

03081

9
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE UN CARBOXILO
ESENCIAL PARA LA ACTIVIDAD DE LA PIROFOSFATASA
DE MEMBRANA DE Rhodospirillum rubrum**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
(AREA BIOQUIMICA)

P R E S E N T A :
IRMA ROMERO ALVAREZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CIUDAD UNIVERSITARIA D.F.

SEPTIEMBRE 1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
CAPITULO 1: INTRODUCCION	5
1.1. CARACTERISTICAS DEL PIROFOSFATO.....	9
1.2. EL PAPEL DEL PIROFOSFATO EN EL METABOLISMO CELULAR....	10
1.3. UTILIZACION DEL PIROFOSFATO	15
1.4. LAS PIROFOSFATASAS	16
1.4.1. Pirofosfatasa Citoplásmica	16
1.4.2. Pirofosfatasa Membranal	17
A. Pirofosfatasa Membranal de <u>Rhodospirillum rubrum</u> ..	17
B. Pirofosfatasa de Membrana Mitocondrial	28
C. Pirofosfatasa Membranal de Vacuola	32
1.4.3. Semejanzas Estructurales Entre los Diferentes Tipos de Pirofosfatasa Membranales	34
1.5. EL PIROFOSFATO Y LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA EN LA EVOLUCION DE LOS MECANISMOS TRANSDUCTORES DE ENERGIA .	35
1.6. MODIFICACIONES QUIMICAS EN PIROFOSFATASAS DE MEMBRANA.	38
OBJETIVO	40
CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS	41
2.1. CULTIVO DE BACTERIAS	41
2.1.1. Medios de Cultivo	41
2.1.2. Siembra de Bacterias	43
2.2. COSECHA DE BACTERIAS	45
2.3. OBTENCION DE CROMATOFOROS	45

.../..

2.4.	DETERMINACION DE PROTEINA	47
2.5.	METODO PARA DETERMINAR LA HIDROLISIS DEL PIROFOSFATO O LA ACTIVIDAD DE LA PIROFOSFATASA EN CROMATOFOROS	47
2.6.	MODIFICACION DE GRUPOS CARBOXILO	48
2.6.1	Reacción de la Pirofosfatasa de Membrana del Cromatóforo con las Carbodiimidas Hidrosolubles	52
CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSION		54
3.1.	DETERMINACION DE LA DESCOMPOSICION DE LAS CARBODIIMIDAS	54
3.2.	EFEECTO DE DIFERENTES AMINAS SOBRE LA MODIFICACION POR EDC	57
3.3.	INACTIVACION DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA POR CARBODIIMIDAS HIDROSOLUBLES	59
3.3.1.	Inactivación por EDC	59
3.3.2.	Inactivación por CMC	62
3.4.	PROTECCION CONTRA LA INACTIVACION POR EDC Y CMC DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA	64
3.4.1.	Protección del PPI y el Mg ²⁺	64
3.4.2.	Protección del Sustrato Mg-PPI	67
3.4.3.	Efecto de Análogos del PPI	67
3.4.4.	Efecto de Otros Cationes Divalentes sobre la Inactivación por EDC	70
3.5.	EFEECTO DEL EDC SOBRE LA ACTIVACION DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA POR MG ²⁺	74
3.6.	INACTIVACION DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA POR EDC Y CMC A TIEMPOS LARGOS	78
CAPITULO 4: CONCLUSIONES		87
FUTURO DE LA INVESTIGACION		88
BIBLIOGRAFIA		90

ABREVIATURAS

Å	Angstrom
AMP	monofosfato de adenosina
ADP	difosfato de adenosina
ADN	ácido desoxirribonucléico
ATP	trifosfato de adenosina
BSA	albúmina de suero de bovino
CMC	1-ciclohexil-3-(2 mofolinil-4-etil)carbodiimida meto-p-toluensulfonato
DCCD	diciclohexil carbodiimida
[¹⁴ C]DCCD	diciclohexil carbodiimida marcada radioactivamente con carbono 14
EDC	1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida
EDTA	ácido etilen diamino tetra acético
EGTA	ácido etilenglicol bis (amino-etil-eter)NN'tetra acético
GME	glicin metil ester
H ⁺	protón
H ⁺ ATPasa	ATP sintetasa de protones
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
IDP	imidodifosfato
kDa	kilodaltones
K obs	constante de pseudo primer orden
MDP	metilen difosfato
Mes	ácido 2-[N-morfolino] etanosulfónico
MOPS	ácido morfolino propano sulfónico
NBD-Cl	7-cloro-4-nitrobenzo-2oxa-1,3 diazol
Nbf-Cl	4 cloro-7-nitrobenzo furazan

NEM	N-etilmaleimida
Pi	fosfato
Pi ³²	fosfato radioactivo, isótopo 32
PPi	pirofosfato
PPi _{asa}	Pirofosfatasa
SDS	dodecil sulfato de sodio
TCA	ácido tricloro acético
Tris	Tris hidroximetil amino metano
WSC	carbodiimidias hidrosolubles
ΔG°	cambio de energía libre en condiciones estándar

RESUMEN

La pirofosfatasa de membrana de la bacteria Rhodospirillum rubrum es una enzima que sintetiza e hidroliza PPI de una manera acoplada al gradiente electroquímico de H^+ . El sustrato para la hidrólisis es el complejo Mg-PPI y requiere Mg^{2+} como activador esencial de la reacción. En esta investigación se determinó la presencia de grupos carboxilo involucrados en la actividad hidrolítica de la enzima, utilizando dos carbodiimidias hidrosolubles (EDC y CMC) para modificarlos químicamente. Los resultados muestran que a tiempos cortos de preincubación, ambas carbodiimidias inactivan a la pirofosfatasa en la membrana con una cinética de pseudo primer orden. Sin embargo, el EDC es más eficiente que el CMC. El Mg y el PPI protegen a la enzima contra estas inactivaciones, no obstante, esta protección es sólo parcial para el caso de la inactivación por CMC. El sustrato, Mg-PPI protege completamente de la inhibición causada por ambas carbodiimidias. Estos resultados indican la presencia de un carboxilo esencial para la pirofosfatasa de membrana que muy probablemente está en el sitio activo. La activación de la enzima por Mg^{2+} libre se protege completamente de la inactivación por EDC al preincubar en presencia de PPI, sugiriendo que el sitio activador está en el sitio activo o muy cerca de él. A tiempos de preincubación mayores, la inactivación con ambas carbodiimidias muestra una cinética más compleja, indicando la presencia de más de un carboxilo involucrado en la modificación. Por último, se propone un modelo del mecanismo del sitio activo y regulador de la pirofosfatasa de membrana.

ABSTRACT

Membrane-bound pyrophosphatase of the photosynthetic bacteria Rhodospirillum rubrum catalyzes the synthesis or hydrolysis of PPI linked to the electrogenic translocation of H^+ . The substrate for hydrolysis is Mg-PPI complex and requires Mg^{2+} as an essential activator. In the present study, the presence of carboxyl residues involved in the hydrolytic activity of the enzyme was studied by chemical modification with two water soluble carbodiimides (EDC and CMC). The results shown that both carbodiimides cause a loss of activity following pseudo first-order kinetics up to 10 min of reaction. Nevertheless, EDC is more effective in its action. Mg^{2+} and PPI protect against the inactivation by carbodiimides, but this protection is only partial in the case of CMC inhibition. The substrate Mg-PPI protected completely against the inactivation caused by both carbodiimides. These data indicate the presence of an essential carboxyl in the membrane-bound pyrophosphatase, that is probably located in the active site. The activation of the enzyme by free Mg^{2+} is protected completely by PPI, against the effect of EDC. This suggests that the activator site for Mg^{2+} is at or near the active site. At longer incubation times with both carbodiimides, more complex kinetics were obtained, indicating that more than one carboxyl are involved in the modification. A model for the mechanism in the active site and the regulatory site of the membrane-bound pyrophosphatase is proposed.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Todas las células utilizan los mismos principios fundamentales y los mismos mecanismos en sus actividades transformadoras de energía. Los organismos fotosintéticos utilizan la energía de la luz solar, mientras que los organismos heterótrofos emplean la energía contenida en la estructura de las moléculas orgánicas obtenidas de su medio.

La célula conserva la energía de manera aprovechable en las moléculas del ATP, las cuales se sintetizan a partir de ADP y de Pi en reacciones catalizadas por la H⁺-ATP sintetasa. El ATP es entonces el transportador que lleva la energía química hacia aquellos procesos o reacciones de la célula que requieren energía. Así, al hidrolizarse el ATP, la energía liberada se utiliza para llevar a cabo el trabajo químico, mecánico y osmótico de la célula (Franklin, 1986).

El tema central en bioenergética en los últimos 30 años ha sido entender los mecanismos por los cuales la energía de la oxidación de sustratos o la proveniente de la absorción de la luz se acopla a la síntesis de ATP.

Aunque ocurre síntesis de ATP en sistemas enzimáticos solubles, la mayor producción de ATP está asociada a complejos enzimáticos ligados a ciertos tipos de membranas llamadas "membranas transductoras de energía", como la membrana plasmática de las células procarióticas, la membrana mitocondrial interna y la

membrana tilacoidal del cloroplasto (Nicholls, 1982).

Peter Mitchell propuso, en 1961, la hipótesis quimiosmótica para explicar el acoplamiento entre la transferencia de electrones y la síntesis de ATP en las membranas transductoras de energía. Esta hipótesis utiliza conceptos de fisiología de membrana, de bioquímica tradicional, y de reacciones vectoriales que dan lugar a la transferencia de grupos químicos a través de la membrana (Mitchell, 1961 y 1967). Mitchell postuló que el flujo de electrones sucede a través de una membrana cerrada que es poco permeable a protones (H^+). El arreglo de las moléculas que transfieren electrones e hidrógenos es alternado, de tal forma que a una molécula acarreadora de electrones le sigue una de hidrógenos y así sucesivamente. El H^+ necesario para formar hidrógeno con el electrón se toma de un lado de la membrana, y al encontrarse con un acarreador de electrones se suelta del otro lado de la membrana; así, se produce un gradiente de H^+ formado por dos componentes: el químico y el eléctrico. La energía total del gradiente de H^+ es la suma de ambos componentes y es la llamada fuerza protonmotriz. Esta es la fuerza que se utiliza para la síntesis de ATP mediante la acción de una enzima de membrana denominada H^+ -ATP sintetasa, que forma el ATP a través de un flujo inverso de H^+ (véase la figura 1).

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

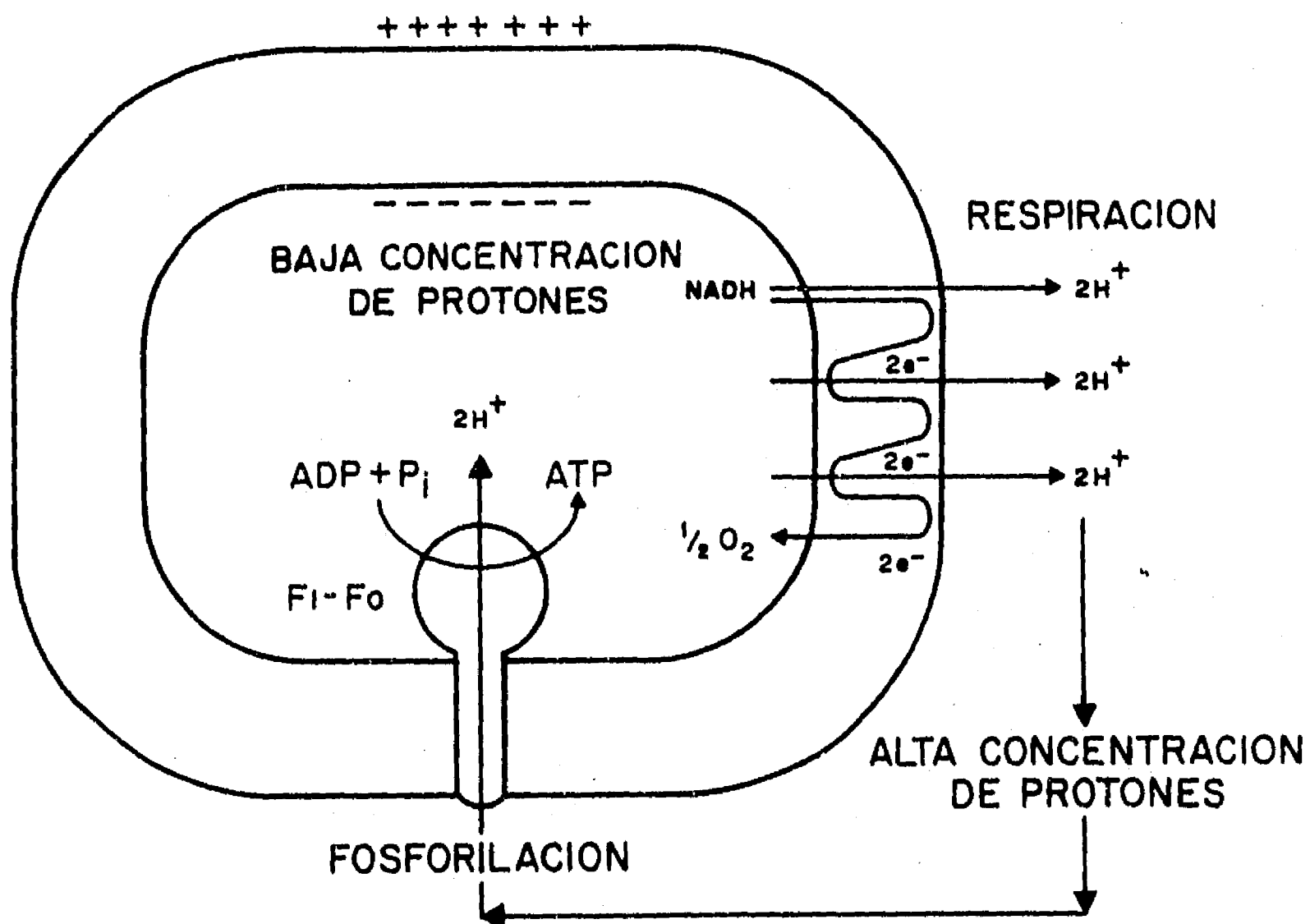


Fig. 1. Acoplamiento Entre la Fosforilación y el Transporte de Electrones.

La teoría quimiosmótica propone un bombeo de H^+ hacia un lado de la membrana por la cadena transportadora de electrones durante la respiración, creando un gradiente electroquímico de H^+ , el cual se utiliza por la H^+ -ATP sintetasa para sintetizar ATP.

plasmática de las células eucarióticas.

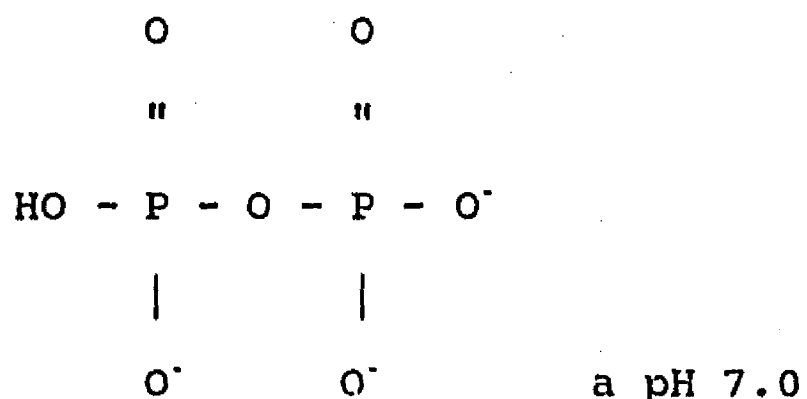
Muchas investigaciones han mostrado que los postulados básicos de esta hipótesis son ciertos; sin embargo, algunos detalles siguen en controversia, especialmente en lo que se refiere al mecanismo de síntesis de ATP por la H^+ -ATP sintetasa (Boyer y col, 1977).

En bacterias fotosintéticas se encontró que la membrana transductora de energía, además 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. Esta es una enzima con actividad reversible que al hidrolizar PPi genera un gradiente electroquímico y en este sentido es semejante a la H^+ -ATP sintetasa.

La H^+ -ATP sintetasa es una enzima compleja tanto en su estructura cuaternaria como en su mecanismo cinético y en su regulación (Senior, 1988, Futai y col, 1989). En cambio, la pirofosfatasa de membrana aparentemente es una enzima más simple, tanto estructuralmente como en los reactivos y productos que intervienen en la reacción que cataliza, por lo que el estudio de este sistema es una opción para el análisis de los mecanismos de síntesis de uniones covalentes de alta energía.

1.1. CARACTERISTICAS DEL PIROFOSFATO

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



Esta unión fosfoanhídrido es la forma química básica, en la cual se transmite la energía en las células.

Para entender el significado biológico del PPI es necesario conocer algunos aspectos termodinámicos de su hidrólisis, particularmente en las condiciones de pH y fuerza iónica presentes en las células. Debido a la alta afinidad del grupo PPI por cationes divalentes y a las concentraciones relativamente altas de Mg^{2+} en el citoplasma, el PPI probablemente se encuentra presente en las células formando un complejo 1:1 con el Mg^{2+} .

La energía libre de la hidrólisis (ΔG°) del PPI es cercana a la del enlace gama del fosfato del ATP, sin embargo en presencia de Mg^{2+} , el ΔG° para el PPI se vuelve menos negativo, debido a que el producto de su hidrólisis (2 Pi) no forma complejo fuertemente con el Mg^{2+} , a diferencia del ATP en donde el producto (ADP) sí se une fuertemente al Mg^{2+} (Sillén y Martell, 1971). Flodgaard y Fleron (1974) obtuvieron valores muy precisos de ΔG° para la

hidrólisis del PPI a pH 7.4 y 25°C. En presencia de Mg²⁺, el $\Delta G^{\circ} = -4.0 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ pero en ausencia de Mg²⁺ el $\Delta G^{\circ} = -5.7 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. De Meis (1984) reportó valores similares a los anteriores y encontró que la K obs y el ΔG° de la hidrólisis del PPI varía considerablemente dependiendo del pH y la concentración de catión divalente en el medio.

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

1.2. EL PAPEL DEL PIROFOSFATO EN EL METABOLISMO CELULAR

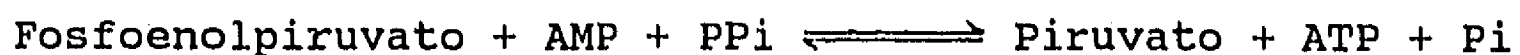
En general se consideraba un dogma bioquímico que el PPI producido en muchas reacciones biosintéticas (síntesis de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, urea, lípidos) era un producto secundario que debía ser hidrolizado inmediatamente por la pirofosfatasa inorgánica, localizada en el citoplasma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

Un nuevo capítulo en la historia del papel del PPI se inició en 1962 con el hallazgo de Sui y Wood de una enzima que utiliza PPI en la bacteria Propionibacterium shermanii y que cataliza la reacción:



Otro ejemplo de una enzima que utiliza al PPI fue reportado en 1968 por tres laboratorios independientemente (Evans y Wood,

1968; Hatch y Slack, 1968; Reeves, 1968). Estos investigadores descubrieron la piruvato fosfato dicinasa, que cataliza la siguiente reacción, tanto en microorganismos como en plantas:



Posteriormente se han identificado más reacciones enzimáticas en las que el PPI sustituye al ATP o que son dependientes de PPI (Tabla I), algunas de ellas son enzimas responsables de la fosforilación de intermediarios esenciales de la glucólisis y gluconeogénesis en microorganismos (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 dependiente de PPI (Lawson y Veech, 1979). También se descubrió que estas enzimas dependientes de PPI están ampliamente distribuidas en plantas (Edwards y col., 1985). En resumen, estos hallazgos muestran que el PPI puede usarse como donador de energía para muchas reacciones y que en algunas otras puede ser utilizado, incluso, en lugar del ATP.

Es posible que las reacciones químicas que utilizan la energía del PPI estén más extendidas de lo que se ha mencionado en la Tabla I. Por otra parte, la idea de que la irreversibilidad de los procesos biosintéticos depende de que el PPI sea hidrolizado y por tanto de la presencia de una baja concentración de PPI celular, no concuerda con la evidencia experimental. Esto resultó ser más claro cuando se pudo cuantificar la cantidad de PPI en las células.

TABLA I

REACCIONES EN LAS QUE EL PPI SUSTITUYE AL ATP O QUE SE UTILIZA COMO DONADOR DE ENERGIA.

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

Organismos en que se presenta la reacción	No. de la reacción	Referencia bibliográfica*
<u>Propionibacterium shermanii</u>	1-3, 5, 7	a, b, k, p, o, n
<u>Entamoeba histolytica</u>	1-4	a, b, p
<u>Pseudomonas marina</u>	3	c
<u>Alicaliqenes</u>	3	c
<u>Bacteroides fragilis</u>	3	d
<u>Rhodospirillum rubrum</u>	3, 2	e, j
Hojas de piña	3	f
Caña de azúcar	2	g
<u>Bacteroides symbiosus</u>	2	h

<u>Acetobacter xylinum</u>	2	i
<u>Desulfotomaculum</u>	6	l,m
Organismos que tienen como productos metabólicos finales acetato, propionato y butirato	7	n
Hígado	8	q

*REFERENCIAS DE LA TABLA I

- a) O'Brien, W.E. y Bowien, S. (1975) Fed. Proc. 34: 641.
- b) Reeves, R.E., South, D.J., Blytt, H.J. y Warren, L.G. (1974) J. Biol. Chem. 249: 7737-7741.
- c) Sawyere, M.H., Baumann, P. y Baumann, L. (1977) Arch. Microbiol. 112: 169-172.
- d) Macy, J.M., Ljungdahl, L.G. y Gottschalk, G. (1978) J. Bacteriol. 134: 84-91.
- e) Pleidere, C. y Klemme, J.H. (1980) Z. Naturforsch. 35C, 229-238.
- f) Carnal, N.W. y Black, C.C. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 86: 20-26.
- g) Hatch, M.D. y Slack, C.R. (1968) Biochem. J. 106: 141.
- h) Reeves, R.E., Menzies, R.A. y Hsu, D.S. (1968) J. Biol. Chem. 243: 5468.
- i) Benziman, M. y Palgi, A. (1970) J. Bacteriol. 104: 24.
- j) Buchanan, B.B. (1974) J. Bacteriol. 119: 1066-1068.
- k) Reeves, R.E. (1968) J. Biol. Chem. 243: 3203.
- l) Liu, C.L. y Peck, H.D. Jr. (1981) J. Bacteriol. 145: 966.
- m) Liu, C.L., Hart, N. y Peck, H.D. Jr. (1982) Science 217: 363-364.
- n) Reeves, R.E. (1976) TIBS 1: 53-55.
- o) Cagen, L.M. y Friedmann, H.C. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 33: 528-533.
- p) Wood, H.G. (1977) Fed. Proceedings 36: 2197-2205.
- q) Lawson, J.W.R. y Veech, R.L. (1979) J. Biol. Chem. 254: 6528-6537.

La concentración de PPI en diferentes células (entre ellas de microorganismos, de animales y de plantas) se encuentra entre 0.1 y 2 mM (Baltscheffsky y Nyrén, 1984). Un caso sobresaliente es el de la arqueobacteria Methanobacterium thermoautotrophicum que contiene una concentración de PPI que va de 2.5 a 40 mM en diferentes condiciones de cultivo (Keltjens y col. 1988). Como se puede observar, la concentración de PPI es comparable a la de otros intermediarios del metabolismo energético, tales como el ATP, 2.0 a 10 mM (Matthews y col., 1982; Zweier y Jacobus, 1987).

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

Otro descubrimiento importante en los últimos años fue la identificación del transporte de PPI a través de la membrana interna mitocondrial en intercambio por ADP vía el translocador de adenín nucleótidos (Kramer, 1985) y 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 y col., 1972), de la membrana interna de la mitocondria y de las membranas de plantas (Rea y Poole, 1985; Wang y col., 1986).

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

1.3. UTILIZACION DEL PIROFOSFATO

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

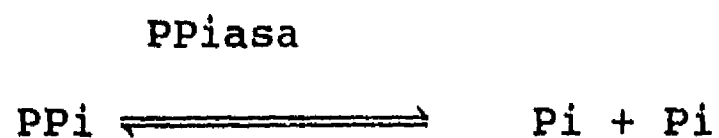
1) Ser hidrolizado por la pirofosfatasa citoplásmica o soluble, donde la energía liberada de la hidrólisis del enlace anhidro se pierde como calor.

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

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

1.4. LAS PIROFOSFATASAS

La pirofosfatasa inorgánica, como ya se ha dicho, es una enzima que cataliza la hidrólisis y la síntesis de PPI, de acuerdo con la siguiente reacción:



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

1.4.1 Pirofosfatasa Citoplásmica

La pirofosfatasa citoplásmica es una enzima ubicua en la Naturaleza. Esto se entiende claramente si se considera su importancia en el metabolismo celular, al desplazar el equilibrio de las reacciones biosintéticas en el sentido termodinámicamente favorable (Kornberg, 1957). El mecanismo de reacción, las propiedades estructurales y las propiedades cinéticas de esta importante enzima han sido estudiadas principalmente en la pirofosfatasa de levadura (Cooperman, 1982). También se ha descrito su caracterización molecular, su clonación y su localización en el cromosoma (Kolakowski y col, 1988). En levadura, esta enzima es un homodímero con 285 aminoácidos y peso molecular de 32,042 daltones por subunidad. Cataliza la

hidrólisis de PPI, el intercambio Pi-H₂O y el intercambio Pi-PPI; para llevar a cabo estas actividades requiere de Mg²⁺ para formar el sustrato Mg-Pi o Mg-PPI, además de unir dos átomos de Mg²⁺ a sitios reguladores de la enzima (Barry y Dunaway-Mariano, 1987).

1.4.2. Pirofosfatasa Membranal

Se pueden distinguir tres tipos de Pirofosfatasa de membrana:

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

Todas ellas tienen como característica común ser enzimas transductoras de energía; es decir, al igual que la H⁺-ATP sintetasa, se encuentran acopladas al gradiente electroquímico de H⁺ generado por la cadena transportadora de electrones. (Aunque en la pirofosfatasa vacuolar solo se le ha encontrado actividad de hidrólisis de PPI simultánea a la translocación de H⁺, ver pág. 32).

A continuación se describirán las principales características de cada una de ellas, haciendo énfasis en la primera, ya que probablemente es la mejor estudiada en cuanto a sus características y propiedades funcionales y cinéticas, si bien su estudio estructural es aún incompleto.

A) Pirofosfatasa Membranal de Rhodospirillum rubrum.

La primera pirofosfatasa de membrana que se reportó fue la de la bacteria fotosintética R. rubrum (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966). Ahora se tiene conocimiento de que también está presente en la membrana de otras bacterias fotosintéticas

como Rhodopseudomonas palustris, Rhodopseudomonas viridis y Chromatium vinosum.

Esta enzima es funcionalmente semejante a la ATP sintetasa (también presente en la membrana de esta bacteria), pero con una estructura más sencilla, sustratos más simples e insensibilidad al inhibidor clásico de la H⁺-ATP sintetasa, la oligomicina. Esta enzima puede llevar a cabo las siguientes reacciones parciales: a) Síntesis de P_{Pi}, b) Hidrólisis de P_{Pi}, c) Intercambio Pi-P_{Pi} y d) Recambio Pi-H₂O.

a) Síntesis de P_{Pi}

En los cromatóforos de la bacteria R. rubrum (vesículas de membrana con polaridad invertida respecto al organismo), se lleva a cabo la formación de P_{Pi}. Esta síntesis se efectúa utilizando la energía del gradiente electroquímico de H⁺ generado a través del transporte de electrones fotosintético en condiciones de iluminación (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966) (Fig. 2). La reacción requiere también de iones Mg²⁺ para obtener máximas velocidades (Guillory y Fisher, 1972). El pH óptimo es 7.5, la síntesis de P_{Pi} es inhibida por antimicina (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 P_{Pi} es diferente al de la formación de ATP. Estos autores demostraron además que la formación de P_{Pi} se satura a menor intensidad luminosa que la

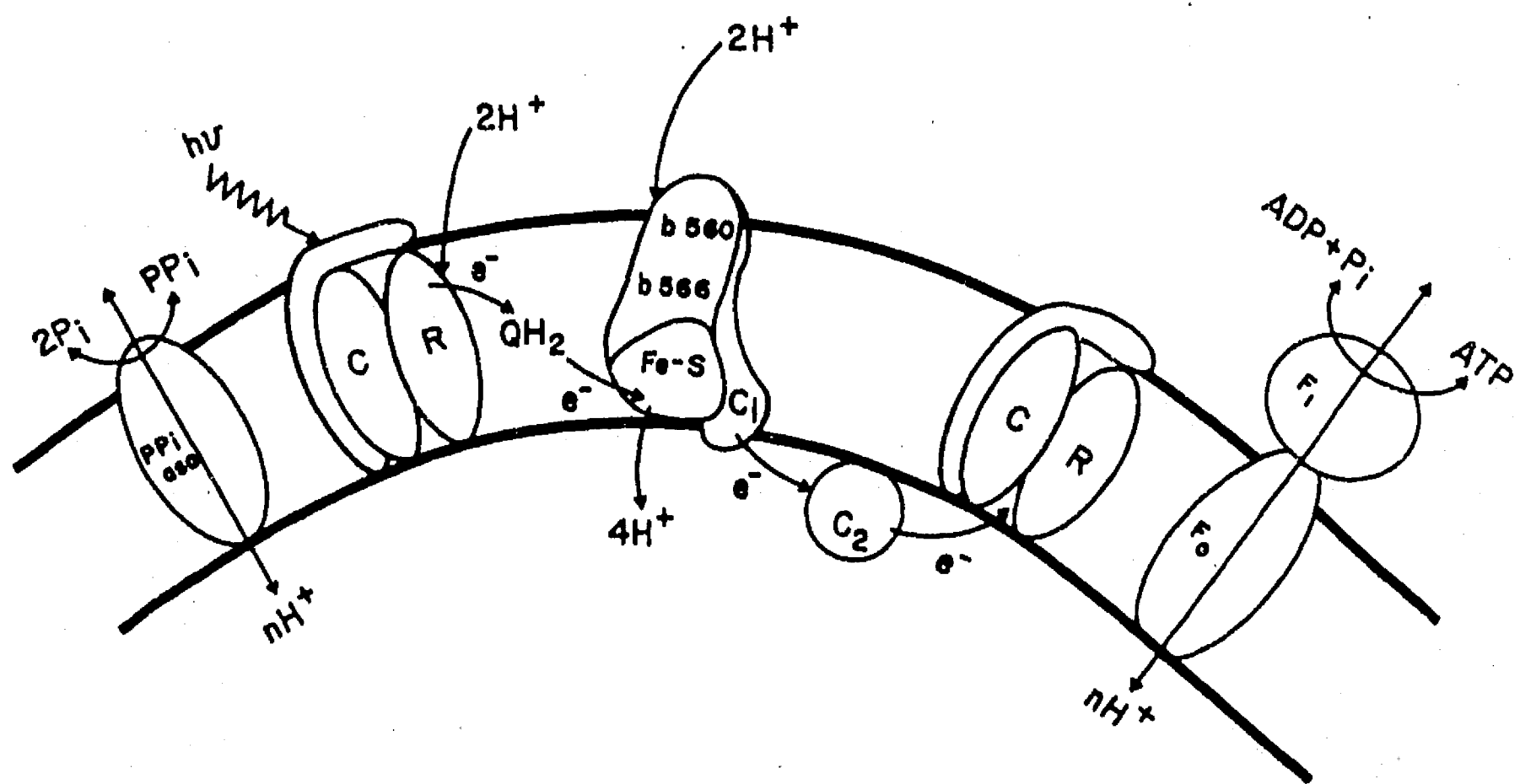


Fig. 2. Esquema de la Transducción Energética en la Bacteria Fotosintética Rhodospirillum rubrum.

Se muestra a la Pirofosfatasa (PPiase), al Centro de Reacción fotoquímico (CR), al sistema de transporte de electrones y a la H⁺ATPasa en la membrana del cromatóforo.

QH₂: ubiquinol, b₅₆₀: citocromo b₅₆₀, b₅₆₆: citocromo b₅₆₆, Fe-S: Proteína hierro-azufre de Rieske, c₁: citocromo c₁, c₂: citocromo c₂, F₁: parte hidrofílica de la ATPasa (catalítica), F₀: parte hidrofóbica de la ATPasa (canal de H⁺).

requerida para la de síntesis de ATP. Hay que tener en cuenta que R. rubrum crece en condiciones naturales a bajas intensidades luminosas, lo que puede sugerir que esta vía alterna, que sintetiza PPI, tenga un significado fisiológico importante.

Recientemente se ha descrito un método de enzimas acopladas bastante preciso para cuantificar la cantidad de PPI sintetizado (Nyrén y Lundin, 1985), y se ha encontrado que se puede inducir la síntesis de PPI por gradientes artificiales de pH o eléctricos (Strid y col., 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 la síntesis de PPI requiere una fuerza protomotriz menor que la de ATP, reflejando un menor ΔG° de la reacción (Strid y col., 1987). Otra posibilidad para explicar este dato sería que, a diferencia de la H⁺-ATP sintetasa, la pirofosfatasa carece de un inhibidor natural (Schwerzmann y Pedersen, 1986).

Estudios comparativos de la H⁺-ATP sintetasa con la pirofosfatasa (Nyrén y col., 1986), reportan que a bajas intensidades de luz (10 W/m²), la velocidad de síntesis de PPI es el doble que la del ATP y que ambas actividades compiten por el gradiente de H⁺.

Aparentemente, la síntesis de PPI y la de ATP utilizan el mismo sitio de acoplamiento en la cadena de transporte de electrones, ya que en la oscuridad se puede inducir un flujo reverso de electrones por la hidrólisis de cualquiera de los dos

compuestos. El resultado de esta reacción es una reducción de citocromo b y la oxidación de citocromo C₂ (Baltscheffsky, 1968).

La formación de P_Pi inducida por luz es inhibida parcialmente por la síntesis simultánea de ATP por luz, pero no se modifica por la adición de ATP. Esto sugiere que la formación fotosintética de ATP y la de P_Pi son catalizadas por diferentes sistemas enzimáticos de conversión de energía que compiten por el mismo transporte cíclico de electrones fotosintético.

b) Hidrólisis de P_Pi

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

La pirofosfatasa transloca H⁺ a través de la membrana en una reacción acoplada a la hidrólisis de P_Pi, dejando el interior del

cromatóforo cargado positivamente con respecto al exterior, de manera semejante a como lo hace la H⁺-ATP sintetasa. El hecho de que la pirofosfatasa transporte H⁺ sugiere que contiene un canal de H⁺ semejante, cuando menos funcionalmente, al de la H⁺-ATP sintetasa. Asociadas a la hidrólisis de P_i y a la correspondiente formación de gradiente de H⁺, se han descrito varias reacciones dependientes de energía que incluyen: la transhidrogenación dependiente de energía (Keister y Yike, 1967a), la reducción de citocromo (Baltscheffsky, 1967), la reducción de NAD⁺ ligada a succinato (Keister y Yike, 1967b), el bombeo de H⁺ (Moyle y col., 1972), y la formación de ATP dirigida por P_i (Keister y Minton, 1971) (Fig. 3).

Estos datos indican que la pirofosfatasa media la transducción de energía entre la síntesis (o la hidrólisis) de P_i y otras reacciones que generan (o que consumen) energía en la membrana.

La función fisiológica y catalítica de la P_iasa membranal parece ser equivalente a la de un factor de acoplamiento convencional; por tanto, la resolución de esta peculiar enzima es de gran interés.

c) Intercambio Pi --- P_i

Keister y Minton (1971) encontraron que los cromatóforos de R. rubrum catalizan el intercambio Pi-P_i en la oscuridad. La reacción es inhibida por desacoplantes, MDP y NaF, y tiene un pH óptimo de 8.0. El intercambio requiere iones Mg²⁺ para formar el complejo Mg-Pi, que es el sustrato verdadero para la reacción, y también Mg²⁺ libre para obtener la máxima actividad (Celis y col.,

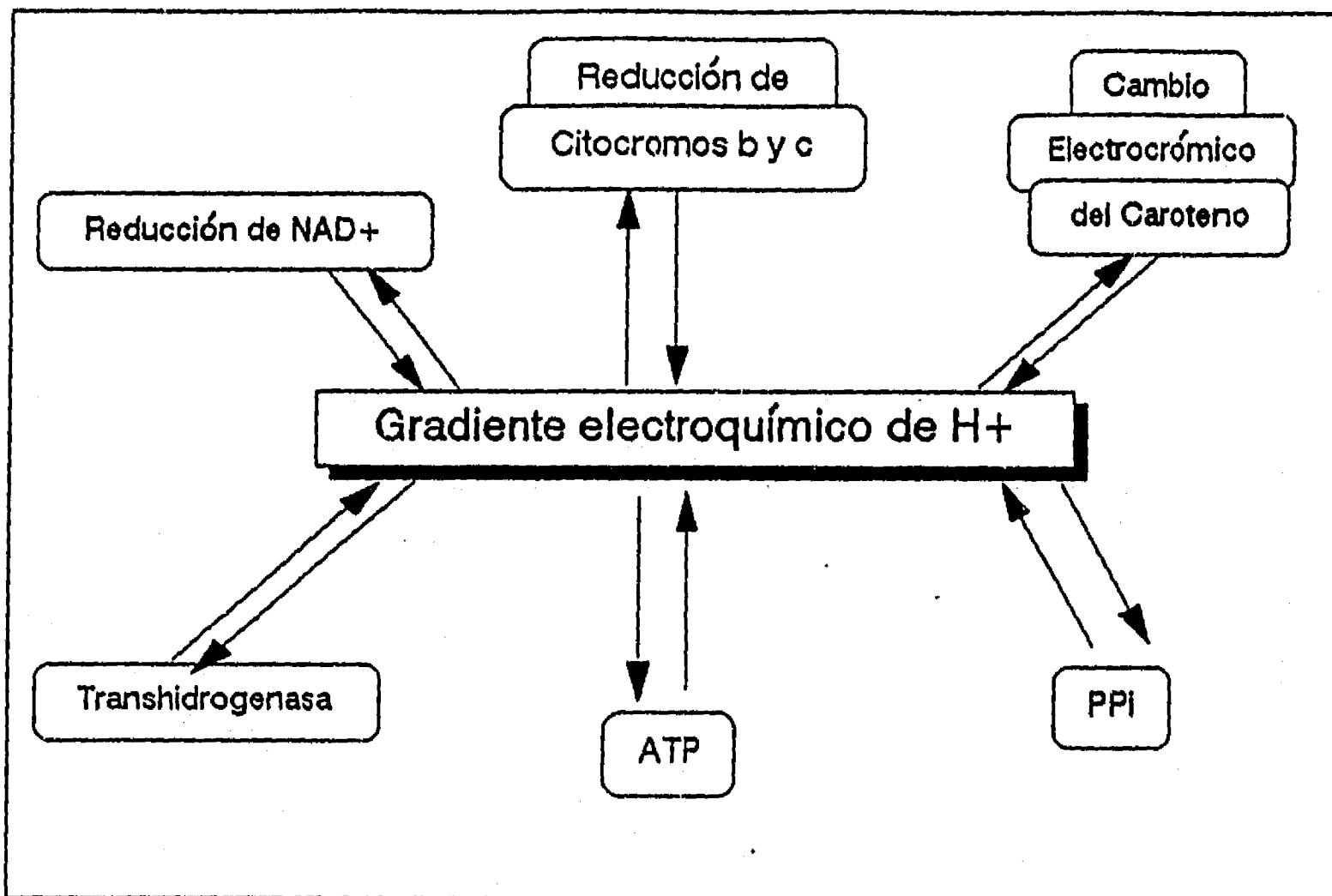


Fig. 3. Reacciones Dependientes o Asociadas al Gradiente Electroquímico de H^+ .

1985).

También se requiere aproximadamente un 75% de PPI hidrolizado para alcanzar el recambio máximo.

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

d) Recambio Pi-H₂O

Harvey y Keister (1981) caracterizaron esta reacción. El recambio Pi-H₂O se debe exclusivamente a la pirofosfatasa 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. Requiere Pi³² y Mg²⁺ en una relación Mg:Pi = 0.8.

Solubilización y purificación

La pirofosfatasa de membrana es una enzima integral de membrana y lograr su purificación ha sido difícil. Rao y Keister (1978) consiguieron solubilizarla por primera vez empleando el detergente colato en presencia de Mg²⁺.

Posteriormente, Nyrén y col. (1984) describieron otro método de solubilización en el que utilizaron el detergente Triton X-100, etilenglicol y altas concentraciones de Mg²⁺. Mediante este

procedimiento se obtuvo un mejor grado de pureza a través de cromatografía en hidroxiapatita; sin embargo, la enzima obtenida no era sensible a DCCD, en contraste a la actividad en cromatóforos.

Finalmente, en 1991, Nyrén y col. publicaron un nuevo método de purificación de esta enzima. La solubilización se realiza con una mezcla de nonanoil-N-metilglucamida (MEGA-9) y colato; además, se emplea un fraccionamiento con polietilenglicol, una cromatografía de hidroxiapatita y una cromatografía de afinidad. Se obtiene una purificación de 92 veces y la actividad específica es de 20.4 μ moles de PPI hidrolizado/min/mg de proteína. La actividad hidrolítica de esta enzima se estimula por fosfolípidos y Tritón X-100, la cardiolipina es el lípido que brinda la mayor activación (9 veces). Al reconstituir esta enzima en liposomas, se presenta una actividad hidrolítica estimulada por desacoplantes y sensible a DCCD. La enzima purificada migra en geles de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (PAGE-SDS), teñidos con plata, como una sola banda con un peso molecular aparente de 56,000 daltones, aunque este peso puede estar siendo subestimado si se considera que las proteínas hidrofóbicas unen mucho SDS. La estructura oligomérica aún está en discusión.

Regulación de la enzima membranal por cationes divalentes

Como todas las pirofosfatasas, citoplásmicas o membranales, la pirofosfatasa de membrana de *R. rubrum* requiere Mg^{2+} para que se formen sus sustratos, Mg-PPI para la hidrólisis o Mg-Pi para la síntesis (Lahti, 1983). Sin embargo, parece que el Mg^{2+} libre

ejerce también 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 cation puede unirse a la pirofosfatasa y protegerla contra la inhibición causada por agentes como N-etilmaleimida y 4-cloro-7-nitrobenzofurazano. También se ha encontrado que la concentración de Mg^{2+} libre estimula la reacción de intercambio Pi-PPI (Celis y col., 1985), lo que sugiere que este metal se une a la enzima e induce un efecto favorable sobre la reacción.

Datos más recientes de nuestro laboratorio (Celis y Romero, 1987), sugieren que la enzima tiene un sitio para Mg^{2+} que puede ser también ocupado por otros cationes divalentes (Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , etc) que inducen cambios en las propiedades cinéticas de la enzima. Por ejemplo, el Zn^{2+} puede formar el complejo Zn-PPI (tan buen sustrato como el Mg-PPI) y cuando está en forma libre inhibe la hidrólisis y el recambio Pi-PPI.

Otros datos (Ordáz y col., 1992) indican que la presencia de Mg^{2+} y Zn^{2+} , al preincubar la enzima a temperatura de $70^{\circ}C$, no solo la protege de su desnaturalización, sino que además la activa. Al ser solubilizada la enzima se sigue observando este efecto protector hasta temperaturas de $65^{\circ}C$. Los datos anteriores sugieren la existencia de un sitio regulador en la enzima para estos cationes divalentes.

Por último, mediante estudios cinéticos, se ha encontrado (Sosa y col., 1992) que el Mg^{2+} libre es un activador esencial de

la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa de membrana, ya que por abajo de 10 μM de Mg^{2+} libre, no hay actividad. El Mg^{2+} disminuye la K_m para el sustrato Mg-PPi . Experimentos utilizando patrones de inhibición cruzada y cinética de equilibrio rápido, han sugerido un mecanismo ordenado, donde primero debe entrar el Mg^{2+} a la enzima para después incorporarse el sustrato Mg-PPi^{2-} y así poder hidrolizarse:



Estudios referentes a la pirofosfatasa citoplásmica de levadura (Cooperman, 1982) muestran que esta 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 unen a la enzima, ni su localización precisa en la estructura polipeptídica.

Es interesante comparar, en lo que respecta a sus requerimientos por Mg^{2+} libre, a la pirofosfatasa y a la H^+ATP sintetasa. En la $\text{H}^+\text{-ATP}$ sintetasa de cloroplastos se ha reportado la unión de Mg^{2+} a un sitio específico (Younis y col., 1983); asimismo, en la $\text{H}^+\text{-ATP}$ sintetasa mitocondrial, el Mg^{2+} provoca una estimulación de la síntesis ATP y una disminución de la hidrólisis (Senior 1981).

Por lo anterior, es probable que una característica común de las enzimas transductoras de energía sea el requerimiento de metales divalentes tanto para formar su sustrato, como en su forma libre para inducir cambios regulatorios sobre la cinética de las enzimas. Por consiguiente, el papel de estos cationes en el

mecanismo de transducción energética requiere ser dilucidado en detalle.

B) Pirofosfatasa de Membrana Mitocondrial

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

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

La pirofosfatasa de mitocondria ha sido estudiada principalmente por Baykov, Avaeva y Mansurova de la Universidad Estatal de Moscú. El éxito en el estudio de las pirofosfatasas mitocondriales ha radicado en la implementación de técnicas para su separación y purificación. Existen dos formas de pirofosfatasas presentes en la mitocondria: la de membrana, que no está muy fuertemente unida (al lado interno de la membrana interna) y la soluble, localizada en la matriz.

La pirofosfatasa de membrana mitocondrial esta unida a la membrana menos fuerte que la ATP sintetasa. A los dos minutos de sonicación, ya no encontramos síntesis de PPI en partículas submitocondriales; pero sí, síntesis de ATP. Asimismo, cuando se

lavan las partículas con sacarosa 0.25 M, la actividad de hidrólisis y de síntesis de PPI decrecen considerablemente, lo que indica que esta enzima está laxamente unida a la membrana (Mansurova y col. 1977).

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

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

La pirofosfatasa I y II de corazón de res tienen en común las subunidades $\alpha\beta$, que son las subunidades catalíticas. Resultados cinéticos (Volk y col, 1982) de estas dos enzimas indican que son muy semejantes: a) ambas utilizan al complejo Mg-PPi como sustrato

para la hidrólisis, b) necesitan además 2 iones Mg^{2+} por sitio activo para la catálisis, c) los parámetros cinéticos que describen el pegado del $Mg-PPi$ y Mg a ambas enzimas son muy semejantes, d) tienen idénticos puntos isoeléctricos y pH óptimo de entre 7-9, e) las dos enzimas son inhibidas por NaF y Ca^{2+} y f) se inactivan rápidamente en ausencia de reactivos protectores de grupos sulfhidrilo.

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

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

Todos estos datos parecen sugerir que estas dos proteínas son

la misma y existen "in vivo" como formas interconvertibles.

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

Se ha encontrado también que la pirofosfatasa membranal mitocondrial de la levadura Saccharomyces cerevisiae comparte muchas de las características de la pirofosfatasa membranal de mitocondrias animales (Lundin y col, 1992). Recientemente (Lundin y col, 1991) se ha clonado el gen que codifica a la pirofosfatasa mitocondrial en la levadura S. cerevisiae utilizando hibridización con el gene PPA1 de la pirofosfatasa citoplásmica de levadura. Este nuevo gene, PPA2, está localizado en el cromosoma 13 y codifica una proteína con una secuencia 49% parecida a la enzima citoplásmica.

En muchos aspectos, la pirofosfatasa de mitocondria recuerda a la ATP sintetasa mitocondrial, en la cual la F_1 se une al complejo F_0 que es el canal de H^+ .

A diferencia de la enzima citoplásmica, esta enzima tiene una secuencia líder rica en residuos básicos e hidroxilados, típico de proteínas mitocondriales. Levaduras que sobreproducen PPA2 tienen un incremento de 47 veces en la actividad de pirofosfatasa. Esta actividad se estimula por desacoplantes. Las células con el gen PPA2 cortado son viables, aunque no pueden crecer con fuentes de carbono respiratorias; además, estas células pierden su DNA mitocondrial.

C) Pirofosfatasa Membranal de Vacuola.

Hace poco se descubrió una nueva pirofosfatasa translocadora de H^+ en las membranas vacuolares o tonoplastos de plantas (Walker y Leigh, 1981; Wagner y Mulready, 1983; Rea y Poole, 1985; Wang y col., 1986), aunque también se ha encontrado en vacuolas de levaduras. Desde su descubrimiento hasta la fecha, se han hecho numerosas investigaciones al respecto. Los grupos que más se han destacado son los de: Maeshima y Hager de Japón, Rea y Poole de Canadá, Maslowska de Polonia y Leight y Britten de Inglaterra, entre otros.

Esta pirofosfatasa es una proteína intrínseca de membrana que cataliza simultáneamente la hidrólisis de PPI y la translocación electrogénica de H^+ al interior de las vacuolas. Hasta la fecha no se ha demostrado que sintetice PPI.

Su actividad es independiente de la ATP sintetasa translocadora de H^+ , que también se localiza en estas membranas.

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

Esta pirofosfatasa es específica para el complejo Mg-PPI como sustrato, requiere de Mg libre como cofactor esencial para expresar su actividad y mantener su estructura (en presencia de Mg, la enzima es termoestable y se protege contra la proteólisis). Estos datos sugieren un sitio para Mg libre que aún no ha sido determinado, ni el número de cationes necesarios (Maeshima, 1991).

Se ha reportado que depende de K^+ para estimular la hidrólisis de Mg-PPi y que es inhibible por fluoruro y MDP como las demás pirofosfatasas (Walker y Leight, 1981). El nitrato, que es un inhibidor específico de la ATPasa de vacuola, no tiene ningún efecto sobre esta pirofosfatasa.

