{2+} , a bajas concentraciones, es un excelente sustrato, mientras que el Co^{2+} y Mn^{2+} sustituyen pobremente al Mg^{2+} . En este sentido es interesante mencionar que altas concentraciones de Zn^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} producen un efecto inhibitorio. Por lo que se refiere a la activación por catión libre se encontró que el Mg^{2+} ejerce un efecto activador a bajas concentraciones, como resultado de una disminución en la K_m del Mg-PPI.

Por otra parte, la actividad hidrolítica está parcialmente reprimida en la luz, aún en condiciones en las que no hay síntesis de PPI (Nishikawa y col., 1973), y es inhibida por Pi,

NaF y por los análogos del PPI: imidodifosfato (IDP) y metilendifosfato (MDP); también es inhibida por butanol, a diferencia de la PPIasa citoplásmica o de la ATPasa de H^+ que no lo son. En *R. rubrum* la actividad de hidrólisis de la PPIasa es considerablemente más alta que la de la ATPasa de H^+ , y sólo se igualan cuando ambas actividades se estimulan por desacoplantes (Baltscheffsky.,1969). El pH óptimo para la reacción de hidrólisis es 6.5 (Celis y Romero.,1987).

La PPIasa 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 (Moyle y col,1972), de manera semejante a como lo hace la ATPasa de H^+ . El hecho de que la PPIasa transporte H^+ y que sea sensible a dicitclohexilcarbodimida (DCCD) sugiere que contiene un canal de H^+ semejante al de la ATPasa de H^+ .

c) Intercambio ^{32}pi -PPI

Keister y Minton (1971), encontraron que los cromatóforos de *R. rubrum* catalizan el intercambio ^{32}pi -PPI en la oscuridad. La reacción es inhibida por desacoplantes, MDP y NaF, y tiene un pH óptimo de 8.0. El intercambio requiere iones Mg^{2+} para formar los complejos $Mg-Pi$ y $Mg-PPI$, que son los sustratos verdaderos para la reacción, y se requiere también Mg^{2+} libre para obtener la máxima actividad (Celis y col.,1985). También se requiere aproximadamente de un 75% de PPI hidrolizado para obtener el recambio máximo.

Celis y Romero en 1987, encontraron que otros cationes

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

d) Recambio $Pi-H_2O^{18}$

Harvey y Keister (1981), caracterizaron esta reacción. El recambio $Pi-H_2O^{18}$ se debe exclusivamente a la PPIasa membranal, ya que es inhibido al 100% por NaF y al 70% por MDP, mientras que la oligomicina no lo afecta. Los desacoplantes tienen poco efecto en la reacción, lo que podría significar que no depende del gradiente de H^+ ; la observación de que la luz no estimula este intercambio apoya esta afirmación. Esta reacción se considera una reacción parcial de la hidrólisis del PPI. El oxígeno recambiado en ausencia de $MgCl_2$ añadido es bajo y se requiere una relación $MgCl_2/^{32}P$ de 0.8 para alcanzar las velocidades óptimas.

I.5 SOLUBILIZACION Y PURIFICACION DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA

La pirofosfatasa de membrana es una enzima integral de membrana y su purificación ha sido difícil. Rao y Keister en 1978 lograron solubilizarla por primera vez empleando el detergente colato en presencia de Mg^{2+} . En su trabajo hicieron una purificación parcial con sulfato de amonio y cromatografía de filtración en gel. La enzima solubilizada requiere de fosfolípidos para expresar su actividad.

Nyrén y col., (1984), describieron un método de

solubilización y purificación más eficiente. La solubilización se realiza en presencia del detergente Triton X-100, de etilenglicol y de altas concentraciones de Mg^{2+} , obteniéndose un alto grado de pureza mediante cromatografía en hidroxapatita. Este grupo también ha realizado una caracterización preliminar de la enzima solubilizada y la ha reconstituido en liposomas (Nyrén y Baltscheffsky, 1983).

I.6 REGULACION DE LA ENZIMA POR CATIONES DIVALENTES

Como todas las PPIasas, ya sean citoplásmicas o membranales (Lahti, 1983) la PPIasa de la membrana de R. rubrum requiere de Mg^{2+} para formar sustrato (ya sea el Mg -PPI durante la hidrólisis ó Mg -Pi en el sentido de la síntesis). Sin embargo, parece ser que el Mg^{2+} libre ejerce algún papel regulatorio sobre las propiedades catalíticas de la enzima.

Randahl en 1979, reporto que el Mg^{2+} libre puede actuar como activador en la hidrólisis del PPI y que este catión puede pegarse a la PPIasa y protegerla contra la inhibición causada por agentes como N-etilmaleimida y 4-cloro-7 nitrobenzofurazan. También se ha encontrado (Celis y col., 1985) que el Mg^{2+} libre estimula la reacción de intercambio ^{32}Pi -PPI, sugiriendo que este metal se pega a la enzima e induce un efecto favorable sobre esta reacción.

Por otro lado, datos más recientes de nuestro laboratorio (Celis y Romero, 1987) sugieren que la enzima tiene un sitio(s) para Mg^{2+} que puede ser también ocupado por otros cationes divalentes (Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , etc.); induciendo un cambio en las

propiedades cinéticas de la enzima.

Otros datos (enviados para su publicación) del laboratorio, indican que la preincubación con Mg^{2+} a $70^{\circ}C$, además de activar a la enzima, la protege de su desnaturalización. Dicho efecto es dependiente tanto de temperatura como de la concentración del catión. Al ser solubilizada la enzima se sigue observando este efecto protector aún a $65^{\circ}C$.

Como puede verse, todos estos datos sugieren un sitio regulador en la enzima para estos cationes divalentes.

Estudios referentes en la PPIasa citoplásmica de levadura (Cooperman, 1982) muestran que la enzima requiere 3 cationes divalentes para la catálisis, dos de ellos se unen directamente a la enzima, mientras el otro se coordina con el PPI para formar el sustrato. Sin embargo, no se conoce aún el papel que juegan en la catálisis estos dos cationes que se pegan a la enzima, ni su localización precisa.

También es interesante que en la ATPasa de H^{+} mitocondrial, altas concentraciones de Mg^{2+} provocan un incremento de la relación del ATP hidrolizado y el ATP que se intercambia (Senior, 1981).

Por otra parte, Younis y col (1983) reportan medidas directas de un sitio para Mg^{2+} en la ATPasa de H^{+} de cloroplasto que participa en el proceso de transducción energética.

De acuerdo a lo anterior, es probable que una característica común a las enzimas transductoras de energía sea un requerimiento de metales divalentes para formar, en primer lugar, su sustrato y en segundo, al unirse a sitios específicos,

para inducir cambios en la cinética de la enzima. Por consiguiente, el papel de estos cationes en el mecanismo de transducción energética requiere de estudios más profundos.

1.7 LANTANIDOS

Estrictamente hablando, son lantánidos los 14 elementos que siguen al lantano en la tabla periódica, en los cuales se va llenando paulatinamente el nivel 4f con los 14 electrones que se agregan a la configuración del lantano. El término lantánidos se emplea para indicar que estos elementos forman un grupo muy vinculado, cuyas propiedades químicas se asemejan a la del lantano en forma tal que este elemento se considera como prototipo.

En estado natural se les encuentra como mezcla de óxidos en minerales, siendo la monoxita uno de los más importantes. Esencialmente se encuentran unidos a ortofosfato y a minerales del grupo del calcio. La Tabla 1 resume algunas de las principales características de los elementos de este grupo.

Estos elementos se han encontrado como traza en algunos organismos, sin embargo no parecen jugar un papel bioquímico conocido. Williams y Birnbaum (1970) fueron los primeros que resaltaron la importancia de los lantánidos en los estudios sobre el papel del Ca^{2+} en la actividad enzimática, ya que debido a su similitud en el radio iónico, compiten con el calcio por los sitios de fijación específicos; de esta manera se ha podido identificar el efecto modulador que ejerce el Ca^{2+} sobre la tripsina, la acetilcolinesterasa y la ATPasa de Ca^{2+} (Evans,

Número atómico	Nombre	Símbolo	Estado de oxidación			Radio iónico	Coloración
			M ²⁺	M ³⁺	M ⁴⁺		
57	Lantano	La	-	[Xe]	-	1.061	incoloro
58	Cerio	Ce	-	4f	[Xe]	1.034	incoloro
59	Praseodimio	Pr	-	4f ²	4f	1.013	verde
60	Neodimio	Nd	4f ⁴	4f ³	4f ²	0.995	violeta
61	Promecio	Pm	-	4f ⁴	-	0.979	rosa
62	Samario	Sm	4f ⁶	4f ⁵	-	0.964	amarillo
63	Europio	Eu	4f ⁷	4f ⁶	-	0.950	rosa
64	Gadolinio	Gd	-	4f ⁷	-	0.938	incoloro
65	Terbio	Tb	-	4f ⁸	4f ⁷	0.923	rosa
66	Disproseo	Dy	-	4f ⁹	4f ⁸	0.908	amarillo
67	Holmio	Ho	-	4f ¹⁰	-	0.894	amarillo
68	Erbio	Er	-	4f ¹¹	-	0.881	rojizo
69	Tulio	Tm	4f ¹³	4f ¹²	-	0.869	verde
70	Yterbio	Yb	4f ¹⁴	4f ¹³	-	0.853	incoloro
71	Lutecio	Lu	-	4f ¹⁴	-	0.848	

Tabla 1 : Se dan solamente los electrones de la capa de valencia, es decir, aquellos que están fuera de la capa del [Xe].
 Un guión indica que el estado de oxidación de que se trata no se encuentra en ningún compuesto aislable.

