



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR
DE LA PIROFOSFATASA MEMBRANAL DE
Rhodopseudomonas palustris.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A :
RODOLFO GARCÍA CONTRERAS

DIRECTOR DE TESIS: DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

CD. UNIVERSITARIA, MEXICO, D.F.

2002



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

A MIS PADRES

A MI FAMILIA

A MIS AMIGOS

A MIS MAESTROS

AGRADECIMIENTOS

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

A los miembros del jurado; Dr. Georges Dreyfus Cortés, Dr. Luis Servín González, Dr. Diego González Halphen y Dr. Heliodoro Celis Sandoval, por su revisión crítica y sus recomendaciones al trabajo de tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo recibido del programa de Fundación U.N.A.M. para realización de tesis de licenciatura, PROBETEL y por el donativo de DGAPA (PAPIIT No. IN 216401).

A la Maestra en Ciencias Silvia Escobedo Martínez por la ayuda técnica para la realización del trabajo experimental.

A Rodolfo Paredes de la unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular por la elaboración de las fotografías de microscopía electrónica.

ABREVIATURAS.

AE	actividad específica
ADP	difosfato de adenosina
ADN	ácido desoxiribonucleico
AMP	monofosfato de adenosina
ARN	ácido ribonucleico
Atm	atmósfera
ATP	trifosfato de adenosina
CCCP	p-triclorometoxi-carbonil-cianuro-fenilhidrazona
kDa	kilo daltones
DCCD	N, N' dicitclohexilcarbodiimida
DMSO	dimetil sulfóxido
DNTPS	desoxinucleótidos trifosfatados
DTTP	desoxitimidin trifosfato
E _a	energía de activación
EDTA	ácido etilendiamino tetra acético
EGTA	ácido etilenglicol bis (amino-etil eter) N N'tetra acético
F ₀	segmento hidrofóbico de la ATP sintetasa
F ₁	segmento hidrofílico de la ATP sintetasa
GCG	de las siglas en inglés de Genetics Computer Group
H ⁺ ATPasa	ATP sintetasa de protones
H ⁺ PPasa	pirofosfatasa membranal bombeadora de protones
IDP	imidodifosfato
IPTG	Isopropil-β -D-tiogalactopiranosido.
LB	medio Luria-Bertani
MDP	metilendifosfato
MOPS	ácido morfolino propano sulfónico
NADH	dinucleótido de nicotinamida adenina
NADP	fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina
Nbf-Cl	4 cloro-7-nitrobenzo furazan
NCBI	de las siglas en inglés del Centro Nacional de Información Biotecnológica
pb	pares de bases
PEP	fosfoenol piruvato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Pi	fosfato
PM	peso molecular
PPi	pirofosfato
Rf	frente de corrida
SC	segmento conservado
SDS	dodecil sulfato de sodio
Tris	Tris (Hidroximetil) amino metano
ΔμH ⁺	potencial electroquímico de protones
ΔG ^o	cambio de energía libre en condiciones estándar a pH 7.0
Xgal	5' Bromo-4-cloro-3-indolil-β -D-galactopiranosido

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA PIROFOSFATASA MEMBRANAL DE *Rhodospseudomonas palustris*.

Las pirofosfatasas membranales (PPasas) están presentes en algunas bacterias y en vacuolas de las plantas. Son enzimas que utilizan la energía de la hidrólisis del enlace de alta energía del PPI para translocar H^+ a través de la membrana en que están situadas, por lo que se denominan $H^+PPasas$. Se ha descrito que la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* posee una H^+PPasa que no solo es capaz de hidrolizar PPI sino también sintetizarlo de una manera acoplada al gradiente electroquímico de H^+ y en este sentido es el único modelo alternativo a la ATP sintetasa para el estudio de la transducción energética y de los mecanismos de síntesis de uniones de alta energía.

Las $H^+PPasas$ de vacuolas han sido ampliamente estudiadas, sin embargo, dentro de las bacterias solo la de *R. rubrum* se ha caracterizado, por lo que es necesario ampliar el estudio de las $H^+PPasas$ bacterianas para determinar las características generales de estas enzimas. Por estas razones el objetivo de este trabajo fue la caracterización bioquímica y molecular de la H^+PPasa de la bacteria fotosintética *Rhodospseudomonas palustris*. Los resultados mostraron que en general, las características bioquímicas de la hidrólisis de PPI por la H^+PPasa de *R. palustris* en la membrana, son muy semejantes a las de su homóloga en *R. rubrum* (selectividad a sustrato, activación por Mg^{2+} libre, sensibilidad a inhibidores y análogos de sustrato, dependencia de pH, etc). Sin embargo, presenta algunas diferencias como una cinética sigmoideal y una energía de activación mayor ($E_a = 62.7$ kJ/mol). Así mismo, la enzima responde pobremente a los desacoplates debido a que las membranas que se obtuvieron no son vesículas selladas. En cuanto a la caracterización molecular, se clonó y secuenció el gen de la H^+PPasa de *R. palustris*. Tiene un tamaño de 2,178 pb con un contenido de G + C de 69%. Al igual que el gen de *R. rubrum* presenta 2 posibles codones de inicio con sus respectivas regiones de unión a ribosoma y una región terminadora rho independiente. La secuencia de aminoácidos que codifica el gen muestra un 63% de identidad con la H^+PPasa de *R. rubrum* y alrededor de un 40% con las enzimas

de vacuola de plantas. Los perfiles de hidropatía sugieren de 12 a 15 cruces transmembranales dependiendo del codón de inicio utilizado. Finalmente se introdujo el gen de la H⁺PPasa de *R. palustris* en la bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. Esta bacteria carece de esta enzima y técnicamente permite la obtención de vesículas de membrana selladas. Las mutantes obtenidas presentaron en su membrana actividad de hidrólisis de PPI sensible a desacoplantes y síntesis de PPI, aunque estas actividades fueron considerablemente bajas. Estos resultados sugieren que la H⁺PPasa de *R. palustris* podría ser sintética *in vivo*.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.	
1.1.. Generalidades.	1
1.2.. Características de las bacterias púrpuras.	3
1.2.1. Bacterias púrpuras no sulfurosas.	4
1.2.2. <i>Rhodopseudomonas palustris</i> .	6
1.3. Hipótesis de transducción de energía.	7
1.4. Características del pirofosfato.	10
1.4.1. El papel del PPI en el metabolismo celular.	11
1.4.2. Utilización del PPI.	15
1.4.3. El PPI y la PPasa de membrana en la evolución de los mecanismos transductores de energía.	16
1.5. Las pirofosfatasa.	18
1.5.1. Pirofosfatasa citoplásmicas.	18
1.5.2. Pirofosfatasa membranales.	20
1.5.3. La H ⁺ PPasa membranal de <i>Rhodospirillum rubrum</i> .	23
1.5.3.1. Características bioquímicas.	23
1.5.3.2. Características moleculares.	29
2. OBJETIVOS.	30
3. MATERIALES Y METODOS.	31
3.1. Cultivo de bacterias.	
3.1.1. Medios de cultivo.	31
3.1.2. Siembra de bacterias fotosintéticas.	33
3.1.3. Cosecha de bacterias.	34
3.2. Caracterización bioquímica.	34
3.2.1. Obtención de cromatóforos (membranas fotosintéticas).	34
3.2.2. Determinación de proteína.	35
3.2.3. Determinación de la actividad hidrolítica .	35
3.2.4. Determinación de la actividad sintética.	36
3.2.5. Cálculo de las concentraciones de complejos y especies libres en las reacciones.	37
3.3. Caracterización molecular.	37
3.3.1. Obtención de ADN cromosomal de <i>R. palustris</i> .	37
3.3.2. Amplificación por medio de PCR del fragmento del gen de la PPasa membranal de <i>R. palustris</i> .	38
3.3.3. Purificación del producto de PCR.	39
3.3.4. Clonación del producto de PCR.	40
3.3.5. Obtención de células competentes y transformación.	41
3.3.6. Secuenciación.	42
3.3.7. Obtención de la secuencia completa del gen de la PPasa Membranal de <i>R. palustris</i> .	42
3.3.7.1. Digestión del ADN cromosomal de <i>R. palustris</i> .	42
3.3.7.2. Análisis tipo Southern.	42

3.3.7.3. Hibridización tipo Southern en colonia.	46
3.3.8. Análisis de la secuencia.	47
3.3.9. Conjugación.	48
4. RESULTADOS.	
4.1. Caracterización bioquímica de la H ⁺ PPasa de <i>Rhodopseudomonas palustris</i> .	49
4.1.1. Especificidad de sustrato.	49
4.1.2. Efecto del Mg sobre la actividad hidrolítica de la H ⁺ PPasa de <i>R. palustris</i> .	49
4.1.3. Efecto de otros cationes divalentes sobre la actividad hidrolítica.	52
4.1.4. Perfil de pH.	55
4.1.5. Efecto del Zn sobre la actividad hidrolítica a pHs 5.6 y 7.	56
4.1.6. Energía de activación (Ea).	58
4.1.7. Efecto de inhibidores y activadores.	60
4.2. Caracterización molecular del gen de la H ⁺ PPasa de <i>Rhodopseudomonas palustris</i> .	67
4.2.1. Obtención de sonda.	67
4.2.2. Clonación y secuenciación del fragmento de ~1,371 pb	68
4.2.3. Obtención de la secuencia completa.	69
4.2.4. Secuencia de la H ⁺ PPasa de <i>R. palustris</i> .	73
4.3. Introducción del Gen de la H ⁺ PPasa de <i>R. palustris</i> en la bacteria fotosintética <i>R. sphaeroides</i> .	90
4.3.1. Desacoplamiento y síntesis de PPI en cromatóforos de la mutante.	90
4. DISCUSIÓN.	93
5. CONCLUSIÓN.	98
6. BIBLIOGRAFÍA.	100

1. INTRODUCCIÓN

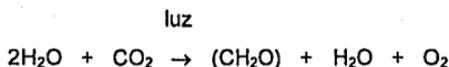
1.1. Generalidades.

En el proceso fotosintético, la energía de la radiación electromagnética es transformada en energía química, ya sea en la membrana tilacoidal de los cloroplastos o en la membrana plasmática de las bacterias fotosintéticas.

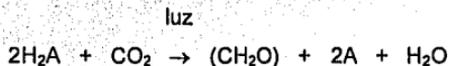
Desde el siglo XVII, se asoció el proceso de la fotosíntesis exclusivamente con las plantas, sin embargo, a partir de 1930 con los estudios de Cornelius Van Niel, se sabe que ciertas bacterias también pueden llevar a cabo dicho proceso.

Existen cuatro grupos de eubacterias (cianobacterias, proclorofitos, bacterias verdes y bacterias púrpuras) y un grupo de arqueobacterias (*Halobacterium*) capaces de realizar fotosíntesis.

La fotosíntesis oxigénica llevada a cabo por las plantas, algunas cianobacterias y los proclorofitos (un pequeño grupo de procariotes fototrópicos simbiotes recientemente descubierto) produce oxígeno, el cual es liberado durante la fotólisis del agua, de acuerdo a la siguiente reacción:



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



donde A = donador de electrones.

El aparato fotosintético puede ser dividido experimentalmente en tres componentes estrechamente relacionados tanto en aspectos estructurales como

funcionales, los cuales son: pigmentos cosechadores de luz, centros de reacción fotoquímicos y una cadena de transferencia de electrones. La energía luminosa absorbida por los pigmentos antena es transferida a los centros de reacción, donde se produce una separación de carga por la liberación de un electrón de la clorofila del centro de reacción. Un flujo de electrones es establecido a través de la cadena de transporte de electrones asociada a la fotosíntesis, la cual se encuentra acoplada a la síntesis de ATP, es decir, la energía derivada de la luz es utilizada para sintetizar el ATP (fotofosforilación) por la ATP sintetasa.

Alternativamente, en algunas bacterias púrpuras, la energía del gradiente electroquímico de protones puede ser acoplada a la síntesis de PPI a través de la pirifosfatasa de membrana (H^+PPasa).

En la fotosíntesis anoxigénica, la síntesis de ATP es la única consecuencia química primaria de la absorción de luz; en cambio en la fotosíntesis oxigénica las consecuencias de la absorción de luz son más complejas, ya que su aparato fotosintético contiene dos clases diferentes de centros de reacción (fotosistemas), conocidos como tipo I y II. La excitación de los centros de reacción tipo I, de manera análoga a la excitación de los centros asociados a la fotosíntesis anoxigénica, puede producir un flujo cíclico de electrones acoplado a la síntesis de ATP. El papel específico de los centros de reacción tipo II es el de realizar la fotólisis del agua. Las dos clases de centros de reacción se encuentran interconectados funcionalmente a través de la cadena de transporte de electrones; si los dos fotosistemas son excitados simultáneamente, se produce un flujo de electrones no cíclico, ligando la oxidación del agua en el fotosistema II, con la reducción del $NADP^+$ en el fotosistema I y a la producción de ATP.

El mecanismo fotoquímico relativamente complejo de la fotosíntesis oxigénica permite el uso del agua (el cual en general no es un buen donador de electrones), para la reducción de nucleótidos de piridina.

Los organismos que realizan fotosíntesis anoxigénica obtienen nucleótidos de pirimidina reducidos, a expensas de ATP, por medio de un flujo reverso de electrones, o bien mediante un flujo de electrones no cíclico desde el donador primario hasta los nucleótidos de piridina.

La utilización de fuentes de carbono para el crecimiento fotosintético, es otra característica que distingue a los organismos que realizan fotosíntesis oxigénica de los que realizan la anoxigénica; las cianobacterias así como los eucariotes fototrópicos dependen exclusivamente del CO_2 como fuente de carbono, mientras que las bacterias verdes y púrpuras además pueden utilizar compuestos orgánicos simples.

Existe otro tipo de fotosíntesis exclusivo de la arqueobacteria del género *Halobacterium*; estos microorganismos se desarrollan quimioorganotróficamente y su obtención de ATP se basa principalmente en la respiración oxigénica; sin embargo, cuando son sometidos a condiciones de limitación de oxígeno, llevan a cabo la síntesis de la cromoproteína bacteriorodopsina, la cual se incorpora en pequeños agregados a la membrana (membranas púrpura). La iluminación de las células de *Halobacterium* que contienen bacteriorodopsina, produce un blanqueamiento de la cromoproteína, acompañado de la liberación de protones al espacio extracelular; el establecimiento de un gradiente transmembranal de protones permite la síntesis de ATP, la cual se mantiene el tiempo en que las células permanecen iluminadas. Por lo tanto este tipo de fotosíntesis no es oxidorreductora.

1.2. Características de las bacterias púrpuras.

Las bacterias púrpuras pertenecen a un pequeño grupo de eubacterias gram-negativas el cual consta de aproximadamente 30 especies, se reproducen por fisión binaria aunque algunas especies lo hacen por gemación, la mayoría son móviles y poseen flagelo.

A pesar del tamaño reducido de este grupo, presenta diversidad genética, de ahí que el contenido de G+C promedio en el DNA varíe de 46% a 73%; el análisis comparativo de las subunidades de RNA ribosomal confirma este hecho.

Considerando sus características fisiológicas y ecológicas, las bacterias púrpuras han sido divididas en dos grupos:

A) Púrpuras sulfurosas.

Son anaeróbicas estrictas con un metabolismo predominantemente fotoautotrófico, basado en el uso de H_2S como donador electrónico.

Sus habitats típicos son aguas ricas en sulfuro, el cual generalmente es producido por la acción de bacterias reductoras de sulfato; géneros representativos de este subgrupo son: *Thiospirillum*, *Chromatium*, *Amoebobacter* y *Thiocystis*.

B) Púrpuras no sulfurosas.

Poseen predominantemente un metabolismo fotoheterotrófico, son sensibles al H_2S y la mayoría son capaces de crecer en condiciones aeróbicas en la oscuridad, debido a que estas especies poseen una cadena de transporte de electrones aeróbica; algunas otras pueden crecer, mediante la fermentación de piruvato y azúcares, en condiciones de anaerobiosis y oscuridad. Los géneros *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodomicrobium*, etc, pertenecen a este subgrupo.

1.2.1. Bacterias púrpuras no sulfurosas.

Debido a que en este trabajo se utilizó una bacteria púrpura no sulfurosa se describirán más ampliamente sus características:

Las bacterias púrpura no sulfurosas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, los cuerpos de agua estáticos como: lodos, pantanos, canales y en las orillas de los lagos eutróficos donde existe una rápida producción y descomposición de materia orgánica proveen las condiciones óptimas para su desarrollo; sin embargo, no han sido encontradas acumulaciones masivas observables a simple vista como las descritas para las bacterias púrpura sulfurosas.

La forma varía entre las diferentes especies del grupo ya que pueden ser: cocos, ovoides, bacilos y espirilos; la mayoría presentan flagelos polares, poseen membranas internas las cuales presentan estructuras que pueden ser: lamelares, vesiculares o tubulares. Su reproducción es por fisión, a excepción de los géneros *Rhodomicrobium* y *Rhodopseudomonas* que se reproducen principalmente por gemación.

La variedad de compuestos orgánicos que pueden ser fotoasimilados por las bacterias púrpura no sulfurosas es amplia e incluye: ácidos grasos y otros ácidos orgánicos, alcoholes primarios y secundarios, carbohidratos y compuestos aromáticos.

Ninguna de las bacterias púrpuras no sulfurosas muere por exposición al aire, sin embargo, algunos de estos organismos no pueden utilizar O_2 como aceptor electrónico final y por tanto son incapaces de crecer aeróbicamente en la oscuridad.

Las especies capaces de llevar a cabo un metabolismo respiratorio pueden crecer anaeróbicamente en la oscuridad, oxidando la misma variedad de compuestos orgánicos que fotoasimilan anaeróbicamente en la luz, a excepción del benzoato, el cual puede ser fotoasimilado anaeróbicamente, pero no puede ser utilizado como sustrato respiratorio, ya que las enzimas que llevan a cabo su reducción pertenecen a una sola vía y son extremadamente sensibles al oxígeno.

Algunas especies crecen tan rápido, utilizando un metabolismo puramente respiratorio como llevando a cabo fotosíntesis; sin embargo, el crecimiento aeróbico conlleva rápidamente a una pérdida casi completa del sistema de pigmentos fotosintéticos. De hecho el O_2 es un potente represor de la síntesis de pigmentos a presiones parciales relativamente bajas, incluso en presencia de luz.

Como consecuencia, el desarrollo fotosintético de todas las bacterias púrpuras tanto anaeróbicas estrictas como anaeróbicas facultativas es posible solamente en un ambiente libre de oxígeno.

Se piensa que a concentraciones de oxígeno entre 0.5% y 5% la fotosíntesis y el metabolismo oxidativo podrían estar funcionando conjuntamente.

La luz no es un requerimiento para la síntesis de pigmentos, como lo demuestra el hecho de que las especies capaces de crecer fermentativamente mantienen un alto contenido de pigmentos por varias generaciones de crecimiento heterotrófico en oscuridad.

Bajo condiciones anaeróbicas en la luz, tanto la velocidad de crecimiento como la síntesis de bacterioclorofila están gobernadas por la intensidad de la luz. Conforme esta aumenta la velocidad de crecimiento aumenta, mientras el contenido celular de bacterioclorofila disminuye.

Muchas de estas bacterias son capaces de crecer como quimioautótrofos aeróbicos utilizando H_2 como donador de electrones, algunas otras pueden llevar a cabo desnitrificación utilizando como fuente energética una gran variedad de compuestos orgánicos; bajo ciertas condiciones, la desnitrificación y la fijación de

nitrógeno pueden proveer suficiente nitrógeno reducido para el crecimiento celular actuando simultáneamente.

La mayoría de estas bacterias requieren vitaminas y su velocidad de crecimiento es aumentada frecuentemente por la provisión de aminoácidos. En general varias combinaciones de biotina, tiamina y niacina constituyen los típicos requerimientos vitamínicos de estas bacterias.

1.2.2. *Rhodopseudomonas palustris*.

De acuerdo a la clasificación de Woese (Woese 1987 y Woese *et al.* 1990); la cual está basada en la similitud de la secuencias de ARNs ribosomales, *Rhodopseudomonas palustris* esta clasificada de la siguiente manera:

Dominio:	Bacteria
Phylum:	bacterias Púrpuras
Subdivisión:	Alfa
Género:	Rhodopseudomonas
Especie:	palustris.

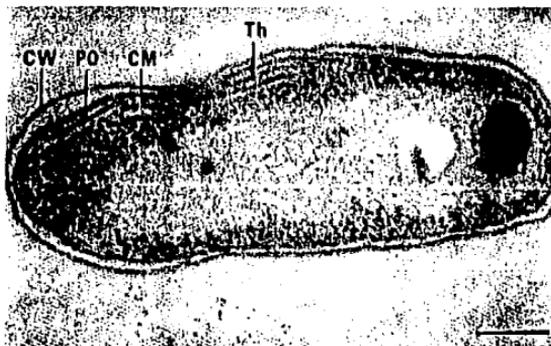


Fig. 1. Micrografía de *Rhodopseudomonas palustris*. Organelo polar (PO); membrana citoplásmica (CM); pared celular CW y membranas internas del tipo tilacoidal (Th). La barra representa 0.2 μm .

El color de los cultivos de *R. palustris* va de rojo a café rojizo y crecen a temperatura de 30- 37°C a un pH óptimo de 6.9 (en un intervalo de 5.5 a 8.5); su composición de G+C en el ADN es de 64.8% a 66.3%. Las células individuales son de forma bacilar a ovoide, ocasionalmente presentan una ligera curvatura, miden de

0.6-0.9 μm de ancho por 1.2-2.0 μm de largo y son móviles gracias a múltiples flagelos subpolares.

En su reproducción por gemación, la célula madre produce en el polo opuesto al que lleva los flagelos un tubo delgado de 1.5 a 2 veces menor que el tamaño de la célula original. El final del tubo se hincha y ahí crece la célula hija, produciendo un organismo en forma de cilindro con terminaciones ensanchadas y es entonces que se lleva a cabo la división asimétrica.

Las células individuales jóvenes son altamente móviles y en los cultivos viejos es característica la formación de rosetas y agregados, en donde las células individuales se encuentran adheridas a otras en sus polos flagelares.

La bacteria presenta membranas fotosintéticas lamelares por debajo y paralelas a la membrana citoplásmica, las células presentan un espectro de absorción con máximos a: 375,468,483,520-545,589,802 y 860-875 nm; los pigmentos fotosintéticos son: bacterioclorofila "a" (esterificada con fitol) y carotenoides de la serie normal de las espiriloxantinas.

El crecimiento fotoautotrófico es posible con H_2 , sulfato y tiosulfato como donadores de electrones en presencia de pequeñas cantidades de extracto de levadura; el crecimiento fotoheterotrófico utiliza como donadores de electrones entre otros substratos acetato, glutamato, lactato y malato.

El crecimiento en la oscuridad se presenta en condiciones que van de microaeróbicas a aeróbicas, y fermentativamente con algunos substratos como fumarato, malato, piruvato y glucosa. El sulfato puede usarse como fuente única de azufre. Los factores de crecimiento requeridos son *p*-aminobenzoato y en algunas cepas biotina.

1.3. Hipótesis de la transducción de energía.

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

Aunque la síntesis de ATP ocurre en sistemas enzimáticos solubles, la producción principal de ATP está asociada a complejos enzimáticos ligados a ciertos

tipos de membranas llamadas "membranas transductoras de energía", como la membrana plasmática de las células procarióticas, la membrana mitocondrial interna y la membrana tilacoidal del cloroplasto (Nicholls, 1982).