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

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

La enzima pura es estimulada por fosfolípidos y es inhibible por DCCD, el polipéptido pega [^{14}C]DCCD. La secuencia amino terminal (30 aminoácidos) de la pirofosfatasa vacuolar de frijol mungo ha sido determinada. De esta sección, 25 aminoácidos son no polares, indicando que este extremo pueda ser parte de un dominio membranal de la proteína, involucrado con el bombeo de H^+ . Esto se ve apoyado, por el hecho de que este fragmento no muestra semejanza

con la pirofosfatasa citoplásmica de levadura (Maeshima y Yoshida, 1989).

Muy recientemente, Sarafian y col. (1992) clonaron y secuenciaron el cDNA que codifica a la pirofosfatasa de membrana vacuolar de Arabidopsis thaliana. La proteína traducida a partir de la secuencia de nucleótidos de los cDNAs está constituida por 770 aminoácidos y tiene un peso molecular de 80,800. Es una proteína integral altamente hidrofóbica y la estructura derivada de las gráficas de hidrofobicidad contiene 13 cruces transmembranales. Aparentemente, el gen que codifica a esta proteína está presente en una sola copia en el genoma de Arabidopsis. No se ha encontrado semejanzas entre la secuencia de la pirofosfatasa de vacuola, translocadora de H^+ y ninguna de las bombas de H^+ o enzimas dependientes de PPI, lo que sugiere un origen evolutivo diferente para esta translocasa.

1.4.3. Semejanzas Estructurales Entre los Diferentes Tipos de Pirofosfatasas Membranales.

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

estructuralmente.

Acerca del tamaño molecular nativo y funcional de la pirofosfatasa vacuolar, Sato y col. (1991) reportaron, utilizando filtración en HPLC de la enzima pura de vacuola de calabaza (Cucurbita moschata) e inactivación por radiación de la enzima en la membrana vacuolar, un peso de 135-139 kDa, lo que sugiere que esta pirofosfatasa pudiera estar funcionando como un dímero de dos subunidades de 75 kDa. Estos datos concuerdan con los de Maeshima, 1990, que al entrecruzar a la pirofosfatasa vacuolar con dimetil suberimidato, producía un complejo correspondiente a un dímero de 2 subunidades de 73 kDa. Sin embargo, estos datos están en desacuerdo con Sarafian y col. (1991) que también reportan en betabel, utilizando análisis de inactivación por radiación, un tamaño funcional para la hidrólisis de 82 kDa, lo que sugiere un monómero como mínima unidad funcional y un tamaño para el transporte de H^+ de 3 ó 4 veces más grande.

1.5. EL PIROFOSFATO Y LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA EN LA EVOLUCION DE LOS MECANISMOS TRANSDUCTORES DE ENERGIA.

Desde hace tiempo, varios autores (Miller y Parras, 1964 y Lipmann, 1965) consideraron que el PPI podría ser el compuesto donador de energía más antiguo, tanto para los sistemas prebióticos como para las primeras formas de vida. La simplicidad de su estructura comparada con la del ATP, así como su posible presencia en los minerales de la tierra primitiva, permiten suponer que el PPI fue importante en las transformaciones bioenergéticas

primigenias. Esta suposición debe considerarse ahora seriamente a la luz de la evidencia experimental actual, donde encontramos síntesis de PPI y utilización del PPI como fuente de energía en diferentes sistemas vivos.

Por otra parte, también se ha planteado el posible papel de la pirofosfatasa de membrana en la evolución del mecanismo de acoplamiento de la óxido-reducción y la fosforilación. A este respecto, el grupo de Baltscheffsky (1982) ha propuesto que originalmente el sistema de transporte de electrones y el sistema de la pirofosfatasa de membrana eran fuentes de energía separadas (Fig. 4a). Posteriormente, gracias al funcionamiento en reversa de la fosfatasa, se dio un acoplamiento entre las dos entidades que funcionaban autónomamente, que condujo al primer almacén de energía con la configuración del PPI. Esta hipótesis postula que el primer transporte de H^+ a través de la membrana estuvo representado por la pirofosfatasa que contenía un canal específico para el paso de H^+ . Durante la evolución, surgió la H^+ -ATP sintetasa, esto creó una situación en la que coexistieron las dos enzimas (Fig. 4b) (como es el caso de R. rubrum actualmente) pero con el tiempo, se perdió la pirofosfatasa (Fig. 4c) (tal es el caso de otros sistemas actuales, como Rhodobacter capsulata que solo tiene H^+ -ATP sintetasa). Esta hipótesis parece lógica, sin embargo, se necesita un estudio más profundo de estas dos enzimas para probarla y poder así ubicar evolutivamente a la pirofosfatasa de membrana.

Una pregunta de gran significado, tanto en el sentido evolutivo como en el mecanístico, es si la traslocación de H^+ de

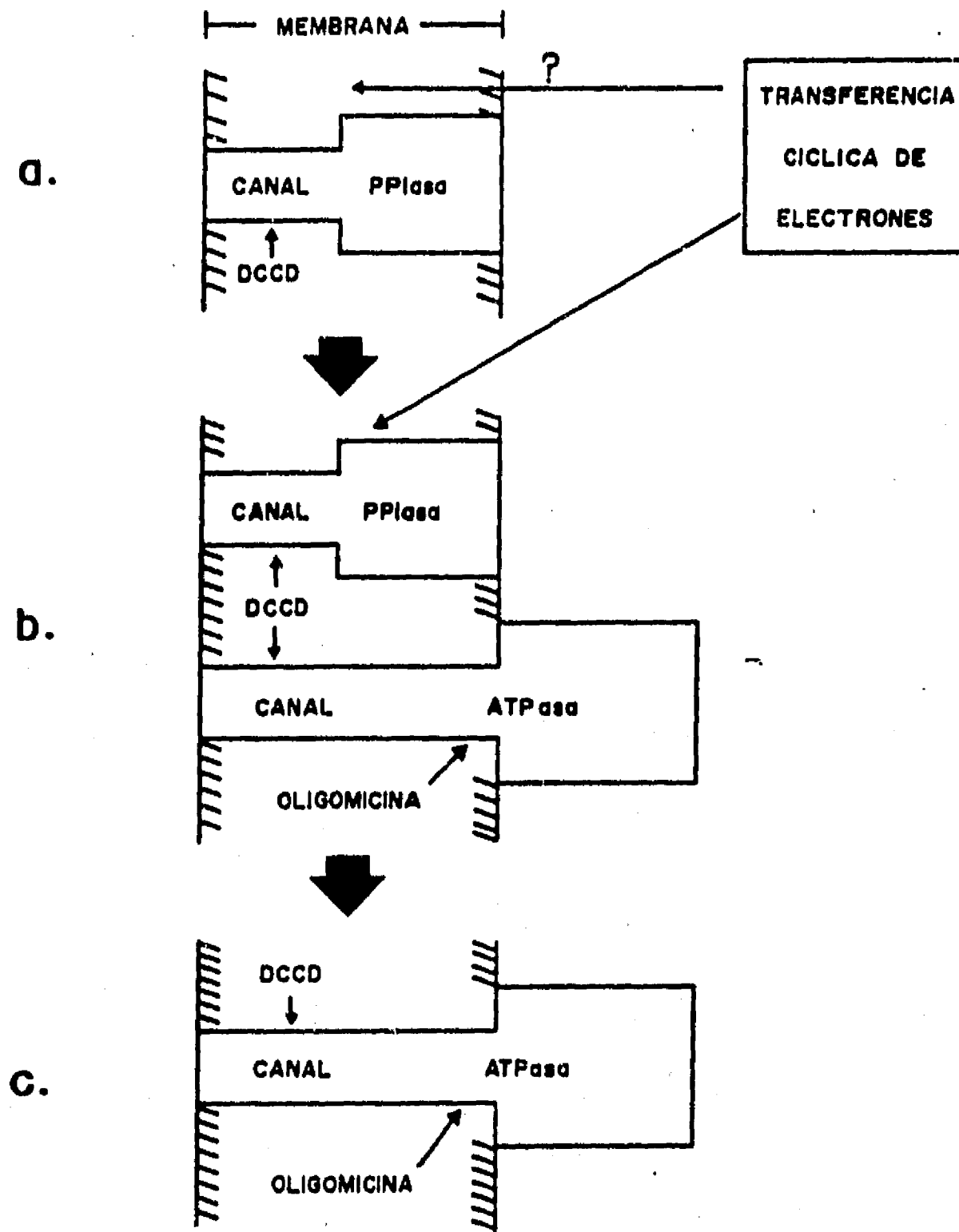


Fig. 4. Posible Mecanismo Evolutivo del Acoplamiento de Energía en Membranas Transductoras.
 a) Situación hipotética en la que sólo la PPIasa existía. b) Situación intermedia en la que coexisten la PPIasa y la H⁺ATPasa en la membrana. c) Situación en la que sólo subsiste la H⁺ATPasa. Tomada de Baltscheffsky y col., 1982.

la Pirofosfatasa utiliza el mismo canal de H^+ en la membrana del cromatóforo o uno más o menos similar al que usa la ATPasa.

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

1.6. MODIFICACIONES QUÍMICAS EN PIROFOSFATASAS DE MEMBRANA.

Se han realizado muchos estudios, utilizando modificaciones químicas, con el objeto de determinar la identidad y el papel de diferentes residuos de aminoácidos en el sitio activo de la pirofosfatasa citoplásmica, sobre todo en levadura (ver Cooperman, 1982). Sin embargo, son pocos los trabajos reportados acerca de esto con las pirofosfatasas membranales. En la pirofosfatasa de membrana de mitocondrias de hígado de rata, se sabe que la modificación de grupos SH en la enzima aislada causa un decremento en su actividad. La reactividad de la enzima en la membrana es más baja para reactivos impermeables a la membrana e incrementada con reactivos solubles en la membrana, lo cual podría sugerir que las subunidades catalíticas están sumergidas en la membrana interna (Baykov y col, 1987).

Por otra parte, las observaciones de Wang y col. (1986) de que

la pirofosfatasa de membrana de vacuola era inhibida por 7-cloro-4-nitrobenzo-2oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) y N-etilmaleimida (NEM), sugieren que los grupos sulfhidrilos reducidos, son importantes para la actividad de la enzima (grupos SH) Finalmente,. Sin embargo, no es hasta 1988, cuando Verstappen y Raush demuestran la presencia de diferentes grupos SH involucrados en la hidrólisis de PPI y en la translocación de H⁺. Estos investigadores encontraron efectos diferentes de NEM sobre la hidrólisis y el bombeo de H⁺; asimismo, el sustrato Mg-PPI no protege el bombeo de H⁺ contra la inhibición por NEM pero sí lo hace para la actividad hidrolítica.

En la pirofosfatasa de membrana de R. rubrum (Randhal, 1979) se reportó que NEM y el 4-cloro-7-nitrobenzofurazan (Nbf-Cl) inhiben a la actividad hidrolítica. El efecto de ambos reactivos es dependiente de la temperatura. EL Mg²⁺ protege de esta inhibición y el PPI incrementa la velocidad de inhibición. Estos resultados sugieren la presencia de grupos SH cerca o en el sitio catalítico.

La carbodiimida hidrofóbica N,N'diciclohexil carbodiimida (DCCD) se conoce que actúa inhibiendo la translocación de H⁺ de la ATP sintetasa actuando sobre los carboxilos de los residuos aspártico y glutámico en las regiones hidrofóbicas de este complejo enzimático. El DCCD inhibe a la pirofosfatasa de membrana de R. rubrum (Baltscheffsky y col, 1982) tanto en la membrana del cromatóforo como purificada (Nyrén et al., 1991). Maeshima y Yoshida, en 1989, reportan también que la actividad hidrolítica y el bombeo de H⁺ en la pirofosfatasa de vacuola es inhibida por DCCD.

OBJETIVO

Para empezar a entender el mecanismo molecular mediante el cual el sustrato interactúa con el sitio activo de la pirofosfatasa de membrana, así como la manera en que el Mg^{2+} libre activa en su sitio regulatorio, es importante obtener información acerca de los aminoácidos involucrados en estas uniones.

En este trabajo se estudiaron los carboxilos involucrados en el sitio activo y en el sitio regulatorio para Mg^{2+} libre de la pirofosfatasa de membrana de Rhodospirillum rubrum, mediante modificación química con dos diferentes carbodiimidas hidrosolubles, EDC y CMC.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1. CULTIVO DE BACTERIAS

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

2.1.1 Medios de Cultivo.

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

A) Medio sólido.

Contiene lo siguiente para un litro:

Extracto de levadura o de carne (Bioxon de México) -----	3 gr
Peptona de Gelatina (Bioxon de México) -----	2 gr
Agar bacteriológico (Bioxon de México) -----	1 %

El medio se esterilizó en la autoclave por 15 min en frascos con tapa de rosca de 15 a 20 ml de capacidad, que contenían aproximadamente 10 ml de éste.

B) Medio líquido.

Se preparó el medio líquido por el procedimiento formulado por Cohen-Bazire y col. (1957) el cual es una modificación del propuesto por Hutner (1950).

Para la preparación de este medio se partió de las siguientes soluciones:

a) Base Concentrada. Contiene lo siguiente para 2 lts.:

$N(CH_2COOH)_3$ -----	20 gr
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -----	28.9 gr

$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ----- 8.7 gr
 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ --- 0.185 gr.
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- 0.195 gr
 * Metales '44' ----- 100 ml

Se ajusta el pH a 6.8.

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

EDTA ----- 2.5gr
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- 5.0 gr
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- 11 mgr
 MnSO_4 ó ----- 1.54 gr
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ----- 1.37 gr
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ----- 0.392 gr
 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ---- 0.248 gr
 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ---- 0.177 gr
 H_2SO_4 ----- aprox. 4 gotas

Se ajusta el pH a 6.8 y se pone agua destilada hasta aforar a 1 lt.

- b) KH_2PO_4 136.09 gr y se afora a 1 lt con H_2O destilada, se ajusta el pH a 6.8.
- c) Acido succínico 100 gr para aforar a 1 lt con H_2O destilada, se ajusta el pH a 6.8.
- d) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 gr para aforar a 1 lt con H_2O destilada.
- e) NaCl 50 gr para aforar a 1 lt con H_2O destilada.

f) Acido L-glutámico 25 gr para aforar a 250 ml con H₂O destilada y se ajusta el pH a 6.8.

g) Acido L-aspártico 5 gr para aforar a 250 ml con H₂O destilada, ajustar el pH a 6.8.

El medio líquido final contiene, para aforar a 12.5 lt, las siguientes cantidades de las soluciones anteriores:

- a) Base concentrada ----- 250 ml
- b) KH₂PO₄ ----- 250 ml
- c) Acido succínico ----- 250 ml
- d) (NH₄)₂SO₂ ----- 62.5 ml
- e) NaCl ----- 125 ml
- f) Acido L-glutámico ---- 25 ml
- g) Acido L-aspártico ---- 25 ml

además de

- Extracto de carne --- 12.5 gr
- Acido nicotínico ----- 12.5 mgr
- Tiamina ----- 6.25 mgr
- Biotina ----- 0.125 mgr

Se ajustó el pH a 6.8. El medio se esterilizó por 45 min en frascos del volumen que se requiere. En el medio caliente se forma un precipitado que se disuelve a la temperatura ambiente. El medio es transparente y de color semejante al del extracto de levadura.

2.1.2. Siembra de Bacterias

Las bacterias se sembraron en placa por el método de dilución

para formar colonias únicas. De ahí se tomó una de ellas y se sembró por punción en los frascos con medio sólido. Se incubaron en la oscuridad por 12 hrs. para permitir que el crecimiento aeróbico de estos microorganismos elimine parcialmente el O_2 del medio. Terminado este período, las bacterias sembradas se expusieron a la luz de focos con filamento de tungsteno de 40 watts. La distancia entre los focos y los frascos fue de 30 cm. Una vez observado el desarrollo de la colonia en la punción, estos cultivos pueden mantenerse así por largo tiempo, entre 6 y 12 meses, como reserva, o bien, utilizarse para cultivos posteriores.

Para obtener grandes cantidades de bacterias se cultivaron en medio líquido. La manera en que se hizo fue la siguiente: a los frascos que contenían las bacterias en el medio sólido, se les agregó el medio líquido y se agitaron. Se dejaron toda la noche en la oscuridad y a continuación se colocaron a la luz de los focos con filamento de tungsteno de 40 watts a 30 cm. Después de 7 a 10 días se observó crecimiento de bacterias en el medio líquido, éste se transfirió a frascos de 100 ml de capacidad, a los cuales se les agregó medio fresco hasta colmar su capacidad. Se repitió el proceso oscuridad-luz y se dejó crecer a las bacterias hasta la fase logarítmica tardía. El inóculo bacteriano, obtenido así, se trasladó a frascos de 1 lt y de 9 lt sucesivamente, siguiendo los pasos descritos con anterioridad. Los frascos se cerraron con tapones de hule herméticos y se dejó el mínimo de aire entre el tapón y el medio de cultivo, para evitar al máximo la presencia de O_2 , ya que el crecimiento fotosintético de estos microorganismos

se realiza en anaerobiosis. Esta es la razón por la cual, previo al crecimiento en la luz, siempre se dejó crecer a los cultivos en la oscuridad por 12 hrs., aprovechando que la bacteria, por sus procesos metabólicos oxidativos, elimina el O_2 que está presente en el agua. Los cultivos se mantuvieron a $30^\circ C$.

2.2. COSECHA DE BACTERIAS

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

La cosecha permite obtener un paquete de bacterias libres de medio líquido. Es conveniente lavarlas al menos una vez con MOPS 50 mM, KCl 50 mM pH 7.0 para eliminar por completo los residuos de medio y desechos. Para volver a obtenerlas en un precipitado se centrifugan a 8 000 x g por 15 min. Los precipitados se pesaron y esto se consideró como peso húmedo. Se almacenaron así a $-70^\circ C$ en un congelador REVCO hasta ser utilizadas.

2.3. OBTENCION DE CROMATOFOROS

Se siguió el método descrito por Baccarini-Melandri y col., 1970, para la obtención de cromatóforos.

A) Las bacterias se resuspendieron en buffer de Tris-Cl 10 mM pH 7.5 en una proporción 1/10 (bacterias/buffer), que contenía

1 mg de DNAasa por 100 gr de peso húmedo de bacterias y $MgSO_4$, 1 mM.

B) Para romper las células se siguieron cualquiera de los dos procedimientos siguientes:

1) Se pasaron por una prensa Sorval Ribi Cell fractionator (French Press) a 16 000 psi (Baccarini-Melandri y col., 1970).

2) Se sonicaron en lotes de 15 ml por 2 min en un sonicador M.S.E. puesto al máximo y se enfriaron con agua a 4°C (Scholes y col., 1969).

C) A continuación se centrifugó a 20 000 x g durante 20 min para remover células sin romper, cápsulas, etc. que quedan en el precipitado.

D) El sobrenadante de la centrifugación anterior se sedimentó a 100 000 x g por 80 min obteniéndose así un precipitado de cromatóforos.

E) Este precipitado de cromatóforos se resuspendió en Tris-Cl 10 mM, EDTA 5 mM y EGTA 2 mM a pH 7.5 y se centrifugó nuevamente a 100,000 x g por 80 min. Esta operación fue para quitar los cationes divalentes presentes en la preparación.

F) El precipitado de cromatóforos obtenido del paso anterior se resuspendió en Tris-Cl 10 mM pH 7.5 y se centrifugó a la misma velocidad. Finalmente, los cromatóforos se resuspenden en buffer de Tris-Cl 10 mM pH 7.5 a una concentración aproximada de 60 mg/ml.

La preparación de cromatóforos se guarda a 4°C y se usa en los 3 días siguientes, ya que no se han detectado cambios en la

actividad hidrolítica o de intercambio durante este período de tiempo.

2.4. DETERMINACION DE PROTEINA

La cantidad de proteína se estimó por el método de Lowry y col., 1951, utilizando como estándar BSA.

2.5. METODO PARA DETERMINAR LA HIDROLISIS DEL PIROFOSFATO O LA ACTIVIDAD DE LA PIROFOSFATASA EN CROMATOFOROS.

La actividad de Pirofosfatasa, se midió como la liberación de Pi a partir de PPI a 30°, en presencia de MgCl₂.

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

Las condiciones del medio de reacción se especifican en los pies de figura de los Resultados. Contiene, en general: Tris-maleato 50 mM pH 6, Pirofosfato de sodio 2 mM y MgCl₂ 2 mM en un volumen final de 0.5 ml.

La reacción se inicia al añadir una cantidad de cromatóforos correspondiente a 1 mg de proteína. Todo el medio se incubaba a 30°C durante 5 min en la oscuridad, en un baño de temperatura constante. La reacción se detiene al añadir TCA a una concentración final de 6%. Finalmente se centrifuga en una centrifuga clínica a 3000 rpm por 5 min.

El Pi presente en el sobrenadante desproteínizado se midió colorimétricamente con el método de Sumner, 1944. La actividad

específica se refirió como nmoles de Pi/min/mg de proteína.

2.6. MODIFICACION DE GRUPOS CARBOXILO.

Los grupos carboxilo de los residuos de los ácidos aspártico y glutámico de las proteínas, pueden ser modificados químicamente utilizando carbodiimidias hidrosolubles (WSC). Estos compuestos convierten a los grupos carboxilo de las proteínas en amidas, en una reacción de dos pasos. Esta modificación se lleva a cabo en presencia de una amina en medios ligeramente ácidos (Fig. 5, reacción 1) (Hoare y Koshland, 1967).

Bajo condiciones suaves, los carboxilos más accesibles o más reactivos son modificados, pero en condiciones desnaturizantes todos los carboxilos pueden ser cuantitativamente sustituidos.

La secuencia de reacción se inicia por la adición del carboxilo a una de las dobles ligaduras de la WSC, formando el intermediario O-acilisourea (Fig. 5, reacción 2). El grupo carboxilo activado de este aducto puede entonces reaccionar por cualquiera de 2 rutas: 1) Un ataque por un nucleófilo HX (por ejemplo una amina) y entonces se formará como producto un acil nucleófilo, más el derivado de la carbodiimida [Fig. 5 (2) bifurcación superior; en el caso especial de que el nucleófilo sea el agua, el carboxilo se regenerará. 2) La O-acilisourea puede reorganizarse a una N-acilurea vía una transferencia intramolecular del grupo acilo [Fig. 5 (2), bifurcación inferior]. Estudios cinéticos del sistema carbodiimida-carboxilo-nucleófilo han demostrado que el reorganamiento puede hacerse muy lento, comparado

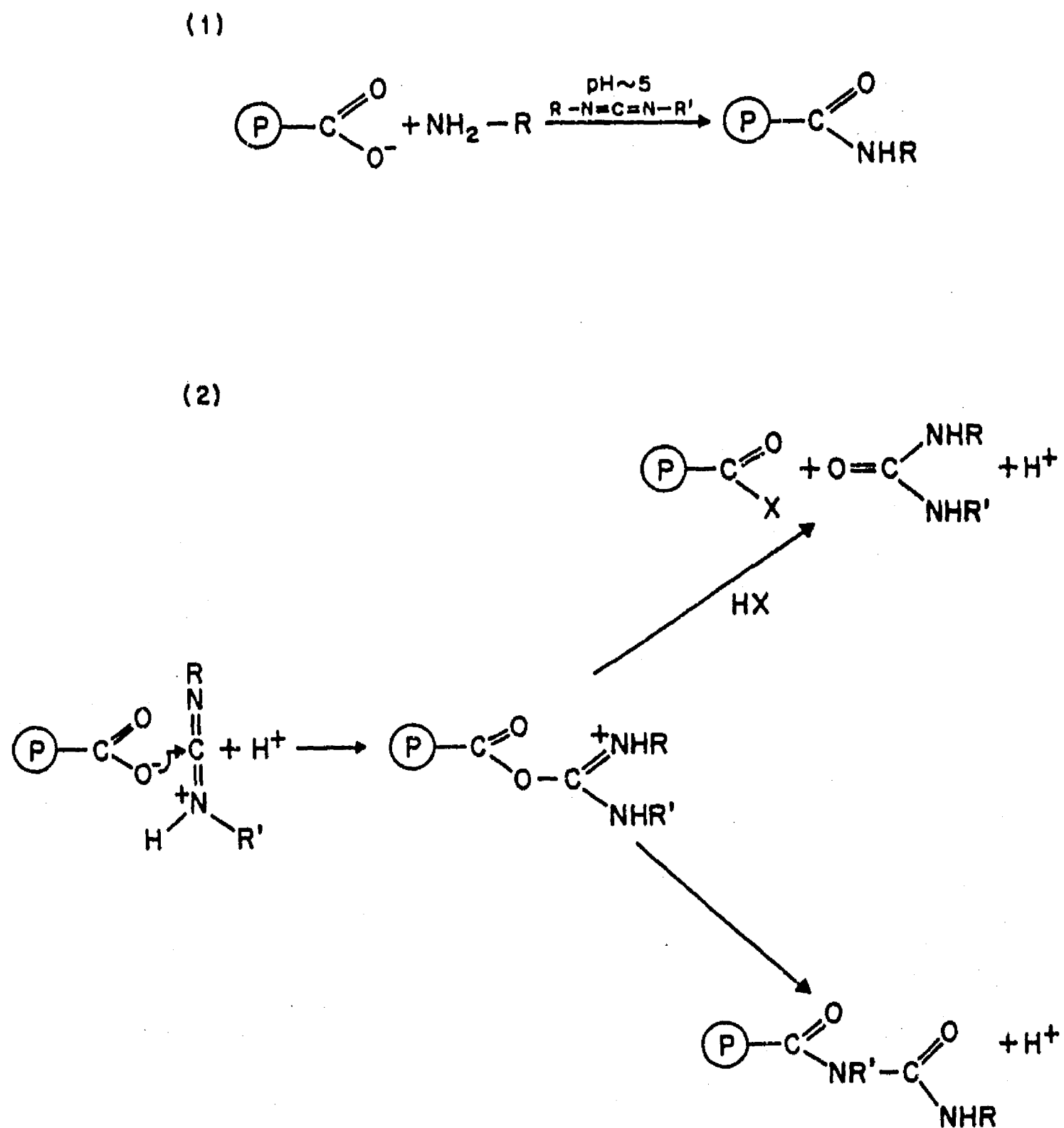


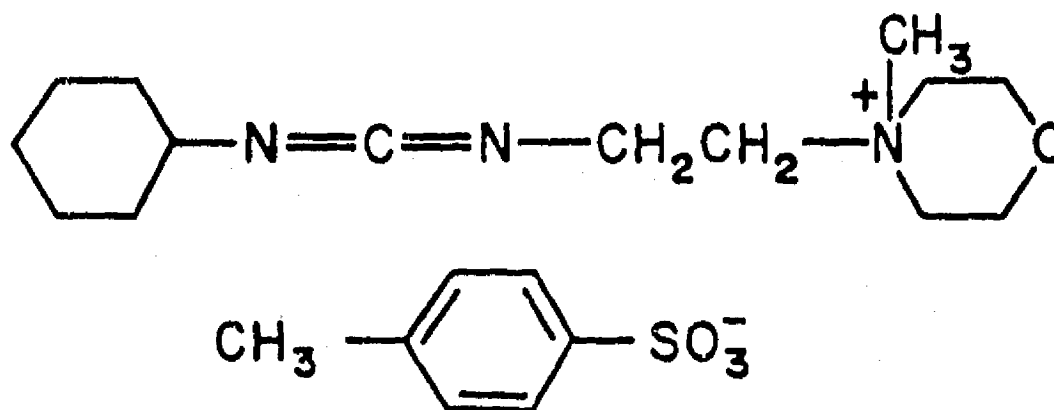
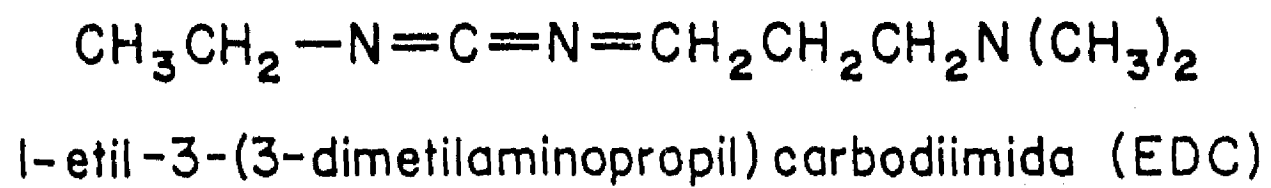
Fig. 5. Reacción de Modificación de los Grupos Carboxilo de las Proteínas por Carbodiimidas Hidrosolubles.
 (1) Reacción global. (2) Desglosamiento de la reacción. P: proteína, R-N = C = N - R': carbodiimida.

con el ataque nucleofílico, si la concentración del nucleófilo es lo suficientemente grande (Hoare y Koshland, 1967). Así, el acoplamiento del carboxilo y el nucleófilo puede llevarse a cabo completamente en presencia de exceso de nucleófilo y carbodiimida.

Aunque las carbodiimidas muestran una fuerte preferencia para reaccionar con grupos carboxilos (Hoare y Koshland, 1967) también pueden reaccionar con sulfhidrilos y tirosinas, aunque más lentamente (Carraway y Triplett, 1970; Carraway y Koshland, 1968, respectivamente). La contribución de la modificación a la actividad perdida, puede ser estimada tratando a la enzima con hidroxilamina para regenerar las tirosinas. Los grupos sulfhidrilos pueden protegerse previamente por reacción con reactivos SH y así evitar la modificación.

Varias carbodiimidas hidrosolubles han sido empleadas para modificación de proteínas. La 1-ciclohexil-3-(2 morfolinil-4-etil)carbodiimida, meto-p-toluensulfonato (CMC) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) cuyas estructuras se muestran en la Fig. 6, se venden comercialmente y son de las más ampliamente utilizadas. Ambos compuestos reaccionan igual, aunque es de esperarse que el más pequeño tenga mayor acceso a los grupos carboxilo parcialmente escondidos.

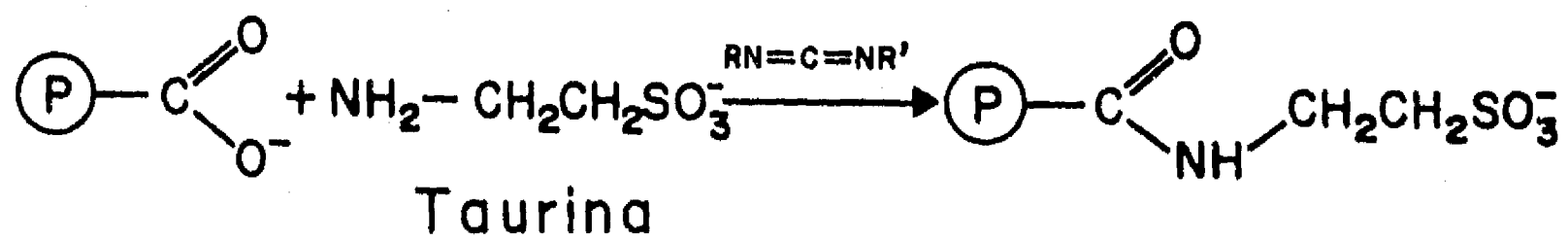
Así como las WSC pueden variarse para ajustarse a diferentes situaciones experimentales, también puede ser variada la amina que se empleará. Dependiendo de la amina utilizada, el carácter del producto puede variar considerablemente (Fig. 7), puede conservarse el carácter aniónico, o puede reemplazarse por neutro o catiónico.



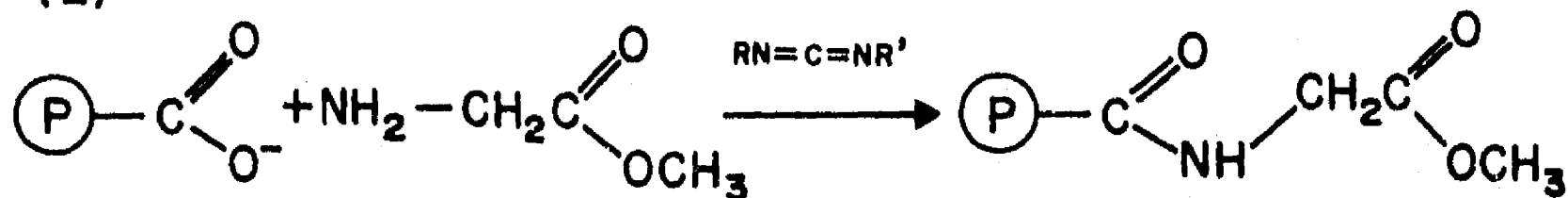
1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida
meto-p-toluen sulfonato (CMC)

Fig. 6. Fórmulas Químicas de las Carbodiimidias Hidrosolubles.

(1)

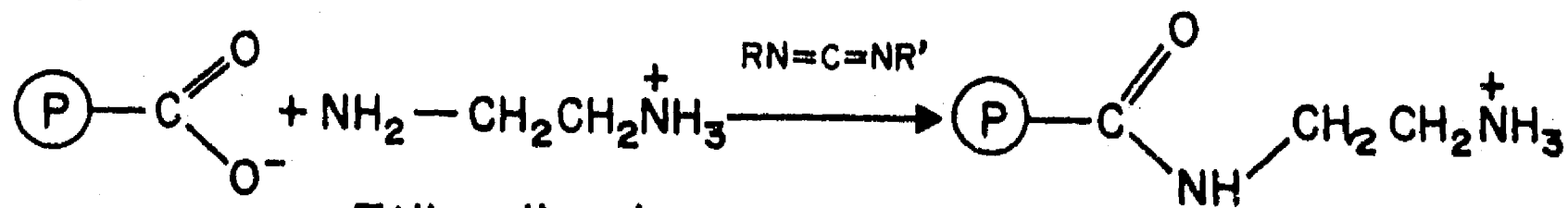


(2)



Glicina metil ester

(3)



Etilendiamina

Fig. 7. Reacción de Modificación de los Carboxilos Variando la Amina Utilizada.
P: proteína, RN = C = NR': carbodiimida.

2.6.1 Reacción de la Pirofosfatasa de Membrana del Cromatóforo con las Carbodiimidias Hidrosolubles.

En este trabajo se utilizaron las carbodiimidias EDC y CMC. Las soluciones empleadas (~ 50 mM) se prepararon inmediatamente antes de cada experimento para evitar descomposición (Guilles y col, 1990). La reacción de modificación se llevó a cabo preincubando los cromatóforos (1 mg de proteína) con EDC o CMC a las concentraciones indicadas en los pies de figura, en 50 mM Mes, 100 mM de taurina, pH 6.0, y a temperatura ambiente. A este pH, las WSC son prácticamente específicas para los grupos carboxilo (Hoare y Koshland, 1967). A diferentes intervalos de tiempo, se tomaron alícuotas y se detuvo la reacción de modificación por la adición del medio de reacción para medir actividad pirofosfatasa, haciendo así una dilución de 10 veces. El grado de modificación se determinó midiendo la actividad hidrolítica residual de la enzima.

En los experimentos para estudiar la protección del Mg^{2+} libre o del PPI sobre la velocidad de inactivación de la pirofosfatasa de membrana por el EDC o el CMC, estas sustancias fueron agregadas en el medio de preincubación y las actividades residuales fueron ensayadas como se describió anteriormente. Solamente en el caso donde se estudió el efecto del sustrato Mg-PPi sobre la modificación, la reacción se llevó a cabo sin preincubación.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSION

Para iniciar el estudio de los carboxilos importantes para la actividad de la Pirofosfatasa de Membrana de Rhodospirillum rubrum, se hicieron algunos experimentos controles.

3.1. DETERMINACION DE LA DESCOMPOSICION DE LAS CARBODIIMIDAS.

Hoare y Koshland (1967) reportan que las carbodiimidas hidrosolubles son estables por períodos de tiempos largos. Sin embargo, Gilles y col. (1990), al estudiar algunos de estos compuestos, encontraron descomposición de ellos en función del pH y de diferentes agentes que se añaden al medio. Tomando en cuenta lo anterior, se determinó la descomposición del EDC y CMC bajo nuestras condiciones experimentales de modificación y pH.

Se preincuba la carbodiimida preparada justo en ese momento con el medio de preincubación durante diferentes tiempos (0 - 90') y a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden los cromatóforos, se incuban 5' y se agrega el medio para medir actividad pirofosfatasa. Si no hubiera descomposición de la carbodiimida, el % de inhibición de la actividad debería ser el mismo para todos los tiempos de preincubación.

Como puede verse en la Fig. 8, a los 10 min de preincubación, prácticamente ambas carbodiimidas no han sufrido descomposición (% remanente: EDC 99% y CMC 100%); no obstante, a los 90 min, aproximadamente, el 25% de ambas carbodiimidas se ha perdido. El tiempo medio de descomposición se calculó de la siguiente manera:

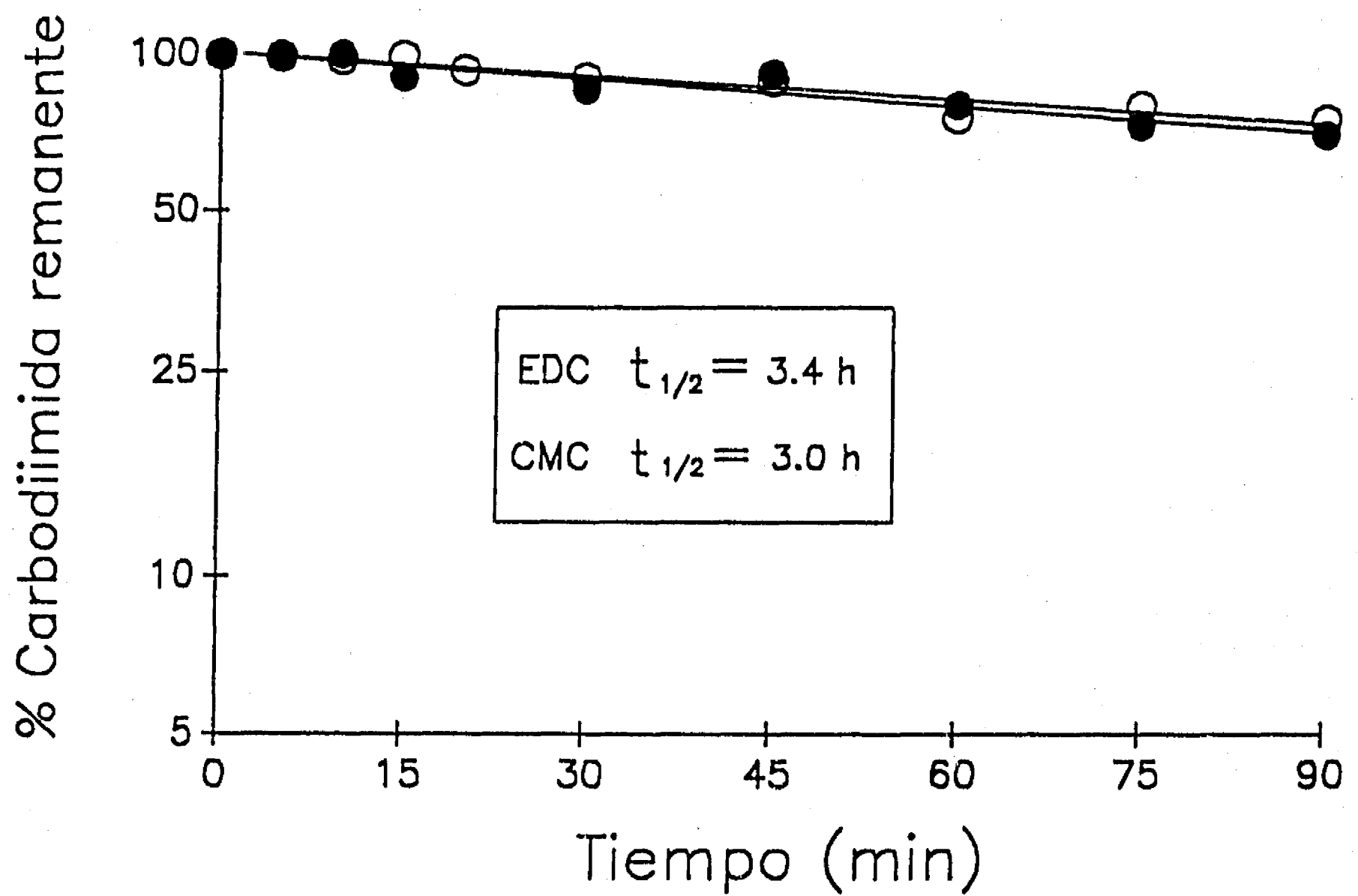


Fig. 8. Descomposición del EDC y CMC en las Condiciones Experimentales Utilizadas y Obtención del $t_{1/2}$ de Descomposición.

Condiciones experimentales: se preincubó 5 mM de EDC o CMC (preparado en ese momento) con el medio de preincubación Mes 50 mM, pH 6.0 y taurina 100 mM, pH 6.0 a temperatura ambiente. A los tiempos indicados se añadió cromatóforos (1 mg de proteína) y se incubaron por 5 min para posteriormente medir actividad hidrolítica como se describe en Materiales y Métodos. El % de carbodiimida remanente se calcula por la diferencia en el % de inhibición a cada tiempo con respecto al tiempo 0.

utilizando la ecuación:

$$\ln [A] = -kt + \ln [A]_0 \dots\dots\dots (1)$$

se obtuvo la siguiente ecuación:

$$k = - \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{[A]}{[A]_0}$$

- donde
- A_0 = % actividad sin carbodiimida
 - A = % actividad a los 5' con carbodiimida
 - t = 5 min
 - k = constante de velocidad de 1er. orden

se calcularon las k para las actividades obtenidas a los diferentes tiempos de preincubación con el modificador (0-90 min). Con estos valores de k y utilizando las figuras 11B y 12B, se obtuvieron los valores correspondientes de concentración de las carbodiimidias respectivas y se obtuvieron las rectas de la Figura 8, de donde a partir de la pendiente se calcula la k'.

Así, sustituyendo la ecuación (1), se obtiene que

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k'} = \frac{0.693}{k'}$$

y los valores obtenidos fueron los siguientes:

- para EDC $t_{1/2} = 3.43$ hrs
- para CMC $t_{1/2} = 3.08$ hrs

Este experimento nos asegura que a los tiempos utilizados en nuestros experimentos, las carbodiimidias son estables.

3.2. EFEECTO DE DIFERENTES AMINAS SOBRE LA MODIFICACION POR EDC.

Con el fin de emplear la amina adecuada para la reacción de modificación de los grupos carboxilo, se realizaron los experimentos de la Fig. 9. Se utilizaron tres diferentes aminas: 1) Taurina, que conserva la carga negativa del carboxilo después de la modificación; 2) Glicil metil ester, que deja neutro el producto y 3) Etilendiamina, que da carga positiva a la proteína modificada.

El primer experimento fue para ver el efecto de las aminas sobre la enzima en el medio de preincubación sin añadir carbodiimidias. En la Fig. 9 A, se puede ver que la etilendiamina causa un efecto inhibitorio muy pronunciado sobre la actividad de pirofosfatasa, mientras que la glicil metil ester provoca un efecto que se ve hasta los 5 min de preincubación y continua aumentando; la taurina, por el contrario, no causa ningún efecto sobre la reacción y por esta razón, es la amina que se utilizó en nuestros experimentos.

Cuando se realiza el experimento en presencia de EDC (Fig. 9 B), la curva de inhibición de la actividad es la misma para la etilendiamina (que en la Fig. 9 A); sin embargo, para la glicil metil ester y la taurina, ahora se ve un efecto inhibitorio más marcado y dependiente del tiempo de preincubación, indicándonos la reacción de modificación con la carbodiimida.

El EDC sólo, sin amina, inhibe la reacción considerablemente (por ejemplo a 5' se obtiene un 35% de inhibición). Sin embargo, y como se establece en Métodos, página 50, todos nuestros experi-

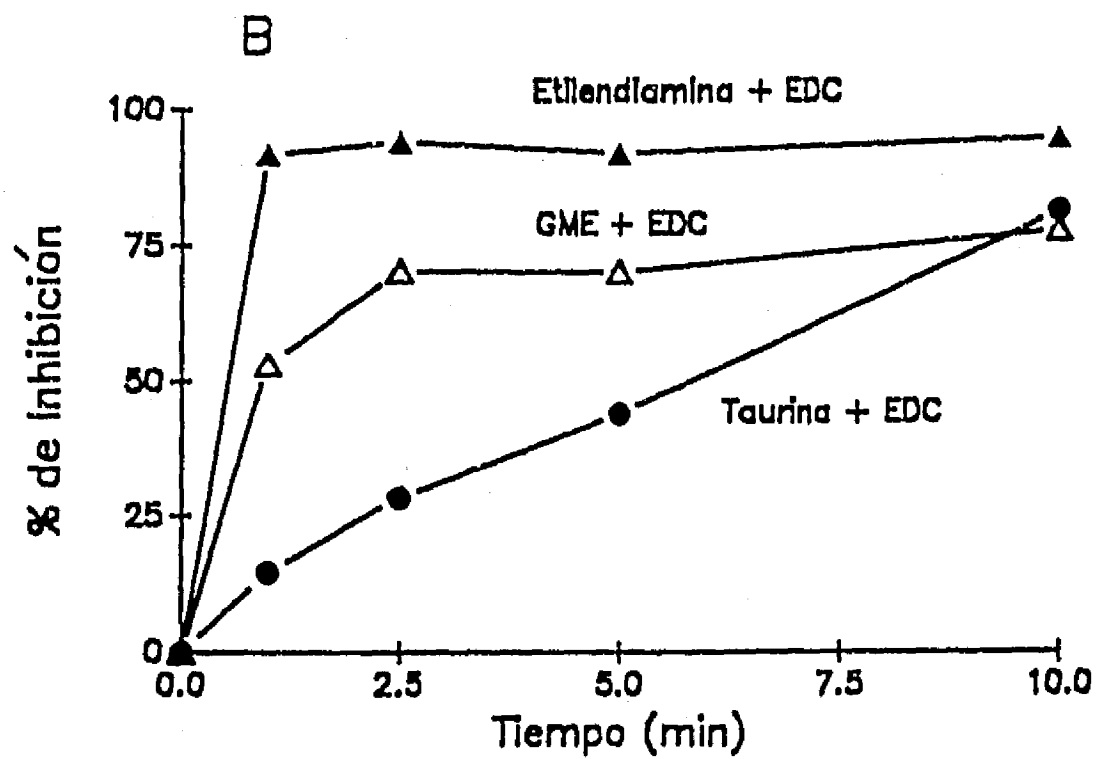
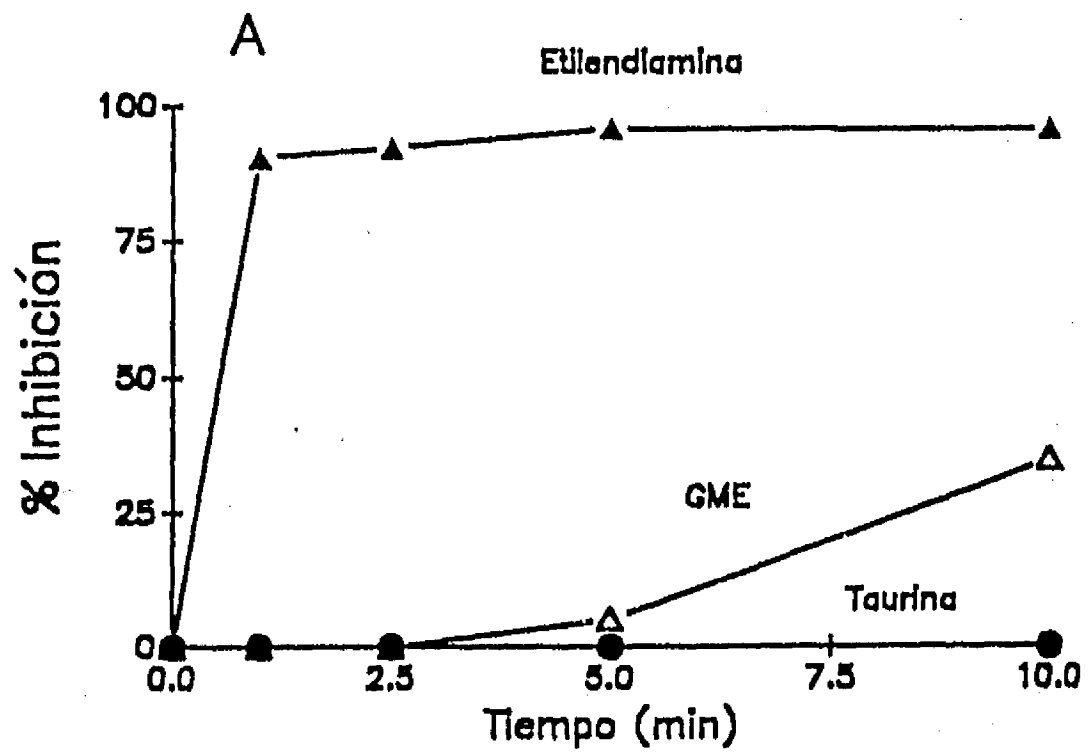


Fig. 9. Efecto de Diferentes Aminas Sobre la Modificación de Carboxilos por EDC de la Pirofosfatasa de Membrana. A. Control, efecto sobre la pirofosfatasa sin añadir EDC. B. Efecto sobre la modificación por EDC. Condiciones Experimentales: Se preincubaban las aminas (100 mM) con Mes 50 mM, pH 6.0 y 1 mg de proteína de cromatóforos, sin (A) y con (B) EDC 2.5 mM y se preincubaban por los tiempos indicados para después medir actividad hidrolítica como en Materiales y Métodos.

mentos se llevaron a cabo en presencia de amina (taurina) para favorecer que la reacción de modificación se completara.

3.3. INACTIVACION DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA POR CARBODIIMIDAS HIDROSOLUBLES.

La actividad hidrolítica de la pirofosfatasa de membrana de Rhodospirillum rubrum es inhibida tanto por EDC como CMC en una forma dependiente de la concentración de carbodiimida (Fig. 10) Evidentemente, el EDC es más efectivo que el CMC. Este hecho refleja, tal vez, una mayor accesibilidad de la carbodiimida pequeña (EDC).