1983). De igual manera son utilizados para determinar en otras enzimas los sitios para Mg^{2+} y otros cationes (Martin y Richardson, 1979). Otro empleo de estos elementos es en estudios de transporte, ya que puede funcionar como bloqueadores de canales de Na^+ y K^+ (Yang, 1989).

Debido a sus propiedades magnéticas pueden ser utilizados en estudios de NMR y EPR dando señales características que identifican sitios activos en las enzimas que los unen específicamente. Por otra parte, se han empleado en la determinación del número de solvatación de moléculas (Evans, 1983).

Aunque los lantánidos fluorescen débilmente en solución acuosa, los iones terbio (Tb) presentan una intensidad de fluorescencia que depende del ambiente en que se encuentren, siendo usados en estudios cuantitativos de residuos de aminoácidos aromáticos en proteínas (Evans, 1983).

En nuestro trabajo en particular, es interesante encontrar que estos cationes presentan una constante de asociación muy grande por pirofosfato, utilizándose para investigar el papel de los cationes como sustrato en la pirofosfatasa citoplásmica de levadura (Ting, 1984).

1.8 OBJETIVOS

Teniendo en consideración que el Mg^{2+} aparte de requerirse para formar el sustrato de la enzima, se necesita para ejercer un papel regulatorio sobre la misma, es claro que, prácticamente, es difícil distinguir estos dos efectos.

Por esta razón, se pensó en trabajar con complejos M (III)-PPI como sustrato y observar independientemente el efecto de los cationes divalentes sobre la actividad de la enzima.

Dado que la constante de asociación (K_s) de los cationes trivalentes (La^{3+} , Tb^{3+} , Nd^{3+} , Fe^{3+} , etc) por el PPI está en el orden de $1 \times 10^{17} M^{-1}$ (Smith y Martell, 1976) y la K_s de, por ejemplo, el Mg^{2+} por el PPI es de $1 \times 10^6 M^{-1}$, es de esperarse que en una solución que contenga PPI, Mg^{2+} y catión trivalente, el PPI formara preferentemente un complejo con el metal trivalente, mientras que el metal divalente quedará prácticamente libre. De esta manera sera posible diferenciar su efecto regulador sobre la enzima.

Con el razonamiento anterior se plantearon los siguientes objetivos de trabajo:

1. Estudiar si los complejos M (III)-PPI pueden ser sustratos de la PPIasa de membrana e hidrolizarse.
2. Investigar el efecto que ejercen los cationes divalentes libres sobre la hidrólisis de los complejos M (III)-PPI.
3. Obtener las constantes cinéticas (K_m y V_{\max}) para los complejos M (III)-PPI activados por cationes divalentes y relacionarlas con las constantes cinéticas del sustrato real de la enzima Mg -PPI.

MATERIALES Y METODOS

2.1 CULTIVO DE BACTERIAS

Se utilizó la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum en todos los experimentos. La cepa se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC 11176).

2.1.1 MEDIOS DE CULTIVO

Los cultivos de esta bacteria se crecieron en medio sólido y líquido

a) Medio sólido .

En un volumen final de 1 litro se disuelven:

Extracto de Levadura.....	3 g
Peptona de gelatina.....	2 g
Agar Bacteriológico.....	1 g

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

b) Medio líquido

Se preparó el medio líquido con base en el método de Cohen-Bazire y col (1957), el cual es una modificación del propuesto por Hunter (1950).

La preparación del medio requirió de las siguientes soluciones:

i) Base concentrada. Un volumen de 2 l contiene:

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

Se ajusta a un pH de 6.8.

Solución de Metales "44". La solución de metales "44" que se utiliza en la base concentrada es:

EDTA.....	2.5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.0 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	11.0 mg
$MnSO_4$ ó	1.54 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.37 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.392 g
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.248 g
$Na_2B_4O_7 \cdot 6H_2O$	0.177 g
H_2SO_4	aprox. 4 gotas

La solución se afora a 1 l con agua destilada y se adicionan unas gotas de H_2SO_4 para permitir que se disuelvan los metales.

ii) KH_2PO_4 136.08 g para 1 l de agua destilada, y se ajusta el pH a 6.8.

iii) Acido succínico, 100 g para 1 l de agua destilada, y

se ajusta el pH a 6.8.

iv) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 g para 1 l de agua destilada.

v) NaCl 50 g para 1 l de agua destilada.

vi) Acido L-glutámico, 25 g para 250 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 6.8.

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

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

i) Base Concentrada.....	250	ml
ii) KH_2PO_4	250	ml
iii) Acido Succínico.....	250	ml
iv) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	62.5	ml
v) NaCl.....	125	ml
vi) Acido L-glutámico.....	25	ml
vii) Acido L-aspártico.....	25	ml
viii) Peptona de gelatina.....	12.5	g
ix) Acido Nicotínico.....	12.5	mg
x) Tiamina.....	6.25	mg
xi) Biotina.....	0.125	mg

El medio se afora a 12.5 l con agua desionizada y se ajusta a un pH de 6.8 y se esteriliza en el autoclave durante 45 minutos. Cuando el medio está caliente se forma un precipitado que se disuelve a temperatura ambiente . El medio es translúcido y de un color amarillo claro.

2.1.2 SIEMBRA DE BACTERIAS.

Las bacterias fueron sembradas en placa con inóculos muy diluidos para formar colonias sencillas. Se tomó una muestra de una colonia para sembrarlas por punción en frascos con medio sólido. Posteriormente se incubaron durante 12 hrs en la obscuridad para que el crecimiento respiratorio de las bacterias consuma el O_2 presente. Enseguida se expusieron a focos con filamento de tungsteno de 40 watts, a una distancia de 30 cm de la luz a una temperatura de $30^{\circ}C$.

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

Se le agrega medio líquido a los frascos de medio sólido y se agitan para desprender alguna colonia, de nuevo se guardan los frascos en obscuridad durante 12 hrs, y posteriormente se exponen a la luz a $30^{\circ}C$. A los 7 días aproximadamente se obtiene el cultivo fotosintético, el cual se vacía en matraces de 100 ml con medio líquido, agregando la cantidad suficiente para no mojar el tapón de hule estéril, pero dejando la menor cantidad de O_2 posible. Se repite de nuevo el ciclo obscuridad-luz indicado para obtener un cultivo en condiciones fotosintéticas. Este procedimiento se repite trasladando el cultivo a un frasco de 1 l y posteriormente a uno de 9 l.

2.1.3 COSECHA DE BACTERIAS.

Se procedió a cosechar el cultivo a los 7 días aproximadamente, cuando éste alcanzó la fase logarítmica tardía. La curva de crecimiento se obtuvo con un fotocolorímetro con filtro rojo (fotocolorímetro Klett-Summerson).

La cosecha se realizó por centrifugaciones sucesivas del medio de cultivo a 8 000 x g durante 15 minutos, obteniéndose pastillas de bacterias, las cuales se lavaron dos veces en un amortiguador MOPS 50 mM y KCl 50 mM pH 7.5 y se centrifugaron a 8 000 x g durante 15 minutos, eliminando así los residuos del medio y los desechos. Las pastillas se pesan y se guardan en un refrigerador REVCO a -70°C.

2.2 OBTENCION DE CROMATOFOROS.

A partir de las bacterias se obtienen los cromatóforos con el procedimiento reportado por Baccarini-Melandri y col., (1970):

- Se resuspenden las bacterias en un amortiguador Tris-Cl 10 mM pH 7.5 en relación 1:10 (peso: volumen), se homogenizan y se les agrega DNAasa en proporción de 1 mg por 100 g de peso húmedo de bacterias y 1 mM de $MgSO_4$.
- Se sonicán en volúmenes de 15 ml durante 2 minutos en un sonicador tipo M.S.E. a la máxima potencia, en un baño de hielo a 4°C (Scholes y col., 1969).
- Se centrifugan a 20 000 x g durante 20 min, para eliminar las células sin romper, cápsulas, etc, que quedan en el precipitado. Se toma el sobrenadante y se centrifuga a 100 000 x g durante 80

min.

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

- El precipitado obtenido se resuspende en Tris-Cl 10 mM, pH 7.5 y se centrifuga a 100 000 x g durante 80 min para lavar el exceso de quelantes.

- Se resuspende la pastilla de cromatóforos en el amortiguador del paso anterior a una concentración de proteína cercana a 25 mg/ml.

- La preparación de cromatóforos se guarda a 4°C durante los siguientes tres días, ya que en este lapso de tiempo no se han detectado cambios en la actividad de pirofosfatasa.

2.3 DETERMINACION DE PROTEINA.

La cantidad de proteína para los ensayos se determinó por el método de Lowry y col., (1951), utilizando estandares de albúmina de suero de bovino (BSA) y un intervalo de concentración de 0 a 400 µg de proteína/ ml.