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

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

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

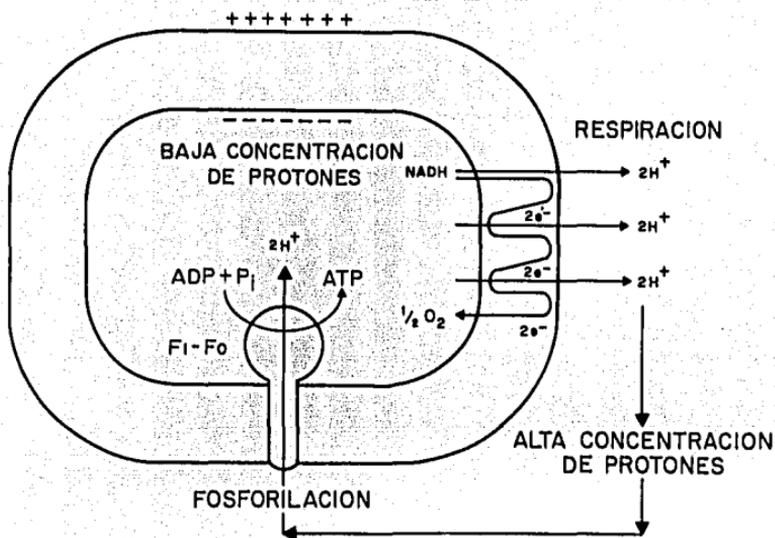


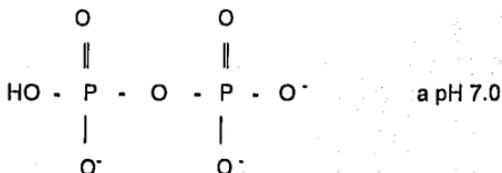
Fig. 2. Acoplamiento entre la fosforilación y el transporte de electrones. La teoría quimiosmótica propone un bombeo de H^+ hacia un lado de la membrana por la cadena transportadora de electrones durante la respiración, creando un gradiente electroquímico de H^+ , el cual es utilizado por la H^+ ATP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

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

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

1.4. Características del Pirofosfato.

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



Esta unión fosfoanhídrida es la forma química básica en la cual se transmite la energía en las células. Para entender el significado biológico del PPI es necesario conocer algunos aspectos termodinámicos de su hidrólisis, particularmente en las condiciones de pH y fuerza iónica semejantes a la de las células. Debido a la alta afinidad del PPI por cationes divalentes y a las concentraciones relativamente altas de Mg²⁺ en el citoplasma, el PPI probablemente se encuentra presente en las células formando un complejo 1:1 con el Mg²⁺ (Lahti, 1983).

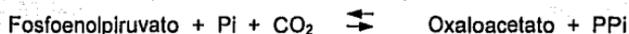
La energía libre de la hidrólisis (ΔG°) del PPI es cercana a la del enlace gama del fosfato del ATP, sin embargo en presencia de Mg^{2+} , el ΔG° para el PPI se vuelve menos negativo, debido a que el producto de su hidrólisis (2Pi) no forma complejo fuertemente con el Mg^{2+} , a diferencia del ATP en donde el producto (ADP) sí se une fuertemente al Mg^{2+} (Sillén y Martell, 1971). Flodgaard y Fleron (1974) obtuvieron valores muy precisos de ΔG° para la hidrólisis del PPI a pH 7.4 y 25 °C. En presencia de Mg^{2+} , el $\Delta G^{\circ} = -4$ Kcal mol⁻¹ pero en ausencia de Mg^{2+} el $\Delta G^{\circ} = -5.7$ Kcal mol⁻¹.

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

1.4.1. El Papel del PPI en el metabolismo celular.

En general se consideraba un dogma bioquímico que el PPI producido en muchas reacciones biosintéticas (síntesis de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, urea, lípidos) era un producto secundario que debía ser hidrolizado inmediatamente por la PPasa localizada en el citoplasma de las células, para hacer a estas reacciones biosintéticas energéticamente favorables (Kornberg, 1957); de esta forma la energía del enlace anhidro del PPI nunca sería utilizada.

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



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



Posteriormente se han identificado más reacciones enzimáticas en las que el PPI sustituye al ATP o que son dependientes de PPI. En la Tabla 1 se muestran estas reacciones, así como los organismos en los que se han detectado, algunas de ellas son responsables de la fosforilación de intermediarios esenciales de la glucólisis y gluconeogénesis (Baltscheffsky y Nyrén, 1984). Así mismo se encontró, que la glucosa-

6 fosfatasa del hígado es capaz de llevar a cabo la síntesis de glucosa 6-fosfato en una reacción dependiente de PPI (Lawson y Veech, 1979). También se descubrió que estas enzimas dependientes de PPI están ampliamente distribuidas en plantas (Edwards et. al., 1985). En resumen, estos hallazgos muestran que el PPI puede usarse como donador de energía para muchas reacciones y que en algunas otras puede ser utilizado, incluso, en lugar del ATP.

Es posible que las reacciones químicas que utilizan la energía del PPI estén más extendidas de lo que se ha mostrado en la Tabla 1. Por otra parte, la idea de que la irreversibilidad de los procesos biosintéticos depende de que el PPI sea hidrolizado y por tanto de la presencia de una baja concentración de PPI celular, no concuerda con la evidencia experimental. Esto resultó ser más claro cuando se pudo cuantificar la cantidad de PPI en las células.

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

Tabla 1. Reacciones en las que el PPI se Utiliza como Donador de Energía

REACCION	ENZIMA
1 PPI + oxaloacetato \leftrightarrow P-enolpiruvato + Pi + CO ₂	carboxitransfosforilasa
ATP + oxaloacetato \leftrightarrow P-enolpiruvato + ADP + CO ₂	P-enolpiruvato carboxicinas
2 PPI + AMP + P-enolpiruvato \leftrightarrow piruvato + ATP + Pi	piruvato, fosfato dicinasa
ADP + P-enolpiruvato \leftrightarrow piruvato + ATP	piruvato cinasa
3 PPI + fructosa-6-P \leftrightarrow fructosa-1,6-diP + Pi	PPI fosfofructocinasa
ATP + fructosa-6-P \leftrightarrow fructosa-1,6-diP + ADP	ATP fosfofructocinasa
4 PPI + acetato \leftrightarrow acetilfosfato + Pi	PPI acetilcinasa
ATP + acetato \leftrightarrow acetilfosfato + ADP	ATP acetilcinasa
5 PPI + serina \leftrightarrow fosfoserina + Pi	PPI serina cinasa
6 ATP + Sulfato \leftrightarrow APS + PPI	ATP - sulfurilasa
acetato + PPI \leftrightarrow acetilfosfato + Pi	acetato: PPI fosfotransferasa
ADP + acetilfosfato \leftrightarrow acetato + ATP	acetato cinasa
7 ATP + acilato + CoA \leftrightarrow AMP + PPI + acil-CoA	acetil-CoA sintetasa
8 glucosa + PPI \leftrightarrow glucosa 6-P + Pi	glucosa 6-fosfatasa

(Continúa en la siguiente página)

Continuación de la Tabla 1

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

Referencias de la Tabla 1

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

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

Otro descubrimiento importante fue la identificación del transporte de PPI a través de la membrana interna mitocondrial en intercambio por ADP vía el translocador de nucleótidos de adenina (Krämer, 1985), así como la generación de un potencial electroquímico a expensas de la energía liberada por la hidrólisis de PPI, a través de las membranas de bacterias fotosintéticas (Moyle *et al*, 1972), de la membrana interna de la mitocondria y de las membranas de plantas (Rea y Poole, 1985; Wang *et al*, 1986).

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

1.4.2. Utilización del PPI.

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

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

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

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

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

1.4.3. El PPI y la PPasa de membrana en la evolución de los sistemas transductores de energía.

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

Por otra parte, también se ha planteado el posible papel de la PPasa de membrana en la evolución del mecanismo de acoplamiento de la óxido-reducción y la fosforilación. A este respecto, el grupo de Baltscheffsky (1982), ha propuesto que originalmente el sistema de transporte de electrones y el sistema de la PPasa de membrana eran fuentes de energía separadas (Fig. 3a). Posteriormente, gracias al funcionamiento en reversa de la fosfatasa, se dió un acoplamiento entre las dos entidades que funcionaban autónomamente, lo que condujo al primer almacén de energía con la configuración del PPI. Esta hipótesis postula que el primer transporte de H^+ a través de la membrana estuvo representado por la PPasa que contenía un canal específico para el paso de H^+ . Durante la evolución, surgió la H^+ -ATP sintetasa, esto creó una situación en la que coexistieron las dos enzimas (Fig. 3b) (como es el caso de *R. rubrum* actualmente) pero con el tiempo, se perdió la PPasa (Fig. 3c) (tal es el caso de otros sistemas actuales, como *Rhodobacter sphaeroides* que solo tiene H^+ -ATP sintetasa). Esta hipótesis parece lógica; sin embargo, se necesita un estudio más profundo de estas dos enzimas para probarla y poder así ubicar evolutivamente a la PPasa de membrana.

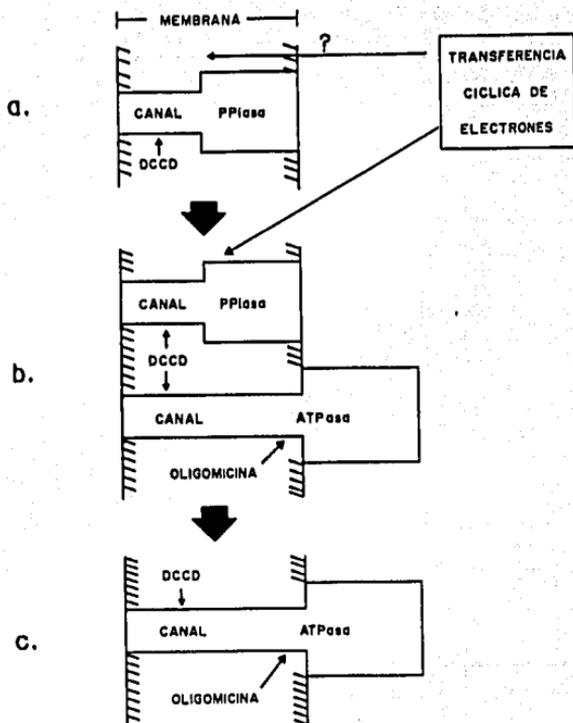


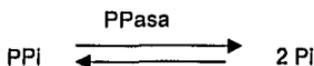
Fig. 3 Posible mecanismo evolutivo del acoplamiento de energía en membranas transductoras. a) Situación hipotética en la que sólo la PPasa existía. b) Situación intermedia en la que coexisten la PPasa y la H^+ ATPasa en la membrana. c) Situación en la que sólo subsiste la H^+ ATPasa. (Tomada de Baltscheffsky y col., 1982).

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

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

1.5. Las pirofosfatasa.

La PPasa (E.C. 3.1.1.1) es una enzima que cataliza la hidrólisis y la síntesis de PPI, de acuerdo con la siguiente reacción:



Las PPasas pueden ser divididas en dos clases: citoplásmicas y membranales.

1.5.1. Pirofosfatasa citoplásmicas.

La PPasa citoplásmica es una enzima ubicua en la naturaleza. Esto se entiende claramente si se considera su importancia en el metabolismo celular, al desplazar el equilibrio de las reacciones biosintéticas en el sentido termodinámicamente favorable (Körnberg, 1957), la importancia de su papel en el metabolismo celular ha sido confirmada al demostrarse que es una proteína esencial en el crecimiento de *Escherichia coli* (Chen *et al.* 1990) así como en la función de las mitocondrias de levadura (Zancani, M *et al.* 1985).

El único organismo que se ha reportado que carece de PPasa citoplásmica es *Entamoeba histolytica* (McLaughlin y Aley, 1985), debido a que es capaz de utilizar el PPI como donador de energía para llevar a cabo reacciones endergónicas. En el metabolismo aeróbico de *E. histolytica* el PPI se produce durante la formación de oxaloacetato a partir de fosfoenol-piruvato, catalizada por la carboxiltransferasa. De las tres moles de PPI que se producen en esta reacción dos son utilizadas por la PPI-

fosfofructocinasa y una por la piruvato-fosfato-dicinasa, mientras que en el metabolismo anaeróbico existen varias vías que proveen de PPI a estas enzimas.

Cabe destacar que existen otros organismos (la mayoría bacterias) capaces de utilizar el PPI como donador de energía, sin embargo, estos organismos sí tienen PPasa citoplásmica, lo que indica que la contribución de las enzimas que utilizan PPI no es suficiente para mantener a este compuesto dentro de las concentraciones óptimas para las células.

Recientemente (Young *et al* 1998) se propuso una nueva clasificación para las PPasas citoplásmicas que las divide en 3 clases:

Clase A: Pertenecen a esta clase las PPasas de procariotes, cuyas subunidades tienen un tamaño de 164-184 aminoácidos, con un PM de aproximadamente 20 kDa, son tetrámeros o hexámeros, y poseen actividades específicas de alrededor de 1,000 μmol de PPI hidrolizado por min por mg de proteína.

Clase B: Estas PPasas pertenecen a eucariotes, son más grandes que las de clase A, con subunidades de 285 aminoácidos y pesos moleculares de el orden de 32 kDa, generalmente son homodímeros, con excepción de las PPasas mitocondriales las cuales son heterotetrámeros $\alpha_2\beta_2$ que presentan asociación con la membrana. Algunas de estas PPasas como la de *Saccharomyces cerevisiae* tienen actividades específicas que se aproximan a las 1,000 μmol de PPI hidrolizado min^{-1} mg de proteína⁻¹, mientras que las actividades de otras PPasas clase B son marcadamente más bajas que las de las enzimas de clase A.

La clase B de PPasas parece ser la más variable ya que incluye PPasas pequeñas como la de *Arabidopsis thaliana* y la de la papa con un peso molecular cercano al de las enzimas clase A, pero sus secuencias presentan homología con las PPasas de eucariotes, lo que las coloca claramente dentro de la clase B.

Clase C: La primera enzima que se identificó dentro de esta clase fue la de *Bacillus subtilis*, posteriormente, mediante la comparación de secuencias se encontró que marcos de lectura abiertos en *Methanococcus jannaschii*, *Archaeoglobus fulgidus* y *Streptococcus gordonii* presentaban una alta similitud con la secuencia de la PPasa de *B. subtilis* y en el caso de *M. jannaschii* se comprobó bioquímicamente que codificaba para una PPasa clase C. A nivel de secuencia estas proteínas

prácticamente no presentan similitud alguna con las de las clases A y B, además difieren de estas en su tamaño siendo ligeramente mayores que las de clase B (aproximadamente 310 aminoácidos con un PM de 34 Kda). Las enzimas de las clases A y B se ven fuertemente inhibidas a concentraciones de fluoruro del orden de 1 mM, mientras que las clase C son resistentes a concentraciones mucho mayores (lo cual pudiera estar mediado por la protección de iones Co^{2+} o Mn^{2+}). Otro punto interesante es que la actividad específica de estas enzimas parece ser mayor que las actividades específicas de las enzimas de las otras dos clases (6,000 a 8,000 μmol de PPI hidrolizado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína).

1.5.2. Pirofosfatas membranales.

Además de las PPasas citoplásmicas, existe otro tipo de PPasas que no están distribuidas tan generalizadamente como las anteriores y que son proteínas integrales de membrana. Estas enzimas están presentes en las membranas citoplásmicas de algunas bacterias fotosintéticas como *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Rhodopseudomonas viridis* (Nore et al, 1990), y en la membrana de las vacuolas de las células de planta (tonoplastos) (Maeshima, 2000). Las PPasas membranales usan la energía de la hidrólisis del enlace de alta energía del PPI para translocar H^+ a través de la membrana en que están situadas (por lo que han sido denominadas H^+PPasas). El gradiente electroquímico de H^+ formado se utiliza para acidificar el interior de las vacuolas y otras funciones como el transporte activo de solutos.

Las PPasas coexisten con las $\text{H}^+\text{ATPasas}$ en el caso de bacterias y con las V ATPasas en el caso de la vacuola colaborando o compitiendo con el gradiente electroquímico de H^+ .

La estructura detallada de las PPasas asociadas a membrana aun no ha sido descrita, sin embargo sus subunidades catalíticas han sido aisladas de varios organismos. Estas PPasas consisten de una sola cadena polipeptídica de entre 70-80 kDa, las cuales se cree que en plantas existen como homodímeros (Maeshima, 2000) que hidrolizan al complejo Mg-PPI y que requieren de Mg^{2+} libre como cofactor y activador (Celis y Romero, 1987 y Maeshima, 2000).

El K^+ es un cofactor esencial de las H^+PP asas vacuolares, que estimula la actividad hidrolítica más de tres veces, con una constante de asociación de 1.27 mM, esta activación tiene la característica de verse inhibida por el amortiguador Tris a concentraciones mayores de 25 mM.

A pesar de que el K^+ es esencial para las H^+PP asas vacuolares esta dependencia no se ha encontrado en ninguna de las H^+PP asas de bacterias y algas estudiadas, por lo que se ha dividido a las H^+PP asas en dependientes e independientes de K^+ .

En cuanto a su estructura primaria, se tiene un ~40% de identidad entre la de bacterias y la de vacuolas, pero no se ha encontrado similitud entre las H^+PP asas y las PP asas citoplásmicas, a excepción de una pequeña región del sitio catalítico (Maeshima, 2000).

El primer cDNA de una H^+PP asa en ser clonado fue el de *Arabidopsis thaliana*, utilizando una biblioteca de expresión con anticuerpos dirigidos contra la H^+PP asa de *Vigna radiata*. (Sarafian *et al*, 1992). Hasta la fecha se han obtenido los cDNAs de una gran variedad de H^+PP asas de plantas terrestres como: betabel, tabaco, arroz, centeno, calabaza, etc.

Se ha reportado que las H^+PP asas de plantas consisten de 761 a 771 aminoácidos, con un punto isoeléctrico de 5, sus PM calculados van de 79.8 kDa a 80.8 kDa, su secuencia de aminoácidos se encuentra altamente conservada dentro de las plantas terrestres, (86% a 91% de identidad), la región menos conservada son los primeros 60 residuos es la parte amino terminal.

Recientemente las estructuras primarias de las H^+PP asas de la bacteria *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky, *et al* 1998), y de las algas *Acetabularia acetabulum* y *Chara corallina* (Maeshima, 2000) han sido reportadas, la identidad de la secuencia de aminoácidos entre las enzimas de estos tres organismos filogenéticamente separados es baja, (35-46%), la identidad de la enzima de *R. rubrum* (de 660 residuos) es de 36-39% con las PP asas vacuolares de plantas terrestres, y de un 40% con la H^+PP asa de *A. acetabulum*, la cual es 47% idéntica con respecto a las vacuolares, la comparación de las H^+PP asas de vacuola y la de *C. corallina* resulta en una alta similitud de alrededor de 71%.

De la comparación de todas las H⁺PPasas de plantas terrestres conocidas, de las de *C. coralina*, *A. acetabulum* y *R. rubrum*, se pueden encontrar tres segmentos altamente conservados (Maeshima, 2000).

El primer segmento de los cuales (SC1) incluye el dominio catalítico para la hidrólisis del sustrato, el cual se sabe se encuentra expuesto al citosol; ha sido propuesto que la secuencia (E/D)(X)7KXE constituye el sitio catalítico de las PPasas, incluyendo las solubles y las H⁺PPasas, la secuencia DVGADLVGKVE de las H⁺PPasas corresponde a esta configuración.

Se piensa que también el segundo segmento conservado (SC2) se localiza en el asa hidrofílica, sin embargo a diferencia de las evidencias que sugieren que el segmento SC1 forma parte de una asa citoplásmica, la localización del segmento SC2 dentro de una de estas estructuras no ha sido determinada aún.

El tercer segmento (SC3) localizado en la parte carboxilo terminal contiene una docena de residuos cargados; experimentos preeliminares muestran que el remplazo de tres ácidos glutámicos por glutamina en el segmento SC3 de la H⁺PPasa de *V. radiata* provoca la pérdida de la actividad enzimática (Maeshima, 2000); se piensa que este segmento puede estar expuesto al citosol y que juega un papel crítico en la función catalítica junto con SC1 y SC2.

Tomando en cuenta sus características, la H⁺PPasas son un modelo para el estudio del mecanismo de acoplamiento entre la hidrólisis de un enlace de alta energía y la translocación de H⁺.

Se han descubierto PPasas membranales en otros organelos y bacterias, por ejemplo: en la membrana tilacoidal (Jiang *et al*, 1997) y mitocondrial (Zancani *et al*, 1995) de plantas, en la mitocondria de levadura (Lundin, 1991), así como en las bacterias *Sulfolobus acidocaldarius* (Meyer y Schafer, 1992), *Syntrophus gentianae* (Schöcke y Schink, 1998), *Pyrobaculum aerophilum* (Drozdowicz *et al*, 1999) y *Thermotoga maritima* (NCBI). Sin embargo, en algunos casos solo se cuenta con la secuencia de nucleótidos, mientras que en otros las PPasas carecen de actividad translocadora de H⁺. Esto nos indica la posibilidad de una distribución más amplia de las PPasas membranales en la naturaleza.

1.5.3. La H⁺PPasa membranal de *Rhodospirillum rubrum*.

La primera PPasa de membrana que se reportó fue la de la bacteria fotosintética *R. rubrum* (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966) y es la única enzima bacteriana de este tipo que ha sido estudiada ampliamente.

1.5.3.1 Características Bioquímicas.

Esta enzima puede llevar a cabo las siguientes reacciones parciales: a) Síntesis de PPI, b) Hidrólisis de PPI, c) Intercambio Pi-PPI y d) Recambio Pi-H₂O, las cuales han permitido conocer más acerca del mecanismo de reacción de la enzima.

a) Síntesis de PPI

En los cromatóforos (vesículas de membrana con polaridad invertida respecto al organismo) de la bacteria *R. rubrum*, se lleva a cabo la formación de PPI. Esta síntesis se efectúa utilizando la energía del gradiente electroquímico de H⁺ generado por el transporte de electrones fotosintético (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966) (Fig.4). La reacción tiene un pH óptimo de 7.5 y requiere iones Mg²⁺ (Guillory y Fisher, 1972). La síntesis de PPI es inhibida por antimicina (inhibidor del transporte de electrones) y desacoplantes (disipadores del gradiente electroquímico), pero no por oligomicina (inhibidor de la ATPasa), que por el contrario, la estimula (Baltscheffsky y von Stedingk, 1966).