3.3.1. Inactivación por EDC.

La incubación de la pirofosfatasa de membrana con EDC provoca una pérdida de la actividad hidrolítica dependiente de tiempo. Las gráficas semilogarítmicas de actividad residual contra tiempo a varias concentraciones de EDC (Fig. 11 A) producen líneas rectas hasta los 10 min de reacción. Al graficar las constantes de pseudo primer orden (k_{obs}) obtenidas de la Fig. 11 A, contra la concentración de EDC, se obtiene una relación lineal que parte del origen, lo que indica la formación de un complejo irreversible entre los carboxilos de la enzima y el EDC (Fig. 11 B); la constante de velocidad de segundo orden para la inactivación calculada de esta gráfica es de $39.1 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. El orden de reacción para la inactivación con respecto a la concentración de EDC se calculó de graficar el $\log k_{obs}$ contra el \log de la concentración

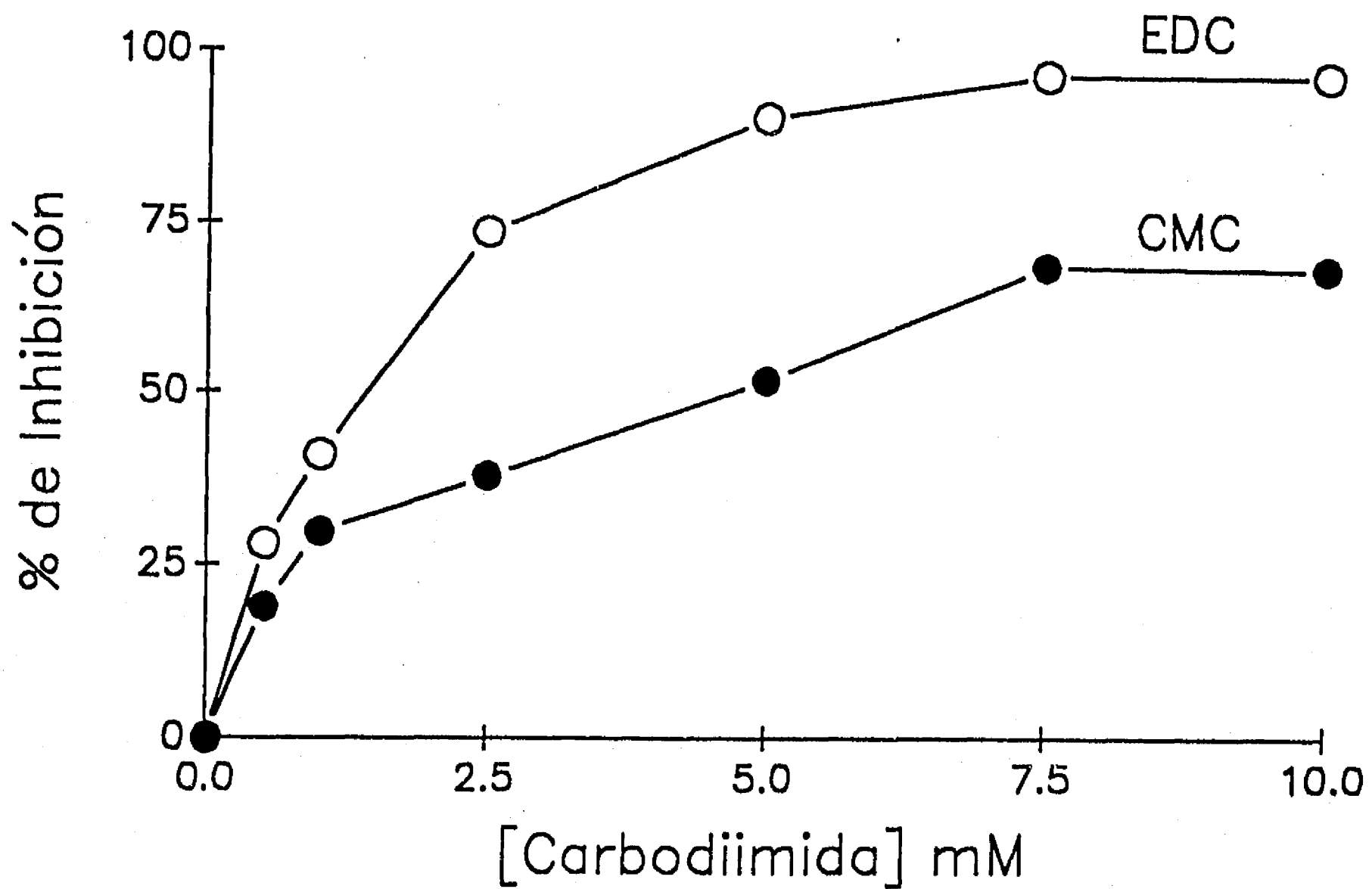


Fig. 10. Efecto Inhibitorio de la Concentración de EDC ó CMC Sobre la Actividad Hidrolítica de la Pirofosfatasa de Membrana. El medio de preincubación contenía: EDC ó CMC a las concentraciones indicadas, Mes 50 mM, pH 6.0, taurina 100 mM, pH 6.0 y 1 mg de proteína de cromatóforos. La preincubación se llevó a cabo a temperatura ambiente por 10 min y se midió actividad pirofosfatasa como en Materiales y Métodos.

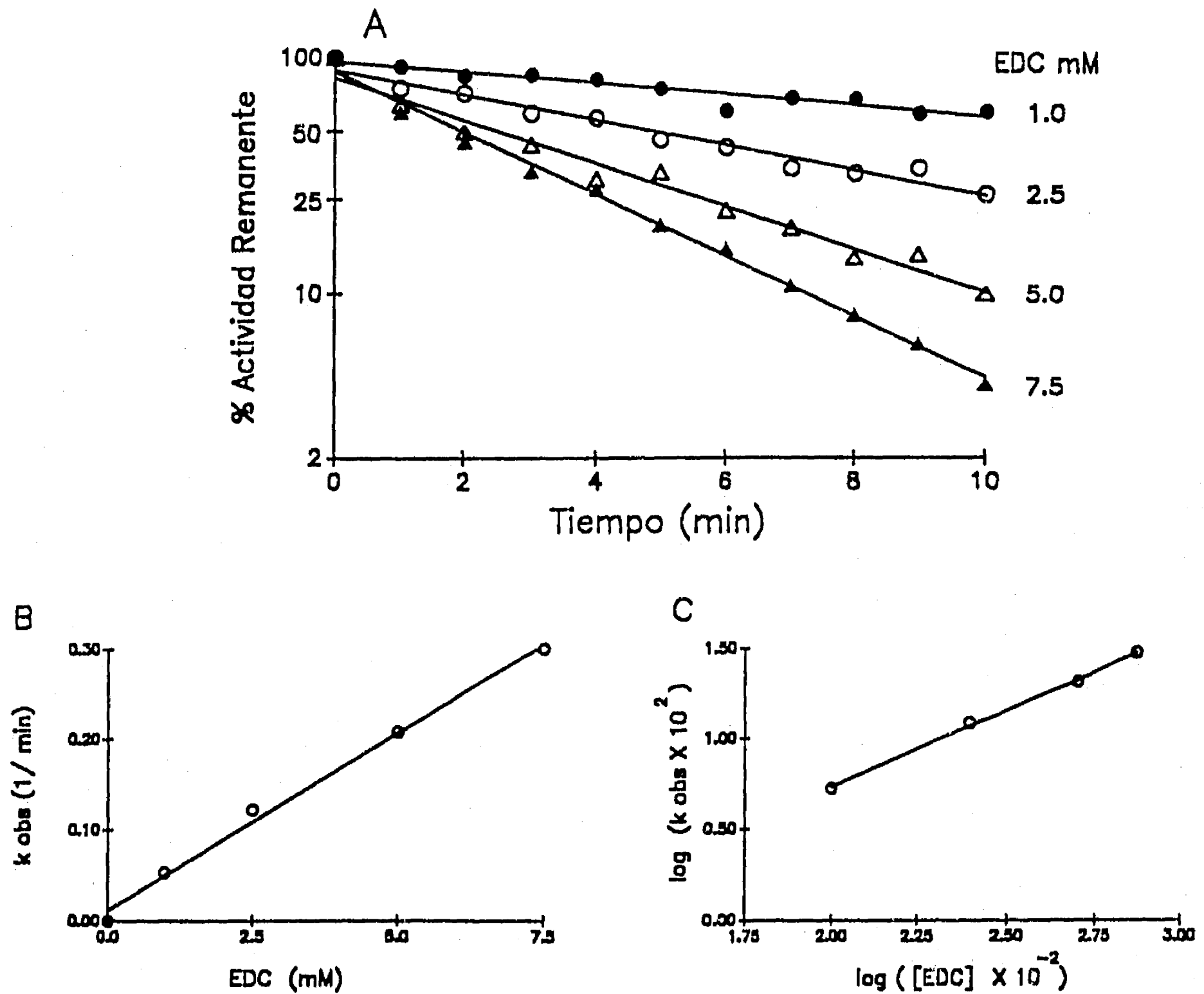


Fig. 11. Inactivación de la Pirofosfatasa de Membrana por EDC.
 A. Gráfica semilog de % de actividad remanente vs. tiempo. Medio de preincubación: EDC en las concentraciones indicadas, Mes 50 mM pH 6.0, taurina 100 mM pH 6.0 y 1 mg de proteína de cromatóforos. El tiempo de preincubación se varió como se indica y se midió actividad hidrolítica como se ha indicado.
 B. Gráfica de K obs vs la concentración de EDC.
 C. Gráfica de log-log de los mismos datos.

de EDC (Fig. 11 C); la estequiometría obtenida de la pendiente es de 0.86, lo que indica que, aproximadamente, 1 mol de EDC inactiva 1 mol de pirofosfatasa de membrana a este intervalo de tiempo (10 min).

3.3.2. Inactivación por CMC.

En la Fig. 12 A se muestra la inactivación por CMC, sobre la pirofosfatasa de membrana. Al igual que en el caso anterior, se obtiene una relación lineal en las curvas semilogarítmicas hasta los 10 min de reacción. De la gráfica de k obs contra la concentración de CMC se obtiene una línea recta, que indica de nuevo la formación de un complejo irreversible (Fig. 12 B) y una constante de velocidad de segundo orden de $18.5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$. La gráfica del $\log k$ obs contra el \log de la concentración de CMC tiene una pendiente de 0.90, que sugiere nuevamente una estequiometría de 1:1 (Fig. 12 C).

Comparando ambas inactivaciones (Fig. 11 A y Fig. 12 A), es aparente que el EDC tiene una constante de segundo orden mayor que la del CMC, lo que refleja, probablemente, una mayor accesibilidad del EDC debida a su pequeño tamaño molecular.

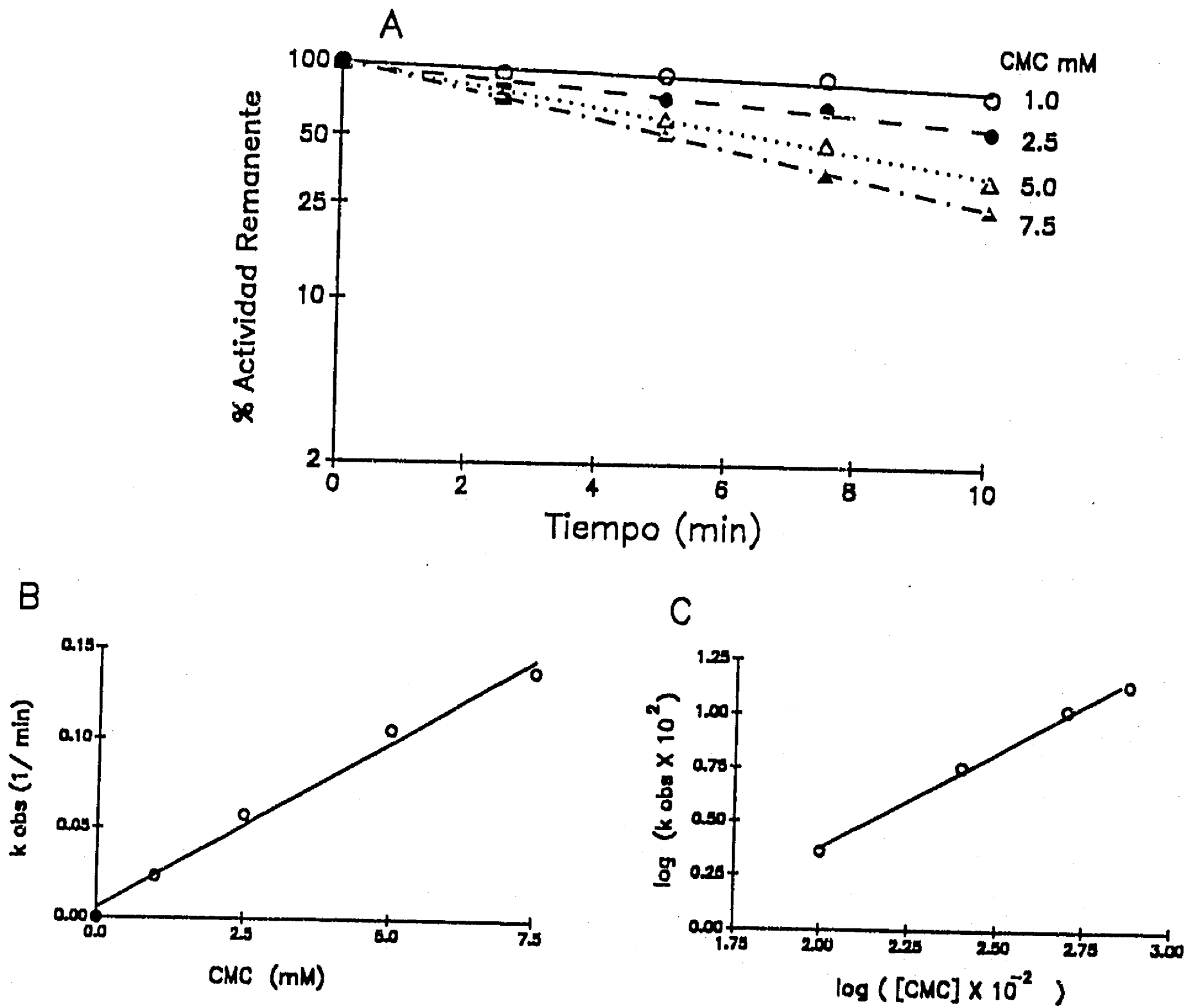


Fig. 12. Inactivación de la Pirofosfatasa de Membrana por CMC.
 A. Gráfica semilog de % de actividad remanente vs tiempo. Las condiciones experimentales son iguales que en la Fig. 11, sólo que empleando CMC en lugar de EDC.
 B. Gráfica K obs vs concentración de CMC.
 C. Gráfica log-log de B.

3.4. PROTECCION CONTRA LA INACTIVACION POR EDC Y CMC DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA.

Para investigar si la inactivación de la pirofosfatasa de membrana por las carbodiimidias hidrosolubles (EDC y CMC) era debida a una modificación en el sitio activo o por un efecto indirecto de la modificación de otros carboxilos fuera del sitio activo, se estudió el efecto protector de PPI, Mg^{2+} , el sustrato (Mg-PPI) y análogos del sustrato sobre la inactivación por WSC.

3.4.1. Protección del PPI y el Mg^{2+} .

EDC. El efecto del PPI y el Mg^{2+} sobre la inactivación de la enzima con EDC se muestra en la Fig. 13 A y C. Como puede observarse, ambos compuestos disminuyen la inactivación de la enzima por EDC de una manera dependiente de su concentración. La gráfica de $1/K$ obs contra la concentración de PPI (Fig. 13 B) o Mg (Fig. 13 D) nos da una relación lineal que sugiere una protección completa de ambos compuestos contra la inactivación por EDC.

El intercepto en las abscisas de estas rectas nos permite obtener la constante de disociación de la enzima por el Mg^{2+} y el PPI:

$$K_{Mg} = 4.2 \text{ mM} \quad K_{PPI} = 2.5 \text{ mM}$$

CMC. El PPI y el Mg también protegen a la pirofosfatasa contra la inactivación por el CMC de una forma dependiente de su concentración (Fig. 14 A y C). Sin embargo, como se puede apreciar en la figura, al añadir 15 mM de PPI o Mg, ya no hay un incremento

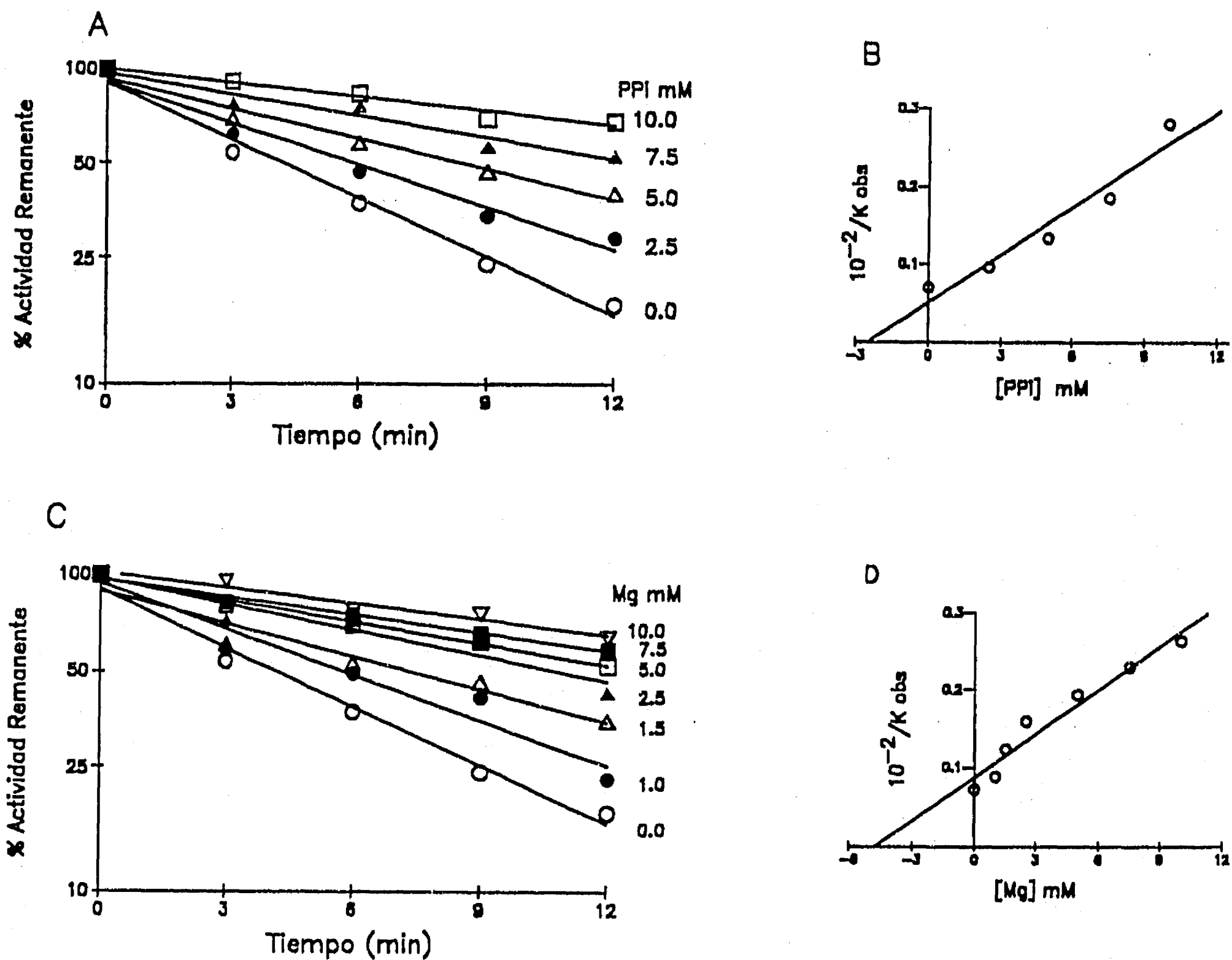


Fig. 13. Efecto del PPI y el Mg^{2+} Sobre la Inactivación de la Pirofosfatasa de Membrana por EDC. Los cromatóforos fueron preincubados con EDC 3 mM como en la Fig. 11, pero en presencia de las concentraciones indicadas de PPI (A) ó Mg (C). Se midió actividad hidrolítica como en Materiales y Métodos. B y D: Gráficas de $10^{-2}/K_{obs}$ vs la concentración de PPI y Mg^{2+} respectivamente.

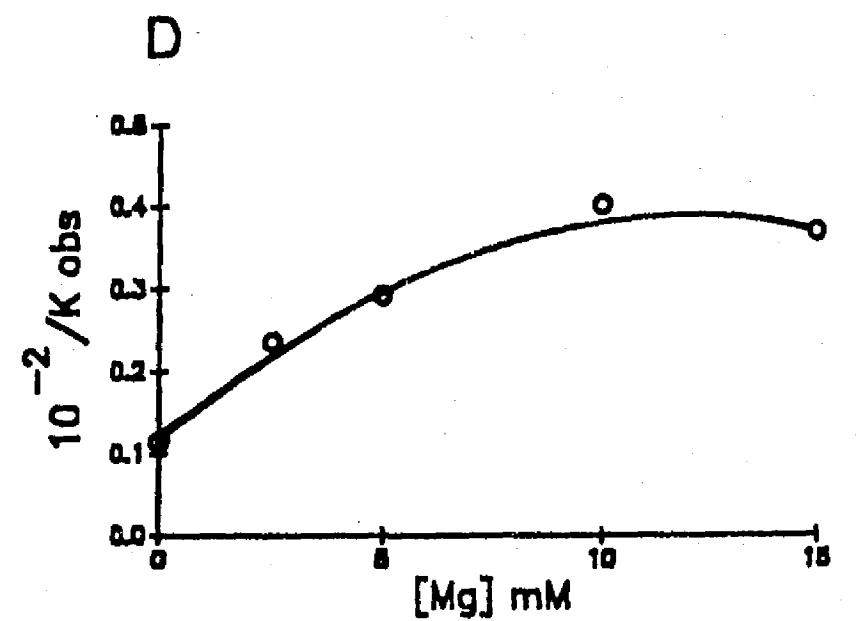
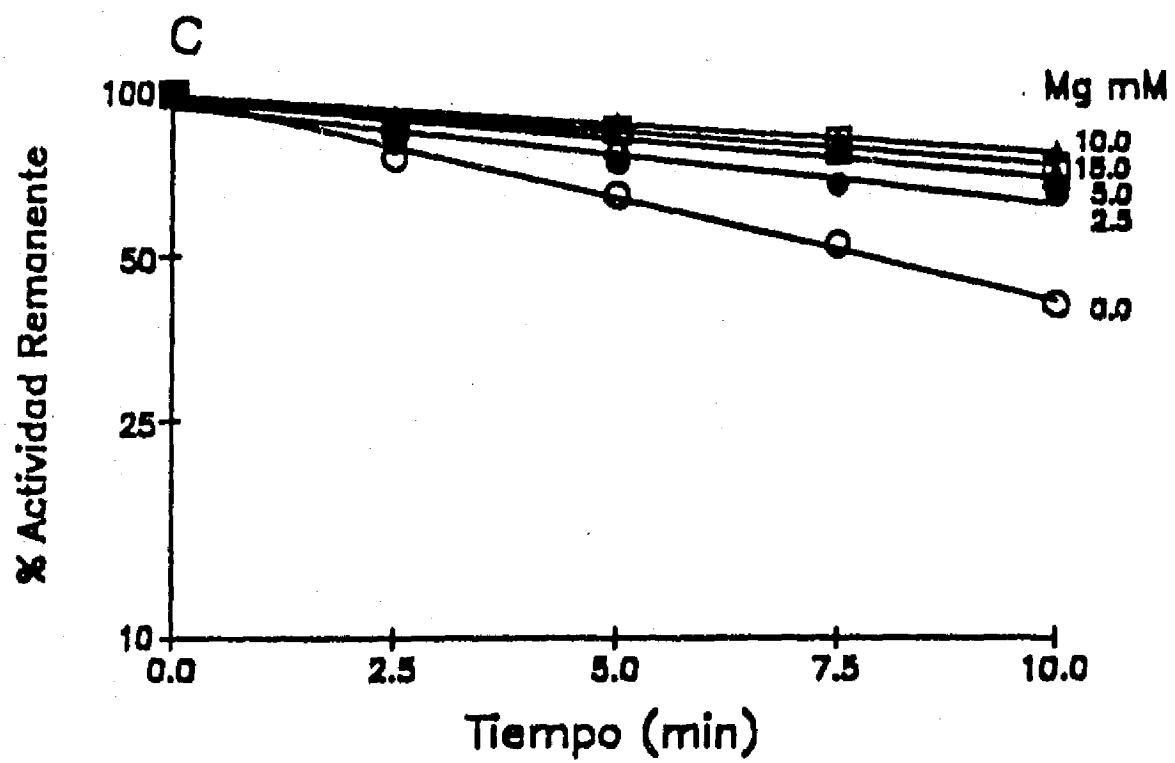
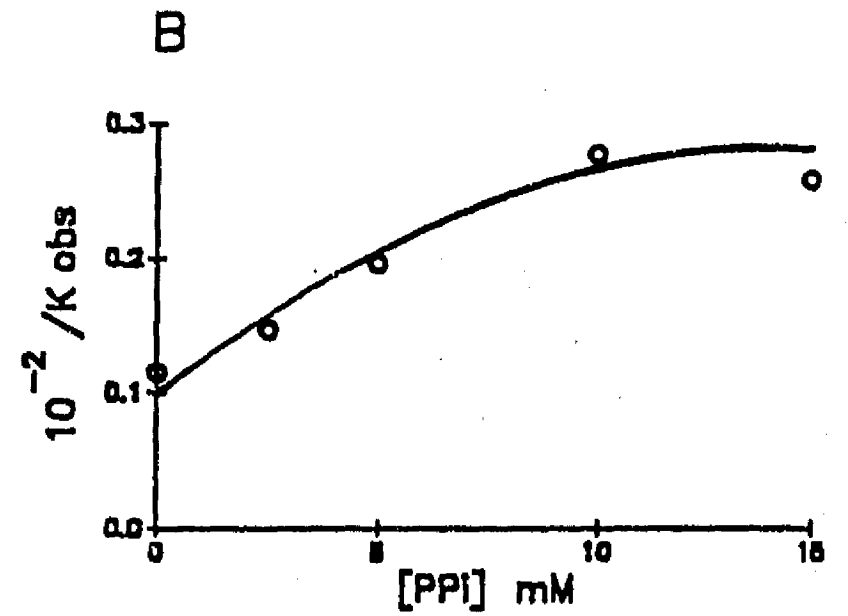
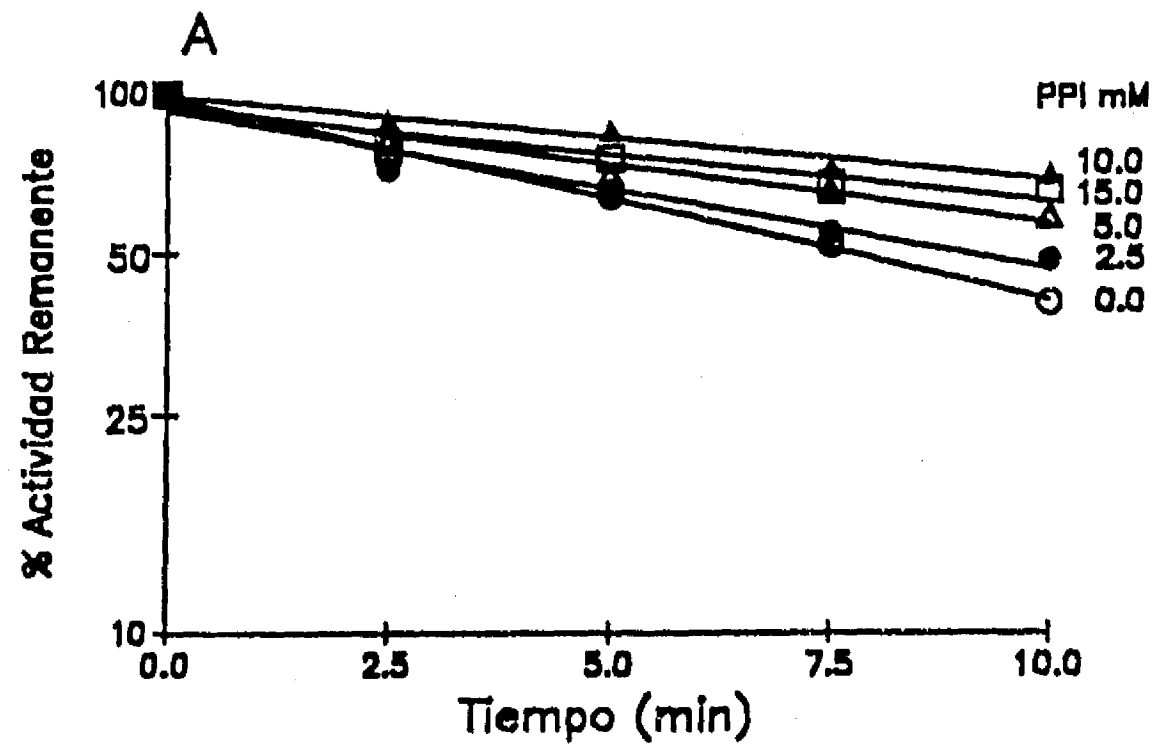


Fig. 14. Protección del PPI y el Mg^{2+} contra la Inactivación por CMC.

Las condiciones experimentales son las mismas que en la Fig. 13, pero usando 3 mM de CMC en lugar de EDC.

A. Con PPI, B. con Mg^{2+} , B y D. regráficos de $10^{-2}/K_{obs}$ vs. la concentración de PPI y Mg^{2+} respectivamente.

en el efecto protector, sugiriendo una protección parcial de estas sustancias contra la inactivación por CMC. Esto se corrobora en los regráficos de $1/k$ obs contra la concentración de Mg o PPI, donde se muestra una curva (Fig. 14 B y D) típica de protecciones parciales. Esto sugiere que el CMC podría estar interactuando con otro carboxilo, que no está directamente en el sitio activo y cuya modificación afectaría la actividad. Esta posibilidad se analizará más adelante.

3.4.2. Protección del Sustrato Mg-PPI.

Cuando se añade simultáneamente el complejo Mg-PPI con las carbodiimidias (EDC o CMC), se observa que no hay inhibición de la actividad hidrolítica de la enzima (Fig. 15). Esto sugiere que el sustrato al ser hidrolizado impide la entrada del modificador a la enzima. Este efecto también se observa cuando se activa a la enzima por la presencia de Mg^{2+} libre (Fig. 16).

Estos datos, Figs. 13 a 15, sugieren fuertemente que uno de los carboxilos modificados por las WSC está en el sitio activo.

3.4.3. Efecto de Análogos del PPI.

A continuación se quiso probar el efecto de análogos del PPI sobre la inactivación por EDC. Los compuestos utilizados fueron imidodifosfato (IDP) y metilendifosfato (MDP), análogos estructurales no hidrolizables del PPI, que pueden formar complejo con Mg^{2+} . En la pirofosfatasa de membrana de R. rubrum tanto el IDP como el MDP actúan como inhibidores competitivos de la hidrólisis del PPI

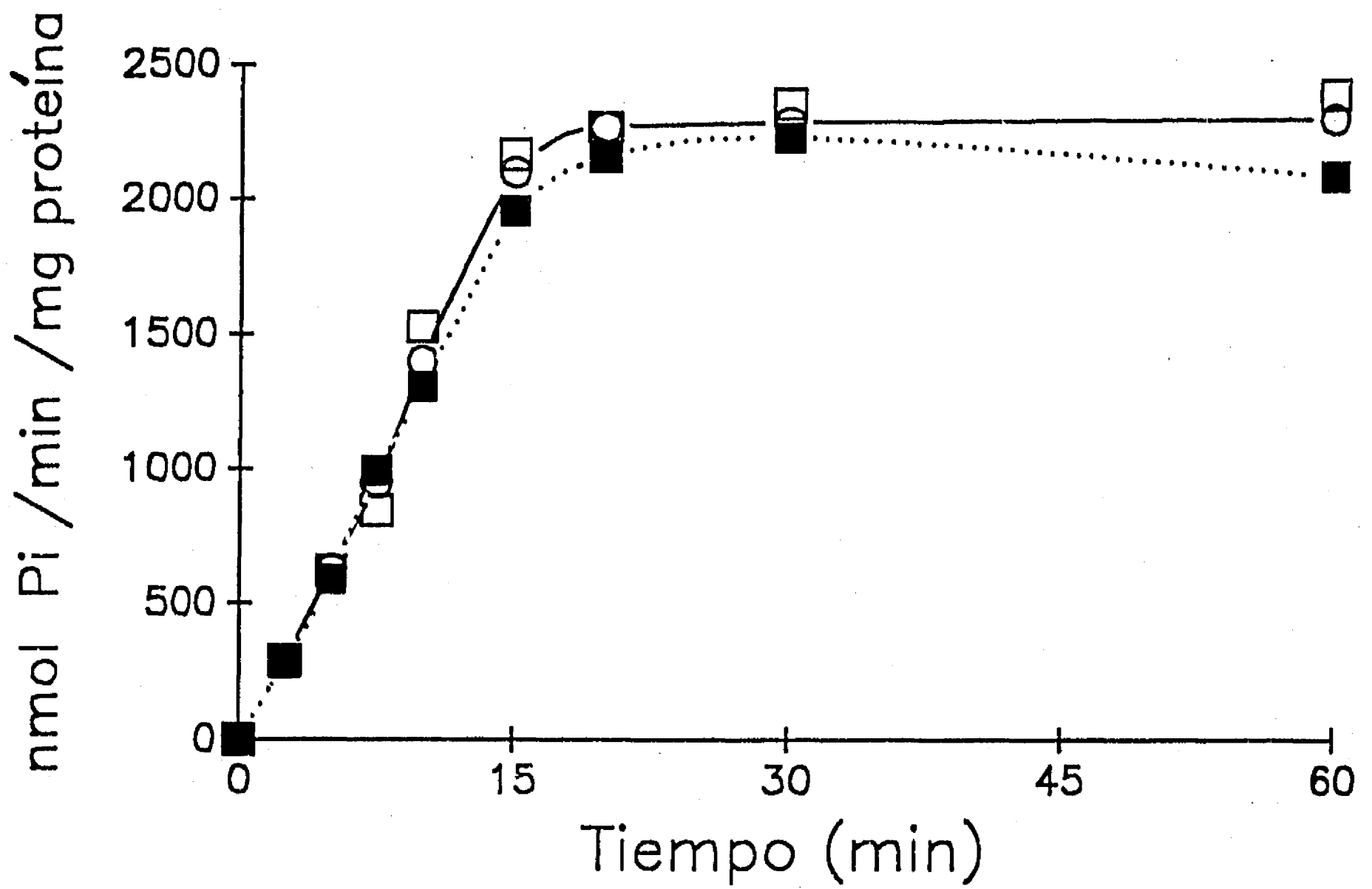


Fig. 15. Protección del Sustrato Mg-PPi Contra la Inactivación de la Pirofosfatasa de Membrana por EDC y CMC. Condiciones Experimentales. No se hizo preincubación, el medio de reacción para medir la hidrólisis contenía: Mes 50 mM pH 6.0, taurina 100 mM pH 6.0, $MgCl_2$ 2 mM, Na-PPi 2 mM, EDC (□) o CMC (■) 5 mM y 1 mg de proteína de cromatóforos, se incubó a 30°C por los tiempos indicados. Control (○).

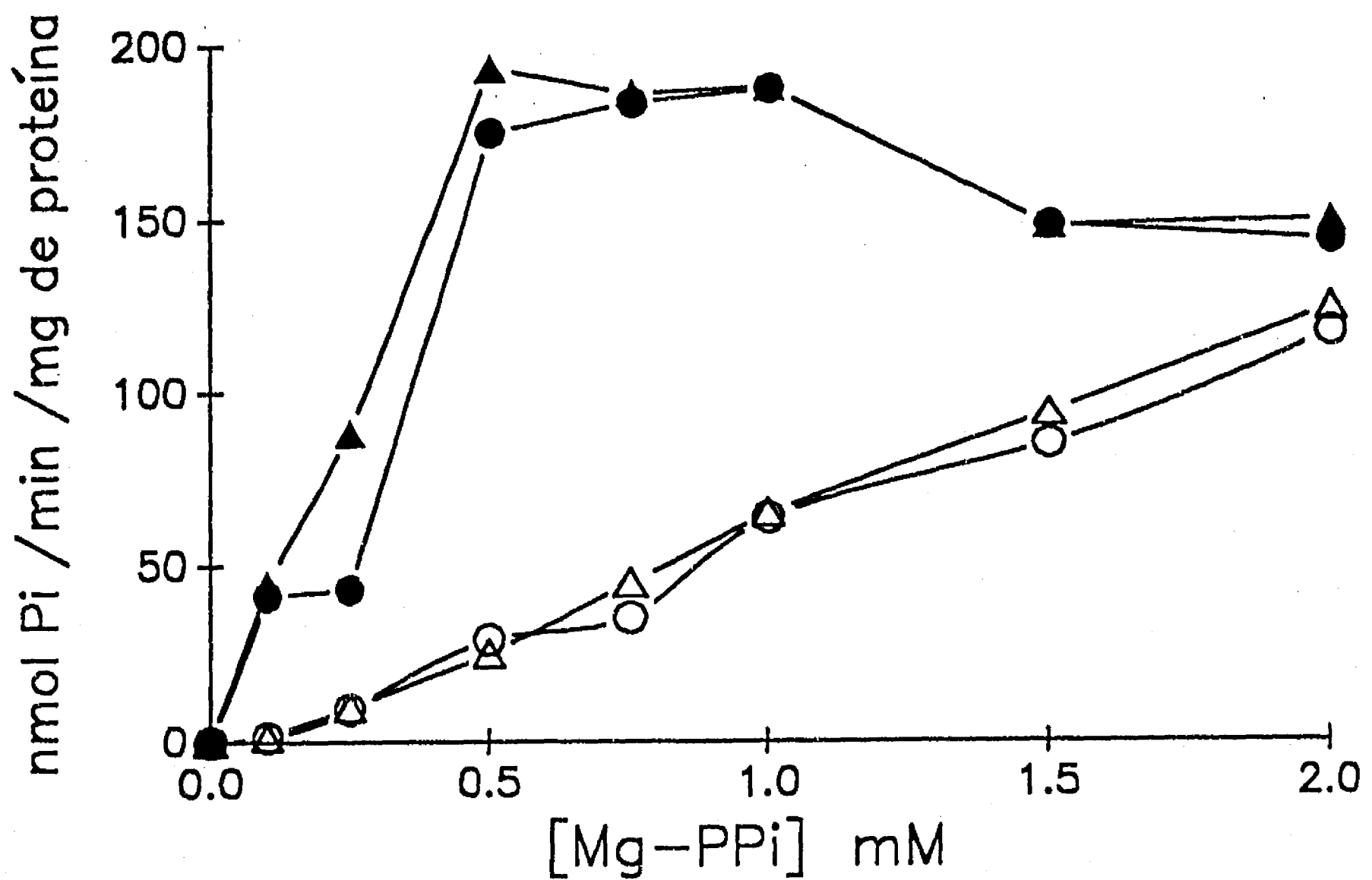


Fig. 16. Efecto del EDC Sobre la Activación de la Pirofosfatasa de Membrana por Mg^{2+} . La actividad hidrolítica se midió en el mismo medio de reacción de la Fig. 14, pero variando las concentraciones de Mg y NaPPi, el tiempo de incubación fue 2.5 min. Las variaciones fueron: (O) actividad sin EDC, (●) igual pero añadiendo 2 mM de $MgCl_2$ extra, (Δ) actividad más EDC 5 mM y (▲) igual al anterior pero añadiendo 2 mM de $MgCl_2$ extra.

(Baltscheffsky y Nyrén, 1986). En la Fig. 17 A, podemos observar el efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de IDP durante la preincubación, sobre la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa de membrana y sobre la inactivación con EDC. En el panel B de la figura se grafica el % de la actividad en presencia de EDC, pero tomando como 100% el valor de cada concentración sin EDC. De esta manera se puede apreciar claramente el efecto protector del IDP sobre la inactivación por EDC y su dependencia de la concentración del análogo.

En la Fig. 18 A, se muestran los resultados de un experimento similar pero usando ahora MDP. En este caso, también es clara la protección del MDP sobre la inactivación por EDC (panel B).

3.4.4.

Efecto de Otros Cationes Divalentes sobre la Inactivación por EDC.

Con el objeto de determinar si otros cationes divalentes, diferente del Mg^{2+} , podían proteger a la enzima de su inactivación por EDC, se realizó el experimento que se muestra en la Tabla II.

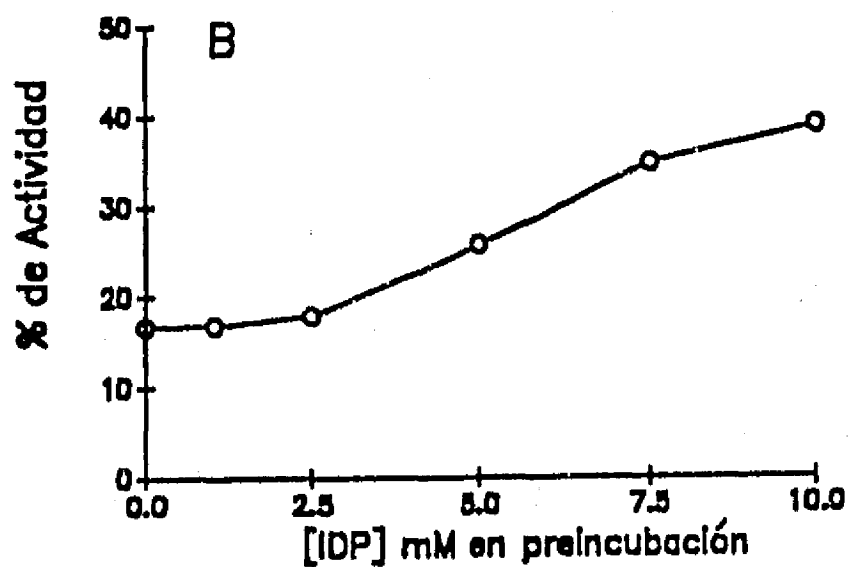
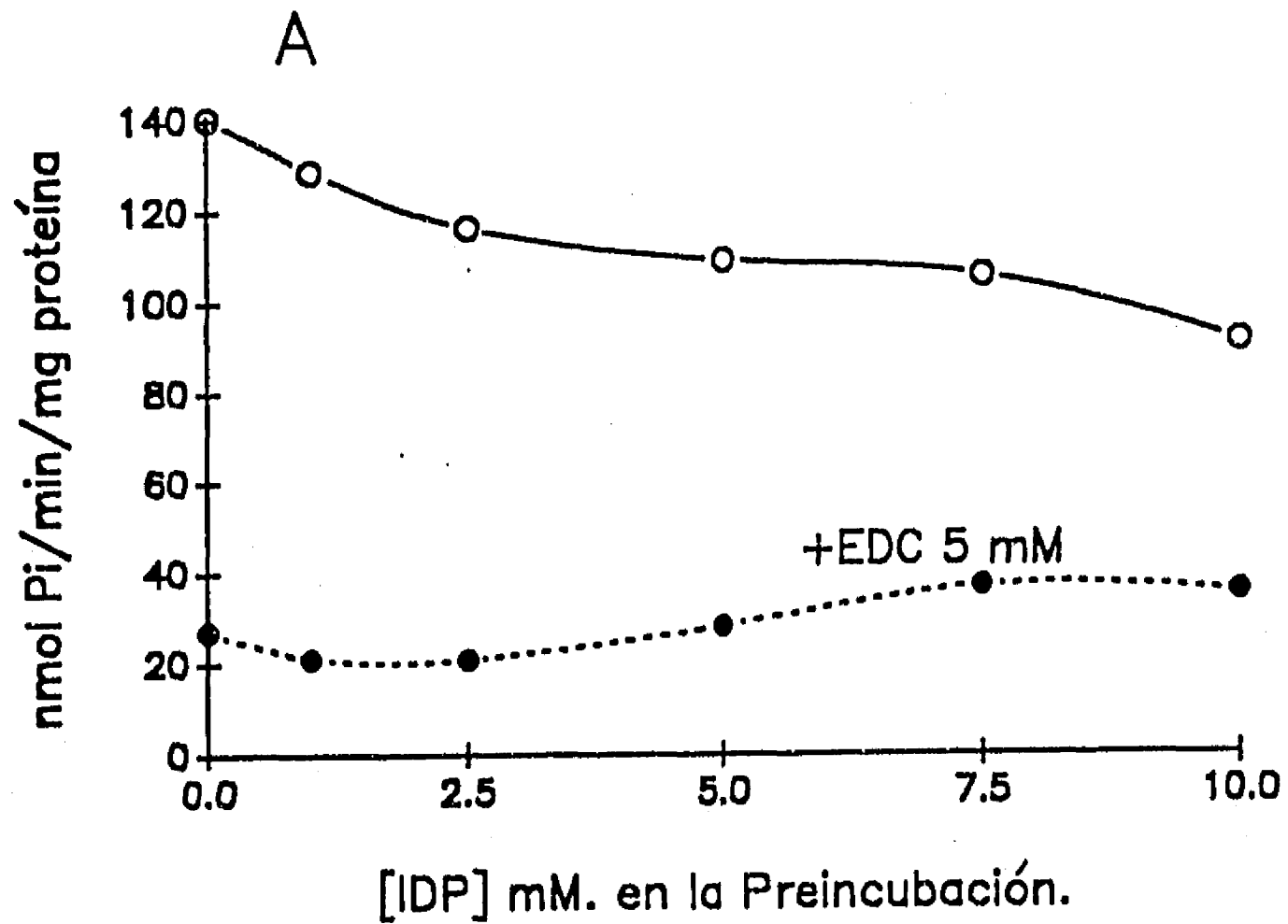


Fig. 17. A. Efecto de IDP Sobre la Inactivación por EDC de la Pirofosfatasa de Membrana. Condiciones experimentales: Se preincuba Mes 50 mM pH 6.0, Taurina 100 mM pH 6.0, Cromatóforos 1 mg de Proteína, IDP en las concentraciones indicadas, EDC 5 mM (●) ó sin EDC (○) por 10 min a temperatura ambiente y se mide actividad hidrolítica. B Gráficas del % de Actividad en presencia de EDC vs la concentración de IDP.

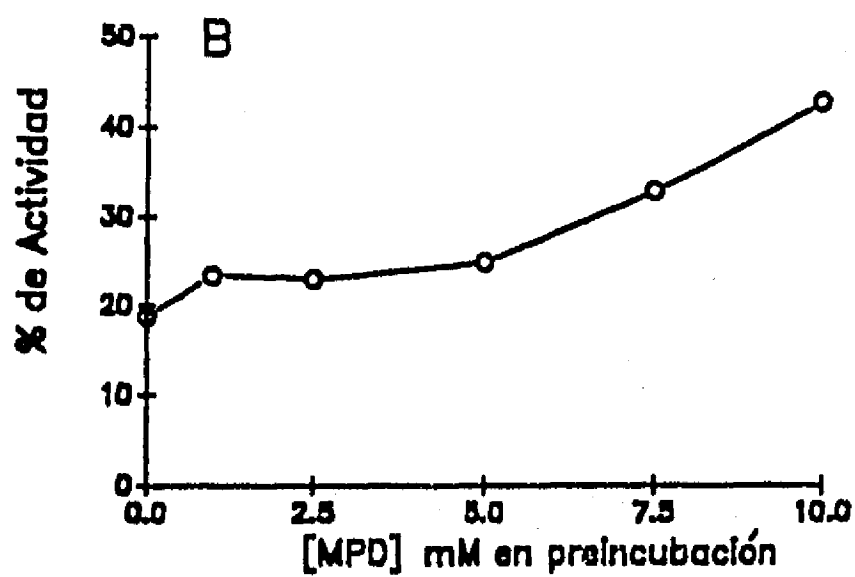
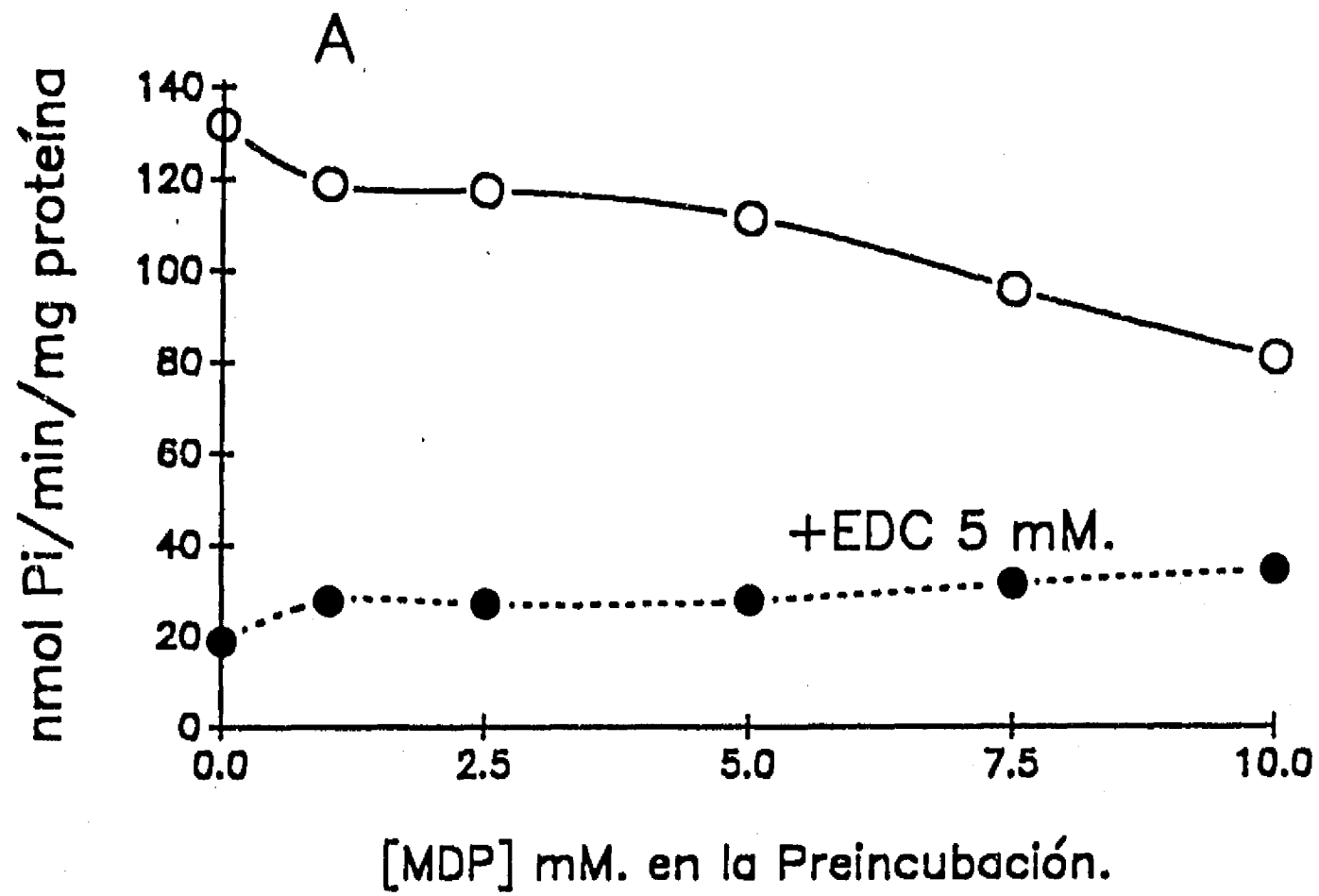


Fig. 18. A. Efecto de MDP sobre la inactivación por EDC. Las condiciones experimentales son las mismas que la Fig. 17, pero usando MDP en lugar de IDP. B. % de Actividad con EDC vs la concentración de MDP.

