

0308/8  
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

**ESTEQUIOMETRIA H<sup>+</sup>/PPi Y CINETICA DE TRANSLOCACION  
DE H<sup>+</sup> DE LA PIROFOSFATASA DE MEMBRANA DE  
*Rhodospirillum rubrum.***

TESIS QUE SUSTENTA  
EL M. EN I. B. B.:  
ALEJANDRO SOSA PEINADO  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN I. B. B.

Ciudad Universitaria, D. F.

Noviembre de 1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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

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

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

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

Sabremos muchas cosas de la luna, composición,  
química, logos y grafías. Y sin embargo...¿le  
quitaran su miel?...¿Perderá su ternura?

Jaime Sabines.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr Heliodoro Celis del I.F.C. de la UNAM y dió lugar a una publicación en: Archives of Biochemistry and Biophysics.

**A LA MEMORIA DE MI PADRE.**

**A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.**

**A MI MADRE.**

**A SUSANA.**

**A EURIDICE, RUSLAN Y JEFTE.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mi maestro el Dr. H. Celis Sandoval por sus enseñanzas y soportarme tanto tiempo. A los miembros del Jurado: Dr. Armando Gómez Puyou, Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Dra. Blanca L. Barquera A., Dr. Rolando Hernández Muñoz, Dr. Edmundo Chávez Cosío y Dr. Alejandro Zentella Dehesa, por su revisión crítica y sus comentarios del trabajo de Tesis.

A mis maestros que han estado muy cerca de mi formación académica: Dr. Diego González Halphen, Dra Marieta Tuena, Dr. Armando Gómez Puyou, Dr. Juan Pablo Pardo. Dr. Antonio Peña, Dra. Rosario Muñoz Clares, Dr. Jaime Mas O., Dr. Adolfo García Sainz.

En especial a Jorge Ramírez, tanto por ser mi maestro, y por sus valiosos enseñanzas.

A mis amigos y compañeros: Helena, Isabel, Alejandro, Ceceña, Juan, la Lupe, Santiago, Ernesto, Edgar, José, Manuel, Ludgar, Hector, Irma etc.

A Susana, por compartir las cronopiadas y apoyarme en otras tantas, de las cuales hoy no voy a hablar.

A mis amigos que aun tienen sed de veinte años y que aún nos faltan muchas andanzas por lograr: Paloma, Mario, Miguel, Sonia, Toño, "el Paco", Jorge, Mara y muchos camaradas más, esta lista se continua pero ....

A DGAPA por la beca que me otorgó.

Al programa PADEP por el apoyo económico para mi trabajo de Doctorado.

## INDICE

RESUMEN.....	3
ABREVIATURAS.....	5
CAPITULO I. INTRODUCCION.....	7
CARACTERISTICAS GENERALES DE LA FOTOSINTESIS EN BACTERIAS .....	7
TAXONOMIA DE LAS BACTERIAS FOTOSINTETICAS.....	8
BACTERIAS FOTOSINTETICAS DEL ORDEN RHODOSPIRILLALES.....	13
DESCRIPCION DE <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	13
TRANSFORMACION DE ENERGIA EN MEMBRANAS BIOLÓGICAS.....	16
HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA.....	17
ESTRUCTURA DEL PPI Y PROPIEDADES GENERALES.....	19
PIROFOSFATAS, PROPIEDADES, CARACTERISTICAS GENERALES.....	21
PIROFOSFATASAS CITOPLASMICAS.....	22
PIROFOSFATASAS DE MEMBRANA.....	24
PIROFOSFATASAS DE MEMBRANA DE <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	28
A) ACTIVIDAD DE PPIasa.....	30
B) SINTESIS DE PPI.....	33
C) INTERCAMBIO Pi-PPI.....	35
D) INTERCAMBIO Pi-H <sub>2</sub> O.....	35
CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS.....	38
CULTIVO DE BACTERIAS.....	37
MEDIOS DE CULTIVO.....	37
SIEMBRA DE BACTERIAS.....	39
COSECHA DE BACTERIAS.....	40
OBTENCION DE LA PREPARACION DE MEMBRANA DENOMINADA CROMATOFOROS.....	40
DETERMINACION DE PROTEINA.....	43
DETERMINACION DEL CONTENIDO DE BCL.....	43
DETERMINACION DEL $\Delta$ pH.....	44
CALIBRACION DEL $\Delta$ pH.....	45
DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE AMORTIGUAMIENTO INTERNO DE LOS CROMATOFOROS DE <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	46
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA.....	47
CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS METALES, LIGANDOS LIBRES Y LOS COMPLEJOS PRESENTES EN EL MEDIO DE REACCION.....	49

OBJETIVOS.....	51
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION.....	52
RESULTADOS PRELIMINARES DEL ACOPLAMIENTO ENTRE LA TRANSLOCACION DE PROTONES Y LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA EN CROMATOFOROS DE LA BACTERIA <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	52
FORMACION DEL $\Delta pH$ EN CROMATOFOROS INDUCIDO POR LA HIDROLISIS DE PPI O DE ATP.....	55
CALIBRACION DEL $\Delta pH$ EN LOS CROMATOFOROS DE <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	57
DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE AMORTIGUAMIENTO INTERNO DE LOS CROMATOFOROS DE <i>Rhodospirillum rubrum</i> .....	60
DETERMINACION DE LA ESTEQUIOMETRIA $H^+/PPI$ UTILIZANDO LA VELOCIDAD DE RELAJACION DEL $\Delta pH$ PARA INFERIR LA VELOCIDAD DEL TRANSPORTE DE PROTONES.....	67
DETERMINACION DE LA ESTEQUIOMETRIA POR EL ANALISIS MATEMATICO QUE DESCRIBE LA FORMACION EN EL TIEMPO DEL $\Delta pH$ .....	75
CINETICA DE GENERACION DEL $\Delta pH$ Y EFECTO DEL $K^+$ SOBRE LA CINETICA DE HIDROLISIS.....	80
EFECTO DEL CCCP Y DE LA VALINOMICINA SOBRE LA CINETICA DE TRANSLOCACION DE PROTONES.....	84
IMPLICACIONES DEL VALOR DE LA ESTEQUIOMETRIA Y VALOR DEL $\Delta G$ PARA EL PPI.....	86
CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	91
BIBLIOGRAFIA.....	94

## RESUMEN

Se estudió la cinética de translocación de  $H^+$  por la pirofosfatasa de membrana de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*. Se utilizó el fluoróforo anaranjado de acridina para obtener una calibración del apagamiento de la fluorescencia versus el  $\Delta pH$  del sistema. La cinética de translocación de protones fue similar a la cinética de hidrólisis de PPI y activación por  $Mg^{2+}$  libre. Por dos métodos cinéticos se determinó la estequiometría  $H^+/PPI$ . En el primer método se infirió la velocidad inicial de transporte de  $H^+$  con la determinación de la velocidad de recuperación de fluorescencia al inhibir la PPIasa, con el sistema en estado estacionario con respecto a la formación del  $\Delta pH$ , se obtuvo una estequiometría de 2.3. En la segunda metodología, se utilizó un modelo matemático que describe la formación del  $\Delta pH$  en función del tiempo y el cociente estequiométrico dió 1.9, por lo que con ambas metodologías el valor es cercano a dos. Se determinó la estequiometría para la  $H^+$ -ATPasa del mismo sistema como control interno de la metodología y se obtuvo un valor de 3.7, que concuerda con los valores reportados para esta enzima, por lo que valida la metodología cinética empleada.

El valor de estequiometría de dos concuerda con la capacidad de síntesis e hidrólisis de la  $H^+$ -pirofosfatasa de bacteria fotosintética, en cambio la  $H^+$ -pirofosfatasa de vacuola presenta una estequiometría de 1, que favorece la reacción de hidrólisis.

### ABSTRACT.

In the present work, the kinetic of  $H^+$  translocation was studied. Two kinetic methods have been used to measure the  $H^+/PPI$  stoichiometry in the chromatophores of the photosynthetic bacteria *Rhodospirillum rubrum*. In the first method, the fluorescent probe acridine orange, was employed to infer the proton pump activity at the steady-state of the  $\Delta pH$  generation. At this point the translocation of protons by the  $H^+$ -PPIase in one direction is balanced exactly by the leak of protons in the opposite direction. Pyrophosphatase activity was then quickly stopped by adding EDTA, producing a relaxation of  $\Delta pH$ . From the initial rate of this relaxation and the rate of PPI hydrolysis measured under the same condition, the  $H^+/PPI$  stoichiometry was obtained. In the second method, a mathematical model was used to describe the time course of  $\Delta pH$  formation. In the two methods an apparent  $H^+/PPI$  stoichiometry of nearly 2 was obtained. The  $H^+/ATP$  stoichiometry was determined also as an internal control, and giving a value of nearly 3.6, which is in agreement with the value in different F-Type  $H^+$ -ATPases. The  $H^+/PPI$  stoichiometry calculated of 1 in tonoplast vesicles of *Beta vulgaris*, probably reflects the function of the vacuolar  $H^+$ -PPIase; it works in parallel with the  $H^+$ -ATPase to generate a  $\Delta\mu H^+$  of the magnitude necessary to drive cotransport across the vacuolar membrane. On the other hand, the here described  $H^+/PPI$  stoichiometry of 2 for *Rhodospirillum rubrum* indicates, that in chromatophores the  $H^+$ -PPIase would made a synthesis or hydrolysis of PPI.

## ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina.
AMP	Monofosfato de adenosina
ANS	Anilino Naftaleno Sulfonato.
ATP	Trifosfato de adenosina.
ATPasa	Adenosin Trifosfatasa.
BCl	Bacterioclorofila.
BSA	Albúmina de suero de bovino.
CCCP	Carbonil-cianuro-fenilhidrazona.
Cl	Clorofila.
CMC	1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodimida.
DCCD	Diciclohexil carbodiimida.
2,6 DCP	2-6 Diclorofenol indofenol.
EDC	1-etil-3[-dimetilamino] propil carbodimida
DEAE	Diethyl amino etil.
DTT	Ditiotreitol.
DTE	Ditioeritrol.
$\Delta G$	Energía libre de Gibbs
$\Delta pH$	Diferencia de pH a ambos lados de la membrana.
$\Delta \psi$	Potencial de membrana.
$\Delta \mu H^+$	Potencial electroquímico de protones
EDTA	Acido etilén diamino tetracético.
EGTA	Acido etilénglicol bis ( amino-etil-eter) NN' tetracético.
FCCP	p-trifluorometoxi carbonil-cianuro fenilhidrazona.
fpm	Fuerza protón motriz.
HEPES	N-2-Hidroxietyl-piperazina ácido N-2-etanosulfónico
IDP	Imidodifosfato.
KDa	Kilodaltones.
MES	Acido morfolino etano sulfónico.
MDP	Metilén difosfonato.
MOPS	Acido morfolino propano sulfónico.
NBF-Cl	4-cloro 3 nitrobenzo-trifluoruro.
NEM	N-etil maleimida
PEP	Fosfoenol piruvato.
Pi	Fosfato.
<sup>32</sup> Pi	Fosfato radioactivo.
PPi	Pirofosfato inorgánico.
PPiasa	Pirofosfatasa.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TCA	Acido tricloroacético.

TPP<sup>+</sup>  
Tris  
UQ<sub>10</sub>

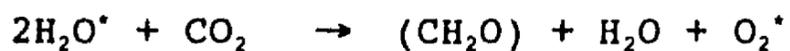
Tetra Fenil Fosfonio  
Tris (hidroximetil) amino metano.  
Ubiquinona 10.

## CAPITULO I.

### INTRODUCCION

#### CARACTERISTICAS GENERALES DE LA FOTOSINTESIS EN BACTERIAS.

En el proceso conocido como fotosíntesis, la energía de las radiaciones electromagnéticas ( $h\nu$ ) es transformada en energía química, ya sea en la membrana tilacoidal de los cloroplastos o bien, en la membrana plasmática de las bacterias fotosintéticas. Durante la fotosíntesis oxigénica se produce oxígeno, el cual se libera durante la fotólisis del agua, de acuerdo a la siguiente reacción:



Sin embargo, la mayoría de las bacterias fotoautotróficas llevan a cabo fotosíntesis anoxigénica, descrita por van Niel en 1935:



En esta reacción no existe liberación de oxígeno molecular, ya que el agua es reemplazada por otros reductores como el  $\text{S}_2$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  o el hidrógeno molecular. Algunas bacterias fotosintéticas pueden substituir tanto al agua como a los compuestos de azufre, por compuestos orgánicos, tales como el malato, succinato,  $\beta$ -hidroxibutirato, etc. (Gottschalk, 1986).

En la fotosíntesis, los eventos involucrados desde la captura de la luz hasta la síntesis de ATP, están comprendidos en cuatro fases: 1) Captura de la energía radiante por los pigmentos cosechadores de la luz, 2) Transferencia de energía hacia el centro de reacción (el que contiene bacterioclorofila, bacteriofeofitina,

quinonas y un Fe no hémico), en donde ocurre el proceso primario de separación de carga (energía de oxido-reducción), 3) El transporte de electrones iniciado por el centro de reacción genera un gradiente electroquímico de  $H^+$  ( $\Delta\mu H^+$ ), 4) La energía del  $\Delta\mu H^+$  es utilizada para la síntesis de ATP, transporte de iones y de solutos, etc. (Dawes, 1986). Es decir, la energía derivada de la luz se utiliza para sintetizar el ATP (fotofosforilación) por medio de un circuito de protones análogo al de las mitocondrias y membranas bacterianas. Alternativamente, esta energía del gradiente electroquímico de protones se acopla a la síntesis de PPI a través de la  $H^+$ -Pirofosfatasa de membrana en la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Baltschefsky, 1967a).

#### **TAXONOMIA DE LAS BACTERIAS FOTOSINTETICAS.**

Las clasificaciones taxonómicas entre los organismos toman en cuenta relaciones fenotípicas para la determinación de los taxa, pero estas agrupaciones no siempre reflejan las relaciones de parentesco o linaje (relaciones evolutivas) entre los grupos. Al respecto, se han realizado agrupaciones de la diversidad biológica basadas en la similitud de la secuencia del ácido ribonucleico ribosomal (RNAr Woese, 1987). Dado que esta molécula se encuentra presente desde los primeros organismos, la magnitud de cambio en su secuencia primaria, ha servido para establecer relaciones filogenéticas. Con base a este tipo de análisis se han propuesto (Woese y col 1990) tres dominios (Fig. 1): Eubacteria, Archaea y Eucarya. Dentro de Eucarya (eucariontes) se encuentran los reinos

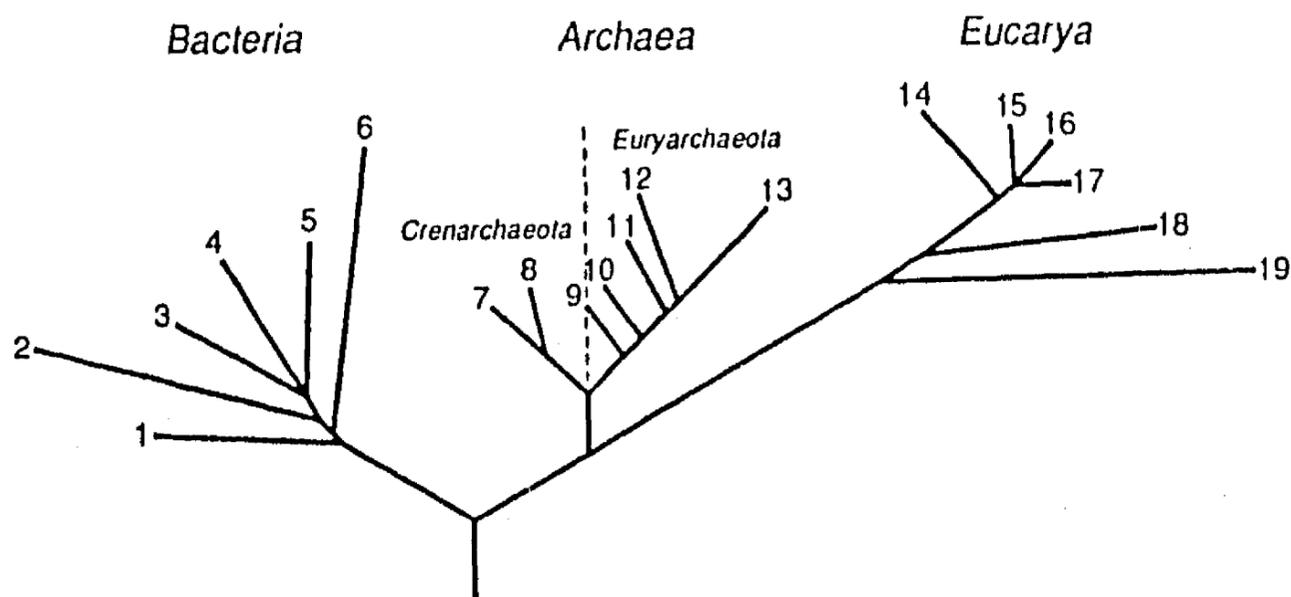


Figura 1. Relaciones filogenéticas entre los organismos, con base en las comparaciones del RNAr tomado de Woese (1990). Los números corresponden a los siguientes grupos: 1 termotogales; 2 flavobacterias; 3 cianobacterias; 4 bacterias púrpuras; 5 Gram-positivas; 6 bacterias verdes no sulfurosas; 7 género Pyrodictium; 8 género Thermoproteus; 9 Thermococcales; 10 Methanococcales; 11 Metanobacterias; 12 Metanomicrobiales; 13 Halófilas; 14 Animales; 15 Ciliados; 16 Plantas; 17 Hongos; 18 Flagelados y 19 Microsporidia.

de Animalia, Plantae y Fungi.

Las bacterias fotosintéticas están presentes en los dominios de Eubacteria y Archaeae (arqueobacterias, ver Fig.1). Dentro del dominio de Eubacteria se encuentra el mayor número de especies de bacterias, en donde las bacterias fotosintéticas no forman un grupo genealógico diferente de las bacterias no fotosintéticas; es decir, los grupos autótrofos y heterótrofos no se encuentran filogenéticamente separados: por ejemplo en el grupo de las bacterias púrpuras encontramos tanto bacterias fotosintéticas como heterótrofas. Las bacterias fotosintéticas que pertenecen a este dominio se encuentran representados en los siguientes grupos (Fig. 1): el de bacterias púrpuras no sulfurosas (*Rhodospirillum*, *Chromatium*, *Rhodobacter*); el de bacterias gram positivas (*Heliobacterium*); el de cianobacteria; el de bacterias verdes sulfurosas (*Chlorobium*) y el de las bacterias verdes no sulfurosas (*Chloroflexus*).

El dominio de las arqueobacterias comprende cuatro fenotipos generales: las metanógenas, las reductoras de compuestos de azufre, las termófilas extremas y las halófilas. Desde el punto de vista filogenético no se encuentran separados estos grupos, sino que muestran una relación evolutiva muy particular entre ellos (Fig. 1). Dentro del grupo de las halobacterias se encuentran las únicas arqueobacterias fotosintéticas, que viven a concentraciones salinas elevadas (4.3 M de NaCl).

A continuación se mencionan algunas características de los principales grupos de bacterias fotosintéticas:

Las **cianobacterias** llevan a cabo fotosíntesis oxigénica. Su aparato fotosintético es similar al de los eucariontes fotosintéticos, ya que contienen dos fotosistemas, excepto por su complejo cosechador de luz, el cual es un complejo de ficobiliproteínas (las proteínas que lo forman están asociadas a diferentes tipos de ficobilinas: ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina, Glazer, 1985). El citoplasma de las cianobacterias contiene unidades membranales denominados tilacoides. Muchos géneros de cianobacterias son fotoautotróficos obligados y algunos géneros son capaces de fijar el  $N_2$ .

Las bacterias fotosintéticas que llevan a cabo fotosíntesis anoxigénica, utilizan como reductores compuestos de azufre, hidrógeno y substratos orgánicos. Las *Chromatiaceae* o bacterias púrpuras sulfurosas y las *Chlorobiaceae* o bacterias verdes sulfurosas son anaeróbicas obligadas.

Las bacterias púrpuras no sulfurosas son principalmente fotoheterótrofas y pueden reducir al  $CO_2$ . Son capaces de oxidar compuestos orgánicos en presencia de  $O_2$  y oscuridad, ya que utilizan al oxígeno como último aceptor de electrones. Algunas especies utilizan el  $H_2$  para reducir al  $CO_2$  (Clayton y Sistrom, 1978).

La especie *Chloroflexus auricantus* que pertenece al grupo de bacterias verdes, es principalmente un organismo organotrófico aunque es capaz de crecer fotosintéticamente en presencia de compuestos de azufre como donadores de electrones. Esta especie presenta fotosíntesis anoxigénica y en condiciones de oscuridad

lleva a cabo respiración.

La **halobacterias** son organismos halófilos que viven en medios donde la concentración salina es elevada (4.3 M de NaCl) y realizan fotosíntesis no óxido-reductora (Oestreheldt y Stoeckenius, 1973), ya que su aparato fotosintético es muy diferente al resto de los demás procariontes fotosintéticos. En lugar de bacterioclorofila (BChl) o clorofila (Chl) asociadas a los complejos cosechadores de luz y centro de reacción (donde ocurre el evento primario de separación de carga), presenta una proteína integral de membrana denominada bacteriorrodopsina. Si se le cultiva a las bacterias en presencia de luz y bajas tensiones de oxígeno esta proteína puede llegar a representar el 90% de la proteína de la membrana de la bacteria, y es responsable del color púrpura de éstas membranas. La bacteriorrodopsina es una proteína monomérica que atraviesa 7 veces la membrana; el polipéptido tiene un peso molecular de 26 Kilodaltones (Eisenbach y Caplan, 1979). Esta proteína contiene una molécula de retinol en la posición trans. El cromóforo está unido con el grupo amino epsilon de la lisina 216 de la proteína, a través de una base de Schiff protonada. La absorción de un fotón por el retinol produce la isomerización de la molécula a la conformación 13-cis, y una disminución del pK en la base de Schiff desde 11 a 4 (Lugtemburg, 1988), lo que genera una desprotonación de este grupo, y la liberación del protón en el lado electropositivo de la membrana.

## **BACTERIAS FOTOSINTETICAS DEL ORDEN RHODOSPIRILLALES.**

Las bacterias fotosintéticas empleadas en este trabajo pertenecen al orden *Rhodospirillales*, de acuerdo con la clasificación de Pfenning y Truper (1971) y realizan fotosíntesis anoxigénica. Este orden incluye dos subórdenes que son:

***Rhodospirillineae* y *Chlorobiineae*.**

El suborden *Rhodospirillineae* comprende organismos que contienen Bcl "a" o "b", los pigmentos se encuentran asociados a proteínas integrales de membrana. La membrana se invagina al interior del citoplasma formando las estructuras denominadas cromatóforos. Este suborden contiene dos familias:

***Rhodospillineae* y *Chromatiaceae*.**

El suborden *Chlorobiniieae* comprende bacterias con Bcl "c", "d", o "e". Los pigmentos están localizados en estructuras especiales llamadas clorosomas, los cuales están unidos a la membrana citoplásmica. Este suborden contiene dos familias: ***Chlorobiaceae* y *Chloroflexaceae*** (Trupper, 1971).

### **DESCRIPCION DE *Rhodospirillum rubrum***

La clasificación de la bacteria empleada en este trabajo es:

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

La especie *Rhodospirillum rubrum*, posee una forma espiral y mide 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho por 7 a 10  $\mu\text{m}$  de largo; se divide por fisión binaria; presenta flagelos polares y una pared celular separada de

la membrana plasmática por un espacio periplásmico. La membrana contiene el sistema de transporte de electrones, los complejos cosechadores de luz y el centro de reacción (Fig 2). Si el crecimiento se lleva a cabo en condiciones de baja concentración de oxígeno y luz, presenta los cromatóforos (Clayton y Sistrom, 1978). En el espacio periplásmico existen proteínas que participan en el transporte de electrones como el citocromo  $c_2$ . En condiciones aeróbicas sin luz obtiene energía a partir de la oxidación de substratos orgánicos. En esta fase respiratoria no desarrolla los cromatóforos. Esta bacteria almacena glucógeno o poli- $\beta$ -hidroxibutirato como reservorio de energía (Merrick, 1978) y requiere de biotina para su crecimiento. Utiliza como donadores de electrones y como fuente de carbono los siguientes compuestos: acetato, butirato, propionato, piruvato, lactato, succinato, etanol y requiere de los aminoácidos: aspartato, glutamato y arginina o bien amonio o  $N_2$ , por lo tanto esta bacteria es fijadora del nitrógeno molecular en ausencia de  $O_2$ . En condiciones respiratorias presenta las siguientes actividades enzimáticas: fumarato reductasa dependiente de NADH, d Ubiquinona reductasa, deshidrogenasa succínica y citocromo c oxidasa (Laskin y Lechevalier, 1988). *R. rubrum*. es una bacteria Gram-negativa que contiene en su membrana 19% de fosfatidiletanolamina, 10% de fosfatidilcolina y 5% de cardiolipina (Rogers, 1986). Al igual que todas las bacterias Gram-negativas, pose una cubierta de peptidoglicano de 2nm de grosor que cubre la pared celular; juntas estas dos estructuras le dan rigidez y su forma característica a

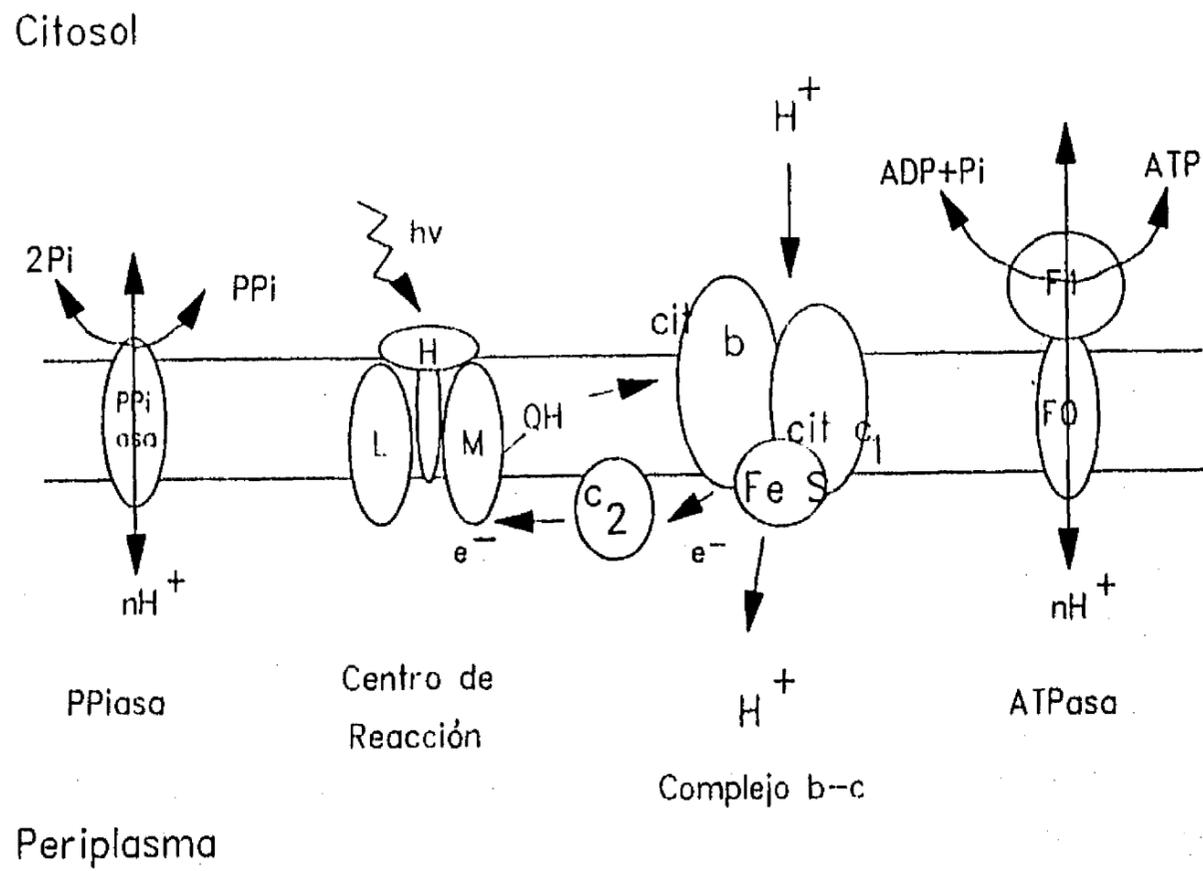


Figura 2. Esquema de la transducción energética en bacterias púrpuras no sulfurosas.

la bacteria.

La quinona que contiene es la ubiquinonas y el caroteno predominante es la espiroloxantina. El espectro absoluto de la membrana del cromatóforo presenta una banda de absorción a los 550 nm debido a la espiriloxantina y un pico de absorción sencillo y simétrico de bacterioclorofila a los 825 nm (Clayton y Sistrom 1978)

La ubiquinona 10 (UQ<sub>10</sub>) se encuentra en la membrana tanto en cultivo fotosintético como el respiratorio, pero su concentración es mayor durante el cultivo fotosintético. La actividad de la NADH-oxidasa y la citocromo oxidasa disminuye por la destrucción de la UQ<sub>10</sub> por luz ultravioleta (Nishikawa y col, 1973).

#### **TRANSFORMACIONES DE ENERGIA EN MEMBRANAS BIOLÓGICAS.**

Un avance crucial en el campo de la bionergética, fue el descubrimiento de que la mayor parte del ATP sintetizado en la célula, proviene de los complejos enzimáticos asociados a las membranas de la mitocondria (membrana interna), la membrana tilacoide de los cloroplastos y la membrana citoplasmática de los procariontes (Harold, 1986). Estas membranas acopladas a la transformación energética, están caracterizadas por dos tipos de estructuras protéicas:

- a) La H<sup>+</sup>ATP-sintetasa, que se encarga de la síntesis del ATP, y
- b) Un segundo sistema que está determinado por la fuente de energía primaria. De tal suerte que en la membrana interna de la mitocondria y en la membrana plasmática de las bacterias, se

encuentra la cadena respiratoria, que cataliza la transferencia de equivalentes de óxido-reducción hasta el oxígeno u otro aceptor dando lugar a la fosforilación oxidativa. En plantas y en bacterias fotosintéticas la unidad fotosintética se compone de complejos cosechadores de luz, centros de reacción y presenta una cadena de transporte de electrones cíclica (Nicholls, 1992).

La hipótesis que ha permitido explicar el mecanismo de transferencia de la energía de óxido-reducción del transporte de electrones para fosforilar el ADP, es la hipótesis quimiosmótica.

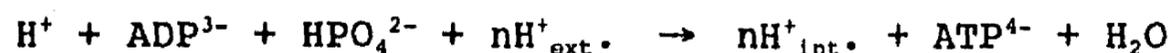
**HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA.** La hipótesis quimiosmótica postula que las enzimas y los acarreadores de electrones están dispuestos asimétricamente en la membrana, de tal manera que catalizan un transporte vectorial de protones, lo que genera un gradiente de potencial electroquímico a través de la membrana (Mitchell, 1967; 1982).