2.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA EN EL CROMATOPORO.

La actividad de pirofosfatasa se determinó cuantificando el fosfato (Pi) liberado a partir de la hidrólisis del PPI, a 30°C .

La PPIasa se incubó en la oscuridad, para evitar la síntesis del PPI promovida por la energía de la luz; por tal motivo, se utilizó un cuarto iluminado con luz verde de seguridad (Schiff, 1972).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 0.5 ml, agregando 1 mg de proteína de cromatóforo por tubo. El medio también contenía Tris-maléico 50 mM pH 6, $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ en concentraciones equimoleculares con M (III) y cationes divalentes libres.

La reacción se inició con la adición de la enzima (cromatóforos) al medio de reacción, y se determinaron las velocidades iniciales; la reacción se terminó agregando 0.1 ml de TCA al 30% (p/v). Finalmente se centrifugó el ensayo a 3000 rpm durante 10 min y se determinó la cantidad de Pi liberado en el sobrenadante.

Se utilizaron dos métodos colorimétricos de diferente sensibilidad para la cuantificación del fosfato liberado en el medio de reacción:

i) El de Sumner (1944), con una sensibilidad de 80 a 1600 nmoles.

Reactivos:

- I:
- a) Molibdato de amonio 80 g
 - b) Agua bidestilada 800 ml
 - c) H_2SO_4 110 ml

- II:
- a) Sulfato de Elon 10 g
 - b) Metabisulfito de sodio 30 g

c) Agua bidestilada 1.0 l

- Se pone la muestra de Pi y agua bidestilada en un volumen de 2 ml. Agitar.
- Agregar molibdato - ácido sulfurico (I) 0.25 ml. Agitar.
- Agregar Elon (II) 0.25 ml. Agitar.
- Esperar 10 minutos.
- Leer absorbancia a 660 nm.

ii) El de Chase y Shaw (1956), que tiene una sensibilidad de 10 a 70 nmoles.

Reactivos:

- a) Acido ascórbico 10%. Debe prepararse en el momento de su uso.
- b) Molibdato de amonio al 42% en una solución 1 N de H_2SO_4 . Es estable a temperatura ambiente.

Mezcla:

Una parte de (a) por 6 partes de (b).

- Se añade 0.7 ml de mezcla a 0.3 ml de solución de fosfato en un tubo de ensaye y se incuba durante 20 minutos a 45°C ó una hora a 30°C. Se lee absorbancia a 820 nm.

Para la cuantificación se realizaron curvas patrones con estándares de fosfato en ambos casos.

La actividad especifica de hidrólisis se expresó en nmoles de Pi/ (min . mg) de proteína.

2.5 DETERMINACION DE PRECIPITADOS EN LAS SOLUCIONES.

El cloruro de lantano y el pirofosfato de sodio en solución

acuosa tiene un valor de pH de 5.7 y 10.2 respectivamente. Su relación estequiométrica de mezcla a pH básicos es menor que 0.75, por lo que la sal formada $La_4 (P_2O_7)_3 \cdot 8 H_2O$ se precipita. Por otra parte, la reacción en un medio ácido (por ejemplo HCl 1 N) tiene una relación estequiométrica mayor que 0.75 formandose la sal $LaHP_2O_7 \cdot 2H_2O$, que es un complejo más soluble (Sheka y Sinyavskaya.,1966).

Nosotros trabajamos a pH 6 por lo que determinamos la existencia de precipitados; para cuantificar la cantidad de PPI libre, no precipitado, utilizamos un método colorimétrico (Heinonen y Kukko.,1981). Las mediciones se realizaron bajo nuestras condiciones experimentales (tris maléico 50 mM pH 6.0, a 30°C). Y se obtuvieron una curva estandar de PPI y una curva del complejo La-PPI para el mismo intervalo de concentraciones.

Reactivos:

- a) H_2SO_4 5N
- b) Heptamolibdato de amonio 40 mM
- c) Trietilamina
- d) Solución MT 4 ml (b), 1 ml (a) y 50 ul (c)
- e) 2-mercaptoetanol 1 M

- Se toma la muestra de PPI y se le agrega 200 µl de solución (a).
- Se afora a 2 ml con agua bidestilada.
- Se agrega 1 ml de la solución MT. Se espera 15 minutos.
- Se agrega 500 µl de (a) y 150 µl de 2-mercaptoetanol.
- Se espera 15 minutos y se lee absorbancia a 700nm.

2.6 MEDICIONES DE FLUORESCENCIA.

El complejo de La-PPI se midió utilizando espectrofotometría de fluorescencia . El aparato empleado fue un espectrofotómetro de Fluorescencia Modelo 650-15, Hitachi. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm y la de emisión de 350 nm, con base en el trabajo de Hashimoto y Rotteberg, 1983, y del espectro de emisión obtenido experimentalmente.

2.7 CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS ESPECIES LIBRES Y DE LOS COMPLEJOS EN EL MEDIO DE REACCION.

Las concentraciones de los metales libres, de los ligandos (diferentes formas iónicas del PPI) y de los complejos Metal-Ligando (M-L) se calcularon con un programa de computadora . Este programa resuelve el sistema de ecuaciones simultáneas que describen el equilibrio que existe entre las diferentes especies involucradas en la formación de los complejos y las especies libres. El programa fue elaborado por el Dr. Kentish C. del "Departament of Physiology University College, London University" y por el Dr. Mas O. del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El programa se corrió en una minicomputadora PDP 11 34 Digital.

Las constantes de asociación (K_a) utilizadas se tomaron de Martell y Sillén (1971) y de Smith y Martell (1976), las cuales se definen como :

$$K_a = [ML] / [M] [L] \quad \text{en donde M = metal y L = ligando.}$$

Logaritmos de las constantes de asociación.

Complejo	log de K_a
PPi H	8.3
PPi H ₂	6.0
PPi H ₃	2.7
PPi H ₄	2.5
PPi- Mg.....	6.0
PPi- Zn.....	11.66
PPi- La.....	16.72
PPi- La ₂	19.53
PPi- Nd ₂	19.98
PPi- Tb ₂	20.50
PPi-Fe ₂	23.00

3 RESULTADOS Y DISCUSION

Para principiar nuestro trabajo decidimos centrarnos en el estudio del complejo La-PPi. Esta elección se debió a que el La^{3+} es el catión prototipo de la serie de trivalentes a estudiar, a que se conoce su K_a por el PPI y a su relativa disponibilidad. Por esta razón en los siguientes experimentos se utilizó este complejo y en las últimas secciones se emplearán otros complejos M (III)-PPi.

Por otra parte, la concentración de cationes divalentes empleada fue de 1 mM para el Mg^{2+} y 0.5 mM para el Zn^{2+} , esto con base en el trabajo previo realizado en el laboratorio.

3.1. ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA, UTILIZANDO COMO SUSTRATO AL COMPLEJO La-PPi

Teniendo en consideración que el complejo La-PPi es diferente del sustrato de la enzima Mg-PPi, lo primero que se quiso determinar fue si podía ser reconocido e hidrolizado por la enzima. Dado que la solubilidad del complejo La-PPi es dependiente del pH, siendo más soluble a pH ácido, y dado que el pH óptimo para la hidrólisis de pirofosfato es de 6.5, decidimos medir la actividad a pH 6.0, donde todavía la enzima tiene una buena actividad hidrolítica (Celis y Romero, 1986) y tratando de tener al complejo lo más soluble posible (Véase sección 3.7).

En el curso temporal que se presenta en la Fig. 3 se observa que utilizando 0.5 mM del complejo La-PPi, la enzima sólo hidroliza 5 nmoles de Pi/ mg de proteína en 5 minutos; esta baja

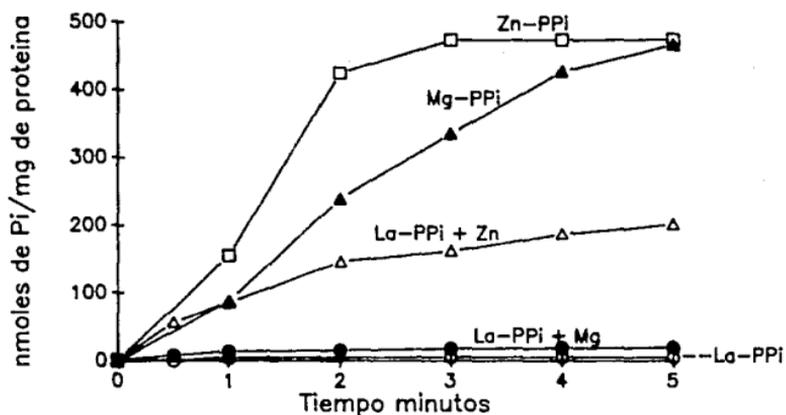


Fig.3 Curso temporal de la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa de membrana, usando como sustrato al La-PPi en ausencia y presencia de catión libre. Medio de reacción : Tris-maléico 50 mM pH 6.0, $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 0.5 mM, LaCl_3 0.5 mM; temperatura de incubación 30°C. e sin catión libre, e con 1 mM de MgCl_2 , e con 0.5 mM de ZnCl_2 . Las otras dos curvas son controles de la hidrólisis de la enzima con: e MgCl_2 1 mM y $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 0.5 mM ; e ZnCl_2 0.5 mM y $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 0.5 mM.

hidrólisis se obtuvo incluso a tiempos largos (60 min, datos no mostrados en la Fig. 3). Al añadir al medio 1 mM de Mg^{2+} libre, el complejo La-PPi se hidroliza con una actividad específica de 20.17 nmoles Pi/mg de proteína en 5 minutos. Sin embargo, cuando se añade al medio 0.5 mM de Zn^{2+} libre en lugar de Mg^{2+} , tenemos una considerable hidrólisis del La-PPi (en 5 minutos, 201 nmoles Pi/mg de proteína). Como puede observarse, este es un efecto activador que depende del tipo de catión divalente libre que esté en el medio de reacción. Como parámetro de comparación, en la Fig. 3 se presenta también la actividad del complejo Mg-PPi y Zn-PPi a las concentraciones de 1 mM Mg^{2+} y 0.5 mM Zn^{2+} con 0.5 mM de PPi en ambos casos; se aprecia que la hidrólisis de La-PPi activado por Zn^{2+} ó Mg^{2+} libre es menor que la de los complejos Mg-PPi ó Zn-PPi.