TABLA II. EFECTO PROTECTOR DE CATIONES DIVALENTES
CONTRA LA INHIBICION POR EDC

Sustrato	nmoles Pi/min/mg Prot.		
	Control	+ EDC	+ EDC + catión
Mg-PPi	227.2	55.7 (75)	105.4 (53)
Co-PPi	30.2	6.0 (80)	13.6 (55)
Zn-PPi	225.5	46.4 (79)	125.5 (43)
Mg-PPi (Ca)	72.0		38.1 (47)
Mg-PPi (Mn)	71.1		68.9 (3)

(% Inhibición)

Se preincubó a la enzima con EDC (3.5 mM) en presencia o en ausencia de Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} y Mn^{2+} (5 mM) por 10 min y se midió la actividad residual. Para el caso en el que se probó el efecto de Mg^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+} , se midió la actividad hidrolítica de los complejos Mg-PPi, Co-PPi y Zn-PPi. En el caso de probar el efecto de Ca^{2+} y Mn^{2+} , se midió la actividad hidrolítica del complejo Mg-PPi, ya que como se sabe (Celis y Romero, 1987), ambos cationes son inhibidores de la hidrólisis.

Es claro que, tanto el Co^{2+} como el Zn^{2+} protegen considerablemente a las concentraciones utilizadas de la inactivación por EDC. Por otra parte, aunque no se puede tener el valor de inactivación por EDC para el caso de la hidrólisis de Mg-PPi en presencia de Ca^{2+} o Mn^{2+} , si comparamos con el % de inhibición de la hidrólisis de Mg-PPi (75%), podemos ver que sí hay protección por Ca^{2+} (47% de

inhibición) y por Mn^{2+} (3% inhibición) en presencia de EDC.

De estos experimentos se deduce que el efecto protector del Mg^{2+} no es único y puede ser sustituido por otros cationes divalentes. Faltaría hacer un estudio más detallado de las concentraciones a las cuales estos cationes divalentes ejercen su efecto protector.

3.5. EFECTO DEL EDC SOBRE LA ACTIVACION DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA POR Mg^{2+} .

Ha sido demostrado que el Mg^{2+} ejerce un papel regulatorio sobre las propiedades catalíticas de la pirofosfatasa de membrana (Randahl, 1979; Celis y Romero, 1987). Datos más recientes han mostrado que el Mg^{2+} libre es un activador esencial de la reacción hidrolítica y que el incremento en la concentración de Mg^{2+} provoca una afinidad más elevada por el sustrato (Sosa y col. 1992).

Así pues, dada la carga del Mg^{2+} , es posible pensar que este catión, para producir su efecto activador, debe interactuar con alguna carga negativa en la enzima, como los carboxilos de los ácidos aspártico o glutámico. La localización de este sitio regulador para Mg^{2+} aún es desconocida y bien puede estar dentro o fuera del sitio activo. Con el objeto de empezar a dilucidar entre estas posibilidades, se diseñó el protocolo experimental detallado en la Fig. 19, teniendo en consideración los dos siguientes puntos:

- a) Que existe un carboxilo esencial para la actividad de la pirofosfatasa de membrana,
- b) Que la modificación de ese carboxilo por EDC se protege

completamente por Mg, PPI y Mg-PPI, lo cual sugiere que se trata de un residuo del sitio.

En primer lugar, se lleva a cabo la inactivación por EDC, en presencia de una concentración de PPI suficiente para proteger el carboxilo al EDC del sitio activo. Si el sitio para Mg^{2+} libre está fuera del sitio activo de la enzima y la activación está mediada por algún grupo carboxilo accesible al EDC, entonces esta enzima modificada será incapaz de activarse por el catión libre. En el caso de que el sitio regulador se encuentre en el sitio activo, entonces muy probablemente la enzima mantendrá sus propiedades de activación.

En la Fig. 20 se muestra el resultado de este experimento. La actividad hidrolítica se protege completamente de la inactivación por EDC cuando se añade PPI al medio de preincubación (\square) y esta actividad se estimula en presencia de Mg^{2+} libre (\blacksquare), de la misma manera que se activa el control (\bullet). En la figura también se muestra la actividad en presencia de EDC y sin PPI (\triangle), para mostrar la inhibición por EDC. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el sitio regulador para Mg^{2+} libre es protegido también por PPI y por consecuencia puede ser parte o estar muy cerca del sitio activo. No obstante, esto podría tener otras explicaciones, por ejemplo, si otros residuos, diferentes a aspárticos o glutámicos, estuvieran involucrados en la unión de Mg^{2+} a la enzima; sin embargo, esta posibilidad es poco probable ya que, como se explicó anteriormente, un grupo carboxilo sería el mejor candidato para la unión de este catión regulador a la enzima.

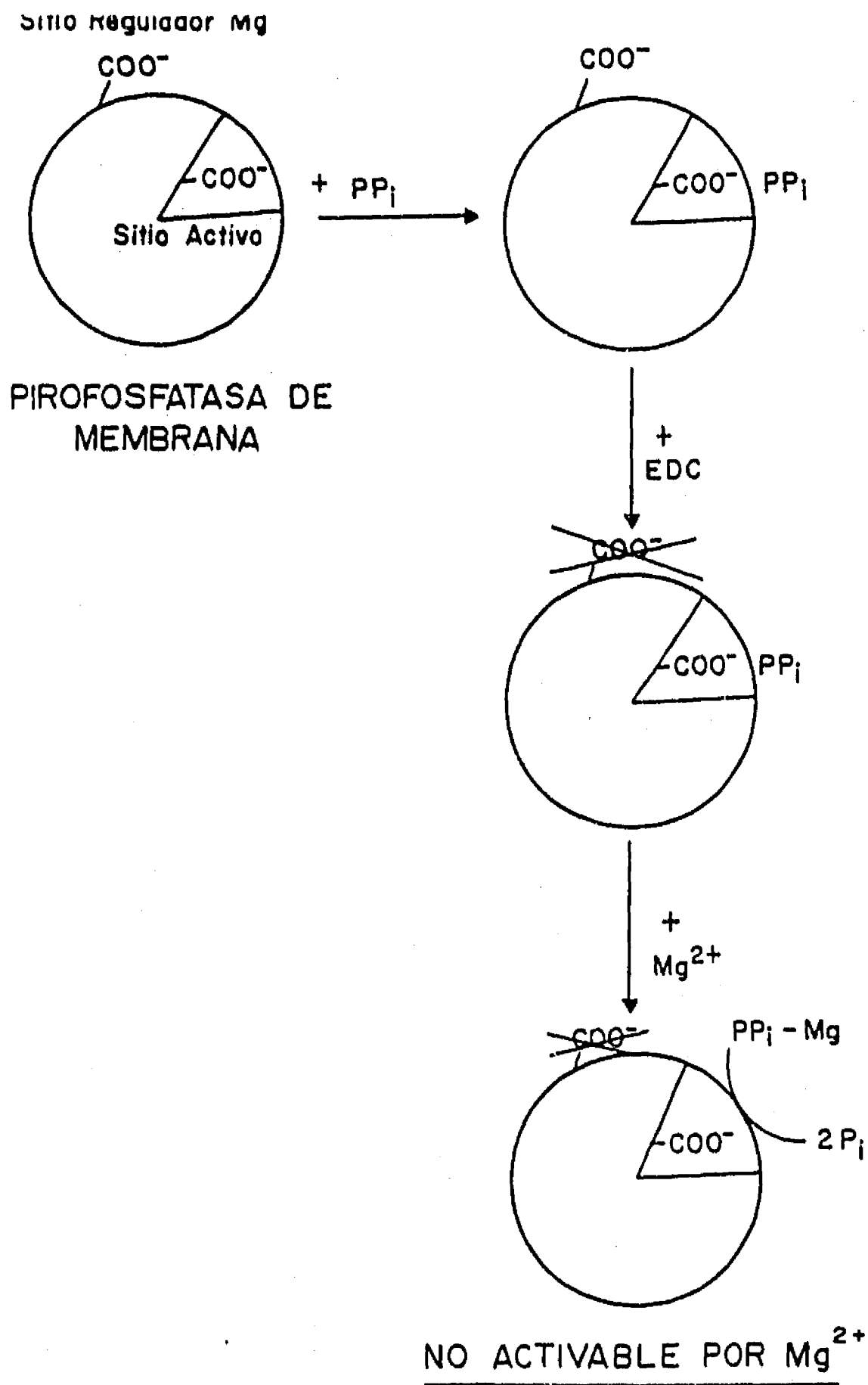


Fig. 19. Diseño Experimental para Demostrar la Localización del Sitio Regulador para Mg²⁺ Libre Utilizando la Modificación por EDC.

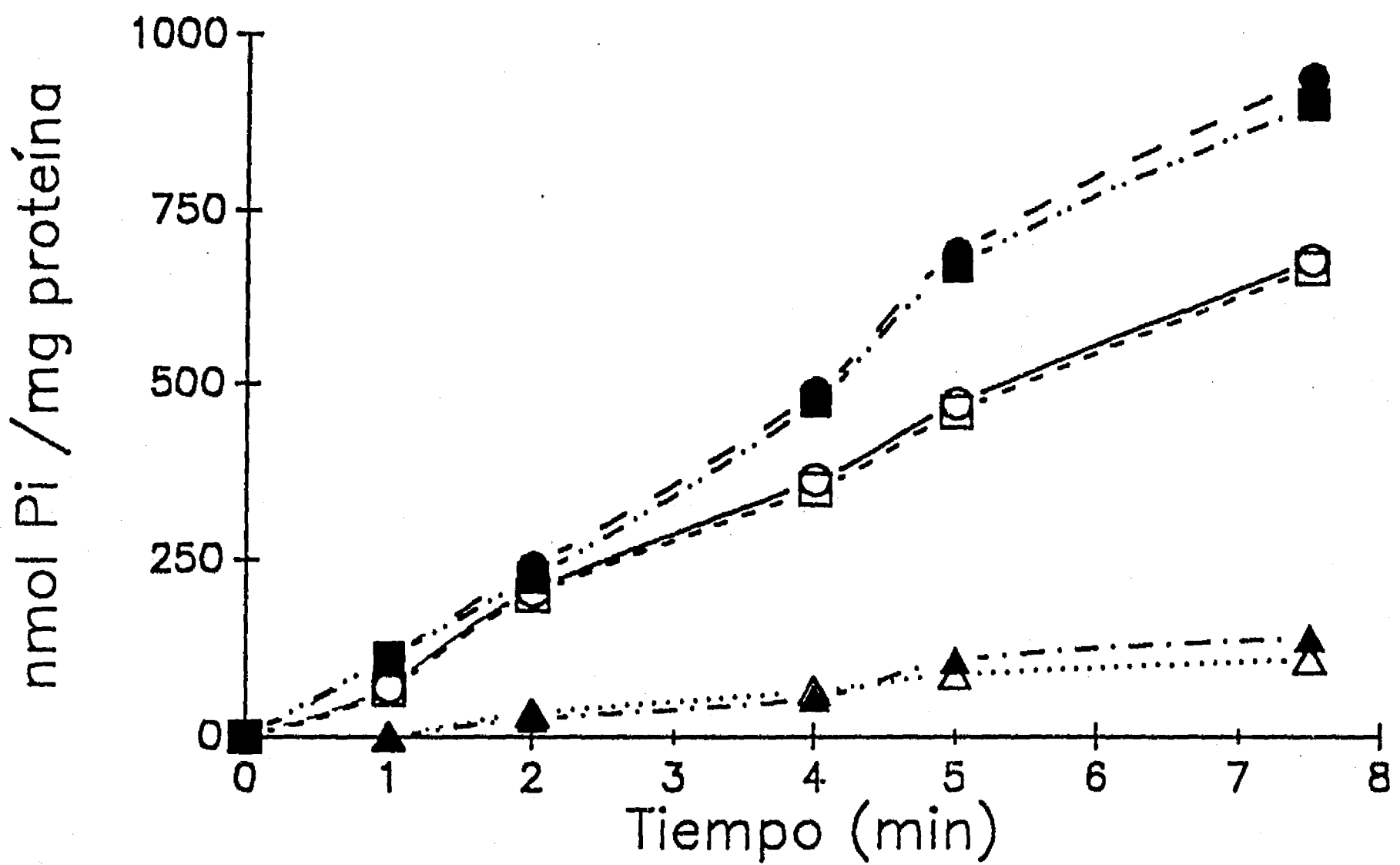
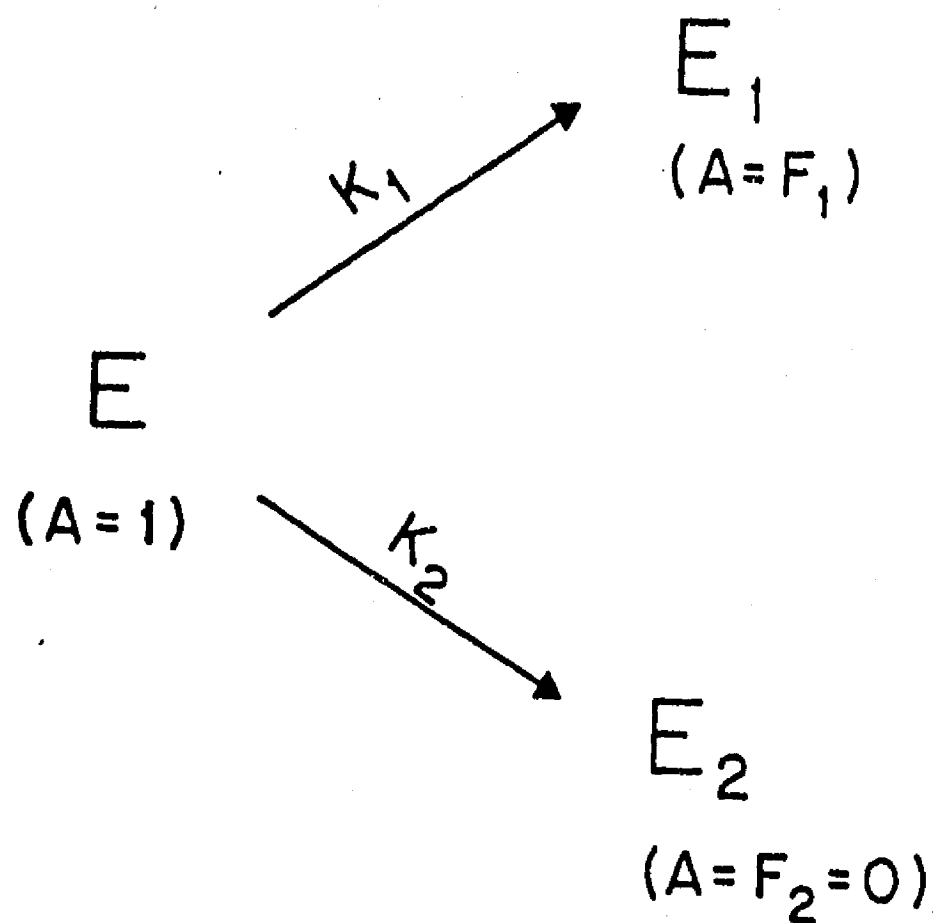


Fig. 20. Protección del PPI Contra la Inactivación por EDC y la Activación de la Pirofosfatasa de Membrana por Mg^{2+} Libre.

El medio de preincubación contiene Mes 50 mM pH 6.0, Taurina 100 mM pH 6.0 y 1 mg de proteína de cromatóforos (○, ●), más 3 mM de EDC (△ y ▲), más 3 mM EDC y 10 mM PPI (□ y ■). Después de preincubar a los tiempos indicados se mide actividad hidrolítica como en Materiales y Métodos, para los símbolos llenos (●, ▲, ■) se agregó 1 mM de Mg^{2+} libre.

3.6. INACTIVACION DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA POR EDC Y CMC A TIEMPOS LARGOS.

Cuando se estudia la inactivación de la actividad de la pirofosfatasa de membrana por las WSC a tiempos mayores de 10 min, las gráficas semilogarítmicas de actividad residual contra tiempo ya no siguen un comportamiento lineal, sino que se curvan (Fig. 21), lo cual sugiere que la cinética de inactivación es más compleja. Este comportamiento no es debido a la descomposición de los reactivos modificadores, ya que a los 75 min solamente el 20% de ellos se ha descompuesto (ver página 54). Sin embargo, este comportamiento es semejante al modelo que propone Ray y Koshland (1961). En este modelo se propone que dos residuos están involucrados en la modificación, uno produce inactivación completa (la primera pendiente) y el otro deja una actividad residual (Ecuación 1). Esto se muestra esquemáticamente en el siguiente mecanismo:



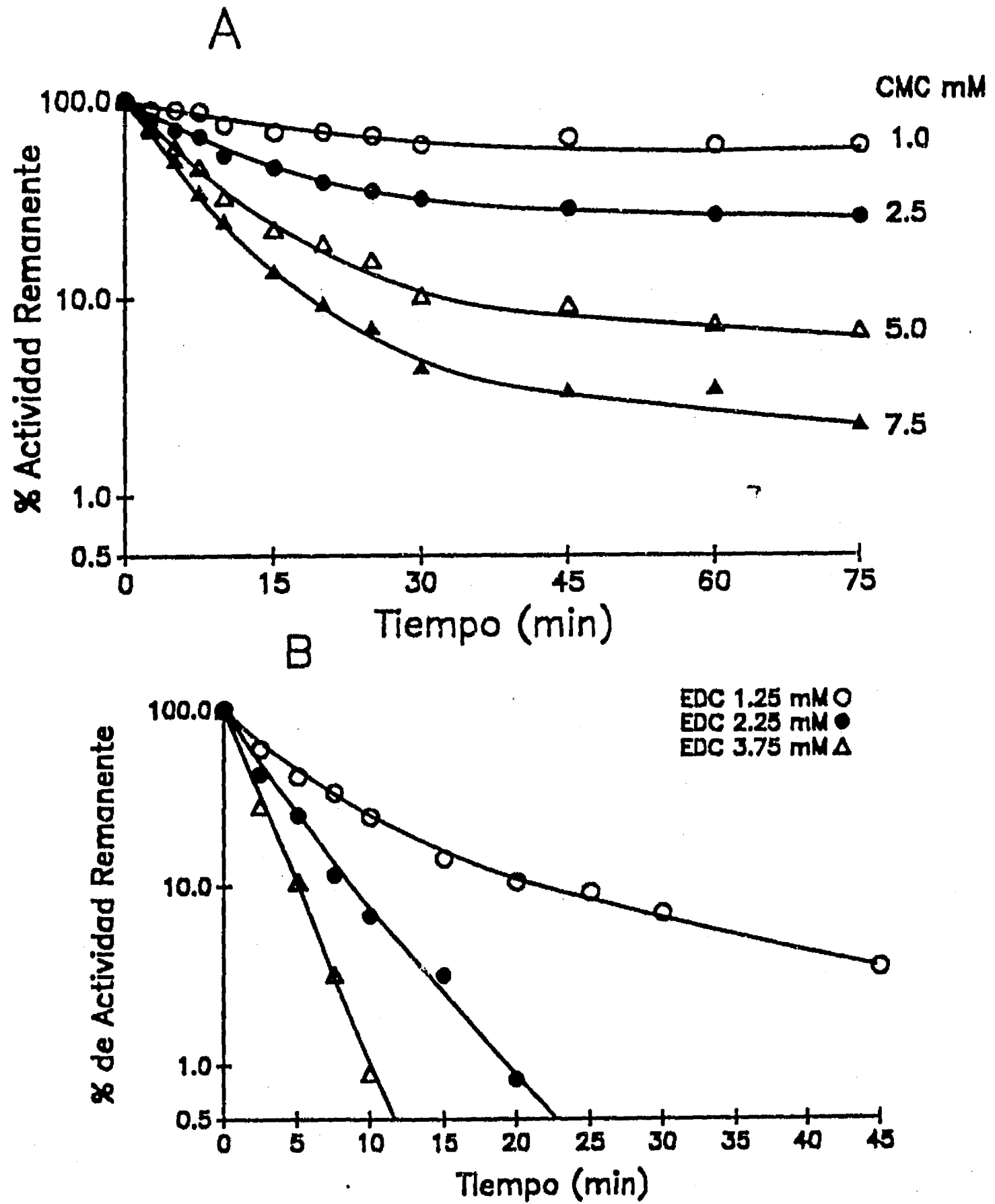


Fig. 21. Inactivación de la Pirofosfatasa de Membrana por CMC (A) o EDC (B) a Tiempos Largos. Las condiciones experimentales son las mismas de la Fig. 11, pero se amplió el tiempo de preincubación como se indica.

$$\frac{A}{A_0} = (1-F_1) e^{-(K_1+K_2)t} + (F_1) e^{-K_2t}$$

Ecuación 1

en donde: E_1 indica la enzima (E) con el aminoácido x_1 que ha sido modificado.

E_2 indica la enzima con el aminoácido x_2 modificado

F_1 actividad (A) parcial

F_2 inactivación completa

k_1 ó k_2 constantes de modificación para cada aminoácido

$\frac{A}{A_0}$ = fracción de la actividad enzimática al tiempo t

Con el objeto de ver si nuestros datos experimentales se ajustaban con este modelo, se alimentó el programa Simplex (Cacessi y Cacheris, 1984) con la ecuación 1. En la Fig. 22 A y B, los símbolos representan los datos experimentales y las líneas fueron dibujadas por el programa Simplex.

Como se puede ver, los resultados se ajustan perfectamente al modelo. En el caso del EDC, las concentraciones por arriba de 1.25 mM se ajustan mejor a una recta, debido a que rápidamente se alcanza la inactivación completa.

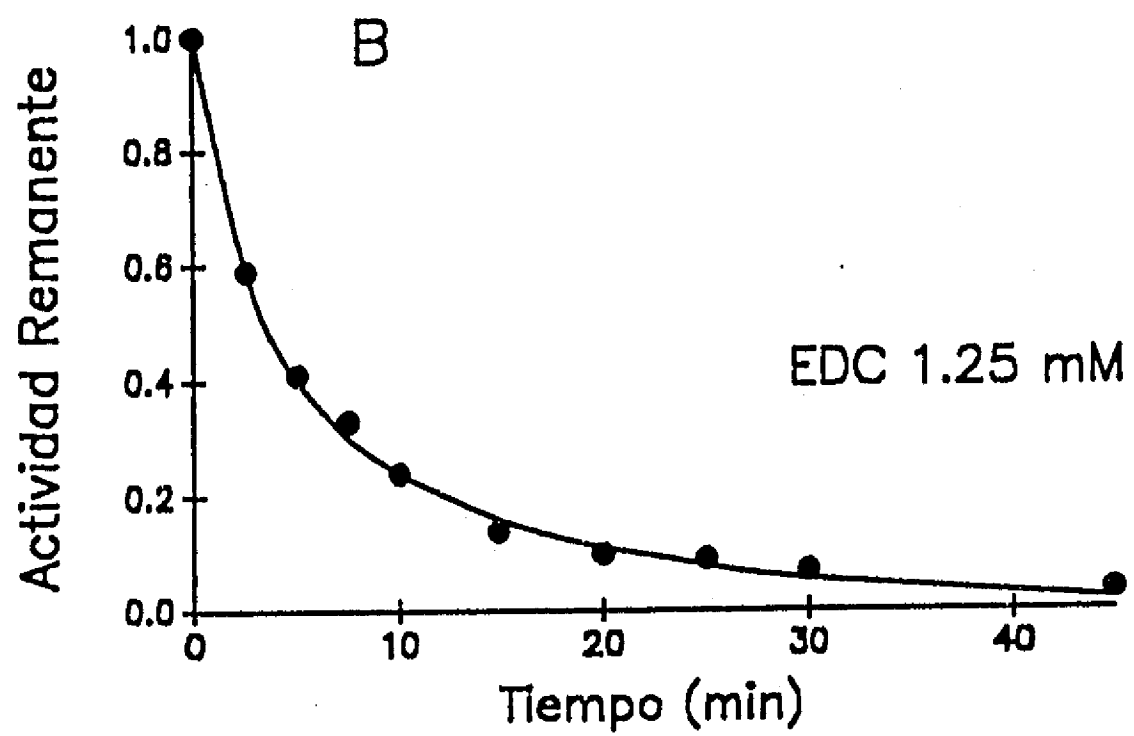
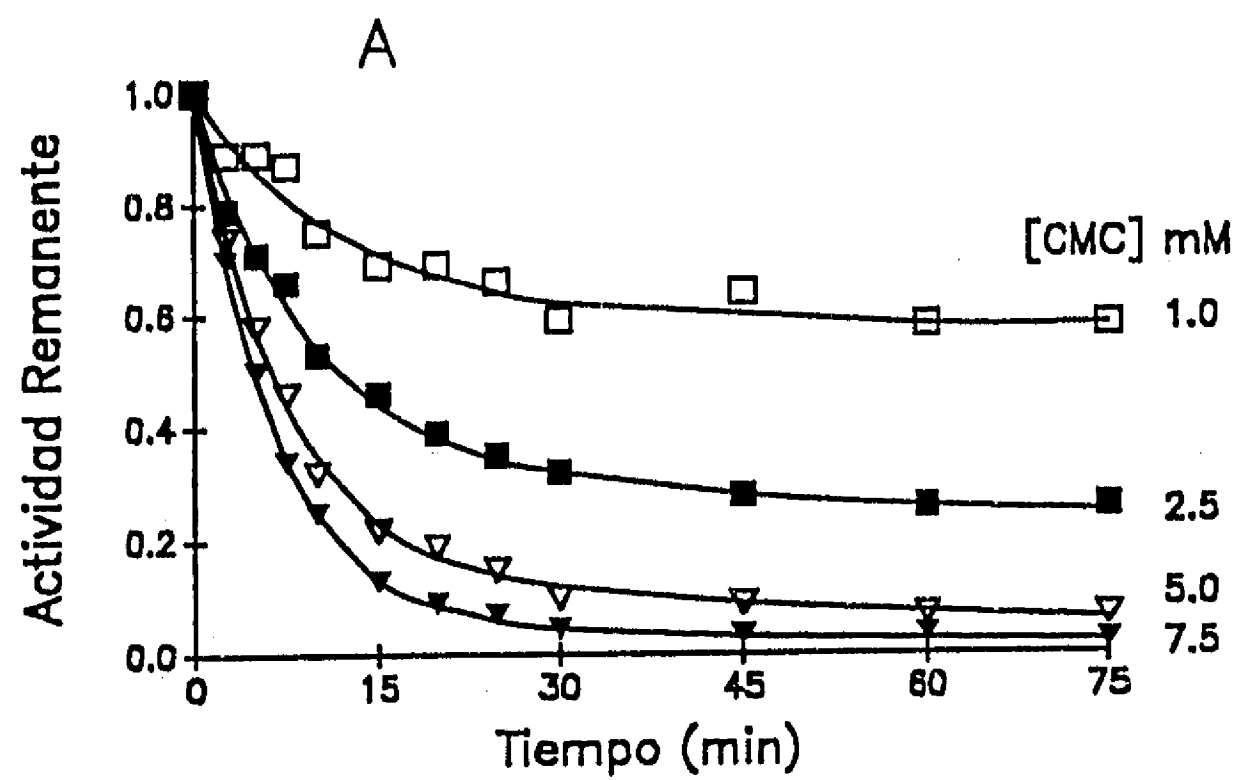


Fig. 22. Inactivación por CMC (A) o EDC (B) a Tiempos Largos. Los símbolos representan los datos experimentales del experimento de la Fig. 21 y las líneas están dadas por el programa Simplex alimentado con la Ecuación 1.

De los resultados anteriores se puede pensar en dos posibilidades: 1) que el EDC y el CMC modifiquen dos grupos carboxilo diferentes (Fig. 23) y 2) que uno de los carboxilos modificados sea el mismo para CMC y EDC (Fig. 24); sin embargo, se necesita más trabajo experimental para aclarar entre estas dos posibilidades.

Se han publicado numerosos estudios sobre modificaciones químicas en la pirofosfatasa citoplásmica, con el fin de determinar la identidad y el papel de los residuos de aminoácidos del sitio activo (Cooperman y Chiu, 1973; Bond y col., 1980; González y Cooperman, 1986; Komissarov y col., 1987). Más aún, Lathi y col. (1990 y 1991) han realizado estudios de mutagénesis dirigida en la pirofosfatasa citoplásmica de Escherichia coli para determinar la importancia de algunos residuos para la integridad estructural de la enzima y para su actividad catalítica. Sin embargo, como ya se mencionó en la introducción (página 38), hay muy pocos estudios de este tipo en pirofosfatasas de membrana.

Dentro de la estructura a 3 Å de la pirofosfatasa citoplásmica de levadura, publicada por Kuranova y col. (1983) y Terzyan y col. (1984) se identifican, en lo que se supone es la cavidad del sitio activo, 17 residuos polares, probablemente involucrados en la unión de alguno de los cuatro cationes divalentes que se requieren para la actividad y en la unión del PPI. De los residuos polares que están relacionados con la unión de Mg^{2+} , nueve son grupos carboxilo de ácidos aspárticos y glutámicos. Por otra parte, Lathi y col., 1990, revelaron la importancia del aspártico 97 y el 102 en la

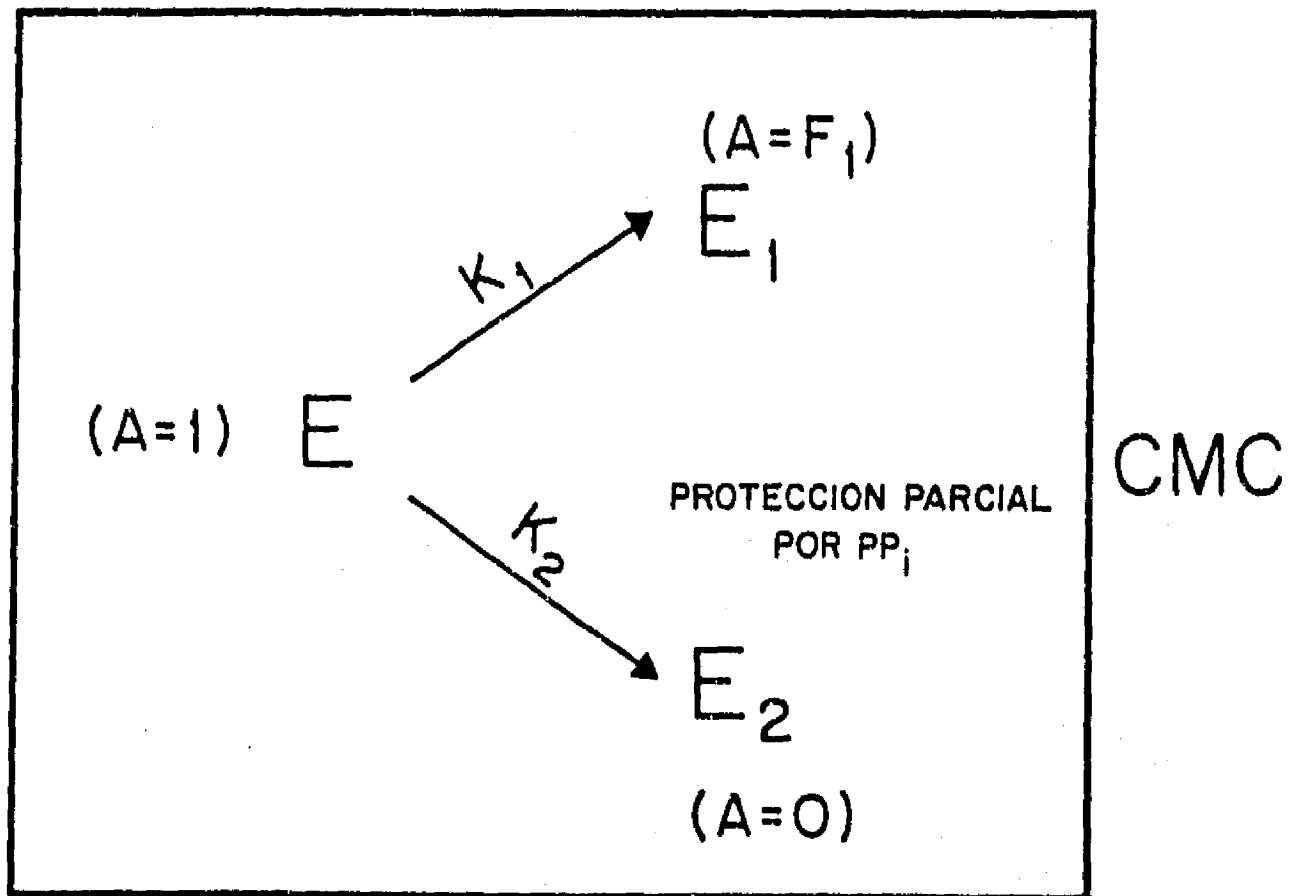
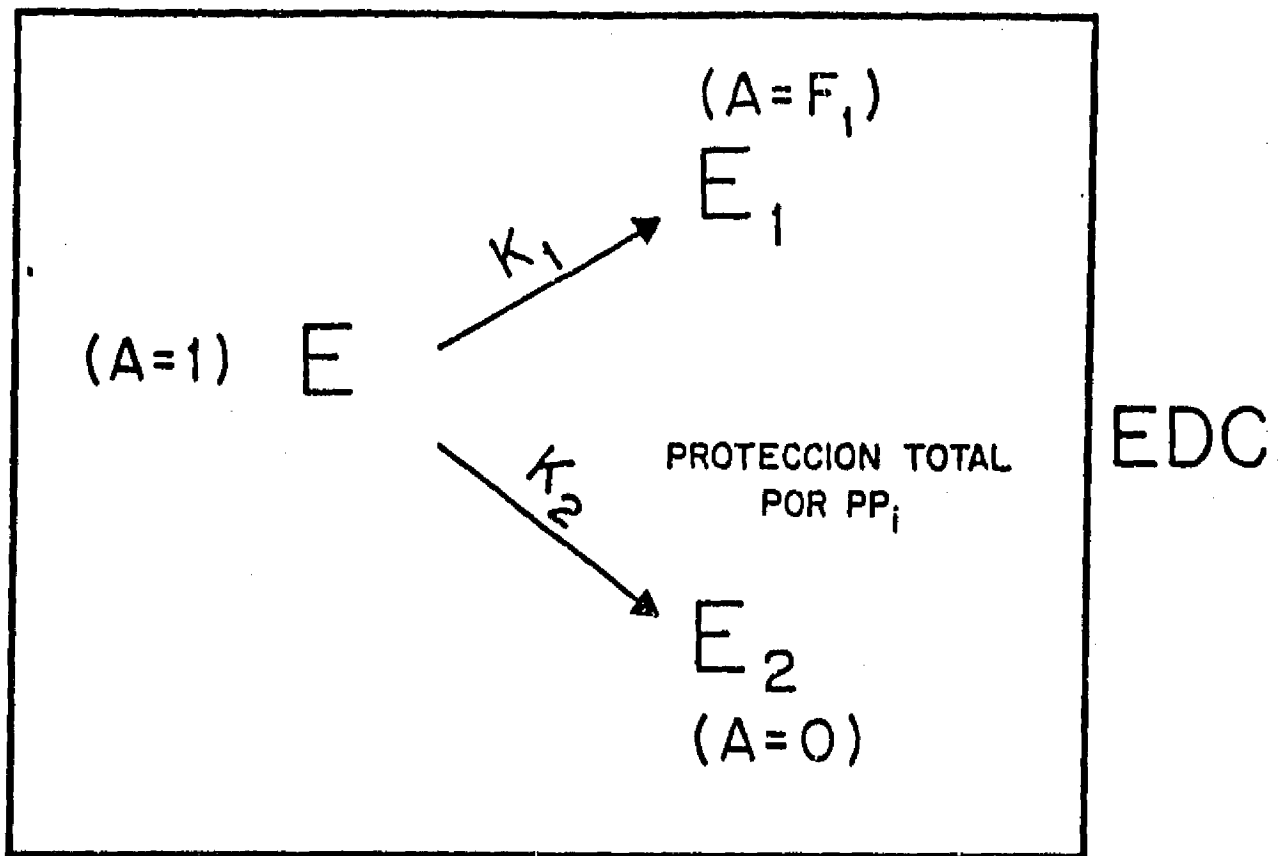


Fig. 23. Primera Posibilidad para Explicar la Modificación por EDC Y CMC.

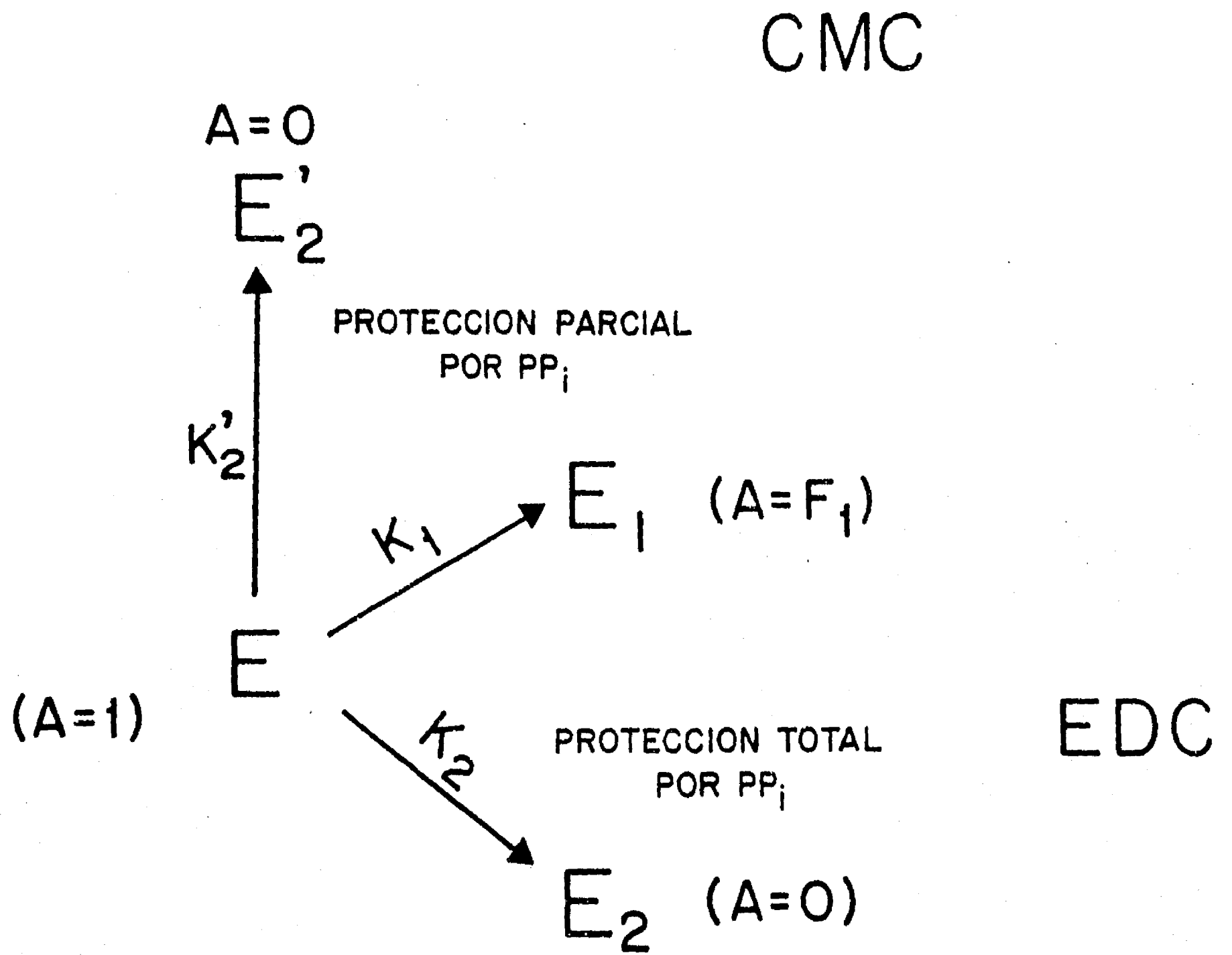


Fig. 24. Segunda Posibilidad para Explicar la Modificación por EDC y CMC.

la actividad catalítica de la pirofosfatasa citoplásmica de E. coli.

Aunque las pirofosfatasas citoplásmicas y membranales pueden ser muy diferentes estructuralmente, debe haber semejanzas en sus sitios activos, ya que ambas pueden llevar a cabo la misma reacción. Por lo tanto, en este trabajo parece razonable la conclusión de que al menos existe un grupo carboxilo esencial para la actividad y para la activación por Mg^{2+} de la Pirofosfatasa de Membrana de Rhodospirillum rubrum.

Considerando los estudios cinéticos realizados por Sosa y col. (1992) que indican que el Mg^{2+} se une a la enzima antes que el sustrato entre al sitio activo; y los resultados del presente trabajo, que demuestran la existencia de al menos un carboxilo esencial para la actividad, se puede plantear el siguiente modelo de trabajo para la función de la pirofosfatasa de membrana de R. rubrum (Fig. 25). En el sitio activo de la enzima se encuentran cargas negativas dadas por los grupos carboxilo de los residuos de aspartato y glutamato. En principio, estas cargas podrían estar impidiendo la entrada del sustrato $Mg-Pi^{2-}$ (cargado negativamente), por lo que se propone que necesita entrar primero el Mg^{2+} a la enzima, para neutralizar dichas cargas y permitir el libre acceso del sustrato cargado negativamente (esto estaría de acuerdo con el mecanismo ordenado propuesto por los estudios cinéticos). De esta manera, la enzima podría llevar a cabo su función.

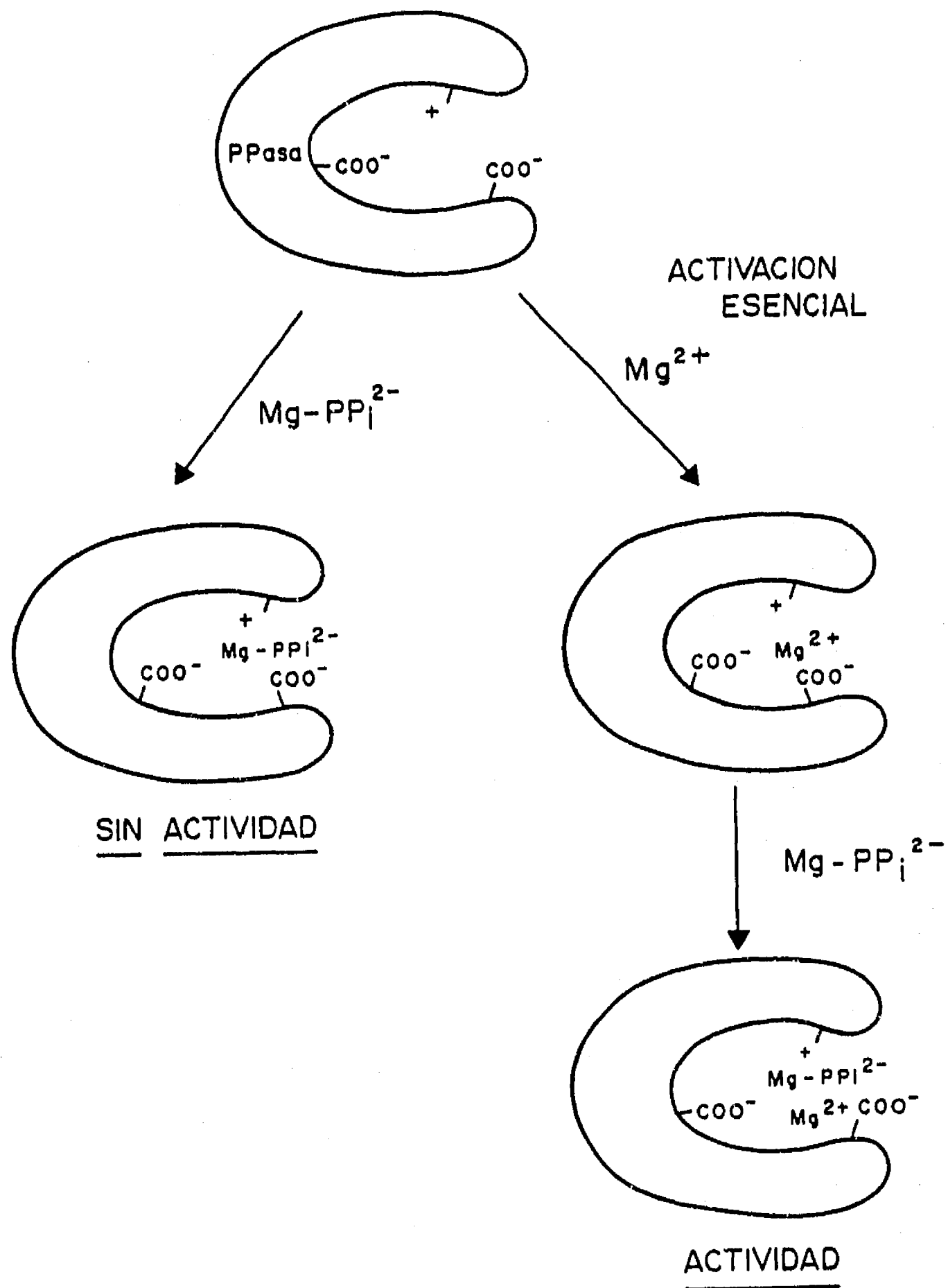


Fig. 25. Modelo de Trabajo que Propone el Mecanismo de Entrada del Sustrato Mg-PPi y el Activador Mg^{2+} Libre en la Pirofosfatasa de Membrana de *Rhodospirillum rubrum*.

CAPITULO 4

CONCLUSIONES

- 1) La conclusión más importante que emerge de este trabajo es la presencia de un carboxilo esencial para la actividad de la Pirofosfatasa de Membrana de Rhodospirillum rubrum. Esta conclusión está apoyada por el hecho de que se obtiene inactivación completa de la enzima por EDC (Fig. 13).
- 2) Este residuo, muy probablemente, está en el sitio activo de la enzima, dada la protección completa que se obtiene por Mg^{2+} , PPI (Fig. 13) y el sustrato Mg-PPI (Fig. 15) de la inactivación por EDC.
- 3) De los resultados, también es posible concluir que otros carboxilos, además del esencial al que ya se refirió, estén involucrados parcialmente o indirectamente en la actividad. Esto se refleja en la protección parcial que ofrecen el Mg^{2+} y el PPI sobre la inactivación por CMC (Fig. 14), así como en la cinética compleja de inactivación que se obtiene al preincubar por tiempos largos con ambas carbodiimidias (Fig. 21).
- 4) El sitio regulador para Mg^{2+} libre puede ser parte o está muy cercano al sitio activo de la Pirofosfatasa de Membrana. Esto se apoya en el hecho de que al proteger a la proteína con PPI contra la inactivación por EDC

(Fig. 20), la enzima conserva completamente su activación por Mg^{2+} libre.

FUTURO DE LA INVESTIGACION

En este trabajo se utilizó a la enzima en la membrana, sin embargo, queda por estudiar, en el futuro, la modificación de la enzima solubilizada y purificada; ya que podría esperarse que la estructura y propiedades de la enzima, se alterarán al salir de la membrana. Asimismo, con la enzima pura se podría determinar exactamente el número de grupos carboxilo que se modifican con las carbodiimidias hidrosolubles.

Con los experimentos realizados en este trabajo, se está empezando a dilucidar la naturaleza del sitio activo de la pirofosfatasa de membrana de R. rubrum "in situ"; queda el seguir estudiando, por otras modificaciones químicas, la identidad de los otros aminoácidos que están involucrados en el sitio activo y regulador de esta enzima.