Los puntos esenciales de esta hipótesis son (Fig. 3.):

a) La transferencia de electrones por la cadena redox que provoca la translocación de protones en dirección de la región electropositiva de la membrana.

b) La membrana es impermeable a los  $H^+$  y los  $OH^-$ , excepto por los sistemas de transporte para estos iones.

c) La existencia de una proteína integral de membrana, la ATPasa translocadora de protones, que cataliza la siguiente reacción.



donde "n" es el número de moles de  $H^+$  translocados por mol de ATP,

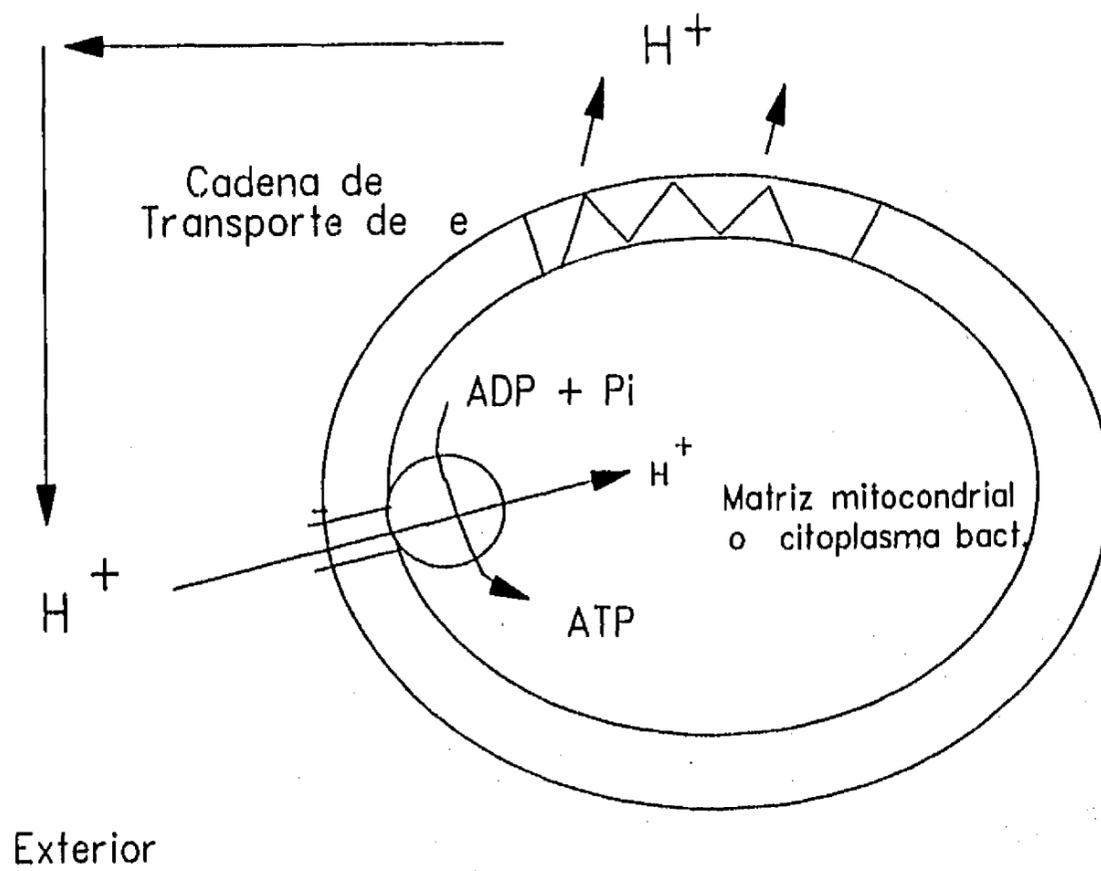


Figura 3. Esquema general de la hipótesis quimiosmótica.

el valor estequiométrico se expresa como el cociente  $H^+/ATP$ . El otro protón en la ecuación corresponde a un proceso escalar (Mitchell, 1967). Dado que esta reacción es reversible, la acumulación de protones en la región electropositiva puede dirigir la síntesis del ATP con la concomitante entrada de protones.

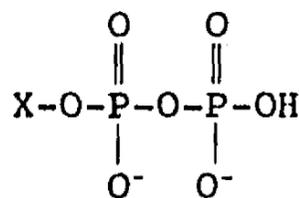
El resultado de la translocación de protones trae consigo la generación de un gradiente electroquímico de protones, ya que presenta un  $\Delta pH$ , debido a la diferencia de concentración de protones a ambos lados de la membrana, y un gradiente eléctrico o potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ), debido a la diferencia de carga del ión  $H^+$ . Estos dos parámetros sumados forman la fuerza protón motriz, que no es mas que la expresión  $\Delta\mu_{H^+}$  dividido entre la constante de Faraday (Fig. 2). La expresión que define la fuerza protón-motriz (fpm) es:

$$fpm = \Delta\psi - Z \Delta pH$$

En donde  $\Delta\psi$  es el gradiente de potencial eléctrico y " $Z \Delta pH$ " es una expresión de la diferencia de potencial químico en unidades de milivoltios (mV),  $Z$  equivale a  $2.303 RT/F$ , en donde  $R$  es la constante universal de los gases,  $T$  es la temperatura en grados Kelvin y  $F$  es la cte. de Faraday.

#### LA ESTRUCTURA DEL PPI Y PROPIEDADES GENERALES.

La estructura del enlace fosfoanhidro a pH 7.0:



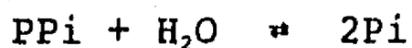
donde X puede ser AMP, GMP, CMP, TMP, UMP u OH<sup>-</sup> para el caso del PPI. Este enlace presenta un papel importante en los procesos de transducción de energía, ya que este enlace es la principal forma de almacenamiento de energía química en los sistemas vivos. El pirofosfato inorgánico (PPI) es el compuesto más simple que contiene esta estructura. El PPI es producto de diversas reacciones biosintéticas tales como la síntesis de DNA, RNA, aminoácidos, nucleótidos, lípidos, urea, ácidos grasos, etc (Reeves, 1976). Debido a que muchas de estas reacciones son reversibles, se pensó durante mucho tiempo que el único papel del PPI era el de ser hidrolizado por la pirofosfatasa citoplásmica (PPiase), formándose así una barrera termodinámica que impide el reverso de estas reacciones biosintéticas. Sin embargo, se ha visto que el PPI es fuente de fosfatos y de energía para diversas reacciones (Reeves, 1976, Wood, 1977). Se ha medido bajo condiciones fisiológicas la concentración del PPI libre en el citoplasma de células animales (Guynn y col, 1973) y células vegetales (Black y col, 1987), lo que muestra que la concentración del PPI se encuentra por arriba de la concentración predicha por el equilibrio de la reacción de la PPiase citoplásmica. En la especie de arqueobacteria *Methanobacterium thermoautotrophicum*, el PPI se encuentra en una concentración de 2.5 a 40 mM, dependiendo de las condiciones del medio de cultivo (Keltjens y col, 1988), lo que sugiere, una participación más compleja del PPI en el metabolismo. Los estudios del  $\Delta G^{\circ}$  de hidrólisis del PPI muestran que no es posible descartarlo como donador de energía para distintas reacciones

metabólicas. Se ha visto que la energía libre de hidrólisis de la reacción, es muy parecida a la energía de hidrólisis del enlace y del ATP en ausencia de cationes divalentes, pero en presencia de estos, el  $\Delta G^\circ$  se vuelve menos negativo, ya que el  $Mg^{2+}$  es más afín por el ADP que por el PPI. El valor experimental para la hidrólisis del PPI fue de -4.0 Kcal/mol, en presencia de 1mM de  $Mg^{2+}$ , 150 mM de  $K^+$  y pH de 7.4, y de -5.63 Kcal/mol en ausencia de  $Mg^{2+}$  (Flodgard y Fleron, 1974), lo cual está en concordancia con la determinación de una energía libre de hidrólisis de -5.27 Kcal/mol, en ausencia de  $Mg^{2+}$  (Lawson y col 1976). Estos valores de nuevo nos sugieren que no es posible eliminar al PPI como fuente de energía.

Estudios de las concentraciones del Pi y PPI en equilibrio entre valores de pH de 6 y 8, en presencia de diferentes concentraciones de  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  y diferentes solventes orgánicos que disminuyen la constante dieléctrica del medio, mostraron que el valor del  $\Delta G^\circ$  disminuye desde -5.1 a -0.7 Kcal/mol (de Meis, 1984). Esto indica que la  $K_{eq}$ , y por lo tanto el  $\Delta G^\circ$  para la hidrólisis de un compuesto de alta energía, también depende de la energía de solvatación entre reactantes y productos.

#### **PIROFOSFATASAS, CARACTERISTICAS GENERALES.**

Las Pirofosfatasas son enzimas que se encargan de hidrolizar la unión fosfoanhidro del PPI inorgánico, de acuerdo con la siguiente reacción:



Se conoce la existencia de dos tipos de pirofosfatasas, las

citoplásmicas y las membranales:

**PIROFOSFATASA CITOPLASMICA.** Se encuentra en el citoplasma de todas las células y se ha purificado de diferentes organismos, lo que ha permitido conocer algunos aspectos de su estructura y de sus propiedades catalíticas (Cooperman, 1982, Rapoport y col 1972, Barry y Dunaway-Mariano, 1987).

La PPIasa citoplásmica de levadura es una enzima homodimérica, que contiene 286 aminoácidos por monomero, y que requiere de iones  $Mg^{2+}$  para presentar actividad. Uno de estos forma un complejo con el PPI y los otros dos iones  $Mg^{2+}$  funcionan como cofactores (Knighth y col, 1984). En general, se ha visto que los cationes divalentes regulan su actividad (Ridlington y Butler, 1972).

Klemme y Guest (1971a) encontraron que más del 90% de la actividad de PPIasa en *Rhodospirillum rubrum* corresponde a la citoplásmica. Se ha propuesto una regulación alostérica de la enzima debida al efecto de los cationes divalentes (Klemme y Gest, 1971b). Las reacciones parciales de la enzima son: el recambio del oxígeno isotópico  $Pi-H_2O$  y el recambio de  $PPI-^{32}Pi$  (Cooperman, 1982).

Las dos pirofosfatasas citoplásmicas mejor estudiadas son las de *Sacharomyces cerevisiae* y de *E. coli*, en las que se han obtenido avances importantes en el conocimiento de la estructura terciaria de ambas enzimas. Se conoce la estructura cristalográfica con una resolución de 3 Å en la PPIasa de levadura (Terzyan y col, 1984), lo que mostró que la cavidad del sitio activo de la enzima contiene cuatro sitios de unión del ión  $Mg^{2+}$ , que concuerda con el efecto de

este catión durante la cinética de hidrólisis. En la región del sitio activo se encuentran 17 residuos polares de los cuales 15 están conservados en ambas PPIasas citoplásmicas secuenciadas (Cooperman y col, 1992).

Recientemente se obtuvo la estructura de la PPIasa de *E. coli* con una resolución de 2.7Å (Kankare y col, 1994), y se encontró que esta estructura es similar a la de la levadura, excepto por los extremos carboxilo y amino de la enzima de *E. coli* que contienen más aminoácidos: esta enzima presenta en el sitio activo un residuo extra de aspartato en comparación a la de levadura, lo que podría explicar la diferencia del número de metales que se unen a ambas enzimas.

	PM en kDa	SUBUNIDADES	Referencia
<b>EUBACTERIA</b>			
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	56	nd	Nyren y col, 1991
<b>EUCARIONTES</b>			
<i>Arabidopsis thaliana</i> vacuola	75	1	Sarafian y col 1992
Mitocondria de Corazón	I 60	$\alpha$ 28; $\beta$ 30	Volk y col, 1982
	II 185	$\alpha$ 28; $\beta$ 30; $\gamma$ 40; $\delta$ 60	
Mitocondria de Hígado	60	2, 28-35	Vol y Baykov, 1984
Beta Vulgaris	67	1	Sarafian y Poole, 1989
Vigna Radiata (vacuola)	73	1	Maeshima y Yoshida, 1989

Tabla I. Distribución de pirofosfatasas Membranales. PM, Peso Molecular en kDa; S.U. Subunidades; nd, No determinado.

**PIROFOSFATASA DE MEMBRANA.** Dentro de este grupo se conocen: a) de la membrana plasmática de bacterias fotosintéticas; b) de la membrana interna mitocondrial y c) de la membrana de tonoplasto en plantas. No existen reportes de la existencia de esta enzima en vacuolas de animales. La característica distintiva de las pirofosfatasas membranales es que la hidrólisis del PPI se encuentra acoplada a la translocación de protones. El primer reporte de una PPIasa de membrana fue de Baltscheffsky y col (1966a) en la bacteria fotosintética *R. rubrum*. Esta enzima cataliza tanto la hidrólisis del PPI como su síntesis al utilizar el  $\Delta\mu H^+$  generado por el transporte de electrones derivado de la luz. La PPIasa de membrana se ha encontrado en otras 3 especies de bacterias fotosintéticas (Baltcheffsky y Nyren, 1986): En *Rhodobacter viridis* se reportó reducción del succinato en la oscuridad con PPI como fuente de energía. En *Rhodobacter palustris* se demostró actividad de transhidrogenación debida a la hidrólisis de PPI (Schwarm y col, 1986). En cromatóforos de *Chromatium D. sp* se ha observado un cambio electrocrómico del espectro de absorción del caroteno, inducido por la hidrólisis del PPI.

También existe una PPIasa de membrana acoplada al  $\Delta\mu H^+$  generado por la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias de levadura (Mansurova y col, 1975) y mitocondrias de hígado y corazón de res (Volk y col, 1982 y Volk y Mansurova, 1984). El  $\Delta\mu H^+$  generado por la hidrólisis del PPI es capaz de inducir el reverso del transporte de electrones en levadura (Baltscheffsky y Baltscheffsky, 1992). En mitocondrias de *Sacharomyces cerevisiae* se

ha medido la generación de un potencial ( $\Delta\psi$ ) midiendo la distribución del catión permeable tetrafenil fosfonio (TPP<sup>+</sup>) durante la hidrólisis del PPI (Pereira-da Silva y col 1993). En partículas submitocondriales de las regiones apicales de chícharo se ha medido la generación de un  $\Delta\mu\text{H}^+$  generado por la actividad de PPiase, sensible al inhibidor IDP, análogo no hidrolizable del PPI (Vianello y col, 1991).

La pirofosfatasa de membrana de mitocondria de corazón de res presenta un peso molecular de 185 KDa (Matsurova, 1977) y contiene 4 subunidades con la siguiente proporción estequiométrica  $\alpha, \beta, 2\gamma, \delta$ . Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son idénticas a las subunidades  $\alpha, \beta$  presentes en la PPiase denominada de tipo I, la cual es soluble (Volk y col, 1982). La extracción de la PPiase membranal con colato muestra una PPiase soluble de matriz mitocondrial (I) y dos formas membranales de pesos moleculares de 120 KDa (II) y 210 KDa (III), aunque parece que la forma denominada II es tan solo una porción de la III (Mansurova, 1989). La reciente clonación de la PPiase de membrana mitocondria de levadura (Lundin, y col 1991) y su comparación con la secuencia de aminoácidos con las PPiases citoplasmáticas y de la PPiases de membrana de vacuola (Sarafian y col 1992) no mostró homología.

Recientemente se ha descubierto una pirofosfatasa membranal en la membrana vacuolar de plantas y de algas (Rea y Poole 1985). Esta enzima actúa como bomba de protones, acoplada a la hidrólisis del PPI. Su actividad es independiente de la H<sup>+</sup>-ATPasa de vacuola. Ambas enzimas generan un  $\Delta\mu\text{H}^+$  a través de la membrana del

tonoplasto, que en su mayor proporción es  $\Delta\text{pH}$  (3.5 a 4). Este se utiliza para dirigir el transporte de iones y la regulación del pH interno. Recientemente se ha logrado sintetizar ATP por medio de la ATPasa vacuolar utilizando el  $\Delta\mu\text{H}^+$  generado por la pirofosfatasa vacuolar (Schmidt y Briskin, 1993). Estos experimentos fueron llevados a cabo en presencia de un inhibidor de la adenilato cinasa, ya que la actividad de esta última enzima puede interferir con la medida del ATP sintetizado.

La pirofosfatasa vacuolar se ha encontrado en todos los tipos de plantas vasculares (Monocotiledoneas, dicotiledoneas, C3, C4 y tipo CAM; Rea y Sanders, 1987), en el alga unicelular *Acetabularia acetabulum*, en musgos (*Conocephalum corallina*), en helechos (*Osmunda conicum*, *Dryopteris austriaca* Maeshima y col 1994). No existen reportes de este tipo de enzima en vacuolas de animales u hongos, por lo que su distribución aparece restringida a las plantas y a sus ancestros.

La PPIasa vacuolar es capaz de generar  $\Delta\text{pH}$  similares a los generados por las ATPasas en el mismo sistema. La actividad específica de la enzima purificada alcanza hasta los 20  $\mu\text{mol}$  de PPI hidrolizado/ mg proteína·min. Su número de recambio va desde 34 a 82  $\text{s}^{-1}$ . Su abundancia relativa es del 5 al 10% de la proteína total de la vacuola, mientras que la ATPasa vacuolar es del 10 al 15% (Rea y col 1993).

Se ha purificado la PPIasa vacuolar de betabel (Sarafian y Poole, 1989), frijol mungo (Maeshima y Yoshida 1989) y sus pesos moleculares, determinados por electroforésis en condiciones

desnaturalizantes, son de 73 y 67 KDa respectivamente.

El substrato de esta enzima es el  $Mg_2$ -PPI, a diferencia de la de la PPIasa de membrana de bacteria fotosintética, donde el substrato es Mg-PPI. Se activa por el  $Mg^{2+}$  y es inhibida competitivamente por el PPI (Leigh y col 1992). Requiere del ión  $K^+$  para sus actividad, por lo que se supone que la enzima no solamente transloca  $H^+$  sino que realiza un co-transporte  $H^+/K^+$ , lo cual se ha visto por estudios de fijación de voltaje, ya que cuando el  $K^+$  es adicionado en la región citosólica de la enzima, se observa una activación de la corriente generada por la PPIasa, (Davies y col, 1991). La PPIasa vacuolar de *Chara corallina* presenta estimulación por cationes monovalentes como el  $Cs^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$  y la colina<sup>+</sup> y es inhibida por el anión  $F^-$ . (Takeshinga y Hager, 1988).

La  $H^+$ -PPIasa vacuolar es inhibida por DCCD y por análogos del PPI como el IDP y por NEM de manera similar a como ocurre en la  $H^+$ -PPIasa de *R. rubrum* (Baltscheffsky y Baltscheffsky 1992).

El gen de esta enzima se ha clonado y secuenciado partir de las siguientes fuentes: *Arabidopsis thaliana* (Sarafian y col, 1992) y *Hordeum vulgare* (Tanaka y col, 1993), lo que ha permitido conocer su estructura primaria. Su peso molecular es de alrededor de 80 KDa. Existe una divergencia en cuanto al PM determinado por electroforésis y el determinado a partir de la secuencia de aminoácidos, que se debe a la alta hidrofobicidad de la proteína. Los modelos de estructura secundaria predicen la formación de 13 y 12 cruces transmembranales. Entre ambas pirofosfatasas vacuolares se presenta una similitud del 85% y no presentan homología con las

pirofosfatasas citoplásmicas. Anticuerpos anti-PPiase vacuolar no muestran reacción cruzada con las PPiases de mitocondria o levadura, pero sí presentan reacción cruzada con la PPiase vacuolar del frijol mungo y de la PPiase de membrana de *Rhodospirillum rubrum*, lo cual puede indicar una similitud estructural y en el origen de las PPiases de vacuolas y de bacterias fotosintéticas.

#### **PIROFOSFATASA DE MEMBRANA DE *Rhodospirillum rubrum***

La PPiase de membrana de *R. rubrum* no solo hidroliza al PPI, también lo sintetiza con la energía derivada de la cadena de transporte de electrones fotosintética. Se ha encontrado actividad de pirofosfatasa en membranas de *R. rubrum* crecidas en condiciones respiratorias en la oscuridad (Romero y col 1991).

La PPiase es una enzima muy parecida a la ATPasa, en el sentido de que se encarga de hidrolizar la unión fosfoanhidro del PPI, por lo que se pensó en algún tiempo que era una reacción parcial de la ATPasa. Sin embargo las siguientes pruebas evidenciaron que es una enzima diferente:

- La PPiase es insensible a oligomicina (Baltscheffsky y col, 1967b) el inhibidor específico de la ATPasa.
- Fisher y Guillory (1969) lograron separar la actividad de la ATPasa de la actividad de la PPiase con inhibidores específicos: con cloruro de litio 2 M se inhibe la ATPasa mientras que con 3.1% de butanol se inhibe la PPiase. De esta manera, se concluyó que son dos sistemas enzimáticos diferentes acoplados al gradiente de potencial electroquímico protones.

- Johansson (1975), inhibió la actividad de H<sup>+</sup>-ATPasa con anticuerpos monoespecíficos, sin modificar la actividad de la PPiase.

- En cromatóforos de *R. rubrum*, que contienen actividad tanto de ATPasa como de PPiase, Keister y Minton (1979) demostraron la síntesis de ATP por un gradiente electroquímico de protones generado durante la hidrólisis del PPI; por esta razón no se encontró el fosfato marcado del <sup>32</sup>PPI en el fosfato gamma del ATP. De esta manera, se concluyó que la PPiase de membrana es un sistema enzimático diferente a la ATPasa, acoplado al gradiente electroquímico de protones. Con respecto a la actividad hidrolítica de la PPiase de membrana de la bacteria fotosintética *R. rubrum*, se sabe que está acoplada a muchos procesos dependientes de energía (Fig. 3) tales como: la reversa de transporte de electrones (Baltscheffsky y col, 1968); la formación de un gradiente de potencial eléctrico evidenciado por el corrimiento electrocrómico del espectro de absorción del caroteno (Baltscheffsky y col, 1969); la alcalinización del espacio externo del cromatóforo (Moyle y col, 1976); el transporte de iones (Isaev y col, 1970); las reacciones de transhidrogenación (Keister y Yike, 1967); la síntesis de ATP dependiente de la energía del gradiente de potencial electroquímico de protones generado por la H<sup>+</sup>-PPiase (Keister y Minton, 1971). La PPiase de membrana de *R. rubrum* es capaz de sintetizar PPI, como respuesta a la formación de un gradiente de potencial químico ( $\Delta\mu$ ), o a la presencia de un potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) generado por un gradiente de iones K<sup>+</sup> (Strid y col, 1987). Estas evidencias

demonstraron que la PPIasa es una enzima que cataliza la translocación electrogénica de protones en un proceso totalmente reversible. La PPIasa de membrana de *R. rubrum* cataliza dos reacciones: a) hidrólisis del PPI; b) síntesis del PPI; y es posible medir dos reacciones parciales: el intercambio Pi-PPI y el intercambio Pi-H<sub>2</sub>O. El estudio de las reacciones de intercambio ha sido muy útil, porque ha permitido conocer los pasos intermedios de la actividad de síntesis e hidrólisis del PPI.

**a) Actividad de PPIasa (hidrólisis).**

La hidrólisis del PPI requiere del catión divalente Mg<sup>2+</sup>, para formar el substrato, como para activar a la enzima (Randahl, 1979 y Celis y col, 1985). Estudios de Celis y Romero (1987), sobre el efecto de los cationes divalentes y de los protones en la actividad de PPIasa y de intercambio Pi-PPI, indican que el Zn<sup>2+</sup>, a bajas concentraciones, es un buen sustituto del Mg<sup>2+</sup> en la hidrólisis, mientras que otros cationes divalentes como el Ca<sup>2+</sup> y el Fe<sup>2+</sup>, no substituyen al Mg<sup>2+</sup>. El pH óptimo para la reacción de hidrólisis en el cromatóforo de *R. rubrum* es de 6.5, mientras que el pH óptimo para la reacción de intercambio Pi-PPI es de 7.5. Se ha visto (Celis y Romero, 1987) en la reacción de intercambio Pi-PPI que la Km para el Pi varia con el pH, por lo que se concluye que los cationes divalentes y los protones juegan un papel importante en las modulaciones cinéticas de la enzima. La oligomicina (inhibidor específico de la ATPasa) no modifica la actividad de la PPIasa en *R. rubrum* (Baltscheffsky y col, 1968). La actividad de PPIasa es

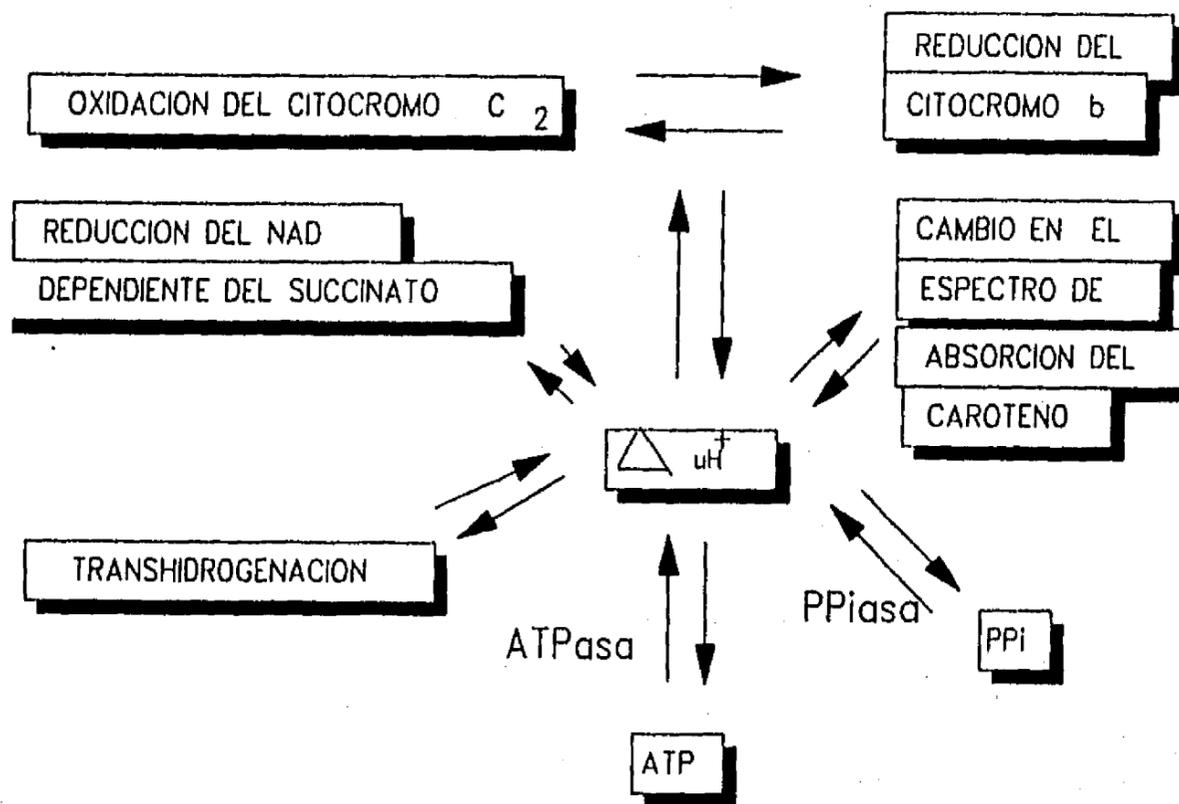


Figura 4. Esquema de las reacciones acopladas a la pirofosfatasa de membrana a través del gradiente electroquímico de protones

inhibida por la diciclohexil carbodiimida (DCCD), fosfato (Pi), y arsenato, mientras que la gramicidina, el 2-4 dinitrofenol (2-4 DNP) y el FCCP, que colapsan el gradiente de potencial electroquímico de protones, estimulan la actividad de hidrólisis (Baltscheffsky y col, 1966b; Baltscheffsky, 1986; Nyren y col 1984). Análogos del substrato como el metilendifosfato (MDP) y el imidodifosfato (IDP) y el antibiótico Dio-9 son inhibitorios. Randahl (1979) observó que los reactivos específicos de grupos-SH, ejercen una inhibición a 0°C, mientras que a 30°C, casi no inhiben. Esto podría explicarse como resultado de cambios conformacionales dependientes de temperatura, lo que traería como consecuencia la exposición de los grupos -SH de la proteína. Nishikawa y col (1973) han visto que la actividad de PPiase disminuye en la luz a pesar de que existan condiciones de baja síntesis de PPi. Se ha visto que el Li<sup>+</sup>, el Na<sup>+</sup> y el K<sup>+</sup> estimulan la actividad de PPiase. La PPiase de membrana, al igual que la ATPasa, es una enzima que depende de fosfolípidos particulares de la membrana, ya que bajo la acción de la fosfolipasa A, la actividad disminuye, y al agregar fosfolípidos totales de soya ésta se recupera (Klemme y col, 1971b), aunque la dependencia de lípidos no es específica, porque la cardiolipina, fosfatidil colina o inclusive el Triton X-100, estimulan la actividad de la enzima purificada (Nyren y col, 1991).

El Mg<sup>2+</sup> libre es un activador esencial para la actividad de hidrólisis, ya que se requiere este ión para la formación del complejo ternario: Mg<sup>2+</sup>-PPiase-(Mg-PPi) que es el complejo catalítico. Desde el punto de vista cinético presenta un mecanismo

secuencial ordenado en la formación del complejo catalítico, ya que se une el  $Mg^{2+}$  libre a la enzima antes que el Mg-PPi (Sosa y col 1992).

La enzima se protege de la desnaturalización térmica en presencia de  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ . Además, estos iones activan a la enzima cuando se preincuba a  $65^{\circ}C$ , lo que nos habla de la importancia de estos iones para la actividad y estabilidad de la enzima (Ordaz y col 1992). Por tal motivo, se realizaron estudios de modificación química de la enzima con las carbodiimidias hidrosolubles EDC y CMC, que reaccionan con grupos carboxilo. Los resultados sugirieron que existe al menos un carboxilo esencial en el sitio activo de la enzima, el cual tiene probablemente un papel en el pegado del  $Mg^{2+}$  libre (Romero y Celis, 1992). Esto se demostró por: la completa inactivación de la enzima con EDC, y la protección de la inactivación en presencia de  $Mg^{2+}$ , PPi o el Mg-PPi.

#### **b) Síntesis del PPi.**

La síntesis del PPi se lleva a cabo en condiciones de iluminación, y en presencia de desacoplantes (FCCP, valinomicina) se inhibe esta reacción. En presencia de NaF 10 mM se inhibe el 40% de la actividad original (Nyren y col, 1986).

Guillory y Fisher (1972), estudiaron el efecto de la intensidad luminosa sobre la síntesis del ATP y del PPi. Se observaron velocidades máximas de síntesis de PPi a intensidades luminosas menores que las requeridas para el ATP. El pH óptimo para esta actividad es de 7.5.