3.2 CINÉTICA DE LA HIDROLISIS DEL COMPLEJO La-PPi Y LA ACTIVACION POR Mg^{2+} O Zn^{2+}

Una vez determinado el efecto activador del Mg^{2+} y el Zn^{2+} sobre la hidrólisis del complejo La-PPi, se procedió a estudiar su cinética. Con base en los datos del experimento anterior utilizamos como velocidad inicial un tiempo de reacción de 1 minuto.

En la Fig. 4 se muestra la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa de membrana, variando la concentración del complejo La-PPi, en presencia de una concentración fija de catión divalente. En ausencia de cationes divalentes, la actividad de pirofosfatasa alcanza un máximo cuando la concentración del,

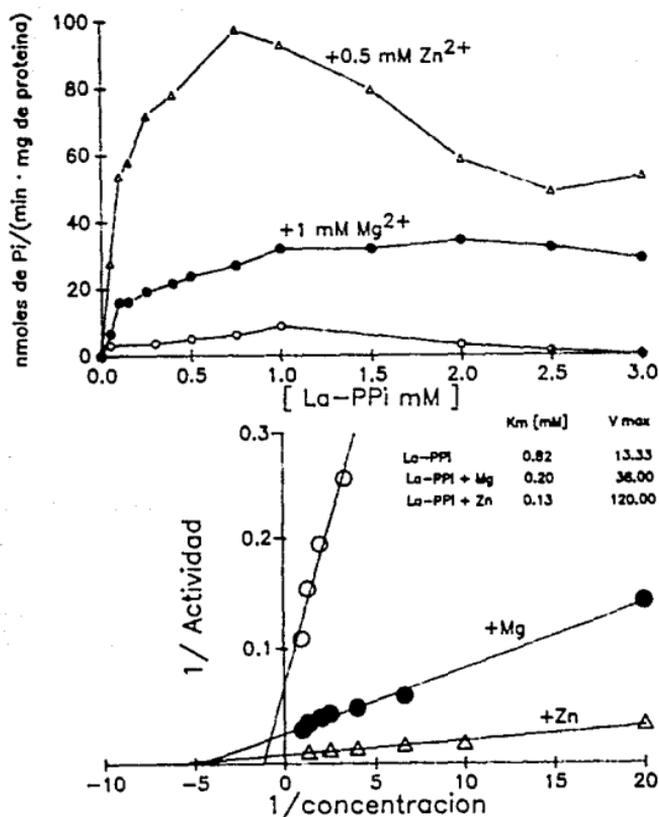


Fig.4 Cinética de la hidrólisis del complejo La-PPi y la activación por Mg²⁺ y Zn²⁺. Medio de reacción : Tris-maléico 50 mM pH 6.0, la concentración de LaCl₂ y Na₂P₂O₇ como se indica en la figura, se incuba el sistema a 30°C y durante 1 min. de tiempo de reacción [○] sin catión libre, [●] con 1 mM de MgCl₂ y [△] con 0.5 mM de ZnCl₂.

complejo La-PPI es de 1 mM, para luego disminuir a concentraciones altas. Es conveniente recordar que la solubilidad del complejo La-PPI, aparte de ser dependiente del pH, es dependiente de la concentración, por lo que a partir de 1 mM se observa la precipitación del mismo. Sin embargo creemos que esta no es la causa del decremento en la actividad, ya que al determinar la cantidad de PPI, se encontró en el medio de reacción; a 3 mM de La-PPI un 65% de PPI soluble (ver sección 3.7).

La hidrólisis del complejo La-PPI en presencia de 1 mM de Mg^{2+} se incrementa, observándose una cinética de saturación a partir de 1 mM.

El complejo La-PPI con 0.5 mM de Zn^{2+} libre presenta un comportamiento en la actividad de hidrólisis 3 veces mayor con respecto al del Mg^{2+} a bajas concentraciones; sin embargo existe a partir de 0.75 mM de sustrato, una disminución marcada de la actividad. Esto podría atribuirse a que el sustrato puede ser un inhibidor en altas concentraciones, lo cual requiere de un estudio más detallado.

Los valores de K_m y $V_{máx}$ fueron obtenidos a través de la gráfica de Lineweaver-Burk (Fig. 4 abajo) tomando los valores hasta 1 mM de sustrato, para evitar efector inhibitorios y fueron los siguientes:

Sustrato	Catión libre	K_m (mM)	$V_{máx}$ nmoles Pi/(mg de prot-min)
La-PPI	-	0.81	14.83
La-PPI	1 mM Mg^{2+}	0.2	36.00
La-PPI	0.5 mM Zn^{2+}	0.13	120.00

Como puede notarse, en presencia de cationes divalentes libres la K_m disminuye considerablemente, aumenta la $V_{m\acute{a}x}$, indicandonos un efecto activador del cati3n. As3 mismo, puede apreciarse diferencias en la constante para cada tipo de cati3n.

Para analizar mejor los efectos observados en este experimento, se llevo a cabo el an3lisis que se describe en la siguiente secci3n.

3.2.1 EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE La-PPi, La³⁺ LIBRE, PPI LIBRE, Mg²⁺ LIBRE Y Mg-PPi

Utilizando las constantes de asociación reportadas (Martell y Sillén, 1971; Smith y Martell, 1976) se calcularon en la computadora, con el programa Iones, las concentraciones de los complejos y de las formas libres de las especies que intervinieron en el experimento de la Fig. 4. Para éste análisis únicamente tomamos los valores hasta 1 mM, para evitar los efectos de inhibición que se observaron en el caso del Zn²⁺. Estos datos se graficaron, en la Fig. 5, para el caso del Mg²⁺ y en la Fig. 6 para el caso del Zn²⁺.

En la Fig. 5 se puede observar que al incrementar la concentración de La-PPi, manteniendo fija la cantidad de catión divalente libre, la actividad hidrolítica aumenta de una manera semejante a la del complejo La-PPi, indicando que es éste complejo el que está siendo hidrolizado por la enzima. También existe, como puede verse en la Fig. 5, una pequeña cantidad de complejo Mg-PPi formado (a 1 mM de La-PPi añadido, hay 0.125 µM de Mg-PPi). Para corroborar que la hidrólisis obtenida no era debida a esta concentración de Mg-PPi se determinó la hidrólisis del complejo Mg-PPi a 0.125 µM y 1 mM de Mg libre. La actividad obtenida fue de cero, indicándonos nuevamente que la hidrólisis que observamos es debida al complejo La-PPi activado por Mg²⁺ y no al complejo Mg-PPi.

3.2.2 EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE La-PPi, La³⁺ LIBRE, PPI LIBRE, Zn²⁺ LIBRE Y Zn-PPi

Para el caso de la hidrólisis del La-PPi en presencia del Zn²⁺ libre, el análisis de la Fig. 6 indica un comportamiento semejante al del caso con Mg²⁺ libre y se ve claramente que la actividad depende de la concentración de La-PPi. Aquí también existe un complejo Zn-PPi cuya concentración es mayor con respecto a la calculada para el Mg²⁺ libre, ya que la constante del Zn²⁺ por el PPI es mayor que la del Mg²⁺. Al realizar el experimento con esta cantidad de complejo Zn-PPi y 0.5 mM de Zn²⁺ libre, observamos que no hubo actividad hidrolítica, lo que nos indica que la cantidad aportada por este complejo es nula.

Tanto en la Fig. 5, como en la Fig. 6, la cantidad de PPI libre es muy baja (abajo de 0.1 pM). Dado que el PPI libre es un inhibidor muy débil para esta enzima, teniendo una Ki del orden de mM (Sosa y col, 1991) el PPI libre que tenemos en nuestro experimento no debe estar inhibiendo a la PPIasa.