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

Se puede inducir la síntesis de PPI por gradientes artificiales de pH o eléctricos (Strid *et al*, 1987). A diferencia de lo que sucede con la síntesis de ATP inducida por este tipo de gradientes, la síntesis de PPI no necesita un umbral de potencial de membrana para llevarse a cabo; esto sugiere que requiere una fuerza protonmotriz

menor que la necesaria para la síntesis de ATP, reflejando un menor ΔG° de la reacción, o bien, que la PPasa requiere un menor número de H^+ que la H^+ -ATP

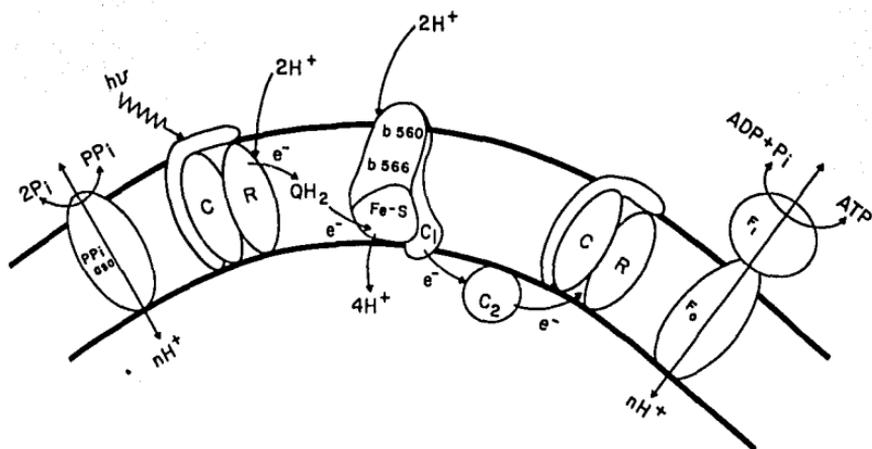


Fig. 4. Esquema de la transducción energética en la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*. Se muestra a la PPasa, al centro de reacción fotoquímico (CR), a la cadena de transporte de electrones y a la ATPasa en la membrana del cromatóforo. QH_2 : ubiquinol, b_{560} y b_{566} : citocromos b, Fe-S: Proteína hierro azufre de Rieske, c_1 y c_2 : citocromos c, F_1 y F_0 : parte hidrofílica e hidrofóbica de la ATPasa.

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

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

La síntesis de PPI y la de ATP utilizan aparentemente el mismo sitio de acoplamiento en la cadena de transporte de electrones, ya que en la oscuridad se puede inducir un flujo reverso de electrones por la hidrólisis de cualquiera de los dos compuestos. El resultado de esta reacción es una reducción de citocromo b y la oxidación de citocromo c_2 (Baltscheffsky, 1968).

b) Hidrólisis de PPI

Esta reacción se lleva a cabo fundamentalmente en condiciones de oscuridad y la enzima requiere iones Mg^{2+} no sólo para formar el complejo Mg-PPI, que es el sustrato de la enzima, sino también como activador (Randahl, 1979; Celis *et al*, 1985). La actividad hidrolítica está parcialmente reprimida en la luz, aún en condiciones en las que no hay síntesis de PPI (Nishikawa *et al*, 1973). La actividad hidrolítica también es inhibida por P_i , NaF, por los análogos de PPI: IDP y MDP, así como por butanol. En *R. rubrum* la actividad de hidrólisis de la PPasa es considerablemente más alta que la de la H^+ -ATP sintetasa y sólo se igualan cuando ambas actividades se estimulan por desacoplantes (Baltscheffsky, 1969). El pH óptimo para la reacción de hidrólisis es de 6.5 (Celis y Romero, 1987).

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

Asociadas a la hidrólisis de PPI y a la correspondiente formación de gradiente de H^+ , se han descrito varias reacciones dependientes de energía que incluyen: la transhidrogenación (Keister y Yike, 1967a), la reducción de los citocromos b y c (Baltscheffsky, 1967), la reducción de NAD^+ ligada a succinato (Keister y Yike, 1967b), el

bombeo de H^+ (Moyle *et al*, 1972), y la formación de ATP dirigida por PPI (Keister y Minton, 1971) (Fig. 5).

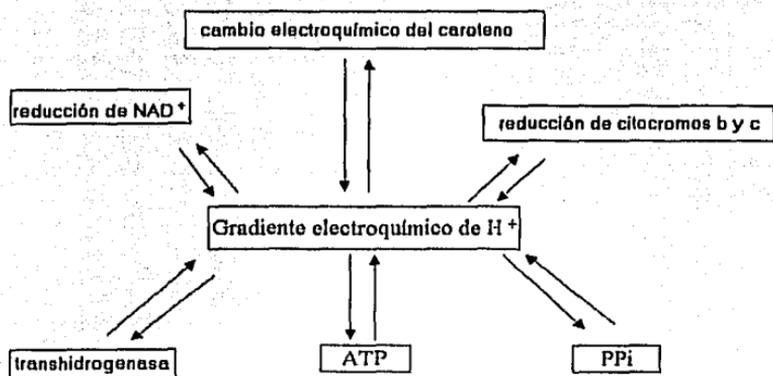


Fig. 5 Reacciones dependientes o asociadas al gradiente electroquímico de H^+

c) Intercambio Pi-PPI

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

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

d) Intercambio Pi-H₂O

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

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

El desacoplante CCCP no presenta un gran efecto sobre la reacción, por lo que podría sugerirse que el intercambio $Pi-H_2O$ no depende de un gradiente de protones. Esto podría estar apoyado por el hecho de que la luz no estimula el recambio.

Regulación de la enzima membranal por cationes divalentes

Como todas las PPasas, citoplásmicas y membranales, la PPasa de membrana de *R. rubrum* requiere Mg^{2+} para que se formen sus sustratos, $Mg-PPi$ para la hidrólisis o $Mg-Pi$ para la síntesis (Lahti, 1983). Sin embargo el Mg^{2+} libre ejerce también un papel regulatorio sobre las propiedades catalíticas de la enzima.

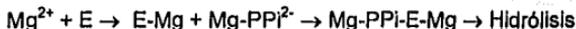
Randahl (1979) reportó que el Mg^{2+} libre puede actuar como activador en la hidrólisis de PPI y que este catión puede unirse a la PPasa y protegerla contra la inhibición causada por agentes como NEM y Nbf-Cl.

Otros cationes divalentes libres también pueden inducir cambios en las propiedades cinéticas de la enzima. Por ejemplo, el Zn^{2+} a pH 5.25 puede formar el complejo $Zn-PPi$ (tan buen sustrato como el $Mg-PPi$) y cuando está en forma libre inhibe la hidrólisis y el intercambio $Pi-PPi$ (Celis y Romero, 1987; Romero y Celis 1995).

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

Mediante estudios cinéticos se ha encontrado que el Mg^{2+} libre es un activador esencial y ordenado de la actividad hidrolítica de la PPasa de membrana (Sosa *et al*,

1992), donde primero debe entrar el Mg^{2+} a la enzima para después incorporarse el sustrato $Mg\text{-PPi}^{2-}$ y así poder hidrolizarse:



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

Canal de H^+ de la PPasa Membranal

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

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

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

Podemos concluir que el canal de H^+ de la PPasa presentará semejanzas con el de la ATP sintetasa, cuando menos funcionalmente.

1.5.3.2. Características moleculares.

Recientemente fue obtenida la secuencia de la H⁺PPasa de *R. rubrum*, (Baltscheffsky, *et al*, 1998) la cual se encuentra codificada en un marco de lectura abierto de 1,980 pb. La secuencia presenta dos posibles regiones de unión al ribosoma (secuencias Shine-Dalgarno), así como dos posibles codones de inicio, ATG y GTG, separados por 120 pares de bases. Uno de ellos predice una proteína de 660 aminoácidos, con una masa molecular calculada de 67453 daltones, mientras que el otro predice una proteína de 702 aminoácidos con una masa molecular de 71609 daltones. El codón de término es TTA y río abajo de éste se encuentra un terminador transcripcional ρ -independiente el cual consiste en una región invertida repetida, rica en G+C, seguida por una secuencia rica en A+T.

Como es de esperarse esta proteína de membrana es altamente hidrofóbica y de acuerdo a modelos computacionales, presenta 15 cruces transmembranales, que involucran al 48% de la proteína. Presenta una alta identidad (alrededor de 80%) con las H⁺PPasas de plantas, en las regiones reconocidas como segmentos conservados (SC), aunque su identidad total es solo del orden de 37%.

Considerando lo anterior es necesario ampliar el número de H⁺PPasas bacterianas caracterizadas, sobre todo tomando en cuenta que solamente la de *R. rubrum* se ha estudiado a detalle y con el estudio de una sola enzima es imposible determinar las características generales de las H⁺PPasas bacterianas, como pueden ser: la actividad de síntesis, el requerimiento de cofactores, el perfil de pH, etc. La determinación de un mayor número de secuencias ayudaría a realizar una comparación menos sesgada, ya que hasta la fecha las estructuras primarias de H⁺PPasas conocidas corresponden en su gran mayoría a eucariontes (plantas superiores y algas), por ello la caracterización bioquímica y molecular de más H⁺PPasas bacterianas como la que se pretende realizar en este trabajo con la enzima de *R. palustris* es importante.

2. OBJETIVOS.

Los objetivos de esta tesis fueron en primer lugar la caracterización bioquímica de la pirofosfatasa membranal de la bacteria fotosintética *Rhodospseudomonas palustris* y en segundo lugar la clonación y caracterización del gen correspondiente.

3 . MATERIALES Y METODOS.

3.1. Cultivo de bacterias.

En todos los experimentos se utilizó la cepa silvestre de la bacteria fotosintética *Rhodospseudomonas palustris* (ATCC 17001).

3.1.1. Medios de Cultivo.

Para el crecimiento de esta bacteria se prepararon dos clases de medio de cultivo:

A) Líquido y B) sólido.

A) Medio líquido :

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

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

a) Base concentrada:

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

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

$CaCl_2 \cdot 6H_2O$ -----29 mM

$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ -----0.074 mM

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ -----0.35 mM

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

Se ajustó el pH a 6.8 con NaOH.

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

EDTA -----6.5 mM

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ -----17.9 mM

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ -----0.038 mM

$MnSO_4$ -----10.1 mM

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ -----1.5 mM

$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ -----0.85 mM

$Na_2B_4O_7 \cdot 6H_2O$ -----0.57 mM

Se añadieron aproximadamente 4 gotas de ácido sulfúrico para disolver a los metales y se ajustó el pH a 6.8. El MnSO_4 se puede sustituir por $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 10.8 mM.

- b) KH_2PO_4 1.0 M, pH 6.8
- c) Acido succínico 0.84 M, pH 6.8
- d) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.75 M
- e) NaCl 0.85 M
- f) Acido L-glutámico 0.679 M, pH 6.8
- g) Acido L-aspártico 0.150 M, pH 6.8

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

		Concentración final a la que queda en el medio:
a) Base concentrada	250 ml	
b) KH_2PO_4	250 ml	20.0 mM
c) Acido succínico	250 ml	16.9 mM
d) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	62.5 ml	3.7 mM
e) NaCl	125 ml	8.5 mM
f) Acido L-glutámico	25 ml	1.35 mM
g) Acido L-aspártico	25 ml	0.3 mM
además de:		
Extracto de carne	12.5 g	0.125%
Acido nicotínico	12.5 mg	10 μM
Tiamina	6.25 mg	1.5 μM
Biotina	0.125mg	0.04 μM

Se ajustó el pH a 6.8. El medio se esterilizó por 45 min a 120°C y 15 atm de presión, en frascos del volumen que se requiere. En el medio caliente se formó un precipitado que se disuelve a la temperatura ambiente. El medio es transparente, de color semejante al del extracto de levadura.

B) Medio sólido:

Agar bacteriológico (Bioxon de México)
en el medio líquido descrito anteriormente

2%

El medio se esterilizó en la autoclave por 15 min a 120°C y 15 atm de presión, se vació en cajas de Petri o en frascos con tapa de rosca de 15 a 20 ml de capacidad, que contienen aproximadamente 10 ml de medio, para la conservación de las bacterias.

3.1.2. Siembra de bacterias fotosintéticas.

Las bacterias se sembraron en placa por el método de dilución para obtener colonias únicas. De ahí se tomó una de ellas y se sembró por punción en los frascos con medio sólido. Se incubaron en la oscuridad por 12 h para permitir que el crecimiento aeróbico de estos microorganismos eliminara parcialmente el O₂ del medio. Terminado este período, las bacterias sembradas se expusieron a la luz de focos con filamento de tungsteno de 40 W, colocadas a una distancia de 30 cm. Una vez observado el desarrollo de la colonia en la punción, estos cultivos pueden mantenerse así por largo tiempo (entre 6 y 12 meses) como reserva, o bien, utilizarse para cultivos posteriores.

Para obtener grandes cantidades de bacterias se cultivaron en medio líquido de la siguiente manera: a los frascos que contenían las bacterias en el medio sólido, se les agregó el medio líquido y se agitaron. Se dejaron toda la noche en la oscuridad y a continuación se colocaron a la luz de los focos con filamento de tungsteno de 40 W a 30 cm de distancia. Después de 4 a 6 días se obtuvo crecimiento de las bacterias en el medio líquido. Este medio se transfirió a frascos de 100 ml de capacidad, a los cuales se les agregó medio fresco hasta colmar su capacidad. Se repitió el proceso oscuridad-luz y se dejó crecer a las bacterias hasta la fase logarítmica tardía. El inóculo bacteriano, así obtenido, se trasladó a frascos de 1 l y de 9 l sucesivamente, siguiendo los pasos descritos con anterioridad. Los frascos se cerraron con tapones de hule herméticos y se dejó el mínimo de aire entre el tapón y el medio de cultivo, para evitar al máximo la presencia de O₂, ya que el crecimiento fotosintético de estos microorganismos se realiza en condiciones de anaerobiosis. Esta es la razón por la cual, previo al crecimiento en la luz, siempre se dejó crecer a los cultivos en la

oscuridad por 12 h, aprovechando que la bacteria, por sus procesos metabólicos oxidativos, elimina el O_2 que está presente en el medio. Los cultivos se mantuvieron a $30^\circ C$.

3.1.3. Cosecha de bacterias.

Las bacterias cultivadas, una vez que se encuentran en la fase de crecimiento logarítmica tardía se cosechan centrifugándolas a $8,000 \times g$ por 15 minutos. El momento de la cosecha se determinó por medio de curvas de crecimiento, esto es, midiendo la turbidez del cultivo a diversos intervalos de tiempo en un fotocolorímetro.

Una vez cosechadas, las bacterias se lavaron con MOPS 50 mM, KCl 50 mM pH 7.0 para eliminar por completo los residuos del medio y se centrifugaron a $8\ 000 \times g$ por 15 min. Las pastillas se pesaron y esto se consideró como peso húmedo. Se almacenaron así a $-70^\circ C$.

3.2. Caracterización bioquímica.

Para llevar a cabo la caracterización bioquímica de la PPasa membranar de *R. palustris* se utilizó la siguiente metodología:

3.2.1. Obtención de cromatóforos (membranas fotosintéticas).

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

- A. Las bacterias se resuspendieron en amortiguador Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, pH 8.0 en una proporción 1/10 (g bacterias/ ml amortiguador), que contenía 1 mg de ADNasa por 100 g de peso húmedo de bacterias.
- B. Para romper las células se sonicó la suspensión en lotes de 15 ml por 1:45 min en un sonicador Branson (Sonifier 250) a máxima potencia y enfriando con baño de agua a $4^\circ C$ (Scholes *et al.*, 1969).
- C. Se centrifugó a $20,000 \times g$ durante 20 min para separar las células sin romper, cápsulas y residuos, que quedaron en el sedimento.
- D. El sobrenadante de la centrifugación anterior, se sedimentó a $100\ 000 \times g$ por 80 min obteniéndose así una pastilla de cromatóforos.

- E. La pastilla de cromatóforos se resuspendió en Tris-HCl 50mM, EDTA 5 mM y EGTA 2 mM a pH 8,0 y se centrifugo nuevamente a 100 000 x g por 80 min, para quitar los cationes divalentes de la preparación.
- F. La pastilla de cromatóforos obtenida del paso anterior se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y se centrifugo a la misma velocidad. Finalmente, los cromatóforos se resuspendieron en el mismo amortiguador a una concentración aproximada de 60 mg de proteína/ml.
- G. La preparación de cromatóforos se guardó a 4 °C y se usó en los 3 días siguientes, período durante el cual no hay cambios importantes en la actividad hidrolítica.

3.2.2. Determinación de proteína.

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

3.2.3. Determinación de la actividad hidrolítica.

La actividad hidrolítica o actividad de pirofosfatasa, se cuantifico como la liberación de Pi a partir de PPI a 30°C, en presencia de MgCl₂ o de otros cationes divalentes. La determinación de la actividad se llevó a cabo en la oscuridad. Para lograr estas condiciones se utilizo un cuarto iluminado con luz verde de seguridad (Schiff, 1972). El medio de reacción en general contenía: Tris-maleato 50 mM pH 8.0 o bien Glicilglicina 50 mM pH 7.4, PPI_{Na} 0.5 mM, MgCl₂ 1 mM.

La reacción se inició al añadir 0.5 mg de proteína de la preparación de cromatóforos, el medio se incubaba a 30°C durante el tiempo especificado en cada experimento y la reacción se detiene al añadir ácido tricloroacético a una concentración final de 6%. Por último, se centrifuga a 3,000 rpm por 5 min y se cuantifica en el sobrenadante el Pi presente con el método de Sumner (1944). La actividad específica se refiere como nmoles Pi min⁻¹ mg de proteína⁻¹.

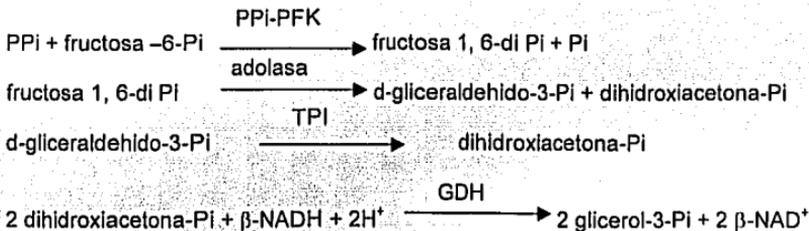
Cualquier otra modificación se especifica en los pies de figura de la sección de resultados. Todos los experimentos se repitieron por lo menos tres veces.

3.2.4. Determinación de la actividad sintética.

Para la determinación de la actividad de síntesis de PPI se incubaron los cromatóforos (1- 5 mg de proteína), en amortiguador glicilglicina 100 mM pH 7.4, NaH_2PO_4 , 15 mM, MgCl_2 10 mM a 30 °C, ajustando el volumen a 500 μl y se iluminaron con focos de 100 W a una distancia de 35 cm durante el tiempo necesario (de 10 a 30 min). Para detener la reacción, se apagó la luz y se colocaron los tubos en hielo. Posteriormente se hirvieron por 5 min (para desactivar a las enzimas y desnaturalizar a la proteína). Se centrifugó a 3,000 rpm 5 min, se tomó una alícuota (300 μl) del sobrenadante, que contenía el PPI y se procedió a la cuantificación de este.

Cuantificación del PPI.

Se utilizó un sistema de enzimas acopladas para la cuantificación del PPI (Sigma P7275), dicho método está basado en la oxidación del $\text{NADH} + \text{H}^+$, dependiente de PPI, de la siguiente manera:



Donde: PPI-PFK = fructosa 6-Pi cinasa, dependiente de PPI,

TPI = trisafosfato isomerasa y GDH = glicerofosfato deshidrogenasa.

El PPI se cuantificó indirectamente midiendo la disminución de la absorbencia de la muestra a 340 nm. Para calcular la concentración de PPI en cada una de las muestras se utiliza la fórmula:

$$\text{PPI } (\mu\text{moles / ml}) = \frac{(\Delta A \text{ muestra} - \Delta A \text{ blanco})}{(6.22) (2) (0.3)} (1.1)$$

Donde:

1.1 = Volumen de la mezcla de reacción.

6.22 = Coeficiente de extinción milimolar del NADH a 340 nm.

2 = moles de $\beta\text{-NADH}$ oxidado por mol de PPI consumido.

0.3 = Volumen de la muestra

3.2.5. Cálculo de las concentraciones de complejos y especies libres en las reacciones.

Las concentraciones de los metales libres, del PPI libre y de los complejos, se calcularon con el programa IONES, que resuelve las ecuaciones simultáneas que describen el equilibrio múltiple que existe en la solución problema utilizando las constantes de asociación de los componentes. Las constantes de asociación fueron tomadas de Martell y Sillén (1971) y expresadas como log Ks son:

Complejo	Log Ks
Mg-PPI	6.00
Zn-PPI	11.66
Co-PPI	6.10

3.3 Caracterización molecular.

Para la obtención del gen de la PPasa membranal de *R. palustris* se utilizó la siguiente metodología:

3.3.1. Obtención de ADN cromosomal de *R. palustris*.

Para obtener el ADN cromosomal de *R. palustris* se siguió la siguiente metodología:

- A. Se resuspendieron 6 g de células en 30 ml de amortiguador que contenía: 0.15 M de NaCl, 0.1 M de EDTA, pH 8.0; las células se centrifugan a 3,000 rpm en una centrifuga clínica por 10 min a 4° C.
- B. Se resuspendió la pastilla en 9.0 ml del mismo amortiguador y se transfirió a una botella de 250 ml.
- C. Se agregaron 2.0 ml de solución de lisozima (50 mg/ml en H₂O) y se mantuvo con agitación vigorosa por 2 h a temperatura ambiente.
- D. Se vació el contenido a 2 tubos de plástico de 50 ml; se congelaron los tubos mediante la inmersión en hielo seco-etanol, girándolos para que las bacterias se congelaran alrededor de las paredes del tubo.

- E. Se añadieron 22,5 ml por tubo de solución de lisis (1% SDS, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M NaCl) precalentada a 50°C; se incubó 10 min a 50°C agitando los tubos constantemente.
- F. El lisado se extrajo 2 veces con 30-40 ml de una solución de fenol-cloroformo 1:1 a temperatura ambiente.
- G. Se separaron las fases mediante centrifugación a 5,000 rpm en una centrifuga clínica durante 15 min, se tomó la fase superior (acuosa) y se desechó la fase inferior de fenol, se combinaron las fases acuosas de los 2 tubos y se transfirieron a otro recipiente. La extracción se llevo a cabo dos veces.
- H. Se agregaron 2 volúmenes de etanol al 100% helado a un recipiente con capacidad de 400 ml que contenía la fase acuosa; la formación de una hebra de ADN cromosomal pudo apreciarse instantáneamente. El ADN se enrolló en una varilla de vidrio o en una pipeta Pasteur modificada con la punta en forma de gancho.
- I. El ADN se dejó secar al aire por 1 h y se colocó en un tubo de ensaye estéril.
- J. El ADN se resuspendió en 2.0 ml de H₂O a 4°C toda la noche; el ADN se rehidrató y se disolvió en agua.
- K. Se agregaron 1-2 µl de ARNsa tipo A (10 mg/ml) y se incubó 1.5 h a 37 ° C.
- L. Se extrajo la ARNasa con una solución fenol-cloroformo 1:1.
- M. Se precipitó el ADN con etanol; se centrifugó 15 min a 14,000 rpm, en una microcentrifuga y se dejó secar el ADN.
- N. El ADN se resuspendió en el volumen de H₂O deseado y se cuantificó su concentración mediante la absorbencia a 260/280 nm.

3.3.2. Amplificación por medio de PCR del fragmento del gen de la PPasa membranal de *R. palustris*.

Para la reacción de PCR se mezclaron los siguientes reactivos:

	[Final]
ADN cromosomal	100-200 ng
Oligo sentido	100 picomolas
Oligo antisentido	100 picomolas
MgCl ₂	0-0.5 mM
DMSO	10%
DNTPS	0.1 mM
Buffer Vent 10 X	1 X
Vent ADN Polimerasa	1 unidad
H ₂ O	(aforar a 100 µl totales).

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

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

3.3.3. Purificación del producto de PCR.

Una vez detectada la banda esperada se realizó una electroforesis preparativa en un gel de agarosa de bajo punto de fusión 1% en amortiguador TAE a 70 V.

Limpieza de la Banda.