Strid y col, (1987) generaron gradientes de potencial eléctrico con el ion  $K^+$  ( $\Delta\psi$ ), y gradientes de protones en los cromatóforos de *R. rubrum*, logrando las síntesis del PPI y del ATP, ya que los cromatóforos contienen ambas actividades. Al respecto concluyeron: i) el número de protones translocados para formar ATP o PPI es diferente y ii) es necesario que la ATPasa se active por el potencial de membrana para que se de la síntesis del ATP, a diferencia de la PPIasa, que con bajos valores de potencial de membrana (respecto a la ATPasa) es capaz de sintetizar al PPI.

En la síntesis del PPI y del ATP se utiliza el gradiente potencial electroquímico de protones generado por la cadena de transporte de electrones fotosintético, mientras que en la oscuridad, se puede inducir el transporte reverso de electrones, ya sea con ATP o con PPI, provocando la oxidación del citocromo  $C_2$  y la reducción del citocromo b.

### **c) Intercambio Pi-PPI.**

La actividad del intercambio del Pi con el PPI presenta el mismo pH óptimo que la actividad de síntesis (7.5), ya que este tipo de intercambio, es una reacción parcial que se observa cuando se incuban los cromatóforos en condiciones favorables para la síntesis. Esta actividad fue descubierta por Keister y Minton (1971b) en los cromatóforos de *R. rubrum*.

La reacción se inhibe por desacoplantes de la fosforilación tales como el p-triclorometoxi carbonil-cianuro-fenilhidrazona (CCCP) y el antibiótico S-13, y se estimula por oligomicina. Se

inhibe por adición de ADP. Los protones y los cationes divalentes ejercen un papel modulador en las propiedades catalíticas de la enzima (Celis y Romero, 1987), ya que el pH afecta la  $K_m$  para el  $P_i$  y para el  $Mg^{2+}$ . Algunos cationes divalentes como el  $Mn^{2+}$  y el  $Co^{2+}$  son substitutos del  $Mg^{2+}$  para formar el substrato (con un 50% de la actividad obtenida con el  $Mg^{2+}$ ), mientras que el  $Ca^{2+}$  y el  $Zn^{2+}$ , no sustituyen al  $Mg^{2+}$  en la reacción. Por otro lado, los requerimientos de  $Mg^{2+}$  añadido a la reacción son mayores que para la actividad hidrolítica (Celis y col, 1985). Los mismos autores demuestran que el substrato para la actividad de recambio es el  $MgHPO_4$ , ya que existe una correlación entre el incremento de la actividad de recambio y el aumento en la concentración de  $MgHPO_4$ , por lo que este es probablemente el substrato para la síntesis, con una  $K_m$  de 1.5 mM en la reacción de recambio. Se ha visto que para la actividad de recambio el  $Mg^{2+}$  libre es importante y probablemente juega un papel activador.

### c) Intercambio $P_i-H_2O$ .

Los cromatóforos de *R. rubrum* catalizan un rápido recambio del oxígeno del pirofosfato por el oxígeno del agua. Esta es inhibida por inhibidores de la PPiase de membrana, como el fluoruro y el metilendifosfato (Harvey y Keister 1981). Se requiere de  $MgCl_2$  en una relación  $MgCl_2/P_i$  de 0.8 para alcanzar las velocidades óptimas. Harvey y Keister (1981), utilizando inhibidores específicos, encontraron que esta actividad de intercambio en la bacteria fotosintética *R. rubrum*, se debe exclusivamente a la PPiase

membranal, a pesar de que la ATPasa tiene el potencial suficiente para llevarla a cabo.

El desacoplante CCCP no presenta un gran efecto sobre la reacción, por lo que podría sugerirse que el intercambio  $\text{Pi-H}_2\text{O}$  no depende de un gradiente de protones. Esto parece estar apoyado por el hecho de que la luz no estimula el recambio.

## CAPITULO II.

### MATERIALES Y METODOS

#### CULTIVO DE LAS BACTERIAS

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

#### MEDIOS DE CULTIVO

Los cultivos de esta bacteria se realizaron en medio sólido y líquido:

A) MEDIO SOLIDO: En un volumen final de 1 litro se disuelven:

Extracto de Levadura o de Carne.....3 g

Peptona de gelatina.....2 g

Agar Bacteriológico.....1 %

El medio se esterilizó en el autoclave durante 15 min en frascos de tapa con rosca de 20 mL de volumen, que contuvieron solamente 10 mL de medio.

B) MEDIO LIQUIDO: Se preparó el medio líquido de acuerdo al método de Cohen-Bazire y col (1957), el cual es una modificación del propuesto por Hutner (1950). El medio de cultivo requirió preparar las siguientes soluciones:

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

N(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>3</sub> .....	20.0 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	28.9 g
CaCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O.....	8.7 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O.....	0.185 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.195 g
Solución de Metales "44".....	100 mL

Se ajusta a un pH de 6.8.

La solución de metales "44" que se utiliza contiene:

EDTA.....	2.5 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	5.0 g
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	11.0 mg
MnSO <sub>4</sub> .....	1.54 mg
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O.....	1.37 g
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O.....	0.392 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O.....	0.248 g
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 6H <sub>2</sub> O.....	0.177 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	aprox. 4 gotas

La solución se afora a 1 L con agua destilada y se ajusta el pH a 6.8.

ii) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136.08g se aforan a 1L con agua destilada. se ajusta el pH a 6.8.

iii) Acido succínico, 100g se aforan a 1L con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8.

iv) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100g se aforan a 1L con agua destilada.

v) NaCl, 50g se aforan a 1L con agua destilada.

vi) Acido L-glutámico, 25g se aforan a 250 mL con agua destilada.

vii) Acido L-aspártico, 5g se aforan a 250 mL con agua destilada y se ajusta el pH a 6.8.

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

i)	Base Concentrada.....	250.0 mL
ii)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	250.0 mL
iii)	Acido Succínico.....	250.0 mL
iv)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	62.5 mL
v)	NaCl.....	125.0 mL
vi)	Acido L-glutámico.....	25.0 mL
vii)	Acido L-aspártico.....	25.0 mL
viii)	Extracto de Carne.....	12.5 g
ix)	Acido Nicotínico.....	12.5 mg
x)	Tiamina.....	6.25 mg
xi)	Biotina.....	0.125 mg

El medio se ajustó a un pH de 6.8 y se esterilizó en el autoclave durante 45 minutos. Cuando el medio está caliente se

forma un precipitado que se disuelve a temperatura ambiente . El medio es translúcido y de un color amarillo claro.

#### **SIEMBRA DE BACTERIAS.**

La siembra de las bacterias se realizó en placa, en inóculos muy diluidos para formar colonias sencillas. Se tomó una muestra del inóculo para sembrarlas por punción en frascos con medio sólido. Posteriormente se incubaron durante 12 hrs en la oscuridad para consumir el oxígeno debido al crecimiento respiratorio de las bacterias. A continuación se expusieron los inóculos a la luz (focos con filamento de tungsteno de 40 watts colocadas a 30 cm de distancia de los frascos), a una temperatura de 30°C.

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

Se le agrega medio líquido a los frascos de medio sólido y se agitan para desprender alguna colonia. Se guardan los frascos en la oscuridad durante 12 hrs, posteriormente se exponen a la luz a una temperatura de 30°C. A los 6 días aproximadamente se obtiene el cultivo fotosintético, el cual se vacía en matraces de 100 mL con medio líquido, agregando la suficiente cantidad para no mojar el tapón de hule estéril, pero dejando la menor cantidad de aire posible. Se repite de nuevo el ciclo oscuridad-luz indicado para obtener un cultivo en condiciones fotosintéticas. Este procedimiento se repite trasladando el cultivo a un frasco de 1 L

y posteriormente a uno de 9 L.

#### **COSECHA DE BACTERIAS.**

Se procedió a cosechar el cultivo a los 7 días aproximadamente, cuando este alcanzó la fase logarítmica tardía.

La densidad óptica del cultivo de bacterias se detectó con un fotocolorímetro con filtro rojo (fotocolorímetro Klett-Summerson).

La cosecha se realizó por centrifugaciones sucesivas del medio de cultivo a 8,000 x g durante 15 minutos, obteniéndose pastillas de bacterias, las cuales se lavaron dos veces en un amortiguador MOPS 50 mM, KCl 50 mM pH 7.5. De nuevo se centrifugaron a 8,000 x g durante 15 minutos eliminando así los residuos del medio y los desechos. Se determinó el peso húmedo de la pastilla de bacterias y se almacenaron en un refrigerador REVCO a -70°C.

#### **OBTENCION DE LA PREPARACION DE MEMBRANA DENOMINADA CROMATOFOROS.**

Se obtuvieron los cromatóforos (Fig. 5) a partir de las bacterias de acuerdo con el procedimiento reportado por Baccarini-Melandri y col, (1978):

-Se resuspenden las bacterias en un amortiguador Hepes-KOH 10 mM, pH 7.4 en una relación de 1:10 (peso:volumen), se homogenizan y se les agrega MgSO<sub>4</sub> y DNAasa, ésta última en proporción de 1 mg por 100 g de peso húmedo de bacterias.

-Se ejercieron cambios de presión con la prensa de French (desde 20000 psi a presión atmosférica), con lo que se rompe la pared de

la bacteria. El cilindro de la prensa de French se enfría previamente para evitar que se caliente la muestra.

-Se centrifugan a 20,000 x g durante 20 min, para remover las células sin romper, pared de la bacteria que quedan en el precipitado.

-Se toma el sobrenadante y se centrifuga a 100,000 x g durante 80 min.

-El precipitado de cromatóforos se resuspende en un amortiguador Hepes-KOH 10 mM pH de 7.2 en presencia de EDTA 5 mM y EGTA 2mM, para remover los cationes divalentes como el  $Mg^{2+}$  presentes en la preparación y se centrifuga a 100,000 x g durante 80 min.

-El precipitado obtenido se resuspende en Hepes-KOH 10 mM, pH 7.2 se centrifuga a 100,000 x g durante 80 min para lavar el exceso de quelantes.

-Se resuspende la pastilla de cromatóforos en el amortiguador del paso anterior a una concentración de proteína aproximada de 25 mg/mL y se almacena a 4°C por un período no mayor de tres días, tiempo en el que conservan su actividad.

Para realizar los experimentos de generación de  $\Delta pH$  se agregó al medio 100 mM de KCl, para impedir la formación de un potencial de membrana. Los cromatóforos utilizados para determinar la capacidad interna de amortiguamiento se obtuvieron con la prensa de French, se centrifugaron a alta velocidad (110 000 X g), se resuspendieron en KCl 250 mM y se diluyeron 1:40 a partir del volumen original. El procedimiento se repitió al menos dos veces,

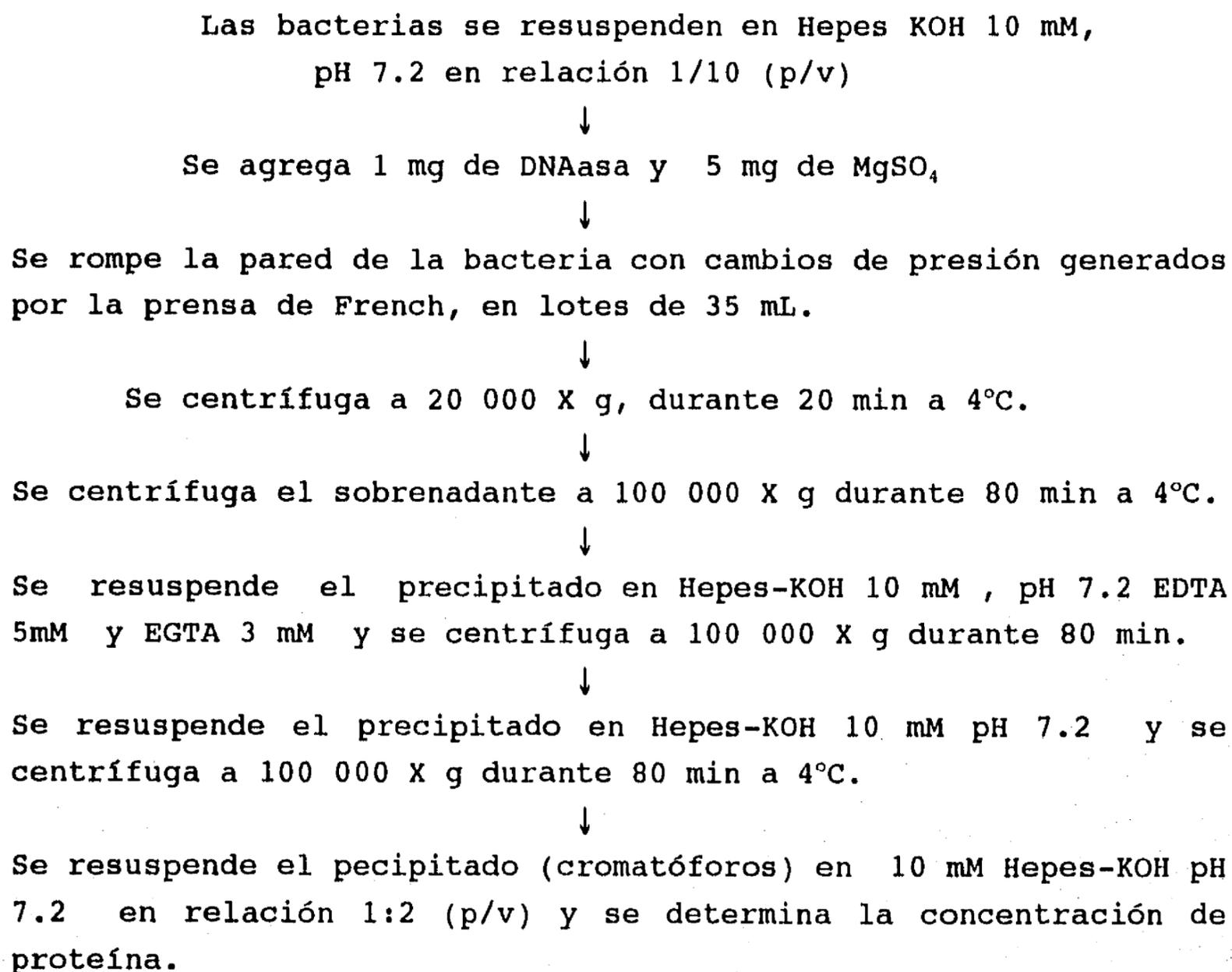


Figura 5. Esquema de la obtención de los cromatóforos.

para diluir el amortiguador Hepes y que éste no influya en la determinación de la capacidad de amortiguamiento propia de la membrana de los cromatóforos.

Para la preparación de los cromatóforos utilizados en la calibración del  $\Delta pH$ , la ruptura de las bacterias se llevó a cabo en presencia del amortiguador Mes (Morfolino-etano-sulfonato) 0.25M, ajustando pH 6.0, 7.0 y 8.0 con KOH. Este amortiguador se incluyó en los subsiguientes pasos de la obtención de cromatóforos indicados.

La preparación de los cromatóforos se utilizó durante los dos siguientes días de su obtención, ya que durante este período no disminuye ni la actividad de hidrólisis ni la actividad de translocación de protones.

#### **DETERMINACION DE PROTEINA.**

La cantidad de proteína para los ensayos se determinó por el método de Lowry y col., (1951), con albúmina de suero de bovino (BSA) como estandar. El método presenta un intervalo de sensibilidad de detección de 0 a 400  $\mu g$  de proteína/mL.

#### **DETERMINACION DEL CONTENIDO DE BCL**

El contenido de bacterioclorofila de los cromatóforos se determinó por la absorción a 770 nm de un extracto de acetona/metanol (7/2, v/v). Los cromatóforos se agitaron vigorosamente en esta mezcla durante dos minutos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga clínica. La

absorbencia del sobrenadante se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 770 nm, contra un blanco de acetona/metanol (Clayton y Siström, 1978).

#### **DETERMINACION DE LA GENERACION DEL $\Delta$ pH**

La formación del  $\Delta$ pH generado en los cromatóforos durante la hidrólisis del PPI o ATP, se determinó con el apagamiento de la fluorescencia de la amina anaranjado de acridina. Esta amina se distribuye libremente a través de la membrana a pH neutro o básico. Como el pH en el interior de la vesícula es ácido, la molécula adquiere un protón y una carga positiva, lo que le impide permear libremente a través de la membrana. Por lo tanto, al aumentar su concentración en el interior de la vesícula se produce un apagamiento de su fluorescencia debido a la formación de complejos que se autoapagan, dependiendo de la magnitud del incremento pH interno en la vesícula.

Los cromatóforos se incubaron en una cubeta de fluorescencia con agitación constante a 30 °C (0.25 o 0.35 mg de proteína/mL). Se generó un gradiente de  $\Delta$ pH durante la hidrólisis del PPI en presencia de 100 mM de KCl, 10 mM de HEPES-KOH, pH 7.2, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0.5 mM de PPI-Na y 2.5  $\mu$ M de anaranjado de acridina. Para determinar la generación de  $\Delta$ pH inducido por la hidrólisis del ATP, se utilizó el mismo medio, excepto que se añadió 4 mM de  $MgCl_2$  y 4 mM de ATP. La reacción se inició por adición de PPI o ATP según fuera el caso. Antes de la adición del substrato se preincubó el medio de reacción con los cromatóforos en la cubeta, hasta que la

señal basal de fluorescencia se mantuvo constante.

La generación del estado estacionario del  $\Delta\text{pH}$  se alcanzó cuando la señal de apagamiento de fluorescencia fue constante a lo largo del tiempo. Este estado se alcanzó en 10 min tanto para la PPIasa como la ATPasa. El estado estacionario fue estable a lo largo del tiempo (12 minutos al menos) para ambas actividades.

La fluorescencia se midió con un espectrofluorómetro AMINCO SLM con una luz de excitación de 429 nm y una luz de emisión de 600 nm, con un sistema de agitación y temperatura constante a 30°C. El estado estacionario del gradiente de pH se inhibió rápidamente con la adición de 3 mM de EDTA para la H<sup>+</sup>-PPIasa y de 5 mM de EDTA para la ATPasa. La velocidad de relajación de gradiente de pH se determinó midiendo la velocidad de recuperación de la fluorescencia, para lo cual se graficaron los cambios en el valor de la fluorescencia con un graficador conectado al fluorómetro, a una velocidad de 1cm/min. La velocidad inicial de recuperación de la fluorescencia fue lineal, por lo que la medición de la pendiente fue realizada manualmente. Se utilizó la curva de calibración (se verá en el siguiente inciso) para transformar los datos de fluorescencia en unidades de pH/min·mg de proteína.

#### **CALIBRACION DEL $\Delta\text{pH}$ .**

La calibración del gradiente de pH versus el apagamiento de fluorescencia se realizó con cromatóforos en presencia 0.25 M de Mes-KOH a pH de 6.0, 7.0 y 8.0. Se agregaron los cromatóforos a una concentración final de 0.25 mg/mL a diferentes cubetas de

fluorescencia que contenían 10 mM Tris-Mes pH 6.0, 0.15M de KCl y 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, en un volumen final de 2.0 mL. El pH del amortiguador se varió pH 6.0 a 10.0, para generar valores de ΔpH desde 0 a 3.0, según el pH interno de la preparación utilizada. Después de la adición de los cromatóforos se observó un apagamiento rápido de la fluorescencia (debido a la generación del ΔpH), seguido de una recuperación lenta de la fluorescencia ya que los protones tienden a regresar a su nivel de equilibrio. Esta recuperación de la fluorescencia se lleva a cabo en 15 minutos. Se agregó NH<sub>4</sub>Cl, que funciona como desacoplante, para colapsar el ΔpH y determinar la línea basal de la fluorescencia. La curva de calibración se construyó utilizando el porcentaje de apagamiento (porcentaje del máximo de apagamiento de la fluorescencia después de la adición de los cromatóforos) con respecto al 100% de fluorescencia (que corresponde a la línea basal después de la adición de NH<sub>4</sub>) con base a la siguiente relación (Schuldiner, 1972):

$$\text{Log } [\%Q / (100 - \%Q)] = \Delta\text{pH} + \text{log } (V_{in} + V_{ex})$$

También se ajustó a una polinomial del tipo  $a + bX + cX^2 + dX^3$ , en donde x corresponde al ΔpH.

#### **DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE AMORTIGUAMIENTO INTERNO DE LOS CROMATOFOROS DE *Rhodospirillum rubrum*.**

La capacidad de amortiguamiento interno de los cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum* se calculó de acuerdo a la metodología de Maloney (1979), con algunas modificaciones para la preparación de

cromatóforos. La preparación de membrana fue diluida 1 a 50 en una solución no amortiguada de 0.5 M de KCl y se centrifugó a 105,000 x g durante 90 min a 4°C. Este procedimiento se repitió al menos dos veces para diluir el amortiguador original en el que estaban preparados los cromatóforos, y este no influya en la determinación de la capacidad de amortiguamiento del sistema. La concentración final de proteína fue de 0.5 a 1.0 mg de proteína/mL en presencia de 0.5 M de KCl.

Previo a la determinación de la capacidad de amortiguamiento interno del sistema, se burbujeó nitrógeno a la preparación, y se le ajustó el pH de la preparación a valores que variaron entre 6.0 y 7.2. El pH no se ajustó a valores más ácidos debido a la agregación que presentan los cromatóforos. Posteriormente se adicionó de 100 a 150 nmoles de H<sup>+</sup> a una solución de 10 mL de cromatóforos no amortiguada. Se registró el cambio de pH con un potenciómetro Beckman conectado a un aplicador de la señal, modelo Radiometer. En los registros, 0.015 unidades de pH correspondieron a un centímetro y se utilizó una velocidad de registro de 1cm/min. Los cambios de pH rápido y lento fueron analizados con base a la metodología de Maloney (1979) para calcular una capacidad de amortiguamiento interno de la membrana de los cromatóforos.

#### **DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA.**

La actividad enzimática se determinó a partir de la cuantificación del fosfato (Pi) liberado, por la hidrólisis del P<sub>2</sub> o de ATP a 30°C en presencia de MgCl<sub>2</sub>. La actividad de hidrólisis

se determinó en la mismas condiciones en que se evaluó la generación de  $\Delta pH$ .

El ensayo se realizó en la obscuridad, para evitar la síntesis del PPI o la generación de  $\Delta \mu H'$  promovida por la energía de la luz, y por tal motivo se utilizó un cuarto iluminado con luz verde (Schiff, 1972). Cuando se determinó el efecto de la generación de un potencial inducido por la luz, se empleo la luz de un proyector Kodack con una lámpara de 100 Watts a 30 cm de la preparación de cromatóforos.

Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo en un volumen de 0.5 mL, agregando 1mg de proteína de cromatóforo por tubo. El medio de reacción contiene, 10 mM de Hepes-KOH pH 7.2, 100 mM de KCl, pirofosfato de sodio, cloruro de magnesio y EDTA necesario para obtener la condiciones que se indican en el pie de figura de las gráficas. La reacción se inició con la adición de enzima (cromatóforos) al medio de reacción. La reacción enzimática se detuvo agregando al medio de reacción 0.1mL de ácido tricloroacético (TCA) al 30 % (p/v). Finalmente se centrifugó el ensayo a 3,000 rpm durante 10min a 4 °C y se determinó en el sobrenadante la cantidad de Pi liberado. Para la determinación de Pi se utilizó el método de Summer (1944), el cual es una modificación del de Fiske y Subbarow (1925), con una curva de calibración de densidad óptica versus nmol de fosfatos de 50 a 1600 nmoles. El método se basa en la formación del complejo de molibdato-fosfato (color amarillo), y su reduccción con sulfato de p-metilamino fenol (ELON), y cambia a una coloración azul. La

absorbencia se determinó a 660 nm de longitud de onda.

Para la cuantificación se realizaron curvas patrones con estandares de  $H_3PO_4$ . La velocidad de hidrólisis se expresó en nmoles de PPI hidrolizado/min·mg de proteína.

#### **CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS METALES, LIGANDOS LIBRES Y LOS COMPLEJOS PRESENTES EN EL MEDIO DE REACCION.**

Para calcular las concentraciones de pirofosfato de sodio, cloruro de magnesio y EDTA necesarias para mantener la concentración del catión libre constante y variar la concentración del complejo Mg-PPI o viceversa, se utilizó el programa de Fabiato (1988). El programa permite calcular, a partir de los equilibrios químicos entre el metal y el ligando.



la concentración del complejo está caracterizado por una constante de asociación:

$$K_s = [ML] / [M][L]$$

donde: M = metal; L = ligando y ML = complejo metal-ligando.

El programa utiliza en su cálculo una serie de aproximaciones sucesivas a través de iteraciones, con el fin de obtener la concentración de metal o ligando libre, partiendo de la concentración del complejo especificado, o bien el cálculo inverso, que consiste en obtener las concentraciones de complejos formados, a partir de las concentraciones de metales y ligandos empleados.

Las constantes de asociación ( $K_s$ ) utilizadas se tomaron de Martell y Sillén (1971) y de Fabiato (1988). El logaritmo de la

constante de asociación es:

Complejo	Log de la $K_s$
PPi H	8.3
PPi H <sub>2</sub>	6.0
PPi H <sub>3</sub>	2.7
PPi H <sub>4</sub>	2.5
PPi-Mg	6.0
PPi-Ca	5.46
IDP-Mg	4.5
IDP-Ca	4.39
EDTA-Mg	4.61

## OBJETIVOS

- Determinar la cinética de translocación de protones de la pirofosfatasa de membrana de *Rhodospirillum rubrum* y compararla con la cinética de hidrólisis.
- Determinar el efecto del ión  $K^+$  en la cinética de la pirofosfatasa de membrana.
- Determinar la estequiometría  $H^+/PPi$  en la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* por dos métodos cinéticos. En el primer método se utilizará el apagamiento de la fluorescencia de anaranjado de acridina para inferir la actividad de translocación de  $H^+$  en el estado estacionario. En el segundo se utilizará un modelo matemático que describe la formación del  $\Delta pH$  en función del tiempo. (Determinar la estequiometría  $H^+/ATP$  de la ATPasa de *Rhodospirillum rubrum* por las mismas metodología cinéticas, como un control interno de la metodología, ya que este valor es conocido para las F-ATPasas).
- Con base en la concentración de  $PPi$  y de  $Pi$  en *Rhodospirillum rubrum*, conocer el  $\Delta G$  total de la hidrólisis del  $PPi$  y con ello hacer inferencias acerca de la direccionalidad de la enzima (hidrólisis o síntesis).

### CAPITULO III.

#### RESULTADOS y DISCUSION.

#### RESULTADOS PRELIMINARES DEL ACOPLAMIENTO ENTRE LA TRANSLOCACION DE PROTONES Y LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA EN CROMATOFOROS DE LA BACTERIA *Rhodospirillum rubrum*.

Una ventaja de trabajar con el sistema experimental de cromatóforos es que el sitio activo de la  $H^+$ -PPiase o de la  $H^+$ -ATPasa se encuentra expuesto hacia el exterior de la vesícula y las membranas se encuentran selladas, lo que permite hacer estudios de generación del  $\Delta pH$  al adicionar los substratos, ya que en ambas enzimas la actividad de hidrólisis se encuentra acoplada a la translocación de  $H^+$ . Como primer punto se determinaron las condiciones para estudiar el acoplamiento entre la translocación de protones y la hidrólisis del PPI. La preparación de cromatóforos se obtuvo por cambios de presión con la prensa de French. Con esta técnica la actividad de hidrólisis de la PPiase se estimuló un 74% en presencia de 2.5  $\mu M$  de CCCP, 1.0 mM de  $Mg^{2+}$  libre, 0.5 mM de Mg-PPi en un amortiguador Hepes 10 mM, pH 7.4, y 36% con la preparación obtenida por el método de sonicación (Tabla 2), ya que probablemente la preparación obtenida por la prensa de French presenta un menor flujo pasivo de  $H^+$  que con la técnica de sonicación.

Se determinó el intervalo de pH óptimo para llevar a cabo los experimentos. Para lo cual se midió la actividad de la pirofosfatasa en un intervalo de pH entre 5.0 y 9.0, en presencia de 40 mM de Hepes-Tris, 100 mM de KCl. Se realizaron los

experimentos en condiciones de acoplamiento y en presencia del desacoplante CCCP ( $2.5\mu\text{M}$ ) para comprobar que el desacoplamiento no tuviera ningún efecto en el pH óptimo de la actividad (Fig. 6). En ambas condiciones se observó que el pH óptimo de la enzima se encuentra en un intervalo entre pH 6.5 y 7.5. En esta región, la actividad de la enzima se estimuló un 80% en presencia de CCCP. Por tal razón se realizaron los experimentos a pH 7.2.

	Prensa de French		
nmol de Pi/min·mg de proteína.	- CCCP	+ CCCP	% Est.
	170	299	74%
	Sonicación		
nmol de Pi/min·mg de proteína.	- CCCP	+ CCCP	% Est.
	186	254	36%

Tabla 2. Estimulación de la actividad de pirofosfata en cromatóforos obtenidos por la prensa de French o por Sonicación en presencia o ausencia de  $2.5\mu\text{M}$  de CCCP.

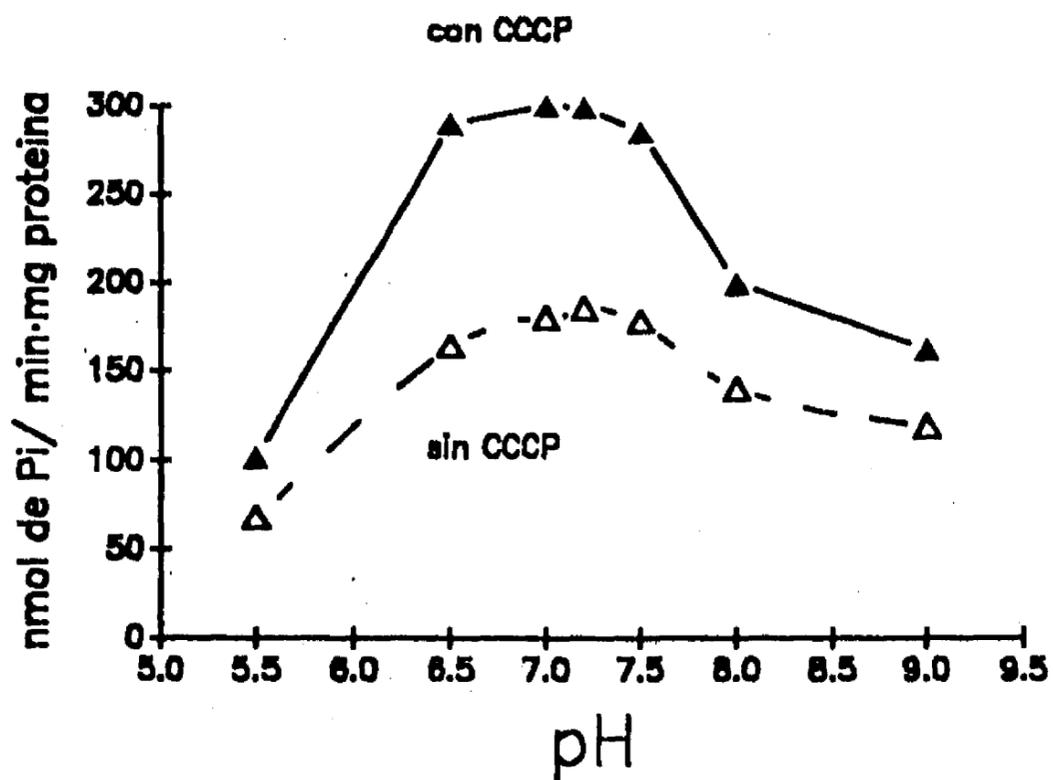


Figura 6. Actividad de pirofosfatasa a diferentes valores de pH, en presencia de Mes-Tris, 40mM, en presencia de 100 mM de KCl en presencia ( $\blacktriangle$ ) o ausencia de CCCP (2,5  $\mu$ M,  $\triangle$ ). La concentración de Mg-PPi fue 0.5 mM y 1 mM de  $Mg^{2+}$ .