La cantidad de La³⁺ libre en este experimento es, para el caso de la actividad estimulada por Mg²⁺, de 0.2 nM en la máxima concentración de sustrato; mientras que para la actividad estimulada por Zn²⁺, hay 0.4 nM de La³⁺. Se ha reportado que en la ATPasa de Ca²⁺ de vesículas de retículo sarcoplásmico (Fujimori y Jencks, 1990) el La³⁺ libre inhibe al 50% la hidrólisis de ATP a una concentración de 0.16 nM. Por lo tanto podríamos pensar que la inhibición obtenida a altas concentraciones de sustrato La-PPi, en la actividad estimulada por Zn²⁺, podría deberse a la presencia de La³⁺ libre; sin

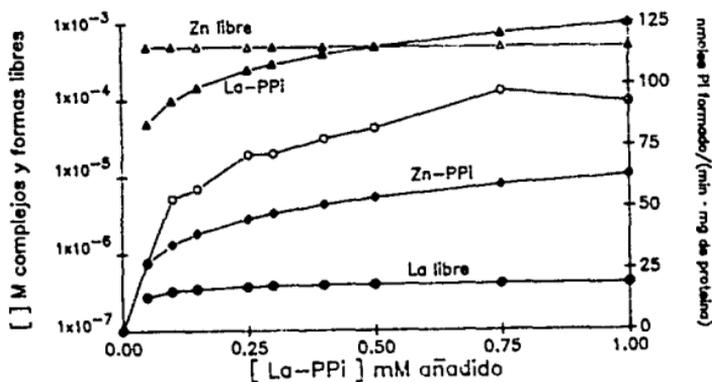


Fig.6 Relación de la Actividad hidrolítica de la pirofosfatasa con la concentración de los complejos de PPI y las especies libres involucrada en el experimento de la Fig.4. La actividad hidrolítica (o) se grafica en el eje de la derecha y las concentraciones calculadas para cada especie se encuentran en el eje de la izquierda.

embargo, esto solo puede determinarse, para nuestro sistema obteniendo la K_i de La^{3+} libre.

En resumen, este análisis nos indica que en presencia de Mg^{2+} ó Zn^{2+} el complejo que está siendo hidrolizado es el La-PPI.

3.3 EFECTO DE LA CONCENTRACION Y DEL TIPO DE CATION LIBRE EN LA REACCION DE HIDROLISIS DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA, UTILIZANDO COMO SUSTRATO La-PPI

Para averiguar si otros cationes divalentes ejercían un efecto semejante al encontrado para el Mg^{2+} y el Zn^{2+} sobre la hidrólisis del complejo La-PPI, se probaron los siguientes divalentes: Co^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} . La Fig. 7 muestra el efecto de concentraciones crecientes de diferentes cationes divalentes sobre la actividad de la pirofosfatasa de membrana, manteniendo fija la concentración del sustrato La-PPI a 0.5 mM.

A excepción del Mg^{2+} , que aumenta la actividad de la enzima al aumentar su concentración, todos los demás cationes presentan un efecto bifásico sobre la hidrólisis de La-PPI, incrementando la actividad enzimática a bajas concentraciones, pero inhibiéndola a altas concentraciones.

Como puede verse, la estimulación de la hidrólisis del complejo La-PPI depende tanto de la concentración, como del catión divalente utilizado en la reacción.

Para tratar de entender mejor lo que sucedía en este experimento, se calcularon las concentraciones de los complejos y especies libres que se formaban utilizando como ejemplo 2 cationes: el Mg^{2+} y el Zn^{2+} (éste último con efecto bifásico).

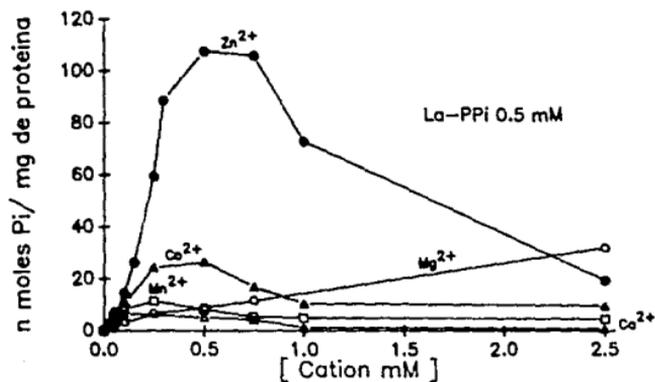


Fig.7 Efecto de diferentes cationes divalentes sobre la hidrólisis del complejo La-PPI. Medio de reacción : Tris-maléico 50 mM pH 6.0, LaCl₂ 0.5 mM, Na₂P₂O₇ 0.5 mM se incubó al sistema a 30°C durante 1 minuto con los siguientes cationes: ○-Mg²⁺, ●-Zn²⁺, □-Mn²⁺, ▲-Co²⁺ y △-Ca²⁺.

3.3.1 ANALISIS DE LAS CONCENTRACIONES CALCULADAS DE LOS COMPLEJOS Y ESPECIES LIBRES DE LA FIG.7

Mg.- Tomando los datos para Mg^{2+} del experimento de la Fig. 7 y tomando en consideración las constantes de asociación apropiadas, se calcularon las concentraciones de los complejos y especies libres involucradas en dicho experimento y se graficó en la Fig. 8. Se puede observar cómo la concentración de complejo La-PPI se mantiene constante y la concentración de Mg^{2+} libre aumenta a lo largo de la gráfica. Aunque se produce el complejo Mg-PPI, éste alcanza, en su nivel máximo, una concentración de 0.4 μM , concentración a la cual no es perceptible la hidrólisis de este complejo. Por lo tanto, el único responsable del efecto activador es el Mg^{2+} libre. Las concentraciones de PPI libre pueden despreciarse pues están en el orden de 0.01 nM.

Zn.- De la misma manera que se calcularon los complejos y especies libres para el caso del Mg^{2+} , se calcularon los correspondientes para el caso del Zn^{2+} . Estos datos se muestran en la Fig. 9. El complejo La-PPI se mantiene constante a lo largo del experimento mientras que la concentración de Zn^{2+} libre aumenta. La actividad hidrolítica, que como ya se indicó presenta un comportamiento bifásico, se incrementa hasta 0.5 mM de $ZnCl_2$. Este primer efecto puede ser debido, de acuerdo a la gráfica, a dos factores: 1^o al aumento de Zn^{2+} libre y 2^o al ligero aumento del complejo Zn-PPI.

Para descartar la 2a. posibilidad, se comprobó que no había actividad hidrolítica en el punto de máxima hidrólisis obtenida,

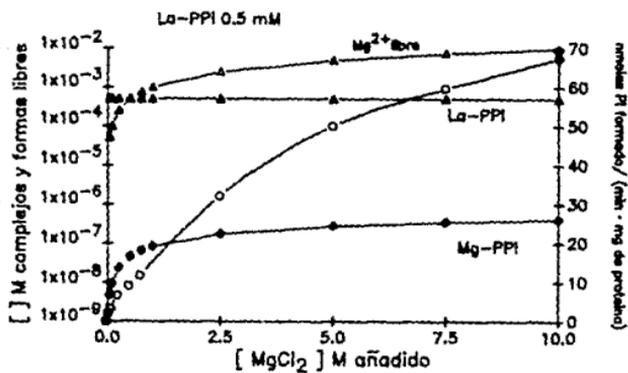


Fig.8 Análisis de las concentraciones calculadas de los complejos de La-PPI y Mg-PPI y de las especies libres involucradas en el experimento de la Fig.7. La actividad hidrolítica se encuentra en el eje de la derecha y los datos calculados en el eje de la izquierda.

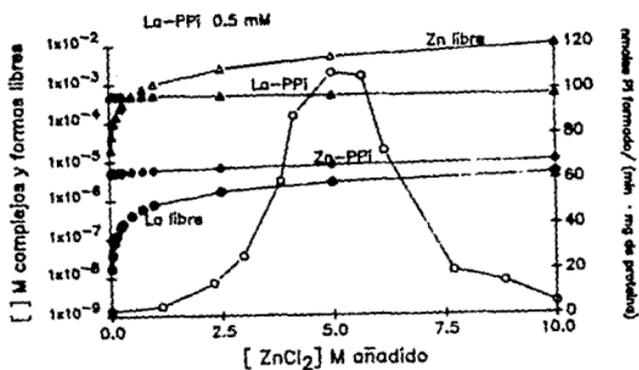


Fig. 9 Análisis de las concentraciones de los complejos La-PPi y Zn-PPi y de las especies libres involucradas en el experimento de la Fig. 7. La actividad hidrolítica experimental se encuentra en el eje de la derecha y los datos calculados en el eje de la izquierda.

que corresponde a una concentración de 0.54 μM de Zn-PPi y 0.5 mM Zn^{2+} libre. Por lo tanto, la activación observada solo puede deberse al efecto del Zn^{2+} libre sobre la enzima.

En la gráfica también se observa un incremento de la concentración libre de La^{3+} , aunque esta es pequeña (0.05 μM); sin embargo, teniendo en consideración los datos ya referidos en la ATPasa de Ca^{2+} de vesículas de retículo sarcoplásmico, consideramos que en este experimento no hay un efecto inhibitorio importante del catión trivalente libre. Aunque esto solo podría comprobarse obteniéndose la K_i de La^{3+} para este sistema.

De estos experimentos podemos concluir que la activación de la hidrólisis del complejo La-PPi depende del tipo y concentración del catión divalente empleado.