Para purificar la banda se utilizó el método GENECLEAN II (Biotechnologies, inc. BIO 101), de la siguiente manera:

- Se cortó la banda del gel de agarosa y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- Se agregaron 3 volúmenes de solución de NaI, se incubó la banda durante 5 min a una temperatura de entre 45°C y 55°C para disolver la agarosa.
- Se le añadieron 5 µl de la suspensión de "glassmilk" (perlas de vidrio afines al ADN) y se incubó a 4°C de 5 a 10 min.

- D. Se centrifugó 5 seg a 14,000 rpm en una microcentrífuga para bajar el complejo ADN-"glassmilk".
- E. El producto se lavó tres veces con la solución "New Wash" que contiene etanol.
- F. Se eluyó el ADN con el volumen deseado de H₂O precalentada a 50°C.

3.3.4. Clonación del producto de PCR.

Una vez que se tuvo la banda de ADN correspondiente se procedió a su clonación en un vector para posteriormente poder secuenciarla.

El producto de PCR se clonó en el vector PCRTMII, utilizando el sistema de TA cloning (Invitrogen). Este método se basa en la propiedad de la enzima *Taq* polimerasa de poseer una actividad, templado independiente, de añadir una sola desoxiadenosina (A) a los extremos 3' de fragmentos de ADN de cadena doble, en este caso del producto de PCR; el vector linearizado de este sistema tiene en los extremos 3' una desoxitimidina (T), lo que permite que el producto de PCR se ligue con eficiencia al vector.

Dado que en la reacción de amplificación se utilizó *Vent* polimerasa en lugar de *Taq* polimerasa y debido a que la primera no deja las colas de A, es necesario añadir estos extremos a nuestros productos purificados de PCR, para lo cual se llevan a cabo los siguientes pasos:

- A. Se colocaron los ng de ADN a utilizar en tubos Eppendorf, se incubaron en hielo y posteriormente se añadieron 0.7-1 unidades de *Taq* polimerasa por tubo.
- B. Los tubos se incubaron a 72° C por 10 min.
- C. La muestra se extrajo inmediatamente con un volumen igual de fenol:cloroformo 1:1.
- D. Se añadió 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol al 100%.
- E. Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 5 min para precipitar el ADN.
- F. Se retiró el sobrenadante, la pastilla se lavó con etanol al 80% y se dejó secar al aire.
- G. La pastilla se resuspendió en agua o en amortiguador TE, en el volumen deseado.

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

- A. Se estimó la cantidad del producto de PCR necesario para la ligación con 50 ng (20 fmoles) de vector PCRTMII, mediante la formula:

$$X \text{ ng de inserto} = \frac{(Y \text{ pb del inserto})(50 \text{ ng de vector pCR}^{\text{TM}}\text{II})}{(\text{pb del vector pCR}^{\text{TM}}\text{II}; \sim 3900)}$$

- B. Utilizando la concentración del producto de PCR previamente determinada, se calculó el volumen necesario para la ligación, basado en una relación 1:1, o bien una relación 1:3 vector/ inserto.
- C. Se incubó la reacción de ligación a 14°C por un mínimo de 4 h, de preferencia toda la noche.
- D. Se transformó la ligación en células competentes de *E. coli* NM522.

3.3.5. Obtención de células competentes y transformación.

- A. Se crecieron 5 ml de bacterias en un tubo de LB durante la noche.
- B. Se inocularon 50 ml de LB en un matraz de 250 ml con 1 ml del cultivo anterior.
- C. Se creció el cultivo a 37°C durante 2 h.
- D. Se centrifugo 10 min a 4°C en una centrifuga clínica y se resuspendieron las células en 6 ml de CaCl₂ 100 mM estéril (manteniendolo en hielo).
- E. Se incubaron las células en hielo 45 min.
- F. Se centrifugaron en una centrifuga clínica 10 min a 4°C a 1500 rpm y se resuspendieron en 1.2 ml de CaCl₂.
- G. Se incubaron las células en hielo 30 min.
- H. Se le adiciono la ligación a 100 µl de estas células y se dejaron en hielo 30 min en tubos Eppendorf.
- I. Se les dio un choque térmico incubándolas 45 seg a 42°C.
- J. Se les añadió 1 ml de LB y se crecieron las células 1 h a 37°C.
- K. Se centrifugaron las células 3 min en una microcentrifuga a 15,000 rpm, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendio en lo que quedó de medio (aproximadamente de 50-100 µl).

L. Se plaquearon las células en cajas LB, con: los antibióticos necesarios (las resistencias del plásmido), 25 µl de Xgal (40 mg/ml) y 25 µl de IPTG 0.1 M.

3.3.6. Secuenciación.

Una vez determinada la presencia del inserto, se llevó a cabo la secuenciación de éste, utilizando los desoxi-oligonucleótidos sentido y antisentido del fago M13. La secuenciación se realizó en un secuenciador automático en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Posteriormente se utilizó el programa GCG para compararlo con las secuencias de nucleótidos contenidas en diversas bases de datos y comprobar que el inserto posea alta similitud solamente con las secuencias de las H⁺PPasas.

3.3.7. Obtención de la secuencia completa del gen de la PPasa membranal de *R. plaustris*.

Para obtener la secuencia completa del gen se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

3.3.7.1 Digestión del ADN cromosomal.

Se utilizaron las siguientes enzimas de restricción: BamHI, EcoRI, PstI y Sall. Se digirieron toda la noche a 37°C.

3.3.7.2. Análisis tipo Southern.

Se utilizó como sonda el fragmento de 1371 pb, para localizar una banda de las digestiones donde se encuentre el gen completo de la PPasa membranal.

Los pasos del análisis tipo Southern son los siguientes:

Marcaje de la sonda.

La sonda se marcó de acuerdo al protocolo "Gene Images Random Prime Labelling Module" (Amersham). El procedimiento se basa en la utilización de nonámeros de ADN con secuencia aleatoria que funcionan como oligonucleótidos para iniciar la síntesis de ADN utilizando como templado la sonda a marcar; en este sistema la fluoresceína-11-

dUTP se incorporó al ADN sintetizado reemplazando parcialmente al dTTP con lo que se genera una sonda marcada. La detección de los grupos de fluoresceína incorporados a la sonda, se realizó con anticuerpos anti-fluoresceína acoplados a fosfatasa alcalina.

- A. Se llevó el ADN a ser marcado a una concentración de 2-25 ng/ml en agua bidestilada.
- B. Se descongeló en hielo los oligonucleótidos y la mezcla de nucleótidos que vienen en el sistema. La muestra de ADN se desnaturalizó por calentamiento durante 5 min en un baño con agua hirviendo, inmediatamente después la muestra se enfrió en hielo. Se recomienda que la desnaturalización se haga en un volumen de al menos 20 μ l.
- C. A un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, colocado en un baño de hielo, se va agregando lo siguiente:
 - H₂O para aforar un volumen final de 50 μ l de la reacción
 - Mezcla de desoxinucleótidos 10 μ l
 - oligodesoxinucleótidos 5 μ l
 - ADN desnaturalizado 50 ng
 - Enzima Klenow ADN polimerasa 5 unidades.
- D. Se mezclaron los reactivos con la micropipeta y se tapó el tubo.
- E. La reacción se incubó a 37°C por 1 h.
- F. Se terminó la reacción con la adición de EDTA (concentración final de 20 mM).

Electroforesis en gel de las muestras

Las digestiones se corrieron 1 h a 70 V en un gel de agarosa 1% con amortiguador TBE. Se tiñó el gel con bromuro de etidio, se observó el gel en un transiluminador con luz UV y se registró con una fotografía.

Transferencia a una membrana de nitrocelulosa

- A. Antes de transferir el gel se le hacen los siguientes lavados a temperatura ambiente:

- B. Depurinización: se le añadieron al gel 250 ml de 0.25 M HCl y se incubaron 15 min con agitación.
- C. Desnaturalización: Se desechó la solución del lavado anterior y se le añadió al gel 250 ml de NaOH 0.4 N, NaCl 0.6 M, primero se incubó 15 min a temperatura ambiente con agitación y posteriormente se le dio un nuevo lavado de 30 min con la misma solución.
- D. Neutralización: Se desechó la solución del lavado anterior y se le añadieron al gel 250 ml de Tris HCl 0.4 M, pH 7.5, NaCl 0.6 M, se dio un primer lavado de 5 min con agitación y un segundo lavado de 30 min.
- E. Se marcó la esquina inferior izquierda del gel y la derecha inferior de la membrana.
- F. Se humedeció la membrana con agua bidestilada y posteriormente con 10 x SSC 5 min.
- G. Se montó el dispositivo para la transferencia.
- H. Se transfirió el gel toda la noche.
- I. Al día siguiente se retiró el paquete gel-membrana y se marcan los pozos con una pluma.
- J. Se entrecruzó el ADN con la membrana en un horno de luz UV.

Prehibridación e hibridización

- A. Se colocó la membrana en un tubo de horno de hibridización y se prehibridizó por dos horas, en la siguiente solución:

H ₂ O	5.9 ml
20 X SSC	2.5 ml
SDS 10%	100 µl
Dextran sulfato 50%	1 ml
Líquido bloqueador	0.5 ml

- B. Se le añadieron 100 µl de ADN de esperma de salmón a la sonda marcada con fluoresceína y se desnaturalizó hirviendo 5 min y enfriando en hielo.
- C. Se le añadió la sonda a la membrana previamente colocada en un recipiente para hibridizar. Se hibridizó toda la noche a 68 ° C con agitación.

D. Se le aplicaron a la membrana lavados de máxima severidad, por tratarse de una sonda homóloga, los lavados se mencionan a continuación:

- a) Se lavó la membrana una vez con 100 ml de 2x SSC 5 min a temperatura ambiente.
- b) Se lavó 2 veces con 200 ml de 0.1 x SSC, 0.1% SDS por 30 min a 70°C.
- c) Se lavó 2 veces con 100 ml de 0.1 SSC, el primer lavado a 70°C y el segundo se bajó la temperatura del hibridizador a temperatura ambiente, ambos lavados se realizaron por 15 min.

Detección

- A. Después de los lavados de hibridización se lavó la membrana en 200 ml de "Diluent Buffer" (Amortiguador de dilución) a temperatura ambiente.
- B. Se incubó por 1 h a temperatura ambiente con agitación en 1/10 de agente bloqueador diluido en el amortiguador de dilución (en un volumen final de 75 ml).
- C. Se enjuagó la membrana brevemente como en el paso A.
- D. Se diluyó el anti F-AP conjugado 5,000 veces en 0.5% peso/volumen de albúmina sérica bovina en amortiguador de dilución.
- E. Se incubó la membrana en el conjugado diluido con agitación suave durante 1 h.
- F. Se retiró el conjugado que no se pegó, lavando 3 veces, 10 min cada vez con 250 ml de Tween 20 0.3% (vol/ vol) en amortiguador de dilución.
- G. Se lavó la membrana con 200 ml de amortiguador de dilución.
- H. Se aplicó sobre la membrana el reactivo dioxetano con atomizador (el cual es un reactivo quimiolumincente que produce luz cuando es cortado por la fosfatasa alcalina y que por lo tanto detecta la presencia de sonda marcada) y se colocó la membrana en una bolsa (sin que se seque).
- I. Se colocó la placa en un cassette y se dejó exponer una película fotosensible por un periodo de 1 o 2 h en la oscuridad.
- J. Una vez transcurrido el tiempo de exposición se procedió a revelar la placa.
- K. Se analizó la placa y se localizaron las bandas esperadas.

Una vez determinada(s) la(s) digestión (es) que da(n) una sola banda de un tamaño no muy alto (no mayor de 6,000 pb), que en este caso se trató de la digestión con PstI, se extrapoló la localización de ésta en el gel de agarosa, mediante el cálculo del Rf. Se realizó un nuevo gel bajo las mismas condiciones y se procedió a cortar la región donde se localizó la banda escogida previamente. El ADN se purificó con Gen Clean, se ligó al vector pBluescript y se transformó en *E. coli*. Las colonias transformantes blancas se replaquearon parchándolas por duplicado en: una caja control y en otra caja con membrana de nylon ambas conteniendo LB Xgal-IPTG con ampicilina. Cuando se reunió un número suficiente de colonias blancas (50 o más) se procedió a realizar la hibridización en colonia para determinar la(s) colonia(s) que poseen el inserto con el gen de la PPasa membranal completo.

3.3.7.3. Hibridización tipo Southern en colonia.

Se guardó la placa control con las colonias a 4°C sellada hasta saber los resultados de la hibridización. La membrana de nylon de la caja duplicado se trató de la siguiente manera:

- A. Se marcó la membrana de nylon con lápiz en varios sitios para determinar la localización de las colonias.
- B. Se prepararon 4 charolas de plástico de la siguiente manera: se colocó en su interior papel filtro aproximadamente del tamaño de la membrana doblado en los extremos, de tal manera que estuviera en contacto con el fondo del recipiente. Se vertió a cada charola el volumen suficiente de la solución correspondiente, permitiendo que el papel filtro se saturara de esta.
- C. La primera charola contenía SDS al 10%; la membrana se dejó sobre el papel 5 min.
- D. Se pasó la membrana a la segunda charola, la cual tenía solución desnaturalizante (0.4 M de NaOH, 0.6 M de NaCl), la membrana se mantuvo ahí 5 min.
- E. Se pasó la membrana a la tercera charola con solución neutralizadora (0.6 M de NaCl, 0.4 M Tris HCl pH 7.5), 5 min.
- F. Finalmente se pasó a la cuarta charola que contiene 2 x SSC, 5 min con agitación; se retiraron los restos de las colonias frotando suavemente (usando guantes).

- G. Se colocó la membrana en un papel filtro seco y se le dejó secar de 30 min a 1 h.
- H. Se colocó la membrana en medio de 2 pedazos de papel filtro y se entrecruzó en un horno de luz UV.
- I. A partir de este paso las indicaciones fueron las mismas que las de la hibridización tipo Southern descrita anteriormente, es decir la membrana se prehibridizó, se hibridizó, se lavó y se llevó a cabo la detección.

Una vez que se seleccionaron las colonias que dieron señal positiva se replaquearon, se crecieron en líquido y se les extrajo el plásmido mediante el método de Wizard miniprep (Promega), se hizo un análisis de restricción para verificar que la clona contenía el inserto y éste se mandó secuenciar.

Para llevar a cabo la secuenciación del gen completo en las dos direcciones se diseñaron los siguientes oligonucleótidos internos a partir de la secuencia del fragmento de 1371 pb.

Oligodesoxinucleótidos sentido:

5' CAT AGC ATG CCG CGC CA 3'
5' TGA AGA ACG TGA TGC CGG 3'
5' ACC AAG GGC TAC GCG AT 3'
5' ATC GTC ACC GGC ATC TTC 3'
5' CGC GTC GCA GTA AGC TCT 3'

Oligodesoxinucleótidos antisentido:

5' AAA GCG CGG GAT CTC CG 3'
5' TAT CGA CGC GAA GAG GTA G 3'
5' GTA GTA CTC GGT GAC CC 3'
5' GAA CAG GTC GGC GGC CAT 3'
5' AAC GCC AGC TCC AGT GC 3'

Una vez obtenido el gen completo, se analizó la secuencia

3.3.8. Análisis de la secuencia.

Para el análisis genético se utilizó el programa GCG, mientras que para la determinación del perfil de hidropatía y los cruces transmembranales se empleó el programa TopPredII (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>).

3.3.9. Conjugación.

- A) Se cultivaron 10 ml de la bacteria aceptora (en este caso *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1.) hasta que alcanzaron la fase logarítmica tardía.
- B) Se inocularon 5 ml de medio LB (con los antibióticos correspondientes) con una asada de la clona de *E. coli* S17 que contenía la construcción que se deseaba transferir (bacteria donadora) y se dejó crecer toda la noche.
- C) Se inocularon 20 ml de medio LB con un centésimo de volumen (200 μ l) del cultivo de *E. coli* S17 anterior y se les dejó crecer de 1.5 a 2 h a 37° C con agitación hasta que alcanzaron una densidad óptica a 550 nm de alrededor de 0.5.
- D) Se tomaron alícuotas de 500 μ l de los cultivos de las bacterias donadora y aceptora y se centrifugaron 8 min a 4,000 rpm para bajarlas.
- E) Se lavaron las bacterias aceptora y donadora 2 veces con un ml de LB
- F) Ambas bacterias se resuspendieron en lo que quedó de medio después de vaciar el tubo (de 50-100 ml), se juntaron la aceptora y donadora y se mezclaron.
- G) Se vertió la mezcla de bacterias sobre fragmentos estériles de nitrocelulosa colocados previamente en una caja de Petri con medio LB.
- H) Se dejó conjugarse a las bacterias de 5 a 24 h incubándose a 30° C.
- I) Se tomó el papel de nitrocelulosa con unas pinzas estériles y se introdujo a un tubo Eppendorf con 1 ml de LB, se resuspendieron las bacterias utilizando un Vortex y se retiró el papel.
- J) Se centrifugaron las bacterias a 15,000 rpm 3 min y se resuspendieron en 100 μ l de el medio que quedó.
- K) Se sembraron las bacterias en cajas de Petri con el medio deseado (en este caso Cohen-Bazire) con los antibióticos apropiados para seleccionar a las bacterias que aceptaron la construcción (en este caso gentamicina 15 μ g/ml) y con un antibiótico que solamente eliminara a la bacteria donadora (ácido nalidixico 20 μ g/ml).
- L) Se recuperaron las clonas positivas y se sembraron para comprobar que habían aceptado la construcción.

4. RESULTADOS.

4.1. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA H⁺PPasa DE *Rhodopseudomonas palustris*.

Para la caracterización bioquímica de la H⁺PPasa de *R. palustris* se utilizaron bacterias crecidas fotosintéticamente, cosechadas en la fase logarítmica tardía y se prepararon membranas (cromatóforos) con las cuales se realizaron todas las mediciones de actividad enzimática.

4.1.1. Especificidad de sustrato.

La tabla 2 muestra la actividad hidrolítica de la H⁺PPasa de los cromatóforos de *R. palustris* en presencia de PPI y otros sustratos fosforilados. La enzima es específica para el sustrato Mg-PPI y a excepción de los sustratos AMP-Mg y PEP-Mg, con los que hidroliza 3.3% y 8.7% respectivamente de la actividad con Mg-PPI, no es capaz de hidrolizar a otros sustratos.

Tabla 2. Especificidad de sustrato de la H⁺PPasa de *Rhodopseudomonas palustris*.

Sustrato	AE
PPI	94.0
AMP	3.3
ADP	0
β -glicerol fosfato	0
α -D glucosa 1-P	0
α -D glucosa 6-P	0
PEP	8.7

Las condiciones experimentales fueron: Tris-maleato 50 mM pH 7, MgCl₂, 1 mM, 0.5 mM de cada sustrato y 0.5 mg de proteína. Tiempo de incubación 10 min a 30°C. A.E. en nmoles Pi min⁻¹ mg⁻¹.

4.1.2. Efecto del Mg sobre la actividad hidrolítica.

La actividad de todas las pirofosfatasa es dependiente de la presencia de metal divalente, principalmente del Mg. El Mg tiene un doble papel, por un lado formar al sustrato (Mg-PPI o Mg-Pi) y por el otro funciona en forma libre como regulador, activando a la enzima (Cooperman *et al*, 1992, Celis y Romero, 1987; Sosa *et al*, 1992;

Maeshima, 2000). En el caso de la H⁺PPasa de *R. rubrum*, la hidrólisis del complejo Mg-PPI se presenta cuando la concentración de Mg libre está por arriba de 10 μ M.

En la Fig. 6 se muestra la cinética de hidrólisis del Mg-PPI por la H⁺PPasa de cromatóforos de *R. palustris* en dos condiciones. En la primera, el Mg y el PPI fueron añadidos en concentraciones equimoleculares (\bullet); de acuerdo a la constante de asociación del complejo Mg-PPI, $\log K_s = 6.0$ (Martell y Sillén, 1971). Bajo estas condiciones el Mg libre no rebasa los 38 μ M (Tabla 3) y como puede observarse en la Fig. 6, la cinética tiene un comportamiento sigmoideal, llegándose a un máximo alrededor de 85 nmoles de Pi min^{-1} mg de proteína⁻¹. En la segunda condición, además de mantener las concentraciones equimoleculares de Mg y PPI, se añadió 0.5 mM de Mg libre (\blacksquare). A concentraciones menores de 0.4 mM de sustrato, las actividades obtenidas son mayores que sin Mg libre y se conserva la cinética sigmoideal. La velocidad máxima es de 83 nmoles de Pi min^{-1} mg proteína⁻¹, comparable al máximo obtenido para la condición anterior. Posteriormente la actividad decrece en función de la concentración de sustrato hasta un 63% del máximo. Es evidente que el Mg libre ejerce un papel estimulador de la hidrólisis de PPI al menos hasta 0.4 mM de sustrato.

Estos datos contrastan con los obtenidos por Schwarm *et al* (1986) para *R. palustris*, los autores reportan también una cinética sigmoideal a bajas concentraciones de Mg²⁺ libre (0.001 mM), pero al aumentar la concentración del catión libre a 0.1 mM la cinética se vuelve hiperbólica. En este trabajo nunca se pudo obtener este tipo de cinética, aún variando diferentes concentraciones de Mg²⁺ libre en el medio.

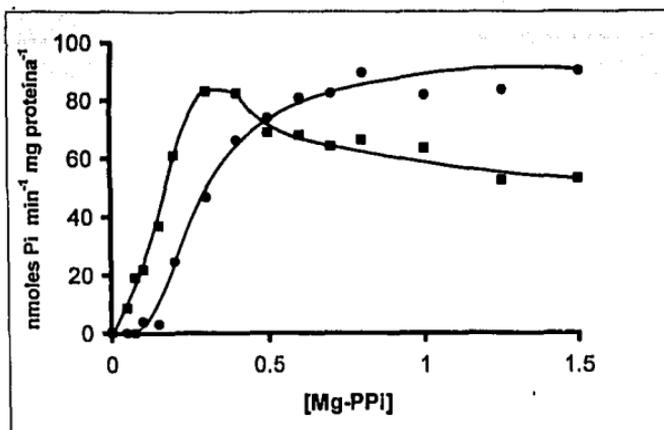


Fig. 6. Cinética de hidrólisis del complejo Mg-PPI. Las condiciones experimentales fueron: Tris-HCl 50 mM pH 7, 0.5 mg de proteína y las concentraciones indicadas de Mg-PPI. Tiempo de incubación 2.5 min a 30°C. Mg-PPI equimolares (●), mas 0.5 mM de Mg^{2+} libre (■).

Tabla 3. Concentraciones de PPI y Mg libre Calculadas a partir de la Fig. 6.

Sin Mg^{2+} libre		Con Mg^{2+} libre	
[Mg-PPI Añadido] mM	[Mg o PPI libre] M	[Mg libre] M	[PPI libre] M
0.05	-	5.00×10^{-4}	0
0.075	-	5.00×10^{-4}	1.45×10^{-7}
0.1	9.512×10^{-6}	5.00×10^{-4}	1.99×10^{-7}
0.15	9.718×10^{-6}	5.00×10^{-4}	2.99×10^{-7}
0.2	1.36×10^{-5}	5.00×10^{-4}	3.98×10^{-7}
0.3	1.68×10^{-5}	5.00×10^{-4}	5.98×10^{-7}
0.4	1.95×10^{-5}	5.00×10^{-4}	7.97×10^{-7}
0.5	2.18×10^{-5}	5.00×10^{-4}	9.96×10^{-7}
0.6	2.4×10^{-5}	5.01×10^{-4}	1.19×10^{-6}
0.7	2.59×10^{-5}	5.01×10^{-4}	1.39×10^{-6}
0.8	2.77×10^{-5}	5.01×10^{-4}	1.59×10^{-6}
1	3.11×10^{-5}	5.01×10^{-4}	1.98×10^{-6}
1.25	3.48×10^{-5}	5.02×10^{-4}	2.48×10^{-6}
1.5	3.82×10^{-5}	5.02×10^{-4}	2.97×10^{-6}

4.1.3. Efecto de otros cationes divalentes sobre la actividad hidrolítica.

Como se mencionó en la sección anterior, el Mg^{2+} es el principal catión utilizado por las PPasas. Sin embargo, otros cationes divalentes pueden sustituir al Mg^{2+} en sus dos papeles, pero con menor eficiencia (Celis y Romero, 1987).