Por otra parte, los resultados aquí obtenidos permiten plantear una metodología muy concreta para identificar algún segmento del sitio activo de la pirofosafatasa. Ya que con PPI podemos proteger completamente el sitio activo (Fig. 20) de la inactivación por EDC en la membrana del cromatóforo, es posible modificar todos los carboxilos de la enzima sin modificar el del sitio activo; así podemos marcar radioactivamente este carboxilo del sitio activo por una modificación posterior con EDC y taurina

radioactiva. Esto nos permitirá tener marcado solamente el carboxilo del sitio activo. Posteriormente se puede aislar este segmento marcado de la enzima y secuenciarlo. De esta manera, obtendríamos información de algunos de los aminoácidos del sitio activo.

Este segmento podría servir, más adelante, como una sonda específica para tratar de identificar el gene que codifica para la pirofosfatasa de membrana en el ADN de R. rubrum.

BIBLIOGRAFIA

- Baccarini-Melandri, A., Gest, H., y San Pietro, A. (1970) A coupling factor in Bacterial Photophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 245: 1224.
- Baltscheffsky, H., von Stedingk, L.V., Heldt, M.W. y Klingenberg, M. (1966) Inorganic pyrophosphate: Formation in bacterial photophosphorylation. *Science* 153: 1120-1121.
- 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 Rs. rubrum. *Nature* (London). 216: 241-243.
- Baltscheffsky, M. (1968) Inorganic Pyrophosphatase as energy donor in photosynthetic and respiratory structures. En: *Regulatory Functions of Biological Membranes* (J. Jarnefelt, ed.) B.B. Libr. 11: 277-286.
- Baltscheffsky, M. (1969a) Energy conversion-linked changes of carotenoid absorbance in Rs. 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.
- Baltscheffsky, M. y Nyrén, P. (1986) Preparation and reconstitution of the proton-pumping membrane-bound inorganic pyrophosphatase from Rhodospirillum rubrum. *Methods. in Enzymol.* 126: 538-545.
- Barry, R.J. y Dunaway-Mariano, D. (1987) The kinetic mechanism of yeast inorganic pyrophosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 196-203.

- Baykov, A.A., Dubnova, E.B., Pashkov, A. y Avaeva, S.M. (1987) Membrane inorganic pyrophosphatase. Different reactivity of SH-groups in free and membrane bound enzyme. *Biologicheskiye Membrani* 10: 1019-1025.
- Bond, M.W., Chiu, N.Y. y Cooperman, B.S. (1980) Identification of an arginine important for enzymatic activity within the covalent structure of yeast inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry* 19: 94-102.
- 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.
- Britten, C.J., Turner, J.C. y Rea, P.A. (1989) Identification and purification of substrate-binding subunit of higher plant H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase. *FEBS Lett.* 256: 200-206.
- Caceci, M.S. y Cacheris, W.P. (1984) Fitting curves to data. *Byte* 9: 340-362.
- Carraway, K.L. y Koshland Jr. D.E. (1968) Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimides reagents. *Biochim. Biophys. Acta* 160: 272-274.
- Carraway, K.L. y Triplett, R.B. (1970) Reaction of carbodiimides with protein sulfhydryl groups. *Biochim. Biophys. Acta* 200: 564-566.
- 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.
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.B., Stainer, R.Y. (1957) The kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.* 49: 25-68.
- Cooperman, B.S. y Chiu, N.Y. (1973) Yeast inorganic pyrophosphatase. III. Active-site mapping by electrophilic reagents and binding measurements. *Biochemistry* 12: 1676-1682.
- Cooperman, B.S. (1982) The Mechanism of action of Yeast Inorganic Pyrophosphatase. *En: Methods in Enzymology* (Ed. Purich, D.L.) Vol. 87, Parte C, pp. 526-548, Academic Press. New York

y London.

- De Meis, L. (1984) Pyrophosphate of high and low energy. Contributions of pH, Ca^{2+} , Mg^{2+} and water to free energy of hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 259: 6090-6097.
- Dupaix, A., Johannin, G. y Arrio, B. (1989) ATP synthesis and pyrophosphate-driven proton transport in tonoplast enriched vesicles isolated from Catharanthus roseus. *FEBS Lett.* 249: 13-16.
- Edwards, G.E., Nakamoto, H. y Burnell, J.N. y Hatch, M.D. (1985) Pyruvate, Pi Dikinase and NADP-Malate Dehydrogenase in C_4 Photosynthesis: Properties and Mechanism of Light Dark Regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 255-286.
- 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 $[\text{Mg}^{2+}]$, $[\text{K}^+]$ and ionic strength determined from equilibrium studies of the reaction. *J. Biol. Chem.* 249: 3464-3465.
- Franklin, M.H. (1986) The vital force. A study of bioenergetics. WH Freeman and Co, Nueva York. 557 p.
- Futai, M. Noumi, T. y Maed, M. (1989) ATP synthase (H^+ -ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 111-136.
- González, M. y Cooperman, B.S. (1986) Glutamic acid-149 is important for enzymatic activity of yeast inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry* 25: 7179-7185.
- Guilles, M.A., Hudson, A.Q. y Borders Jr. C.L. (1900) Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution. *Anal. Biochem.* 184: 244-248.
- Guillory, R.J. y Fisher, R.R. (1972) Studies on the light dependent synthesis of inorganic pyrophosphate by Rs. rubrum chromatophores. *Biochem. J.* 129: 471-481.
- Harvey, G.W. y Keister, D.L. (1981) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria: $\text{Pi} = \text{HOH}$ oxygen exchange catalyzed by membrane-bound inorganic pyrophosphatase of Rs. 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.

- Hoare, D.G. y Koshland, D.E. (1967) A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. *J. Biol. Chem.* 242: 2447-2453.
- Hutner, S.H. (1950) Anaerobic and aerobic growth of purple bacteria (Athiorhodaceae) in chemically defined media. *J. Gen. Microbiol.* 4: 286-293.
- Keister, D.L. y Yike, N.J. (1967a) Energy-Linked reactions in photosynthetic bacteria. I Succinate-linked ATP-driven NAD⁺ reduction by *Rs. 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 phosphate by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in chromatophores of *Rs. rubrum*. *Biochemistry* 6: 3847-3857.
- Keister, D.L. y Minton, N.L. (1971) ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in *Rs. rubrum* chromatophores. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42: 932-939.
- Keltjens, J.T., van Erp, R., Mooijaart, 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.
- Kolakowsky Jr., L.F., Schloesser, M. y Cooperman, B.S. (1988) Cloning, molecular characterization and chromosome localization of the inorganic pyrophosphatase (PPA) gene from *S. cerevisiae*. *Nucl. Acid. Res.* 22: 10441-10452.
- Komissarov, A.A., Sklyankima, V.A. y Auaeva, S.M. (1987) *Bioorg. Khim* 13: 599-605.
- Kornberg, A. (1957) Pyrophosphorylases and phosphorylases in biosynthetic reactions. En: *Advances in Enzymology* Vol. 18 (Ed. F.F. Nord) pp 191-240. Interscience, Nueva York.
- Kowalczyk, S. y Maslowski, P. (1984) Oxidation-linked formation of inorganic pyrophosphate in maize shoot mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 766: 570-575.
- Krämer, R., (1985) Characterization of pyrophosphate exchange by the reconstituted adenine nucleotide translocator from mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127: 129-135.

- Kuranova, I.P., Terzyan, S.S. Varonova, A.A. y Hansen, G. (1983) Bioorg. Khim. 9: 1611-1619.
- Lahti, R. (1983) Microbial inorganic pyrophosphatases. Microbiol. Rev. 47: 169-179.
- Lahti, R., Pohjanoksa, K., Pitkäranta, T., Heikinheimo, P., Salminen, T., Meyer, P. y Heinonen, J. (1990) A site-directed mutagenesis study on Escherichia coli inorganic pyrophosphatase. Glutamic acid-98 and lysine-104 are important for structural integrity, whereas aspartic acids-97 and 102 are essential for catalytic activity. Biochemistry 29: 5761-5766.
- Lahti, R., Salminen, T., Latonen, S., Heikinheimo, P., Pohjanoksa, K. y Heinonen, J. (1991) Genetic engineering of Escherichia coli inorganic pyrophosphatase. Tyr 55 and Tyr 141 are important for the structural integrity. Eur J. Biochem. 198: 293-297.
- 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.
- 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. y Yoshida, S. (1989) Purification and properties of vacuolar membrane proton translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. J. Biol. Chem. 264: 20068-20074.
- Maeshima, M. (1990) Oligomeric structure of H^+ translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 168: 1157-1162.
- Maeshima, M. (1991) H^+ -translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. Inhibition by Ca^{2+} , stabilization by Mg^{2+} and

- immunological comparison with other inorganic pyrophosphatases. Eur. J. Biochem. 196: 11-17.
- Mansurova, S.E., Ermakova, S.A., Zvyagil'skaya, R.A. y Kulaev, I.S. (1975a) Microbiology, USSR, 44: 874-879.
- Mansurova, S.E., Shakhov, Yu, A. y Kulaev, I.S. (1975b) Synthesis of inorganic pyrophosphate by animal tissue mitochondria, FEBS Lett. 55: 94-98.
- Mansurova, S.E., Shakhov, Yu. A. y Kulaev, I.S. (1977) Mitochondrial pyrophosphatase is a coupling factor of respiration and pyrophosphate synthesis. FEBS Lett. 74: 31-34.
- Mansurova, S.E. (1989) Inorganic pyrophosphate in mitochondrial metabolism. Biochim. Biophys. Acta 977: 237-247.
- Maslowski, P. y Maslowska, H. (1987) Purification and some properties of proton-translocating pyrophosphatase from microsomal vesicles of corn seedlings. Biochem. Physiol. Pflanzen. 182: 73-84.
- Matthews, P.M., Williams, S.R., Seymour, A.M., Schwartz, A., Dube, G., Gadian, D.G. y Radda, G.K. (1982) A ^{31}P -NMR study of some metabolic and functional effects of the inotropic agents epinephrine and ouabain, and the ionophore R02-2985(X537A) in the isolated perfused rat heart. Biochim. Biophys. Acta 720: 163-171.
- Miller, S.L. y Parris, M. (1964) Synthesis of pyrophosphate under primitive earth conditions. Nature 204: 1248-1250.
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by the chemiosmotic type mechanism. Nature 191: 144-148
- Mitchell, P. (1967) Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: Natural fuel cells and solar cells. Fed. Proc. 26: 1370-1379.
- Moyle, J., Mitchell, R., y Mitchell, P. (1972) Proton-translocating pyrophosphatase of Rs. rubrum FEBS Lett. 23: 233-236.
- 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 Descomposition of Pyrophosphate Related to Bacterial Photophosphorylation. J. Biochem. 73: 537-553.
- Nore, B., Sakai-Nore, Y., Maeshima, M., Baltscheffsky, M. y Nyrén,

- P. (1991) Immunological cross-reactivity between proton-pumping inorganic pyrophosphatases of widely phylogenetic separated species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 962-967.
- Nyrén, P., Hajnal, K., y Baltscheffsky, M. (1984) Purification of the membrane-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase from Rs. rubrum. *Biochim. Biophys. Acta.* 766: 630-635.
- Nyrén, P. y Lundin, A. (1985) Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Anal. Biochem.* 151: 504-509.
- Nyrén, P. Nore, B.F. y Baltscheffsky, M. (1986) Studies on photosynthetic inorganic pyrophosphatase formation in Rhodospirillum rubrum chromatophores. *Biochim. Biophys. Acta* 851: 276-282.
- Nyrén, P., Nore, B.F. y Strid, A. (1991) Proton-pumping N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive inorganic pyrophosphate synthase from Rhodospirillum rubrum: Purification, characterization and reconstitution. *Biochemistry* 30: 2883-2887.
- Ordaz, H., Sosa, A., Romero, I. y Celis, H. (1992) Thermostability and activation by divalent cations of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase of Rhodospirillum rubrum. *Int. J. Biochem.* (en prensa).
- Randahl, H. (1979) Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in Rs. rubrum. *Eur. J. Biochem.* 102: 251-256.
- Rao, P.V., y Keister, D.L. (1978) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. X Solubilization of the membrane-bound energy-linked inorganic pyrophosphatase of Rs. rubrum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84: 465-473.
- Ray, W.J. Jr. y Koshland, D.E. Jr. (1961) A method for characterizing the type and numbers of groups involved in enzyme action. *J. Biol. Chem.* 236: 1973-1979.
- 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, R.E. (1968) A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. *J. Biol. Chem.* 243: 3202-3204.
- Rubtzov, P.M., Efremovich, N.V. y Kulaev, I.S. (1976) *Akad. Nauk SSSR* 230: 1236-1237.

- Sarafian, V. y Poole, R.J. (1989) Purification of an H⁺ translocating inorganic pyrophosphatase from vacuole membranes of Red Beet. *Plant Physiol.* 91: 34-38.
- Sarafian, V., Kim, Y., Poole, R.J. y Rea, P.A. (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.
- Sarafian, V., Potier, M. y Poole, R. (1992) Radiation inactivation analysis of vacuolar H⁺ ATPase and H⁺-pyrophosphatase from Beta vulgaris L. *Biochem. J.* 283: 493-497.
- Sato, M., Maeshima, M., Ohsumi, Y. y Yoshida, M. (1991) Dimeric structure of H⁺ translocation pyrophosphatase from pumpkin vacuolar membranes. *FEBS Lett.* 290: 177-180.
- Schiff, J.A. (1972) A green safelight for the study of chloroplast development and other photomorphogenetic phenomena. En: *Methods in Enzymology* (Ed. San Pietro, A.) Vol. 24, Parte B, pp. 321-322, Academic Press. New York, London.
- Scholes, P., Mitchell, P. y Moyle, J. (1969) The polarity of proton translocation in some Photosynthetic microorganisms. *Eur. J. Biochem.* 8: 450-454.
- Schwerzmann, K. y Pedersen, P.L. (1986) Regulation of the mitochondrial ATP Synthase/ATPase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 250: 1-18.
- Senior, A.E. (1981) Divalent metals in beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 256: 4763-4767.
- Senior, A.E. (1988) ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol. Rev.* 68: 177-231.
- Shakhov, Yu, A., Mansurova, S.E. y Kulaev, I.S. (1981) Lipid-dependent mitochondrial pyrophosphatase. *Biochem. Int.* 3: 139-145.
- 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.
- Strid, A., Karlsson, I. y Baltscheffsky, M. (1987) ΔpH- and ΔΨ induced ATP and P_i synthesis in Rhodospirillum rubrum

- chromatophores. Acta Chem. Scandinavica B41: 116-118.
- Sumner, J.B. (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorous. Science 100: 413-415.
- Sui, P.M.L. y Wood, H.G. (1962) Phosphoenolpyruvic carboxytransferase, a CO₂ fixation enzyme from propionic acid bacteria. J. Biol. Chem. 237: 3044-3051.
- Terzyan, S.S., Voronova, A.A., Smirnova, E.A., Kuranova, I.P., Nekrasov, Y.V., Arutynun, E.G. Vanishtein, B.K., Hohne, W.E. y Hansen, G. (1984) Spatial structure of yeast inorganic pyrophosphatase at a resolution of 3 Å. Bioorg. Khim. 10: 1469-1482.
- Verstappen, R. y Raush, T. (1988) Different SH groups involved in H⁺ translocation and PPI hydrolysis of higher plant Mg²⁺-PPIase. FEBS Lett 236: 420-424.
- Volk, S.E., Baykov, A.A., Duzhenko, V.S. y Avaeva, S.M. (1982) Kinetic studies on the interactions of two forms of inorganic pyrophosphatase of heart mitochondria with physiological ligands. Eur. J. Biochem. 125: 215-220.
- Volk, S.E., Baykov, A.A., Kostenko, E.B. y Avaeva, S.M. (1983) Isolation subunit structure and localization of inorganic pyrophosphatase of heart and liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 744: 127-134.
- Volk, S.E. y Baykov, A.A. (1984) Isolation and subunit composition of membrane inorganic pyrophosphatase from rat-liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 791: 198-204.
- Wagner, G.J. y Mulready, P. (1983) Characterization and solubilization of nucleotide-specific Mg²⁺-ATPase and Mg²⁺-pyrophosphatase of tonoplast. Biochim. Biophys. Acta 728: 267-280.
- Walker, R.R. y Leight, R.A. (1981) Mg²⁺-dependent cation-stimulated inorganic pyrophosphatase associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet (Beta vulgaris L.) Planta 153: 150-155.
- Wang, Y., Leigh, R., Kaestner, K. y Sze, H. (1986) Electrogenic H⁺-pumping pyrophosphatase in tonoplast vesicles of oat roots. Plant Physiol. 81: 497-502.
- 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.

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.

JBBM 00830

Determination of the physicochemical constants and spectrophotometric characteristics of the metallochromic Zincon and its potential use in biological systems

E. Hilario, I. Romero and H. Celis

Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F., Mexico

(Received 20 January 1990)
(Accepted 22 March 1990)

Summary

In this work we report a detailed characterization of the metallochromic Zincon. Zincon forms complexes with Zn^{2+} and Cu^{2+} , producing change in colour; the complexes with Fe^{2+} , Mn^{2+} and Ca^{2+} cause the bleaching of the Zincon solutions. Mg^{2+} does not interact with Zincon nor does it change its spectral characteristics. The presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} does not interfere with the spectral characteristics of the Zn-Zincon complex. The K_d , K_s and $\Delta\epsilon$ values for the complexes were determined. The $\Delta\epsilon$ values were very high, making this spectrophotometric method very sensitive. The complex Zn-Zincon is fully reversible; however, the complex Cu-Zincon is only partially reversible. The free Zincon, and the complexes Zn-Zincon and Cu-Zincon, does not partition into organic solvents, does not permeate liposome membrane, and neither does it interact with biological membranes. All these characteristics make the metallochromic Zincon useful in biological systems.

Key words: Zincon; Metallochromic; Zinc ion; Divalent cation; Membrane; Spectrophotometry

Introduction

Zinc is an oligoelement which plays an important role in the stabilization of macromolecules and in the enzymatic reactions of living organisms [1,2]. Some analytical methods have been devised for its quantification: atomic or emission absorption spectroscopy [3], the distribution of radioactive isotopes [4], polarographic methods [5], potentiometric stripping analysis [5] etc. In spite of their high

Correspondence address: H. Celis, Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-600, México 04510, D.F., Mexico.

sensitivities, these methods have several shortcomings such as being destructive, expensive, incapable of differentiating between free Zn^{2+} and Zn^{2+} linked to proteins, nor do they analyze the role of Zn^{2+} in enzyme kinetics. A useful method to measure cations is the metallochromic indicators. These methods which are non-destructive allow kinetics measurements [6].

The following metallochromics can be used: for Ca^{2+} , arzenazo III [7,8] and antipirilazo [9]; for Mg^{2+} , Eriochrome blue SE [10]; for H^+ , phenol red [11] etc. In 1954, Rush and Yoe [12] reported a colorimetric method to quantify Zn^{2+} and Cu^{2+} , using the metallochromic Zincon (2-carboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazyl-benzenic acid). However, a detailed study of its spectroscopic characteristics and its possible use in biological systems has not been reported. In this work, we report in detail the selectivity, the association and dissociation constants, $\Delta\epsilon$, partitioning in organic solvents, reversibility of the complexes, and its behavior in model and biological membranes.

Materials and Methods

Materials

Zincon, molecular weight 440, was purchased from Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. All reagents are of the highest purity available. All metal ions were in their chloride form, except Fe^{2+} and Cu^{2+} which were sulfate salts.

Absorption spectra were obtained with a dual-wavelength spectrophotometer AMINCO DW-2a.

Methods

Rhodospirillum rubrum cells were cultivated and harvested according to Cohen-Bazire et al. [13]; *R. rubrum* chromatophores were prepared as in Celis and Romero [14]; *Saccharomyces cerevisiae* cells were prepared as in De Kloet et al. [15]; bovine heart mitochondria were prepared as in Low and Vallin [16].

Liposomes were made by sonication (5 min) of 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soybean phospholipid (Sigma) in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.2) 150 mM sucrose with or without Zincon, and passed through a Sephadex G-50 column (80×1.5 cm).

Characteristics of the Zincon solutions

Zincon solutions can be stored in the dark at 0 or -70°C , thawed-out for use, and frozen again without changes in the absorbance. There are differences in complex formation depending on whether diluted or concentrated Zincon stock solutions were used, probably due to dimer-polymer formation. Therefore, a diluted stock solution was used in this work (120 μM Zincon in a Tris-HCl, 50 mM buffer (pH 8.2)).

Results

Differential spectra of Zincon with metals

The differential spectra of Zincon-Zincon-metal complexes are shown in Fig. 1. The spectra can be separated into three different groups: the first group of Zn^{2+} and Cu^{2+} , which presents hyperchromisms in the region of 600 nm and 470-480 nm, respectively; the second group (Fe^{2+} , Mn^{2+} , and Ca^{2+}) is characterized by hypochromisms around 490 nm only; and the third group with Mg^{2+} does not modify the Zincon spectrum, even with Mg^{2+} concentrations of up to 2 mM (data not included in Fig. 1C).

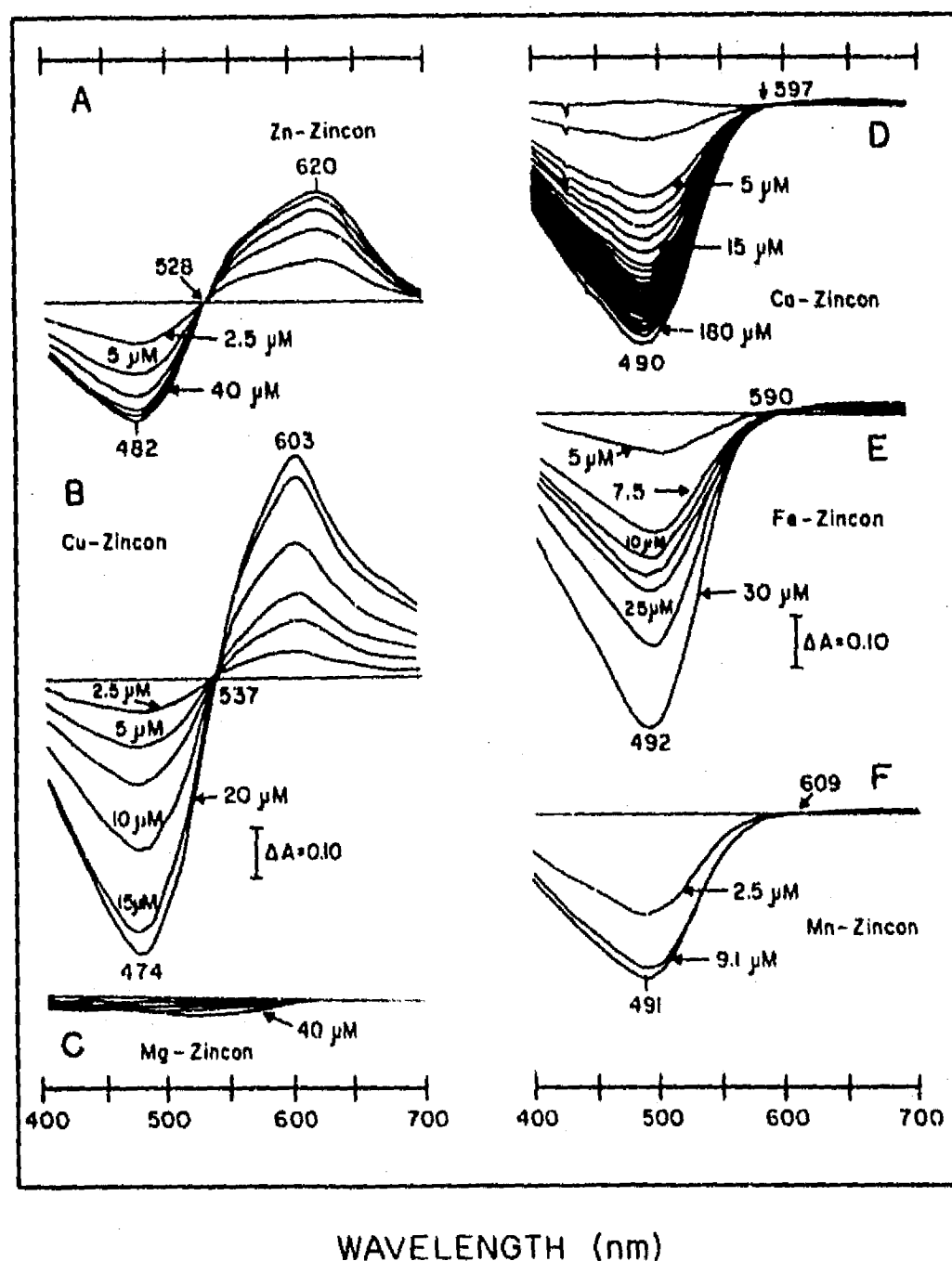


Fig. 1. Differential spectra of divalent cations-Zincon and complexes. Medium conditions: 40 μM Zincon, 50 mM Tris-HCl (pH 8.2) and metal concentrations as indicated in the figure.

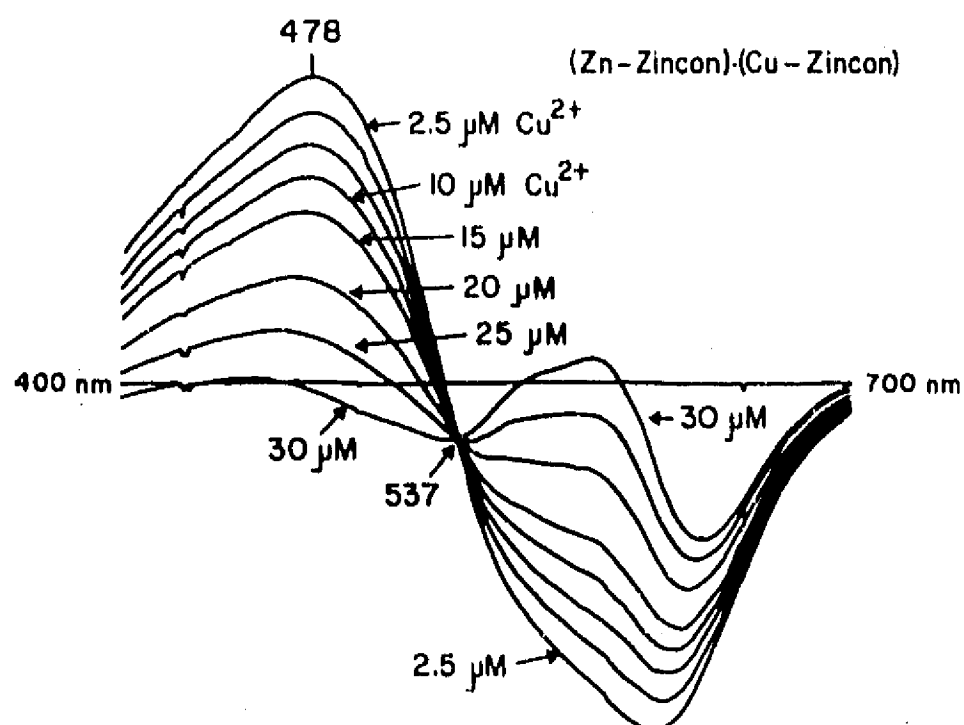


Fig. 2. Differential spectra of Zn-Zincon/Cu-Zincon. Medium conditions: In sample cuvettes the baseline was plotted with Zn-Zincon 1:1 40 μM each, and the measurement cuvettes contained 40 μM Zincon, 50 mM Tris-HCl (pH 8.2) and Cu^{2+} concentrations as indicated.

These differential spectra imply that it is possible to measure Zn^{2+} concentrations in the presence of Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} and Ca^{2+} when choosing the appropriate wavelengths. However, it may be difficult to make the measurement of Zn^{2+} in presence of Cu^{2+} .

Fig. 2 shows the differential spectra of Zinc-Zincon minus Cu-Zincon. The existence of two clear differential spectra between the two complexes permits the measurement of both divalent cations in the same solution.

Association and dissociation constants and $\Delta\epsilon_{\text{max}}$

The dissociation constants were obtained by measuring the change in absorbance caused by $\Delta[\text{metal}]$, taking the isosbestic point and the maximum of absorbance shown in Fig. 1 for the Zn^{2+} and Cu^{2+} complexes plotting the $1/A$ versus $1/[\text{metal}]$.

Fig. 3 shows the results for the complex Zn-Zincon. A and B show hyperchromism and C and D hypochromism; the linear data can be seen in inserts B and D. This type of data was repeated for Cu-Zincon, Zn-Zincon, Fe-Zincon, Mn-Zincon, Ca-Zincon complexes, and for Cu-Zincon complex and Zn-Zincon complex in the presence of Mg^{2+} and Ca^{2+} ; the results are in Table 1.

Reversibility of the complexes

Fig. 4 shows the reversibility of the complex Zn-Zincon with EDTA. As can be seen, this complex is completely reversible. This same result was obtained when EGTA or NTA were used as chelators (data not shown). However, with these

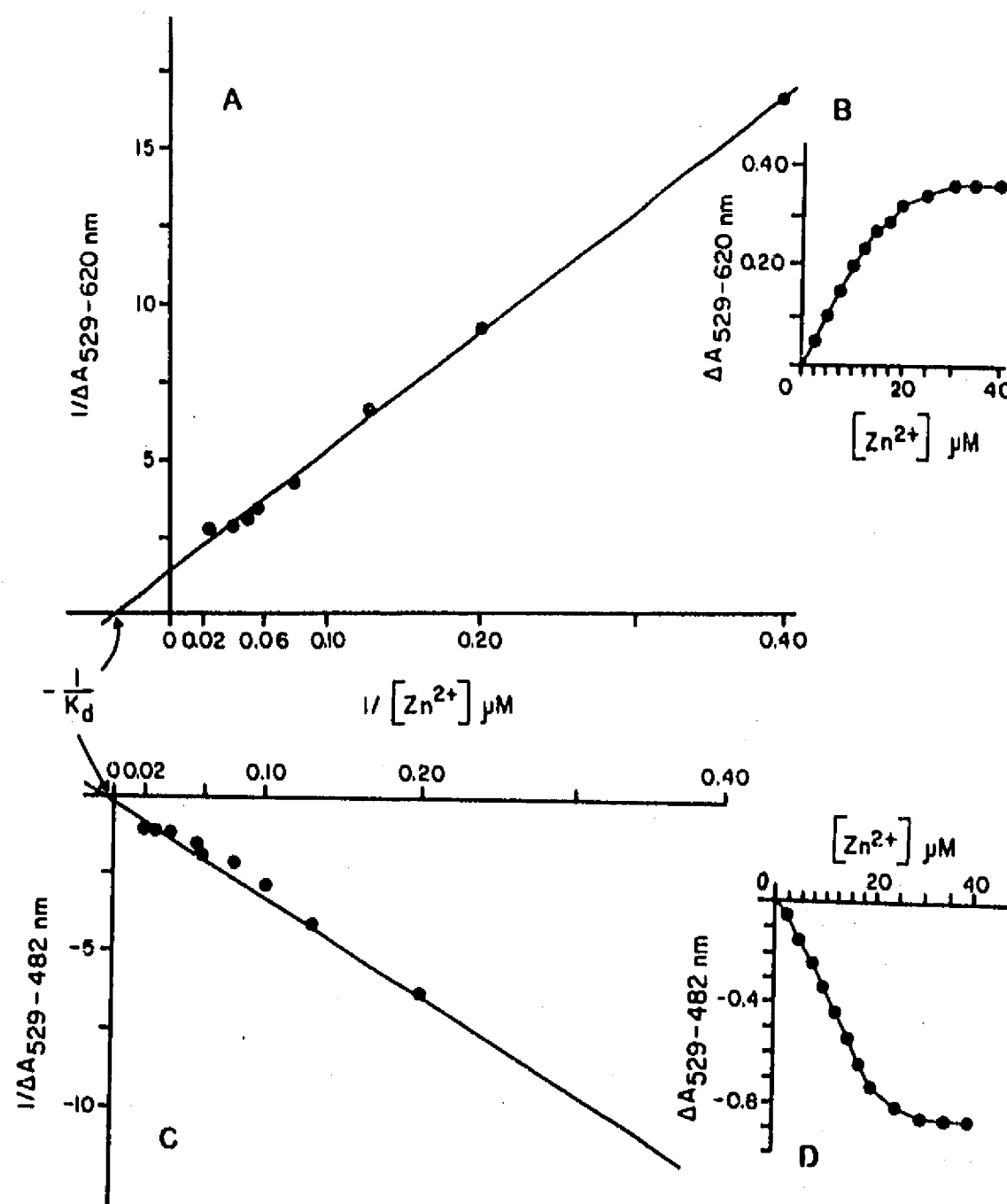


Fig. 3. Double-reciprocal plots in the hyperchromism (A) and hypochromism (C) of the changes of Zincon absorbance versus Zn^{2+} concentrations. B and D are linear plots. Measurement cuvette contains $40 \mu M$ Zincon, $50 mM$ Tris-HCl (pH 8.2). Zincon titration was obtained by adding to the measurement cuvette the $ZnCl_2$ concentrations indicated.

chelators the Cu-Zincon complex is not reversible; the reversibility could only be achieved in part by high concentrations of cysteine ($\log K_s$ for $Zn^{2+} = 21.3$).

Partition to organic solvents, diffusion across liposomes and interaction with biological membranes

Table 2 shows the percentage of Zincon recovery and the complexes Zn-Zincon and Cu-Zincon after extraction with hexane or toluene. As can be seen, all the molecular entities are almost totally recovered during the water phase. This demon-

TABLE I

Association, dissociation constants and $\Delta\epsilon$ for Zincon complexes and in the presence of other divalent cations

Zincon complexes isosbestic points and maxima *	Log K_s	K_d (μM)	$\Delta\epsilon$ ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
Cu^{2+}			
537-600 nm	4.39	40.01	28.79
537-474 nm	2.57	2662.18	-2136.7
Zn^{2+}			
529-620 nm	4.19	64.44	46.28
529-482 nm	3.89	127.32	-105.30
$\text{Zn}^{2+} + 40 \mu\text{M Mg}^{2+}$			
529-620 nm	4.12	74.39	49.66
$\text{Zn}^{2+} + 40 \mu\text{M Ca}^{2+}$			
529-620 nm	4.28	52.39	41.66
$\text{Zn}^{2+} + 100 \mu\text{M Ca}^{2+}$			
529-620 nm	4.39	40.29	34.71
Fe^{2+}			
590-492 nm	4.30	49.5	-99.24
Mn^{2+}			
609-491 nm	5.49	3.16	-22.57
Ca^{2+}			
597-490 nm	3.42	372.75	-63.65
Mg^{2+}	0	0	0

The values of K_d , K_s and $\Delta\epsilon$ for the Fe^{2+} , Mn^{2+} and Ca^{2+} complexes shown were obtained with 1 min intervals between additions. 40 μM Zincon from a 120 μM stock solution. Measurement cuvettes contain 40 μM Zincon and 50 mM Tris-HCl (pH 8.2).

* Isosbestic points and maximum changes in absorbance were taken from Fig. 1.

states that Zincon and its complexes are not soluble in these organic solvents, suggesting that the metallochromic and the complexes could not permeate the membranes. In order to assess this possibility, we trapped Zincon in liposomes, as is described in Materials and Methods.

Fig. 5 shows the changes in absorbance of the Zincon-loaded liposomes. As can be seen, the addition of Zn^{2+} does not produce a change in absorbance, which demonstrated that neither Zincon nor Zn^{2+} cross the membrane. As control, the addition of Triton X-100 produces a considerable change in absorbance due to the rupture of liposomes and the concomitant formation of the complex Zn-Zincon. The same results were obtained 30 min after the addition of Zn^{2+} to loaded liposomes with Zincon (data not shown).

As has been demonstrated above, Zincon does not permeate the liposome membrane. This suggests that it would not interact with biological membranes, as

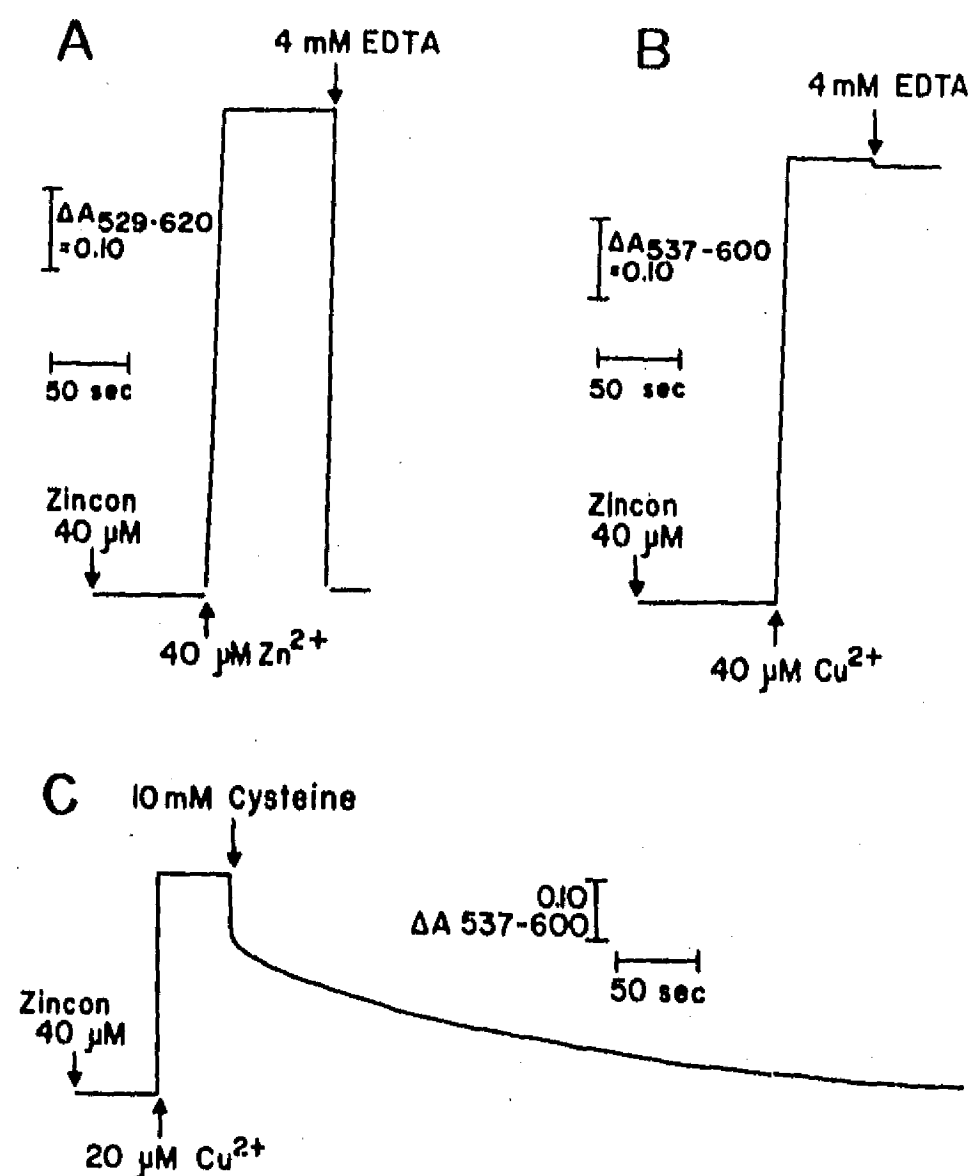


Fig. 4. Reversibility of the complexes Zn-Zincon and Cu-Zincon. The measurement cuvettes contain 40 μM Zincon, 50 mM Tris-HCl (pH 8.2).

TABLE 2

Partition of Zincon and Zincon complexes into organic solvents

Solvent	% of recovery in the water phase after extraction		
	Zincon	Zn-Zincon	Cu-Zincon
Hexane	100	87.5	100
Toluene	98.3	97.9	100

Each test tube contains 3 ml 40 μM Zincon, Zn-Zincon or Cu-Zincon 1:1 and 3 ml hexane or toluene. After vigorous shaking for 1 min followed by 20 min resting they were centrifuged at 15000 rpm for 5 min. Both phases were separated and plotted in a double-wavelength spectrophotometer from 400 to 700 nm. These experiments were performed in the dark. Organic phases did not show an absorbance change due to Zincon nor complexes (data not shown).

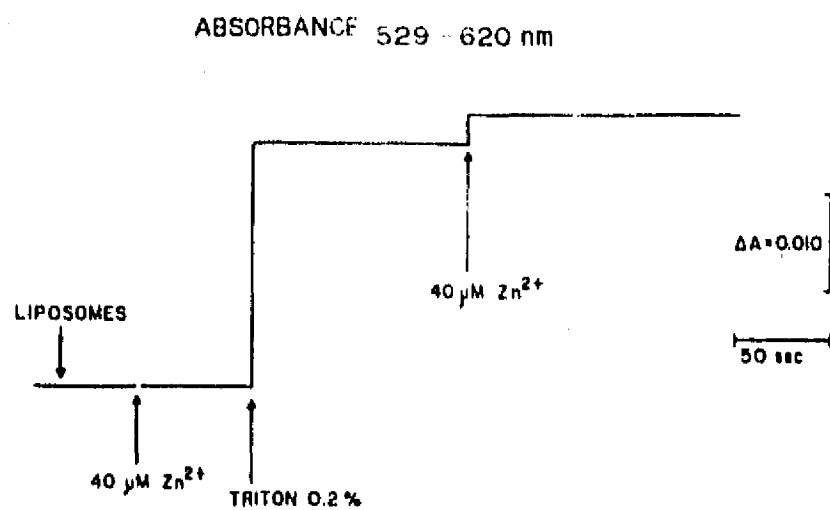


Fig. 5. Interaction with model membranes. Dual wavelength measurements of the absorbance changes of Zincon after titration with Zn^{2+} and 0.2% Triton X-100 to Zincon-loaded liposomes. The loaded liposomes were prepared as in Materials and Methods.

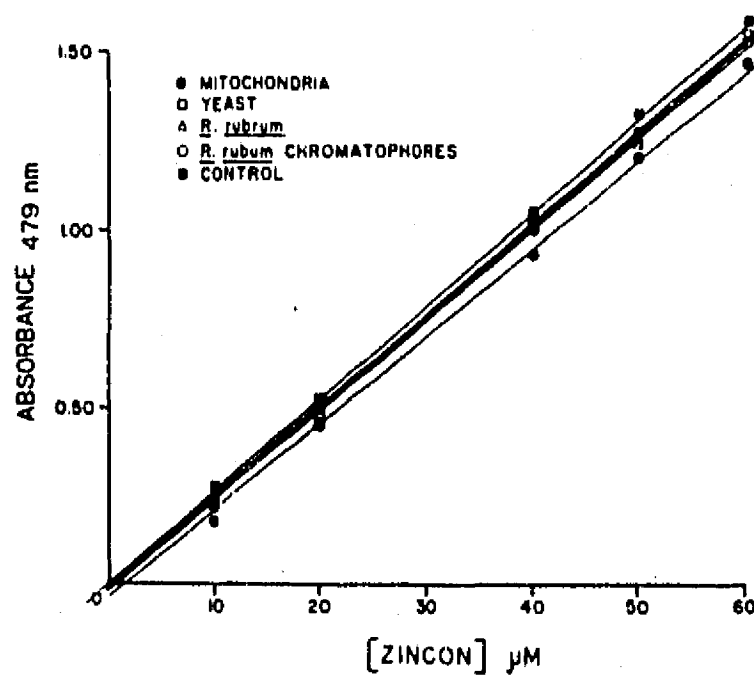


Fig. 6. Interaction with biological membranes. Each test tube contains Zincon in concentrations shown in the plot, from a stock solution of Zincon $120 \mu M$ and 50 mM Tris-HCl (pH 8.2), final volume 2 ml . Bovine heart mitochondria (1 mg/ml ; ●); *Saccharomyces cerevisiae* (50 mg/ml ; □); *Rhodospirillum rubrum* cells ($50 \mu g \text{ Bchl/ml}$; Δ); and chromatophores of *R. rubrum* ($50 \mu g \text{ protein/ml}$; ○); were added to each Zincon concentration, and incubated for 5 min. Mitochondria, yeast and bacterium cells were centrifugated for 20 min at 15000 rpm at $4^\circ C$. Chromatophores were centrifuged for 1 h 20 min at 40000 rpm at $4^\circ C$. The supernatant was extracted and measured at 479 nm . A concentration curve with Zincon only was obtained to compare results (■).

can be seen in Fig. 6. The added concentrations of Zincon to mitochondria, yeast. *R. rubrum* cells and its chromatophores are recovered almost completely in the supernatant.

Discussion

From this work it is clear that the metallochromic Zincon possesses some of the characteristics needed for a good indicator of free concentrations of Zn^{2+} , Cu^{2+} and other divalent cations; however not for Mg^{2+} .

The differential spectrum of the Zn-Zincon complex with respect to the spectra of complexes with Mn^{2+} , Ca^{2+} and Fe^{2+} is very different in the hyperchromic zone near 600 nm, this could be useful to measure the Zn^{2+} concentration in the presence of the other divalent cations; however, in experiments in which Zn^{2+} was added to equimolecular solutions of Mn-Zincon or Fe-Zincon, the complex Zn-Zincon did not appear (data not shown). Nevertheless, the addition of Zn^{2+} to solutions of Ca-Zincon yields the data of the Zn-Zincon complex (Table 1). These data correlate with the interference caused by Fe^{2+} and Mn^{2+} found in Hg-Zincon complex [17]. Zincon displays a complete selectivity between Zn^{2+} and Mg^{2+} , this characteristic makes this metallochromic very convenient for measuring Zn^{2+} in living cells which contain a high concentration of Mg^{2+} and Ca^{2+} . The concentration of total zinc found in kidney, lung and erythrocyte is around 100 μM [18], which is in the range of the Zn^{2+} determination by Zincon. It is important to note that Zincon will measure only free Zn^{2+} . Accordingly, all free Zn^{2+} can be measured in a solution containing EDTA and Zincon, when the Zincon/Zn ratio is 2.6 (data not shown).

One characteristic that a metallochromic must possess is a high dissociation constant [6]. It means that the presence of the metallochromic does not alter the concentration of the ions already present, and that most of the indicator remains in free form. The values considered for a good metallochromic are in the mM order. In this work we showed (Table 1) that the K_d values for the complex Zn-Zincon or Cu-Zincon are in the μM order ($\sim 60\text{--}40 \mu M$), this characteristic makes it unsuitable for use in biological systems, since it could act as a chelator. However, in this work we showed also that the maximum $\Delta\epsilon$ ($\sim 30\text{--}40 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) of the complexes are very high compared with other metallochromics $\Delta\epsilon$ ($\sim 3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [6]. The latter characteristic allows its use at very low concentrations of Zincon with large changes in absorbance. In this way, the ion concentration would not be altered considerably.

Another important characteristic that a metallochromic probe must possess is its high solubility in water and its low solubility in organic solvents, as is shown in Table 2. This is so in the case of the metallochromic Zincon and its complexes. Consequently, this work also shows that Zincon does not permeate model membranes and does not interact with biological membranes (Figs. 5 and 6). Taken together these characteristics make Zincon a good probe for measurements in membranes.

Simplified description of the method

The metallochromic Zincon is a selective indicator for Zn^{2+} and Cu^{2+} (but it also complexes with Fe^{2+} , Mn^{2+} and Ca^{2+}). They can be differentiated from each other by spectrophotometrical methods. Zn-Zincon and Cu-Zincon complexes have low K_d values, making the determination of this cation very accurate in the μM range. Neither Zincon nor Zn-Zincon partitioned into organic solvents or permeated liposome membranes, these are favorable characteristics for the adequate use of this metallochromic indicator in membrane studies. As well as other metallochromics, Zincon could be used for measuring cation transport across the membranes or for, for example, metalloenzyme analysis.

Acknowledgement

This work was partially supported by a grant (P228CCOX891650) from CON-ACyT, Mexico.

References

- 1 Vallee, B.L. and Glades, A. (1984) The metalbiochemistry of zinc enzymes. In: *Advances in Enzymology* (Meister, A., ed.), Vol. 56, pp. 283-430, John Wiley & Sons, New York.
- 2 Evans, R.M. and Hollenberg, S.M. (1988) Zinc fingers: gilt by association. *Cell* 52, 1-3.
- 3 Veillon, C. and Vallee, B.L. (1978) Atomic spectroscopy in metal analysis of enzymes and other biological materials. In: *Methods in Enzymology* (Fleischerand, S. and Packer, L., eds.), Vol. LIV, pp. 446-486, Academic Press, New York.
- 4 Lowry, J.R., Baldwin, R.R. and Harrington, R.V. (1954) Uptake of radiozinc by normal and diabetic rat pancreas. *Science* 119, 219-220.
- 5 Jensen, A. and Jorgensen, S.V. (1984) Analytical chemistry applied to metal ions in the environment. In: *Metal Ions in Biological Systems* (Sigel, M., ed.), Vol. 18, pp. 5-59 Marcel Dekker, New York.
- 6 Scarpa, A. (1979) Measurements of cation transport with metallochromic indicators. In: *Methods in Enzymology* (Fleishar, S. and Packer, L., ed.), Vol. LVI, pp. 301-338, Academic Press, New York.
- 7 Vallieres, I., Scarpa, A. and Somlyo, A.P. (1975) Subcellular fractions of smooth muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 659-669.
- 8 Miledi, R., Parker, I. and Schallow, G. (1977) Calcium transients in frog slow muscles fibres. *Nature* 268, 750-752.
- 9 Scarpa, A. Brinley, F.J. and Dubyak, G. (1978) Antipirilazo III, a 'middle range' Ca^{2+} metallochromic indicator. *Biochemistry* 17, 1378-1386
- 10 Scarpa, A. (1974). Indicators of free magnesium in biological systems. *Biochemistry* 13, 2789-2794.
- 11 Petty, K. and Dutton, P.L. (1976) Ubiquinone-cytochrome *b* electron and proton transfer: a functional pK on cytochrome b_{50} *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Arch. Biochem. Biophys.* 172, 346-353.
- 12 Rush, R.M. and Yoe, J.H. (1954). Colorimetric determination of zinc and copper with 2-carboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazilbencenic acid. *Anal. Chem.* 26, 1345-1347.
- 13 Cohen-Bazire, G., Sstrom, W.R. and Stainer, R.Y. (1957) The kinetic studies of pigment synthesis by nonsulphur purple bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.* 49, 25-68.
- 14 Celis, H. and 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.
- 15 De Kloet, S.R., Van Wermeskerken, R.K.A. and Konigsberger, V.V. (1961) Studies on protein synthesis by protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 47, 138-143.