## FORMACION DEL $\Delta$ pH EN CROMATOFOROS INDUCIDO POR LA HIDROLISIS DE PPI O ATP.

La adición de Mg-PPI a la preparación de cromatóforos genera un  $\Delta$ pH que fue medido por el apagamiento de la fluorescencia del anaranjado de acridina. Este fluoróforo se acumula en las vesículas dependiendo del incremento del  $\Delta$ pH y se produce un apagamiento de la fluorescencia. La generación del  $\Delta$ pH se indujo con la adición de Mg-PPI (actividad de Pirofosfatasa) o Mg-ATP (actividad de ATPasa), ya que ambas enzimas están presentes en la preparación de cromatóforos. La magnitud del  $\Delta$ pH depende de la concentración de Mg-PPI que se añada en cada caso (ver la sección de cinética de translocación de  $H^+$ ). La adición del análogo del substrato, el Mg-IDP (1.5 mM) produjo una recuperación de la fluorescencia, mientras que el NaF a una concentración de 10 mM, disminuyó el incremento del  $\Delta$ pH. No se probaron concentraciones más altas de NaF, aunque se ha reportado que se requieren concentraciones mayores a 20 mM para lograr una inactivación completa de la actividad, pero esto genera precipitaciones en el medio de reacción (Baltschefsky y Nyren 1986b). El Mg-IDP y el NaF no producen efecto sobre la translocación de protones inducido por la ATPasa. El inhibidor clásico de la ATPasas oligomicina (5 $\mu$ g/mL) produce una recuperación de la fluorescencia cuando el  $\Delta$ pH se genera por la hidrólisis del Mg-ATP, pero no tiene ningún efecto sobre el  $\Delta$ pH generado por la pirofosfatasa. El desacoplante CCCP (2.5  $\mu$ M) produce una recuperación de la fluorescencia en ambos casos, al abatirse el  $\Delta$ pH de los cromatóforos. La adición de EDTA también



produce una recuperación de la fluorescencia, ya que quela al ión  $Mg^{2+}$ , el cual es necesario para la formación del substrato en ambas enzimas (Mg-PPi o Mg-ATP). En el caso de la  $H^+$ -PPiase, el  $Mg^{2+}$  es un activador esencial de la reacción, ya que el complejo catalítico es ternario: (Mg)-Enzima-(Mg-PPi) (Sosa y col 1991). La adición previa del EDTA a la del substrato no permite la generación del  $\Delta pH$ , es decir el EDTA inhibe completamente la actividad de hidrólisis y de translocación de protones en ambas enzimas.

#### **CALIBRACION DEL $\Delta pH$ EN LOS CROMATOFOROS DE *Rhodospirillum rubrum*.**

La curva calibración de la fluorescencia versus el  $\Delta pH$  se realizó por medio de la generación de  $\Delta pH$  artificiales en cromatóforos preparados en presencia de una concentración elevada de Mes-KOH (0.25M), a pH de 6.0, 7.0 u 8.0, en presencia 0.25 M de KCl. Se adicionó la preparación a diferentes medios de reacción con Tris-Mes 10 mM, pH de 6.0 a 10.0, en presencia de 0.15 M de KCl, de manera que se generó un  $\Delta pH$  entre 0 y 3.0 para cada una de las preparaciones de cromatóforos. Es decir el  $\Delta pH$  se generó manteniendo el pH interno constante y cambiando el pH externo. Inmediatamente después de la adición de los cromatóforos a la cubeta de fluorescencia, se registró un apagamiento rápido de la fluorescencia debido a la generación del  $\Delta pH$  (Fig. 8), seguido de una recuperación de la fluorescencia lenta, ya que los protones tienden a regresar a su estado de equilibrio. En esta fase se adicionó 5mM  $(NH)_4Cl$ , el cual funciona como desacoplante y acelera el tiempo en el que se abate el  $\Delta pH$ . Se consideró al porcentaje

máximo de apagamiento de la fluorescencia (Q%), al valor máximo de apagamiento de la fluorescencia después de la adición de los cromatóforos. Se considero como 100% de fluorescencia el valor de esta después de la adición de (NH)<sub>4</sub>Cl que abate la formación del ΔpH. La curva de calibración del cambio de fluorescencia en función del ΔpH se realizó de acuerdo al siguiente razonamiento:

El apagamiento de la Fluorescencia depende:

$$Q \text{ (Apagamiento de la fluorescencia)} = 100\% - Fe/Fd \dots\dots\dots(1)$$

En donde Fe y Fd es la fluorescencia en presencia y ausencia del ΔpH respectivamente. Fe/Fd que es proporcional a la relación de la concentración interna de la amina en presencia de un ΔpH (A<sub>i</sub>) y la concentración interna de la amina en ausencia de ΔpH o en el estado inicial (A<sub>ini</sub>), y también depende de la relación entre el volumen interno entre el externo de la vesícula, V<sub>in</sub>/V<sub>ext</sub> (Shuldiner, y col 1972), es decir:

$$Q = (A_i/A_{ini}) \cdot (V_{in}/V_{ext}) \dots\dots\dots(2)$$

por lo tanto:

$$A_i = A_{ini} (Q/(V_{int}/V_{ext})) \dots\dots\dots(3)$$

$$A_{ext} = A_{ini} - (A_i) \cdot (V_{in}/V_{ext}) = A_{ini} (100\% - Q\%) \dots\dots\dots(4)$$

Por lo tanto, la relación de concentración de la amina interna entre la externa:

$$A_i/A_{ext} = Q\% / (100\% - Q\%) \cdot (V_{in}/V_{ext}) \dots\dots\dots(5)$$

La relación de concentración de la amina esta dada por:

$$A_i/A_{ext} = (K_a + [H^+]_{in}) / (K_a + [H^+]_{ext}) \dots\dots\dots(6)$$

y dado que el valor de la constante de disociación es mucho menor que el valor de la concentración de protones en el interior y

exterior de la vesícula ( $K_a \ll H^{in}$  y  $H^{ext}$ ), esta relación es igual a:

$$A_i/A_{ext} = H^{in}/H^{ext} \dots \dots \dots (7)$$

Finalmente si obtenemos el log y relacionamos la ecuación 5 y 7 tenemos (Haraux y Kouchkovsky, 1980):

$$\log [Q\%/(100\%-Q\%)] = \Delta pH + \log(V_{in}/V_{ex}) \dots \dots \dots (8)$$

Por lo que los registros de apagamiento de fluorescencia (Fig. 8) se graficaron como  $\log [Q\%/(100\%-Q\%)]$  versus el  $\Delta pH$ , en donde la ordenada al origen es el  $\log (V_i/V_{ex})$  (Fig. 9). El  $\Delta pH$  generado a partir de los tres valores de pH interno (6, 7 y 8) dio una relación lineal entre 0 y 2.5 unidades de pH. Por arriba de este valor se perdió la linealidad.

Se realizó el ajuste del valor del cambio de fluorescencia versus el  $\Delta pH$  a una función polinomial:  $\Delta Q\% = a + bX + cX^2 + dX^3$  (Fig. 10), con un coeficiente de regresión no lineal de 0.9966. Para esto se utilizó el programa de computadora Inplot. Es importante hacer esta observación, ya que no es necesario que los datos se ajusten a una relación lineal del primer tipo (Fig. 9). El ajuste a la ecuación 8, solo permite hacer correlaciones en un intervalo lineal hasta un  $\Delta pH$  de 2.5, mientras que la función polinomial permite un ajuste valores cercanos a pH 3 (Fregni y Casadio, 1992).

A partir la Fig. 9, se obtuvo un valor de la ordenada al origen de -1.46, lo que quiere decir que el cociente  $V_{int}/V_{ext}$  corresponde a 0.034, es decir que existen 34  $\mu L$  de volumen interno de cromatóforos por mL total de la preparación. Dado que la concentración de cromatóforos fue de 0.250 mg proteína/mL, el

volumen interno es de 136  $\mu\text{L}/\text{mg}$  de proteína. El valor del volumen interno de la preparación de cromatóforos se ha calculado alrededor de 3.5  $\mu\text{L}/\text{mg}$  de proteína (Shuldiner y col 1974). Estos datos implican que el anaranjado de acridina, en ausencia de un  $\Delta\text{pH}$ , es atrapado en mayor concentración que la amina libre en solución. Sin embargo, esto no invalida la relación lineal de la Fig. 9. En la calibración del apagamiento de la fluorescencia del anaranjado de acridina versus  $\Delta\text{pH}$ , medido en las membranas de tonoplasto de betabel, se determinó un volumen interno de 285  $\mu\text{L}/\text{mg}$  proteína. La determinación directa del volumen en la misma preparación con la resonancia magnética de un nitróxido fue de 6.6  $\mu\text{L}/\text{mg}$  de proteína (Briskin y Niesman, 1990). Por lo tanto probablemente parte de la concentración total de la amina apaga su fluorescencia por la interacción con la membrana. Sin embargo, esto no invalida la relación de la Fig. 9 en los intervalos de 0 a 2.5 de  $\Delta\text{pH}$  (Briskin y Niesman 1991), ya que la amina libre permite hacer la calibración. Realmente no existe el fluoróforo ideal que no presente unión a las membranas. Por ejemplo para la 9-amino acridina, más del 80% de la amina se encuentra unida a membrana, lo que genera un apagamiento de su fluorescencia (Casadio y Melandri, 1984).

#### **DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE AMORTIGUAMIENTO INTERNO DE LOS CROMATOFOROS DE *Rhodospirillum rubrum*.**

La determinación de la capacidad de amortiguamiento interno de los cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*, se calculó de acuerdo a

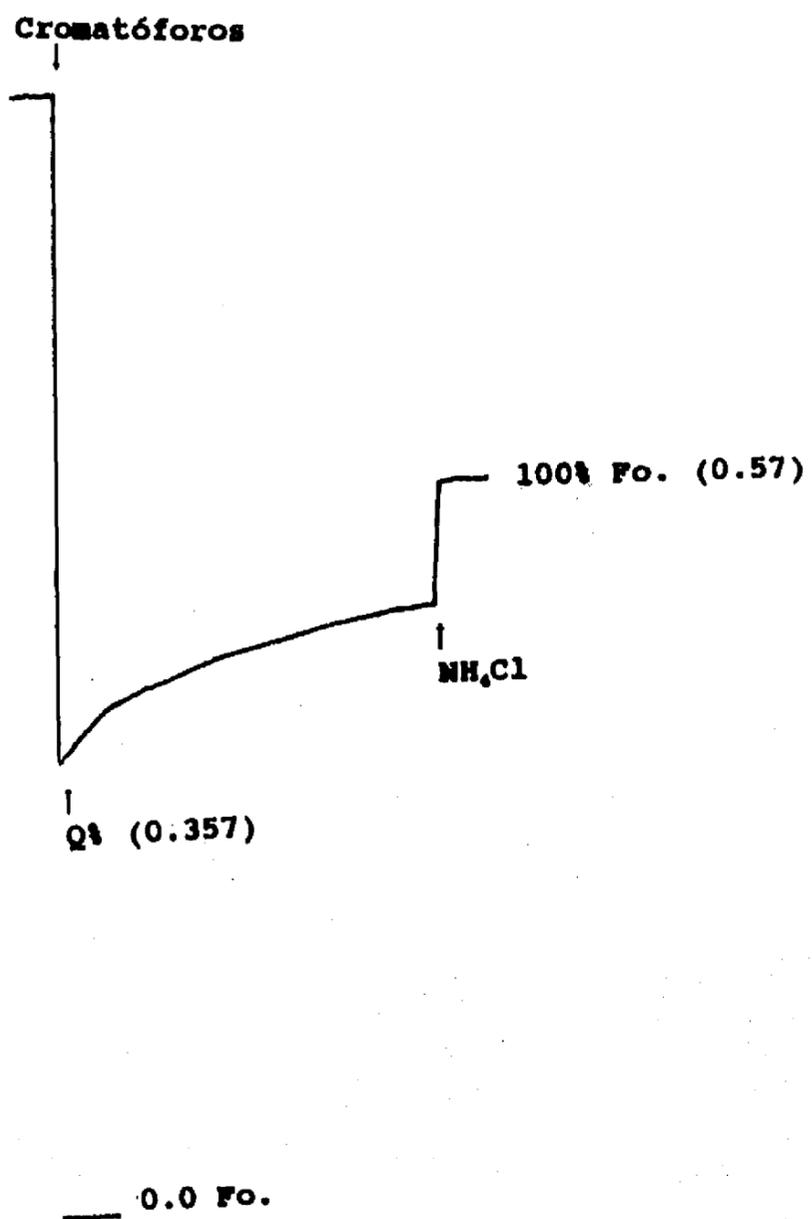


Figura 8. Apagamiento de Fluorescencia al adicionar cromatóforos (0.25 mg de proteína/ mL), preparados en KCl 0.25 M Mes KOH 0.25 M pH 6.0 en un medio con Tris-Mes 10 mM, pH 7.0 250 mM de KCl.

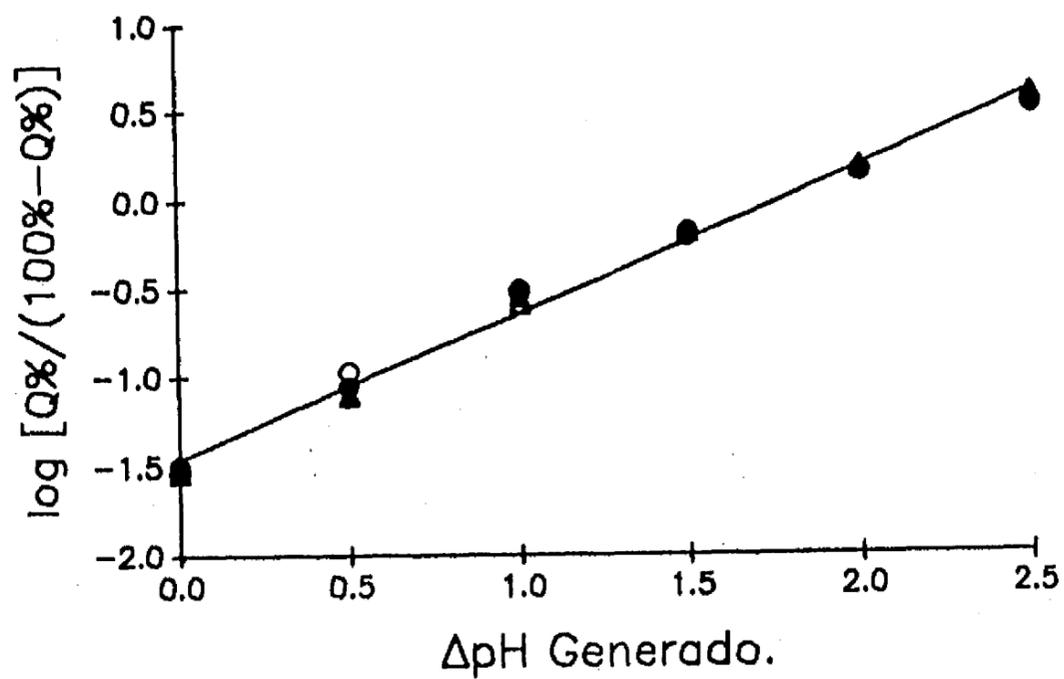


Figura 9. Calibración de la curva de  $\log [Q\%/(100\%-Q\%)]$  versus el  $\Delta\text{pH}$  generado artificialmente. Los cromatóforos se cargaron con 0.25 M de Mes-KOH pH 6.0 (o, o), 7.0 (▲) y 8.0 (Δ). El cambio en el pH externo fue realizado como dice en materiales y métodos. se agrego 0.25 (o) o 0.35 (o) mg de proteína/mL.

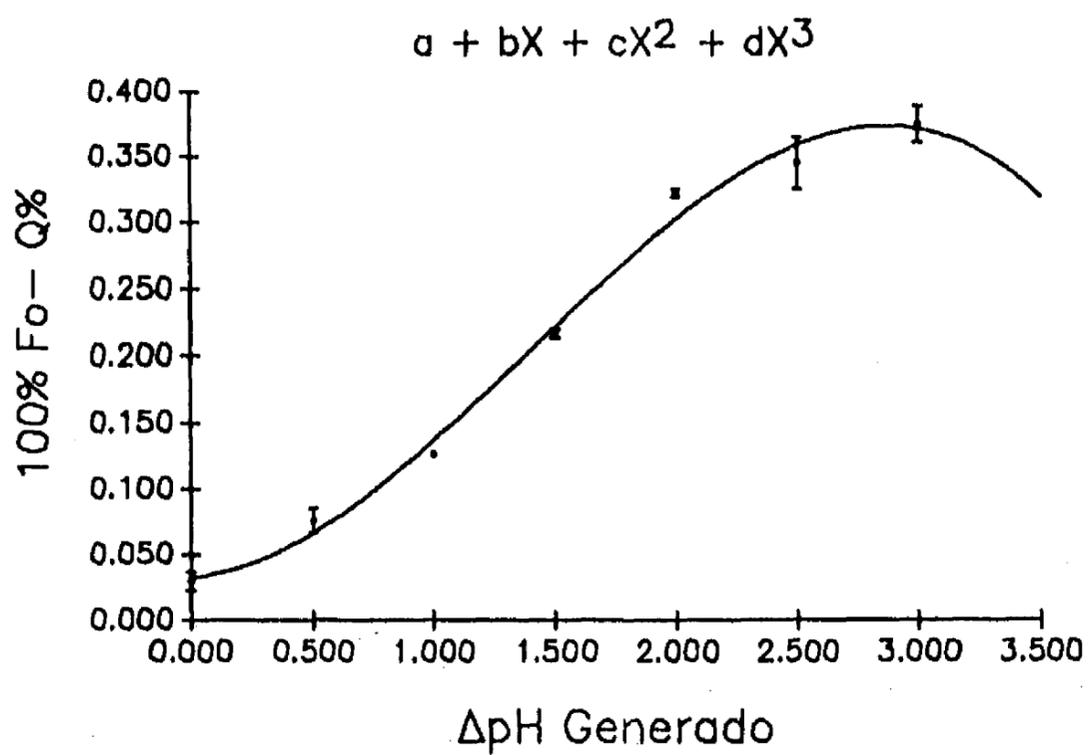


Figura 10. Calibración del apagamiento de la fluorescencia versus el  $\Delta\text{pH}$  generado, ajustado a una polinomial de la forma  $a+bX+cX^2+dX^3$ . las condiciones experimentales son las mismas de la figura anterior.

la metodología de Maloney (1978), que consiste en adicionar una cantidad conocida de protones (100 a 150 nmol) a una solución no amortiguada de la preparación de membrana y registrar los cambios de pH. Cuando se adicionaron los protones se produjo un cambio instantáneo en el pH (Fig. 11). Al generarse un desbalance en la concentración de H<sup>+</sup> a ambos lados de la membrana, estos tienden a regresar a su estado de equilibrio, por lo que los protones se transportan al interior del cromatóforo y el pH regresa asintóticamente a un valor dado (Fig. 11). Podemos relacionar la capacidad de amortiguamiento externo del sistema como la cantidad conocida de protones adicionada entre el cambio de pH instantáneo ( $\Delta H^+ / \Delta pH_0^a$ ). La capacidad de amortiguamiento total del sistema se define como la cantidad de protones adicionados entre el cambio del pH a tiempos largos, cuando se establece el equilibrio ( $\Delta H^+ / \Delta pH_0^w$ , Mitchell y Moyle, 1966).

Dado que la capacidad de amortiguamiento se expresa:

$$Cam_{tot} = Cam_{in} + Cam_{ext} \dots \dots \dots (9)$$

Entonces la capacidad de amortiguamiento interno es igual al valor de la capacidad de amortiguamiento total menos la externa.

$$Ca_{in} = Cam_{tot} - Cam_{ext} \dots \dots \dots (10)$$

Para obtener el valor de  $\Delta pH_0^a$  los datos se ajustan a una función exponencial decreciente ( $\Delta pH = \Delta pH_0^a e^{-kt}$ ) de donde se extrapola este valor. Otra forma posible de obtenerlo es a partir de la siguiente relación (Mitchell y Moyle, 1966):

$$\ln (pH^w - pH_0) = -Kt + \ln (pH^w - pH_0^a) \dots \dots \dots (11)$$

El valor de  $\Delta pH^w$  se obtuvo a partir del ajuste de la función

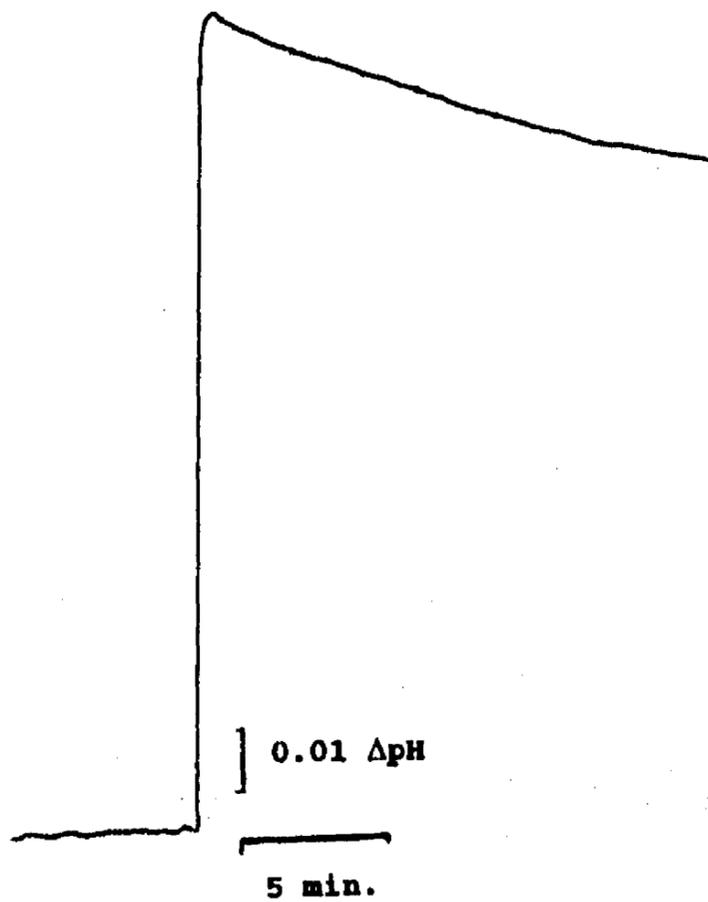


Figura 11. Cambio en el pH externo al adicionar 150 nmol de  $H^+$  a una preparación no amortiguada de cromatóforos a pH 6.5. Se conecto el potenciómetro a un amplificador donde el cambio en 0.015 unidades de pH correspondieron a un 1 cm de longitud.

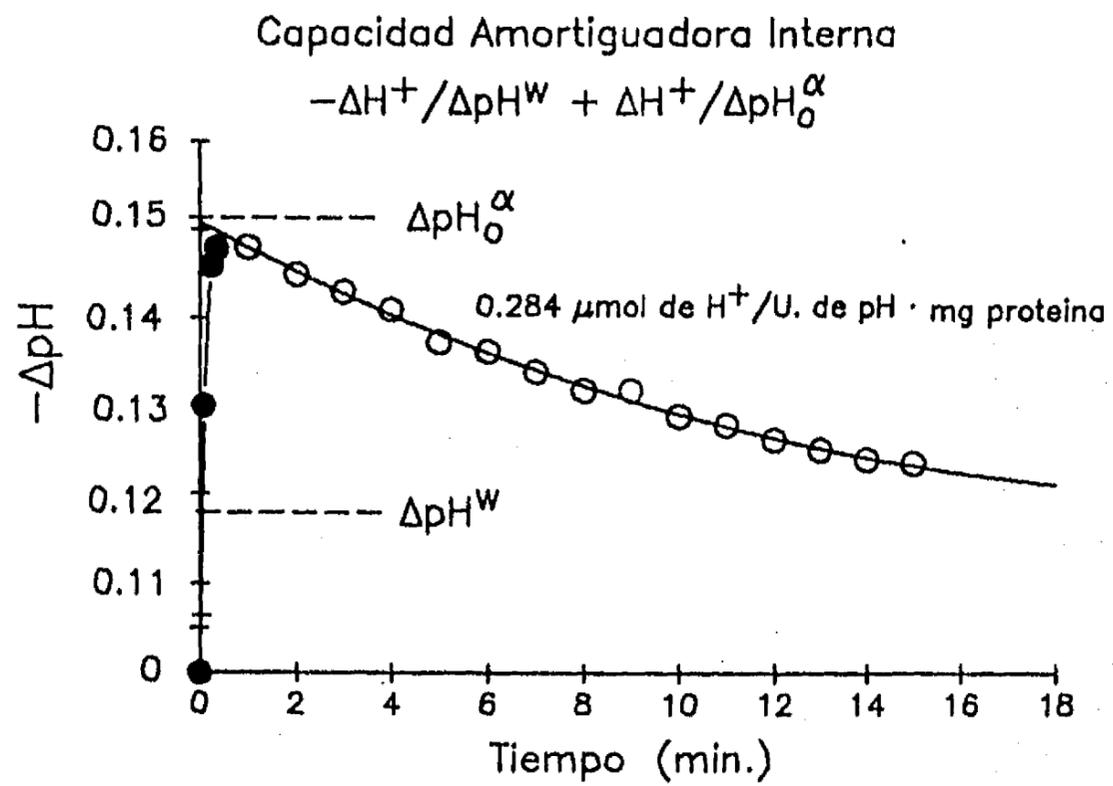


Figura 12. Calculo de la capacidad de Amortiguamineto interno de acuerdo a la metodología de Maloney, 1976. Las condiciones experimentales están indicadas en materiales y métodos.

exponencial a tiempos largos cuando se alcanza un valor asintótico en el  $\Delta\text{pH}$ , o bien, se puede obtener a partir de la relación:

$$\ln [(pH^w - pH_o)/(pH^w - pH_o^a)] = K t \dots \dots \dots (12)$$

Se calculó la capacidad de amortiguamiento interno de los cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*, en un intervalo entre pH 6.0 y 7.2. Se graficó el  $-\Delta\text{pH}$ , ya que el cambio de pH al adicionar ácido dio valores negativos (Fig. 12). No fue posible llevar a cabo estos experimentos a valores de pH más ácidos, debido a la agregación de las membranas que presentan los cromatóforos (García y Drews, 1984). La capacidad de amortiguamiento interno fue de 0.284  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}^+$ /unidades de  $\text{pH} \cdot \text{mg}$  de proteína. Este valor concuerda con el calculado para las membranas de *Neurospora crassa* (0.26  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}^+$ /unidades de  $\text{pH} \cdot \text{mg}$  de proteína) y de *E. coli* (0.3  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}^+$ /unidades de  $\text{pH} \cdot \text{mg}$  de proteína) y es mayor que el calculado para las vesículas de tonoplasto de betabel (0.2  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}^+$ /unidades de  $\text{pH} \cdot \text{mg}$  de proteína). Es importante hacer notar que este valor es más grande en bacterias que en organelos, precisamente porque estos organismos presentan cambios importantes en el pH del medio (Padan y Shuldiner, 1986).

**DETERMINACION DE LA ESTEQUIOMETRIA  $\text{H}^+$ /PPi UTILIZANDO LA VELOCIDAD DE RELAJACION DEL  $\Delta\text{pH}$  PARA INFERIR LA VELOCIDAD INICIAL DE TRANSPORTE DE PROTONES.**

La determinación de la estequiometría  $\text{H}^+$ /substrato de una enzima acoplada al transporte del ion durante hidrólisis del substrato puede determinarse por métodos cinéticos o métodos termodinámicos.

Estos últimos se basan en tener una buena estimación del  $\Delta\mu\text{H}^+$ , y en conocer el  $\Delta G_{\text{Tot}}$  de la reacción, por lo que se necesita el valor del  $\Delta G^\circ$  estándar de la reacción y de las concentraciones de productos y reactivos en el sistema. De manera que, a partir de la relación:

$$\Delta G_{\text{Tot}} = n \Delta\mu\text{H}^+ \dots \dots \dots (13)$$

donde "n" es igual a la estequiometría  $\text{H}^+$ /substrato. Este tipo de estudios deben realizarse en el equilibrio. Y los resultados dependen del flujo pasivo para los protones, que es factor presente en las membranas biológicas, y puede ser una fuente de error en las determinaciones realizadas por métodos termodinámicos.

Los métodos cinéticos se basan en determinar la velocidad de translocación de protones, para lo cual se utiliza un reactivo que mida los cambios de  $\Delta\text{pH}$  en el sistema para estimar la velocidad de translocación de protones. Bajo las mismas condiciones experimentales se determina la velocidad de hidrólisis del substrato, al cual esta acoplado el transporte del ion. Si se divide la velocidad de translocación de protones entre la hidrólisis del substrato se obtiene el valor de la estequiometría. Los métodos cinéticos tienen la ventaja de que en el cálculo de la estequiometría se toma en cuenta el flujo pasivo de protones, por lo que se elimina un posible factor de error en la medición.

En el primer método cinético se utilizó el fluoróforo anaranjado de acridina para determinar la generación del  $\Delta\text{pH}$ . Los cromatóforos se incubaron en presencia de  $2.5 \mu\text{M}$  de anaranjado de acridina, y la adición de  $\text{Mg-PPi}$  produjo un apagamiento de la fluorescencia debido a la translocación de  $\text{H}^+$  al interior del cromatóforo y la

generación de un  $\Delta\text{pH}$ . La magnitud del  $\Delta\text{pH}$  fue determinado por medio de la curva de calibración realizada (Fig. 9). Las condiciones experimentales fueron 10 mM de HEPES-KOH, pH 7.2, a 30°C, en presencia de 100 mM de KCl (interno y externo) para reducir la formación de potencial de membrana (Perlin, 1984, Casadio y Melandri, 1984). La magnitud del  $\Delta\text{pH}$  fue de 2.4 unidades de  $\Delta\text{pH}$  para ambas enzimas a las concentraciones de sustrato utilizadas.