3.4 CINÉTICA DE LA HIDROLISIS DE DIFERENTES COMPLEJOS M (III)- PPI ACTIVADA POR Mg^{2+} LIBRE

Una vez caracterizada la activación de la hidrólisis del complejo La-PPI por cationes divalentes, se trató de examinar la especificidad de la pirofosfatasa de membrana por otros sustratos M (III)-PPI. En la Fig. 10a se muestra la actividad hidrolítica de la enzima utilizando como sustrato Nd-PPI, Fe-PPI, Tb-PPI y La-PPI en presencia de 1mM de $MgCl_2$. El comportamiento cinético no fue típicamente Michaeliano en todos los sustratos, esto podría ser explicado por la dificultad experimental que tuvimos al trabajar con complejos trivalentes (bajas actividades de hidrólisis, presencia de precipitados, oxidación, etc.). Y como se aprecia en la Fig.10a, en algunas curvas (por ejemplo Nd-PPI) no se realizó el experimento a concentraciones altas evitando así algún efecto de precipitación.

La Fig. 10b muestra la gráfica de Lineweaver-Burk del experimento y en el recuadro de la misma se presentan las constantes cinéticas (K_m y $V_{máx}$). La K_m para cada complejo varía desde 0.078 mM para el Nd-PPI hasta 2.0 mM para el complejo Tb-PPI mientras que la $V_{máx}$ no varía considerablemente. Estos datos nos sugieren que el Mg^{2+} libre activa a la enzima de una manera tal que el sitio activo muestra selectividad por el sustrato complejo M (III)-PPI.

Por otra parte, haciendo un análisis comparativo de la K_m con el sustrato real de esta enzima Mg -PPI activado con 1 mM de Mg^{2+} libre es de 0.6 mM mientras que su $V_{máx}$ es 333 nmoles Pi / (min.mg de proteína). Esto nos indica que los sustratos

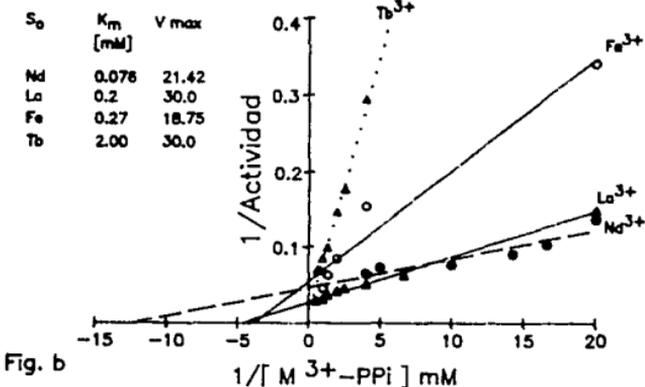
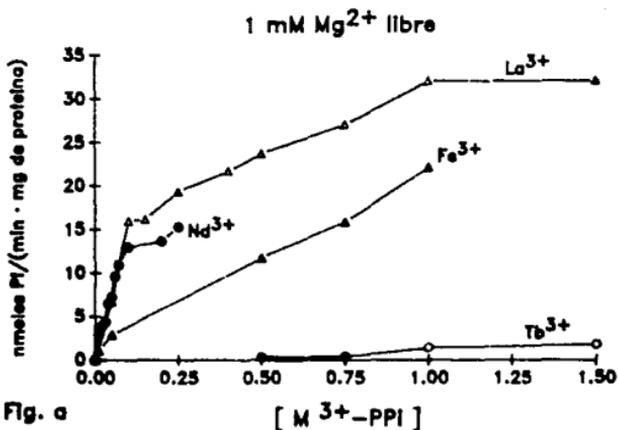


Fig.10 Cinética de la activación por Mg²⁺ de la hidrólisis de diferentes complejos M (III)-PPI. a) Medio de reacción: Tris-maléico 50 mM pH 6.0, 1 mM de MgCl₂, se incubó a 30°C. Se usaron los siguientes sustratos : La-PPI, Nd-PPI, Tb-PPI y Fe-PPI. Los metales trivalentes se añadieron como cloruros y el pirofosfato en la forma sódica. b) Gráfica de Lineweaver-Burk de los datos de a).

Nota: Unidades de V máx nmoles Pi/(min.mg de proteína).

3.5 CINETICA DE LA HIDROLISIS DE DIFERENTES COMPLEJOS M (III)-PPI ACTIVADOS POR Zn^{2+} LIBRE.

La actividad hidrolítica en función de la concentración de los sustratos Nd-PPI, Fe-PPI, Tb-PPI y La-PPI en presencia de 0.5 mM de Zn^{2+} libre se presenta en la Fig.11a. Como se demostró para el caso del La-PPI, al utilizarse como sustratos otros M (III)-PPI, la activación con Zn^{2+} es mayor que la encontrada con Mg^{2+} .

En la Fig. 11b se muestran las dobles recíprocas de nuestros datos y en el recuadro se presentan la K_m y $V_{máx}$ obtenidas.

La K_m para los diferentes sustratos es la misma (0.126 mM) y la $V_{máx}$ varía de 22.2 nmoles/ (min.mg de proteína) para Fe-PPI hasta 200 nmoles/ (min.mg de proteína) para el complejo La-PPI.

Estos valores nos sugieren que, en este caso, el efecto activador del Zn^{2+} hace que la enzima tenga la misma afinidad (representada por la misma K_m) por cualquier complejo M (III)-PPI pero variando la $V_{máx}$. Esto podría interpretarse como que el Zn^{2+} produce un estado del sitio activo completamente "abierto" a los sustratos M (III)-PPI.

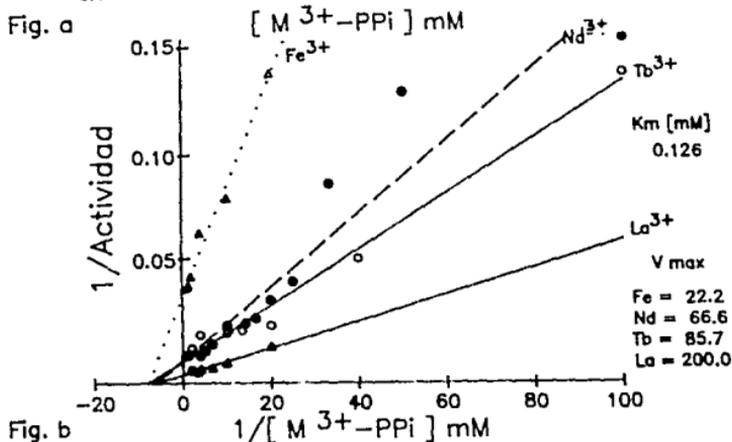
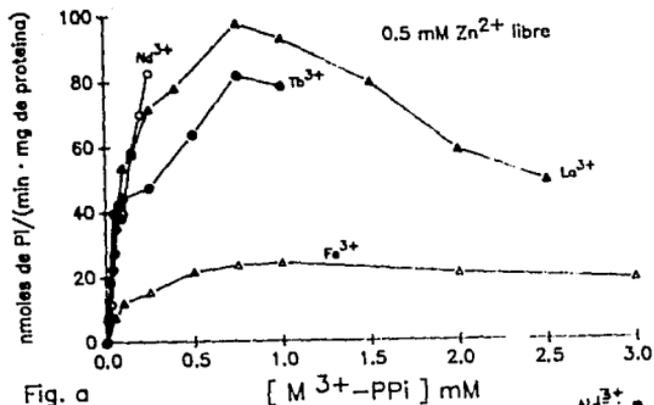


Fig.11 Cinética de la activación por Zn^{2+} libre de la hidrólisis de diferentes complejos $M(III)-PPi$. a) Medio de reacción: Tris-maléico 50 mM pH 6.0, 0.5 mM de $ZnCl_2$, se incubó a $30^\circ C$. Se usaron los siguientes sustratos : La-PPi, Nd-PPi, Tb-PPi y Fe-PPi. Los metales trivalentes en forma de cloruros y el pirofosfato en la forma sódica. b) Gráfica de Lineweaver-Burk de los datos de a).

Nota: Unidades de $V_{m\acute{a}x}$ nmoles P/(min.mg de proteína).