- 16 Low, H. and Vallin, I. (1963) Succinate-linked diphosphopyridinenucleotide reduction in sub-mitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta* 69, 361-374.
- 17 Morris, A.G. (1957) The use of Zincon in the absorptimetric determination of mercury. *Analyst* 82, 34-37.
- 18 Tsalev, D.L. (1984) Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice, Vol. II, The Chemical Rubber Co., OH, 215-223.

El pirofosfato y la pirofosfatasa

Una opción en la bioenergética

Irma Romero Álvarez

y

Heliodoro Celis

RESUMEN

El tema central de estudio de la bioenergética es el mecanismo por el cual se sintetiza el adenosintrifosfato (ATP). Esta molécula es la encargada de llevar la energía a todas aquellas reacciones de las células que la requieren; sin embargo, el ATP no es la única molécula rica en energía que puede desempeñar este papel. En este trabajo se analiza el papel del pirofosfato (PPi) como donador de energía para muchas reacciones endergónicas de las células. Considerando las características termodinámicas del PPi, su concentración intracelular y una serie de investigaciones que demuestran su utilización en el metabolismo, se puede explicar por qué actualmente el PPi no puede ser considerado como producto secundario del metabolismo, sino que su energía es aprovechada. Se analizan las enzimas (pirofosfatasa) encargadas de la hidrólisis del PPi, o como ocurre en las bacterias fotosintéticas, de su síntesis, mediante un gradiente transmembranal de protones. Se examinan también las características de las reacciones enzimáticas de síntesis e hidrólisis de PPi por la pirofosfatasa de membrana, así como su regulación por cationes, con el objeto de mostrar que dichas reacciones son más simples que las que realiza la H^+ -ATP sintetasa. Finalmente, se considera al PPi como un compuesto donador de energía más antiguo que el ATP y a la pirofosfatasa de membrana como el modelo primario de enzima transductora de energía.

Recibido el 9 de abril de 1990

Aceptado en forma revisada el 26 de junio de 1990

La M en C Irma Romero Álvarez estudió biología en la Facultad de Ciencias de la UNAM y la maestría en ciencias (bioquímica) en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM. Se encuentra estudiando el doctorado en investigación biomédica básica. Actualmente trabaja en el Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en el estudio de la pirofosfatasa membranal de bacterias fotosintéticas. Es profesora de la Facultad de Ciencias y miembro del SNI.

El Dr Heliodoro Celis es biólogo egresado de la Facultad de Ciencias de la UNAM, obtuvo los grados de maestro y de doctor en ciencias (bioquímica) en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Realizó una estancia pos-

INTRODUCCIÓN

Todas las células utilizan los mismos principios fundamentales y los mismos mecanismos en sus actividades transformadoras de energía. Los organismos fotosintéticos utilizan la energía de la luz solar, mientras que los organismos heterótrofos emplean la energía contenida en la estructura de las moléculas orgánicas nutrientes obtenidas de su medio.

La célula conserva la energía de manera aprovechable en las moléculas del ATP, las cuales se sintetizan a partir de ADP y de Pi en reacciones catalizadas por la H^+ -ATP sintetasa. El ATP es entonces el transportador que lleva la energía química hacia aquellos procesos o reacciones de la célula que requieren energía. Así, al hidrolizarse el ATP, la energía liberada se utiliza para llevar a cabo el trabajo químico, mecánico y osmótico de la célula (Franklin, 1986).

El tema central en bioenergética en los últimos 30 años ha sido entender los mecanismos por los cuales la energía de la oxidación de sustratos o la proveniente de la absorción de la luz se acopla a la síntesis de ATP.

Aunque ocurre síntesis de ATP en sistemas enzimáticos solubles, la producción mayor de ATP está asociada a complejos enzimáticos ligados a ciertos tipos de membranas llamadas "membranas transductoras de energía" como la membrana plasmática de las células

doctoral en la Universidad de Bristol, Inglaterra. Actualmente es investigador en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, e Investigador Nacional. Sus principales áreas de investigación son la fotosíntesis en bacterias y la transducción energética en los seres vivos.

procarióticas, la membrana mitocondrial interna y la membrana tilacoidal del cloroplasto (Nicholls, 1982).

Peter Mitchell propuso, en 1961, la hipótesis quimiosmótica para explicar el acoplamiento entre la transferencia de electrones y la síntesis de ATP en las membranas transductoras de energía. Esta hipótesis utiliza conceptos de fisiología de membrana, de bioquímica tradicional, y de reacciones vectoriales que dan lugar a la transferencia de grupos químicos a través de la membrana (Mitchell, 1961 y 1967). Mitchell postuló que el flujo de electrones sucede en una membrana cerrada que es poco permeable a protones (H^+). El arreglo de las moléculas transferidoras de electrones e hidrógenos es alternante, de tal forma que a una molécula acarreadora de electrones le sigue una de hidrógenos y así sucesivamente. El H^+ necesario para formar hidrógeno con el electrón 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. La energía total del gradiente de H^+ es la suma de ambos componentes y es la llamada fuerza protonmotriz. Ésta es la fuerza que se utiliza para la síntesis de ATP mediante la acción de una enzima de membrana denominada H^+ -ATP sintetasa, que forma el ATP a través de un flujo inverso de H^+ (véase la figura 1).

Esta hipótesis explica el mecanismo de transducción energética en bacterias, mitocondrias y sistemas fotosintéticos como cloro-

plastos y bacterias fotosintéticas. Asimismo, se puede extender para explicar el transporte de iones en la membrana plasmática de las células eucarióticas.

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

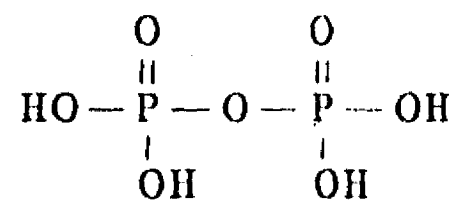
En bacterias fotosintéticas se encontró que la membrana transductora de energía, además de sintetizar ATP, puede utilizar el gradiente electroquímico de H^+ para sintetizar pirofosfato (PPi) (Baltscheffsky y col, 1966) a través de la enzima membranal llamada pirofosfatasa. Ésta es una enzima con actividad reversible que al hidrolizar PPi genera un gradiente electroquímico y en este sentido es semejante a la H^+ -ATP sintetasa.

Sin embargo, la H^+ -ATP sintetasa es una enzima compleja tanto molecularmente como en su mecanismo cinético y en su regulación (Senior, 1988, Futai y col, 1989). La pirofosfatasa de membrana es una enzima más simple, tanto molecularmente como en los reactivos y productos que intervienen en la reacción que cataliza, por lo que el estudio de este sistema es una opción para el análisis de los mecanismos de síntesis de uniones covalentes de alta energía.

En este trabajo se revisan las características de las pirofosfatasas, con especial énfasis en las membranales, el papel del PPi como fuente de energía en las reacciones metabólicas celulares, así como el posible papel evolutivo del PPi y la pirofosfatasa de membrana.

I. CARACTERÍSTICAS DEL PPI

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



Para entender el significado biológico del PPI es necesario conocer algunos aspectos termodinámicos de su hidrólisis, particularmente en las condiciones de pH y fuerza iónica presentes en las células. Debido a la alta afinidad del grupo PPi por cationes divalentes y a las concentraciones relativamente altas de

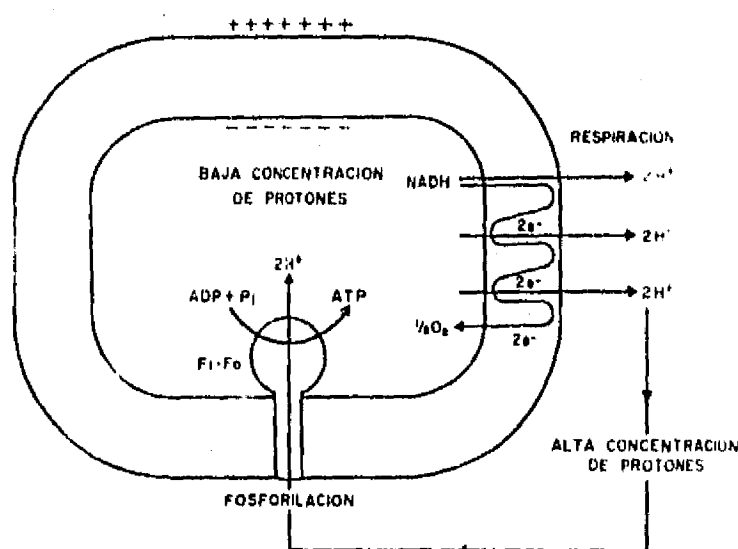


Figura 1. Acoplamiento entre la fosforilación y el transporte de electrones. La teoría quimiosmótica propone un bombeo de H^+ hacia un lado de la membrana por la cadena transportadora de electrones durante la respiración, creando un gradiente electroquímico de H^+ , el cual es utilizado por la H^+ -ATP sintetasa para sintetizar ATP (Hinkle y McCarty, 1978).

Mg^{2+} en el citoplasma, el PPI probablemente se encuentra presente en las células formando un complejo 1:1 con el Mg^{2+} .

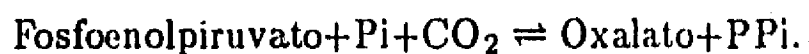
El cambio de energía libre asociado a la hidrólisis (ΔG°) del PPI es cercano a la energía del enlace gama del ATP; sin embargo, en presencia de Mg^{2+} el ΔG° para el PPI se vuelve menos negativo debido a que el producto de su hidrólisis (2Pi) no se acompleja fuertemente con el Mg^{2+} , a diferencia del ATP, cuyo producto (ADP) sí se une fuertemente al Mg^{2+} (Smith y Martell, 1981). Flodgaard y Fleron (1974) obtuvieron valores muy precisos de ΔG° para la hidrólisis del PPI a pH 7.4 y 25° C. En presencia de Mg^{2+} , $\Delta G^{\circ} = -4.0 \text{ kcal mol}^{-1}$, y en ausencia de Mg^{2+} $\Delta G^{\circ} = -5.7 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Al considerar las propiedades termodinámicas del PPI, no hay razón para excluirlo como posible fuente de energía para las células.

II. EL PAPEL DEL PIROFOSFATO EN EL METABOLISMO CELULAR

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

En 1962 Sui y Wood encontraron una enzima que utiliza PPI en la especie bacteriana *Propionibacterium shermanii* y que cataliza la reacción:



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



Posteriormente se han identificado más

enzimas dependientes de PPI, responsables de la fosforilación de intermediarios esenciales de la glucólisis y gluconeogénesis en microorganismos (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 dependiente de PPI (Lawson y Veech, 1979). También se descubrió que estas enzimas dependientes de PPI están ampliamente distribuidas en plantas (Edwards y col, 1985). En resumen, estos hallazgos muestran que el PPI puede usarse como donador de energía para muchas reacciones, y que en otras, puede ser utilizado incluso en lugar del ATP.

Por otra parte, la idea de que la irreversibilidad de los procesos biosintéticos depende de que el PPI sea hidrolizado y por tanto de la presencia de una baja concentración de PPI celular, no concuerda con la evidencia experimental. Esto fue más claro cuando se pudo cuantificar la cantidad del PPI en las células. 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 especie de arqueobacterias llamada *Methanobacterium thermoautotrophicum* que contiene una concentración de PPI que va de 2.5 a 40 mM en diferentes condiciones de cultivo (Keltjens y col, 1988). Como se puede observar, la concentración de PPI es comparable a la de otros intermediarios del metabolismo energético, tales como el ATP, 2.0 a 10 mM (Matthews y col, 1982; Zweier y Jacobus, 1987).

H Baltzscheffsky y von Stedingk (1966) detectaron la síntesis de PPI dependiente de la luz por una pirofosfatasa membranal en la especie bacteriana fotosintética púrpura no sulfurosa llamada *Rhodospirillum rubrum*. La síntesis de PPI acoplada a la cadena respiratoria también se describió en mitocondrias de levaduras, de animales y de plantas (Mansurova y col, 1975b) y el acoplamiento a la cadena de transporte fotosintético fue encontrado en cloroplastos de plantas (Rubtsov y col, 1976).

Otro descubrimiento en los últimos años fue la identificación del transporte de PPI a través de la membrana interna mitocondrial en intercambio por ADP vía el translocador de adenín nucleótidos (Asimakis y Aprille, 1980) y 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 y col, 1972), de la membrana interna de la

mitocondria y de las membranas de plantas (Rea y Poole, 1985; Wang y col, 1986).

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

III. UTILIZACIÓN DEL PIROFOSFATO

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

1) Ser hidrolizado por la pirofosfatasa citoplásmica o soluble, y perder como calor la energía liberada de la hidrólisis del enlace anhidro.

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

3) Ser utilizado directamente como fuente de energía en reacciones metabólicas, o sustituir al ATP como donador de energía.

IV. LAS PIROFOSFATASAS

La pirofosfatasa inorgánica (PPiase), como ya se ha dicho, es una enzima que cataliza la hidrólisis y la síntesis de PPI, de acuerdo con la siguiente reacción:



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

Pirofosfatasa citoplásmica

La pirofosfatasa citoplásmica es una enzima ubicua. Esto se entiende claramente si se

considera su importancia en el metabolismo celular, al desplazar el equilibrio de las reacciones biosintéticas en el sentido termodinámicamente favorable (Kornberg, 1957). El mecanismo de reacción, las propiedades estructurales y las propiedades cinéticas de esta importante enzima han sido estudiadas principalmente en la pirofosfatasa de levaduras (Cooperman, 1982). También se ha descrito su caracterización molecular, su clonación y su localización en el cromosoma (Kolakowski y col, 1988). En las levaduras, esta enzima es un homodímero con 285 aminoácidos y peso molecular de 32 042 daltones por subunidad. Cataliza la hidrólisis de PPI, el intercambio $Pi-H_2O$ y el intercambio $Pi-PPi$. Para llevar a cabo estas actividades requiere de Mg^{2+} para formar el sustrato $Mg-Pi$ o $Mg-PPi$, además de unir dos átomos de Mg^{2+} a sitios reguladores de la enzima (Barry y Dunaway-Mariano, 1987).

Pirofosfatasa membranal

La existencia de este tipo de pirofosfatasa se reportó por primera vez en *R rubrum* (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966). Sin embargo, ahora se sabe que también está presente en otras bacterias fotosintéticas (Knobloch, 1975; Nore y col, 1990), en mitocondrias de levaduras (Mansurova y col, 1975a), en mitocondrias de hígado de rata y de corazón de res (Mansurova y col, 1975b y 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 ATP sintetasa (también presente en la membrana de esta especie bacteriana), pero con una estructura más sencilla, sustratos más simples e insensibilidad al inhibidor clásico de la H^+ -ATP sintetasa, la oligomicina. Esta enzima puede llevar a cabo las siguientes reacciones parciales: a) síntesis de PPI, b) hidrólisis de PPI, c) intercambio $Pi-PPi$ y d) intercambio $Pi-H_2O$.

a) Síntesis de PPI

La formación de PPI se efectúa utilizando la energía del gradiente electroquímico de H^+ generado a través de las invaginaciones de la membrana plasmática de la bacteria (cromatóforos) en condiciones de iluminación (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966) (Fig 2). El sustrato de la enzima es el complejo $Mg-Pi$

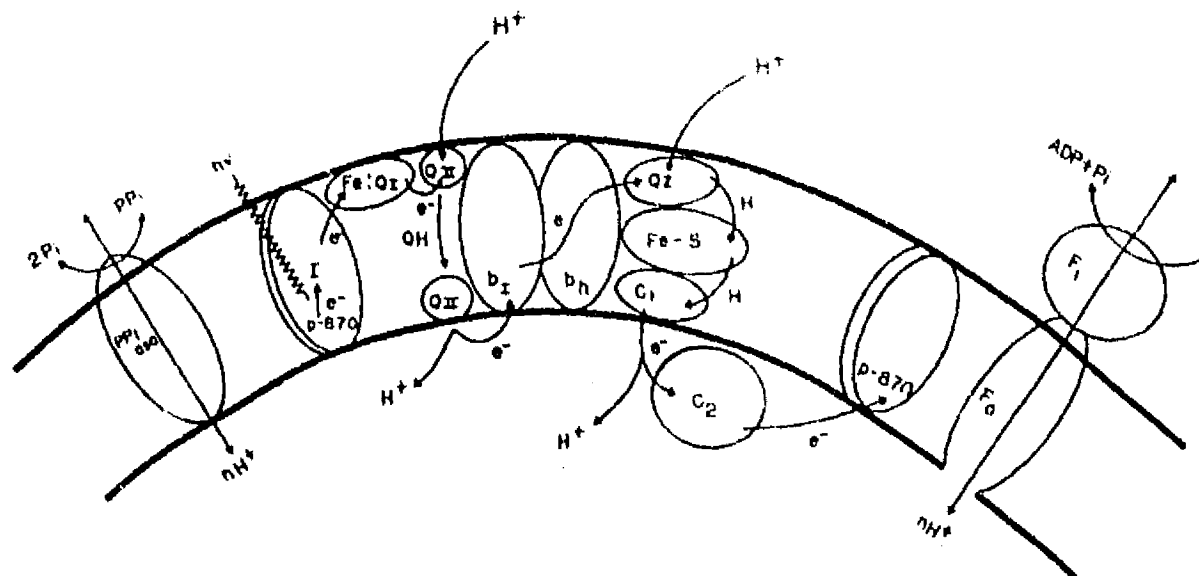


Figura 2. Esquema de la transducción energética en cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*. Se muestran la H^+ -ATP sintetasa, la pirofosfatasa (PPi) y el sistema de transporte de electrones fotosintético. P870: Centro de reacción fotoquímico, I: Intermediario, Fe:Q₁: Aceptor primario-hierro quinona, Q₁₁: quinona secundaria, B₁ y b_h: citocromo b, Q₂: ubiquinona terciaria, Fe-S: complejo Rieske, c₁: citocromo c, F₁ y F₀: partes hidrofílica e hidrofóbica de la H^+ -ATP sintetasa.

la reacción requiere también de iones Mg^{2+} para obtener velocidades máximas. El pH óptimo es 7.5, la síntesis de PPi es inhibida por antimicina (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 al de la formación de ATP. Estos autores demostraron además que la formación de PPi se satura con menor intensidad luminosa que la requerida para saturar la de síntesis de ATP. Hay que tener en cuenta que *R. rubrum* crece en condiciones naturales a bajas intensidades luminosas, lo que puede sugerir que esta vía alterna, que sintetiza PPi, tenga un significado fisiológico importante.

Recientemente se ha descrito un método de enzimas acopladas bastante preciso para cuantificar la cantidad de PPi sintetizado, y se ha encontrado que se puede inducir la síntesis de PPi por gradientes artificiales de pH o eléctricos (Nyrén y Lundin, 1985). 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 la síntesis de PPi requiere una fuerza protonmotriz menor que la de ATP, lo que refleja un menor ΔG° de la reacción, o que la pirofosfatasa requiere un menor número de H^+ que la H^+ -ATP sintetasa (Strid y col, 1987). Otra posible

explicación sería que, a diferencia de la H^+ -ATP sintetasa, la pirofosfatasa carece de un inhibidor natural (Schwerzmann y Pedersen, 1986).

Estudios comparativos de la H^+ -ATP sintetasa con la pirofosfatasa (Nyrén y col, 1986), indican que a bajas intensidades de luz, la velocidad de síntesis de PPi es el doble que la del ATP y que ambas actividades compiten por el gradiente de H^+ .

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). La actividad hidrolítica está parcialmente reprimida en la luz, aun en condiciones en las que no hay síntesis del PPi (Nishikawa y col, 1973). Es inhibida por Pi, NaF y por los dos análogos de PPi, imidodifosfato (IDP) y metilendifosfato (MDP); también es inhibida por butanol a diferencia de la pirofosfatasa citoplásmica o de la H^+ -ATP sintetasa que no lo son. En *R. rubrum* la actividad de hidrólisis de la pirofosfatasa es considerablemente más alta que la de la H^+ -ATP sintetasa y sólo se igualan cuando ambas actividades se estimulan por desacoplantes (Baltscheffsky, 1969b). El pH óptimo para la reacción de hidrólisis es 6.5 (Celis y Romero, 1987).

La pirofosfatasa transloca H^+ a través de la membrana en una reacción acoplada a la hidrólisis de PPi, dejando el interior del cromatóforo cargado positivamente con

respecto al exterior, de manera semejante a como lo hace la H^+ -ATP sintetasa. El hecho de que la pirofosfatasa transporte H^+ sugiere que contiene un canal de H^+ semejante al de la H^+ -ATP sintetasa. Asociadas a la hidrólisis de PPi se han descrito varias reacciones dependientes de energía que incluyen la transhidrogenación dependiente de energía (Keister y Yike, 1967a), la reducción de citocromo (Baltscheffsky, 1967), la reducción de NAD^+ ligada a succinato (Keister y Yike, 1967b), el bombeo de H^+ (Moyle y col, 1972), y la formación de ATP dirigida por PPi (Keister y Minton, 1971).

c) Intercambio Pi—PPi

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

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

d) Recambio Pi- H_2O

Harvey y Keister (1981) caracterizaron esta reacción. El recambio Pi- H_2O se debe exclusivamente a la pirofosfatasa 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. Requiere ^{32}P i y Mg^{2+} en una relación Mg:Pi = 0.8.

Solubilización y purificación

La pirofosfatasa de membrana es una enzima integral de membrana y su purificación ha sido difícil. Rao y Keister (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 peso molecular, la enzima solubilizada requiere 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 concentraciones elevadas de Mg^{2+} ; se obtiene un alto grado de pureza mediante cromatografía en hidroxiapatita. Este grupo también ha realizado una caracterización preliminar de la enzima solubilizada y la ha reconstituido en liposomas (Nyrén y Baltscheffsky, 1983).

Regulación de la enzima membranal por cationes divalentes

Como todas las pirofosfatasas, citoplásmicas o membranales, la pirofosfatasa de membrana de *R rubrum* requiere Mg^{2+} para que se formen sus sustratos, Mg-PPi para la hidrólisis, o Mg-Pi para la síntesis (Lahti, 1983). Sin embargo, parece que el Mg^{2+} libre ejerce también un papel regulador de 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 cation puede unirse a la pirofosfatasa y protegerla contra la inhibición causada por agentes como N-etilmaleimida y 4-cloro-7-nitrobenzofurazano. También se ha encontrado que la concentración de Mg^{2+} libre estimula la reacción de intercambio Pi-PPi (Celis y col, 1985), lo que sugiere que este metal se une a la enzima e induce un efecto favorable sobre la reacción.

Datos más recientes de nuestro laboratorio (Celis y Romero, 1987), sugieren que la enzima tiene un sitio para Mg^{2+} libre que puede ser ocupado también por otros cationes divalentes (Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , etc) que inducen cambios en las propiedades cinéticas de la enzima (Fig 3). Por ejemplo, el Zn^{2+} puede formar el complejo Zn-PPi (tan buen sustrato como el Mg-PPi) y al estar en forma libre inhibir la hidrólisis y el recambio Pi-PPi.

Otros datos nuestros no publicados indican que la presencia de Mg^{2+} y Zn^{2+} al preincubar la enzima a 70° C no sólo la protege contra la desnaturalización, sino que además la activa. Al ser solubilizada la enzima, se sigue observando este efecto protector hasta temperaturas de 65° C. Los datos anteriores

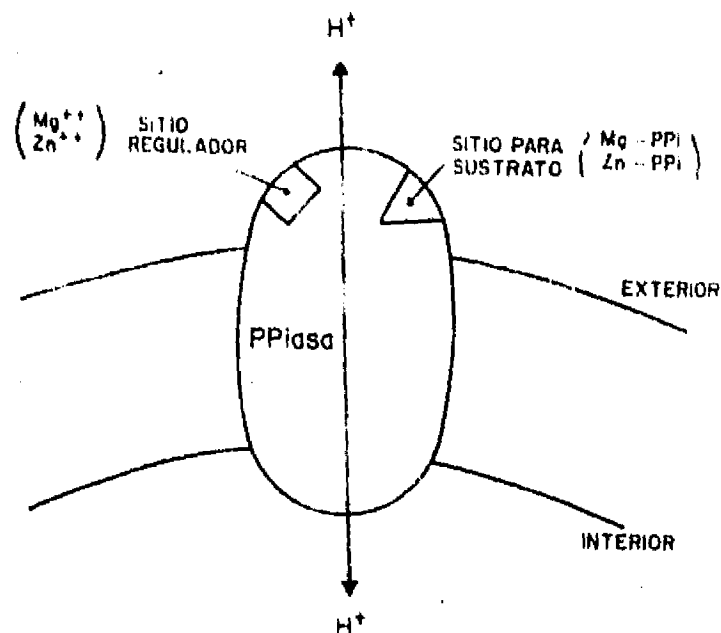


Figura 3. Esquema de la pirofosfatasa de membrana del cromatóforo. La enzima posee un sitio para el sustrato ($Mg-PPi$ o $Zn-PPi$) y se propone que tiene un sitio regulador que puede ser ocupado por cationes divalentes como el Mg^{2+} o el Zn^{2+} .

sugieren la existencia de un sitio regulador para estos cationes divalentes en la enzima.

Estudios referentes a la pirofosfatasa citoplásmica de levadura (Cooperman, 1982) muestran que ésta requiere tres cationes divalentes para la catálisis: dos de ellos se unen directamente a la enzima, mientras el tercero se coordina con el PPi para formar el sustrato. Sin embargo, no se conoce aún el papel que desempeñan en la catálisis los dos cationes que se unen a la enzima, ni su localización precisa en la estructura polipeptídica.

Es interesante estudiar a la H^+ -ATP sintetasa en lo que respecta a sus requerimientos de Mg^{2+} libre. En la enzima de cloroplastos se ha reportado la unión de Mg^{2+} a un sitio específico (Younis y col, 1983), asimismo, en la H^+ -ATP sintetasa mitocondrial, el Mg^{2+} provoca una estimulación de la síntesis ATP y una disminución de la hidrólisis (Senior, 1981).

De lo anterior se desprende que una característica común de las enzimas transductoras de energía es el requerimiento de metales divalentes, tanto para formar el sustrato, como, en forma libre, para inducir cambios regulatorios sobre la cinética de las enzimas. Por consiguiente, resulta importante dilucidar el papel de estos cationes en el mecanismo de transducción energética.

Pirofosfatasa de tonoplastos

Recientemente se descubrió una nueva pirofosfatasa translocadora de H^+ en las mem-

branas vacuolares o tonoplastos de plantas superiores (Walker y Leigh, 1981; Wagner y Mulready, 1983; Rea y Poole 1985; Wang y col, 1986).

Esta enzima actúa como una bomba de H^+ utilizando al PPi como fuente de energía. Su actividad es independiente de la ATP sintetasa translocadora de H^+ , que también se localiza en estas membranas.

La fuerza protonmotriz que se genera a través del tonoplasto, ya sea por esta pirofosfatasa o por la H^+ -ATP sintetasa, controla el transporte secundario de iones y regula el pH vacuolar.

El conocimiento acerca de la pirofosfatasa del tonoplasto es escaso. Se ha reportado que depende de K^+ para estimular la hidrólisis de $Mg-PPi$ y que es inhibible por fluoruro y MDP como las demás pirofosfatasa (Walker y Light, 1981).

Wang y col (1986) han encontrado que, bajo ciertas condiciones, el pH generado por la H^+ -pirofosfatasa es de magnitud semejante al producido por la H^+ -ATP sintetasa en vesículas de tonoplastos de raíz de avena. Dupaix y col (1989) han logrado utilizar el gradiente de H^+ producido por la pirofosfatasa para sintetizar ATP a través de la H^+ -ATP sintetasa en tonoplastos de *Catharanthus roseus*.

La pirofosfatasa del tonoplasto ha sido purificado recientemente (Maslowski y Maslowska, 1987; Sarafian y Poole, 1989) y su peso molecular aparente está entre 64 y 67 kilodaltones.

V. EL PIROFOSFATO Y LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA EN LA EVOLUCIÓN DE LOS MECANISMOS TRANSDUCTORES DE ENERGÍA

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

Por otra parte, también se ha planteado el posible papel de la pirofosfatasa de membrana en la evolución del mecanismo de acoplamiento de la óxido-reducción y la fosforilación. A este respecto, el grupo de Baltscheffsky (1982) ha propuesto que el sistema de transporte de electrones y el sistema de la pirofosfatasa de membrana eran originalmente fuentes de energía separadas (Fig 4a). Gracias al funcionamiento en reversa de la fosfatasa, se dio después el acoplamiento entre las dos entidades que funcionaban autónomamente, que condujo al primer almacén de energía con la configuración del PPI. Esta hipótesis postula que el primer transporte de H^+ a través de la membrana estuvo representado por la pirofosfatasa que contenía un canal específico para el paso de H^+ . Durante la evolución surgió la H^+ -ATP sintetasa, lo cual creó una situación en la que coexistieron las dos enzimas (Fig 4b) (como es el caso de *R rubrum* actualmente); pero con el tiempo se perdió la pirofosfatasa (Fig 4c) (como es el caso de otros sistemas actuales, como *Rhodobacter capsulata* que sólo tiene

H^+ ATP sintetasa). Aunque esta hipótesis parece lógica, se necesita un estudio más profundo para probarla y poder ubicar evolutivamente a la pirofosfatasa de membrana.

La importancia energética del PPI en el metabolismo celular ha emergido como una opción a la del ATP. El número de experimentos que involucran diversos aspectos del PPI en la bioenergética es cada vez mayor. La simplicidad del PPI y de las pirofosfatasas nos ofrece la oportunidad experimental y conceptual de facilitar nuestro camino hacia el entendimiento de cómo las células utilizan y transforman la energía.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos los comentarios al manuscrito del Dr Diego González Halphen y a los biólogos Elena Hilario y Erwin Silva. Nuestro trabajo de laboratorio estuvo parcialmente apoyado por el Conacyt (P228COOX891650 y D111-903553).

REFERENCIAS

- Asimakis, GK, y JR Aprille, *FEBS Lett* (1980) 117, 157-160.
 Baltscheffsky, M, *Nature (London)* (1967) 216, 241-243.
 Baltscheffsky, M, *Arch Biochem Biophys* (1969) 133 46-53.
 Baltscheffsky, H, y LV von Stedingk, *Biochem Biophys Res Commun* (1966) 22, 722-728.
 Baltscheffsky, H, LV von Stedingk, MW Heldt y M Klingenberg, *Science* (1966) 153, 1120-1121.
 Baltscheffsky, M, H Baltscheffsky y J Boork, "Evolutionary and Mechanistic Aspects on Copuling and Phosphorylation in Photosynthetic Bacteria", *Electron transport and photophosphorylation*. J Barber (Ed) (Elsevier Biomedical Press, 1982) pp 249-272.
 Baltscheffsky, M, y P Nyrén, "The synthesis and utilization of inorganic pyrophosphate", *Bioenergetics* L. Ernster (Ed) (Elsevier, Amsterdam, 1984) pp 187-206.
 Barry, RJ, y D Dunaway-Mariano, *Arch Biochem Biophys* (1987) 259, 196-203.
 Boyer, PD, B Chance, L Ernster, P Mitchell, E Racker y EC Slater, *Ann Rev Biochem* (1977) 46, 955-1026.
 Celis, H, I Romero y A Gómez-Puyou, *Arch Biochem Biophys* (1985) 236, 767-774.
 Celis, H, e I Romero, *J Bioenerg Biomembr* (1987) 19, 255-272.
 Cooperman, B, *Meth Enzymol* (1982) 87, 526-548.
 Dupaix, A, G Johannin y B Arrio, *FEBS Lett* (1989) 249, 13-16.
 Edwards, GE, H Nakamoto y JN Burnell, *Annu Rev Plant Physiol* (1985) 36, 255-286.
 Evans, HJ, y HG Wood, *Proc Natl Acad Sci USA* (1968) 61, 1141-1453.
 Floodgard, H, y P Fleron, *J Biol Chem* (1974) 249, 3464-3465.
 Franklin, MH, *The Vital Force, A Study of Bioenergetics* (WH Freeman and Company, Nueva York, 1986) 557 p.
 Futai, M, N Takato y M Masatomo, *Annu Rev Biochem* (1989) 58, 111-136.
 Guillory, RJ, y RR Fisher, *Biochem J* (1972) 129, 471-481.
 Harvey, GW, y DL Kleister, *Arch Biochem Biophys* (1981) 208, 426-430.

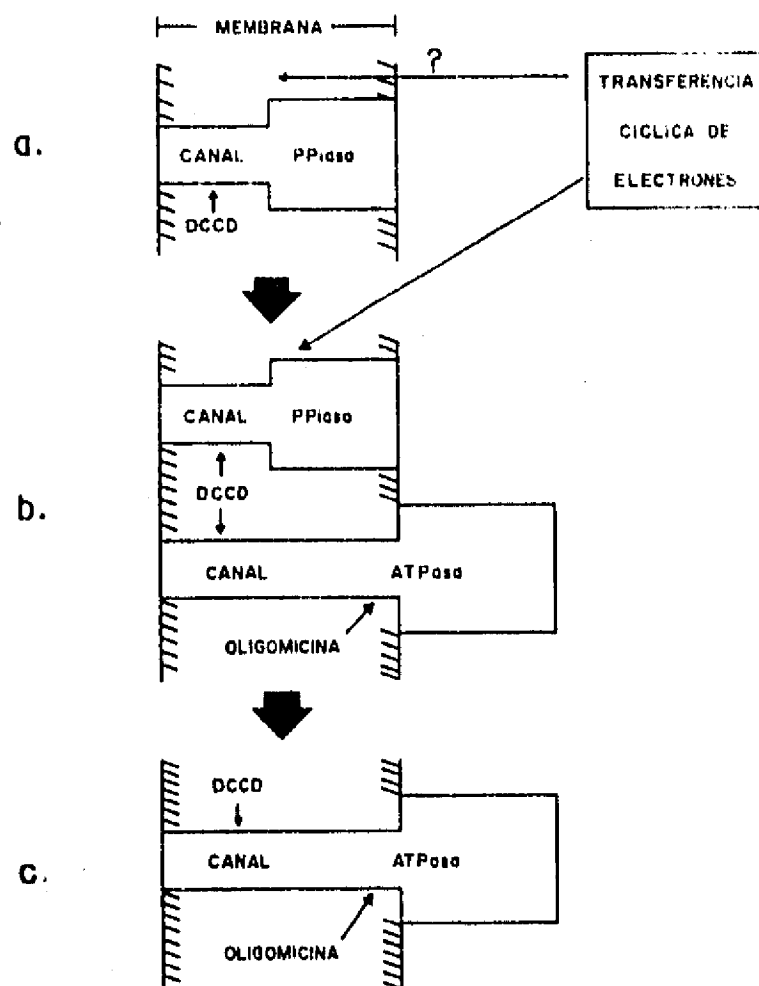


Figura 4. Posible mecanismo evolutivo del acoplamiento de energía en membranas transductoras. a) Situación hipotética en la que sólo existe la PPIasa. b) Situación intermedia en la que coexisten la PPIasa y la H^+ -ATP sintetasa en la membrana. c) Situación en la que sólo subsiste la H^+ -ATP sintetasa (Baltscheffsky y col, 1982).

- Hatch, MD, y CR Slack, *Biochem J* (1968) 106, 141-146.
 Hinkle, PC, y RE McCarty, *Sci Am* (1978) 20, 58-75.
 Keister, DL, y NJ Yike, *Biochemistry* (1967a) 6, 3847-3857.
 Keister, DL, y NJ Yike, *Arch Biochem Biophys* (1967b) 121, 415-422.
 Keister, DL, y NI. Minton, *Biochem Biophys Res Commun* (1971) 42, 432-439.
 Keltjens, JT, R van Erp, RJ Mooijaart, Ch van der Drift y GD Vogels, *Eur J Biochem* (1988) 172, 471-476.
 Knobloch, K, *Z Naturforsch* (1975) 30C, 771.
 Kolakowski Jr, LF, M Schloesser y BS Cooperman, *Nucl Acids Res* (1988) 22, 10441-10452.
 Kornberg, A, "Phyrophosphorylases and Phosphorylases in biosynthetic reactions", *Advances in Enzymology*, Vol 18. FF Nord (Ed) (Interscience, Nueva York, 1957) pp 191-240.
 Lahti, R, *Microbiol Rev* (1983) 47, 169-179.
 Lawson, JWR, y RL Veech, *J Biol Chem* (1979) 254, 6528-6537.
 Lipmann, F, *The Origin of Prebiological Systems* (Academic, Nueva York y Londres, 1965) p 259.
 Mansurova, SE, SA Ermakova, RA Zvyagil'skaya y IS Kulaev, *Mikrobiologiya* (1975a) 44, 874-1273.
 Mansurova, SE, Yu A Shakhov, TN Belyakova y IS Kulaev, *FEBS Lett* (1975b) 55, 94-98.
 Mansurova, SE, Yu A Shakhov e IS Kulaev, *FEBS Lett* (1977) 74, 31-34.
 Maslowski, P, y H Maslowska, *Biochem Physiol Pflanzen* (1987) 182, 73-84.
 Matthews, PM, SR Williams, AM Seymour, A Schwartz, G Dube, DG Gadian y GK Radda, *Biochim Biophys Acta* (1982) 720, 163-171.
 Mitchell, P, *Nature* (1961) 191, 144-148.
 Mitchell, P, *Fed Proc* (1967) 26, 1370-1379.
 Miller, SL, y M Parris, *Nature* (1964) 204, 1248.
 Moyle, J, R Mitchell y P Mitchell, *FEBS Lett* (1972) 55, 94-98.
 Nicholls, DG, *Bioenergetics* (Academic Press, Nueva York, 1982) pp 1-22.
 Nishikawa, K, K Hosi, J Suzuki, S Yoshimura y T Horio, *J Biochem* (1973) 73, 537-553.
 Nore, BF, P Nyrén, GF Salih y A Strid, *Photosyn Res* (1990) 24, 75-80.
 Nyrén, P, K Hajnal y M Baltscheffsky, *Biochim Biophys Acta* (1984) 766, 630-635.
 Nyrén, P, y M Baltscheffsky, *FEBS Lett* (1983) 155, 125-130.
 Nyrén, P, y A Lundin, *Anal Biochem* (1985) 151, 504-509.
 Nyrén, P, BF Nore y M Baltscheffsky, *Biochim Biophys Acta* (1986) 851, 276-282.
 Randahl, H, *Eur J Biochem* (1979) 102, 251-256.
 Rao, PV, y DL Keister, *Biochem Biophys Res Commun* (1978) 84, 465-473.
 Rea, PA, y RJ Poole, *Plant Physiol* (1985) 77, 46-52.
 Reeves, RE, *J Biol Chem* (1968) 243, 3202-3204.
 Rubtsov, PM, NV Efemovich e IS Kulaev, *Dokl Akad Nauk Uzb SSR* (1976) 230, 1236-1237.
 Sarafian, V, y RJ Poole, *Plant Physiol* (1989) 91, 34-38.
 Senior, AE, *J Biol Chem* (1981) 256, 4763-4767.
 Senior, AE, *Physiol Rev* (1988) 68, 177-231.
 Smith, RM, y AE Martell, *Critical Stability Constants. Vol 4 Inorganic Complexes* (Plenum Press, Nueva York, 1981) pp 56-62.
 Strid, A, I Karlsson y M Baltscheffsky, *Acta Chem Scandinavica* (1987) B41, 116-118.
 Sui, PML, y HG Wood, *J Biol Chem* (1962) 237, 3044-3051.
 Schwerzmann, K, y PL Pedersen, *Arch Biochem Biophys* (1986) 250, 1-18.
 Wagner, GJ, y P Mulready, *Biochim Biophys Acta* (1983) 7281, 267-280.
 Walker, RR, y RA Leigh, *Planta* (1981) 153, 150-155.
 Wang, Y, RA Leigh, KH Kaestner y H Sze, *Plant Physiol* (1986) 81, 497-502.
 Younis, HM, G Weber e IS Boyer, *Biochemistry* (1983) 22, 2505-2511.
 Zweier, JL, y WE Jacobus, *J Biol Chem* (1987) 262, 8015-8021.

ABSTRACT

The central theme of bioenergetics is the mechanism of adenosine triphosphate (ATP) synthesis. This molecule transfers energy to all cellular processes that require it. However, other energy-rich metabolites could release as much energy as ATP. In this work we analyze the role of pyrophosphate (PPi) as energy donor for many endergonic reactions, even instead of ATP. Taking into account the thermodynamic characteristics of PPi as well as its intracellular concentration and several investigations that prove its utilization in metabolism, it can be seen that PPi energy is not wasted, as was considered previously. The enzymes (pyrophosphatases) involved in PPi hydrolysis and, as is the case of photosynthetic bacteria, its synthesis using the transmembranal proton gradient, are also analyzed. The characteristics of the enzymatic reactions for PPi synthesis and hydrolysis by the membrane-bound pyrophosphatase, as well as their regulation by cations are examined showing that these reactions are simpler than those performed by H⁺-ATP synthase. Finally, we review why PPi has been proposed as a high-energy donor older than ATP, and why the membrane bound pyrophosphatase appears to be a model of the first energy-transducing enzyme.

A membrane-bound pyrophosphatase from respiratory membranes of *Rhodospirillum rubrum*

IRMA ROMERO,¹ ALBERTO GÓMEZ-PRIEGO² and HELIODORO CELIS^{1*}

¹Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Apartado Postal 70-600, and ²Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, UNAM, México 04510, DF

(Received 20 May 1991; revised 5 August 1991; accepted 20 August 1991)

A pyrophosphatase activity was found in respiratory membranes of *Rhodospirillum rubrum*. This activity was specific for pyrophosphate and was inhibited by dicyclohexylcarbodiimide, NaF and pyrophosphate analogues, but not by oligomycin or LiCl. The divalent cation selectivity was $Zn^{2+} > Mg^{2+} > Co^{2+} > Ca^{2+}$, and the pH dependence was the same as that of the membrane-bound pyrophosphatase of chromatophores (optimum pH 6.5). The pyrophosphate hydrolysis activity of respiratory membranes was inhibited by 1-butanol. The enzyme was solubilized by Triton X-100, and the activity of the solubilized enzyme was stimulated by phospholipids. The respiratory-membrane enzyme ran in native electrophoresis with the same R_f as the membrane-bound pyrophosphatase of chromatophores. Antibodies raised against both enzymes cross-reacted with each other. These findings show that a membrane-bound pyrophosphatase is present in respiratory membranes of *R. rubrum* and is similar to the enzyme of photosynthetic membranes.

Introduction

The photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* is a member of the family *Rhodospirillaceae*. These organisms are remarkably versatile in obtaining growth energy through alternative mechanisms. They can grow in the dark chemotrophically in the presence of O_2 by the oxidation of substrates, or phototrophically in the absence of O_2 .

In phototrophically grown bacteria, extensions and modifications of the cytoplasmic membrane are formed and can be easily isolated. These pigmented membranes, called chromatophores, contain the photosynthetic electron transport and ATP synthesis enzymes. H. Baltcheffsky *et al.* (1966) reported that chromatophores contain a membrane-bound pyrophosphatase which is coupled reversibly to the H^+ gradient (Guillory & Fisher, 1972; Moyle *et al.*, 1972). In chemotrophically dark-grown cells, the fragments derived from the cytoplasmic membrane are enriched in respiratory chain activity (Taniguchi & Kamen, 1965; Thorne *et al.*, 1969). These membranes contain very low concentrations of bacteriochlorophyll and carotenoids. However there have been no reports of a bound pyrophosphatase in respiratory membranes.

In this work, we report the existence and characteristics of a membrane-bound pyrophosphatase activity in

respiratory membranes of *R. rubrum*, and compare this enzyme with the membrane-bound pyrophosphatase of chromatophores.

Methods

Cell cultures and membrane preparations. *Rhodospirillum rubrum* (ATCC 11170) was grown chemotrophically in the dark at 30 °C. We used 1 litre Erlenmeyer flasks, which contained 200 ml of the growth medium described by Cohen-Bazire *et al.* (1957); intense aeration was provided by gyratory shaking. Cells were harvested during the exponential phase and contained 0.3 µg bacteriochlorophyll (mg cell protein)⁻¹. The respiratory membranes were prepared as described by Fenoll & Ramírez (1984). For phototrophic growth, the cells were grown anaerobically in light from tungsten lamps (30 W) 30 cm from the flasks and at 30 °C in the same medium as above. The bacteria were harvested in the exponential growth phase and contained 25 µg bacteriochlorophyll (mg protein)⁻¹. The chromatophores were prepared by ultrasonic rupture of the cells and centrifugation as previously described (Celis *et al.*, 1985). For experiments with divalent cations, the residual Mg^{2+} was eliminated from the respiratory membranes and chromatophores by washing them with 5 mM-EDTA, pH 7.5, 5 mM-EGTA, pH 7.5, and 10 mM-Tris/HCl, pH 7.5, followed by a second washing with 10 mM-Tris/HCl, pH 7.5. Cytoplasmic pyrophosphatase of *R. rubrum* was partially purified as described by Klemme & Gest (1971).

Pyrophosphatase and ATPase activities. Hydrolysis of PP_i and ATP was determined in the dark with a Green safety light. The solutions contained: for PP_i hydrolysis, 50 mM-Tris/maleate, pH 6.5, 2.0 mM-sodium pyrophosphate and 5.0 mM- $MgCl_2$; for ATP hydrolysis, 50 mM-

Tris/acetate, pH 7.5, 3.0 mM-ATP, 5.0 mM-MgCl₂, 1.45 mM-phosphoenol pyruvate and 7 µg pyruvate kinase. The final concentration of chromatophores or respiratory membranes was 1 mg protein in 0.5 ml mixture. The temperature was 30 °C. The reaction was stopped by adding trichloroacetic acid to a final concentration of 6.0%. Phosphate was determined in the supernatant as described by Sumner (1944).

Protein and bacteriochlorophyll determinations. Protein was measured by the method of Lowry. Bacteriochlorophyll content was determined according to Clayton (1963).

Solubilization of membrane-bound pyrophosphatase. The solubilization of the pyrophosphatase of respiratory and photosynthetic membranes was done according to the procedure of Nyren *et al.* (1984) as follows: 1 ml of respiratory or photosynthetic membranes (70 mg protein ml⁻¹) was suspended in 7 ml buffer containing 50 mM-Tris/HCl, pH 8.2, 25% (v/v) ethylene glycol, 600 mM-MgCl₂, 0.2 mM-dithioerythritol and various concentrations of Triton X-100. After gentle stirring on ice for 20 min, the suspension was centrifuged at 110000 g for 2 h, and the supernatants were analysed for pyrophosphatase activity. The phospholipids were prepared as follows: L- α -lecithin from soybean, commercial grade (Sigma) was washed with acetone and ether (Kagawa & Racker, 1966) and 60 mg ml⁻¹ of washed phospholipids were suspended in 10 mM-Tris/HCl, pH 7.5, and sonicated to give a uniform suspension which was used for experiments.

Gel electrophoresis. The solubilized respiratory and photosynthetic pyrophosphatases were analysed by non-denaturing electrophoresis using the method of Davis (1964) on slab gels (1.5 mm thickness). Electrophoresis, with 10% acrylamide running gels and 4.5% stacking gel, was carried out at 4 °C in 24.8 mM-Tris, 191.8 mM-glycine buffer, pH 8.3, for 5 h at 30 mA per gel. To localize the pyrophosphatase activity, the gels were incubated for 30 min at 37 °C in 50 mM-Tris/HCl, pH 8.5, 3 mM-sodium pyrophosphate and 5 mM-MgCl₂. The gels were then washed once with water and immersed in a solution at 45 °C of 10% ascorbate and 0.42% ammonium molybdate in 0.5 M-H₂SO₄ (1:6, v/v) until blue bands showing the position of enzyme were clearly visible. Gels were rinsed quickly with distilled water, and immediately scanned at 660 nm with a Beckman DU-50 spectrophotometer gel scanner.

Antibodies. The bands with pyrophosphatase activity were excised and homogenized. Mouse antibodies were raised against these mixtures by the intramuscular injection of 0.1 ml of the preparation (7 µg protein) in 0.1 ml of Freund's complete adjuvant and a intraperitoneal injection of 0.9 ml (60 µg protein) of the mixture without adjuvant. This procedure was repeated on days 7 and 21 after the first inoculation. Bleeding was performed 7 d after the last injection and antisera were used for ELISA experiments.

Two-dimensional denaturing (sodium lauryl sulphate) polyacrylamide gel electrophoresis of the bands with pyrophosphatase activity showed a band around 56 kDa, and no contaminants were detected.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Indirect ELISA was done as described by Nakamura *et al.* (1986). ELISA immunoplates (Dynatech Immulon) were adsorbed with solubilized respiratory and photosynthetic pyrophosphatase, which reacted with the antisera. Anti-mouse antibodies conjugated with horse-radish peroxidase were then added and the colour reaction was developed with ortho-phenylenediamine and H₂O₂ as substrate and stopped with 2.5 M-H₂SO₄. Absorbance was read at 492 nm in a Bio-Rad EIA reader.

Reproducibility. The experiments shown in each Figure or Table were all repeated two or more times to confirm that the results were reproducible. Representative data are presented.