Es importante hacer notar que la generación del estado estacionario en la formación del  $\Delta\text{pH}$ , no está limitado por la hidrólisis del PPI (Fig. 13), ya que se alcanzó el estado estacionario del  $\Delta\text{pH}$  aproximadamente de 10 a 12 minutos, mientras que la velocidad de hidrólisis se mantiene constante hasta los 24 minutos. Esto es un factor fundamental en la determinación de la estequiometría por métodos cinéticos (Perlin y col, 1986).

Si se desea medir la velocidad de generación del  $\Delta\text{pH}$  en los primeros segundos, la velocidad inicial del apagamiento de la fluorescencia está determinado por los protones translocados al interior del cromatóforo, menos la fuga de protones. Por pequeño que sea este valor daría lugar a un error. Por lo tanto, se estimó la velocidad inicial de generación del  $\Delta\text{pH}$  a partir del estado estacionario con el siguiente razonamiento: cuando se alcanza el estado estacionario en la formación del  $\Delta\text{pH}$ , implica que la velocidad de entrada de los protones (por la actividad de translocación de protones de la enzima) es igual a la velocidad de salida de los protones, ya sea por fugas de protones a través de la membrana o por la presión ejercida por los protones en el interior

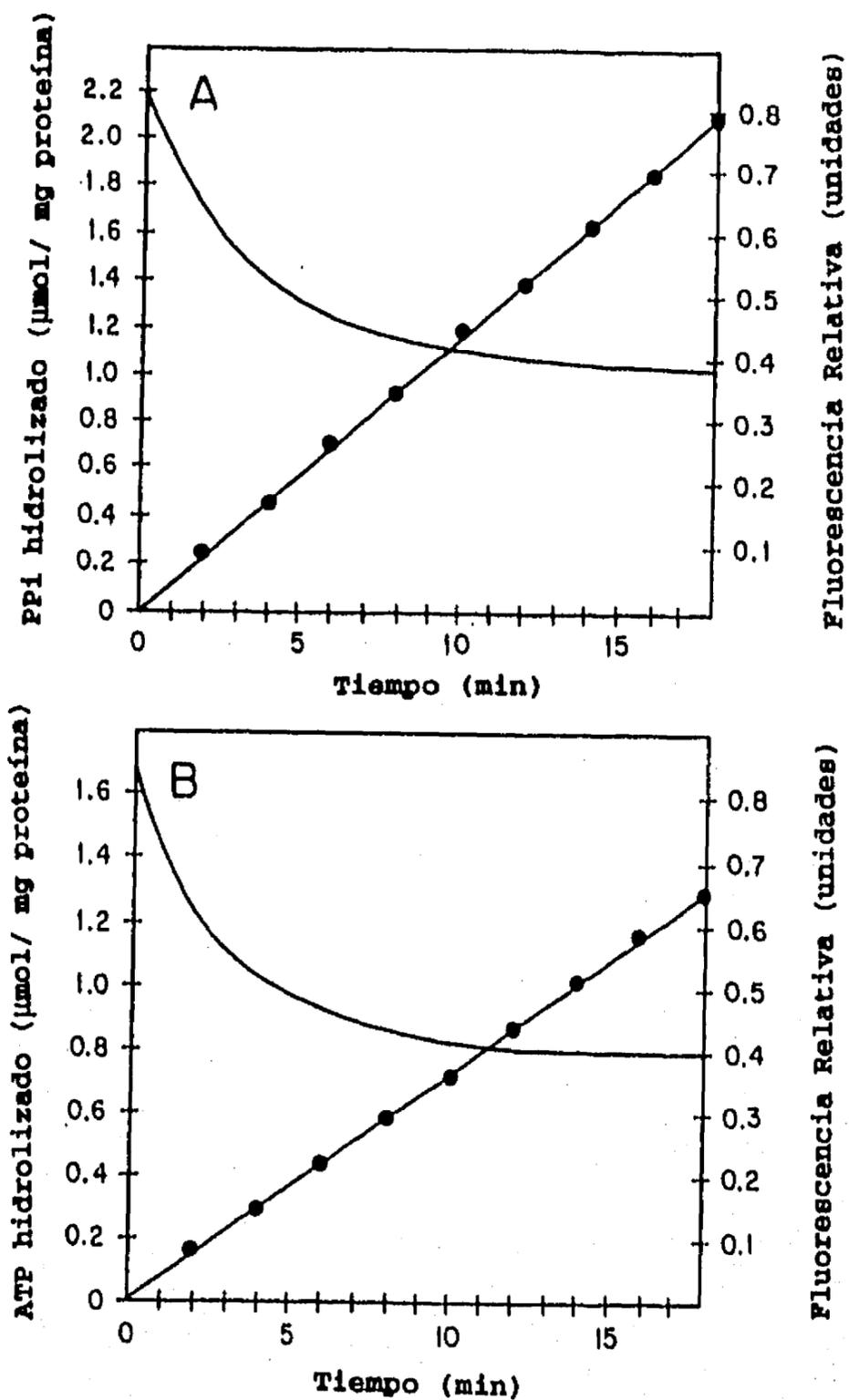


Figura 13. Curso en el tiempo de la hidrólisis (  $\circ$  ) de Mg-PPi (A) o de Mg-ATP (B) y de la formación del  $\Delta\text{pH}$  ( - ) en cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*. 0.25 mg de proteína se adicionaron a una cubeta de fluorescencia (2 mL de volumen final), el medio consistió en 100 mM de KCl, 10 mM de Hepes-KOH, pH 7.2, 2.5  $\mu\text{M}$  de anaranjado de acridina. Las actividades de hidrólisis se determinaron en función del tiempo como se indica en materiales y métodos.

de la vesícula en contra de la acumulación del mismo ion. Por lo que si la actividad de bombeo de protones se inhibe rápida y completamente con un reactivo que no modifique la permeabilidad de la membrana, la velocidad de salida de protones es igual a la de entrada. Es decir, a partir de la velocidad de recuperación de la fluorescencia (inmediatamente después de adicionar el inhibidor), se evaluó la velocidad con la que el  $\Delta pH$  se abate y, por tanto la velocidad de entrada de protones. Esto tiene la ventaja de que al medir la velocidad de la fuga de los protones del sistema, se eliminó una posible fuente de error presente en métodos termodinámicos.

El inhibidor que se seleccionó fue el EDTA, ya que no modifica la permeabilidad de la membrana y la velocidad de quelación del  $Mg^{2+}$  es casi instantánea (del orden de milisegundos). Este ion es esencial para la formación del substrato ( $Mg-PPi$  o  $Mg-ATP$ ). En la actividad de la pirofosfatasa se probaron otros inhibidores como el IDP o el NaF, pero la inhibición se observó después de algunos segundos.

A partir de 3 mM de EDTA se obtuvo la máxima pendiente de la recuperación de la fluorescencia en la  $H^+-PPi$ asa. En cambio, para la  $H^+-ATP$ asa fue de 5 mM (Fig. 14). La adición previa del EDTA a la del substrato impide la formación del  $\Delta pH$ , lo que quiere decir que esta es la manera más rápida y completa de inhibir las actividades de ambas enzimas sin modificar la permeabilidad de la membrana (Perlin, 1986).

Con la curva de calibración del  $\Delta pH$ , se determinó la pendiente

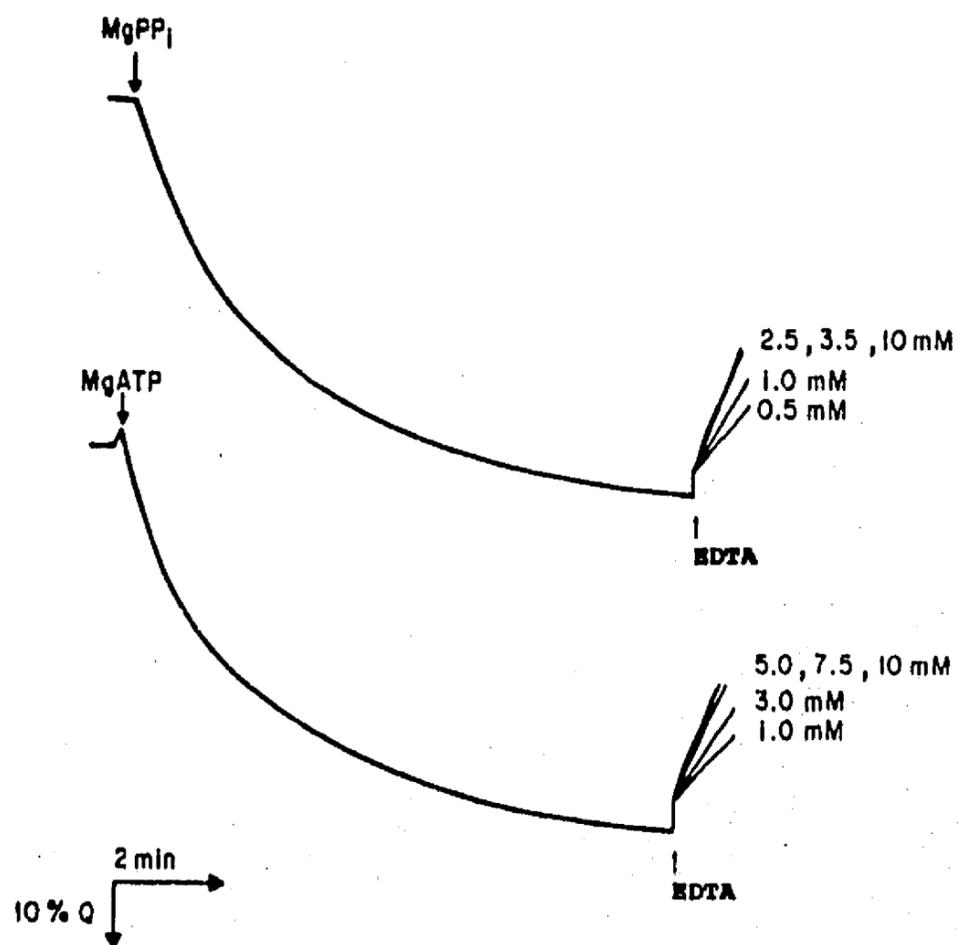


Figura 14. Determinación de la velocidad de recuperación de la fluorescencia o de relajación de  $H^+$  al adicionar EDTA. La calibración del apagamiento de la fluorescencia versus el  $\Delta pH$  fue utilizada para determinar el valor del  $\Delta pH$  y la hidrólisis de los substratos fue realizada como se indica en materiales y métodos

de recuperación de la fluorescencia medida en unidades de  $\Delta\text{pH}/\text{min}$  y se multiplicó por la capacidad de amortiguamiento interno de los cromatóforos para obtener los valores de velocidad de translocación de protones/ $\text{min}\cdot\text{mg}$  de proteína (Tabla 3). La velocidad de translocación de protones fue de  $0.266 \mu\text{mol}$  de  $\text{H}^+/\text{min}\cdot\text{mg}$  de proteína, y la velocidad de hidrólisis de PPI fue de  $0.117 \mu\text{mol}$  de PPI hidrolizado/ $\text{min}\cdot\text{mg}$  de proteína, por lo que el cociente del número de protones translocados entre el PPI hidrolizado dio de 2.3. Para la ATPasas se obtuvo un valor de  $0.272 \mu\text{mol}$  de  $\text{H}^+$  translocados/ $\text{min}\cdot\text{mg}$  de proteína y para la velocidad de hidrólisis se obtuvo un valor de  $0.72 \mu\text{mol}$  de ATP hidrolizado/ $\text{min}\cdot\text{mg}$  de proteína por lo que el cociente entre estas velocidades dio de 3.8, el cual concuerda con el valor calculado para la ATPasa de la bacteria fotosintética *Rhodobacter palustris* (Turina y col, 1987). En *Rhodospirillum rubrum* y en *Synechococcus* 6716 se reportó que el valor de la estequiometría de la  $\text{H}^+$ -ATPasa depende del pH externo. El valor de la estequiometría en *R. rubrum* es cercana a 4 a pH 7.5 (Krenn y col, 1993). La obtención de una estequiometría de 3.8 en la ATPasa de *R. rubrum* corrobora la metodología y la precisión de los valores obtenidos en la estequiometría de la  $\text{H}^+/\text{PPIasa}$ . En particular, en el calculo de la capacidad de amortiguamiento interno, que es un valor crítico en estas determinaciones.

Es interesante hacer notar que la translocación de  $\text{H}^+$  a las concentraciones de substrato utilizadas por ambas enzimas, es prácticamente el mismo ( $0.266$  y  $0.272$ ), por lo que la diferencia en el valor de la estequiometría radica en la velocidad de hidrólisis

**Tabla 3**

Estimación de la Estequiometría H<sup>+</sup>/substrato por el método cinético, que se basa en la determinación de la velocidad de relajación de ΔpH en el estado Estacionario.

---

	H <sup>+</sup> -PPiase	H <sup>+</sup> -ATPasa
ΔpH en el Edo. Estacionario	2.4 ± 0.06 (n=10)	2.4 ± 0.05 (n=11)
Velocidad de relajación del ΔpH (unidades de ΔpH/min)	0.94 ± 0.05 (n=6)	0.96 ± 0.04 (n=5)
Capacidad de Amortiguamieto Interno (μmol de H <sup>+</sup> / unidad de pH · mg de proteína)	0.284 ± 0.04	0.284 ± 0.04
Transporte de H <sup>+</sup> estimado	0.266	0.272
Velocidad de hidrólisis del substrato ( μmol de substrato hidrolizado/min · mg de proteína)	0.117 ± 0.007 (n=12)	0.072 ± 0.002 (n=10)
Estequiometría H <sup>+</sup> /Substrato <sup>a</sup>	2.3	3.8

---

<sup>a</sup> La estequiometría H<sup>+</sup>/Substrato se determino multiplicando la velocidad de relajación de H por la capacidad de amortiguamieto interno y dividiendo entre la velocidad de hidrólisis.

de los substratos por la enzimas, ya que la velocidad de hidrólisis de ATP es más lenta (Tabla 3).

Para corroborar el valor de la estequiometría en ausencia de valor de potencial de membrana, se realizó este mismo experimento en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de valinomicina, la hidrólisis del PPI se estimuló ligeramente (0.136  $\mu\text{mol}$  de PPI hidrolizado/min·mg de proteína) así como la velocidad de translocación de protones a 1.1 unidades de  $\Delta\text{pH}$ /min·mg de proteína, mientras que el cociente estequiométrico dio 2.3. Por tanto, se confirma el valor cercano a 2.0 en la estequiometría de la pirofosfatasa de membrana de *Rhodospirillum rubrum* por la primer metodología cinética.

**DETERMINACION DE LA ESTEQUIOMETRIA POR EL ANALISIS MATEMATICO QUE DESCRIBE LA FORMACION EN EL TIEMPO DEL  $\Delta\text{pH}$ .**

El otro método que se utilizó para determinar la estequiometría, fue emplear el modelo matemático descrito por Brauer y col (1989), para la formación del  $\Delta\text{pH}$  en función del tiempo, en vesículas que contengan una proteína que transloca iones. El modelo se basa en que el valor del  $\Delta\text{pH}$  en cualquier momento se debe a un balance entre la entrada de protones a la vesícula (por la actividad de translocación del ion) y la salida de los  $\text{H}^+$  por la conductancia pasiva y la presión contraria que impiden que la vesícula almacene el ión.

La velocidad neta de transporte del ion está definida por la siguiente relación:

$$d\delta / dt = m R - (K_{FP} + K_{FC}) \delta = m R - K_1 \delta \dots \dots \dots (14)$$

en donde  $\delta$  son las moles de protones translocados;  $m$  es el valor de la estequiometría;  $R$  es la velocidad de hidrólisis del substrato y  $K_1$  es la suma de las constantes contrarias a la entrada de protones a la vesícula; es decir, la fuga pasiva ( $K_{PP}$ ) y la fuerza contraria que impide la acumulación de protones en la vesícula ( $K_{FC}$ )

El estado estacionario de la formación del  $\Delta pH$  se alcanza cuando la velocidad de entrada de los protones, es igual a la salida de los protones, por lo que la ecuación se puede transformar en:

$$m R_e = K_1 \delta_e \dots \dots \dots (15)$$

en donde el subíndice "e" denota el estado estacionario.

Durante la formación del  $\Delta pH$ , la velocidad de hidrólisis del PPI y del ATP es constante, tanto durante la formación del  $\Delta pH$  como durante el estado estacionario del  $\Delta pH$ , por lo que:

$$m \cdot R_e = m \cdot R = K_1 \cdot \delta_e \dots \dots \dots (16)$$

Es decir, la velocidad inicial de hidrólisis es igual que en el estado estacionario del  $\Delta pH$ , por lo que la ecuación 14 se puede reducir a:

$$d\delta / dt = - K_1 \cdot (\delta - \delta_e) \dots \dots \dots (17)$$

integrando la ecuación 17 se obtiene:

$$\ln (1 - \delta/\delta_e) = - K_1 \cdot t \dots \dots \dots (18)$$

Por lo tanto al conocer  $K_1$ ,  $R$  y  $\delta_e$ , se puede obtener la estequiometría de acuerdo a la siguiente relación:

$$m = K_1 \cdot \delta_e / R \dots \dots \dots (19)$$

A partir de la pendiente del regráfico de la relación  $1 - \delta/\delta_e$  en función del tiempo, se obtuvo el valor de la constante  $K_1$ . El valor de  $\delta/\delta_e$  se calculó a partir del apagamiento de la

fluorescencia a un tiempo dado entre el valor del apagamiento de la fluorescencia en el estado estacionario (Brauer y col 1989). En la Figura 15 se muestra el análisis realizado para la PPiase, que dió un valor de  $K_1$  de  $0.309 \text{ min}^{-1}$ , mientras que para la ATPase fue de  $0.368 \text{ min}^{-1}$  (Tabla 4).

El número neto de protones translocados en el estado estacionario se obtuvo al multiplicar el valor del  $\Delta\text{pH}$  en el estado estacionario por la capacidad de amortiguamiento interno del sistema, y dió un valor de  $0.681 \text{ } \mu\text{mol de H}^+/\text{min}\cdot\text{mg}$  de proteína para ambas enzimas. Este valor se multiplica por la constante  $K_1$  y se divide entre el valor de hidrólisis del PPI o del ATP para obtener el cociente estequiométrico (Tabla 4, ecuación 19).

La estequiometría para la  $\text{H}^+$ -PPiase, por esta metodología fue de 1.8 y para la ATPase de 3.5. Para corroborar la precisión de los valores obtenidos, se realizó el mismo experimento en presencia de  $1 \text{ } \mu\text{M}$  de valinomicina. La actividad de hidrólisis se incrementó ligeramente ( $0.136 \text{ } \mu\text{mol de PPI hidrolizado}/\text{min}\cdot\text{mg}$  de proteína) y el valor de  $K_1$  aumento a  $0.372 \text{ min}^{-1}$ , pero el valor de la estequiometría fue de 1.9, por lo que prácticamente la estequiometría se mantuvo en el valor de 2 para la  $\text{H}^+$ -PPiase de *Rhodospirillum rubrum*, lo que concuerda con la estequiometría obtenida por la metodología anterior.

Por ambas metodologías cinéticas se obtuvo una estequiometría de dos para la  $\text{H}^+$ -PPiase y una de 3.7 para la  $\text{H}^+$ /ATPase. Además la estequiometría de la  $\text{H}^+$ -ATPase concuerda con los valores reportados en la literatura, por lo que valida la metodología empleada y los

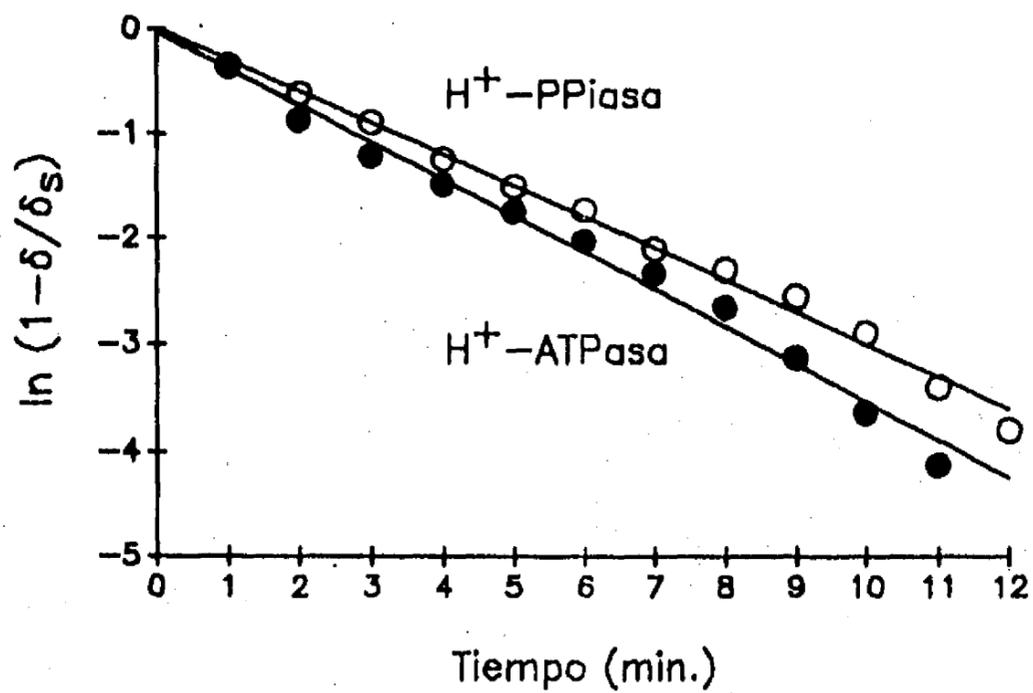


Figura 15. Determinación de la  $K_1$  a partir del curso temporal de la generación del  $\Delta pH$  para la actividad de  $H^+ - PPiase$  (  $\circ$  ) y de  $H^+ - ATPase$  (  $\bullet$  ), de acuerdo a como se indica en Materiales y Métodos.

**Tabla 4.**

Estimación de la estequiometría H<sup>+</sup>/Substrato por la metodología del análisis matemático de la formación del ΔpH en función del tiempo.

	H <sup>+</sup> -PPi <sub>asa</sub>	H <sup>+</sup> -ATP <sub>asa</sub>
ΔpH en el Estado Estacionario (Unidades de ΔpH)	2.4 ± 0.06 (n=10)	2.4 ± 0.05 (n=11)
Capacidad de amortiguamiento interno (μmol de H <sup>+</sup> /min·mg de proteína)	0.284 ± 0.04	0.284 ± 0.04
Valor de δ <sub>s</sub> (μmol de H <sup>+</sup> /min·mg proteína) <sup>b</sup>	0.681	0.661
K <sub>1</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.309 ± 0.009	0.368 ± 0.012
Estimación de los H <sup>+</sup> translocados (μmol de H <sup>+</sup> /min·mg de proteína)	0.210	0.243
Velocidad de hidrólisis del sustrato (μmol de sustrato hidrolizado/min·mg de proteína)	0.117 ± 0.007 (n=12)	0.072 ± 0.002 (n=10)
Estequiometría H <sup>+</sup> /Substrato) <sup>c</sup>	1.8	3.38

<sup>b</sup> El valor de δ<sub>s</sub> se determinó multiplicando el ΔpH en el estado estacionario por la capacidad de amortiguamiento interno.

<sup>c</sup> El valor de la estequiometría H<sup>+</sup>/Substrato se determinó multiplicando K<sub>1</sub> por δ<sub>s</sub> y dividiendo este valor entre la velocidad de hidrólisis del sustrato.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

calculos realizados para determinar la estequiometría por métodos cinéticos.

#### **CINETICA DE GENERACION DEL $\Delta$ pH Y EFECTO DEL $K^+$ SOBRE LA CINETICA DE HIDROLISIS.**

Apartir de la curva de calibración del  $\Delta$ pH, se determinó la velocidad de formación del  $\Delta$ pH en función de la concentración de Mg-PPI, a una concentración de 0.1 mM de  $Mg^{2+}$  libre y 100 mM de KCl. La velocidad de hidrólisis se determinó bajo las mismas condiciones experimentales. La velocidad de hidrólisis y generación de  $\Delta$ pH siguen la misma función de saturación (Fig. 16), con una  $K_m$  de 0.15 mM y 0.16 mM respectivamente y una  $V_{max}$  de 56.5 nmol de PPI hidrolizado/ min·mg de proteína y una  $V_{max}$  de generación de  $\Delta$ pH de 1.74 respectivamente. Este resultado muestra claramente el acoplamiento entre ambas reacciones por la  $H^+$ -PPIasa.

Se estudió el efecto del  $K^+$ , ya que durante los experimentos para obtener la estequiometría se utilizó este ion, para evitar la aparición del potencial de membrana. El  $K^+$  presenta efectos de activación sobre la actividad de hidrólisis, por lo que se fijó la concentración de Mg-PPI a 0.5 mM en dos condiciones de  $Mg^{2+}$  libre, (1mM y 0.1mM) y se varió la concentración de  $K^+$ . Se utilizó el programa de computadora descrito por Fabiato (1988) para alcanzar la concentración deseada (Fig. 17). Es importante hacer notar que dada la baja afinidad del  $K^+$  por el PPI, éste ion no modifica el equilibrio entre el Mg y el PPI. Se realizaron las determinaciones en ausencia de valinomicina para estudiar únicamente el efecto del

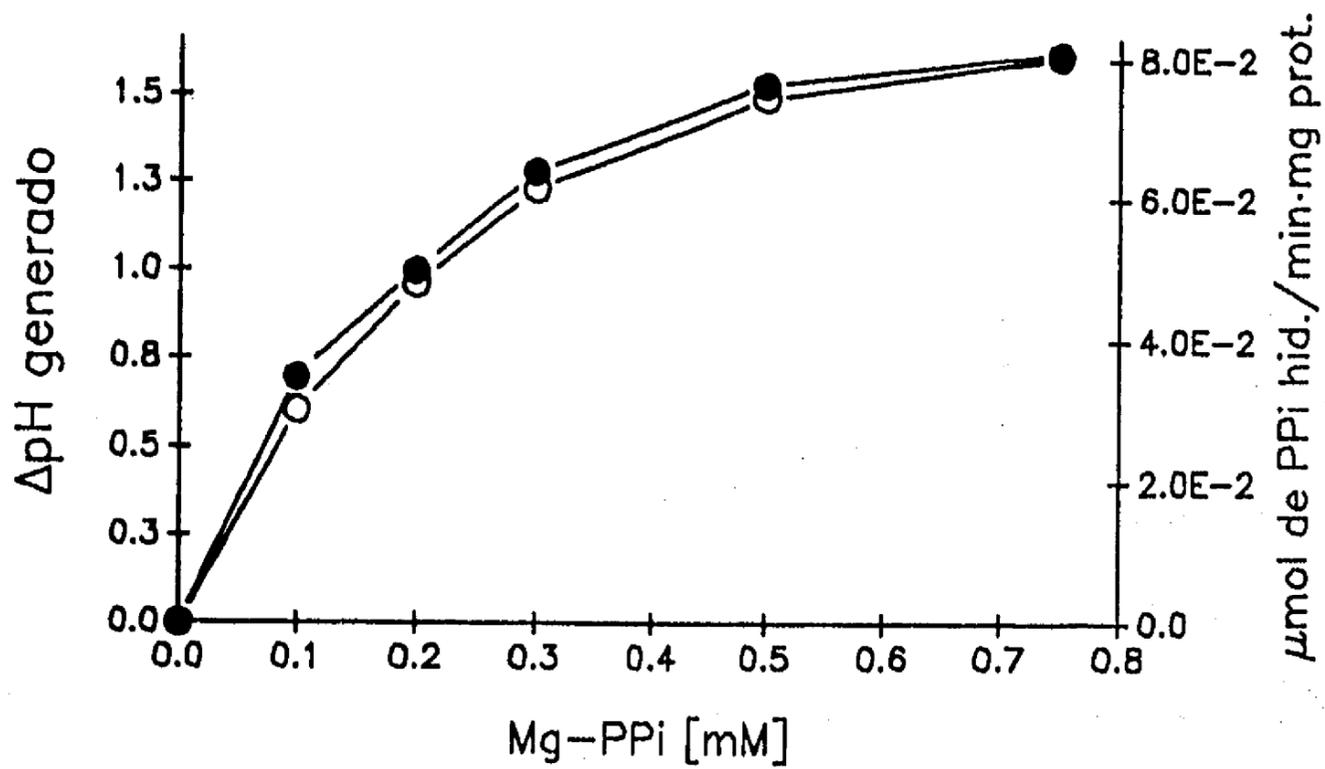


Figura 16. Velocidad de hidrólisis de PPI (  $\circ$  ) y velocidad de generación del  $\Delta$ pH (  $\bullet$  ) a diferentes concentraciones de sustrato en presencia de 0.1 mM de  $Mg^{2+}$  y de 100mM de KCl. Las condiciones experimentales están indicadas en Materiales y Métodos.

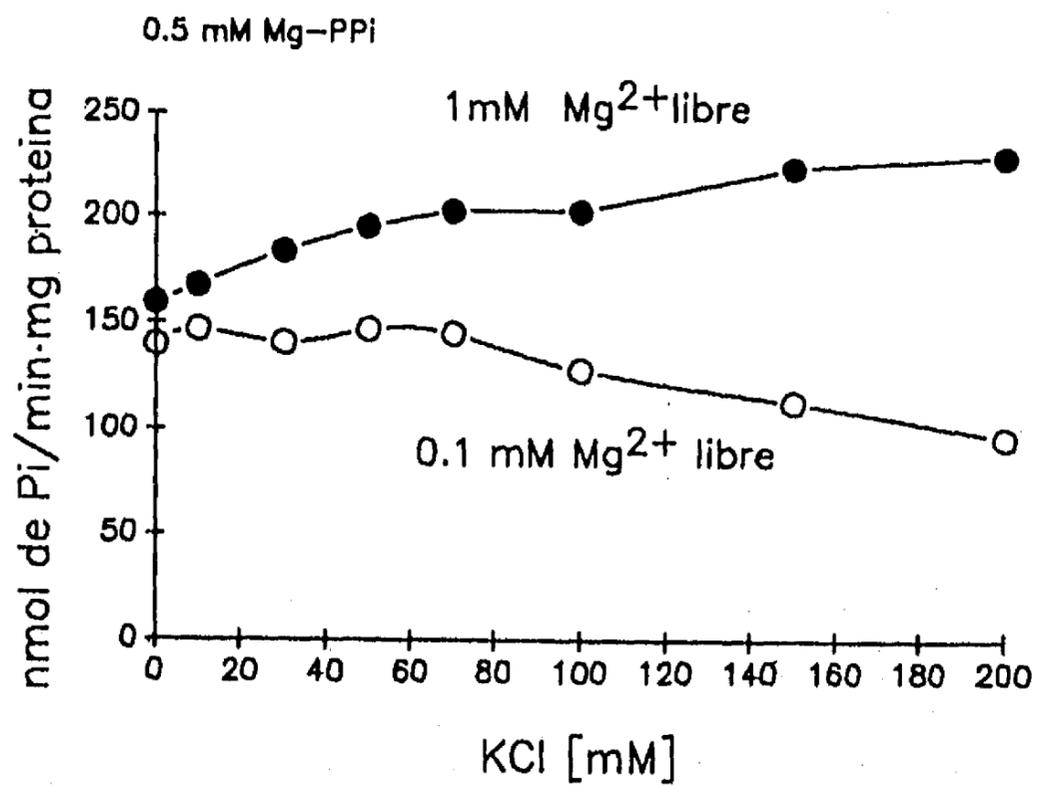


Figura 17. Efecto del KCl sobre la hidrólisis de PPI en dos condiciones de Mg<sup>2+</sup> libre, 0.1 mM ( o ) y 1.0 mM ( ● ), en presencia de 0.5 mM de Mg-PPI. Las condiciones experimentales se indican en Materiales y Métodos.