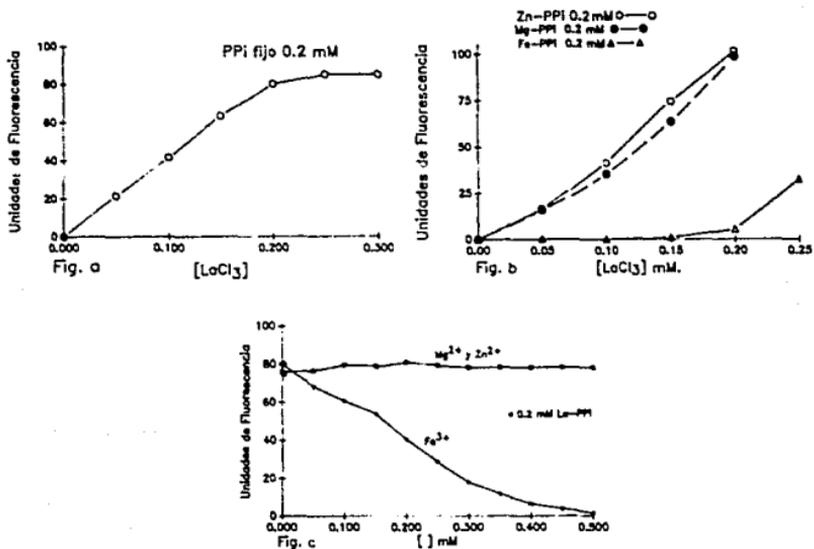


Fig. 12 Fluorescencia del complejo La-PPI bajo diferentes condiciones experimentales. a) Fluorescencia emitida por el complejo La-PPI, utilizando una longitud de onda de excitación de 280 nm y midiendo la emisión a 350 nm. b) Señal de fluorescencia por el desplazamiento por el La³⁺ de los cationes divalentes en los complejos : Mg-PPI, Zn-PPI y Fe-PPI. c) Efecto de la concentración creciente de catión libre (Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺) sobre la fluorescencia del complejo La-PPI.

señal de fluorescencia. Para los dos primeros complejos, cuyas constantes de asociación por PPI son inferiores que la del complejo La-PPI, se encuentra un desplazamiento inmediato del catión divalente por el LaCl_3 , obteniéndose una señal de fluorescencia muy parecida a la de la Fig. 12a, lo que nos sugiere que el desplazamiento es completo. Por otro lado, con el uso del tercer complejo cuya constante de asociación por PPI es mayor que la del La^{3+} , solamente se observó un desplazamiento hasta después de la equimolaridad.

En la Fig. 12c estudiamos el efecto de las concentraciones crecientes de cationes divalentes en la estabilidad del complejo La-PPI (0.2mM). Para el caso del Mg^{2+} y Zn^{2+} , nuevamente encontramos que practicamente no alteran la señal de fluorescencia dada por el complejo, sugiriéndonos que estos metales libres no son capaces de desplazar al lantano bajo nuestras condiciones experimentales. Para el caso del Fe^{3+} si existe un apagamiento de la señal de fluorescencia, pero se necesita el doble de la cantidad del complejo La-PPI para llevar a cero esta señal.

Lo que podemos concluir de estos experimentos es que el complejo La-PPI es muy estable, dando una señal de fluorescencia que prácticamente no se altera por la presencia de cationes Mg^{2+} y Zn^{2+} libres lo que nos indica que bajo nuestras condiciones experimentales el complejo no es desplazado por Mg^{2+} ó Zn^{2+} , validando nuestros resultados experimentales con la enzima.

3.7 DETERMINACION DE PRECIPITADOS

Como se mencionó en la metodología, estos complejos M (III)-PPi a pH 6.0 podrían presentar cierta precipitación que aumenta dependiendo de su concentración. Por esto creímos necesario conocer la cantidad real del complejo disponible para la enzima en nuestras condiciones experimentales y conocer además si la presencia de cationes libres tiene alguna repercusión en la solubilidad del complejo. Estos datos se muestran en la Fig. 13. Encontramos que el La-PPi se encuentra prácticamente en solución hasta una concentración de 0.2 mM, y va disminuyendo lentamente hasta obtenerse un 35% de precipitación a una concentración de 3 mM. En presencia de Mg^{2+} la precipitación aumenta en todas las concentraciones, encontrándose desde su inicio cierta cantidad precipitada y llegando a una precipitación del 54% a 3 mM del complejo La-PPi. Esto mismo se observó para el caso del Zn^{2+} teniendo una precipitación muy parecida a la del Mg^{2+} , pero utilizando en este caso la mitad de la concentración de catión, que en la del Mg^{2+} .

Estos precipitados podrían estar contribuyendo en la inhibición observada en el experimento de la Fig. 4, sin embargo no creemos que sea de una manera importante ya que a 3 mM del complejo La-PPi tendremos disponible para la enzima más de 1.5 mM suficiente para ser hidrolizado y no presentar una inhibición por carencia de sustrato.

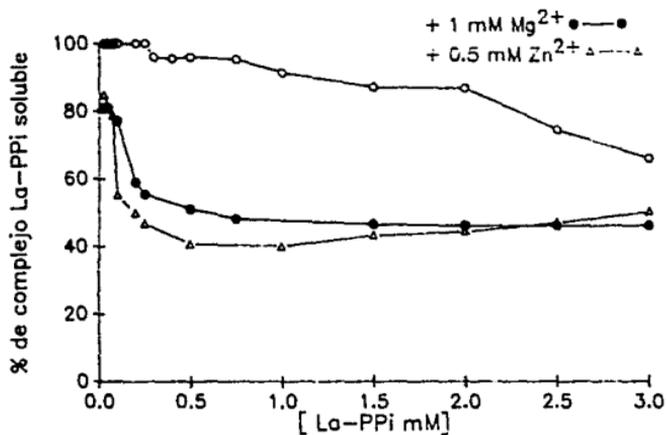


Fig. 13 Cuantificación de la concentración de complejo La-PPi soluble disponible para la hidrólisis. Medio de reacción: Tris-maléico 50 mM pH 6.0, La-PPi equimolecular, se incubó en baño de agitación constante a 30°C. ○ Sin Cation libre, ● + 1 mM de MgCl₂, △ + 0.5 mM de ZnCl₂.

CONCLUSIONES

Con base en los datos experimentales obtenidos en este trabajo respecto a la regulación que ejercen los cationes divalentes en la actividad hidrolítica de la Pirofosfatasa de membrana podemos resumir lo siguiente:

1) Los complejos M (III)-PPi son reconocidos como sustrato por la PPIasa de membrana, sin embargo son débilmente hidrolizados.

2) En presencia de catión divalente libre la enzima se activa e hidroliza a los complejos M (III)-PPi.

3) La Activación depende del tipo y concentración de catión divalente libre.

4) La Activación por Mg^{2+} hace que la enzima tenga diferente selectividad por los complejos M (III)-PPi pero sin variar la $V_{m\acute{a}x}$.

5) La Activación por Zn^{2+} hace que la enzima tenga la misma K_m para todos los complejos M (III)-PPi pero varíe su $V_{m\acute{a}x}$.

6) La señal de fluorescencia emitida por el complejo La-PPi permitió verificar su estabilidad en solución y comprobar que en nuestras condiciones experimentales los cationes divalentes se encuentran en estado libre.

7) Se demuestra la existencia de sitio(s) para catión divalente que regula la actividad de la PPIasa de membrana.

Referencias

- Ames, N.B. 1965. Assay of Inorganic Phosphate, Total Phosphate and Phosphatases. *Methods in Enzymology*. (ed. Purich). VII:115-118. Academic Press. New York London.
- Asimakis, G.K. y Aprille, J.R. 1980. Net Uptake of Adenine Nucleotides in Isolated Rat Liver Mitochondria. *FEBS: Lett* **117**: 157-160.
- Baltscheffsky, H., von Stedingk, L.V., Heldt, M.W. y Klingenberg, M., 1966. Inorganic Pyrophosphate: Formation in bacterial Photophosphorylation. *Science*, **153**:1120-1121.
- Baltscheffsky, M., Baltcheffsky, H., y von Stedingk, L.V., 1966. Light-induced energy conversion and the inorganic pyrophosphatase reaction in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. Brookhaven Symp. Biol. **19**: 246-257.
- Baltscheffsky, M., 1967. Inorganic Pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Nature (London)*. **216**:241-243.
- Baltscheffsky, M., 1967. Inorganic Pyrophosphate as an Energy in photosynthetic and Respiratory electron transport phosphorylation system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**: 270-276.
- Baltscheffsky, M., 1986. The synthesis and utilization of inorganic Pyrophosphate. *Bioenergetics* (ed. Ernester, L.). Elsevier Science Publishers.
- Boyer, P.D. y col., 1977. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* **46**: 955-1026.
- Celis, H., Romero, I., y Gómez-Poyou, A., 1985. The Phosphate-Pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of the membrane-bound Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: Effects of Mg^{2+} , phosphate and pyrophosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **236**:766-774.
- Celis, H. y Romero, I., 1987. The Phosphate-Pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: Effects of pH and Divalent Cations. *J. Bioenerg. Biomem.* **19**:225-271.
- Clayton, R.K. y Sistrom W.R., 1978. *The Photosynthetic Bacteria*. New York y London. Plenum Press.
- Cooperman, B.S., 1982. The mechanism of action of yeast inorganic pyrophosphatase. *Methods in Enzymology* (Ed. Purich, D.L.) **97**: 526-548. Academic Press. New York y London.

Crofts, A.R. 1974. The electron transport system as a pump in the photosynthetic Bacteria, en: Perspectives in Membrane Biology. (Editores: Estrada, S. y Gitler, C.), pp. 373-412. Academic Press. New York, Sn. Francisco y London.

Cruden, D.L., Durbin, W.E. y Markovitz, A.J. 1983. Appl. Environ. Microbiol. **46**: 1403-1408.

Dawes, A.E. 1986. Microbial Energetics. Blackie & Sons. Glasgow.

Dutton, P.L. y Prince, R.C. 1978. Energy conversion processes in bacterial photosynthesis. The Bacteria, Vol. VI, eds. I.C. Gunsalus, L.N. Ornston and J.R. Sokatch, New York and London: Academic Press, pp 523-584.