Table 1. Comparison of specific activities of pyrophosphatase (PP_iase) and ATPase in chromatophores and respiratory membranes of *Rhodospirillum rubrum*

	$\mu\text{mol P}_i \text{ h}^{-1}$ (mg protein) ⁻¹		$\mu\text{mol P}_i \text{ h}^{-1}$ (mg Bchl) ⁻¹	
	PP _i ase	ATPase	PP _i ase	ATPase
Chromatophores	6.8	2.4	119.0	42.1
Respiratory membranes	3.7	4.1	50320.0	55983.0

Results and Discussion

The pyrophosphatase and H⁺-ATPase activities of respiratory membranes and chromatophores are shown in Table 1. When the PP_i hydrolysis activity was normalized with respect to protein, the specific activity found in respiratory membranes was 30–50% of that found in chromatophores; however, when the ATPase activity was compared, the ATPase activity was higher in respiratory membranes than in chromatophores. When the specific activities for hydrolysis of PP_i and ATP were normalized with respect to bacteriochlorophyll, very high activities of both enzymes were found. This was due to the decrease in bacteriochlorophyll content in respiratory membranes. Since it is known that ATP hydrolysis is catalysed by the same enzyme in chromatophores and respiratory membranes (Melandri *et al.*, 1971) these findings strongly imply that the PP_i hydrolysis found in respiratory membranes was not due to chromatophore contamination.

Effects of inhibitors and substrate specificity of the pyrophosphatase of respiratory membranes

The pyrophosphatase and H⁺-ATPase activities in chromatophores and respiratory membranes were compared in their sensitivity to classical inhibitors of these activities. These data are shown in Table 2. M. Baltscheffsky *et al.* (1966) found that oligomycin strongly inhibits the H⁺-ATPase of chromatophores, but not the membrane-bound pyrophosphatase, which we confirmed. Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) is an inhibitor of the H⁺ channel of both mitochondrial and chromatophore H⁺-ATPases (Schmid *et al.*, 1981; Sebald & Hoppe, 1981) and also inhibits the pyrophosphatase activity (Baltscheffsky *et al.*, 1982). Table 2 shows that the H⁺-ATPase and pyrophosphatase of chromatophores and respiratory membranes were inhibited by 480 µM-DCCD. NaF is a specific inhibitor of cytoplasmic and membrane-bound pyrophosphatases (Keister & Minton, 1971a) but not H⁺-ATPase. The same was found in this work for the pyrophosphatase

Table 2. Effect of various inhibitors on the ATPase and pyrophosphatase activities of chromatophores and respiratory membranes

Conditions of measurement as in Methods.

Compound	Concentration	Inhibition (%)		
		ATPase	Pyrophosphatase	Respiratory membranes‡
Oligomycin	20 µg ml ⁻¹	85.3	1.5	4.7
DCCD	480 µM	85.0	65.1	87.4
NaF	10 mM	8.6	100.0	100.0
Imidodiphosphate	20 mM	-	80.0	74.0
Methylenediphosphate	20 mM	0.0	50.0	60.0
LiCl§	2 M	96.6	0.0	0.0¶

* 100% activity corresponds to 2.5 µmol P_i h⁻¹ (mg protein)⁻¹.† 100% activity corresponds to 6.65 µmol P_i h⁻¹ (mg protein)⁻¹.‡ 100% activity corresponds to 3.55 µmol P_i h⁻¹ (mg protein)⁻¹.

§ LiCl inhibition measurements were made as follows: 10 mg protein from respiratory membranes or chromatophores was suspended in 3 ml 100 mM-glycylglycine, pH 8.0, and 10% (w/v) sucrose, and then diluted to 50 ml at final concentration of 250 mM-glycylglycine, pH 8, and 2 M-LiCl, incubated for 10 min at 4 °C, with agitation, then centrifuged at 110000 g for 60 min. The pellets were resuspended in the initial buffer and their activities measured as in Methods.

|| 37% stimulation.

¶ 76% stimulation.

activity of respiratory membranes. Moreover, the competitive inhibitors methylenediphosphate and imidodiphosphate inhibit the membrane-bound pyrophosphatase of chromatophores (Keister & Minton, 1971b; Nyrén & Baltscheffsky, 1983) and we found that they also inhibited the pyrophosphatase of respiratory membranes. LiCl, at high concentrations (2 M) inhibits the H⁺-ATPase of chromatophores, because it releases the β-subunit from F₁ (Pilosoph *et al.*, 1977). However, although the membrane-bound pyrophosphatase of chromatophores is said to be insensitive to this compound (Guillory & Fisher, 1972), we found this enzyme was activated. The respiratory membranes pyrophosphatase activity was also activated by LiCl (Table 1). In summary, the pattern of sensitivity to inhibitors of the pyrophosphatase of respiratory membranes was the same as that found in chromatophores.

To assay the specificity of the pyrophosphatase present in respiratory membranes, α-glycerophosphate, β-glycerophosphate, D-glucose 1-phosphate, D-glucose 6-phosphate, AMP and *p*-nitrophenylphosphate were tested at 2 mM concentration (data not shown). Except for ADP, which is hydrolysed at 20% the rate of PP_i, none of these compounds were hydrolysed by the enzyme at a rate of more than 2% of the rate of PP_i. Thus, the pyrophosphatase of respiratory membranes is highly specific for PP_i as substrate.

Effect of pH and divalent cations

To compare the pyrophosphatase of respiratory membranes with the one present in chromatophores, two kinetic characteristics were studied: the pH dependence and the divalent cation requirement. The pH profile obtained for the PP_i hydrolysis in chromatophores and respiratory membranes is shown in Fig. 1. The pH optimum for chromatophores was 6.5, as reported previously (Celis & Romero, 1987). Although the pyrophosphatase activity in respiratory membranes was lower than in chromatophores, the pH optimum was the same. Moreover, the optimum pH for cytoplasmic pyrophosphatase of *R. rubrum* is 8.6–9.5 (Klemme & Gest, 1971). This comparison indicates that the pyrophosphatase activity found in respiratory membranes was not due to cytoplasmic pyrophosphatase contamination.

The membrane-bound pyrophosphatase of chromatophores, like most microbial pyrophosphatases, requires Mg²⁺ for hydrolysis (Lathi, 1983). Mg²⁺ forms a Mg-PP_i complex which is the true substrate for the enzyme (Randahl, 1979; Celis *et al.*, 1985). Recently, we reported that the Zn-PP_i complex at low concentrations is a better substrate than the Mg-PP_i complex (Celis & Romero, 1987). Fig. 2 shows the cation dependence of the pyrophosphatase of respiratory membranes. Both

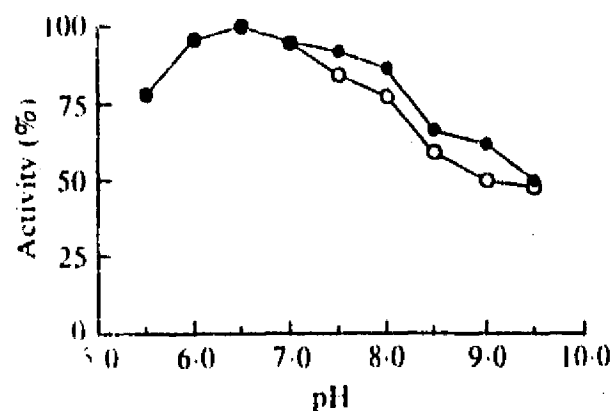


Fig. 1. pH profiles of pyrophosphatase of chromatophores and respiratory membranes. The incubation media contained 50 mM-Tris/maleate at the pH values indicated in the abscissa, 2 mM-sodium pyrophosphate, 5 mM-MgCl₂ and 1 mg of protein from chromatophores (O) or respiratory membranes (●).

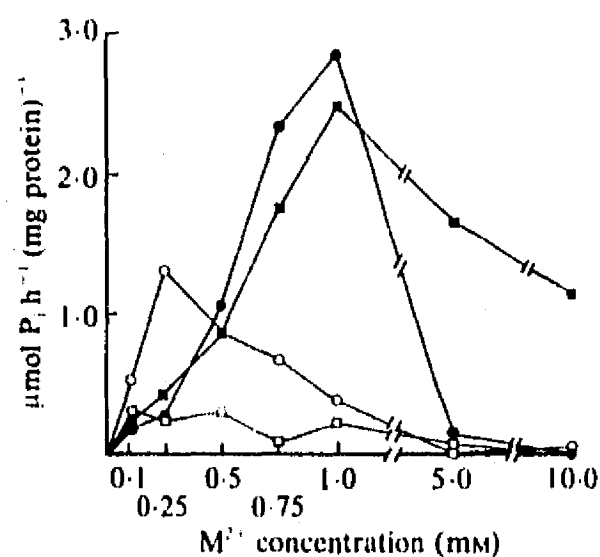


Fig. 2. Effect of divalent cations on the pyrophosphatase activity of respiratory membranes from *Rhodospirillum rubrum*. The assay medium contained: 50 mM-Tris/maleate, pH 6.5, 0.67 mM-sodium pyrophosphate and the indicated concentration of Co²⁺ (O), Ca²⁺ (□), Mg²⁺ (■) or Zn²⁺ (●).

Mg-PP_i and Zn-PP_i were good substrates for the pyrophosphatase activity, and Co-PP_i was less efficient. Very low activity was found with Ca-PP_i. At high concentrations (>1.0 mM), Zn²⁺ inhibited the activity completely and Mg²⁺ inhibited it partially. This was probably due to the presence of free Zn²⁺ and free Mg²⁺ at these high concentrations (Celis & Romero, 1987). The profile of divalent cation requirement obtained for respiratory-membrane pyrophosphatase was the same as that obtained by Celis & Romero (1987) for the membrane-bound pyrophosphatase of chromatophores.

These observations strongly suggest two points. On the one hand, the pyrophosphatase found in respiratory membranes is very similar to that of chromatophores, and may be the same enzyme. On the other hand, the pyrophosphatase is a different molecular entity from the H⁺-ATPase.

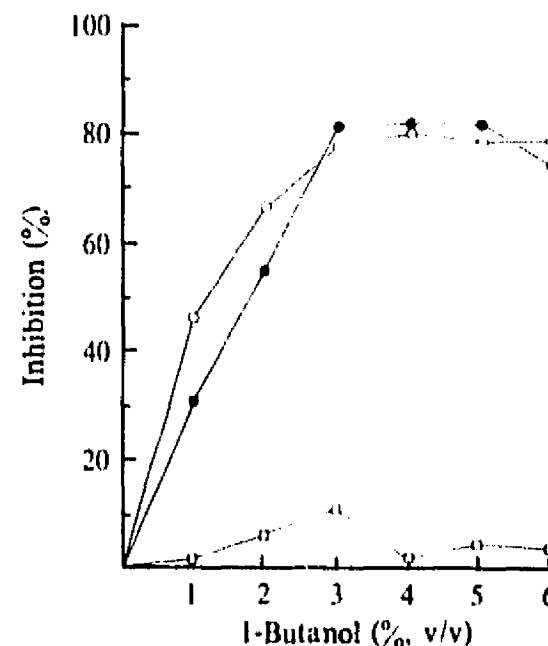


Fig. 3. Effect of 1-butanol on the activity of pyrophosphatase of chromatophores, respiratory membranes and cytoplasmic pyrophosphatase. The reaction mixture was as in Methods, and contained 50 μg protein of cytoplasmic pyrophosphatase (PP_iase) where indicated. The maximal activity values (100%) were: for chromatophores (O), 6.5 μmol P_i h⁻¹ (mg protein)⁻¹; for respiratory membranes (●), 3.4 μmol P_i h⁻¹ (mg protein)⁻¹; and for cytoplasmic PP_iase (□), 720 μmol P_i h⁻¹ (mg protein)⁻¹.

Evidence that the pyrophosphatase of respiratory membranes is a membrane-bound enzyme

M. Baltscheffsky *et al.* (1966) showed that 1-butanol is a specific inhibitor of membrane-bound pyrophosphatase of chromatophores of *R. rubrum* but inhibits neither the cytoplasmic pyrophosphatase nor H⁺-ATPase. Fig. 3 shows inhibition as a function of 1-butanol concentration. The pyrophosphatase of respiratory membranes was inhibited in the same fashion as that of chromatophores. This result further indicates that the pyrophosphatase activity of respiratory membranes was due to a membrane-bound enzyme and is not the result of cytoplasmic pyrophosphatase contamination.

To support the above suggestion, the respiratory-membrane pyrophosphatase was solubilized with different concentrations of Triton X-100 (Fig. 4). In (a), the specific activity in the supernatant is shown. When the concentration of Triton X-100 was increased, enzyme was liberated from the membrane. Moreover, the specific activity was enhanced when soybean phospholipids were added to the measurement reaction mixture. More than 80% of the initial activity of the membrane was released with Triton X-100 (Fig. 4b). Other treatments, such as exposure to high ionic strength or washings with chelators, did not release the enzyme (data not shown).

In summary, the respiratory-membrane pyrophosphatase is an integral membrane protein according to the criteria of Singer & Nicolson (1972). This conclusion is

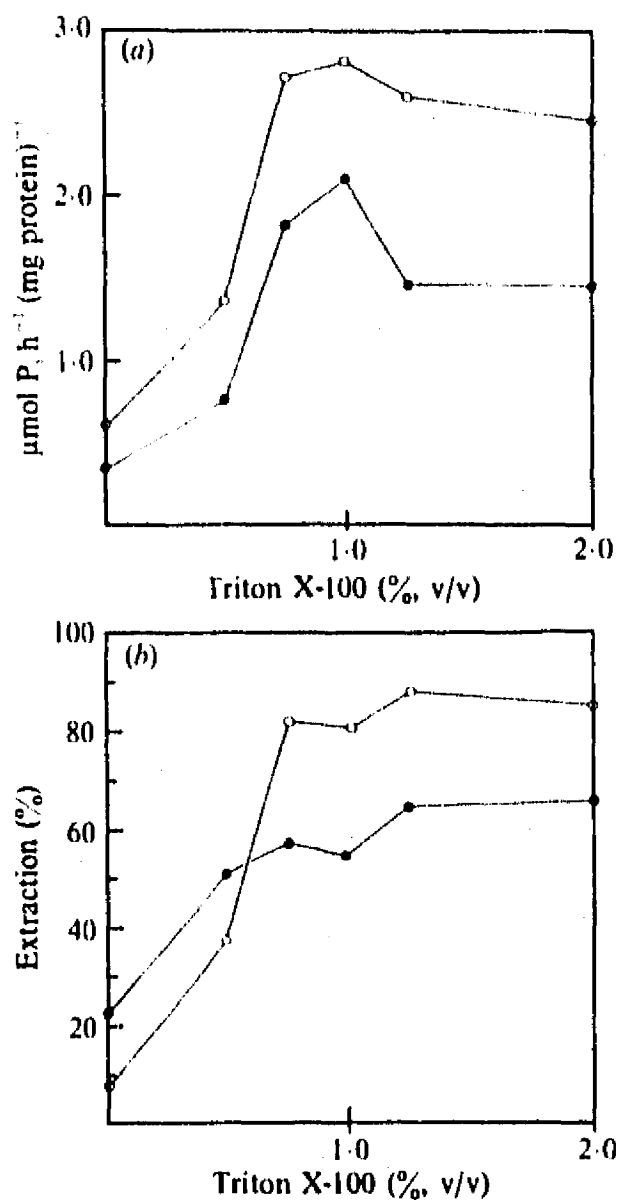


Fig. 4. Solubilization of the membrane-bound pyrophosphatase from respiratory membranes with Triton X-100. The solubilization was done as indicated in Methods. (a) The supernatant fractions were analysed for pyrophosphatase activity as in Fig. 1 at pH 6.5. The final concentration of supernatant protein in the assay tubes was 3 mg. The activity was measured with (O) and without (●) phospholipids. (b) Percentage extraction, expressed on the basis of activity (with phospholipids, O) and protein (●).

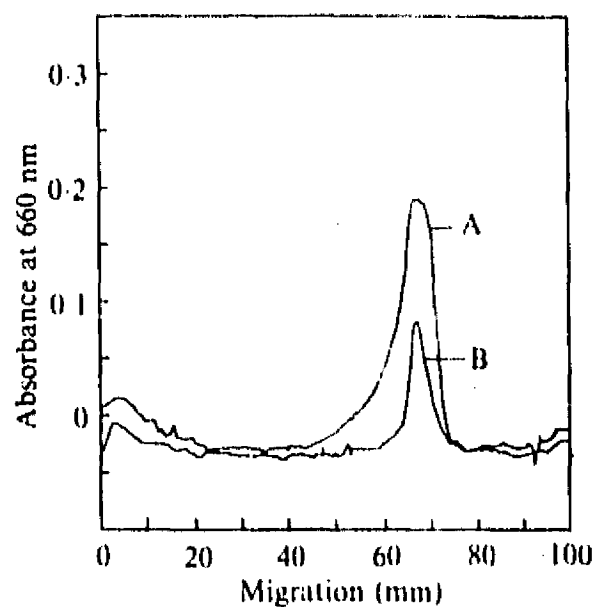


Fig. 5. Densitometric trace of non-denaturing polyacrylamide gel after electrophoresis of solubilized membrane-bound pyrophosphatases. Triton X-100 solubilized photosynthetic (a) and respiratory-membrane-bound (b) pyrophosphatases were run and the gels were stained for hydrolytic activity as stated in Methods.

supported by the following facts: the respiratory-membrane pyrophosphatase was inhibited by 1-butanol, which inhibits only the membrane-bound pyrophosphatase (M. Baltscheffsky *et al.*, 1966) (Fig. 3), and the enzyme activity was released from the membrane by treatment with Triton X-100 and requires phospholipids for maximal activity.

Structural similarities between membrane-bound pyrophosphatases of respiratory and photosynthetic membranes

To determine the structural similarities between the two membrane-bound pyrophosphatases, an electrophoretic analysis of the activities was performed (Fig. 5). A

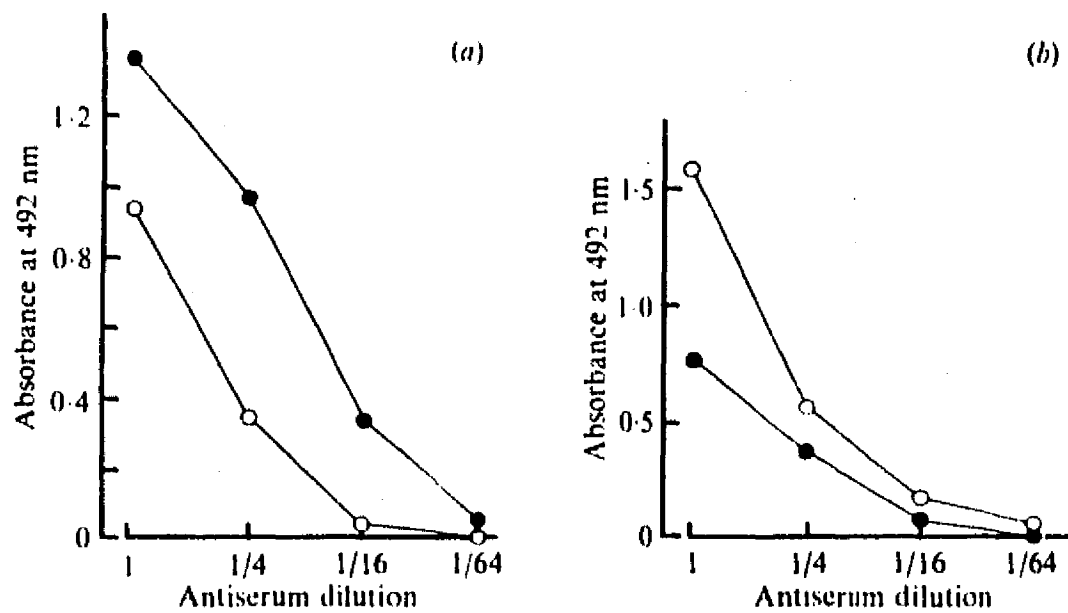


Fig. 6. Cross-reactivity of antibodies raised against photosynthetic and respiratory membrane-bound pyrophosphatases. In panel (a), solubilized photosynthetic membrane-bound pyrophosphatase (640 μg protein per well) was used as the basis for the indirect ELISA assay. In panel (b), solubilized membrane-bound pyrophosphatase from respiratory membranes (640 μg protein per well) was used as the basis for the assay. Antisera vs photosynthetic membrane-bound pyrophosphatase (●); antisera vs respiratory membrane-bound pyrophosphatase (O).

single band for both enzymes migrated to the same position, suggesting the same overall charge. Furthermore, the cross reactivity of mouse antibodies to the two proteins was tested by ELISA, using membrane-bound pyrophosphatase of photosynthetic membranes as base for antibody union assay (Fig. 6a) or membrane-bound pyrophosphatase from respiratory membranes (Fig. 6b). The binding was higher for the homologous antigen and antibody in each case, but the heterologous antibodies bound efficiently to the heterologous antigen, indicating structural similarities between the two enzymes.

The collected results suggest that membrane-bound pyrophosphatase is the same molecular entity in both photosynthetic and respiratory growing cells. The findings constitute the first evidence of the existence of a membrane-bound pyrophosphatase in respiratory membranes of the photosynthetic bacterium *R. rubrum*.

We thank Juan Quinto for his help with the initial experiments of this work. This work was partially supported by grant D111-903553 from CONACyT, Mexico.

References

- BALTSCHIEFFSKY, H., VON STEDINGK, L. V., HELDT, H. W. & KLINGENBERG, M. (1966). Inorganic pyrophosphate: formation in bacterial photophosphorylation. *Science* **153**, 1120-1124.
- BALTSCHIEFFSKY, M., BALTSCHIEFFSKY, H. & VON STEDINGK, L. V. (1966). Light-induced energy conversion and the inorganic pyrophosphatase reaction in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Brookhaven Symposia in Biology* **19**, 246-257.
- BALTSCHIEFFSKY, M., BALTSCHIEFFSKY, H. & BOORK, J. (1982). Evolutionary and mechanistic aspects on coupling and phosphorylation in photosynthetic bacteria. In *Electron Transport and Photophosphorylation. Topics in Photosynthesis*, vol. 4, 249-272. Edited by J. Barber. New York: Elsevier Biomedical Press.
- CELIS, H., ROMERO, I. & GÓMEZ-PUYOU, A. (1985). The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: effects of Mg^{2+} , phosphate and pyrophosphate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **236**, 766-774.
- CELIS, H. & ROMERO, I. (1987). The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: effects of pH and divalent cations. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **19**, 255-272.
- CLAYTON, R. K. (1963). Toward the isolation of a photochemical reaction center in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta* **75**, 312-323.
- COHEN-BAZIRE, G., SISTROM, W. B. & STANIER, R. Y. (1957). The kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **49**, 25-68.
- DAVIS, B. J. (1964). Disc electrophoresis. II. Methods and application to serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **121**, 404-427.
- FENOLL, C. & RAMÍREZ, J. M. (1984). Simultaneous presence of two terminal oxidases in the respiratory system of dark aerobically grown *Rhodospirillum rubrum*. *Archives of Microbiology* **137**, 42-46.
- GUILLORY, R. J. & FISHER, R. R. (1972). Studies on the light-dependent synthesis of inorganic pyrophosphate by *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochemical Journal* **129**, 471-481.
- KAGAWA, Y. & RACKER, E. (1966). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. IX. Reconstitution of oligomycin-sensitive triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* **241**, 2467-2474.
- KEISTER, D. L. & MINTON, N. J. (1971a). ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **42**, 932-939.
- KEISTER, D. L. & MINTON, N. J. (1971b). Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. VI. Inorganic pyrophosphate-driven ATP synthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **147**, 330-338.
- KLEMMER, J. H. & GEST, H. (1971). Regulation of the cytoplasmic inorganic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *European Journal of Biochemistry* **22**, 529-537.
- LATHI, R. (1983). Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiological Reviews* **47**, 169-179.
- MELANDRI, B. A., BACCARINI-MELANDRI, A., SAN PIETRO, A. & GEST, H. (1971). Interchangeability of phosphorylation coupling factors in photosynthetic and respiratory energy conversion. *Science* **174**, 514-516.
- MOYLE, J., MITCHELL, R. & MITCHELL, P. (1972). Proton-translocating pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Letters* **23**, 233-236.
- NAKAMURA, R. M., VOLLER, A. & BIDWELL, D. E. (1986). Enzyme immunoassays: heterogeneous and homogeneous systems. In *Handbook of Experimental Immunology*, vol. 1, pp. 27.1-27.20. Edited by D. M. Weir. Great Britain: Blackwell Scientific Publications.
- NYRÉN, P. & BALTSCHIEFFSKY, M. (1983). Inorganic pyrophosphate-driven ATP-synthesis in liposomes containing membrane-bound inorganic pyrophosphatase and F_0-F_1 complex from *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Letters* **155**, 125-130.
- NYRÉN, P., HAJNAL, K. & BALTSCHIEFFSKY, M. (1984). Purification of the membrane-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase from *R. rubrum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **766**, 630-635.
- PILOSOPH, S., BINDER, A. & GROMET-ELHANAN, Z. (1977). Coupling factor ATPase complex of *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 8747-8752.
- RANDAHL, H. (1979). Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in *Rhodospirillum rubrum*. *European Journal of Biochemistry* **102**, 251-256.
- SCHMID, R., KILTZ, H. H., SCHNEIDER, F. & ALTENDORF, K. (1981). Characterization of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive protein from *Rhodospirillum rubrum* grown in the light and in the dark. *FEBS Letters* **125**, 97-100.
- SEBALD, W. & HOPPE, J. (1981). On the structure and genetics of the proteolipid subunit of the ATP synthase complex. *Current Topics in Bioenergetics* **12**, 1-64.
- SINGER, S. J. & NICOLSON, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.
- SUMNER, J. B. (1944). A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* **100**, 413-415.
- TANIGUCHI, S. & KAMEN, M. D. (1965). The oxidase system of heterotrophically grown *Rhodospirillum rubrum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **95**, 395-428.
- THORNE, A., KEISTER, D. L. & SAN PIETRO, A. (1969). Studies on the respiratory system of aerobically (dark) and anaerobically (light) grown *Rhodospirillum rubrum*. *Archives of Microbiology* **67**, 378-396.

Mg²⁺ is an essential activator of hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*

Alejandro SOSA, Héctor ORDAZ, Irma ROMERO and Heliodoro CELIS*

Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F. México

The substrate for the hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase is the PP_i-Mg²⁺ complex. The enzyme has no activity when the free Mg²⁺ concentration is lower than 10 μM (at 0.5 mM-PP_i-Mg²⁺), and therefore free Mg²⁺ is an essential activator of the hydrolytic activity. The K_m for the substrate changes in response to variation in free Mg²⁺ concentration, from 10.25 to 0.6 mM when free Mg²⁺ is increased from 0.03 to 1.0 mM respectively. The K_m for Mg²⁺ depends on the substrate concentration: the K_m decreases from 0.52 to 0.14 mM from 0.25 to 0.75 mM-PP_i-Mg²⁺ respectively. The extrapolated K_m for Mg²⁺ in the absence of the substrate is 0.73 mM. Imidodiphosphate-Mg²⁺ and free Ca²⁺ were used as competitive inhibitors of substrate and activator respectively. The equilibrium binding kinetics suggest an ordered mechanism for the activator and the substrate: Mg²⁺ ions bind the enzyme before PP_i-Mg²⁺ in the formation of the catalytic complex, membrane-bound pyrophosphatase-(Mg²⁺)-(PP_i-Mg²⁺).

INTRODUCTION

Membrane-bound pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) of *Rhodospirillum rubrum* chromatophores catalyses not only the hydrolysis of pyrophosphate but also the synthesis of pyrophosphate with energy derived from photosynthetic electron transport (Baltseffsky, 1978; Baccarini-Melandri & Melandri, 1978). Pyrophosphate hydrolysis in the chromatophore membrane is linked to the electrogenic translocation of protons in a fully reversible process (Baltseffsky, 1968; Keister & Minton, 1971; Moyle *et al.*, 1972).

Most inorganic pyrophosphatases, both cytoplasmic and membrane-bound, use the PP_i-Mg²⁺ complex as the real substrate for hydrolysis; free PP_i is an inhibitor of this reaction (Lathi, 1983).

Randahl (1979) suggested that Mg²⁺ ions modulate the properties of the enzyme. Indeed, it has been shown (Celis *et al.*, 1985) that P_i/PP_i exchange reaction and pyrophosphate hydrolysis catalysed by membrane-bound pyrophosphatase have sharply different requirements for Mg²⁺ ions. In the same way, Celis & Romero (1987) have demonstrated that the two reactions have a markedly different pH requirement.

Studies on the effect of bivalent cations on the hydrolytic reaction and P_i/PP_i exchange (Celis & Romero, 1987) show that Mn²⁺ and Co²⁺ partially support the P_i/PP_i exchange reaction (50%), whereas bivalent cations such as Zn²⁺ and Ca²⁺ do not. In the hydrolytic reaction, Zn²⁺ at low concentration can replace Mg²⁺ in the formation of the substrate. In the presence of high concentrations of substrate for the hydrolysis (PP_i-Mg²⁺), free bivalent cations are inhibitory.

These sets of observations suggest that bivalent cations and protons regulate the catalytic properties of membrane-bound pyrophosphatase. However, it is difficult to determine the regulatory effect of free Mg²⁺ on hydrolytic activity because, as has been stated, it also forms the substrate complex. The regulatory properties and kinetics of Mg²⁺ activation of cytoplasmic pyrophosphatase have been studied previously (Klemme & Gest, 1971; Moe & Butler, 1972a; Barry & Dunaway-Mariano, 1987). However, to our knowledge, these properties have not been studied for a membrane-bound pyrophosphatase. Since this

pyrophosphatase is coupled to the proton gradient, whereas the cytoplasmic enzyme is not, the study of the regulation of the membrane-bound enzyme is important for the understanding of the mechanism of energy transduction. In the present work, the role of free Mg²⁺ as an essential activator of the hydrolytic reaction of membrane-bound pyrophosphatase was studied. An ordered mechanism for the hydrolytic activity of the enzyme is suggested in which Mg²⁺ binds to the enzyme before PP_i-Mg²⁺ in the formation of the catalytic complex.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial growth and preparation of chromatophores from wild-type *R. rubrum*

Wild-type *R. rubrum* A.T.C.C. 11170 was grown anaerobically in the light (tungsten lamps of 40 W at 30 cm) at 30 °C in a medium described by Cohen-Bazire *et al.* (1957). Bacterial cells were harvested in the late-exponential phase.

The cells were washed with 50 mM-KCl/50 mM-Mops buffer, pH 7.5, and chromatophores were prepared by sonication for 2 min in an MSE sonicator at full power, in 10 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.5. After centrifugation at 26000 g for 20 min, the supernatant was collected and centrifuged at 105000 g for 90 min. The residual Mg²⁺ was eliminated from the chromatophores by washing with 5 mM-EDTA/5 mM-EGTA/10 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.5, followed by a second washing with 10 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.5. The final pellet was resuspended in 10 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.5, at a protein concentration of 30–35 mg/ml. The chromatophore preparation was kept at 4 °C and used within the next 3 days. No change in the hydrolytic activity was detected within this time. Protein was determined by the method of Lowry *et al.* (1951), with BSA as standard.

Hydrolysis of pyrophosphate

The hydrolytic reaction was determined in the dark with a green safety light under the conditions described in the Results and discussion section. The reactions were initiated by adding the chromatophores to the reaction medium, and were arrested with 6% (w/v) trichloroacetic acid (final concentration). Phosphate was determined in the supernatant as described by

* To whom correspondence should be addressed.

Fiske & SubbaRow (1925) In the initial-velocity studies, the maximum amount of PP_i - Mg^{2+} complex hydrolysed was only 15% in 1.5 min; in this period the product formation (phosphate) had no effect on the hydrolytic velocity. Initial velocities are defined as nmol of P_i produced/min per mg of protein.

Calculation of free metal ions, ligands and complex

Concentrations of metal ion complex and free ions in the reaction media were calculated with the computer program of Fabiato (1988), using published association constants for all components of the reaction media. All values were taken from Martell & Sillén (1971) except for the association constant for the formation of the Mg^{2+} -EDTA complex, which was taken from Fabiato (1988). In the computations, adjusted values of the association constants suitable to temperature and pH of reaction media were used. The program was run in an IBM AT computer with an arithmetic co-processor.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of free Mg^{2+} on the hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase

The substrate for the hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase is the PP_i - Mg^{2+} complex, and free Mg^{2+} has an apparent activating effect (Randahl, 1979; Celis *et al.*, 1985; Celis & Romero, 1987). In order to investigate the effect of free Mg^{2+} on the hydrolytic activity, free Mg^{2+} concentration was increased from 0.01 μ M to 1.0 mM, keeping PP_i - Mg^{2+} constant at 0.5 mM (Fig. 1). It can be observed that the hydrolytic activity depends strictly on free Mg^{2+} concentration; the apparent K_m for Mg^{2+} ($K_{Mg^{2+}(app.)}$) is 0.28 mM. No PP_i - Mg^{2+} hydrolysis occurs when free Mg^{2+} concentration is lower than 10 μ M. Therefore Mg^{2+} could serve as an essential activator for the hydrolytic activity of the membrane-bound pyrophosphatase, given the Mg^{2+} requirement for substrate recognition by the enzyme.

Effect of free Mg^{2+} on PP_i - Mg^{2+} hydrolysis

In order to determine the effect of free Mg^{2+} on the hydrolytic activity, free Mg^{2+} was fixed at four different concentrations, and for each case the concentration of PP_i - Mg^{2+} was varied (Fig. 2a). An increase in free Mg^{2+} produced an enhanced hydrolytic activity, but hydrolysis depended on substrate concentration in a saturable manner; this is in agreement with the report by

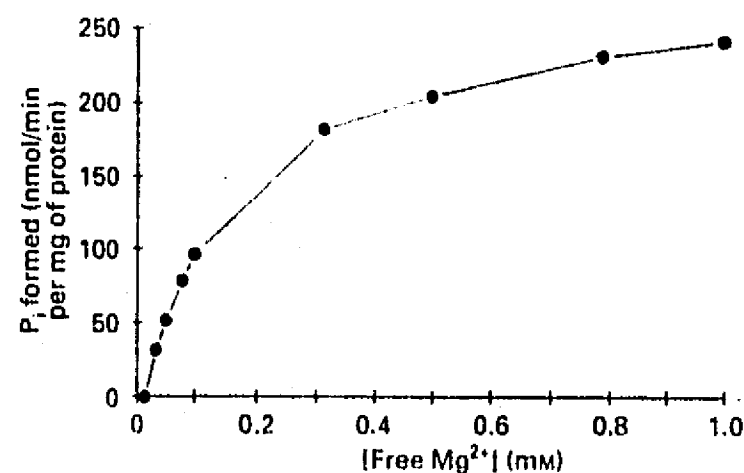


Fig. 1. Effect of free Mg^{2+} on the hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase

The necessary concentrations of sodium pyrophosphate and $MgCl_2$ were calculated to maintain the PP_i - Mg^{2+} concentration at 0.5 mM and the indicated free Mg^{2+} concentration in presence of 1.0 mM-EDTA. The incubation medium contained 50 mM-Tris/maleate buffer, pH 6.5, and 1 mg of chromatophore protein. Incubation time was 1.5 min.

Schwarm *et al.* (1986) working with the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospseudomonas palustris*. The data shown in Fig. 2(a) were replotted as Lineweaver-Burk plots. A small change in V_{max} was obtained (515 to 482 nmol of P_i /min per mg of protein at fixed Mg^{2+} concentrations of 0.03 to 1.0 mM respectively). When the free Mg^{2+} concentration was raised, the apparent K_m for PP_i - Mg^{2+} ($K_{PP_i-Mg^{2+}(app.)}$) decreased. The calculated K_m values were 10.25, 2.92, 0.84 and 0.6 mM at free Mg^{2+} concentrations of 0.03, 0.1, 0.5 and 1 mM respectively. Fig. 2(c) shows a linear relationship between the apparent K_m for PP_i - Mg^{2+} obtained from Fig. 2(b) and the reciprocal fixed free Mg^{2+} concentration. The intercept on the ordinate axis (0.17 mM) gives the K_m for PP_i - Mg^{2+} at saturating concentrations of free Mg^{2+} . This is in agreement with the role of free Mg^{2+} as an essential activator for PP_i - Mg^{2+} hydrolysis.

Free Mg^{2+} activation and its dependence on PP_i - Mg^{2+} concentration

The effect of various free Mg^{2+} concentrations was studied at three concentrations of PP_i - Mg^{2+} (Fig. 3a). The increase in hydrolytic activity depended on free Mg^{2+} , but the hydrolytic activity also increased as the concentration of PP_i - Mg^{2+} increased. The calculated V_{max} values were 270.6, 362.9 and 367.3 nmol of P_i /min per mg of protein at 0.25 mM-, 0.5 mM- and 0.75 mM- PP_i - Mg^{2+} respectively. The apparent K_m for Mg^{2+} decreased as PP_i - Mg^{2+} concentration increased; the $K_{Mg^{2+}(app.)}$ was 0.51, 0.28 and 0.12 mM for PP_i - Mg^{2+} at 0.25, 0.5 and 0.75 mM respectively. The K_m for Mg^{2+} in the absence of substrate was calculated by interpolation of the intersection point to the abscissa, and a value of 0.73 mM was obtained.

Segel (1975) has described rapid-equilibrium analysis between an essential activator and a substrate, and we have applied this approach to determine the type of mechanism. If the activator concentration is fixed and that of the substrate is varied giving rise to a competitive pattern, and if the substrate concentration is fixed and that of the activator is varied giving rise to a mixed type in the double-reciprocal plot (Figs. 2b and 3b), these patterns are characteristic of an obligated ordered mechanism for the binding of free Mg^{2+} and PP_i - Mg^{2+} , in which Mg^{2+} binds to the enzyme before PP_i - Mg^{2+} . This mechanism contrasts with the pattern described for the yeast cytoplasmic pyrophosphatase, in which the substrate binds to the enzyme before Mg^{2+} ions (Knight *et al.*, 1981).

Imidodiphosphate- Mg^{2+} and free Ca^{2+} as competitive inhibitors of PP_i - Mg^{2+} hydrolysis and activation by free Mg^{2+}

In order to substantiate the ordered mechanism in the formation of the catalytic complex, an imidodiphosphate- Mg^{2+} complex was used as a competitive inhibitor of PP_i - Mg^{2+} hydrolysis. In addition, the effect of Ca^{2+} ions was studied on the activator effect of free Mg^{2+} . The cross-inhibitory patterns (imidodiphosphate- Mg^{2+} versus free Mg^{2+} and free Ca^{2+} versus PP_i - Mg^{2+}) were analysed to clarify whether the binding of PP_i - Mg^{2+} and free Mg^{2+} is ordered or random and whether it is in rapid equilibrium or in a steady state (Segel, 1975; Morrison, 1979).

Imidodiphosphate has been reported to inhibit the cytoplasmic pyrophosphatase of yeast (Kelly *et al.*, 1973). The effect of imidodiphosphate- Mg^{2+} on the hydrolytic activity was analysed by fixing its concentration at 0.5 mM and 1.0 mM while that of the PP_i - Mg^{2+} was varied at fixed free Mg^{2+} concentration (1.0 mM). Fig. 4(a) shows imidodiphosphate- Mg^{2+} as a competitive inhibitor of PP_i - Mg^{2+} hydrolysis, since the K_m for PP_i - Mg^{2+} increased from 0.68 mM to 2.44 mM, whereas V_{max} did not change (331 nmol of P_i /min per mg of protein). These data clearly

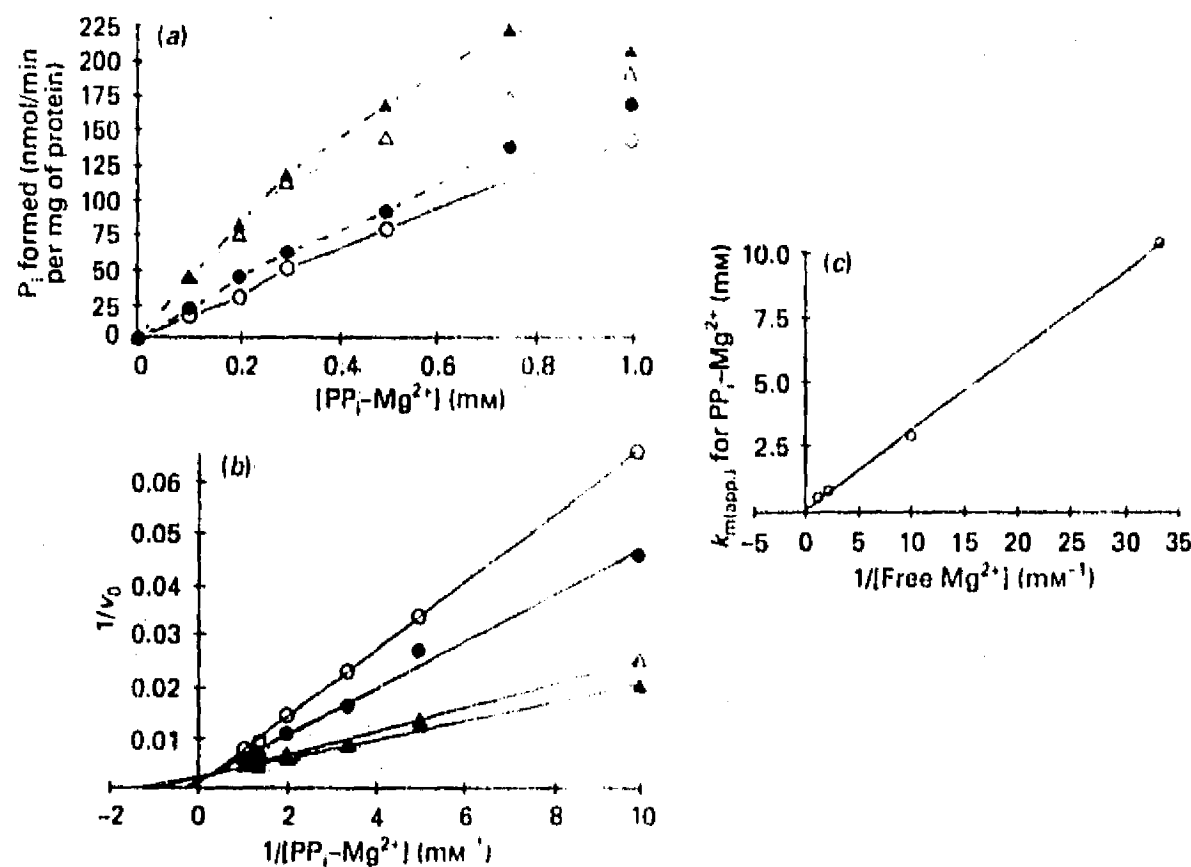


Fig. 2. Effect of free Mg²⁺ ions on the hydrolysis of the PP_i-Mg²⁺ complex

(a) The experimental conditions were as in Fig. 1, but the concentrations of sodium pyrophosphate and MgCl₂ were calculated to have four different concentrations of free Mg²⁺: 0.03 mM (O), 0.1 mM (●), 0.5 mM (Δ) and 1.0 mM (▲). The apparent K_m for the substrate obtained in (b) was replotted in (c)

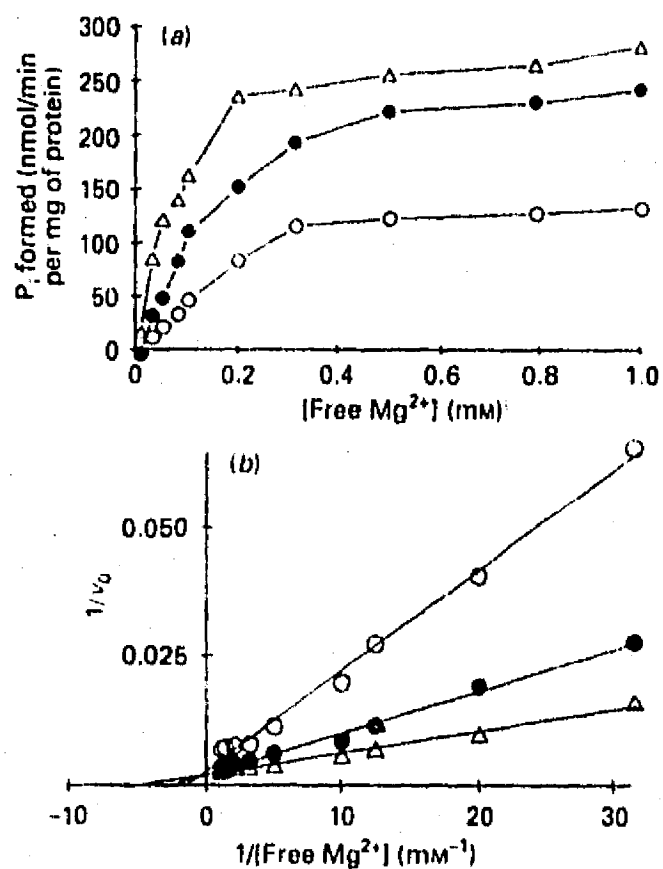


Fig. 3. Dependence of PP_i-Mg²⁺ concentration on the activation of free Mg²⁺

(a) The experimental conditions were as in Fig. 1. The concentrations of sodium pyrophosphate and MgCl₂ were calculated to give three fixed concentrations of PP_i-Mg²⁺: 0.25 mM (O), 0.5 mM (●) and 0.75 mM (Δ). (b) Lineweaver-Burk plot of the results from (a)

indicate that imidodiphosphate-Mg²⁺ competes with PP_i-Mg²⁺ for binding to the enzyme-Mg²⁺ complex.

Ca²⁺ is an inhibitor of several types of pyrophosphatase (Baykov *et al.*, 1989; Moe & Butler, 1972b). The effect of free Ca²⁺ on PP_i-Mg²⁺ hydrolysis was analysed by using fixed free Ca²⁺ concentrations while that of free Mg²⁺ was varied and

PP_i-Mg²⁺ was kept at 0.5 mM (Fig. 4b). Lineweaver-Burk analysis shows that free Ca²⁺ acts as a competitive inhibitor of Mg²⁺ activation, since the K_m for Mg²⁺ increased 7-fold, from 0.25 to 1.71 mM, whereas the V_{max} did not change (237 nmol of P_i/min per mg of protein). Free Ca²⁺ binds to the enzyme to form an enzyme-Ca²⁺ complex, competing with free Mg²⁺ binding. The PP_i-Ca²⁺ complex was present in the reaction medium at concentrations ranging from 0.77 mM to 0.007 mM when free Ca²⁺ was fixed at 0.05 mM, and from 0.15 mM to 0.015 mM when free Ca²⁺ was fixed with 0.1 mM. Since a clearly competitive effect of free Ca²⁺ for the activation of free Mg²⁺ is observed, and a mixed-type inhibition is not present, an effect of PP_i-Ca²⁺ on the enzyme can be ruled out.

To complete the analysis, the effect of imidodiphosphate-Mg²⁺ on Mg²⁺ activation and free Ca²⁺ on the substrate was studied. Imidodiphosphate-Mg²⁺ concentration was fixed at 0.1 and 0.15 mM and free Mg²⁺ concentration was varied (at PP_i-Mg²⁺ 0.5 mM). Fig. 4(c) shows a change in K_m from 0.23 to 0.074 mM and a decrease in V_{max} (201 to 150 nmol of P_i/min per mg of protein) showing uncompetitive inhibition. This inhibition pattern is in agreement with rapid equilibrium for the ordered mechanism, indicating that PP_i-Mg²⁺ binds to the enzyme after free Mg²⁺.

Free Ca²⁺ concentration was fixed at 0.05 and 0.1 mM while that of the substrate was varied (with free Mg²⁺ fixed at 1.0 mM). The inhibition pattern again is uncompetitive (Fig. 4a). The K_{PP_i-Mg²⁺} decrease changed from 0.73 to 0.19 and the V_{max} also decreased from 433 to 118 nmol of P_i/min per mg of protein. These data are not consistent with the predicted inhibition pattern (Table 1); they indicate that free Ca²⁺ binds to the enzyme-substrate complex, but that the PP_i-Ca²⁺ is formed in the reaction medium at a concentration 70 times lower than the substrate at a free Ca²⁺ concentration of 0.05 mM, and 33 times lower than that of PP_i-Mg²⁺ at a free Ca²⁺ concentration of 0.1 mM. For this reason binding constants relevant for Ca²⁺ inhibition in the presence of PP_i-Ca²⁺ are difficult to analyse (Baykov *et al.*, 1989).