El caso del Zn^{2+} es diferente, ya que en la H⁺PPasa de *R. rubrum* puede sustituir al Mg^{2+} en la formación del sustrato tan efectivamente como el Mg^{2+} pero a pH ácido (Romero y Celis, 1995).

Para explorar el efecto de los cationes divalentes sobre la actividad pirofosfatasa de los cromatóforos de *R. palustris* se realizó el experimento de la Fig. 7. Se mantuvo fija la concentración de PPI en 0.5 mM y se añadieron concentraciones crecientes de los cationes Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} . Bajo las condiciones del experimento, ningún catión igualó la actividad obtenida con el Mg^{2+} . Se obtuvo alrededor de un 42% de la actividad con Mg^{2+} , con Zn^{2+} y Co^{2+} , mientras que prácticamente no hay actividad con Mn^{2+} y Ca^{2+} . Hay que hacer notar que la respuesta a la concentración de catión es diferente para el caso de Zn^{2+} y Co^{2+} con respecto a la de Mg^{2+} .

Como se aprecia en la Fig. 7, la velocidad de hidrólisis de PPI se incrementa a medida que la concentración del Mg añadido aumenta, siendo máxima alrededor de 0.75 mM. Posteriormente, la actividad se mantuvo y disminuyó ligeramente (9.5% a la concentración más alta utilizada). Considerando que la concentración de PPI en el experimento fue de 0.5 mM, a partir de esta misma concentración de Mg añadido se empieza a tener concentraciones crecientes de Mg libre y la actividad hidrolítica sigue aumentando hasta alrededor de 1 mM de catión añadido, lo que nos indica que el Mg libre es el activador de la reacción en este intervalo de concentración y posteriormente no hay más activación. Esto corrobora el hecho, demostrado en la sección anterior, de que el Mg libre es activador de la reacción.

El Zn^{2+} y el Co^{2+} siguen patrones diferentes, en ambos casos, se obtiene un máximo de actividad y ésta decrece a concentraciones de catión mayores y menores de la concentración óptima, alcanzando valores de cero o cercanos. La actividad óptima para la curva del Zn^{2+} se obtiene a una concentración de 0.25 mM, en esta condición existe 0.249 mM de PPI libre que aún no se ha acomplexado y no hay Zn^{2+}

libre (Tabla 4); sin embargo, al acercarnos a 0.5 mM de Zn la actividad decrece a pesar de que hay suficiente sustrato para la hidrólisis y a 1 mM de catión la actividad es nula.

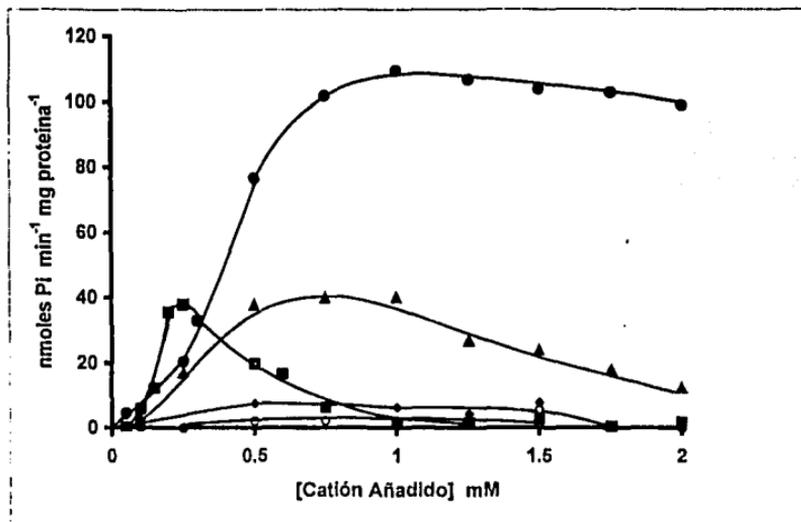


Fig. 7. Efecto de cationes divalentes sobre la hidrólisis de PPI. Las condiciones experimentales fueron: Tris-maleato 50 mM pH 7, NaPPI 0.5 mM, 0.5 mg de proteína y las concentraciones indicadas de cationes añadidos en forma de cloruro. Tiempo de incubación 5 min a 30° C. Mg²⁺ (●), Zn²⁺ (■), Co²⁺ (▲), Ca²⁺ (○) y Mn²⁺ (◆).

En la H⁺PPasa de *R. rubrum* se ha demostrado que el Zn²⁺ libre es la especie inhibitoria de la actividad de PPasa (Celis y Romero, 1987) lo que podría explicar, en nuestro caso, la caída de la actividad a partir de 0.5 mM de catión añadido, pero no la caída de 0.25 a 0.5 mM.

Tabla 4. Concentraciones molares de complejos y especies libres calculadas a partir de la Fig. 7

[Cati3n]	[Mg-PPi]	PPi libre	Mg libre	[Zn-PPi] M	PPi libre	Zn libre
0.5×10^{-4}	4.98×10^{-5}	4.5×10^{-4}	1.1×10^{-7}	5×10^{-5}	4.99×10^{-4}	0
1×10^{-4}	9.97×10^{-5}	4×10^{-4}	2.49×10^{-7}	1×10^{-4}	3.99×10^{-4}	0
2.5×10^{-4}	2.49×10^{-4}	2.5×10^{-4}	9.92×10^{-7}	2.5×10^{-4}	2.49×10^{-4}	0
5×10^{-4}	4.78×10^{-4}	2.18×10^{-5}	2.18×10^{-5}	4.99×10^{-4}	0	0
7.5×10^{-4}	4.98×10^{-4}	1.97×10^{-6}	2.51×10^{-4}	5×10^{-4}	0	2.49×10^{-4}
1.0×10^{-3}	4.9904×10^{-4}	9.96×10^{-7}	5×10^{-4}	5×10^{-4}	0	4.99×10^{-4}
1.25×10^{-3}	4.9937×10^{-4}	6.65×10^{-7}	7.5×10^{-4}	5×10^{-4}	0	7.49×10^{-4}
1.5×10^{-3}	4.9953×10^{-4}	4.99×10^{-7}	1×10^{-3}	5×10^{-4}	0	9.99×10^{-4}
1.75×10^{-3}	4.9963×10^{-4}	3.99×10^{-7}	1.25×10^{-3}	5×10^{-4}	0	1.249×10^{-4}
2.0×10^{-3}	4.997×10^{-4}	3.33×10^{-7}	1.5×10^{-3}	5×10^{-4}	0	1.499×10^{-4}

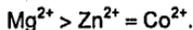
Continuaci3n de la Tabla 4

[Cati3n]	[Co-PPi]	PPi libre	Co libre
0.5×10^{-4}	4.99×10^{-5}	4.5×10^{-4}	0
1×10^{-4}	9.98×10^{-5}	4×10^{-4}	1.981×10^{-7}
2.5×10^{-4}	2.492×10^{-4}	2.5×10^{-4}	7.894×10^{-7}
5×10^{-4}	4.8×10^{-4}	1.95×10^{-5}	1.955×10^{-5}
7.5×10^{-4}	4.98×10^{-4}	1.638×10^{-6}	2.415×10^{-4}
10×10^{-4}	4.99×10^{-4}	7.99×10^{-7}	5×10^{-4}
12.5×10^{-4}	4.99×10^{-4}	5.28×10^{-7}	7.5×10^{-4}
15×10^{-4}	4.996×10^{-4}	3.96×10^{-7}	1×10^{-3}
17.5×10^{-4}	4.997×10^{-4}	3.17×10^{-7}	1.25×10^{-3}
20×10^{-4}	4.9977×10^{-4}	2.64×10^{-7}	1.5×10^{-3}

Para el caso del Co^{2+} , el 3ptimo se obtiene en un intervalo amplio de concentraciones (0.5 -1 mM) y la inhibici3n posterior no es abrupta sino lenta correlacionando la calda tambi3n con concentraciones crecientes de Co^{2+} libre en el medio (Tabla 4).

En las condiciones experimentales usadas, los resultados pueden resumirse de la siguiente manera:

- a) Los cationes que pueden formar complejo con PPi y su selectividad son:



- b) El Mg^{2+} es el 3nico cati3n activador.
 c) El Zn^{2+} y el Co^{2+} en su forma libre son inhibidores.

4.1.4. Perfil de pH.

Tomando en cuenta que la hidrólisis de PPI es dependiente de la concentración de cationes, escogimos las relaciones óptimas de PPI-cation para explorar el efecto del pH sobre la reacción hidrolítica utilizando los cationes Mg, Zn y Co.

La Fig. 8 muestra las curvas de pH obtenidas para la hidrólisis de PPI.

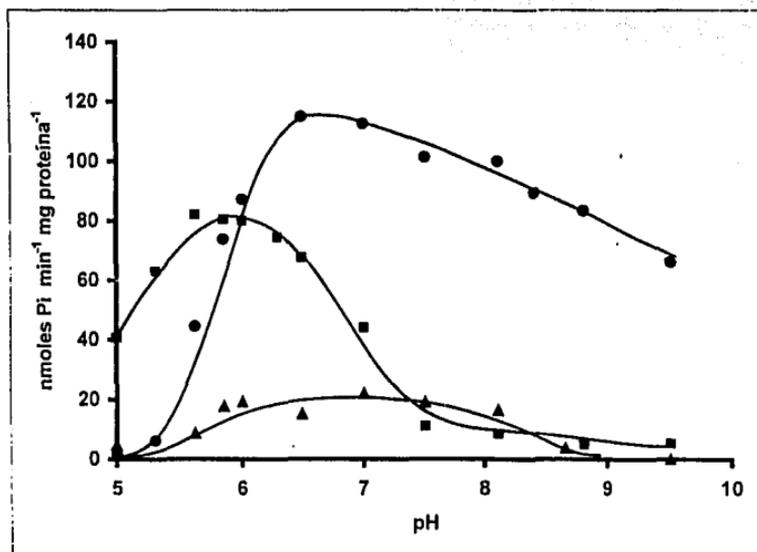


Fig. 8. Efecto del pH sobre la hidrólisis de PPI. Las condiciones experimentales fueron: Tris-maleato 50 mM a los valores de pH que se indican, 0.5 mg de proteína y las siguientes concentraciones de catión-PPi: Mg 1mM / PPI 0.5 mM (●), Zn 0.25 mM / PPI 0.5 mM (■) y Co 0.75 mM / PPI 0.5 mM (▲). Tiempo de incubación 5 min a 30°C.

Como puede observarse el perfil obtenido con Mg-PPi (●) no es una campana típica donde existe un pH óptimo único y la actividad cae abruptamente hacia ambos lados. En este caso, el pH óptimo está entre 6.5 y 7 y hacia valores de pH básicos la actividad decae lentamente hasta un 60% del óptimo a pH 10. Hacia valores de pH ácidos, la caída es más considerable llegando a cero a pH 5.

La curva de pH para Zn-PPI parece ser más simétrica (■), el óptimo se encuentra alrededor de pH 5.8, y a pH de 7.5, solo se tiene 13% de la actividad máxima. Aunque esta actividad no alcanza los niveles obtenidos con Mg-PPI, la hidrólisis obtenida a pH 5.6 es considerable, sobretodo tomando en cuenta que a este valor de pH la actividad con Mg-PPI es inferior al 40% de la que se observa a su pH óptimo. De acuerdo a este experimento es claro que la enzima puede utilizar diferentes cofactores, lo que le permitiría ser funcional en un rango de pH más amplio. Para que este efecto tuviera un sentido fisiológico tendría que correlacionarse con concentraciones de PPI y cationes *in vivo*.

La actividad con Co-PPI es muy baja y el perfil muestra una meseta muy amplia desde pH 6.0 hasta pH 8.0 (▲).

Finalmente, también se llevó a cabo el perfil de pH, pero utilizando como sustrato p-nitrofenilfosfato-Mg (0.5mM/1mM) (datos no mostrados) este compuesto es un sustrato artificial para fosfatasa. A ningún pH ensayado se obtuvo actividad hidrolítica considerable, indicando que las actividades obtenidas no son producto de alguna fosfatasa inespecífica en la preparación de cromatóforos y corroborando el resultado de la especificidad de la H⁺PPasa de *R. palustris* para PPI.

4.1.5. Efecto del Zn sobre la actividad hidrolítica a pHs 5.8 y 7.

Tomando en cuenta que el pH óptimo para la hidrólisis de PPI con Zn esta alrededor de pH 5.8, se realizó un nuevo experimento, pero variando la concentración de Zn en el medio con 0.5 mM de PPI a pH 5.8, para verificar la dependencia de catión a su pH óptimo. En la Fig. 9 se muestra comparativamente la variación en la actividad hidrolítica a pH 5.8 y a pH 7.0.

Se puede apreciar que la relación óptima obtenida a pH 7.0 (0.25 mM Zn/0.5 mM PPI) se corre a valores de 0.3 - 0.5 mM Zn/ 0.5 mM PPI, cuando se mide la actividad a pH 5.8, y se alcanza una actividad máxima de 104 nmoles de Pi min⁻¹ mg proteína⁻¹. La inhibición de la actividad ahora sí se correlaciona exactamente con la aparición de Zn libre en el medio.

El máximo de actividad con Zn como sustrato a pH 5.8 es comparable con la máxima actividad obtenida con Mg como sustrato (Fig. 7). Este comportamiento de la

enzima hacia estos cationes es semejante al que presenta la H⁺PPasa de *R. rubrum* (Romero y Cells, 1995) aunque con diferencias en la relación catión/PPi.

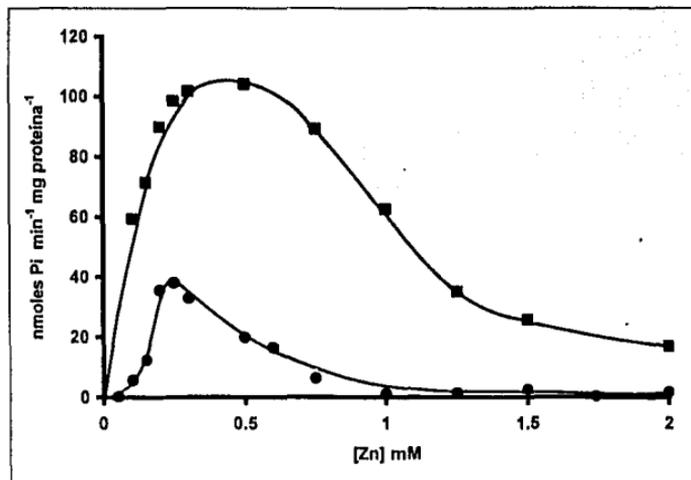


Fig. 9. Efecto del Zn²⁺ sobre la actividad hidrolítica a pH 5.8 y 7. Las condiciones del ensayo fueron: Tris-maleato 50 mM pH 5.8 (■), PPINa 0.5 mM, 0.5 mg de proteína y las condiciones indicadas de ZnCl₂. Los datos para la curva a pH 7 (●) fueron tomados de la Fig.7.

4.1.6. Energía de activación (E_a).

La Fig. 10 muestra el perfil de temperatura para la actividad hidrolítica de la H^+PPasa . La actividad máxima obtenida está alrededor de los $50^\circ C$ para 2, 4 y 6 min de incubación. En todos los casos la desnaturalización de la enzima ocurre de una manera gradual cuando se eleva la temperatura y no abruptamente como en otras enzimas, quizá por un efecto protector de la membrana.

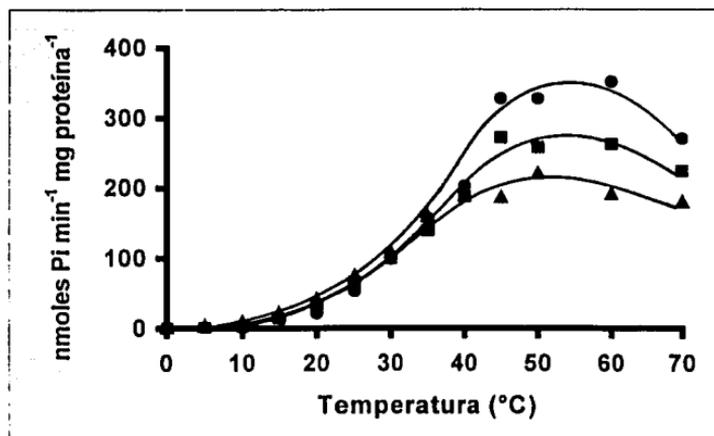


Fig. 10. Efecto de la temperatura sobre la actividad hidrolítica. Las condiciones experimentales fueron: Glicilglicina 50 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 0.75 mM, NaPPi 0.75 mM y 0.5 mg de proteína. El ensayo se realizó a las temperaturas indicadas a 2 min (●), 4 min (■) y 6 min (▲) de incubación.

A partir de los datos de la figura anterior, se realizó la gráfica de Arrhenius (Fig. 11), sin tomar en consideración los puntos de inactivación de la enzima, ni las temperaturas de 0 y $5^\circ C$ donde no hay actividad o es demasiado baja.

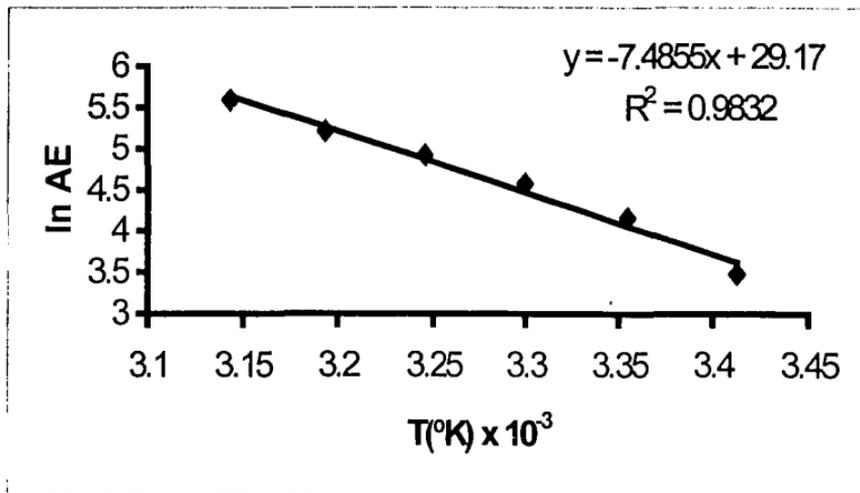


Fig. 11. Gráfica de Arrhenius de la hidrólisis de PPI. Los datos fueron tomados de la Fig.10 a 4 min de incubación. La energía de activación se calculó a partir de la pendiente de la línea obtenida por una regresión lineal, por la ecuación: $E_a = -mR$ (donde m es la pendiente de la recta y R la constante de los gases = 8.314 kJ/mol).

La E_a obtenida para los tres tiempos fue muy parecida : $E_a = 62.7 \pm 2.63$ kJ/mol y no presenta quiebres, esto indica que probablemente la H*PPasa tiene solamente una forma conformacional durante su actividad o que no hay una transición de fase que controle las propiedades cinéticas de la enzima.

El valor obtenido para la H*PPasa de *R. palustris* difiere por 17.7 kJ/mol con el reportado para la correspondiente enzima de *R. rubrum* ($E_a = 45$ kJ/mol, Ordaz *et al*, 1992). Esta diferencia indica que la enzima de *R. palustris* necesita más energía que la de *R. rubrum* para realizar su función y por tanto debe ser más lenta. Esto podría indicar diferencias en el mecanismo catalítico de las 2 enzimas

Por otra parte, Schwarm *et al* (1986) reportaron que la H⁺PPasa de *R. palustris* presenta dos quiebres en la gráfica de Arrhenius, lo cual difiere drásticamente con los resultados del presente trabajo. Desgraciadamente, en ese reporte no indican algunos detalles de la forma en que hicieron su experimento y se sabe que los quiebres dependen entre otras cosas, de la historia de almacenamiento de la membrana, por lo que no es posible hacer un análisis de las discrepancias en los resultados.

4.1.7. Efecto de inhibidores y activadores.

NaF.

El fluoruro es un inhibidor clásico de las PPasas. La inhibición de la actividad hidrolítica de la H⁺PPasa de *R. palustris* se muestra en la Fig. 12 con Mg-PPI y con Zn-PPI como sustrato.

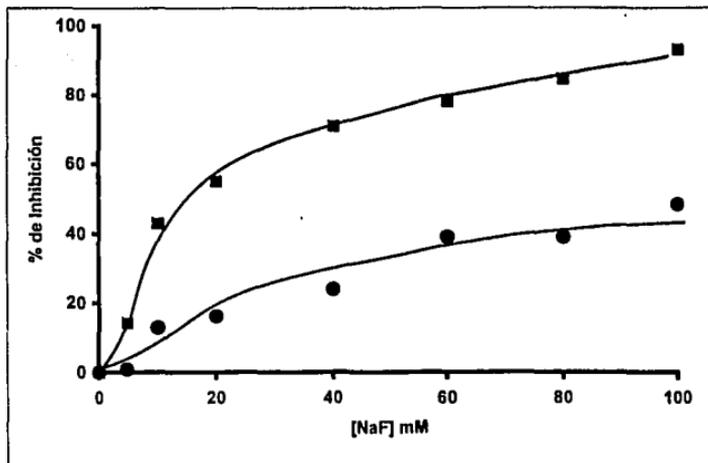


Fig. 12. Efecto del NaF sobre la hidrólisis de Mg-PPI y Zn-PPI. Las condiciones experimentales fueron: Para Mg-PPI (■): Tris-maleato 50 mM pH 8, PPI_{Na} 0.5 mM, MgCl₂ 0.5 mM y para Zn-PPI (●): Tris-maleato 50 mM pH 5.7, PPI_{Na} 0.5 mM, ZnCl₂ 0.3 mM; en ambos casos se utilizó 0.5 mg de proteína y las concentraciones indicadas de NaF. Tiempo de incubación 7.5 min a 30° C.

En presencia de Mg-PPI como sustrato, la hidrólisis se inhibe hasta en un 95% con 100 mM de NaF mientras que con Zn-PPI solo se logra un 50% de inhibición. En *R. rubrum* se ha reportado (Romero y Celis, 19995) que la hidrólisis de PPI por H⁺PPasa, es insensible a concentraciones de hasta 25 mM de NaF y se ha sugerido que esta falta de sensibilidad pueda deberse a diferencias en la unión del Zn-PPI y del Mg-PPI a la enzima, debido a las propiedades particulares de cada uno de estos iones. Sin embargo, en el caso de la H⁺PPasa de *R. palustris* sí se encuentra inhibición parcial por NaF para la hidrólisis de Zn-PPI, esto podría estar indicando diferencias estructurales entre estas dos H⁺PPasas.

Diciclohexilcarbodimida (DCCD).