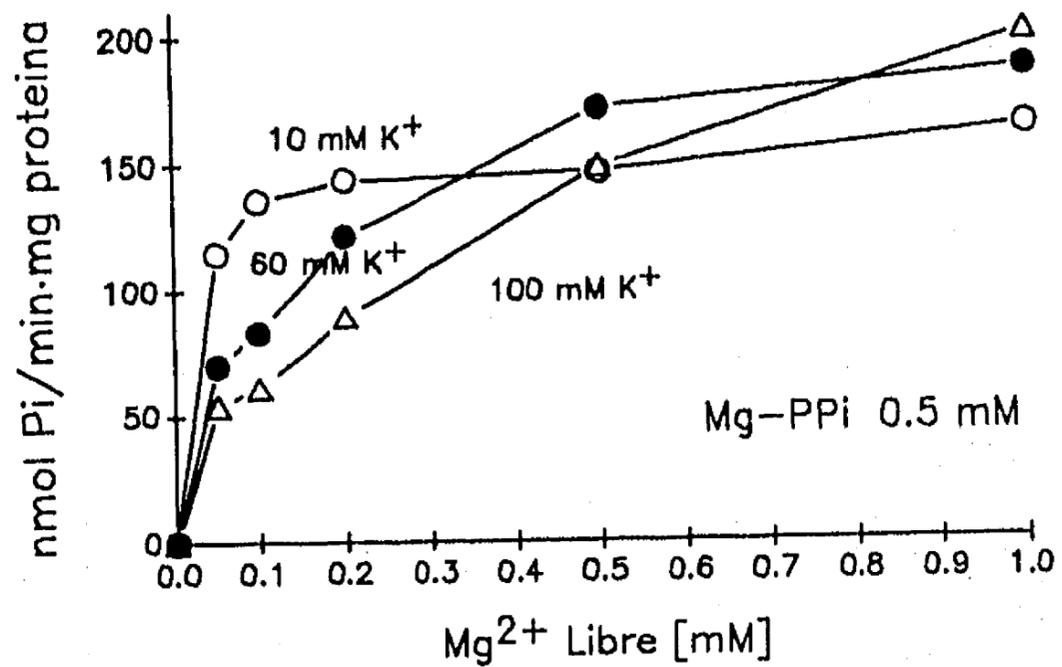


Figura 18. Activación de  $Mg^{2+}$  libre sobre la velocidad de hidrólisis (0.5 mM de Mg-PPi) y efecto del  $K^+$  sobre la actividad de hidrólisis del PPI. Las concentraciones de  $K^+$  fueron 10 (  $\circ$  ), 60 (  $\bullet$  ) y 100 (  $\Delta$  ) mM. Las condiciones experimentales se indican en Materiales y Métodos.

ión. Se observó que el  $K^+$  ejerce una activación del 37% en presencia de 1.0 mM de  $Mg^{2+}$ , mientras que produce una inhibición del 52% en la condición de 0.1 mM de  $Mg^{2+}$  libre. Por tal motivo se realizó el experimento inverso en donde se fijó la concentración de Mg-PPi (0.5mM) a tres concentraciones fijas de  $K^+$  libre (10, 60 y 100 mM) y se varió el  $Mg^{2+}$  libre, como se indica en la Fig. 18. En las tres condiciones se observó el efecto activador de  $Mg^{2+}$  reportado para esta enzima (Sosa y col 1992). Estos resultados concuerdan con el experimento anterior, ya que a concentraciones bajas de  $Mg^{2+}$  libre la actividad de la enzima es menor en la concentración de  $K^+$  de 100mM, mientras que a concentraciones altas de  $Mg^{2+}$ , el incremento de la concentración de  $K^+$  presenta un efecto estimulador. Esto sugiere una cooperatividad entre estos iones sobre la enzima (Segel, 1975).

Es importante hacer notar que aunque esta enzima presenta efectos estimulatorios por el  $K^+$ , la PPIasa de vacuola de betabel muestran un requerimiento esencial de este ión para la actividad, lo que es una diferencia fundamental entre ambas pirofosfatasas de membrana (Rea, 1993). Se ha sugerido que esta enzima en vacuola cataliza el co-transporte  $H^+/K^+$  (Davies y col, 1993).

#### **EFFECTO DEL CCCP Y DE LA VALINOMICINA SOBRE LA CINETICA DE TRANSLOCACION DE PROTONES.**

Se determinó la velocidad de hidrólisis variando la concentración del substrato en presencia de 0.1 mM de  $Mg^{2+}$  y  $1\mu M$  de valinomicina o de  $2.5\mu M$  de CCCP. Asimismo, se determinó la

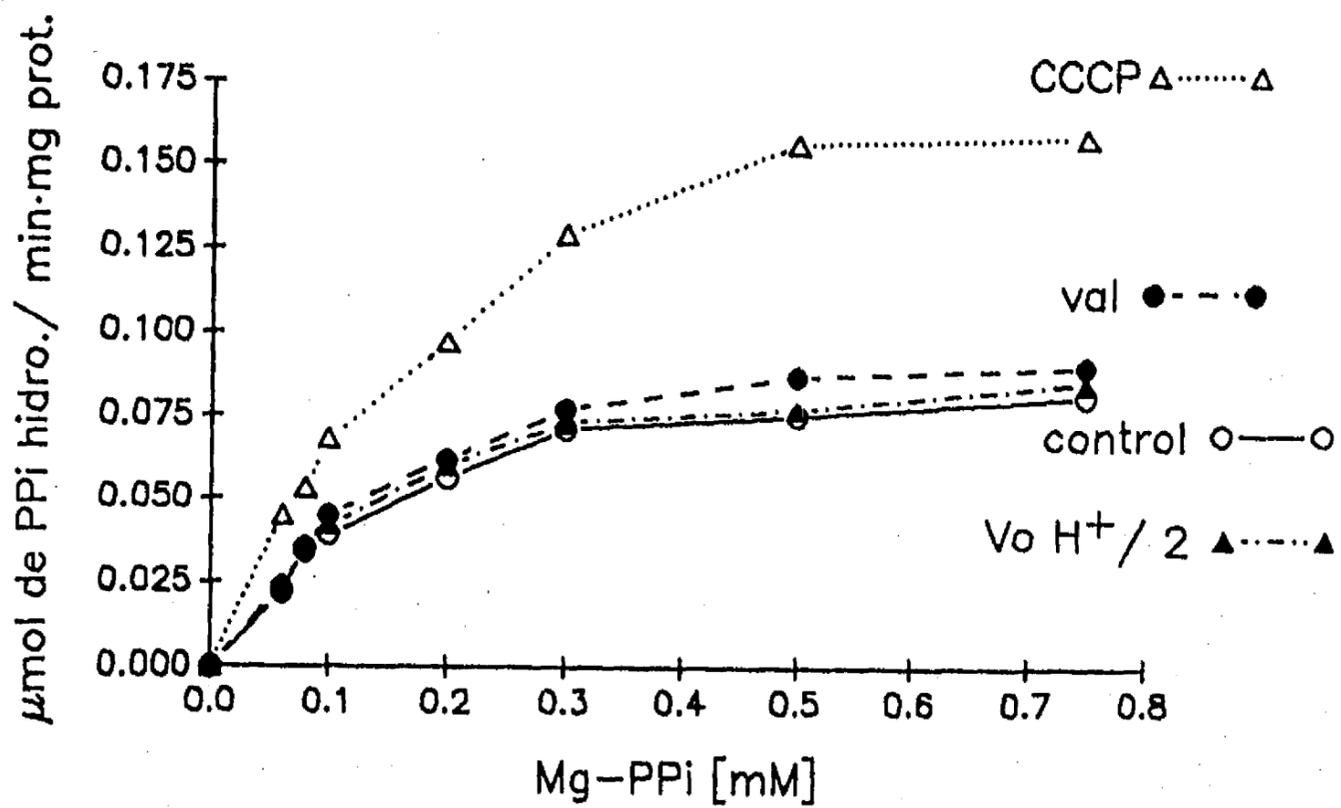


Figura 19. Efecto del desacoplante CCCP ( $\Delta$ ) y la Valinomicina ( $\circ$ ) sobre la actividad de hidrólisis de PPI en presencia de 100mM de KCl. Se grafico la actividad de translocación de  $H^+$  dividida entre dos ( $\blacktriangle$ ). Las condiciones exeperimentales se indican en Materiales y Métodos.

velocidad de relajación de protones al adicionar EDTA y el  $\Delta pH$  generado en cada caso, para obtener el número de protones translocados de acuerdo con la metodología cinética para la determinación de la estequiometría. El CCCP, que abate el gradiente de  $\Delta pH$ , produce una estimulación del 80% de la actividad de hidrólisis. La valinomicina estimula ligeramente la velocidad de hidrólisis (5%) ya que abatió la formación de potencial de membrana. Por lo que es claro que el  $\Delta \mu H^+$  formado bajo estas condiciones esta fundamentalmente en la forma de  $\Delta pH$ . Cuando se grafica la velocidad de translocación de protones se sobreponen las curvas de velocidad de hidrólisis. Se aprecia que bajo la condición de desacoplamiento, la  $K_m$  para este proceso no se modifica, solamente el valor de la  $V_{max}$  (Fig. 19), ya que los desacoplantes al abatir el  $\Delta \mu H^+$ , impiden la generación del gradiente que actuaría como una fuerza contraria a la acumulación de  $H^+$  en el interior de la vesícula, pero no tienen efecto sobre la afinidad de la enzima por el substrato.

**IMPLICACIONES DEL VALOR DE LA ESTEQUIOMETRIA Y VALOR DEL  $\Delta G$  PARA EL PPI.**

Si se conoce el  $\Delta G^\circ$  de la reacción de hidrólisis y las concentraciones de PPI y Pi en el equilibrio, se puede determinar el  $\Delta G_{Tot}$  de la reacción:



$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln [Pi]^2/[PPI] \dots \dots \dots (21)$$

Donde R es la constante universal de los gases y T es la Temperatura en grados Kelvin.

Se ha determinado que el  $\Delta G^\circ$  de la reacción de hidrólisis del PPI es de 4.1 en presencia de 1 mM de  $Mg^{2+}$  y 100mM de KCl (Flodgar y Fleron, 1976), por lo que si se determina la concentración de PPI y Pi en este sistema se puede conocer el  $\Delta G$  de la reacción. En un trabajos previo del laboratorio (Rebolledo y Celis, 1990) midieron las concentraciones de PPI y Pi en la bacteria fotosintética con métodos colorimétricos. Se obtuvo una concentración de PPI entre 7 y 14 mM y de Pi entre 2 y 3 mM. Sería interesante realizar esta determinación por métodos de resonancia magnética nuclear, lo que daría más precisión acerca de este valor. La concentración de PPI en plantas varía desde 50 a 390  $\mu M$ . En bacterias metanógenas se han reportado concentración hasta de 40 mM (Keltjens y col, 1988). Dado que el PPI es producto de reacciones catabólicas (Reeves, 1976), la variación de la concentración del PPI depende de la realación entre las velocidades de las reacciones biosintéticas (aminoácidos, azúcares, etc) y la actividad de la PPIasa citoplásmica.

Los datos de la concentración de PPI y Pi obtenidos en nuestro laboratorio son los únicos para esta bacteria fotosintética, por lo que se calculó un  $\Delta G$  total de -6.07 Kcal/mol.

Teniendo en cuenta estos datos, es posible hacer inferencias acerca del valor de energía ( $\Delta \mu H^+$ ) para que la reacción se dirija en el sentido de la hidrólisis o síntesis. Es importante hacer la aclaración que los estudios de generación de  $\Delta \mu H$  en cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum* no están realizados en el equilibrio, ya que implicaría que las concentraciones de PPI y Pi no cambian en el

tiempo, por lo que habría que diseñar un sistema regenerador de PPI, que mantuviera constante su concentración a lo largo del experimento. Sin embargo se pueden realizar inferencia de la direccionalidad para un proceso acoplado si se conoce  $\Delta G_{PPI}$  y el  $\Delta \mu H^+$  y se sabe que el  $\Delta G_{Tot}$  en el equilibrio es cero:

$$\Delta G_{PPI} = n \Delta \mu H^+ = \Delta G_{Tot} = 0 \dots \dots \dots (22)$$

Donde "n" es el valor de la estequiometría  $H^+/PPI$ , si el sistema se encuentra en equilibrio se puede conocer el  $\Delta G_{Tot}$ :

$$\Delta G_{PPI} - n \Delta \mu H^+ = \Delta G_{Tot} \dots \dots \dots (23)$$

Si el valor del  $\Delta G_{Tot}$  del sistema es positivo la reacción se favorece en la dirección de la síntesis y si es negativo se favorece la dirección de hidrólisis.

El valor de  $\Delta \mu H^+$  presenta dos componentes:

$$\Delta \mu H^+ = n [F\Delta\psi - 2.3 RT \Delta pH] \dots \dots \dots (24)$$

Como en los cromatóforos en las condiciones experimentales el  $\Delta \mu H^+$ , predomina en forma de  $\Delta pH$ , se obtiene:

$$\Delta \mu H^+ = n (-2.3 RT \Delta pH) \dots \dots \dots (25)$$

Por lo que podemos conocer el  $\Delta G_{Tot}$  de la reacción en función del  $\Delta pH$ :

$$\Delta G_{Tot} = \Delta G_{PPI} + n (2.3 RT) \Delta pH \dots \dots \dots (26)$$

La Figura 20 muestra esta relación tomando en cuenta los valores de estequiometría de 1, 2 y 3. Claramente se observa que a valores de estequiometría de 1.0, la enzima podría llevar a cabo hidrólisis del PPI contra valores de  $\Delta pH$  muy grandes (4.4), en cambio, con una estequiometría de 3 la enzima favorecería la reacción de síntesis a valores de  $\Delta pH$  bajos (1.35). Con una estequiometría de 2, la

enzima se encuentra en equilibrio en un  $\Delta\text{pH}$  de 2.2, por arriba de este valor llevaría a cabo síntesis y por abajo hidrólisis. Es interesante notar que debido a esta estequiometría de dos, la enzima presenta actividades de síntesis (Strid y col, 1987) o hidrólisis de P<sub>Pi</sub>. En cambio, la H<sup>+</sup>-P<sub>Pi</sub>asa de vacuola con una estequiometría de 1.0 (Schmidt y Briskin, 1993) trabaja únicamente en el sentido de la hidrólisis y su función es la de generar el  $\Delta\text{pH}$  necesario en la vacuola para procesos de co-transporte acoplados al gradiente de protones. Debe aclararse que el valor de la estequiometría no es el único factor que determina la direccionalidad de la reacción, sino que depende de la variación de la concentración de P<sub>i</sub> y P<sub>Pi</sub>, que a su vez depende la actividad de la actividad de la P<sub>Pi</sub>asa citoplásmica y de la velocidad de las reacciones biosintéticas que producen P<sub>Pi</sub>. Recientemente se determinó por métodos termodinámicos, la estequiometría H<sup>+</sup>/P<sub>Pi</sub> en vacuola de betabel (Davies y col, 1994), en donde se mostró que ésta varía de 1.75 a 3.28, dependiendo del valor del pH citoplásmico o del lumen de la vacuola. Los mismos autores mencionan que la enzima, en condiciones fisiológicas, debe presentar una estequiometría menor a 2 para lograr generar un  $\Delta\text{pH}$  mayor a 3, presente en las vacuolas. Por lo que aún queda por aclarar los factores que producen variabilidad en el valor de la estequiometría, dependiendo del pH y las condiciones metabólicas del sistema.

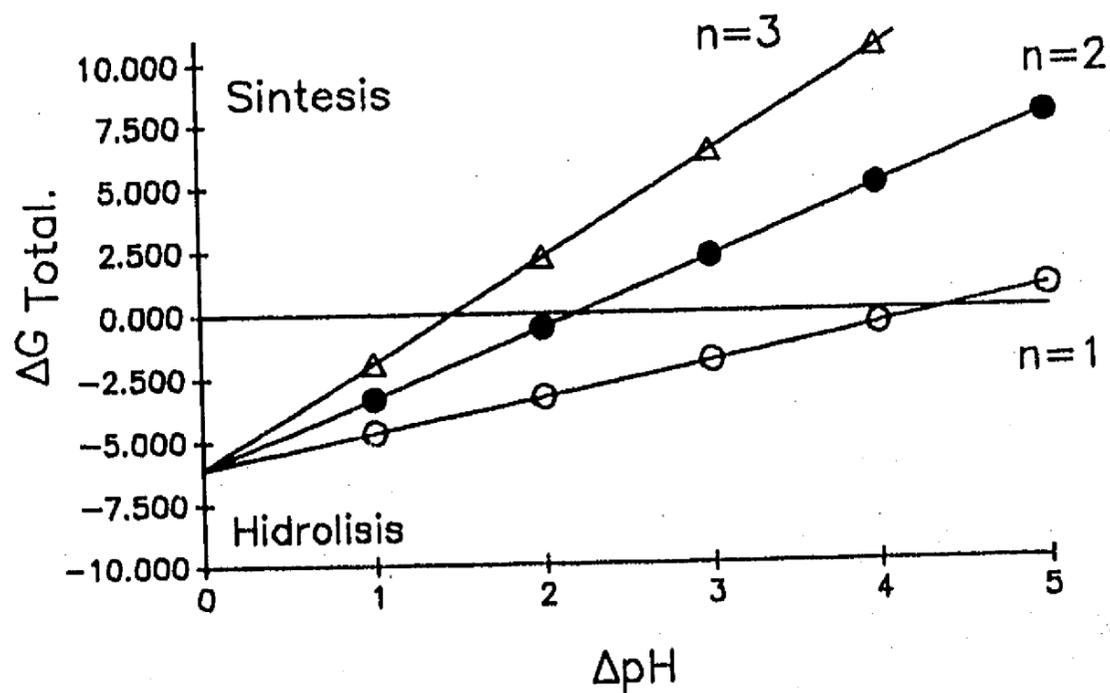


Figura 20.  $\Delta G_{total}$  del acoplamiento de energía de la translocación de protones con la de hidrólisis de PPI, bajo la suposición de un valor nulo de potencial, tomando en cuenta tres valores de estequiometría.

## CAPITULO IV.

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### Evaluación de la Estequiometría.

La cinética de translocación de protones de la pirofosfatasa describe la misma curva de saturación que la cinética de hidrólisis del substrato, presentan la misma  $K_m$  para ambos procesos. Lo que indica claramente el acoplamiento entre ambas reacciones. El  $\Delta pH$  generado por la actividad de pirofosfatasa se inhiben por Mg-IDP y NaF, inhibidores específicos de la pirofosfatasa de membrana. El inhibidor específico de la ATPasa, la oligomicina, no produce ningún efecto en la  $H^+$ -PPiase.

La estequiometría  $H^+/PPi$  de *R. rubrum*, obtenida por dos metodologías cinéticas dio un valor de 2.0, y 3.7 para la  $H^+/ATP$ , que concuerda con una estequiometría menor para la  $H^+$ -PPiase que para la  $H^+$ -ATPasa.

La evaluación por métodos cinéticos de las estequiometría  $H^+/Substrato$  presenta ventajas con respecto a los métodos termodinámicos, ya que en estos últimos, es necesario evaluar la permeabilidad pasiva a los protones, lo que es una fuente de error. Precisamente en el primer método cinético, se evaluó la velocidad de recuperación de la fluorescencia. Que se observa por la fuga de protones del interior de la vesícula, por lo que se eliminó una fuente de error.

Otro posible error, es no utilizar un inhibidor lo suficientemente rápido y que no modifique la permeabilidad a la membrana, por lo que se utilizó el EDTA, que esta claramente

demostrado su efectividad para este tipo de determinaciones (Perlin y col, 1984). Asimismo, es importante notar que se repitieron los experimentos en presencia de valinomicina, para minimizar los efectos del potencial de membrana y se obtuvo el mismo valor de 2 para la estequiometría  $H^+/PPi$ .

El valor de la capacidad de amortiguamiento interno, es crítico en estas determinaciones. Se calculó este valor en un intervalo de pH entre 6 y 7.2, no fue posible medirlo a valores más ácidos debido a la agregación de los cromatóforos. Al utilizar este valor se obtuvo la estequiometría reportada para la  $H^+$ -ATPasa, por lo que se validó la precisión del calculo de la estequiometría  $H^+/PPi$ .

En el estado estacionario, la generación de  $\Delta pH$  para la actividad de PPiase (0.5 mM de Mg-PPi) de  $2.4 \pm 0.06$  y para la ATPasa (3mM Mg-ATP) fue  $2.4 \pm 0.05$ . La diferencia en la estequiometría fue la velocidad de hidrólisis de ambas enzimas.

La estequiometría de dos para la  $H^+$ -PPiase concuerda con la capacidad reversible de síntesis o de hidrólisis de esta enzima en *Rhodospirillum rubrum*. En cambio, la estequiometría de 1 para la  $H^+$ -PPiase de vacuola, le permite hidrolizar el PPi en contra de gradientes de pH de grandes (3.5 a 4).

La estequiometría  $H^+$ /substrato es un parámetro importante para realizar predicciones de la direccionalidad de la reacción, desde el punto de vista termodinámico. Sin embargo, es importante conocer las variaciones en la concentración del Pi y PPi, así como el valor del  $\Delta \mu H^+$  que se puede generar en el sistema *in vivo* que permitan una mayor confiabilidad en las suposiciones e inferir los límites

fisiológicos en los cuales esta enzima se dirige en la dirección de la síntesis o de la hidrólisis.

#### **Posible papel Fisiológico y perspectivas.**

La  $H^+$ /PPiase de membrana es capaz de hidrolizar o sintetizar el PPI. Strid y col (1987) generaron gradientes artificiales de pH o de potencial en cromatóforos de *R. rubrum* y observaron que se llevó a cabo síntesis de PPI valores menores de  $\Delta pH$  o de  $\Delta \psi$  que para el ATP. Se ha observado que la capacidad de síntesis de ATP, es mucho mayor que la del PPI. Solo en condiciones de intensidades luminosas bajas la síntesis del PPI se compara al ATP. Asimismo, la velocidad de hidrólisis del PPI es un orden de magnitud mayor que la de síntesis del PPI. Además ambas enzimas compiten por el potencial generado en la bacteria. Por lo que su capacidad de síntesis de PPI en la bacteria se vería limitada, aunado a que los  $\Delta pH$  generados en la bacteria se encuentran por abajo de dos, por lo que de acuerdo a los cálculos de la Fig. 20 se vería muy limitada la síntesis de PPI. Esto es, sin conciderar la pregunta: ¿ De que sirve sintetizar PPI por la  $H^+$ -PPiase de membrana, sí se encuentra presente una PPiase citoplásmica muy activa en un sistema no compartamentalizado?.

Al respecto Nyrén y Strid (1991) han sugerido la hipótesis, de que esta enzima podría mantener el  $\Delta \mu H^+$  en condiciones de bajo energía, por ejemplo, en los períodos de obscuridad a través de la actividad de hidrólisis de PPI acoplada al gradiente de protones. Para demostrar este papel se requiere conocer las fluctuaciones de

las concentraciones de PPI y Pi en el ciclo de vida de la bacteria y en los ciclos luz oscuridad.

Nyrén y col (1991) reportaron la purificación de esta proteína, la cual reproduje parcialmente en mis estudios de doctorado. Sin embargo no logré la suficiente pureza ni cantidad para iniciar los estudios estructurales de la enzima, o afinar detalles de la cinética de la enzima. Este problema de la purificación se origina en su baja abundancia en las membranas de la bacteria fotosintética, aproximadamente del 1% (Nyren y col 1991). Por lo que los estudios estructurales de la enzima aun son limitados, a menos que se logre un mejoramiento del rendimiento de la purificación o se clone, utilizando las sondas con las que se clonó la H<sup>+</sup>-PPiase de vacuola (Sarafian y col, 1992). Con una preparación mas pura y con el gene de la H<sup>+</sup>-PPiase, se podrían hacer preguntas a cerca de los mecanismos moleculares de la enzima, su secuencia de aminoácidos, los residuos de aminoácidos que incluyen los carboxilos involucrados en la catálisis de la H<sup>+</sup>-PPiase de membrana de *Rhodospirillum rubrum*.

## BIBLIOGRAFIA

- Baccarini-Melandri, A. y Melandri B.A., (1978) En: The photosynthetic Bacteria (Clayton R.K. y Sistrom, W.R eds) Plenum. Press. New York y London, pp. 615-628.
- Baltscheffsky, H., von Stedingk, L.V., Heldt, M.W. y Klingenberg, M., (1966a), Inorganic pyrophosphate: Formation in bacterial photophosphorylation, *Science*, **153**, 1120-1121.
- Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H., y von Stedingk, L.V., (1966b), Light-induced energy conversion and the pyrophosphatase reaction in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*, *Brookhaven Symp. Biol.* **19**, 246-257.
- Baltscheffsky, M., (1967a) Inorganic Pyrophosphate as an Energy in photosynthetic and Respiratory electron transport phosphorylation system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**
- Baltscheffsky, M., (1967b) Inorganic Pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from *R. 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., (1969) Energy conversion-linked changes of carotenoid absorbance in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 646-652.
- Baltscheffsky, M. y Nyren P., (1986a) The synthesis and utilization of inorganic Pyrophosphate en: *Bioenergetics* (ed. Ernester, L.). Elsevier Science Publishers.
- Baltscheffsky, M. y Nyren, P., (1986b). Preparations and Reconstitution of proton-pumping Membrane-Bound Inorganic Pyrophosphatase. en: *Methods in Enzymology* (Ed. Purich, D.L.) Vol **126**. pp: 538-545 Academic Press. New-york London.
- Baltscheffsky, M. y Baltscheffsky H (1992) Inorganic pyrophosphate and inorganic pyrophosphatases, en *Molecular Mechanisms in Bioenergetics.* (ed. Ernester, L.) Elsevier Sciences Publishers. Netherlands. 521pp.
- Barry, B. S. y Dunaway-Mariano, D., (1987) The Kinetics of Yeast Inorganic Pyrophosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 196-203.

- Baykov, A.A., Volk, E.S. y Unguryte, A.A., (1989) Inhibition of inorganic pyrophosphatase of animal mitochondria by calcium. Arch. Biochem. Biophys. 273, 287-291.
- Black, C.C. (1987) PPI Metabolism and its regulation by fructose 2-6 biphosphate in plants. En Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in microorganisms. (ed. Torriani-Gorni). American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Briskin, D. y Reynolds-Niesman, I. (1991). Determination of H<sup>+</sup>/ATP Stoichiometry for the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from Red Beet (*Beta vulgaris L*) Storage Tissue. 95, 242-250.
- Butler, L.G., (1971) en: The Enzymes (Ed. Boyer, P.D.) 3a. Ed. Vol. 4, pp. 529-541, Academic Press, New York.
- Brauer, D., Tu, S., Hsu, S. y Thomas, C. (1989) Kinetic Analysis of Proton Transport by the Vanadate Sensitive ATPase from Maize Root Microsomes. Plant Physiol. 89, 464-471.
- Casadio, and Melandri, B.A. (1984) Calibration of the response of 9-aminoacridine fluorescence to transmembrane pH differences in bacterial chromatophores. Arch. Biochim. Biophys. 238, 219-228.
- Celis, H., Romero, I., y Gómez-Poyou. A., (1985) The Phosphate-Pyrophosphate exchange and hydrolytic Reactions of the Membrane-Bound Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. Effects of Mg<sup>2+</sup>, phosphate and pyrophosphate. Arch. Biochim. Biophys. 236, 766-774.
- Celis, H., y Romero, I., (1987) The phosphate-pyrophosphate Exchange and Hydrolytic reactions of Membrane-bound Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: Effects of pH and Divalent Cations. J. Bionerg. Biomemb. 19, 225-271.
- Clayton, R.K. y Sistrom W.R. (1978) The Photosynthetic Bacteria. New York y London. Plenum Press.
- 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,
- Cooperman, B.S., Panakal, A., Springs, B., Hann, D.J., (1981) Divalent Metal Binding and Inorganic Phosphate Analogue Binding to Yeast Inorganic Pyrophosphatase. 20, 6051-6060.
- 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.

- Cooperman, B.S., Baykov, A.A., Lathi, R. (1992) Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trend. Bioch. Sci*, 17, 262-266.
- Cramer y Knaff, 1991. *Energy Transduction in Biological Membranes*. (Spring-Verlang, New-York, 1991) p 579.
- Davies, J.M., Rea, P.A. and Sanders D. (1991) Vacuolar proton-pumping in *Beta vulgaris* Shows Vectorial Activation by Potassium. *FEBS lett.* 278, 66-68.
- Davies, J.M., Poole, R.J. y Sanders, S. (1993) The computed free energy of hydrolysis of inorganic pyrophosphate and ATP: apparent significance for inorganic-pyrophosphate-driven reactions of intermediary metabolism. *Biochem. Biophysc. Acta.* 1141, 29-36.
- Davies, J.M., Hunt, I. y Sanders, D. (1994) Vacuolar H<sup>+</sup>-pumping ATPase variable transport coupling ratio controlled by pH. *Proc. Natl. acad. sci. USA.* 91, 8547-8551.
- Dawes, A.E. (1986) *Microbial Energetics*. Blackie & Sons. Glasgow.
- de Meis, L. (1985) Pyrophosphate of High and Low Energy Contributions of pH, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and water to the free energy 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 *Chararantus roseus*. *FEBS Lett.* 249, 13-16.
- Eisenbach, M. y Caplan, S.R., (1979) The light driven proton pump of *Halobacterium halobium*: mechanism and function. *Current Topic in Membranes and Transport.* 12, 165-248.
- Fabiato A. (1988) Computer programs for calculating total from specified free or free specified total ionic in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. In *Methods in Enzymology*. (Fleisher S. y Fleisher B. eds.) Vol 157, pp 378-417. Academic. Press. New York y London.
- Fisher, R.R. y Guillory, R.J., (1969) Partial resolution of energy-linked reactions in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *FEBS Lett.* 3, 27-35.
- Fiskie , C.A. y Subarrow, Y., (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 177, 751-756
- Flodgaard, H. y Fleron, P., (1974) Thermodynamic parameters for the hydrolysis of inorganic pyrophosphate pH 7.4 as a function (Mg<sup>2+</sup>), (K<sup>+</sup>) an ionic strength determined from equilibrium studies of the reaction. *J. Biol. Chem.* 11,

3465-3474.