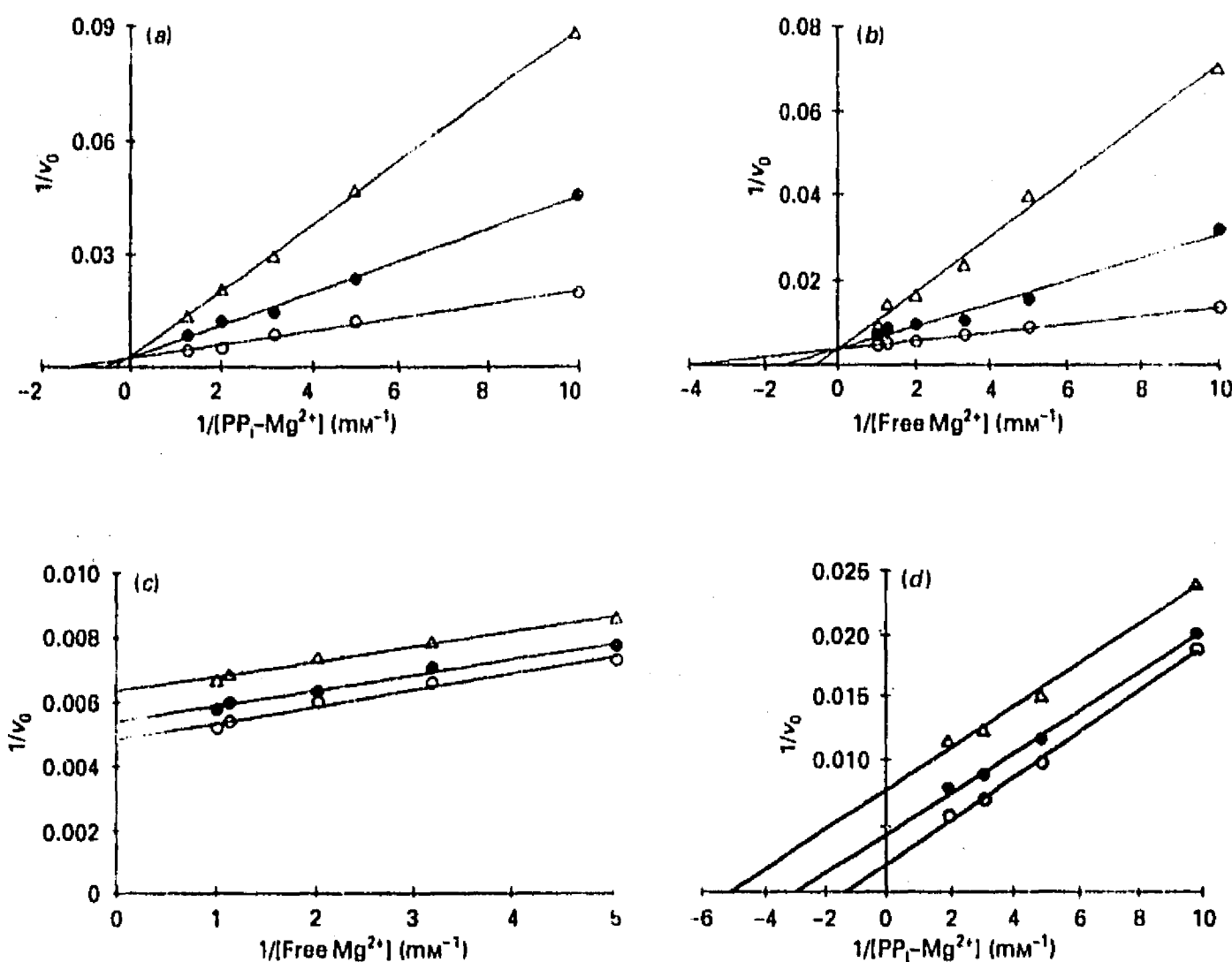


Fig. 4. Inhibition patterns for imidodiphosphate-Mg²⁺ and free Ca²⁺ as inhibitors for the substrate and the activator effect of free Mg²⁺

The experimental conditions were as in Fig. 1. (a) Lineweaver-Burk plot of initial velocity versus [PP_i-Mg²⁺] at imidodiphosphate-Mg²⁺ concentrations of 0 mM (○), 0.5 mM (●) and 1.0 mM (△). (b) Lineweaver-Burk plot of initial velocity versus free Mg²⁺ at free Ca²⁺ concentrations of 0 mM (○), 0.05 mM (●) and 0.1 mM (△). (c) Lineweaver-Burk plot of initial velocity versus [free Mg²⁺] at imidodiphosphate-Mg²⁺ concentrations of 0 mM (○), 0.1 mM (●) and 0.15 mM (△). (d) Lineweaver-Burk plot of initial velocity versus [PP_i-Mg²⁺] at free Ca²⁺ concentrations of 0 mM (○), 0.05 mM (●) and 0.1 mM (△).

Table 1. Predicted and observed inhibition patterns from the data of Fig. 4

Types of inhibition: competitive (C), uncompetitive (UC) and non-competitive (NC).

Substrate whose concentration was varied	Inhibitor	Observed inhibition pattern	Predicted inhibition patterns			
			Rapid equilibrium random	Steady-state random	Rapid equilibrium ordered	Steady-state ordered
PP _i -Mg ²⁺	Imidodiphosphate-Mg ²⁺	C	C	C	C	C
Mg ²⁺	Ca ²⁺	C	C	C	C	C
PP _i -Mg ²⁺	Ca ²⁺	UC	C	NC	C	UC
Mg ²⁺	Imidodiphosphate-Mg ²⁺	UC	C	NC	UC	NC

Effect of free PP_i on hydrolytic activity

Free PP_i is present in the reaction medium, and it is an inhibitor of pyrophosphatases (Ridlington & Butler, 1972; Lathi, 1983). The concentration of free PP_i was fixed at 0.03, 0.1, 1.0 and 5.0 mM, and that of PP_i-Mg²⁺ was varied for each case (Fig. 5a). An increase in free PP_i has an apparent inhibitory effect on the hydrolytic activity. When free PP_i concentration was kept constant and that of PP_i-Mg²⁺ was varied, there was a decrease in free Mg²⁺ concentration in a constant ratio described by eqn.

$$(1): \quad K_{PP_i, Mg^{2+}} = \frac{[Mg][PP_i]}{[PP_i-Mg^{2+}]} \quad K_{PP_i, Mg^{2+}} = \frac{[Mg^{2+}]}{[PP_i-Mg^{2+}]} \quad (1)$$

There were no apparent inhibitory effects at 0.03 and 0.1 mM-

PP_i, but the corresponding free Mg²⁺ concentrations were enough for the enzyme to recognize the substrate ($K_{Mg^{2+}}$ at 0.75 mM substrate is 0.12 mM). At 1.0 and 5.0 mM free PP_i, the corresponding concentrations of free Mg²⁺ were at the lower limit for substrate recognition by the enzyme (Table 2). Although there was a high concentration of free PP_i (5.0 mM), the enzyme activity increased in response to variations in substrate concentration. Therefore free PP_i seems to be a weak inhibitor. Since free Mg²⁺ is essential for hydrolytic activity, its decrement produces an inhibitory effect.

The inverse of PP_i-Mg²⁺ concentrations from Fig. 5(a) were squared, and a modified Lineweaver-Burk plot was obtained (Fig. 5b). The latter data indicate an apparent non-competitive inhibition. This effect is not consistent with the previously

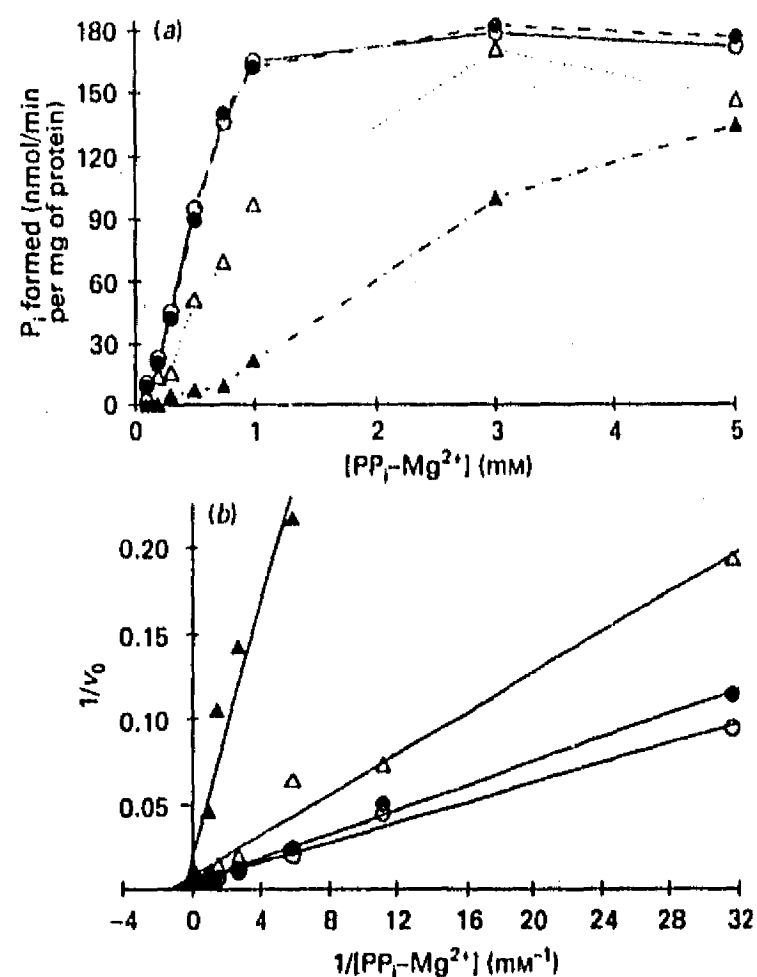


Fig. 5. Effect of the free PP_i on the hydrolytic activity

The experimental conditions were as in Fig. 1. (a) Concentrations of sodium pyrophosphate and MgCl₂ were calculated to give four concentrations of free PP_i: 0.1 mM (○), 0.5 mM (●), 1.0 mM (△) and 5.0 mM (▲). (b) Double-reciprocal plots of the results from (a).

Table 2. Decrease in Mg²⁺ concentration in the experiment of Fig. 5(a)

Constant PP _i (mM)	Variation in PP _i -Mg ²⁺ (mM)	$C = \frac{[Mg^{2+}]}{[PP_i-Mg^{2+}]}$	Variation in free Mg ²⁺ (mM)
0.03	0.1 to 5.0	3.3×10^{-2}	0.003 to 0.165
0.1	0.1 to 5.0	1×10^{-2}	0.001 to 0.05
1.0	0.1 to 5.0	1×10^{-3}	0.0001 to 0.005
5.0	0.1 to 5.0	2×10^{-4}	0.00002 to 0.001

reported competitive inhibition for other pyrophosphatases (Josse, 1966). The observed inhibition is probably due to a decrease in Mg²⁺ concentration, although an additional inhibitory effect by free PP_i cannot be ruled out.

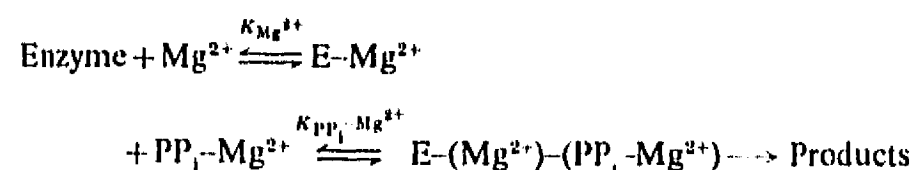
CONCLUSION

Free Mg²⁺ is an essential activator for the hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of *R. rubrum*. The catalytic complex is enzyme-(Mg²⁺)-(PP_i-Mg²⁺). The binding of Mg²⁺ modifies the enzyme's affinity for the substrate; a similar effect was described from cytoplasmic pyrophosphatase of yeast (Knight *et al.*, 1981) and for cytosolic and mitochondrial pyrophosphatase (Unguryte *et al.*, 1989). In the above-mentioned pyrophosphatases, three bivalent cations per active site are required for activity (Cooperman, 1982; Unguryte *et al.*, 1989). One of these metal ions binds to PP_i to form the substrate. For *R. rubrum*, the number of Mg²⁺ ions that bind to the enzyme is not known.

The binding of the substrate (PP_i-Mg²⁺) produces an increase in free Mg²⁺ affinity for the enzyme (Fig. 3a). The K_m for Mg²⁺

is 0.73 mM in the absence of substrate. The rapid-equilibrium treatment between the essential activator and the substrate suggests an ordered mechanism in which free Mg²⁺ binds to the enzyme before the substrate. For the cytoplasmic pyrophosphatase of yeast, Barry & Dunaway-Mariano (1987) proposed an ordered mechanism in which the substrate binds to the enzyme before Mg²⁺. In the case of slow substrates such as Cr(H₂O)PP_i, the binding steps are in rapid equilibrium, whereas for PP_i-Mg²⁺, the binding steps are in a steady state. In contrast, in *R. rubrum*, when PP_i-Mg²⁺ is used as the substrate, the binding steps are in rapid equilibrium. Studies of competitive inhibition suggest an ordered mechanism which may be rapid equilibrium or steady state. Formulation of a complete model should be the goal of future research.

The proposed model for rapid-equilibrium kinetics for the hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of *R. rubrum* is:



In a different way from Randahl's (1979) model, the enzyme-(PP_i-Mg²⁺) complex is ruled out, since it predicts that, in the absence of free Mg²⁺, the K_m for the substrate approaches infinity. Indeed, all other routes for catalytic complex-formation were eliminated from our model.

Randahl (1979) proposed PP_i inhibition of pyrophosphatase of *R. rubrum*. We suggest an additional strong inhibitory effect due to the decrease in free Mg²⁺ in experimental conditions; direct determination of the inhibition constant for PP_i is impracticable.

Both membrane-bound and cytoplasmic pyrophosphatases of several organisms require free metal for activation (Rapoport *et al.*, 1972; Unguryte *et al.*, 1989), and their substrate is a metal ion-PP_i complex. In spite of similar requirements for all kinds of pyrophosphatases, specific differences in their kinetic properties could be important in their regulation. Since the membrane-bound pyrophosphatase provides the simplest model for the study of hydrolysis and synthesis of phosphoanhydro bonds, the characteristics and properties of this enzyme are relevant in the mechanism of energy transduction.

This work was partially supported by Grant D11-903553) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. A.S. was a fellow of D.G.A.P.A., U.N.A.M. We thank Susana Magallón and Dr. Diego González-Halphen for helping us with the English.

REFERENCES

- Baccarini-Melandri, A. & Melandri, B. A. (1978) in *The Photosynthetic Bacteria* (Clayton, R. K. & Sistrom, W. R., eds.), pp. 615-628, Plenum Press, New York and London
- Baltscheffsky, M. (1968) in *Regulatory Functions of Biological Membranes* (Jainefelt, J., ed.), vol. 2, pp. 277-286, Elsevier, Amsterdam, New York and London
- Baltscheffsky, M. (1978) in *The Photosynthetic Bacteria* (Clayton, R. K. & Sistrom, W. R., eds.), pp. 598-613, Plenum Press, New York and London
- Barry, R. J. & Dunaway-Mariano, D. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 196-203
- Baykov, A. A., Volk, S. E. & Unguryte, A. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **273**, 287-291
- Celis, H. & Romero, I. (1987) *J. Bioenerg. Biomembr.* **19**, 255-272
- Celis, H., Romero, I. & Gómez-Puyou, A. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **236**, 766-774
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W. R. & Stainer, R. Y. (1957) *J. Cell. Comp. Physiol.* **49**, 25-68
- Cooperman, B. S. (1982) *Methods Enzymol.* **87**, 526-548

- Fabiato, A. (1988) *Methods Enzymol.* **157**, 378-417
Fiske, C. A. & Subbarow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.* **117**, 751-766
Josse, J. (1966) *J. Biol. Chem.* **214**, 1948-1957
Keister, D. L. & Minton, N. J. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 330-338
Kelly, S. J., Feldman, F., Sepos, J. W. & Butler, L. G. (1973) *Biochemistry* **12**, 3338-3340
Klemme, J. H. & Gest, N. J. (1971) *Eur. J. Biochem.* **22**, 529-537
Knight, B. W., Fitts, S. W. & Dunaway-Mariano, D. (1981) *Biochemistry* **20**, 4079-4086
Lathi, R. (1983) *Microbiol. Rev.* **47**, 169-179
Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
Martell, A. & Sillén, L. G. (1971) *Spec. Publ. Chem. Soc.* **25**, Suppl. 1, 112-120
Moe, O. A. & Butler, L. G. (1972a) *J. Biol. Chem.* **247**, 7308-7314
Moe, O. A. & Butler, L. G. (1972b) *J. Biol. Chem.* **247**, 7315-7319
Morrison, J. F. (1979) *Methods Enzymol.* **63**, 257-294
Moyle, J. Mitchell, R. & Mitchell, P. (1972) *FEBS Lett.* **23**, 233-236
Randahl, H. (1979) *Eur. J. Biochem.* **102**, 251-256
Rapoport, T. A., Hohne, W. E., Heitman, P. R. & Rapoport, S. M. (1972) *Eur. J. Biochem.* **26**, 237-246
Ridlington, J. W. & Butler, G. L. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 7303-7307
Schwarm, H., Vigerschow, H. & Knobloch, K. (1986) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **367**, 127-133
Segel, I. H. (1975) in *Enzyme Kinetics: Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, pp. 227-272, John Wiley and Sons, New York
Unguryte, A., Smirnova, I. N. & Baykov, A. A. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **273**, 292-300

Received 10 July 1991/30 September 1991; accepted 14 October 1991

THERMOSTABILITY AND ACTIVATION BY DIVALENT CATIONS OF THE MEMBRANE-BOUND INORGANIC PYROPHOSPHATASE OF *RHODOSPIRILLUM RUBRUM*

HÉCTOR ORDAZ, ALEJANDRO SOSA, IRMA ROMERO and HELIODORO CELIS*

Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-600, 04510 México, D.F., México [Tel. (905) 550-52-15 ext. 4938; Fax (905) 548-0387]

(Received 27 January 1992)

- Abstract**—1. The activation energy of the membrane bound H⁺-pyrophosphatase is 44.9 kJ·mol⁻¹, for the detergent solubilized enzyme is 55.9 kJ·mol⁻¹.
2. The Arrhenius plots obtained for pyrophosphatases of *Rhodospirillum rubrum* show no breaks.
3. At 70°C, the membrane-bound pyrophosphatase is more stable in the presence of either Mg²⁺ or Zn²⁺ than in their absence.
4. At 65°C, an activator effect of Mg²⁺ or Zn²⁺ was observed. Nevertheless, at 70°C no activation was obtained.
5. The activator effects of Mg²⁺ or Zn²⁺ were depended of their concentration.

INTRODUCTION

Baltscheffsky *et al.* (1966) reported that chromatophores of the photosynthetic bacteria *Rhodospirillum rubrum* contain a membrane-bound H⁺-pyrophosphatase which catalyzes the synthesis of pyrophosphate with energy derived from electron transport. H⁺-Inorganic pyrophosphatase of the membrane of chromatophores is an independent molecular complex, clearly distinguishable from the H⁺-ATPase (Keister and Minton, 1971). The enzyme requires Mg²⁺ for hydrolysis. Mg²⁺ forms a magnesium-pyrophosphate complex which is the true substrate for the enzyme, but recent data suggests that Mg²⁺ and other divalent cations also exert a regulatory action on the catalytic properties of the enzyme (Randahl, 1979; Celis *et al.*, 1985; Celis and Romero, 1987; Sosa *et al.*, 1992).

The temperature stability of an enzyme depends on factors such as pH and ionic strength, but most importantly, on the presence or absence of ligands (Dixon and Webb, 1964).

During the catalytic process, free energy of activation must be added to the enzyme substrate to generate the "active complex" ES, that gives products; such energy barrier can be assessed by means of the Arrhenius equation, which relates the reaction

rate as a function of the temperature. This has been widely used in attempts to demonstrate the influence of membrane lipids on the function of membrane-bound enzymes (McElhaney, 1985).

In photosynthetic bacteria, the activation energies for the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospseudomonas palustris* (Schwarm *et al.*, 1986) and for the H⁺-ATPase of *R. rubrum* (Oelze *et al.*, 1980) have been reported.

This work is the first report of the activation energies of membrane-bound H⁺-inorganic pyrophosphatase, detergent solubilized enzyme and cytoplasmic pyrophosphatases of *R. rubrum*. We also report about the stabilization of the enzyme by ligands such as Mg²⁺ and Zn²⁺ and on the temperature-dependent activation produced by these divalent cations.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial growth and preparation of chromatophores from wild-type

Wild-type (strain ATCC 11170) *R. rubrum* were grown anaerobic in the light (tungsten lamps of 40 W at 30 cm) at 30°C in the medium described by Cohen-Bazire *et al.* (1957). Bacteria were harvested in the exponential phase. The cells were washed with 50 mM MOPS, 50 mM KCl, pH 7.0, and chromatophores were prepared by sonication for 3 min in 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, in the presence of 200 units DNAase/50 ml of sonication mixture and 1 mM MgCl₂. After centrifugation at 26,000 g for 20 min, the supernatant was collected and centrifuged at 105,000 g for 90 min. The residual Mg²⁺ was eliminated from the chromatophores by washing with 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5 followed by a second washing with 10 mM Tris-Cl,

*To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations: MOPS, 3-(*N*-morpholino)propane-sulfonic acid; Triton X-100, octyl phenoxy polyethoxyethanol; DEAE cellulose, diethylamino ethyl cellulose; *E_a*, activation energy; *enzyme*: inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1).

pH 7.5. The final pellet was resuspended in 10 mM Tris-Cl, pH 7.5. The chromatophore preparation was kept at 4°C, and was used within the next 3 days. No change in the hydrolytic activity was detected within this time. Protein was determined by the method of Lowry *et al.* (1951), using crystalline bovine serum albumin as standard.

Hydrolysis of pyrophosphate

Pyrophosphatase activity was measured by determination of the Pi released during enzymatic hydrolysis, in conditions of darkness with a green safety light. The reactions were arrested by 6% trichloroacetic acid (final concentration). Inorganic orthophosphate was determined in the supernatant as described by Fiske and Subbarow (1925).

The conditions of the reactions were chosen so as to have always saturating and/or optimum activity (including pH).

Temperature was varied between 0° and 80°C to evaluate the activation energies and thermostability of the enzymatic activity. The values of E_a of the Arrhenius plots were calculated by the least square method. All the data obtained are the result of 3 or 4 experiments by duplicate with different preparation.

Solubilization of membrane-bound H^+ -pyrophosphatase

The membrane-bound H^+ -pyrophosphatase was solubilized with Triton X-100 as Baltscheffsky and Nyren (1986).

Purification of cytoplasmic pyrophosphatase

The partial purification of *R. rubrum* cytoplasmic pyrophosphatase was a modification of the procedure by

Klemme and Gest (1971). Our method did not include the protamine sulfate step and after fractionation with ammonium sulfate, a column of DEAE-52 cellulose as absorbent and a gradient of 0–0.5M NaCl as eluant was used instead of calcium phosphate gel adsorption step.

RESULTS

Activation energy of membrane-bound, solubilized and cytoplasmic pyrophosphatase

The temperature profile for the H^+ -pyrophosphatase is shown in Fig. 1(A). A time-course of hydrolytic activity at different temperatures is shown. It is a common error to take a fixed time in the measurement of optimal temperature of an enzyme (Segel, 1975). As can be seen, at 5 min, 50°C would be optimal; but at 10 min and 40°C, the enzyme is stable for a longer time. For that reason 40°C will be used for this enzyme (Fig. 1B). Figure 1(C) shows the optimal temperature for the solubilized enzyme in Triton X-100. Although the hydrolytic activity is lower than in membrane bound-pyrophosphatase, the maxima is at 50°C; however, in this case the time taken for the reaction was 40 min.

At temperatures above the optimal, the hydrolytic activity of solubilized enzyme falls faster than in the membrane-bound form, suggesting a possible membrane protecting effect. This is reflected in the following values of E_a for inactivation: 153 and

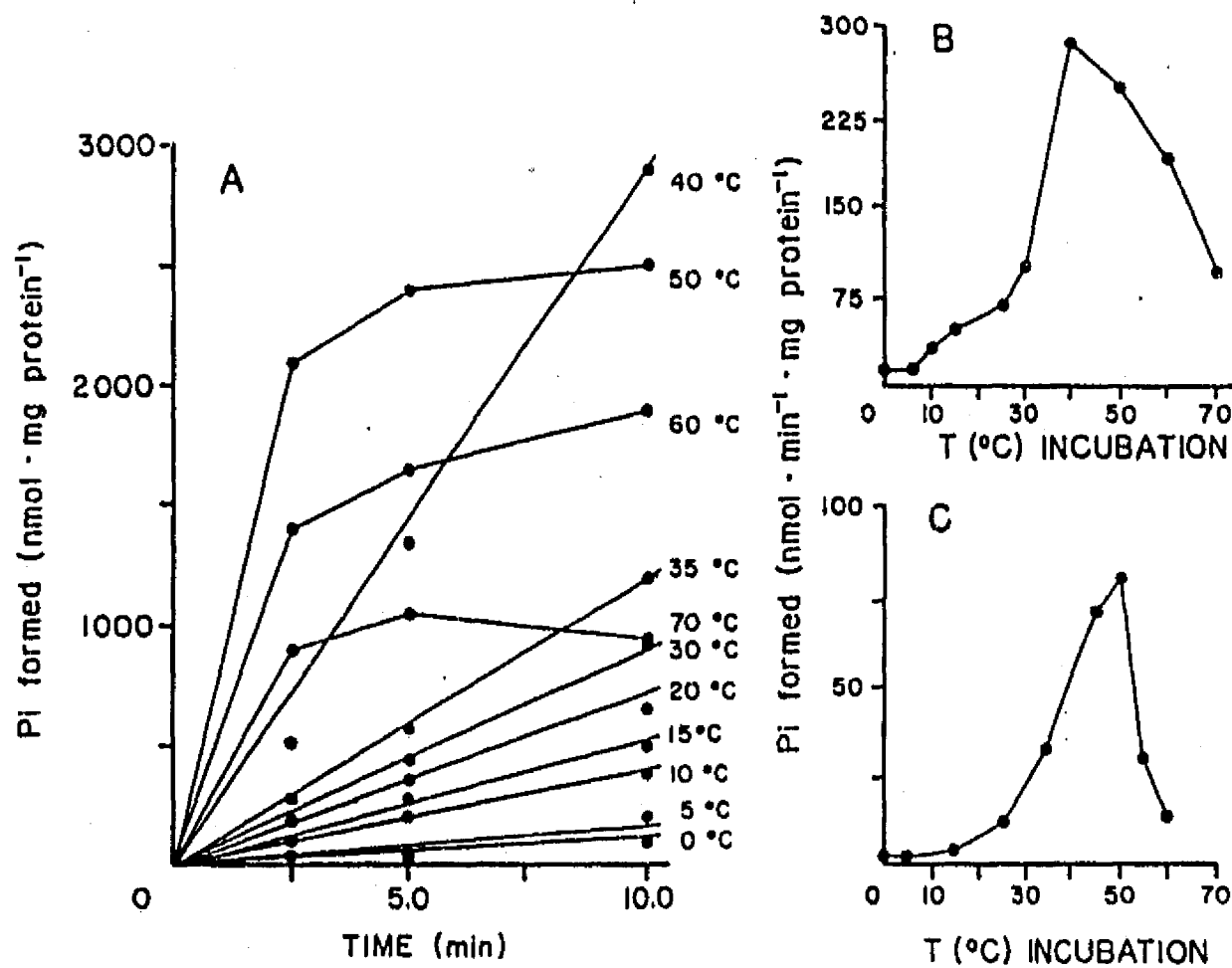


Fig. 1. Effect of temperature on membrane-bound H^+ -pyrophosphatase activity. (A) A time-course at different incubation temperatures. (B) Optimal temperature of the pyrophosphatase activity. Data were obtained from (A), at 10 min. A similar experiment as in (A) was made for Triton X-100 solubilized membrane-bound pyrophosphatase. The data plotted in (C) shows the optimal temperature of this enzyme preparation at 40 min. Experimental conditions were 50 mM Tris-maleate, pH 6.5, 3 mM PPI-Na, pH 6.5, 3 mM $MgSO_4$, and 1 mg protein of chromatophores of 0.25 mg of protein of Triton X-100 solubilized pyrophosphatase.

99 kJ·mol⁻¹ for the solubilized and membrane-bound H⁺-pyrophosphatase, respectively.

These experiments were done under conditions in which substrate was saturating (3 mM) and only 50% had been hydrolyzed, this was done to ensure that there would be enough substrate, in this range of temperature, for the reaction. pH is another factor that varies with temperature; with the buffer used (Tris-maleate) there is a slight variation of 0.05 units of pH per 10°C (data not shown). Therefore, the differences in activities could not be explained by changes in pH, since around pH 6.5 the activity is practically constant (Celis and Romero, 1987).

Arrhenius plots of membrane-bound, solubilized and cytoplasmic pyrophosphatases were calculated from data of Fig. 1 and plotted in Fig. 2. The inactivation parts of the curves were not taken in consideration. No breaks in the curves were observed in any case. The activation energies obtained were 44.9, 55.9 and 67.3 kJ·mol⁻¹ for membrane-bound, solubilized and cytoplasmic pyrophosphatases respectively. The activation energy was also obtained for membrane-bound H⁺-pyrophosphatase under uncoupled conditions (20 μM CCCP) and a value of 45.17 kJ·mol⁻¹ was obtained; therefore, there is no control of activation energy by the electrochemical proton gradient, although specific activity was stimulated 45% (data not shown). It is interesting to note that cytoplasmic and solubilized enzymes have a very similar E_a but differs by ~20 kJ·mol⁻¹ from membrane bound enzyme. Binding of the enzyme inside the membrane may produce a lower activation energy, probably due to an orientation order effect. This was confirmed by the addition of phospholipids to solubilized enzyme, and the E_a under these conditions was 50.2 kJ·mol⁻¹, which is nearer to the value obtained for the membrane-bound H⁺-pyrophosphatase. In the last condition, the specific

activity was higher than without phospholipids as previously reported (Nyrén *et al.*, 1984).

Activation energy for hydrolysis of the complex zinc-pyrophosphate, which is also substrate (Celis and Romero, 1987), is very similar (43.4 kJ·mol⁻¹) as the magnesium-pyrophosphate hydrolysis catalyzed by membrane-bound H⁺-pyrophosphatase (data not shown)

Thermostability of membrane-bound and solubilized pyrophosphatase

In previous experiments of our laboratory and others (Celis *et al.*, 1985; Celis and Romero, 1987; Randahl, 1979; Sosa *et al.*, 1992) a possible regulatory site for divalent cations in membrane-bound H⁺-pyrophosphatase had been proposed. If this is so, we will expect that divalent cation could bind to the enzyme and protects it against denaturalization by temperature. In order to assess the stability of hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase, a time-course of the enzyme, preincubated at 65°C and measuring the activity at 30°C, was performed (Fig. 3). In preincubations without cation, the loss of activity is very rapid. However, when either Mg²⁺ or Zn²⁺ (3 mM), were present in the preincubation medium, the activity was preserved. Furthermore, not only the hydrolytic activity was preserved, but also the activation effect (of 50% with Mg²⁺) is observed with respect to the activity obtained when the enzyme was measured at 30°C without preincubation. To obtain the half time for inactivation for the enzyme without added cation, the data of Fig. 3 were plotted in a semilogarithmic

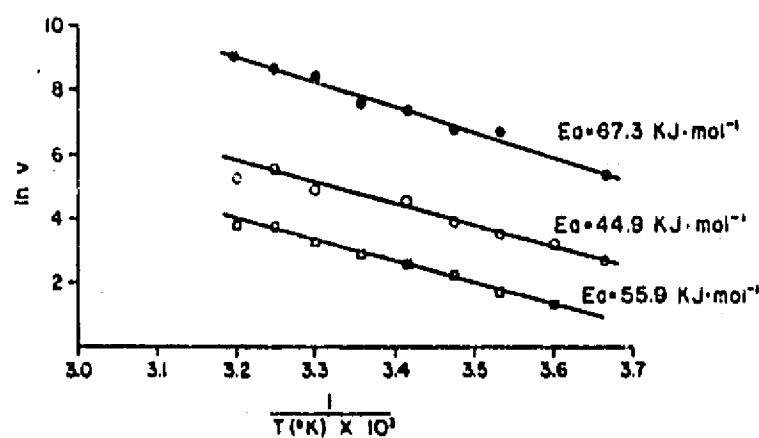


Fig. 2. Arrhenius plot of pyrophosphatases of *Rhodospirillum rubrum*. For chromatophores and solubilized enzyme the data were taken from Fig. 1. For cytoplasmic enzyme, the data were obtained from plots similar to those of Fig. 1. Incubation times were 10 min for chromatophores (○), 40 min for Triton X-100 solubilized pyrophosphatase (□) and 5 min for cytoplasmic enzyme (●). The activation energy was calculated from the slope of the lines obtained by linear regression analysis. Determination of maximal velocities were determined concentration.

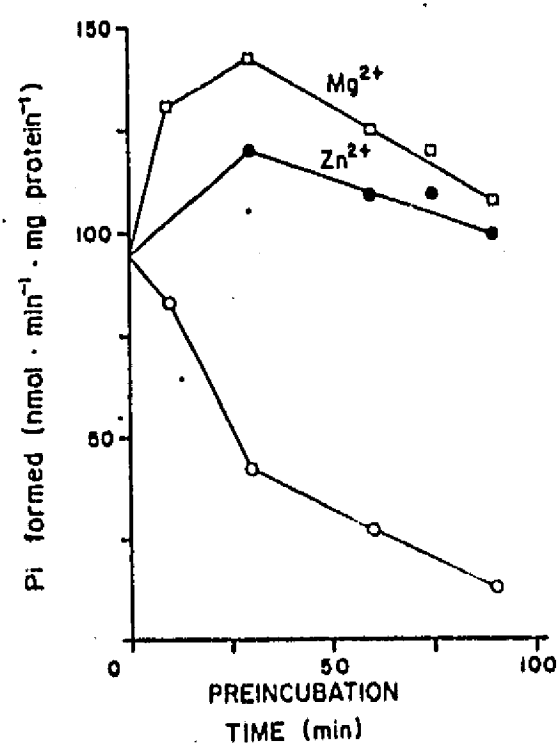


Fig. 3. Effect of preincubation at 65°C upon the pyrophosphatase of chromatophores. Preincubation was carried without cation (○), with 3.0 mM MgSO₄ (□) or with 3.0 mM ZnSO₄ (●) during indicated times. Experimental conditions were as in Fig. 1 and incubation time was 5 min at 30°C.

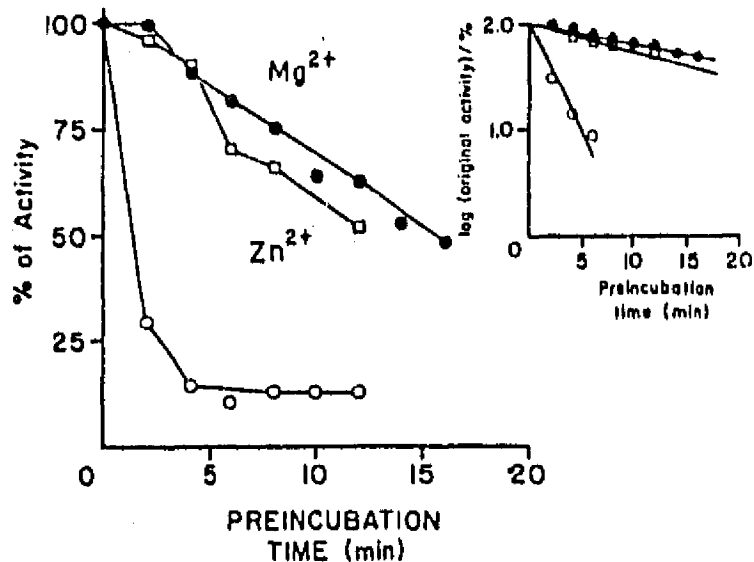


Fig. 4. Effect of preincubation at 70°C upon the pyrophosphatase of chromatophores. Experimental conditions were as in Fig. 3.

scale (data not shown); the calculated value was 28 min. This kind of analyses were not obtained for Mg²⁺ or Zn²⁺ because of the observed activation. On the other hand, when preincubation was made at 70°C, no activation was obtained, but the protective effect by cations was observed (Fig. 4). The half time for inactivation was 3 min without added cation, 16 min with Mg²⁺ and 12 min with Zn²⁺ (insert Fig. 4). At longer times (90 min) the remaining activity with Mg²⁺ and Zn²⁺ in the preincubation was of 35% (data not shown). Data from the above experiments should be separated in two effects: the non-specific stabilization of divalent cations of the enzyme; and the specific activation of the membrane-bound H⁺-pyrophosphatase by Mg²⁺ or Zn²⁺. This is supported by the fact that Ca²⁺ added during the preincubation protected but did not activate the enzyme (data not shown).

In order to differentiate whether the activation effect is due to temperature or to divalent cations, the Mg²⁺ concentration dependence on the preincubation at 65°C or the hydrolytic activity was explored in Fig. 5. In this figure two effects are shown, one protecting and the other activating; both dependent on Mg²⁺ concentration in the preincubated state, in a clearly saturatable fashion. The enzyme preincubated and measured at 30°C did not show any stimulation. This experiment means that for enzyme activation, both Mg²⁺ and temperature are necessary. In Fig. 6, a similar experiment is shown for a quantitative requirement of Zn²⁺ in preincubation medium for stabilization of hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase. In this case, as in Fig. 3, only slight activation of activity was obtained. At high concentrations (3 mM), a substantial amount of free Zn²⁺ is present, activity is inhibited (Celis and Romero, 1987). In experiments of Fig. 5 and 6 final concentration of substrate was 3 mM either for magnesium-pyrophosphate or zinc-pyrophosphate.

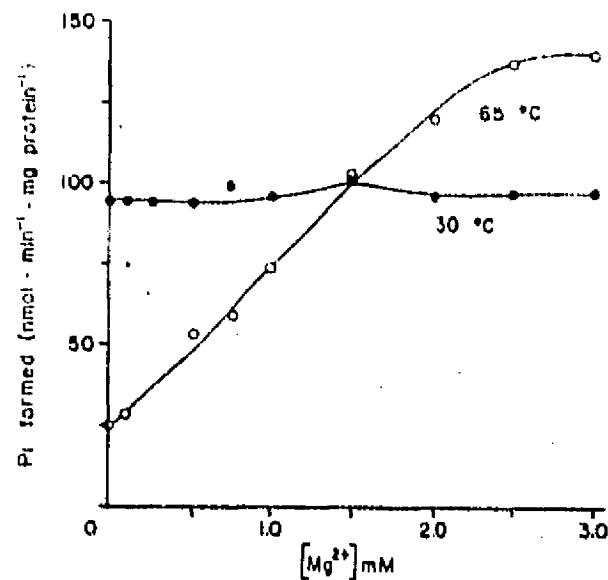


Fig. 5. Effect of magnesium during the preincubation on the activity of the membrane-bound H⁺-pyrophosphatase. Concentration of MgSO₄ in the preincubation medium is indicated in the abscissa. The final concentration of Mg in the incubation medium was 3 mM. The preincubation time was 30 min at 65°C (○) or 30°C (●). The activity was determined at 30°C for 5 min in the conditions of Fig. 1.

30°C for 5

DISCUSSION

The experiments reported here show that the activation energy for hydrolysis of the complex zinc-pyrophosphate is very similar to the one obtained for the complex magnesium-pyrophosphate, suggesting that the active site of the enzyme recognizes both substrates.

The Arrhenius plot obtained for membrane-bound H⁺-pyrophosphatase shows no breaks (Fig. 2). This indicates that individual rate constants of the enzyme are not affected differently by temperature as other authors had pointed out for other membrane enzyme (Silvius *et al.*, 1978). This feature is probably due to the fact that in this work we chose saturating concentrations of substrate in order to assess the real E_a .

The Arrhenius plot with no breaks also indicates that the enzyme had probably only one conformational change induced by temperature. Furthermore, it is also revealed that kinetic properties of the enzyme are not controlled by the phase transition of lipids which is below 0°C (Fralely *et al.*, 1978), in the temperature range experimented. It occurs in other membrane-bound enzymes (Londesborough, 1980; Jahnig and Bramhall, 1982). However, the fact reported in this paper is that the membrane-bound enzyme has a lower activation energy than solubilized or cytoplasmic enzymes, which suggests a protective and orientating effect of membrane over the enzyme. In contrast with our results, Scharm *et al.* (1986), have reported in membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospseudomonas palustris*, 2 breaks in the Arrhenius plot.

It is interesting to note that activation energy for membrane-bound ATPase of *Rhodospirillum rubrum* shows breaks in this enzyme (Oelze *et al.*, 1980) but not in the solubilized enzyme; moreover, the breaks

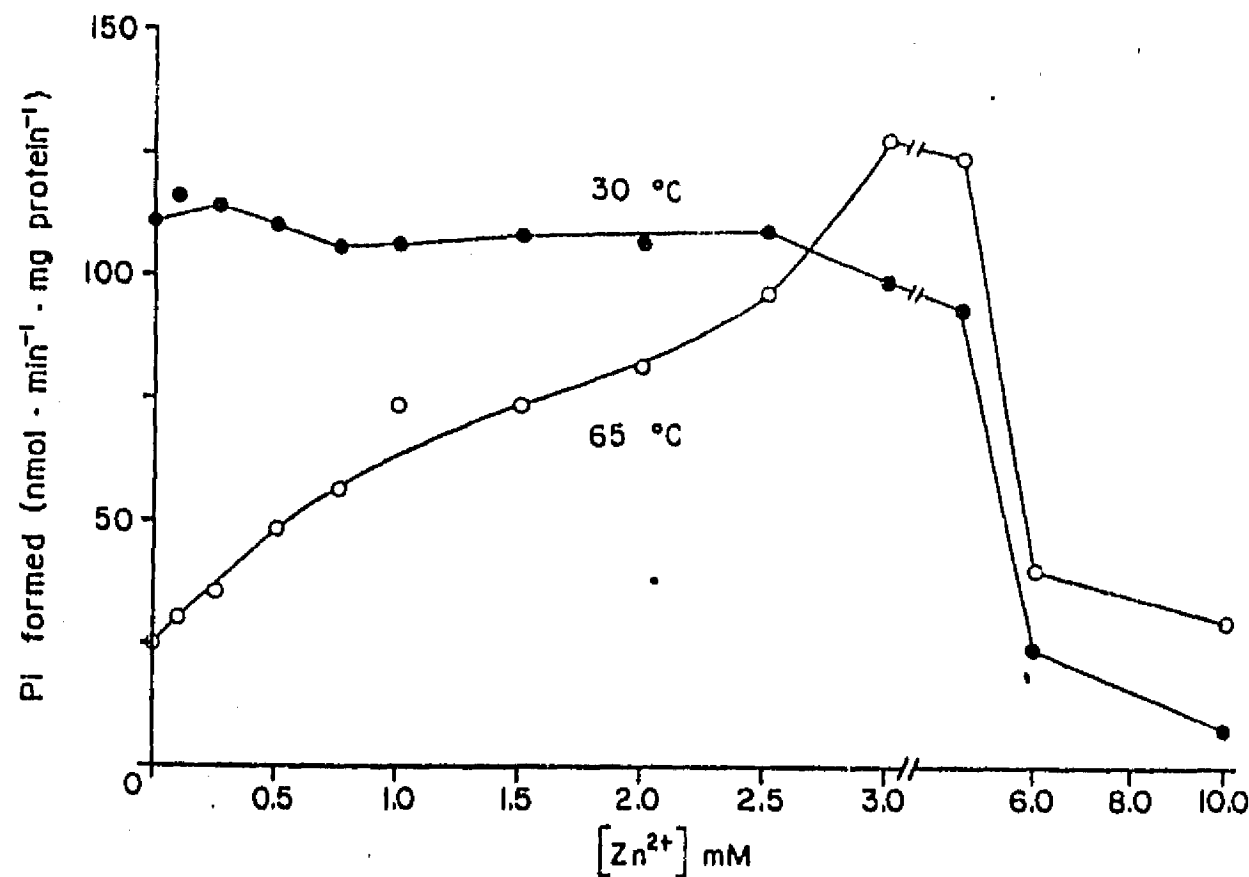


Fig. 6. Effect of zinc on the preincubation upon the membrane-bound H⁺-pyrophosphatase concentration of ZnSO₄ in the preincubation medium is indicated in the abscissa. The final concentration of cation in the incubation medium was adjusted at 3 mM and above this concentration was 4.5, 6.0 and 10 mM. The preincubation time was 30 min at 65°C (○) or 30°C (●). Activity was measured at 30°C for 5 min in conditions of Fig. 1.

30°C for Smith

in the membrane-bound enzyme depends on the storage history of the chromatophores. In the present work we used fresh chromatophores that came from deep frozen bacteria.

Our previous results (Celis *et al.*, 1985; Celis and Romero, 1987; Sosa *et al.*, 1992) suggest a regulatory effect of free cations on the membrane-bound H⁺-pyrophosphatase; in accordance, free cations must bind to the enzyme and exert a protective effect against denaturalization by temperature. This has been demonstrated in this work for the chromatophore pyrophosphatase and for solubilized enzyme. Furthermore, this protective effect depends on the cation concentration added in the preincubation stage (Figs 5 and 6). This effect has been observed by others, in different kind of pyrophosphatases: Klemme and Gest (1971) for the cytoplasmic pyrophosphatase of *R. rubrum*; Randhal (1979) in the membrane-bound enzyme of the same species; Josse (1966) in the cytoplasmic form of *Escherichia coli*; Frommel and Hohne (1979) for yeast; Hachimori *et al.* (1979); Shiroya and Samejima (1985) in thermophilic bacteria cytoplasmic enzyme and Ichiba *et al.* (1988) in yeast and *E. coli* cytoplasmic pyrophosphatase. It is interesting to note that in the last 3 reports, the authors detected differences in the circular dichroism spectra attributed to conformational changes, induced by divalent cations binding. Our data could be explained by the thermostability effect produced by tertiary structure stabilization of membrane-bound H⁺-pyrophosphatase *R. rubrum*, or as a stabilization of membrane structure.

As stated above, the protective effect of divalent cations upon pyrophosphatases is general. However it is important to stress that in this study we found a temperature-dependant activation effect by Mg²⁺ and Zn²⁺ over the hydrolytic activity of membrane-bound H⁺-pyrophosphatase (Figs 3 and 4). This correlates with previous studies (Celis *et al.* 1985; Celis and Romero, 1987). The activation effect could be interpreted as a specific interaction of Mg²⁺ or Zn²⁺ upon a regulatory site of the enzyme.

Since the membrane-bound pyrophosphatase provides the simplest model for the study of hydrolysis and synthesis of phosphoanhydride bond. For the future, it is interesting to know the thermostability induced by cation on the conformation and aminoacid important for the catalysis of this enzyme.

Acknowledgements—This work was partially supported by Grant (011-903553) from CONACyT, México H Ordáz was given a fellowship by the same organization and A Sosa by DGAPA, UNAM. The secretarial assistance of Mrs Ma. Elena Gutiérrez is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Baltscheffsky M. and Nyrén P. (1986) Preparation and reconstitution of proton-pumping membrane-bound inorganic pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum*. *Meth. Enzymol.* 126, 538-545.
- Baltscheffsky H., Von Stedingk L. V., Heldt H. W. and Klingenberg M. (1966) Inorganic pyrophosphate: formation in bacterial photophosphorylation. *Science* 153, 1120-1124.

Meth. Enzymol

- Celis H. and Romero I. (1987) The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: Effects of pH and divalent cations. *J. Bioenerg. Biomem.* 19, 255-272.
- Celis H., Romero I. and Gómez-Puyou A. (1985) The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: Effects of Mg^{2+} , phosphate and pyrophosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 236, 766-774.
- Cohen-Bazire G., Sistrom W. R. and Stanier R. Y. (1957) The kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. cell. comp. Physiol.* 49, 25-68.
- Dixon M. and Webb E. C. (1984) *Enzymes*, pp. 164-181. Academic Press, New York.
- Fiske C. A. and Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
- Fraley R. T., Jameson D. M. and Kaplan S. (1978) The use of the fluorescent probe α -parinaric acid to determine the physical state of the intracytoplasmic membranes of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochem. biophys. Acta* 511, 52-69.
- Frommel C. and Hohne W. E. (1979) Einfluss von magnesium ionen auf die hitzestabilität der anorganischen pyrophosphatase aus backerhefe. *Acta biol. med. germ.* 38, 1339-1412.
- Hachimori A., Shiroya Y., Hirato A., Miyhara T. and Samejima T. (1979) Effect of divalent cations on thermophilic inorganic pyrophosphatase. *J. Biochem., Tokyo* 86, 121-130.
- Ichiba T., Shibasaki T., Iizuka E., Hachimori A. and Samejima T. (1988) Cation-induced thermostability of yeast and *Escherichia coli* pyrophosphatases. *Biochem. Cell Biol.* 66, 25-31.
- Jahnig F. and Bramhall J. (1982) The origin of a break in Arrhenius plots of membrane processes. *Biochem. biophys. Acta* 690, 310-313.
- Josse J. (1966) Reconstitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. I. Purification and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 241, 1938-1947.
- Keister D. L. and Minton N. J. (1971) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. VI. Inorganic pyrophosphate-driven ATP synthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 147, 330-338.
- Kleffe J. H. and Gest H. (1971) Regulation of cytoplasmic inorganic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Eur. J. Biochem.* 22, 529-537.
- Londesborough J. (1980) The causes of sharply bent or discontinuous Arrhenius plots for enzyme-catalyzed reactions. *Eur. J. Biochem.* 105, 211-215.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randahl R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- McElhaney R. N. (1985) *Membrane Fluidity in Biology* (Edited by Aloia R. C. and Boggs J. M.), pp. 147-208. Academic Press, New York.
- Nyérén P., Hajnal K. and Baltscheffsky M. (1984) Purification of the membrane-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. biophys. Acta* 766, 630-635.
- Oelze J., Kaiser I. and Schrader M. (1980) Differences in activation energies of membrane-bound and the solubilized ATPases of *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 145-147.
- Randahl H. (1979) Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in *Rhodospirillum rubrum*. *Eur. J. Biochem.* 102, 251-256.
- Schwarm H., Vigerschow H. and Knoblock K. (1986) Purification and properties of soluble inorganic pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367, 127-133.
- Segel I. (1975) Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme kinetics. In *Enzyme Kinetics*, pp. 931-942. Wiley, New York.
- Shiroya Y. and Samejima T. (1985) Specific modification of histidyl residues of inorganic pyrophosphatase from *Bacillus stearothermophilus* by photooxidation. *J. Biochem., Tokyo* 98, 333-339.
- Silvius R. J., Read B. and McElhaney R. N. (1978) Membrane enzymes: Artifact in Arrhenius plots due to temperature dependence of substrate-binding affinity. *Science* 199, 902-904.
- Sosa A., Ordaz H., Romero I. and Celis H. (1992) Magnesium is an essential activator of hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. J.* [in press.] 283, 561-566.

Kleffe J.

and steady state

σ

JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES

Peter L. Pedersen
Editor-In-Chief

April 28, 1992

Dr. Heliodoro Celis
Instituto de Fisiologia Celular
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Apartado Postal 70-600
04510 Mexico D.F.
Mexico

JBB 381

Dear Dr. Celis:

Your revised manuscript entitled "Evidence of an Essential Carboxyl Residue in Membrane-Bound Pyrophosphatase of Rhodospirillum rubrum" is now acceptable for publication. It will be published in a future issue of the journal.

Sincerely,



Peter L. Pedersen