Edwards, G.E., Nakamoto H. y Burnell, J.N. 1985. Pyruvate, Pi Dikinase and NADP-Malate Dehydrogenase in C_4 Photosynthesis: Properties and Mechanism of light/dark Regulation. Annu. Rev. Plant. Physiol. **36**: 255-286.

Eisenbach, M y Caplan, S.R. 1979. The light driven proton pump of Halobacterium halobium: Mechanism and Function. Current Topic in Membranes and Transport. **12**: 165-248.

Evans, C.H. 1983. Interesting and useful biochemical properties of lanthanides. TIBS. 445-449.

Flodgaard, H. y Fleron, P. 1974. Thermodynamic parameters for the hydrolysis of inorganic pyrophosphate pH 7.4 as a function (Mg^{2+}), (K^+) an ionic strength determined from equilibrium studies of the reaction. Biol. Chem. **11**: 3465-3474.

Fujimori, T. y Jencks, W. 1990. Lanthanum Inhibits Steady-state Turnover of the Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase by Replacing Magnesium as Catalytic Ion. J. Biol. Chem. **265**: 16262-16270.

Hashimoto, K. y Rottenberg, H. 1983. Surface Potential in Rat Liver Mitochondria: Terbium Ion as a Phosphorescent Probe for Surface Potential. Bioche. **22**: 5738-5745.

Heinonen, J. Honkasalo, S. y Kukko, E. 1981. A Method for the Concentration and for the Colorimetric Determination of Nanomoles of Inorganic Pyrophosphate. Ana. Bioche. **117** : 293-300.

Jones, C.W., 1981 Biological Energy Conservation: Oxidative Phosphorylation. 2nd edn. London and New York: Chapman and Hall.

Keister, D.L. y Minton, N.L., 1971. ATP syntesis driven by inorganic pyrophosphata in Rhodospirillum rubrum chromatophores. Biochem. Biophys. Res. Commun. **42**: 932-939.

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

Kornberg, A. 1957. "Pyrophosphorylases and Phosphorylase in biosynthetic reactions". Advances in Enzymology F.F. Nord (Ed. Interscience, New York). 18 191-240.

Lawson, J.W.R., Guynn, R.W., Cronell, N. y Veech, R.L., 1976. en Gluconeogenesis: It is Regulation in Mammalian Species., (Ed. Hanson, R.W. y M.A. Mehlman), pp. 481. Wiley, New York.

Laskin, A.I. y Lechevalier., 1980. Handbook of Microbiology. vol. I CRC Press.

Lui, C.L. y PecK, H.D. 1981. Comparative Bioenergetics of Sulfate Reduction in Desulfovibrio an Desulfotomaculum spp. J. Bacteriol. 145: 966-973.

Lui, C., Hart, N., Perck, D.H., 1982. Inorganic pyrophosphate: Energy source for sulfate reducing bacteria of the genus Desulfotomaculum. Science. 217: 363-364.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randal, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

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

Mansurova, S.E., Shakhov, Yu.A. y Kulaev, I.S. 1977. Mitochondrial Pyrophosphatase is a coupling factor of respiration and Pyrophosphate synthesis. FEBS Lett 74: 31-34.

Martell, A. y Sillen, L.G., 1971. Stability Constants of Metal-Ion Complexes: Supplement No. 1, Special Publication No. 25. The Chemical Society, London.

Martin, R.B. y Richardson, F.S. 1979. Lanthanides as probes for calcium in biological systems. Q. Rev. Biophys. 12: 181-209.

Merrick, J.M. 1978. Metabolism of reserve materials. In The Photosynthetic Bacteria, eds. Clayton, r.k. y Sistrom, W.R., New & London. Plenum Press. pp 19-219.

Mitchell, P. 1961. Coupling of Phosphorylation to electron and hydrogen transfer by the Chemiosmotic type Mechanism. Nature 191: 144-148.

Mitchell, P., 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Revs. 41: 445-502.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Mitchell, P. 1967. Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria. Natural Fuel cells and solar cells. Fed. Proc. 26: 1370-1379.
- Moeller, T., 1973. The Lanthanides. Comprehensive Inorganic Chemistry. (Ed. Borad). vol 4: 1-101.
- Moyle, J., Mitchell, R., y Mitchell, P., 1972. Proton-translocating of Rhodospirillum rubrum. FEBS Lett. 23: 233-236.
- Nicholls, D.G., 1982. Bioenergetics: An introduction to chemiosmotic theory. London and New York. Academic Press.
- Nishikawa, K., Hosi, K., Suzuki, J., Yoshimura, S. y Horio, T., 1973. Formation and Decomposition of Pyrophosphate Related to Bacterial Photophosphorylation. J. Biochem. 73: 537-553.
- Nore, B.F., Husain, I., Nyren, P. y Baltscheffsky, M., 1986. Synthesis of pyrophosphate coupled to the reverse energy linked transhydrogenase reactions in: Rhodospirillum rubrum chromatophores. FEBS Lett. 200: 133-139.
- Nyren, P., Hajnal, K. y Baltscheffsky, M., 1984. Purification of the membrane-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase from Rhodospirillum rubrum. Biochem. Biophys. Acta. 766: 630-635.
- Oelze, J y Draws, G., 1972. Membranes of photosynthetic bacteria. Biochem. Biophys. Acta 265: 209-239.
- Ordaz, H., y col., 1991. Thermostability and activation by divalent cations of the membrane-bound inorganic Pyrophosphatase of Rhodospirillum rubrum. Eur. J. Biochem. (revisión editorial).
- Randahl, H., 1979. Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in Rhodospirillum rubrum. Eur. J. Biochem. 102: 251-256.
- Rao, P.V. y Keister, D.L., 1978. Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. Solubilization of the Membrane-bound energy-linked inorganic pyrophosphatase of Rhodospirillum rubrum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84: 465-473.
- Rea, P.A. y Poole, R.J. 1985. Proton-Translocating Inorganic Pyrophosphatase in Red Beet (Beta vulgaris L.) Tonoplast Vesicles. Plant Physiol. 77: 46-52.
- Reeves, E.R. 1976. How useful is the energy in inorganic pyrophosphate? Trends in Biochemical Sciences. 1: 53-55.
- Romero, I., 1987. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.

Schachmann, H.K., Pardee, A.S. y Stanier, R.Y., 1952. Studies on the macromolecular organization of microbial cells. Arch. Biochem. Biophys. **38**: 245-260.

Senior, A. E. 1981. Divalent Metals in Beef Heart Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. J. Biol. Chem. **256**: 4763-4767.

Senior, A.E. 1988. ATP Synthesis by Oxidative Phosphorylation. Physiol. Rev. **68**: 177-231.

Sheka, Z.A. y Sinyavskaya, E.I. 1966. Equilibrium in Lanthanum and Ytterbium pyrophosphate solutions. Rus. J. Inorg. Chem. **11**: 555-560.

Sheka, Z.A. y Sinyavskaya, E.I. 1967. Study of pyrophosphato-complexes of rare-earth elements by a kinetic method from the displacement of equilibrium. Rus. J. Inorg. Chem. **12**: 194-195.

Smith, M.R. y Martell, E.A., 1976. Critical Stability Constants. Plenum Press. New York and London. **4**:55-73.

Sosa, A., 1989. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM: México, D.F.

Sosa, A. Romero, I y Celis, H. 1991. The Mg^{2+} is esencial activator for the Mg-PPi hydrolisis in chomatohpores of Rhodospirillum rubrum (en publicación)..

Sumner, J.B. 1944. A method for the colorimetric determination of phosphorous. Science. **100**: 413-415.

Ting, J.S. y Dunaway-Mariano, D., 1984. Investigation of the role of the substrate metal ion in the yeast inorganic pyrophosphatase reaction. FEBS Lett. **165**: 251-253.

Trüper, H.G. 1976. Higher taxa of the phototrophic bacteria: Chloroflexaceae fam. nov., a family for the gliding, filamentous, phototrophic "green" bacteria. Int. J. System. Bacteriol. **26**: 74.

van Niel, C.B. 1935. Photosynthesis of Bacteria. Harbor Symp. Quant. Biol. **3**: 138-150.

Varma, A.K., Rigsby, W. y Jordan, D.C. 1983. A New Inorganic Pyrophosphate utilizing bacterium from a stagnant lake. Can. J. Microbiol. **29**: 1470-1474.

Vernon, L.P., 1953. Cytochrome c content of Rhodospirillum rubrum. Arch. Biochem. Biophys. **41**: 492.

Wang, Y. y col., 1986. Electrogenic H^+ -Pumping Pyrophosphatase in Tonoplast Vesicles of Oat Roots Plant. Physiol. **81**: 497-502.

Yang, X. y Sachs, F. 1989. Block of Stretch-Activated Ion Channels in Xenopus Oocytes by Gadolinium and Calcium Ions. Science. 244: 1068-1071.

Younis, H.M., Weber, G. y Boyer, I.S., 1983. Activity and conformational changes in Chloroplast coupling factor induced by Ion Binding: Formation of a Magnesium-Enzyme-Phosphate Complex. Biochemistry 22: 2505-2511.