- Fregni, V. and Casadio (1993) Kinetic characterization of the ATP-dependent proton pump in bacterial photosynthetic membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1143**, 215-222.
- García, F.A. y Drews G., (1984) Properties of membrane fractions prepared by chromatophore-liposome fusion. *Z. Naturforsch.* **39c**, 1112-1119.
- Glazer, A.N. (1985) Light Harvesting by Phycophyllisomes *Ann. Rev. Biophys. Chem* **14**, 47-77.
- Gottschalk. (1986) *Bacterial Metabolism.* New York and Berlin. Springer Verlag.
- Guillory, R.J. y Fisher, R.R. (1972) Studies on the light dependent synthesis of inorganic pyrophosphatase by *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemical Journal* **129**, 471-481.
- Guynn, R.W., Veloso, D., Randolph, L. y Veech, R., (1973) The concentration and control of cytoplasmic free inorganic pyrophosphate in rat liver in vivo. *Biochem. J.* **140**, 369-375
- Harold, F.M., (1972) Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *Bacteriological Rev.* **36**, 172-230.
- Harold, F.M. (1986) *The vital force: a study of bioenergetics.* New York. Freeman Company. pp 577.
- Haraux, F. y Kouchkovsky, Y. (1980) Measurement of chloroplast internal protons with 9-aminoacridine. *Biochim. Biophys. Acta.* **592**, 153-168.
- Harvey, G.W. y Keister, D.L. (1981) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria: Pi - HOH Oxygen Exchange catalyzed by Membrane-bound inorganic Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **208**, 426-430.
- Hutner, S.H. (1950) Anaerobic and Aerobic growth of purple bacteria (Arthiodaceae) in chemically defined media. *J. Gen Microbiol.* **4**, 286-293.
- Isaev, P.I., Liberman, E.A., Samuilov, V.D., Skulachev, V.P. y Tsofina, L.M., (1970) Conversion of Biomembrane produced energy into Electric Form. *Biochim. Biophys. Acta.* **216**, 22-29.
- Johannes, E. y Felle, H. (1990) Proton Gradient Across the Tonoplast of *Riccia fluitans* as a Result of the Join Action of Two Electroenzymes. *Plant Physiol.* **93**, 412-417.

Johansson, B.C., (1975) Partial resolution of the energy transfer system in chromatophores from *R. rubrum*, purification and characterization of the "coupling factor" ATPase, Ph.D. Thesis, University of Stockholm.

Josse, J., (1971) en: The Enzymes, (Ed. Boyer, P.D.) 3era. Ed. Vol. 4, pp. 499-527. Academic Press, New York.

Kankare, J., Neal, G.S., Salminen, T., Glumhoff, T., Cooperman, B.S., Lathi, R. y Goldman, A. (1994) The Structure of *E. coli* soluble inorganic pyrophosphatase at 2.7Å resolution. Prot. Engin. 7, 823-830.

Keister, D.L. y Yike, N.J., (1967) 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 *R. rubrum*. Biochemistry 6, 3847-3857.

Keister, D.L. y Minton, N.L. (1971a) ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 932-939.

Keister, D.L. y Minton, N.L. (1971b) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. VI Inorganic pyrophosphate-driven ATP synthesis in *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Biochem. Biophys. 147, 330-338.

Keltjens T., Erp, R., Mooijart, R, Drift, C. Vogels. (1988) Inorganic pyrophosphate synthesis during methanogenesis from methylcoenzyme M by cell-free extracts of *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain AH). Eur. J. Biochem. 172, 471-476.

Klemme, B., Klemme, J.H. y San Pietro, A. (1971). PPIase, ATPase and Photophosphorylation in Chromatophores of *Rs. rubrum*: Inactivation by phospholipase A, Reconstitution by phospholipids. Arch. Biochem. Biophys. 144, 339-342.

Klemme, J.H. y Gest, H., (1971) Regulation of the Cytoplasmic Inorganic Pyrophosphatase of *Rs. rubrum*. Eur. J. Biochem. 22, 529-537.

Klemme, J.H., Klemme, B. y Gest, H. (1971) Catalytic Properties and regulatory diversity of inorganic Pyrophosphatases from Photosynthetic Bacteria, J. Bacteriol. 108, 1122-1128.

Klemme, J.H. y Gest, H. (1971) Regulatory properties of an Inorganic Pyrophosphatase from the Photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 721-725.

- Knight, W.B., Dunaway-Mariano, D., Ransom, S.C. y Villafranca, J.J., (1984) Investigations of the metal ion-binding sites of yeast inorganic pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* **259**, 2886-2893
- Kreen, B., van Walraven, S., Scholts, M.J. and Kraayenhof, R. (1993) Modulation of the proton-translocation stoichiometry of H<sup>+</sup>-ATP synthases in two phototrophic prokaryotes by external pH. *Biochem J.* **294**, 705-709.
- Lawson, J.W.R., Guynn, R.W., Cronell, N. y Veech, R.L. (1976) en: *Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species.*, (Ed. Hanson, R.W. y M.A. Mehlman), pp. 481, Wiley, New York.
- Laskin A.I. y Lechavalier R (1980 ) *Handbook of Microbiology*. Vol I. SRC Press
- Leigh, R. A., Pope, A.J. Jennings, I. R. and Sanders, D. (1992) Kinetics of the vacuolar H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase. The roles of Magnesium, pyrophosphate, and their complexes as Substrates, Activators, and Inhibitors. *Plant Physiol.* **100**, 1698-1705.
- 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.
- Lugtember, J, Mathies, R.A. Griffen, R.G. y Herzefeld, J. (1988) Structure and function of rhodopsin from solid State and resonance Raman spectroscopy of isotopic retinal derivates. *Trends. Biochem. Sci* **13**, 388-393.
- 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.
- Maeshima M, Y Yoshida, S. (1989) Purification and Properties of vacuolar membrane Proton-translocating Inorganic Pyrophosphatase from Mung Bean. *J. Biol. Chem.* **264**. 20068-20073.
- Maeshima, M., Mimura, T. y Sato, T, (1994) Distribution of vacuolar H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase and Membrane Integral protein in a variety of green plants. *Plant. Cell. Physiol.* **35**, 323-328.
- Mansurova, S.E., Shakhov, Yu, A. y Kulaev, I.S. (1975) Synthesis of inorganic pyrophosphate by animal tissue mitochondria, *FEBS Lett.* **55**, 94-98.
- Mansurova, S.E., Shakhov, Yu Y Kulaev, I.S. (1977) Mitochondrial pyrophosphatase is a coupling factor of respiration and pyrophosphatase synthesis. *FEBS. Lett.* **74**. 31-34.

- Mansurova,, S.E. (1989) Inorganic pyrophosphatases in mitochondrial metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **977**, 237-247
- Maloney, P.C. (1979) Membrane H<sup>+</sup> Conductance of *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol.* **140**, 197-205
- Martell, A. y Sillen, L.G. (1971) Stability Constants of Metal-Ion Complexes: Supplement No. 1, Special Publication No. 25. The Chemical Society, London.
- Merrick, J.M. (1978) Metabolism of reserve material, en: *Photosynthetic Bacteria* (ed. Clayton, R.C., y Sistrom, R.W.) New-York, Plenum Press.
- Mitchell, P. (1966) Chemosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Revs.* **41** 445-502.
- Mitchell, P., y Moyle J. (1966) Acid Base Titration across the Membrane System of Rat-Liver Mitochondria. Catalysis by uncouplers. *Biochem. J* **104**, 558-600.
- Mitchell, P., (1967) Proton-Translocation Phosphorylation in Mitochondria, Chloroplasts and Bacteria: Natural Fuel Cells and Solar Cells. *Fed. Proc.* **26**, 1370-1379.
- Mitchell, P., (1982) Compartamentation and comunicatio in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemosmotic reaction systems. *Eur. J. Biochem.* **166**, 255-272.
- Moyle, J., Mitchell, R., y Mitchell, P., (1972) Proton-translocating pyrophosphatase of *Rs. rubrum* *FEBS Lett.* **23**, 233-236.
- Nicholls, D.G. y Ferguson, S. J. (1992). *Bioenergetics 2*. London. Academic Press. 255 pp.
- Nishikawa, K., Hosi, K., Suzuki, J., Yoshimura, S. y Horio, T. (1973) Formation and Decomposition of Pyrophosphate Related to Bacterial Photophosphorylation. *J. Biochem.* **73**, 537-553.
- Nore, B.F., Husain, I., Nyren, P. y Baltscheffsky, M. (1986) Synthesis of pyrophosphate coupled to the reverse energy linked transhydrogenase reactions. in: *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *FEBS Lett.* **200**, 133-139.
- Nyrén, P. y Strid, A. (1991). Hypothesis: the physiological role of the membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase in some phototrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**, 265-270.

- Nyren, P. y Baltscheffsky, M. (1983) Inorganic pyrophosphate-driven ATP-synthesis in liposomes containing membrane-bound inorganic pyrophosphatase and Fo-F<sub>1</sub> complex from *Rhodospirillum rubrum* FEBS Lett. 155, 125-130.
- Nyren, 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.
- Nyren, P., Nore, F.B. y Baltscheffsky, M., (1986) Inorganic pyrophosphate synthesis after a short light flash in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. Photobiology and Photobiophysics 11, 185-196.
- Nyren, P. Nore, F. y Strid, A., (1991) Proton pumping N.N'-dicyclohexylcarbodiimida-sensitive inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: purification, Characterization and reconstitution. Biochemistry.30, 2883-2887.
- Nyren, P., Sakai-Nore, y Strid A. (1993) Aminoacid sequence similarities between the vacuolar Proton-Pumping Inorganic Pyrophosphatase and the c-subunit of FoF<sub>1</sub>-ATPases. Cell. Physiol. 34, 375-378.
- Oesterhelt, D y Stoeckenius, W. (1973) Functions of a new photoreceptor membrane. Proc. Natl. acad. Sci. USA. 70, 2853-2857.
- Padan, E. y Shuldiner S. (1986) Intracellular pH regulation in Bacterial Cells. In Methods in enzymology vol 125 (Ed. Fleischer, S. y Fleisher, B.) 337-352. New-York and London. Academic. Press.
- Pereira-da Silva, L. Sherman, M, Lundin, M and Baltscheffsky, H. (1993) Inorganic Pyrophosphatase gives a membrane potential in yeast Mitochondria, as Measured with the Permeant Cation Tetraphenylphosphonium. Arch. Biochem. biophys. 304, 310-313.
- Perlin, D.S. Kasamo, K., Brooker, y Salyman, C.W. (1984) J. Biol. Chem. 259. 7884-7892.
- Perlin, D.S. San Francisco, J.D., Slayman, C.W. y Rosen, B.P. (1986) H<sup>+</sup>/ATP Stoichiometry of Proton Pumps from *Neurospora crassa* and *E. coli*. Arch. Biochem. Biophysc 248, 53-61.
- Pfennig, N., y Truper, H.G., (1974) The phototrophic bacteria, en: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed. (Ed: R.E. Buchanan y N.E. Gibbons), pp. 24-64. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

- Randahl, H. (1979) Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in *Rhodospirillum rubrum*. Eur. J. Biochem. 102, 251-256.
- Rao, P.V., y Keister, D.L. (1978) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. Solubilization of the Membrane-bound energy-linked inorganic pyrophosphatase of *Rs. rubrum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 465-473.
- Rapoport, T.A. Höhne, W.E. Heitman, P.R. Rapoport, S.M. (1972) A kinetical Model for the action of the inorganic pyrophosphatase of *Rs. rubrum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 465-473.
- Rea, P.A., y Poole, J.R. (1985) Proton translocating inorganic pyrophosphatase in red beet (*Beta vulgaris L.*) Tonoplast vesicles. Plant Physiol. 77, 46-52.
- Rea, P.A., Kim, Y., Sarafian, V., Poole, R.J., Davies, M and Sanders, D. (1993). Vacuolar translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocases. TIBS. 17, 348-353.
- Rea P.A. and Sanders D. (1987) Tonoplast Energization: Two H<sup>+</sup> Pumps One Membrane. Plant Physiol. 71, 131-141.
- Reeves, E.R., South, J.S., Blytt, J.H., Warren, G.C. (1974) Pyrophosphate: D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferasa. J. Biol. Chem. 249, 7737-7741.
- Reeves, E.R., (1976). How useful is the energy in inorganic pyrophosphate? Trends in Biochemical Sciences 1, 53-55.
- Rebolledo, S. y Celis, H. (1990) Contenido Intracelular de Pirofosfato en células de *Rhodospirillum rubrum*. XVIII Congreso Nacional de la Sociedad mexicana de Bioquímica, San Luis Potosí. SLP. p131
- Ridlington, W.J. y Butler, G.L. (1972) Yeast inorganic pyrophosphatase. J. Biol. Chem. 247, 7303-7307.
- Robertson, E.D. y Rottemberg, H., (1983) Membrane potential and surface potential in mitochondria. J. Biol. Chem 258, 11039-11048.
- Romero I, Gomez-Priego a, Celis, H. (1991) A membrane-bound pyrophosphatase from respiratory membranes of *Rhodospirillum rubrum*. J. Gen. Microbiol. 137, 2611-2616.
- Romero, I y Celis, H. (1992) Evidence of an essential carboxyl residue in membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. J. Bioenerg Biomembr. 24, 617-624.

- Rogers, A.J. (1983) Bacterial cell structure, Workingham, Van Nostrand. Reinhold U.K.
- Sarafian, V. y Poole, R.J. (1989) Purification of an H<sup>+</sup>-Translocating Inorganic Pyrophosphatase from vacuole membranes of Reed 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 pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pumping of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **88**, 1775-1779.
- Segel, I. (1975) Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid equilibrium and study of steady state kinetics. New-York, Jhon Willey & Sons.
- Schiff, J. A. (1972) A Green safeligth for the study of Chloroplast development and the other Photormorphogenetic Phenomena, en: *Methods in Enzymology* (Ed. San Pietro, A.) vol 24, Parte B. pp 321-322. Academic Press. New-York, London.
- Schmidt, A.L. y Briskin, D.P. (1993) Energy Transduction in Tonoplstat Vesicles from Red Beet (*Beta vulgaris L.*) Storage Tissue: H<sup>+</sup>/Substrate Stoichiometries for the H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPIase. **301**, 165-173.
- Schole, P. Mitchell, P. y Moyle, J. (1969) The polarity of proton translocation in some Photosynthetic microorganism. *Eur. J. Biochem.* **8**, 450-454.
- Schuldiner, S. Rottemberg, H. y Avron, M. (1972) Determination of ΔpH in chloroplast 2. Fluorescente amines as a probes for the determination of ΔpH in chloroplast. *Eur. J. Biochem.* **25**, 64-70.
- Schwarm, H.S., Vogenschow Y. y Knobloch, K. (1982) Reconstitution of highly purified proton translocating pyrophosphatase from *Rhodobacter palustris*. *FEBS lett*, **224**, 217-220.
- Shakov, Y.A. Nyren, P. y Balstcheffsky, M. (1982) Reconstitution of highly purified proton translocating pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS lett*, **144**, 177-180.
- Strid, A. Karlsson, M.J. y Balstcheffsky, M. (1987) Demonstration of ΔpH and Δψ induced synthesis of inorganic pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS lett*. **224**, 348-352.
- Sosa, A., Ordaz, H., Romero, I., y Celis H. (1992) Mg<sup>2+</sup> is an essential activator of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. J.* **283**, 561-566.

Summer, J. B. (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science*. 100, 413-415.

Takeshinga. K. y Hager, A. (1988) Ion Effects on the H<sup>+</sup>-Translocating Adenosine Triphosphatase and Pyrophosphatase associated with the Tonoplast of *Chara corallina*. 29. 694-657.

Tanaka, Y., Chiba, K., Maeda, M. Y Maeshida, M. (1993) Molecular cloning of cDNA for the vacuolar membrane proton translocating inorganic pyrophosphatase in *Hordeum vulgare*. *Biochem Biophys. Res. Comm.* 190, 1110-1114.

Trupper, H.G. (1971) Higher taxa of the phototrophic bacteria. *Int. Syst. Bacteriol.* 21, 217-220.

Turina, P.M., Venturoli, G., Gräber, P. and Melandri, B.A. (1990) Quantitative estimation of the H<sup>+</sup>-storage capacity of chromatophores and comparison with acid-base induced ATP synthesis. *Biochem. Biophys. Acta.* 1018, 134-137.

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 resolution of 3Å. *Bioorg. Khim.* 10, 1469-1482.

van Niel, C.B. (1935) Photosynthesis of bacteria. *Harbor. Symp. Quant. Biol.* 3, 138-150.

Vianello, A, Zancani, M. Braidot, E. Petrusa, E. and Macri, F. (1991) Proton pumping inorganic pyrophosphatase of pea stem submitochondrial particles. *Biochem. Biophys. Acta.* 1060, 299-302.

Volk, S.E., Baykov, A., Duzhenico, S., Avaeva, M. (1982) Kinetics studies on the interaction of two forms of inorganic pyrophosphatases of heart mitochondria with physiological ligands. *Eur. J. Biochem.* 125, 215-220.

Woese, C.R. (1987) Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.

Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, W.L. (1990) Bacterial Evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87. 4576-4579.

Wood, H.G. (1977) Some reactions in which inorganic pyrophosphatase replaces ATP and serves as a source of energy. *Fed. Proc.* 36, 2197-2205.

## H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub> Stoichiometry of Membrane-Bound Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*<sup>1</sup>

Alejandro Sosa and Heliodoro Celis<sup>2</sup>

Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-243, 04510, México, D.F. Mexico

Received July 8, 1994, and in revised form September 26, 1994

Two kinetic methods have been used to measure the H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub> stoichiometry in the chromatophores of the photosynthetic bacteria *Rhodospirillum rubrum*. In the first method, the fluorescent probe acridine orange was employed to infer the proton pump activity at the steady state of the ΔpH generation. At this point the translocation of protons by the H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase in one direction is balanced exactly by the leak of protons in the opposite direction. Pyrophosphatase activity was then quickly stopped by adding EDTA, producing a relaxation of ΔpH. From the initial rate of this relaxation and the rate of PP<sub>i</sub> hydrolysis measured under the same condition, the H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub> stoichiometry was obtained. In the second method, a mathematical model was used to describe the time course of ΔpH formation. In the two methods an apparent H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub> stoichiometry of nearly 2 was obtained. The H<sup>+</sup>/ATP stoichiometry was determined also as an internal control, giving a value of nearly 3.6, which is in agreement with the value in different F-type H<sup>+</sup>-ATPases. © 1995 Academic Press, Inc.

**Key words:** H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase; H/PP<sub>i</sub> stoichiometry; proton pump; transmembrane pH difference; bacterial chromatophores; internal buffering capacity.

Chromatophores of the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* have been extensively used in biophysical studies, since these microorganisms are able to do both photosynthetic and oxidative phosphorylation. There are two energy-transducing enzymes in the membranes of *R. rubrum*, H<sup>+</sup>-ATPase and the H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase,<sup>3</sup> that convert the energy of the electrochemical gra-

radient of protons (ΔμH<sup>+</sup>) into the high energy bond of ATP or PP<sub>i</sub>, respectively. The membrane-bound pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) catalyzes the synthesis of PP<sub>i</sub> with energy derived from the photosynthetic electron transport in a fully reversible processes (1, 2).

The hydrolysis of PP<sub>i</sub> by the H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase generates a ΔμH<sup>+</sup> which can be used as an energy source for several energy-requiring processes such as the reversal of electron transport (3), the uptake of ions (4), the reduction of NADP by NADH (5), and ATP synthesis (6). The magnitude of the Δψ induced by PP<sub>i</sub> hydrolysis is comparable to the one formed by the H<sup>+</sup>-ATPase in *R. rubrum* (7). In addition, the synthesis of PP<sub>i</sub> by an artificial Δψ or ΔpH in chromatophores of *R. rubrum* was demonstrated (8). The real substrate of the H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase is the Mg-PP<sub>i</sub> complex and free Mg<sup>2+</sup> is an essential activator of this reaction (9).

Recently Nyren and Strid (10) postulated that the physiological role of the H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase under conditions of low electrochemical proton gradient (as darkness) could be the maintenance of the ΔμH<sup>+</sup>.

In spite of several works characterizing the kinetic and bioenergetic properties of the H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase of the photosynthetic bacteria, an important parameter associated with H<sup>+</sup> translocation between the number of H<sup>+</sup> translocated and the number of PP<sub>i</sub> molecules hydrolyzed, remains to be established. The stoichiometric relationship value represents an important parameter governing the free energy transduction in coupled transport systems, and knowledge of this value is important for developing a mechanistic model of the catalytic cycle of the enzyme and to explain the physiological role of the H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase. In chromatophores, ΔpH induced by artificial changes of pH, actinic light on the pigment proteins of membrane,

<sup>1</sup> This work was partially supported by Grant 030359 from PADEP of UNAM. A. Sosa was awarded a fellowship by DGAPA of UNAM.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. Fax: (525) 622 5611. E-mail: asosa@ifscunl.ifsiol.unam.mx.

<sup>3</sup> Abbreviations used: Hepes, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid; Mes, 2-n-morpholinoethanesulfonic acid; CCCP, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone; ΔμH<sup>+</sup>, electrochemical

gradient of protons; Δψ, membrane potential; PP<sub>i</sub>, inorganic pyrophosphate; H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase, membrane-bound pyrophosphatase; BSA, bovine serum albumin; EGTA, ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether) N,N'-tetracetic acid.

and ATPase activity have been reported (11, 12). However, the generation of a  $\Delta\text{pH}$  induced by  $\text{PP}_i$  hydrolysis in chromatophores has not been described.

In the determination of  $\text{H}^+/\text{PP}_i$  stoichiometry, a thermodynamic or kinetic approach can be used (12). The thermodynamic approach requires an accurate comparison of the free energy of substrate hydrolysis ( $\Delta G_{\text{substrate}}$ ) with the maximal magnitude of  $\Delta\mu\text{H}^+$  formed in the coupled process, according to the relation  $\Delta G_{\text{pp}} \geq n \Delta\mu\text{H}^+$  at equilibrium, in which  $n$  is the  $\text{H}^+/\text{PP}_i$  stoichiometry. The last parameter is highly influenced by the passive  $\text{H}^+$  conductance of the membrane (13).

In the kinetic approach, direct measurements of  $\text{H}^+$  transport are compared with rates of substrate hydrolysis under the same experimental condition. The estimation of  $\text{H}^+$  transport in vesicles that build up a  $\Delta\text{pH}$  is made using fluorescent probes to evaluate the  $\Delta\text{pH}$  relaxation rate in the steady state. This approach has been used to estimate the  $\text{H}^+/\text{ATP}$  stoichiometry of the plasma membrane  $\text{H}^+/\text{ATPase}$  from *Neurospora crassa* and *Escherichia coli* (14) and the  $\text{H}^+/\text{PP}_i$ ase from vacuoles of *Beta vulgaris* (15). A second kinetic approach is based on the use of a mathematical model describing the time course of  $\Delta\text{pH}$  formation (16). The kinetic methods have advantages over the thermodynamic ones, because they are independent of the buffering capacity of the medium, and they are not affected by the passive  $\text{H}^+$  leaks, which usually occur in biological membranes.

The two previously described kinetic methods were employed in the present work to measure the  $\text{H}^+/\text{PP}_i$  and  $\text{H}^+/\text{ATP}$  stoichiometry in the chromatophores of *R. rubrum*. Apparent stoichiometries of 2.0 for  $\text{H}^+/\text{PP}_i$ ase and 3.6 for  $\text{H}^+/\text{ATPase}$  were obtained.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial growth and preparation of chromatophores from wild-type *R. rubrum*.** Wild-type *R. rubrum* (ATCC 11170) was grown anaerobically in the light (tungsten lamps of 40 W at 30 cm) at 30°C in the medium described by Cohen-Bazire *et al.* (17). Bacterial cells were harvested in the late exponential phase. The cells were washed with 50 mM KCl/50 mM Mops buffer, pH 7.5. Chromatophore membranes were prepared with a French press (SLM Aminco) at 17 000 psi in 100 mM KCl/10 mM Hepes-KOH, pH 7.2. After centrifugation at 26,000g for 20 min at 4°C, the supernatant was collected and centrifuged at 105,000g for 90 min at 4°C. Residual  $\text{Mg}^{2+}$  was eliminated from chromatophores by washing with 3 mM EDTA/5 mM EGTA/100 mM KCl/10 mM Hepes-KOH, pH 7.2, at 4°C, followed by a second washing with 100 mM KCl/10 mM Hepes-KOH, pH 7.2, at 4°C. The final pellet was resuspended in the same buffer at approximately 50 mg protein/ml.

For the preparations of Mes-loaded chromatophores, 0.25 M Mes-KOH, pH 6.0, 7.0, or 8.0, was included in the chromatophore preparation buffer and subsequent steps. The chromatophore preparations were kept at 4°C and used within the next 2 days. Within this period of time, no changes in the hydrolytic activity or in proton pump activity were detected. Protein was determined by the method of Lowry *et al.* (18), using BSA as standard.

**Measurements of pH gradient.** The formation of  $\Delta\text{pH}$  was assayed by measuring the fluorescence quenching of acridine orange induced by the addition of  $\text{Mg-PP}_i$  (pyrophosphatase activity) or  $\text{Mg-ATP}$

(ATPase activity) in the membrane preparation of *R. rubrum*. Before the experiments, it was explored if there was an effect on electron transport which might interfere with assays of fluorescence quenching. It was found the antimycin (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) did not modify fluorescence quenching. Since there was no effect, the inhibitor was omitted from the reaction media. Chromatophores (0.25 mg protein/ml) were incubated in a stirred cuvette at 30°C in 2 ml medium reaction, containing 100 mM KCl/10 mM Hepes-KOH/pH 7.2, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ /0.5 mM  $\text{PP}_i$ , and 2.5  $\mu\text{M}$  acridine orange in the case of  $\text{PP}_i$ ase activity. For the ATPase activity, the medium reaction was the same except that 4 mM  $\text{MgCl}_2$  and 4 mM ATP were added. After the mixing and equilibration of temperature, the reaction was initiated using the respective substrate for each enzyme.

The steady state of the pH gradient was reached when the level of fluorescence quenching in the time course was stable; this state was reached at from 10 to 12 min for  $\text{PP}_i$ ase and ATPase and remained stable for at least 14 min in both cases. The fluorescence was monitored using an SLM Aminco spectrofluorometer with the excitation monochromator at 429 nm and the emission monochromator at 600 nm. At steady state of the  $\Delta\text{pH}$  gradient,  $\text{H}^+/\text{PP}_i$ ase activity was stopped quickly by the addition of 3 mM of EDTA (5 mM EDTA in the case of  $\text{H}^+/\text{ATPase}$ ). The  $\Delta\text{pH}$  relaxation rate was determined by measuring the initial rate of recovery of the acridine orange fluorescence using a strip-chart recorder at 1 cm/min. The initial rate of this trace was linear. A calibration curve of fluorescence quenching versus  $\Delta\text{pH}$  (see below) was used to express the rate of recovery of the fluorescence ( $\Delta\text{pH}$  relaxation) into pH units/min  $\cdot$  mg protein.

**Calibration of  $\Delta\text{pH}$ .** To calibrate the value of the  $\Delta\text{pH}$  induced by  $\text{PP}_i$  or ATP, chromatophores of *R. rubrum* were prepared in 0.25 M Mes-KOH pH 6.0, 7.0 or 8.0 as described above. Vesicles (0.25 and 0.35 mg protein/ml) were added rapidly to a fluorescence cuvette containing 2.5  $\mu\text{M}$  acridine orange, 10 mM Tris-Mes, pH 6.0 to pH 10.0, 0.15 M KCl, and 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  in a final volume of 2.0 ml. A rapid fluorescence quenching was observed, followed by a slower recovery of fluorescence toward the baseline. After approximately 4 min, 5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (final concentration) was added in order to collapse any residual  $\Delta\text{pH}$  and determine the final baseline. The  $\Delta\text{pH}$  calibration curve was constructed using the percentage of quenching (maximal value of fluorescence quenching) with respect to the fluorescence in presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (baseline), according to the following relation:  $\log [\%Q/(100-\%Q)]$  versus  $\Delta\text{pH}$ .

**Measurement of the internal buffering capacity of chromatophores.** The internal buffering capacity was determined by the method of Maloney (19), modified for the chromatophore preparation. The vesicles were diluted (50-fold) in an unbuffered solution of 0.5 M KCl, and centrifuged at 105,000g for 90 min at 4°C. This procedure was repeated at least twice, and the final pellet was resuspended at concentrations of 0.5 to 1 mg of protein/ml in 0.5 M KCl.

Nitrogen was bubbled prior to the measurements and the pH of the unbuffered chromatophores were adjusted with HCl to pH values ranging from 6.0 to 7.2. Ten milliliters was added to a jacketed reaction vessel at 30°C.  $\text{H}^+$  (100 to 150 nmol) was added, and the change of external pH was registered with a pH radiometer, with a scale of 1.0 cm corresponding to 0.015 units of pH change. When the biphasic pH traces were analyzed according to Maloney's method, the internal buffering capacity was relatively independent of the pH in the range 6.0 to 7.2 with an average value of  $0.284 \pm 0.004 \mu\text{mol H}^+/\text{pH units} \cdot \text{mg protein}$ .

**$\text{PP}_i$  or ATP hydrolysis rate.** The hydrolytic reaction was determined in the dark with a green safety light under the conditions described under *Measurements of pH gradient*. The reaction was stopped by the addition of trichloroacetic acid (6% final concentration). Phosphate was determined in the supernatant as described by Fiske and Subbarow (20). The calculations of  $\text{MgCl}_2$  and  $\text{NaPP}_i$ , necessary for maintaining a given concentration of  $\text{Mg-PP}_i$  and free  $\text{Mg}^{2+}$ , were based on the computer program of Fabiato (21).