Esta carbodimida hidrofóbica es un inhibidor del canal de H⁺ de las ATP sintasas y también de las H⁺PPasas (Baltscheffsky, *et al*, 1982; Zhen *et al*, 1997). En las F₁F₀-ATP sintasas se sabe que este compuesto modifica químicamente a un residuo de aspártico o glutámico de la subunidad c del sector F₀, pero en el caso de las H⁺PPasas no se conoce aún su sitio de unión.

El efecto del DCCD sobre la H⁺PPasa de *R. palustris* se muestra en la Fig. 13. La respuesta al inhibidor tiene una fase rápida hasta concentraciones de 100 mM y posteriormente la curva se vuelve asintótica hasta una concentración de DCCD de 500 mM, obteniéndose un máximo de inhibición del 77% (■).

En la Fig. 13 se muestran las curvas de inhibición en presencia (●) y en ausencia (■) de Mg²⁺ en el medio de preincubación. Es interesante el hecho de que la presencia de Mg previene en 10% la inhibición por DCCD, sobre todo porque la carbodiimida es hidrofóbica y debe repartirse rápidamente a la membrana.

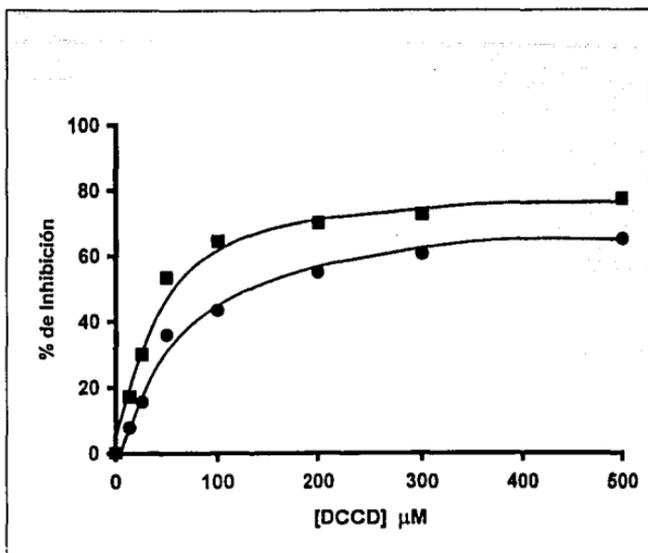


Fig. 13. Efecto del DCCD sobre la hidrólisis de Mg-PPI. Las condiciones experimentales fueron: Tris-maleato 50 mM pH 7.5, PPI 0.75 mM, MgCl_2 0.75 mM, 0.25 mg de proteína y las concentraciones indicadas de DCCD. Se preincubó la reacción por 30 min a temperatura ambiente en presencia (●) o ausencia (■) de MgCl_2 y se inicia la reacción añadiendo PPI. Tiempo de incubación 12.5 min a 30°C.

Análogos del sustrato. Efecto de imidodifosfato (IDP) y de metilendifosfato (MDP).

Los inhibidores competitivos IDP y MDP inhiben de manera semejante a la H^+PPase de *R. palustris* (Fig. 14). La inhibición alcanzada es de 55% con 0.5 mM de cualquiera de los dos compuestos, independientemente de que exista o no Mg^{2+} libre.

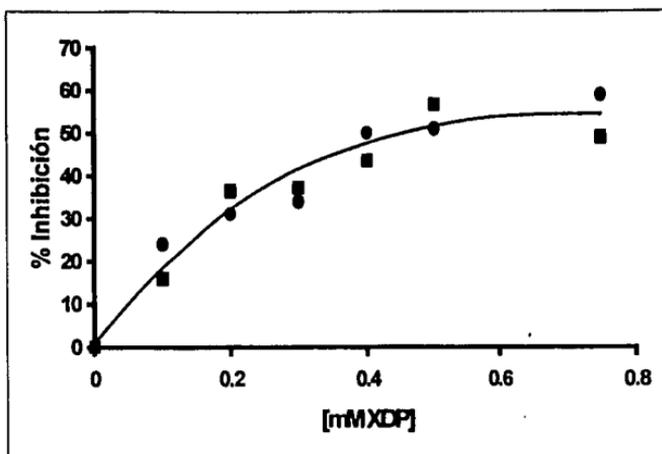


Fig. 14. Efecto de análogos de sustrato en la hidrólisis de Mg-PPi. Las condiciones experimentales fueron: Glicilglicina 50 mM pH 7.4, PPiNa 0.5 mM, MgCl₂ 1 mM, 0.5 mg de proteína y las concentraciones indicadas de MDP (●) e IDP (■), Tiempo de Incubación 7.5 min a 30°C.

Efecto del K⁺.

El K⁺ estimula a las H⁺PPasas vacuolares aproximadamente tres veces y es un cofactor esencial. El máximo de activación se obtiene con valores de 30 mM de KCl en la mayor parte de estas H⁺PPasas (Maeshima, 2000). A pesar de que el K⁺ no es esencial para la hidrólisis de PPi en los procariones, se decidió probar el efecto de este ion en los cromatóforos de *R. palustris*. Se encontró que la hidrólisis del complejo Mg-PPi es independiente de la presencia de K⁺, incluso hasta concentraciones de 75 mM (datos no mostrados).

Efecto de protonóforos sobre la actividad hidrolítica de la H⁺PPasas de

R. palustris

Los protonóforos desacoplan la cadena de transporte de electrones de la síntesis de ATP, mediante el aumento en la conductancia de H⁺ a través de la membrana. Dado que la H⁺PPasa está acoplada de la misma manera que la ATP sintasa en los cromatóforos, los ionóforos de H⁺ tendrán el mismo efecto sobre la H⁺PPasa.

Cuando la H⁺PPasa está en condiciones de síntesis estos compuestos inhiben la formación de PPI y en condiciones hidrolíticas aceleran la reacción de hidrólisis debido a la disipación del gradiente electroquímico de H⁺ que producen. Sin embargo en los cromatóforos de *R. palustris* el desacoplante CCCP tiene un efecto muy pobre sobre la actividad hidrolítica de PPI (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de CCCP sobre la Hidrólisis de PPI.

[CCCP] μ M	% Activación
0.2	8.82 \pm 8.0
0.5	11.57 \pm 3.9
1.0	11.57 \pm 5.0

Las condiciones experimentales fueron: Se preincubó el desacoplante, a las concentraciones indicadas con 0.25 mg de proteína de cromatóforos por 15 min a temperatura ambiente en Glicilglicina 100 mM pH 7.4, en un volumen de 250 μ l. La actividad se inicia agregando 250 μ l del medio de reacción que contiene MgCl₂ 0.5 mM y PPI_{Na} 0.5 mM, y se incuba por 5 min a 30°C. El CCCP está disuelto en etanol, la concentración máxima utilizada fue del 1% y se realizaron controles con la misma concentración de etanol, no observándose ningún efecto del solvente.

El efecto casi nulo de CCCP sobre la actividad hidrolítica de la pirofosfatasa, indicaba que las membranas de los cromatóforos podrían haberse dañado durante la sonicación. por lo anterior se exploró el efecto del desacoplante en función del tiempo de sonicación. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Efecto del CCCP sobre la actividad pirofosfatasa en cromatóforos obtenidos de bacterias sonicadas por diferentes tiempos.

Actividad Especifica (nmoles PI min⁻¹ mg proteína⁻¹)

Tiempo de Sonicación	0.5 min	1 min	1.5 min	2 min
Control	76	80	126	152
+ CCCP 0.2 μ M	82 (9)	89 (11)	119 (0)	171 (12)
+ CCCP 0.5 μ M	93 (22)	103 (29)	140 (11)	192 (26)
+ CCCP 1.0 μ M	85 (11)	100 (24)	137 (8)	165 (8)

() % de Activación. Las condiciones experimentales son las mismas de la Tabla 5.

Como se puede observar en la tabla 6, no existe una relación entre el tiempo de sonicación y el desacoplamiento, mismo que no supera el 29% de estimulación. En otros sistemas, el porcentaje de estimulación normalmente es arriba del 50%.

La falta de estimulación de la actividad hidrolítica podría deberse a que las membranas no están selladas, de tal manera que no se establece un gradiente electroquímico de H⁺ y no pueda acelerarse más la reacción. Al realizar un análisis de las membranas al microscopio electrónico se pudo constatar que un gran porcentaje de ellas estaban rotas y esto explica el bajo grado de desacoplamiento por CCCP (ver adelante Fig.24).

El problema de tener unas membranas que no están selladas es que no se puede medir la síntesis de PPI, por esta razón se hicieron otros intentos para obtener membranas acopladas y estos incluyeron: obtención de cromatóforos con una prensa de French (que rompe por presión a las bacterias de una manera más suave), adición de fosfolípidos y variación en los amortiguadores utilizados. Sin embargo, con ninguno de los tratamientos se logró obtener un desacoplamiento adecuado.

Como se describió en la introducción, la estructura de la membrana en las bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas es diferente dependiendo de las especies. En bacterias como *Rhodobacter sphaeroides* o *R. rubrum*, la membrana se invagina formando vesículas o tubos que al romper la célula, se sellan fácilmente. En el caso de *R. palustris*, la membrana se extiende formando lamelas de varias capas, a lo

largo de la célula, quizá este tipo de sistema membranal haga más difícil la obtención de membranas selladas cuando se rompen las células.

Se obtuvieron alrededor de 20 colonias transformadas a las cuales se les extrajo el plásmido, el cual se digirió con Eco RI para liberar el fragmento y comprobar la presencia del inserto de ~1,371 pb. Se escogió una clona para secuenciarla y verificar que se tratara del gen de la H⁺PPasa.

El fragmento resultó de 1,296 deoxinucleótidos y la secuencia de aminoácidos que codifica se comparó utilizando el programa GCG, contra 517,973 secuencias de la base de datos. El análisis mostró que el fragmento se alinea en primer lugar con la H⁺PPasa de *R. rubrum* con una identidad de 65% y un 76% de similitud, mientras que con las H⁺PPasas de plantas tiene un 46% de identidad. Estos resultados confirmaban que el segmento de 1,296 pb es efectivamente de la H⁺PPasa de *R. palustris*, por lo que se utilizó como sonda para obtener el gen completo. De acuerdo al gen de *R. rubrum* faltarían aproximadamente 560 pb del extremo 5' y aproximadamente 170 del extremo 3'.

4.2.3. Obtención de la secuencia completa.

Con el objetivo de encontrar un fragmento de ADN cromosómico que contuviera el gen completo de la H⁺PPasa de *R. palustris*, se realizó una hibridación homóloga tipo Southern utilizando como sonda el fragmento Eco RI de 1,296 pb de la H⁺PPasa. Para poder hacer esto, primero se ensayaron digestiones del ADN cromosómico de *R. palustris* con las siguientes enzimas de restricción: Bam HI, Eco RI, Pst I y Sal I; para las cuales no existen sitios de corte en el fragmento de 1,296 pb.

En la figura 15 se muestran los resultados de la hibridación. Las digestiones con Bam HI, Eco RI y Pst I revelaron una sola banda de hibridación cada una con un tamaño aproximado de 2,300, 25,000 y 5,000 pb respectivamente, lo que indica que solo existe una copia del gen en el cromosoma de *R. palustris*.

En el caso de la digestión con Sal I se observan 2 bandas, una que predomina, de menos de 2,000 pb y otra de ~ 1,500 pb que indica que el gen está fragmentado y que debe tener un sitio Sal I (esto se corroboró al obtener la secuencia completa del gen).

Debido a que estábamos interesados en clonar no solo el gen (~2,380 pb) sino también las regiones adyacentes (promotora y terminadora al menos) se escogió la digestión con Pst I que da una banda de ~ 5,000 pb que se espera que contenga el gen completo y quizá las regiones deseadas.

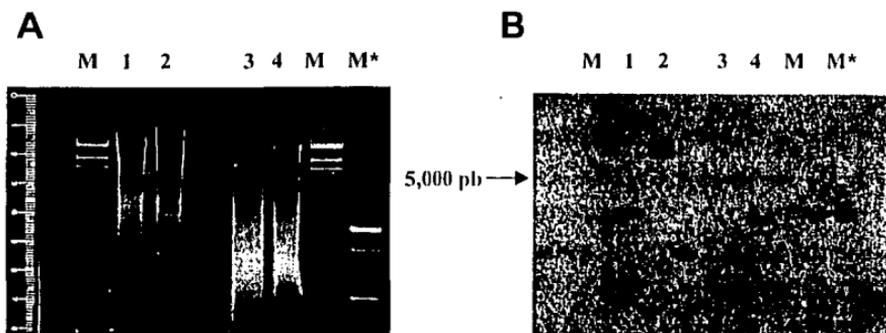


Fig. 15. Hibridación tipo Southern del ADN cromosómico de *Rhodospseudomonas palustris* con la sonda de 1296 pb. Digerido con: Bam HI, Eco RI, Pst I y Sal I (Carriles 1, 2, 3 y 4). Estándares de peso molecular λ Hind III (M) y escalera de 100 pb (M*). A) Electroforesis de las digestiones en gel de agarosa 1%. B) Patrón de hibridación con la sonda de 1,296 pb

Clonación de la banda Pst I.

Para clonar la banda de Pst I, se digirió suficiente cantidad del ADN cromosomal de *R. palustris* con la enzima, se corrió en un gel bajo las mismas condiciones del anterior y se cortó una zona que abarcaba la región del R_I de la banda que hibridizó. Este fragmento se clonó en el vector *p*Bluescript y se transformó en *E. coli* NM522 seleccionando a las transformantes por α complementación.

TEXIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hibridación en colonia y secuenciación.

Para identificar cual(es) de la(s) transformantes contenía el gen de la H⁺PPasa, se realizó hibridación por colonia.

Se parcharon 800 colonias por duplicado en cajas de Petri, una de ellas con membrana de nitrocelulosa para realizar una hibridación con la sonda de 1296 pb.

Diez clonas mostraron mayor intensidad en la señal con respecto a los controles. Estas clonas se recuperaron, se les extrajo el plásmido, se digirieron con Pst I y se realizó una nueva hibridación tipo Southern de las bandas obtenidas.

En la Fig. 16 se muestra que solo una de las clonas contenía un fragmento de ~5,000 pb que hibridizó contra la sonda de 1,296 pb, indicando la presencia del gen completo de la H⁺PPasa de *R. palustris*. Esta colonia se denominó NM522-B-5,000 y se guardó en colección. El plásmido (B-5000) se purificó y se secuenció parcialmente utilizando en primer lugar oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del fragmento de 1,296 pb que ya se conocía. Conforme se fue conociendo la secuencia, se diseñaron nuevos oligonucleótidos internos hasta conocer completamente la secuencia de la H⁺PPasa de *R. palustris*. Los oligonucleótidos empleados se muestran en Materiales y Métodos. La secuencia fue verificada en ambos sentidos.

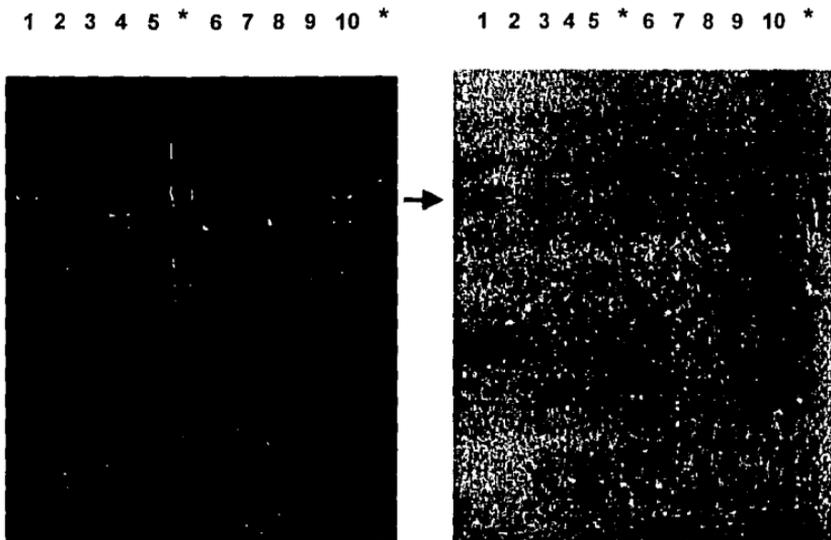
A**B**

Fig 16. A) Digestion del plásmido pBluescript con el inserto clonado en PstI. Carriles 1-5 y 7-11 diferentes clonas con aparente señal positiva; 7 y 12 Marcador de peso molecular λ Hind III, EcoRI.

B) Hibridación con la sonda de 1296 pb del gen de la H^+ PPasa de *R. palustris*. Se marca con una flecha el inserto con señal positiva

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.2.4. Secuencia de la H⁺PPasa de *R. palustris*.

La Fig. 17 muestra la secuencia de nucleótidos completa de la H⁺PPasa de *R. palustris*. Esta secuencia fue dada de alta en Gen Bank, con el número de acceso: AF 325217. La parte codificante está compuesta por 2,178 pb, su contenido de G+C es de 69%.

Al igual que su gen homólogo en *R. rubrum* presenta 2 posibles codones de inicio, así como sus 2 respectivas regiones de unión al ribosoma (Shine-Dalgarno). También al igual que en *R. rubrum*, después del codón de término se encuentra una región terminadora de la traducción tipo *rho* independiente, la cual consiste en una región invertida repetida, rica en G+ C, seguida de una región rica en T.

El análisis de la secuencia río arriba del primer posible codón de inicio del gen de la H⁺PPasa de *R. palustris* reveló la existencia de una probable región -35 consenso (TTGAC) para la unión del factor σ -70 ubicada a 37 pb del posible inicio de la transcripción (en este estudio no se determinó y solo se puede especular su localización basándose en la comparación de la secuencia con la de su gen homólogo en *R. rubrum*), la cual es idéntica a la reportada para la ARN polimerasa σ -70 de *Rhodobacter capsulatus* (Cullen *et al.* 1997). Cabe destacar que no se encontró una secuencia -10 consenso (TATAAT), sin embargo existe una región rica en A-T localizada a 11 pb del posible +1, tomando en cuenta que en *R. capsulatus* el único consenso de estas secuencias es el alto contenido en A-T es probable que funcione como región -10 consenso, sin embargo esta secuencia tiene una separación de 21 pb de la correspondiente región -35, lo cual excede la longitud óptima (aproximadamente 17 pb), a la cual las parejas de regiones -35 y -10 funcionan .


```

1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
581 P I L V G M L L G P A A L G G L L M G T 600

    atcgtaccggcatcttcgtcggcatctcgaatgtgcaccggtggcggcgcctgggacaac
1801 -----+-----+-----+-----+-----+ 1860
601 I V T G I F V G I S M C T G G G A W D N 620

    gcgaagaagctgatcgaagaaggcttcaccgacgccaaacggcgctgctgcacaagaaggcc
1861 -----+-----+-----+-----+-----+ 1920
621 A K K L I E E G F T D A N G V L H K K G 640

    agcgagggcacaaggcggcggtgacgggtgacaccgtcggcgatccctacaaggacacc
1921 -----+-----+-----+-----+-----+ 1980
641 S E A H K A A V T G D T V G D P Y K D T 660

    gccggcccgccgctcaaccgctgatcaagatcatcaacatcgtcgcgctgctgatcgtg
1981 -----+-----+-----+-----+-----+ 2040
661 A G P A V N P L I K I I N I V A L L I V 680

    ccgctgctgccgctggccagcaaccggcgaaggcctcgcacgccgagcccgcgccgatg
2041 -----+-----+-----+-----+-----+ 2100
681 P L L P L A S N P V K A S H A E P A P M 700

    gtgcagccggccgagaccgcgccggcgatgccggcggcgccgatggccgagccctcggcc
2101 -----+-----+-----+-----+-----+ 2160
701 V Q P A E T A P A M P A A P M A E P S A 720

    ccggccgctcgcagtaagctctcggctcttcgccacggtgccggcgccctcggggcgcc
2161 -----+-----+-----+-----+-----+ 2178
721 P A A S Q * 725

    ggccttttttcgcatgtccgagaagcctcccgaggtcgcgccggagatcccgcgctttcg
    Lccgctgccg

```

Fig 17. Secuencia de nucleótidos del gen de la H⁺PPasa de *Rhodospseudomonas palustris*. Se muestran las posibles regiones -35, -10 y +1, los codones de inicio y término (negritas), así como las regiones de unión a ribosoma (doble subrayado) y la región terminadora rho-independiente (flechas).

A partir de la secuencia de nucleótidos, se obtuvo la secuencia de aminoácidos (Fig. 17). La proteína tiene 725 aminoácidos y una masa molecular calculada de 73.7 kDa en el caso de que se inicie en el primer codón, mientras que sería de 708 aminoácidos, con un peso de 72 kDa si inicia en el segundo. Su punto isoeléctrico teórico es de 5.75 independientemente de cual sea el inicio de la secuencia.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de la H⁺PPasa de *R. palustris* con las secuencias de las bases de datos incluidas en el GCG, muestra que presenta una alta similitud con las H⁺PPasas encontradas en otras especies principalmente con la de *R. rubrum*, perteneciente a su misma familia con la cual tiene una similitud del 70.9% y una identidad del 63.4%, mientras que con las H⁺PPasas de otras bacterias, algas y plantas su similitud es de aproximadamente 50% y su identidad de 40% (Tabla 7). Al realizar el alineamiento de estas secuencias se aprecia que la H⁺PPasa de *R. palustris* contiene los tres segmentos conservados (Fig. 18).

Tabla. 7, Identidad y similitud entre la H⁺PPasa de *Rhodopseudomonas palustris* y las H⁺PPasas reportadas.