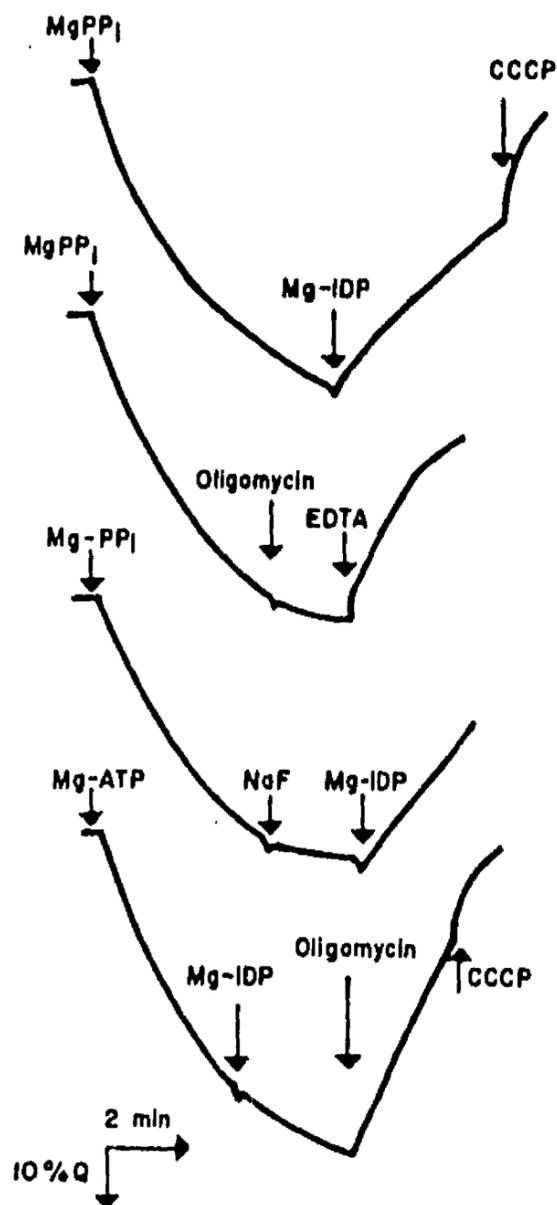


FIG. 1. Effect of inhibitors of H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase and H<sup>+</sup>-ATPase on ΔpH formation in chromatophores of *R. rubrum*. The reaction medium contained 100 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH, pH 7.2, 2.5 μM acridine orange at 30°C. As indicated, 0.5 mM Mg-PP<sub>i</sub>, 4 mM Mg-ATP, 1.5 mM Mg-IDP, 10.0 mM NaF, 5 μg/ml oligomycin, and 2.0 mM EDTA were added to the medium.

## RESULTS

### Chromatophores of *R. rubrum* Generate a ΔpH Dependent on H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase or H<sup>+</sup>-ATPase Activity

The hydrolysis of PP<sub>i</sub> was stimulated 85% when 2.5 μM of CCCP was added, indicating that the ΔμH<sup>+</sup> was coupled to the H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase activity in the chromatophores used in this work. In the same way addition of Mg-PP<sub>i</sub> (the real substrate for H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase) or Mg-ATP induced the quenching of acridine orange due to the increase in ΔpH. This quenching was abolished by 2.5 μM of CCCP (Fig. 1). The magnitude of ΔpH depends on the concentration of Mg-PP<sub>i</sub> (data not shown). Mg-IDP (1.5 mM), an inhibitor of H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase, induced a recovery of fluorescence. NaF at 10 mM arrested the fluorescence quenching, but it should be noted that at this concentra-

tion there was a residual H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase activity (not shown), i.e., higher concentrations, are required for full inhibition (22), but these interfere with the fluorescence measurements. The specific inhibitor of H<sup>+</sup>-ATPase, oligomycin (5 μg/ml), had an effect only on ΔpH induced by Mg-ATP and hardly affected the fluorescence quenching induced by Mg-PP<sub>i</sub> hydrolysis (Fig. 1). The chelation of Mg<sup>2+</sup> by EDTA inhibited the hydrolytic activity of both H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase and H<sup>+</sup>-ATPase and produced a recovery of fluorescence in both cases.

### ΔpH Calibration

Chromatophores (0.25 and 0.35 mg/ml) were loaded with 0.25 M Mes-KOH, at pH 6.0, 7.0, or 8.0, and 0.25 M KCl and added to solutions of different pH values in order to generate a ΔpH from 0 to 3.0. Hence, ΔpH was imposed by varying the external pH. A linear relationship was observed when the data were plotted as log [%Q/(100%-Q)] versus ΔpH (Fig. 2), in which %Q is the percent of quenching, and 100% is the maximal fluorescence registered (baseline). The linear relationship was independent of the internal pH in the ΔpH interval between 0 and 2.5. It should be noted (13) that this linear relationship would be predicted by

$$\log \left[ \frac{\%Q}{100\% - \%Q} \right] = \Delta pH + \log V_i/V_o \quad (1)$$

in which V<sub>i</sub> and V<sub>o</sub> are the internal and external volumes, respectively. Therefore, the Y-intercept (Fig. 2) should give an estimation of the vesicle internal volume. The value of this intercept was -1.46, which corresponded to a V<sub>i</sub>/V<sub>o</sub> ratio of 0.034. This means that there are 34 μl of vesicle internal volume per milliliter. Since the assay contained 250 μg of protein, an internal volume of 136 μl/mg protein was obtained. However, the internal volume of chromatophores was determined as

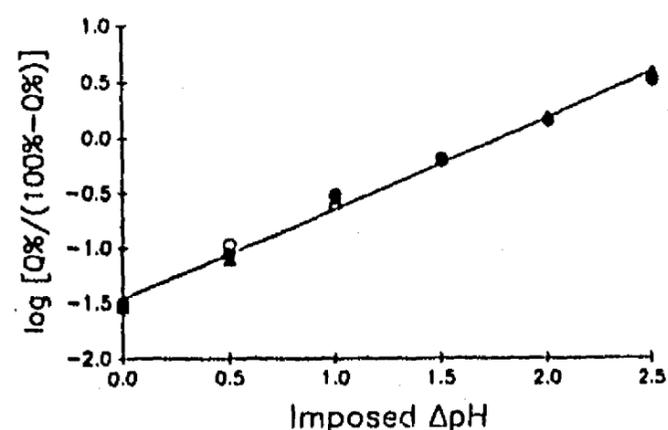


FIG. 2. Calibration curve for the fluorescence quenching of acridine orange in response to an imposed ΔpH. Chromatophores were loaded with 0.250 M Mes-KOH, pH 6.0 (○, ●), pH 7.0 (Δ), and pH 8.0 (▲). The external pH was modified as described under Materials and Methods and the magnitude of quenching was determined at 0.25 (○) and 0.35 (●) mg protein/ml.

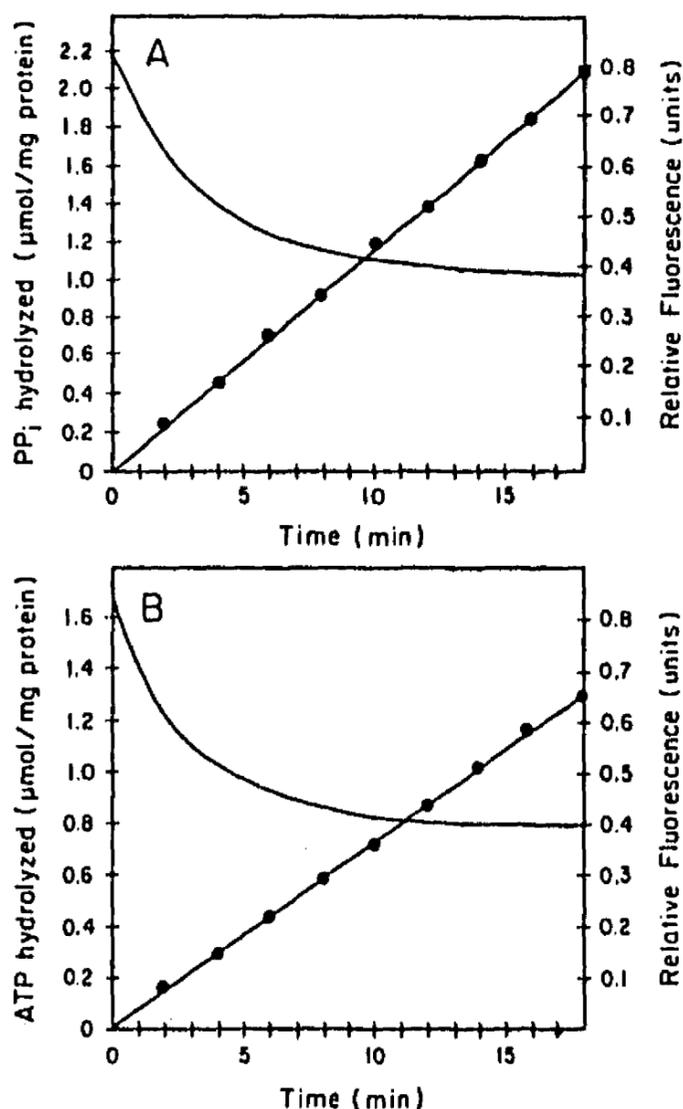


FIG. 3. Time course of Mg-PP<sub>i</sub> (A) or Mg-ATP (B) hydrolysis (●) and ΔpH formation (—) in chromatophores of *R. rubrum* 0.25 mg of protein were resuspended in 2.0 ml of medium containing 100 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH, pH 7.2, and 2.5 μM acridine orange. The hydrolysis of PP<sub>i</sub> or ATP was monitored as a function of time, as described under Material and Methods.

3.5 μl/mg protein (23). Therefore, this indicates that in the absence of a ΔpH gradient, acridine orange was taken up by the chromatophore to an extent larger than expected for a free amine in solution. In any case, this does not dispute the observation that the fluorescence change behaves according to Eq. [1], as noted by Briskin and Reynolds-Niesman (24).

#### Determination of H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub> Stoichiometry Using ΔpH Relaxation Rate to Infer the Initial Rate of H<sup>+</sup> Transport

When chromatophores were incubated in the presence of 2.5 μM of acridine orange, the addition of Mg-PP<sub>i</sub> produced a quenching of fluorescence due to the translocation of H<sup>+</sup> to the interior of the chromatophores (Fig. 3). The magnitude of ΔpH was calculated by using the calibration curve (shown in Fig. 2). The conditions were

10 mM HEPES-KOH, pH 7.2, and 100 mM KCl to reduce the membrane potential (25). For the steady-state condition an average of  $2.4 \pm 0.06$  ΔpH units ( $n = 10$ ) was obtained for the H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase and  $2.4 \pm 0.05$  ΔpH units ( $n = 11$ ) for the H<sup>+</sup>-ATPase. It is important to note that the hydrolytic reaction measured under the same conditions during the ΔpH formation and at the ΔpH steady state was linear with time for both substrates. Therefore, the hydrolysis of substrate did not limit the generation of the ΔpH steady-state.

At steady state of the ΔpH formation, it is assumed that the H<sup>+</sup> translocation by the pump is exactly balanced by the H<sup>+</sup> efflux. Therefore, when H<sup>+</sup> pump rate is inhibited rapidly and completely at the steady state, the observed ΔpH relaxation rate (Fig. 3) can be used to infer the initial velocity of the H<sup>+</sup> pump (14).

Since Mg<sup>2+</sup> ions are required for hydrolytic activity for both enzymes, a fast and complete inhibition of H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase or H<sup>+</sup>-ATPase at steady state without modifying the membrane permeability was achieved by the addition of EDTA. Other inhibitors for H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase such as NaF and Mg-IDP produced an incomplete inhibition after a detectable lag of few seconds (data not shown). The action of EDTA was highly reproducible; concentrations above 2.5 and 5 mM of EDTA did not increase further the maximal initial rate of ΔpH relaxation for H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase.

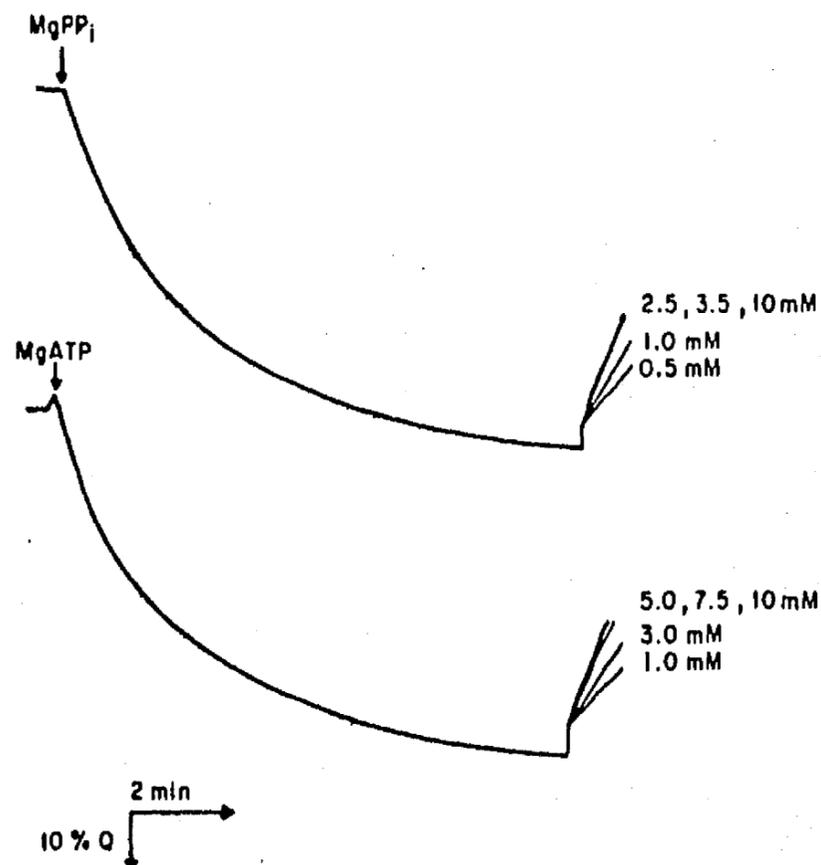


FIG. 4. Determination of the H<sup>+</sup> relaxation rates by adding EDTA at the steady state of the ΔpH formation by H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase (A) or H<sup>+</sup>-ATPase (B). The acridine orange fluorescence was used to determine the ΔpH gradient as described under Materials and Methods. The resulting relaxation curves were superimposed for ready comparison.

TABLE I  
Estimation of H<sup>+</sup>/Substrate Stoichiometry by the Kinetic Method Based on the Determination of H<sup>+</sup> Relaxation Rate at Steady State and Measurements of Substrate Hydrolysis

	H <sup>+</sup> -PP <sub>i</sub> ase	H <sup>+</sup> -ATPase
ΔpH at steady state	2.4 ± 0.06 (n = 10)	2.4 ± 0.05 (n = 11)
ΔpH relaxation rate (ΔpH units/min)	0.94 ± 0.05 (n = 6)	0.96 ± 0.04 (n = 5)
Internal buffering capacity (μmol H <sup>+</sup> /pH units · mg protein)	0.284 ± 0.04	0.284 ± 0.04
H <sup>+</sup> estimated transport (μmol H <sup>+</sup> /min · mg protein)	0.266	0.272
Substrate hydrolysis (μmol of substrate hydrolyzed/min · mg protein)	0.117 ± 0.007 (n = 12)	0.072 ± 0.002 (n = 10)
H <sup>+</sup> /substrate stoichiometry*	2.3	3.8

\*H<sup>+</sup>/substrate stoichiometry was determined multiplying the H<sup>+</sup> relaxation rate by the internal buffering capacity and dividing the product by the rate of substrate hydrolysis.

ase, and H<sup>+</sup>-ATPase (Figs. 4A and 4B, respectively). In previous studies it was shown that EDTA provided the most adequate method for inhibiting H<sup>+</sup> pump enzymes such as H<sup>+</sup>-ATPases (14, 15). The addition of 0.5 mM of Mg-PP<sub>i</sub> after EDTA did not modify the ΔpH relaxation rate. Furthermore, the addition of EDTA (2.5 mM) previous to substrate addition completely prevented ΔpH generation; this demonstrated the completely inhibition of H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase by EDTA. The ΔpH relaxation rate calculated for H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase and for the H<sup>+</sup>-ATPase (Table I) was multiplied by the internal buffering capacity of the chromatophores of *R. rubrum* (0.284 μmol H<sup>+</sup>/pH unit · mg protein, as calculated by method of Maloney (19), in order to estimate the rate of proton transport (Table I). The magnitude of internal buffering capacity determined in a pH range of 6.0 to 7.2 is similar to that calculated for vesicles of plasma membrane of *Neurospora* (0.260 μmol H<sup>+</sup>/pH unit · mg protein) and for *E. coli* membranes (0.3 μmol H<sup>+</sup>/pH unit · mg protein). The calculation gave 0.266 and 0.272 μmol of H<sup>+</sup>/min · mg protein for H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase and H<sup>+</sup>-ATPase, respectively. When these values were divided by the hydrolytic activity measured under the same conditions, an apparent stoichiometry of 2.3 and 3.8 was obtained for H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase and H<sup>+</sup>-ATPase, respectively (Table I).

To corroborate the H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub>ase stoichiometry in the absence of any membrane potential, the measurements were carried out in the presence of 1 μM valinomycin. The hydrolysis of PP<sub>i</sub> was slightly stimulated to 0.136 μmol of PP<sub>i</sub> hydrolyzed/min · mg protein, and the ΔpH relaxation rate was slightly stimulated to 1.10 ΔpH unit/min · mg protein, giving a stoichiometry of 2.3 (data not shown).

#### Determination of H/PP<sub>i</sub> Stoichiometry by a Mathematical Analysis of ΔpH Formation in Time

Another kinetic determination of H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub> and H<sup>+</sup>/ATP stoichiometry was based on a mathematical model (16). This model assumes that the value of ΔpH at any time is due to the balance of H<sup>+</sup> influx produced by the H<sup>+</sup> pump and the sum of passive H<sup>+</sup> leakage and thermodynamic restrictions against the H<sup>+</sup> transport. The net rate of proton transport as a function of time is described by  $d\delta/dt = mR_s - K_1\delta$ , where  $\delta$  is the mole of H<sup>+</sup> transported,  $m$  is the H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub> stoichiometry,  $R_s$  is the rate of PP<sub>i</sub> hydrolysis, and  $K_1$  is the sum of the rate constant for H<sup>+</sup> leakage and any thermodynamic back pressure upon H<sup>+</sup> transport. At steady state the equation is expressed as

$$m = \frac{K_1\delta}{R_s} \quad [2]$$

In addition, the change in ΔpH within time is described by the fluorescence quenching of acridine orange. Therefore, the previous equation permits an evaluation of H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub> or H<sup>+</sup>/ATP stoichiometry if  $K_1$  is determined for each condition. This constant can be evaluated because the integration of the rearranged equation  $d\delta/dt = K_1(\delta_s - \delta)$  gives

$$\ln(1 - \delta/\delta_s) = -K_1 \cdot t \quad [3]$$

The ratio  $\delta/\delta_s$  represents the relation between the net transport at any time of the steady state, which corresponds to the relation between fluorescence quenching at any time and the quenching of the steady state. Therefore, a plot of  $\ln(1 - \delta/\delta_s)$  versus time gives a linear relationship with a negative slope equal to  $K_1$ . The  $K_1$  value was found to be  $0.309 \pm 0.006 \text{ min}^{-1}$  for H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase and  $0.368 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$  for H<sup>+</sup>-ATPase (Fig. 5).

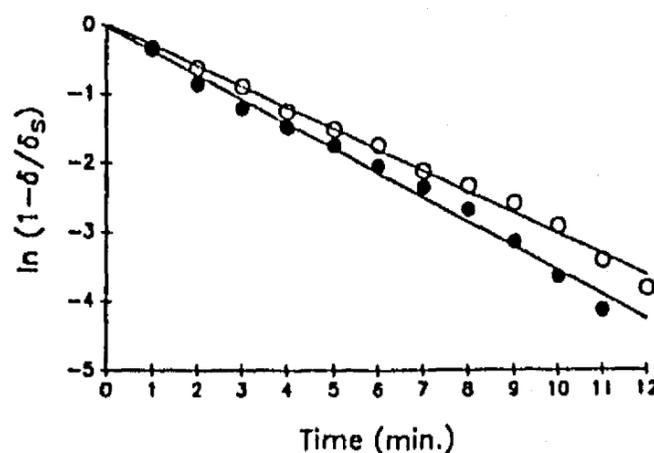


FIG. 5. Determination of  $K_1$  from the time of course of ΔpH formation in chromatophores of *R. rubrum*. H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase activity (O) and H<sup>+</sup>-ATPase activity (●). The acridine orange quenching was used to determine the ΔpH gradient as described under Materials and Methods.

TABLE II  
Estimation of H<sup>+</sup>/Stoichiometry by a Mathematical Analysis  
of ΔpH Formation and Measurements  
of Substrate Hydrolysis

	H <sup>+</sup> -PP <sub>i</sub> ase	H <sup>+</sup> -ATPase
ΔpH at steady state (pH units)	2.4 ± 0.06 (n = 10)	2.4 ± 0.05 (n = 11)
Internal buffering capacity (μmol H <sup>+</sup> /pH units · mg protein)	0.284 ± 0.04	0.284 ± 0.04
δ <sub>s</sub> (μmol H <sup>+</sup> /min · mg protein) <sup>a</sup>	0.681	0.681
K <sub>1</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.309 ± 0.009 (n = 6)	0.368 ± 0.012 (n = 5)
Estimated H transport (μmol H <sup>+</sup> / min · mg protein)	0.210	0.250
Substrate hydrolysis (μmol of substrate hydrolyzed/min · mg protein)	0.117 ± 0.007 (n = 12)	0.072 ± 0.002 (n = 10)
H <sup>+</sup> /substrate stoichiometry <sup>b</sup>	1.8	3.5

<sup>a</sup> δ<sub>s</sub> was determined multiplying the ΔpH at steady state by internal buffering capacity.

<sup>b</sup> H<sup>+</sup>/substrate stoichiometry was determined multiplying the K<sub>1</sub> and δ<sub>s</sub> and dividing the product by the rate of substrate hydrolysis.

The value of δ<sub>s</sub> (net amount of H<sup>+</sup> transported) was evaluated by multiplying the steady state ΔpH by the internal buffering capacity (Table II). The rate of proton transport at steady state was calculated by multiplying the K<sub>1</sub> value by the net H<sup>+</sup> transported at steady state, according to Eq. [2], obtaining a value of 0.210 μmol H<sup>+</sup>/min · mg protein for H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase and of 0.250 μmol H<sup>+</sup>/min · mg protein for H<sup>+</sup>-ATPase (Table II).

When the H<sup>+</sup> pump rate was divided by the rate of PP<sub>i</sub> or ATP hydrolysis measured under the same conditions, an apparent stoichiometry of 1.9 and 3.5 was obtained for H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase and H<sup>+</sup>-ATPase in chromatophores of *R. rubrum*. To corroborate this value in the absence of any membrane potential, K<sub>1</sub> was determined in the presence of 1 μM valinomycin. The ΔpH slightly increased to 2.49 ± 0.03 ΔpH units, the K<sub>1</sub> changed to 0.372 μmol H<sup>+</sup>/min · mg protein, and the hydrolytic activity slightly increased to 0.136 μmol of PP<sub>i</sub> hydrolyzed/min · mg protein, giving a H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub>ase stoichiometry of 1.93 (data not shown).

## DISCUSSION

With two different kinetic methods, an apparent stoichiometry close to 2.0 was obtained for H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase and of 3.6 for H<sup>+</sup>-ATPase in chromatophores of *R. rubrum*. This is in agreement with a lower stoichiometry for the H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase compared to that for H<sup>+</sup>-ATPase as reported for the photosynthetic bacteria *R. rubrum* (10). The H<sup>+</sup>/ATP stoichiometry value obtained in this work is consistent with the values between 3 and 4 reported for several F-type H<sup>+</sup>-ATPases (26), including that of the photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus* (27). The

stoichiometry calculated for H<sup>+</sup>/ATPase and its similarity to reported values thus validates the methodology used for the determination of H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub> stoichiometry. Nevertheless, Krenn *et al.* (28) recently described that the H<sup>+</sup>/ATP stoichiometry in *R. rubrum* chromatophores varies with the external pH, giving a value close to 4.0 at pH 7.5.

## Evaluation of the Presently Employed Methodologies

Since the internal buffering capacity is a critical value for evaluating H<sup>+</sup>/substrate stoichiometry, this value was measured in a broad pH range between 6.0 and 7.2; measurement of this value at more acid pH was not possible due to chromatophore aggregation (29). The agreement between the H<sup>+</sup>/ATP stoichiometry measured in this work and the value reported (27) validate the value of calculated internal buffering capacity. We found that the internal buffering capacity for *R. rubrum* is similar to that calculated for *N. crassa*, *E. coli* (14), and *B. vulgaris* (15) and larger than the value obtained in reconstituted vesicles of maize roots (16). The values for bacteria are consistently greater than the ones found for membranes of organelles (30).

In the evaluation of H<sup>+</sup>/substrate ratio, kinetic methods have an advantage with respect to the thermodynamic methods. For instance, a source of error in the thermodynamic approach is the H<sup>+</sup> leak, which is taken into account in the kinetic approach. In addition, in the first kinetic method here employed, the rate of H<sup>+</sup> relaxation, which depends on the passive H<sup>+</sup> leakage, is used to infer precisely the H<sup>+</sup> pump rate at the steady state of the ΔpH formation. In the mathematical model describing the ΔpH formation, K<sub>1</sub> includes the information of the H<sup>+</sup> leakage. However, the presently used kinetic methods might overestimate or underestimate the stoichiometry (see 24). For example, the H<sup>+</sup>/substrate stoichiometry would be underestimated when the rate of H<sup>+</sup> translocation is lower than that of substrate hydrolysis and, as a consequence, at the steady state a low ΔpH would be generated.

Another source of error in the first kinetic method results if the H<sup>+</sup> transport rate is not stopped quickly and completely or if the inhibitor modifies the membrane permeability. Therefore, the selection of EDTA as inhibitor is most appropriate as demonstrated by Perlin *et al.* (14) and Schindt and Briskin (15). There is also error when the rate of proton leakage is limited by a transient formation of membrane potential immediately after inhibitor addition; in this case the stoichiometry would be underestimated. Hence, to minimize this effect we have used a high concentration of KCl and 1 μM valinomycin. Although this produced a slight increase of hydrolytic activity and ΔpH relaxation rate, the H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub> stoichiometry remained close to 2.0.

*Comparison of Stoichiometries*

On the basis of computed calculation on the free energy change of hydrolysis of PP<sub>i</sub> and ATP (31), and on the measurements of the ΔpH generated *in vivo* by H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase and H<sup>+</sup>-ATPase in plant vacuoles (32), it would appear that the vacuolar H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase with a stoichiometry of 1 can operate in the hydrolytic direction against a large ΔpH (of nearly 4). In contrast with a stoichiometry of 2 or larger the H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase may operate in the direction of synthesis at ΔpH of 2.0. Furthermore, it has been described that the H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase of isolated intact vacuoles generates a ΔpH ranging from 3.6 to 5.8, depending on the extravesicular concentration of PP<sub>i</sub> (33).

The H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub> stoichiometry recently calculated by kinetic methods is 1 in tonoplast vesicles of *B. vulgaris*. This value probably reflects the function of the vacuolar H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase; it works in parallel with the H<sup>+</sup>-ATPase to generate a ΔμH<sup>+</sup> of the magnitude necessary to drive co-transport across the vacuolar membrane. On the other hand, the here-described H<sup>+</sup>/PP<sub>i</sub> stoichiometry of 2 for *R. rubrum* indicates that in chromatophores the H<sup>+</sup>-PP<sub>i</sub>ase would make a synthesis of PP<sub>i</sub> at lower values of ΔpH than those generated in vacuolar systems. However, under physiological conditions the ΔpH values should be considered in light of the intracellular concentration of substrate and products of the reaction. The interplay between these various factors should determine the direction of the reaction.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs. A. Gómez-Puyou, J. P. Pardo-Vázquez, and D. González-Halphen for critically reading the manuscript. The secretarial assistance of Mrs. Ma Elena Gutiérrez is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

- Baltschefskey, M., and Nyrén, P. (1984) in *Bioenergetics* (Ernester, L., Ed.), pp. 187-206, Elsevier, Amsterdam.
- Baccarini-Melandri, A., and Melandri, B. A. (1978) in *Photosynthetic Bacteria* (Clayton, R. K., and Sistrom, W. R., Eds.), pp. 615, Plenum, New York/London.
- Baltschefskey, M. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**, 270-276.
- Isaev, P. I., Liberman, E. A., Samuilov, V. D., Skulachev, V. P., and Tsofina, I. M. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 22-26.
- Keister, D. L., and Yike, M. J. (1967) *Biochemistry* **6**, 2847-2857.
- Keister, D. L., and Minton, N. J. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 330-338.
- Nore, F. B., Sakni, Y., and Baltschefskey, M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **105**, 189-194.
- Strid, A., Karlsson, I. M., and Baltschefskey, M. (1987) *FEBS Lett.* **224**, 348-352.
- Sosa, A., Ordaz, H., Romero I., and Celis H. (1992) *Biochem. J.* **283**, 561-566.
- Nyrén, P., and Strid, A. (1991) *FEBS Microbiol. Lett.* **77**, 265-270.
- Casadio, R., and Melandri, B. A. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **238**, 219-228.
- Fregni, V., and Casadio R. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 215-222.
- Azzone, G. F., Pietrobon, D., and Zoratti, M. (1984) *Curr. Topics Bioenerg.* **13**, 1-77.
- Perlin, D. S., San Francisco, M. J., Slayman, C. W., and Rosen, B. P. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **248**, 53-61.
- Schmidt, A. L., and Briskin D. P. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **301**, 165-173.
- Brauer, D., Tu, S., Hsu, A. F., and Thomas, C. E. (1989) *Plant Physiol.* **89**, 464-471.
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W. R., and Stainer, R. Y. (1957) *J. Cell. Comp. Physiol.* **49**, 25-68.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Maloney, P. C. (1979) *J. Bacteriol.* **140**, 197-205.
- Fiske, C. A., and Subbarow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.* **117**, 751-766.
- Fabiato, A. (1988) *Methods Enzymol.* **157**, 378-417.
- Baltschefskey, M., and Nyrén, P. (1986) *Methods Enzymol.* **126**, 538-545.
- Schuldiner, S., Padan, E., Rottenber, H., Gromet-Elhanam, Z., and Avron, M. (1974) *FEBS Lett.* **49**, 174-177.
- Briskin, D. P., and Reynolds-Niesman, I. (1991) *Plant Physiol.* **95**, 242-250.
- Perlin, D. S., Kasamo, K., Brooker, R., and Slayman, C. W. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 7884-7892.
- Strotman, H., and Lhose, D. (1988) *FEBS Lett.* **229**, 308-312.
- Turina, P. M., Venturoli, G., Graber, P., and Melandri, B. A. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1018**, 134-137.
- Krenn, B. E., Van Walraven, S., Scholts, J. C., and Kraayenhof, R. (1993) *Biochem. J.* **294**, 705-709.
- Garcia, A. F., and Drews, G. (1984) *Z. Naturforsch.* **39c**, 1112-1119.
- Padan and Schuldiner (1986) *Methods Enzymol.* **125**, 337-352.
- Davies, J. M., Poole, R. J., and Saunders, D. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1141**, 29-36.
- Johannes, E., and Felle, H. (1989) *Plant Physiol.* **93**, 412-417.
- Bennet, A. B., and Spanswick, R. M. (1984) *Plant. Physiol.* **74**, 545-548.