Organismo	% Identidad	% Similitud
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	63.4	70.9
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	43.8	54.9
<i>Thermotoga maritima</i>	41.5	50.2
<i>Acetabularia acetabulum</i>	48.2	56.7
<i>Chara corallina</i>	39.5	49.2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	41.8	49.9
<i>Beta vulgaris</i> (Betabel)	41.5	50.2
<i>Oryza sativa</i> (Arroz)	41.5	49.4
<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabaco)	41.8	48.6
<i>Hordeum vulgare</i> (Cebada)	41.7	49.7
<i>Cucurbita moschata</i> (Calabaza)	41.8	49.6
<i>Vigna radiata</i>	41.8	50

	1					50
<i>R. palustris</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Thermotoga maritima</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>A. acetabulum</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Chara corallina</i>	MAAVA EGLNA	MTTIP TTPAP	ADLALAAVTG	NTIVSETAVL	IFIPAACVIG	
<i>Cucurbita moschata</i>	-----	-----	-----	-----MS	VTILPDLGTE	IFIPVCAVIG
<i>Vigna radiata</i>	-----	-----	-----	-----MG	AAILPDLGTE	ILIPVCAVIG
<i>Nicotiana tabacum</i>	-----	-----	-----	-----MG	SALLPDLGTE	IVIPVCAVIG
<i>Hordeum vulgare</i>	-----	-----	-----	-----	MAILGELGTE	ILIPVCGVIG
<i>Oryza sativa</i>	-----	-----	-----	-----M	AAILPDLATG	VLVPAAAVVG
<i>Arabidopsis thaliana</i>	-----	-----	-----	-----MVA	PALLPELWTE	ILIPVCAVIG
<i>Beta vulgaris</i>	-----	-----	-----	-----	~MISDLATE	IFIPVCAVIG
consenso	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	51					100
<i>R. palustris</i>	-----	-----	-----	-----	-----	~MTTSLALYL
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	-----	-----	-----	-----	-----	~MAGIYL
<i>Thermotoga maritima</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	-----	-----	-----	-----	-----	~MNMISYAL
<i>A. acetabulum</i>	-----	-----	-----	-----	-----	~MGQITY
<i>Chara corallina</i>	ILFAVLQWSV	VGKISVRPSG	GGM.....N	YPLMDEGLE	
<i>Cucurbita moschata</i>	1VFSLVQWYY	VSQVKLSPGR	DAAHNN.SA.	GSKNG..YSD	YLIEEEGVN	
<i>Vigna radiata</i>	IAFALFQWLL	VSKVKLSAVR	DASPN...A.	AAKNG..YND	YLIEEEGVN	
<i>Nicotiana tabacum</i>	IVFSSQWYVL	VSRVKVSSSEH	GATSPS.SNK	NNKNG..YGD	CLIEEEGIN	
<i>Hordeum vulgare</i>	IVFAVAQWFI	VSKVKVTPG.	...AAS.AAA	GAKNG..YGD	YLIEEEGLN	
<i>Oryza sativa</i>	IAFAVVQWVL	VSKVKMTAER	RGEGGSPGAA	ACKDGGGAASE	YLIEEEGLN	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	IAFSLFQWYV	VSRVKLTSDL	GASSSG.GAN	NGKNG..YGD	YLIEEEGVN	
<i>Beta vulgaris</i>	Y.ISCYQWFL	VSKVKVSTDR	HVNNGG.SA.	..KNG..FND	YLIEEEGVN	
consenso	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	101					150
<i>R. palustris</i>	.ALGCGLAAV	LYGFIQRGWI	LAQDAGNARM	QEIAGAIQQG	AAAYLARQYK	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	FVVAALALAL	GYGALTIKTI	MAADAGTARM	QEISGAVQEG	ASAFLNRQYK	
<i>Thermotoga maritima</i>	~MYVAALFF	LIPLVALGFA	AANFAAVVRK	PEGTERMKEI	SSYIRSGADS	
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	LGVILGISGV	IYAVYLAVWV	LRQDPGNEKM	RFISQAIATG	ARAYLFRQYR	
<i>A. acetabulum</i>	ATPVFGVLAL	LYTFWRSSWV	SKQEVGTERM	GRIAKNITDG	AMAFILKAEYR	
<i>Chara corallina</i>	DSSVVTCAE	IQEAISEGAV	SFLMTEYKYL	SYFMVGFVIV	IFAFILGATED	
<i>Cucurbita moschata</i>	DHNVVVKCAE	IQSAISEGAT	SFLFTEYKYV	GIFMVLFAVL	IFVFLGSVES	
<i>Vigna radiata</i>	DHNVVVKCAE	IQNAISEGAT	SFLFTEYKYV	GIFMVAFAIL	IFLFLGSVEG	
<i>Nicotiana tabacum</i>	DHNVVVKCAD	IQNAISEGAT	SFLFTEYQYV	GIFMIAFAIL	IFLFLGSVEG	
<i>Hordeum vulgare</i>	DHNVVVKCAE	IQTAISEGAT	SFLFTMYQYV	GMFMVVFAAI	IFLFLGSIEG	
<i>Oryza sativa</i>	EHNVVEKCE	IQHAISEGAT	SFLFTEYKYV	GLFMGIFAVL	IFLFLGSVEG	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	DQSVVAKCAE	IQTAISEGAT	SFLFTEYKYV	GVFMIFFAAV	IFVFLGSVEG	
<i>Beta vulgaris</i>	DQNVVAKCAE	IQNAISEGAT	SFLFTEYQYV	GVFMCAFAVL	IFVFLGSVEG	
consenso	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

	151		200
<i>R. palustris</i>	TIAIVGAVLA	ILIFFF....	...LGLLTA
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	TIAVVGAVVF	VILTAL....	...LGISVGF
<i>Thermotoga maritima</i>	FLAHETKAIF	KVAIVIAILL	MIETTWTQGV
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	TLAVL.LVIL	AVLILVAIDM	PRRTFGLTAL
<i>A. acetabulum</i>	VLAIFVIAVA	ILLGISGNRE	G..TSPLIAV
<i>Chara corallina</i>	FGTDRKPCWE	DATKLCGSGV	M..NALLSAV
<i>Cucurbita moschata</i>	FSTKQPQCTY	DKTRTCKPAL	A..TAIFSTV
<i>Vigna radiata</i>	FSTSPQACS	DKTKTCKPAL	A..TAIFSTV
<i>Nicotiana tabacum</i>	FSTSSQPCTY	NKEKRCKPAL	A..TAIFSTV
<i>Hordeum vulgare</i>	FSTKGPQCTY	SK.GTCKPAL	Y..TALFSTA
<i>Oryza sativa</i>	FSTKSPQCHY	SKDRMCKPAL	A..NAIFSTV
<i>Arabidopsis thaliana</i>	FSTDNKPCY	DTTRTCKPAL	A..TAAFTSI
<i>Beta vulgaris</i>	FSTESQPCTY	SPLKKCKPAL	A..TALFSTV
consenso	-----	-----	-F-G--S--G-G--GM--

	201		250
<i>R. palustris</i>	VRANVRTAQA	AT..KGIGPA	LDVAFKGGAI
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	VRANVRVAAG	AQ..QGLARG	LELAFQSGAV
<i>Thermotoga maritima</i>	TRANVRVAEA	ARTTKKIGPA	LKVAYQGGSV
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	TRSASRVA.Q	AAATGGMGKA	LLVSWRAGAV
<i>A. acetabulum</i>	TKANVRTTNA	AR..SSLGRA	LEVAFAGGSV
<i>Chara corallina</i>	TFANARTRSR	RG..GGVPGA	FKAAPFRSGAV
<i>Cucurbita moschata</i>	TYANARTTLE	AR..KGVGKA	FITAFRSGAV
<i>Vigna radiata</i>	TYANARTTLE	AR..KGVGKA	FITAFRSGAV
<i>Nicotiana tabacum</i>	TYANARTTLE	AR..KGVGKA	CLV....QV
<i>Hordeum vulgare</i>	TYANARTTLE	AR..KGVGKA	FITAFRSGAV
<i>Oryza sativa</i>	TYANARTTLE	AR..KGVGKA	FITAFRSGAV
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TYANARTTLE	AR..KGVGKA	FIVAFRSGAV
<i>Beta vulgaris</i>	TDANARTTLE	AR..KGVGKA	FIIAFRSGAV
consenso	-----R-----	-----	-G-----

	251		300
<i>R. palustris</i>	LSGGIHH....ADPAT.LKPLLG
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	LVGIGA....TGRALIDPLVA
<i>Thermotoga maritima</i>	GKWMGQVDNL	NIYTNWLGIN	FVPFAMTVSG
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	RSVLPPDDWAVPLVA
<i>A. acetabulum</i>	YSNIGW....DINRVITVITG
<i>Chara corallina</i>	QRYYGD....DWIGLYESIAG
<i>Cucurbita moschata</i>	KLYYGD....DWGGLFESITG
<i>Vigna radiata</i>	KIYYGD....DWGGLFEAITG
<i>Nicotiana tabacum</i>	KLYYGD....DWEGLFEAITG
<i>Hordeum vulgare</i>	KMYYGD....DWEGLFESITG
<i>Oryza sativa</i>	GIYYGD....DWEGLFEAITG
<i>Arabidopsis thaliana</i>	KIYYGD....DWEGLFEAITG
<i>Beta vulgaris</i>	KLYYGD....DWEGLFEAITG
consenso	-----	-----	-----

G-S----F-R-CGG--T

	301		350
<i>R. palustris</i>	KGADVGADLV	GKVEASIPED	DPRNPAVIAD NVGDNVGDCA GMAADLFETY
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	KCADVGADLV	GKVEAGIPED	DPRNPAVIAD NVGDNVGDCA GMAADLFETY
<i>Thermotoga maritima</i>	KAADMAADLV	GKTELNLPE	DPRNPATIAI NVGDNVGDVA GLGADLLESE
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	KAADLGADLV	GKVEAGIPED	DPRNPGVIAD NVGDNVGDVA GMAADVYESY
<i>A. acetabulum</i>	KAADVAADLV	GKVEAGIPED	HPLNPATIAI NVGDNVGDVA GMGADLFESY
<i>Chara corallina</i>	KAADVGADLV	GKVERNIPE	DPRNPAVIAD NVGDNVGDIA GMGADLFGSL
<i>Cucurbita moschata</i>	KAADVGADLV	GKVERNIPE	DPRNPAVIAD NVGDNVGDIA GMGSDLFGSY
<i>Vigna radiata</i>	KAADVGADLV	GKVERNIPE	DPRNPAVIAD NVGDNVGDIA GMGSDLFGSY
<i>Nicotiana tabacum</i>	KAADVGADLV	GKVERNIPE	DPRNPAVIAD NVGDNVGDIA GMGSDLFGSY
<i>Hordeum vulgare</i>	KAADVGADLV	GKVERNIPE	DPRNPAVIAD NVGDNVGDIA GMGSDLFGSY
<i>Oryza sativa</i>	KAADVGADLV	GKVERNIPE	DPRNPAVIAD NVGDNVGDIA GMGSDLFGSY
<i>Arabidopsis thaliana</i>	KAADVGADLV	GKVERNIPE	DPRNPAVIAD NVGDNVGDIA GMGSDLFGSY
<i>Beta vulgaris</i>	KAADVGADLV	GKVERNIPE	DPRNPAVIAD NVGDNVGDIA GMGSDLFGSY
consenso	K-AD--ADLV	GK-E---PED	-P-NP--IAD NVGDNVGD-A G--D-----

	351		400
<i>R. palustris</i>	AVTLIAAMAL	GA.....LL	L.....PN ..AAL.AAAV YPLVLGGVSI
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	AVTVVATMVL	AS.....IF	F.....AG VPAMT.SMMA YPLAIGGVC:
<i>Thermotoga maritima</i>	VGAIVSSIIL	ASYMFPYVQ	KIGENLVHQV PKETIQALIS YPIFFALVGL
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	IVTVTAAIFL	AAILGL....PTQFIEA I..ILFAALAL
<i>A. acetabulum</i>	VGSIIIGTMVL	GA.....TF	IGVAGFQETN DFNGL.NAVL LPLVLAGTGI
<i>Chara corallina</i>	AESTCAALVV	SS.....LS	DFGKEMNYVA MSFPL.LITG AGIL...VCL
<i>Cucurbita moschata</i>	AESSCAALVV	AS.....IS	PFGNHHELT PLYPL.IVSS MGI...VCL
<i>Vigna radiata</i>	AESSCAALVV	AS.....IS	SFGLNHELTA MLYPL.IVSS MGI...VCL
<i>Nicotiana tabacum</i>	AESSCAALVV	AS.....IS	SFGLDHDEFTA MLYPL.LISS MGI...VCL
<i>Hordeum vulgare</i>	AESSCAALVV	AS.....IS	SFGINHDFTA MLYPL.LVSS MGI...VCL
<i>Oryza sativa</i>	AESSCAALVV	AS.....IS	SFGINHEFT PLYPL.LISS MGI...VCL
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AEASCAALVV	AS.....IS	SFGINHDFTA MLYPL.LISS MGI...VCL
<i>Beta vulgaris</i>	AEASCAALVV	AS.....IS	SFGINHEFTA MLYPL.LISS MGI...VCL
consenso	-----	-----	-----

	401		450
<i>R. palustris</i>	IASIIGCAFV	KASPGHKNVM	PALYKGLIVA GAISLVFFFF VTRMVMP...
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	LASILGTFV	KLGP.KNNIM	GALYRGFLVS AGASVFGIIL ATAIVPG...F
<i>Thermotoga maritima</i>	GCSMGLYV	IVKKPSDNQ	DFENISLWTS ALLTVLVTAF LTYFYLKDLQ
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	VATFAGVNL	KT.TGVKHP	SSISLA.IYA TIGTLVVLFF IGAFTLGLD
<i>A. acetabulum</i>	ITSIVGTFV	KVKEG.GNQ	KALNTGEFLA SGIMLVLYL IVDNMLP...
<i>Chara corallina</i>	ITTLVATDLT	SGVSNIKGE	PALKKQLIIS TVLMTFVIAL LAMGCLPDTF
<i>Cucurbita moschata</i>	ITTLFATDFE	E.IKAVKEIE	PALKKQLIIS TVLMTFVIAI VTWLSVPSSF
<i>Vigna radiata</i>	ITTLFATDFE	E.IKAVKEIE	PALKKQLIIS TVLMTIGVAV VSFVALPTSF
<i>Nicotiana tabacum</i>	ITTLFATDFE	E.IKAVKEIE	PALKKQLIIS TAIMTVGIAI VTWTCILPSSF
<i>Hordeum vulgare</i>	ITTLFATDFE	E.IKAVKEIE	PALKKQLIIS TALMTFVIAI TSWLALPAKF
<i>Oryza sativa</i>	ITTLFATDFE	E.IKAVDEIE	PALKKQLIIS TVVMTVGIAL VSWLGLPYSF
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ITTLFATDFE	E.IKLVKEIE	PALKKQLIIS TVIMTVGIAI VSWVGLPTSF
<i>Beta vulgaris</i>	ITTLFATDFE	E.IKAVKEIE	PALKKQLIIS TVLMTFVIAI ITWIALPSSF
consenso	-----	-----	-----

	451			500
<i>R. palustris</i>	DDALGAG...	.TQMRLFGAC	VVGLVLTAA	VWVTEYTYGT QFKPVQHVAAQ
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	GDIQQANGVL	YSGFDLFLCA	VIGLLVTLGLL	IWVTEYTYGT NFRPVRSAK
<i>Thermotoga maritima</i>	GLDVGVERL	FGAISPWFSA	IIGIFSGILL	GFWAEYTYSY RYKPTQFLSK
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	T.....	.KALALAATT	SLGAVIAPLI	VKITDYTYSY NYGPKRIAE
<i>A. acetabulum</i>	STWTSATGVS	YSSFGVEMAV	IFGLVAGLLI	GMITFEYTYGT GTRPVKGIYS
<i>Chara corallina</i>	EIINGAETKV	VKKWYMPFCV	ACGLWAGLLI	GYTTEYFTSH QFTPVRDVA
<i>Cucurbita moschata</i>	TIFNFGTQKV	VINWKLFLCV	AVGLWAGLII	GFVTEYTYTSN AYSPVQDVAD
<i>Vigna radiata</i>	TIFNFGVQKD	VKSNQFLFLCV	AVGLWAGLII	GFVTEYTYTSN AYSPVQDVAD
<i>Nicotiana tabacum</i>	TIFNFGTQKV	VKNWQLFLCV	AVGLWAGLII	GFVTEYTYTSN AYSPVQDVAD
<i>Hordeum vulgare</i>	TIFNFGAQKE	VSNWGLFFCV	AVGLWAGLII	GFVTEYTYTSN AYSPVQDVAD
<i>Oryza sativa</i>	TIFNFGAQKT	VYNWQLFLCV	AVGLWAGLII	GFVTEYTYTSN AYSPVQDVAD
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TIFNFGTQKV	VKNWQLFLCV	AVGLWAGLII	GFVTEYTYTSN AYSPVQDVAD
<i>Beta vulgaris</i>	TIFNFGTQKV	VHNWQLFLCV	AVGLWAGLII	GFVTEYTYTSN AYSPVQDVAD
consenso	-----	-----	--G-----	-----T-----P-----

	501			550
<i>R. palustris</i>	ASTTGHGTNI	IAGLGVSMKS	TAWPVIVFVCL	AIYGAYA... ..
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	ASTTGHGTNV	IQGLAISMEA	TALPALIICA	AIITTYQ... ..
<i>Thermotoga maritima</i>	SSIEGTGMVI	SNGLSLGMKS	VFPPTLTLVL	GILFADY... ..
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	QAKISPATVI	ITGYGVGLMS	AIPVIAVIVA	VLGSIYMIY YVPVSGPGE
<i>A. acetabulum</i>	QSLTGSATNI	IAGLGVGMQS	TAIPIVILAA	AIIGAE... ..
<i>Chara corallina</i>	SCRTGAATNV	IFGLALGYKS	VIIPILAI AF	TVFVSH... ..
<i>Cucurbita moschata</i>	SCRTGAATNV	IFGLALGYKS	VIIPIFAI AF	SIFVSFT... ..
<i>Vigna radiata</i>	SCRTGAATNV	IFGLALGYKS	VIIPIFAI AF	SIFVSFT... ..
<i>Nicotiana tabacum</i>	SCSTGAATNV	IFGLALGYKS	VIIPIFAI AF	AIFVSFT... ..
<i>Hordeum vulgare</i>	SCRTGAATNV	IFGLALGYKS	VIIPIFAI AF	SIYVSFS... ..
<i>Oryza sativa</i>	SCRTGAATNV	IFGLALGYKS	VIIPIFAI AF	SIFVSFS... ..
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SCRTGAATNV	IFGLALGYKS	VIIPIFAI AF	SIFVSFS... ..
<i>Beta vulgaris</i>	SCRTGAATNV	IFGLALGYKS	VIIPIFAI AF	SIFVSFS... ..
consenso	-----	-----	--G-----	-----

	551			600
<i>R. palustris</i>	...LAGLYG	IAIAATSMLS	MAGIVVARDA	YGPITDNAGG IAEMSGLPDS
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	...LSGLFG	IAITVTSMLA	LAGMVVALDA	YGPVTDNAGG IAEMANLPED
<i>Thermotoga maritima</i>	...FAGLYG	VAIAALGMLS	FVATSVSVD	YGPVADNAGG ISEMCELDP
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	LSKYLGAIFG	TAMASVGLLV	VAGIITADS	YGPVSDNAGG VVEMAGLPDE
<i>A. acetabulum</i>	...FAGLYG	IAIAAVGMLS	NTGIQLAVDA	YGPISDNAGG IAEMGLPKE
<i>Chara corallina</i>	...LAAMYG	IACAALGMLS	TLSTCLAIDA	YGPISDNAGG IAEMAEKMPA
<i>Cucurbita moschata</i>	...FAAMYG	IAVAALGMLS	TIATGLAIDA	YGPISDNAGG IAEMAGMSHR
<i>Vigna radiata</i>	...LAAMYG	IAVAALGMLS	TIATGLAIDA	YGPISDNAGG IAEMAGMSHR
<i>Nicotiana tabacum</i>	...FAAMYG	IAVAALGMLS	TIATGLAIDA	YGPISDNAGG IAEMAGMSHR
<i>Hordeum vulgare</i>	...IAAMYG	IAMAALGMLS	TMATGLAIDA	YGPISDNAGG IAEMAGMSHR
<i>Oryza sativa</i>	...LAAMYG	VAVAALGMLS	TIATGLAIDA	YGPISDNAGG IAEMAGMSHR
<i>Arabidopsis thaliana</i>	...FAAMYG	VAVAALGMLS	TIATGLAIDA	YGPISDNAGG IAEMAGMSHR
<i>Beta vulgaris</i>	...FAAMYG	VAVAALGMLS	TIATGLAIDA	YGPISDNAGG IAEMAGMSHR
consenso	-----G	-A-----L-	-----D-	YGP--DNAGG --EM-----

	601		650
<i>R. palustris</i>	VRDITDPLDA	VGNTTKAVTK	GYAIGSAGIA
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	VRKTTDALDA	VGNTTKAVTK	GYAIGSSGLG
<i>Thermotoga maritima</i>	VRKITDHLDA	VGNTTAAIGK	GFAIGSAIFA
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	VREITDVLDS	VGNTTKATTK	GYAIASAALA
<i>A. acetabulum</i>	VRGRTDKLDA	VGNTTAAIGK	GFAIGSAALT
<i>Chara corallina</i>	IREKTDALDA	AGNTTAAIGK	GFAIGSAALV
<i>Cucurbita moschata</i>	IRERTDALDA	AGNTTAAIGK	GFAIGSAALV
<i>Vigna radiata</i>	IRERTDALDA	AGNTTAAIGK	GFAIGSAALV
<i>Nicotiana tabacum</i>	IRERTDALDA	AGNTTAAIGK	GFAIGSAALV
<i>Hordeum vulgare</i>	IRERTDALDA	AGNTTAAIGK	GFAIGSAALV
<i>Oryza sativa</i>	IRERTDALDA	AGNTTAAIGK	GFAIGSAALV
<i>Arabidopsis thaliana</i>	IRERTDALDA	AGNTTAAIGK	GFAIGSAALV
<i>Beta vulgaris</i>	IRERTDALDA	AGNTTAAIGK	GFAIGSAALV
consenso	-R--TD-LD-	-GNTT-A--K	G-AI-S----

	651		700
<i>R. palustris</i>	...EARGMSL	SFD...LSDH	RVIVGLFIGG
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	AYPAFAGVDV	NFS...LSSP	YVVVGLFIGG
<i>Thermotoga maritima</i>	DIGKPELVL	LLN...MLDA	RVIAGALLGA
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	GKGIVDMISE	SLSGLQLINA	NVLIGAFILV
<i>A. acetabulum</i>	ADP	LVMAGLFLGG
<i>Chara corallina</i>	L.....	P	KEFVGLIVGA
<i>Cucurbita moschata</i>	T.....	P	KVFIPLLIVGA
<i>Vigna radiata</i>	T.....	P	KVFIPLLIVGA
<i>Nicotiana tabacum</i>	T.....	P	QVFIPLLIVGA
<i>Hordeum vulgare</i>	S.....	P	KVFIPLLIVGA
<i>Oryza sativa</i>	T.....	P	KVFIPLLIVGA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	T.....	P	KVFIPLLIVGA
<i>Beta vulgaris</i>	T.....	P	KVFIPLLIVGA
consenso	-----	-----	-G--G- ----F-- --V--A--

	701		750
<i>R. palustris</i>	VVEEVRQR	DIKIM....
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	VVEEVRQR	EIPGIM....
<i>Thermotoga maritima</i>	MVDEIRQR	EIPGLL....
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	IVEEIRQR	EKPGIL....
<i>A. acetabulum</i>	MIQEVRRQF	TIPELKALD	TMRKNDGKEF
<i>Chara corallina</i>	MVEEVRQFN	TIAGLM....
<i>Cucurbita moschata</i>	MVEEVRQFN	TIPGLM....
<i>Vigna radiata</i>	MVEEVRQFN	TIPGLM....
<i>Nicotiana tabacum</i>	MVEEVRQFN	TIPGLM....
<i>Hordeum vulgare</i>	MVEEVRQFN	TIPGLM....
<i>Oryza sativa</i>	MVEEVRQFN	SIPGLM....
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MVEEVRQFN	TIPGLM....
<i>Beta vulgaris</i>	MVEEVRQFN	TIPGLM....
consenso	---E-RRQ--	-----	-----Y

	751			800
<i>R. palustris</i>	GTAVDMLTTA	AIKEMIVPSL	LPVVAPI.LV	GMLLGA...ALGGLL
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	GRCVDMLTKA	AIKEMIIPSL	LPVLAPIVLY	FVILGIADKS AAFSALGAML
<i>Thermotoga maritima</i>	NRCEIITSDN	ALKQMGYPAF	IAILTPLVTG	FLL.GAEFVGGVL
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	ARLVVDIATRR	ALGEFLIPGL	AAIVLPLITG	LLL.GWNALAGLI
<i>A. acetabulum</i>	SKCVEISTKA	SIREMVLPLG	IAVLTPVVIG	F.A GGAEMLGGLL
<i>Chara corallina</i>	KRCVEISTDA	SLREMIPPGC	LVMLTPLVVG	GLL.GKETLAGIL
<i>Cucurbita moschata</i>	ATCVKISTDA	SIKEMIPPGA	LVMLTPLIVG	ILF.GVETLSGVL
<i>Vigna radiata</i>	ATCVKISTDA	SIKEMIPPGA	LVMLTPLVVG	ILF.GVETLSGVL
<i>Nicotiana tabacum</i>	ATCVKISTDA	SIKEMIPPGA	LVMLTPLIVG	IFF.GVETLSGVL
<i>Hordeum vulgare</i>	ATCVKISTDA	SIKEMIPPGA	LVMLTPLIVG	TLF.GVETLSGVL
<i>Oryza sativa</i>	ATCVKISTDA	SIKEMIPPGA	LVMLSPLIVG	IFF.GVETLSGVL
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATCVKISTDA	SIKEMIPPGA	LVMLTPLIVG	FFF.GVETLSGVL
<i>Beta vulgaris</i>	ATCVKISTDA	SIKEMIPPGA	LVMLTPLIVG	IFF.GVETLSGVL
consenso	-----	-P-	-----	-P-

	801			850	
<i>R. palustris</i>	MGTIVTGIFV	GISMCTGGGA	WDNAKKLIEE	GFTDANGVLH	KKGSEAHKAA
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	LGSVIVTGLFV	AISMTAGGGA	WDNAKKYIED	GHYGG.KGSEAHKAA
<i>Thermotoga maritima</i>	IGTVLSGAML	AILTANSOGGA	WDNAKKYLEA	GNLEGYG.KGSEPHKAL
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	MGAIVAGVPR	ALLMANAGGA	WDNAKKYIE.	IQQ	LKKTEMHKAA
<i>A. acetabulum</i>	AGVTVSGVLM	AI FOSNSOGGA	WDNAKKMFEE	G. VEIDGQMH	YKGSDAHKAA
<i>Chara corallina</i>	AGALVSGVQI	AISASNTGGA	WDNAKKYIEA	GNDHARTLG	PKGSDCHKAA
<i>Cucurbita moschata</i>	AGSLVSGVQI	AISASNTGGA	WDNAKKYIEA	GASKHARTLG	PKGSDPHKAA
<i>Vigna radiata</i>	AGSLVSGVQI	AISASNTGGA	WDNAKKYIEA	GASEHARSLG	PKGSDCHKAA
<i>Nicotiana tabacum</i>	AGALVSGVQI	AISASNTGGA	WDNAKKYIEA	GASEHARTLG	PKGSEPHKAA
<i>Hordeum vulgare</i>	AGALVSGVQI	AISASNTGGA	WDNAKKYIEA	GNSEHARSLG	PKGSDCHKAA
<i>Oryza sativa</i>	AGALVSGVQI	AISASNTGGA	WDNAKKYIEA	GASEHARTLG	PKGSDCHKAA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AGSLVSGVQI	AISASNTGGA	WDNAKKYIEA	GVSEHAKSLG	PKGSEPHKAA
<i>Beta vulgaris</i>	AGSLVSGVQI	AISASNTGGA	WDNAKKYIEA	GASEHARSLG	PKGSEPHKAA
consenso	-G-----G-	-----	GGA WDNAKK--E-	-----	-K----HKA-

	851			900	
<i>R. palustris</i>	<u>VTGDTVGD</u> <u>DPY</u>	<u>KDTAGPAVNP</u>	<u>LIKI</u> INIVAL	LIVPLLPLAS	NPVKASHAEP
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	VTGDTVGD <u>DPY</u>	KDTAGPAVNP	MIKITNIVAL	LLLAVLAVH--	-----
<i>Thermotoga maritima</i>	VIGDTVGD <u>PL</u>	KDTVGP <u>SLDI</u>	LIKIMSVSVV	IAVSIKHHVH	LF-----
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	VIGDTVGD <u>PM</u>	KDTVGP <u>SLNP</u>	LIKVNLTVSV	VFTYVIVSTN	IALGIWPSGL
<i>A. acetabulum</i>	VVGDTVGD <u>DPF</u>	KDTSGP <u>SPNI</u>	LIKLMSVVAL	VIAPFLD.QS	TKNTLQVLEP
<i>Chara corallina</i>	VIGDTVGD <u>PL</u>	KDTSGP <u>SLNI</u>	LIKLMAVESL	VFAPFFKTYG	GVLFVLWDFK
<i>Cucurbita moschata</i>	VIGDTIGD <u>PL</u>	KDTSGP <u>SLNI</u>	LIKLMAVESL	VFAPFFASHG	GLLFKIF---
<i>Vigna radiata</i>	VIGDTIGD <u>PL</u>	KDTSGP <u>SLNI</u>	LIKLMAVESL	VFAPFFATHG	GLLFKIF---
<i>Nicotiana tabacum</i>	VIGDTIGD <u>PL</u>	KDTSGP <u>SLNI</u>	LIKLMAVESL	VFAPFFATHG	GILFKIF---
<i>Hordeum vulgare</i>	VIGDTIGD <u>PL</u>	KDTSGP <u>SLNI</u>	LIKLMAVESL	VFAPFFATYG	GLLFKIF---
<i>Oryza sativa</i>	VIGDTIGD <u>PL</u>	KDTSGP <u>SLNI</u>	LIKLMAVESL	VFAPFFATHG	GILFKYF---
<i>Arabidopsis thaliana</i>	VIGDTIGD <u>PL</u>	KDTSGP <u>SLNI</u>	LIKLMAVESL	VFAPFFATHG	GILFKYF---
<i>Beta vulgaris</i>	VIGDTIGD <u>PL</u>	KDTSGP <u>SLNI</u>	LIKLMAVESL	VFAPFFATHG	GLLFKLF---
consenso	<u>V-GDT-GDP-</u>	<u>KDT-GP----</u>	<u>--K-</u>	-----	-----

	901		928
<i>R. palustris</i>	APMVQPAETA	PAMPAAPMAE	PSAPAASQ
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>Thermotoga maritima</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	LPF~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>A. acetabulum</i>	HRHIGGAFLL	DVRPHSKI~	~~~~~
<i>Chara corallina</i>	VAGKY~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>Cucurbita moschata</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>Vigna radiata</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>Nicotiana tabacum</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>Hordeum vulgare</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>Oryza sativa</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>Arabidopsis thaliana</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>Beta vulgaris</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~
consenso	-----	-----	-----

Fig 18. Alineamiento múltiple de las secuencias de H'PPasas. Se marcan los segmentos conservados con un recuadro. (*A. acetabulum* = *Acetabularia acetabulum*).

Determinación del perfil de hidropatía y topología transmembranal de la H⁺PPasa de *R. palustris* .

Se utilizó el programa TopPredII, el cual ha demostrado ser eficiente en la predicción de cruces transmembranales de proteínas bacterianas (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>). Este programa emplea la escala de Engelman-Goldman (Engelman *et al*, 1986) y una ventana de 19 aminoácidos.

La Fig. 19 muestra los dos perfiles de hidropatía arrojados por el programa para la H⁺PPasa de *R. palustris*, correspondientes a las isoformas A y B de la proteína, dependiendo si se incluye el primero o segundo codón de inicio. En términos generales los patrones son clásicos para proteínas con una alta hidrofobicidad y muy parecidos a los reportados para las H⁺PPasas de plantas (Maeshima, 2000) y al de *R. rubrum* (Baltscheffsky *et al*, 1998).

Con base en los perfiles de hidropatía se realizaron modelos topológicos. Para la isoforma A (Fig. 20) se tienen 15 cruces transmembranales (uno de ellos putativo), mientras que para la isoforma B (Fig. 21), el programa propone un cruce menos. Esto resulta interesante ya que en el gen homólogo de *R. rubrum* se tiene una situación similar, aunque en este caso tampoco se ha determinado el inicio de la proteína.

Estudiar la posible relevancia funcional o fisiológica de estos codones de inicio alternos, así como la existencia de isoformas de la enzima podrían proporcionar información relevante acerca de la regulación a nivel genético de estas enzimas en las bacterias fotosintéticas.

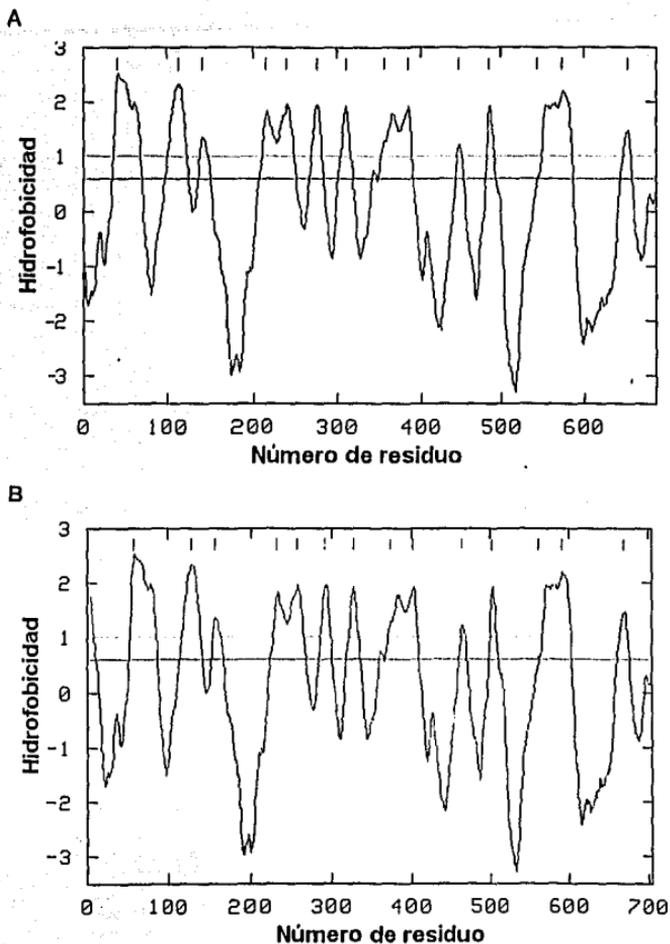
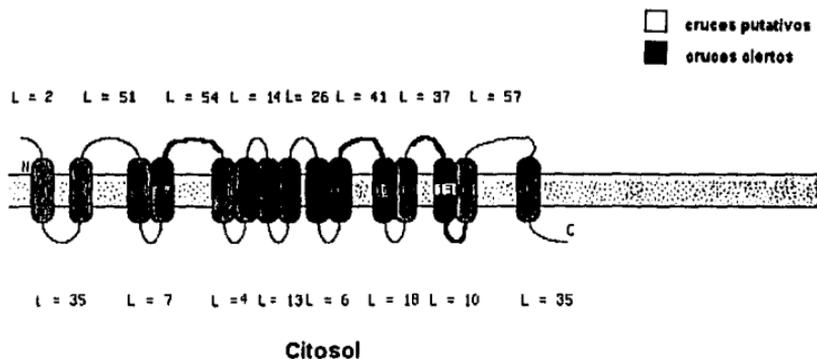


Fig 19. Perfiles de hidropatía de la H⁺PPasa de *R. palustris* obtenidos mediante el programa TopPredII. A. Perfil de a la proteína incluyendo el primer codón de inicio (Isoforma A). B., Perfil de la proteína sin los primeros 17 aminoácidos, es decir, a partir del segundo codón de inicio (isoforma B). Líneas horizontales (mínimo y máximo valor de corte para considerar un cruce transmembranal); se indica cada cruce posible con una línea vertical.

A



B

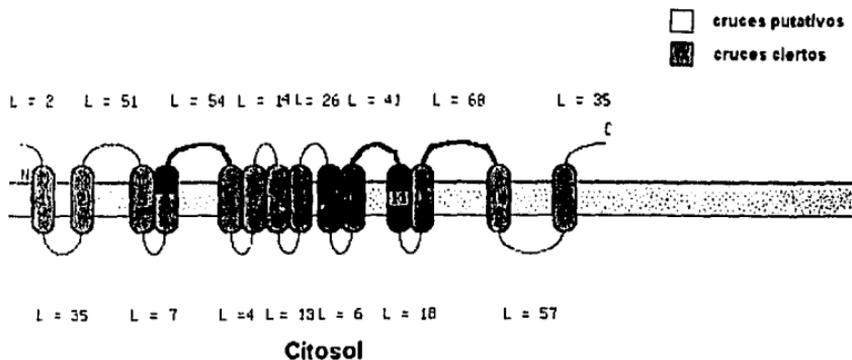


Fig 20. Modelos Topológicos de la Isoforma A de la H⁺PPasa de *R. palustris*. El programa arrojó 2 modelos posibles, cuyas diferencias son la presencia (A) o ausencia (B) de el treceavo cruce (en blanco) y la orientación de los extremos carboxilo y amino terminales. Se indica la longitud de cada asa (L) y se marcan en negro los segmentos conservados.

A

□ cruces putativos
 ■ cruces ciertos

L = 51 L = 54 L = 14 L = 26 L = 41 L = 37 L = 57



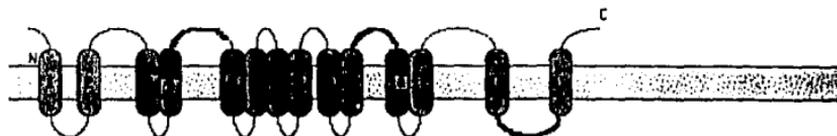
L = 41 L = 7 L = 4 L = 13 L = 6 L = 18 L = 10 L = 35

Citosol

B

□ cruces putativos
 ■ cruces ciertos

L = 2 L = 51 L = 54 L = 14 L = 26 L = 41 L = 68 L = 35



L = 35 L = 7 L = 4 L = 13 L = 6 L = 18 L = 57

Citosol

Fig 21. Modelos Topológicos de la Isoforma B de la H⁺PPase de *R. palustris*. A diferencia de los modelos presentados en la figura anterior esta isoforma carece del primer cruce transmembranal y al igual que en la figura anterior, el programa arroja 2 modelos posibles, cuyas diferencias también son la presencia (A) o ausencia (B) de un cruce (el doceavo, equivalente a el treceavo de la figura anterior) y la orientación de los extremos carboxilo y amino terminales. Se indica la longitud de cada asa (L) y se marcan en negro los segmentos conservados.

4.3. INTRODUCCIÓN DEL GEN DE LA H⁺PPasa DE *R. palustris* EN LA BACTERIA FOTOSINTÉTICA *R. sphaeroides*.

Como se describió en la sección 4.1.7., es muy difícil la obtención de membranas selladas de *R. palustris*, así que, ahora que contábamos con el gen, se decidió introducirlo en *R. sphaeroides* (que carece de H⁺PPasa, y posee un sistema membranal de tipo vesicular que permite la obtención de membranas selladas), con el objeto de poder medir la síntesis de PPI por la H⁺PPasa de *R. palustris* en un sistema heterólogo.

En primer lugar se introdujo el fragmento de 5,000 pb que contiene al gen en el plásmido pBBR1MCS-5 (vector de amplio rango, Kovach, *et al* 1995), posteriormente se transformó en *E. coli* S17 (Cepa especial para conjugación) y se conjugó con *R. sphaeroides* 2.4.1. Se seleccionaron cinco colonias resistentes a gentamicina (resistencia que da el plásmido) y se crecieron fotosintéticamente para obtener cromatóforos. Las cinco clonas presentaron una actividad hidrolítica de PPI semejante, mientras que la cepa silvestre no. Esta actividad fue inhibida por NaF de manera similar a como sucede en los cromatóforos de *R. palustris* y no se detectó hidrólisis con p-nitrofenilfosfato, indicando que la actividad determinada se debía a la H⁺PPasa de *R. palustris* y no a alguna fosfatasa inespecífica (resultados no mostrados).

4.3.1. Desacoplamiento y síntesis de PPI en cromatóforos de las bacterias transgénicas.

A continuación se procedió a medir el desacoplamiento por CCCP. Como se puede apreciar en la Fig. 22, la actividad específica de los cromatóforos de las clonas transgénicas es en promedio de 22.8 nmoles Pi min⁻¹ mg proteína⁻¹, la cual es del 22% de la actividad de los cromatóforos de *R. palustris*, sin embargo, el porcentaje de activación de la hidrólisis obtenido es considerable (58% en promedio). Es importante hacer notar que esta activación se obtuvo sin necesidad de preincubar a las membranas. Resultados similares se presentan utilizando otras concentraciones de CCCP (datos no mostrados).

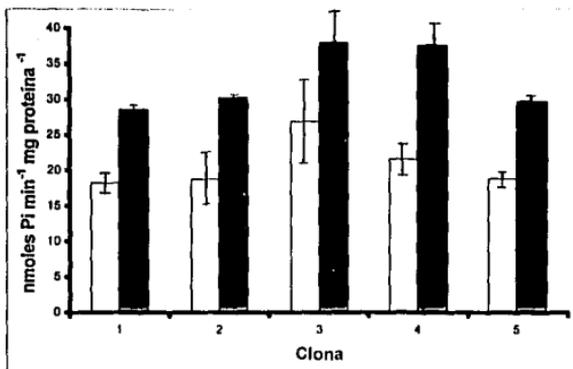
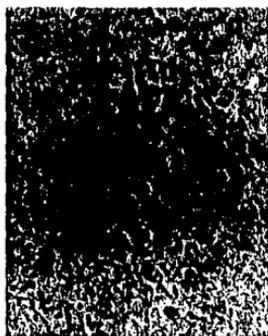


Fig. 22. Activación de la Hidrólisis de PPI por CCCP en cromatóforos de *R. sphaeroides* transformadas con el gen de la H⁺PPasa de *R. palustris*. Las condiciones del ensayo fueron Glicilglicina 50 mM pH 7.4, PPI_{Na} 0.5 mM MgCl₂ 1mM y 0.4 mg de proteína. Barras claras: actividad control. Barras cuadrículadas: adicionando 1 μM de CCCP. Tiempo de Incubación 15 min a 30° C. Se muestra el promedio y las desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos.

Esta estimulación con el protonóforo sugiere que a diferencia de lo ocurrido en las membranas de *R. palustris*, estas membranas sí se encontraban selladas. Este hecho se confirmó mediante micrografías electrónicas (Fig.23) obtenidas de las membranas fotosintéticas de *R. palustris* y de la clona 4 de *R. sphaeroides*, las cuales, como puede observarse son vesículas cerradas en su mayoría.

A



B



Fig. 23. Fotografías de microscopía electrónica de los cromatóforos. A) *Rhodospseudomonas palustris* cepa silvestre y B) *Rhodobacter sphaeroides* clona 4 con la incorporación de la H⁺PPasa de *R. palustris*. Ambas obtenidas a 20,000 aumentos.

El siguiente paso fue tratar de determinar si estas quimeras podían ser capaces de síntesis de PPI. La Tabla 9, muestra que la actividad sintética de los cromatóforos de la clona 4 de *R. sphaeroides* es baja, sin embargo, se estimula en un 50% con la adición de succinato (el cual funciona donando electrones a la cadena fotosintética) y en un poco más de 100% en presencia de oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa).

Tabla 9 Síntesis de PPI en Cromatóforos de *R. sphaeroides* con el gen de la H⁺PPasa de *R. palustris*.

Condición	nmoles de PPI / ml
Control	10
+ Succinato (0.1 mM)	15
+Oligomicina (10 µg/ml)	21.9

Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos, se utilizaron 5 mg de proteína y se incubó la reacción 30 min a 30° C.

5. DISCUSIÓN.

La gran plasticidad metabólica de las bacterias púrpuras no sulfurosas las hace un objeto de estudio interesante, tanto desde el punto de vista bioquímico, como el fisiológico para tratar de entender como utilizan esta plasticidad en su forma de vida y supervivencia.

Anteriormente se pensaba que la presencia de la H⁺PPasa de membrana estaba restringida a unas cuantas bacterias fotosintéticas y tonoplastos de plantas, pero recientemente se ha encontrado que diversos grupos de bacterias aparentemente poco relacionados entre sí, también poseen esta clase de PPasas, por lo que su distribución parece ser más amplia que la que se suponía.

Es importante la utilización de modelos alternos en el estudio de las enzimas, ya que permite conocer las características generales de éstas. En el caso de las H⁺PPasas de bacterias fotosintéticas solo se ha estudiado detalladamente la enzima de *R. rubrum*, a la cual se le han caracterizado las actividades de hidrólisis y síntesis de PPI. Sin embargo, existen otras bacterias fotosintéticas que poseen PPasa de membrana las cuales aun no han sido estudiadas, esta falta de información motivó la realización de este trabajo, que consistió en caracterizar tanto bioquímica como molecularmente a la PPasa de la bacteria fotosintética *Rhodospseudomonas palustris*. Aunque todavía quedan detalles por explorar, este trabajo contribuye y aporta a la información que se tiene acerca de estas proteínas.

Las características generales de la H⁺PPasa de *R. palustris* obtenidas en este trabajo muestran que es una PPasa membranal típica. En cuanto a sus características moleculares, la secuencia del gen y el de la proteína que codifica son muy semejantes a las de las PPasas membranales de plantas y en especial a la de la bacteria fotosintética *R. rubrum* (el único gen de bacteria fotosintética con el que se cuenta al momento). La identidad entre la secuencia de aminoácidos de la H⁺PPasa de *R. palustris* y la de *R. rubrum* es alta (65%), mientras que su similitud con las H⁺PPasas de plantas y algas es del mismo orden que la similitud de éstas enzimas con la H⁺PPasa de *R. rubrum* (alrededor del 40%). Al igual que todas las PPasas de membrana se identifican 3 segmentos conservados, lo que confirma la importancia de

éstos en la función de la enzima. La obtención del gen de *R. palustris* permitirá, a medida que se sigan obteniendo más secuencias de bacterias fotosintéticas y otras bacterias, hacer estudios filogenéticos y evolutivos más confiables.

En cuanto a sus características bioquímicas, también encontramos semejanzas con las otras H⁺PPasas, principalmente en la especificidad de sustrato, pH óptimo y en términos generales en la respuesta a inhibidores y activadores.

Otro hecho interesante es que esta H⁺PPasa, al igual que la de *R. rubrum*, es capaz de hidrolizar el complejo Zn-PPi (tan buen sustrato como el Mg-PPi), con una dependencia de pH similar, con un máximo alrededor de pH 5.5. Desafortunadamente aun no existen reportes donde se haya evaluado la hidrólisis de este complejo por parte de la PPasas vacuolares, ni las de otras bacterias, por lo que no es posible determinar aún si esta es una característica general de todas las PPasas o es exclusiva de las H⁺PPasas de bacterias fotosintéticas.

Sin embargo, la H⁺PPasa de *R. palustris* muestra algunas diferencias interesantes, tales como la cinética de hidrólisis del complejo Mg-PPi. En *R. rubrum*, la cinética de la H⁺PPasa es de tipo Michaeliano en presencia de Mg²⁺ libre desde 0.03 hasta 1 mM (Sosa *et al*, 1992), en cambio, en *R. palustris* la cinética es siempre sigmoideal. Este comportamiento sigmoideal se ha asociado a los sitios regulatorios no catalíticos que presentan algunas PPasas (Cooperman, 1992), que deben ocuparse antes que el sustrato pueda unirse al sitio catalítico, como sería el caso del Mg²⁺.

Otra diferencia importante es la alta E_a que presenta la H⁺PPasa de *R. palustris* (62.7 kJ/mol) comparada con la de la enzima de *R. rubrum* (45 kJ/mol). Aparentemente la enzima de *R. palustris* requiere más energía para realizar su función y efectivamente es más lenta que la de *R. rubrum* (Romero y Celis, 1995). Estas diferencias podrían indicar variaciones en el mecanismo catalítico entre las dos enzimas, o en la accesibilidad del sustrato.

La actividad máxima de hidrólisis de PPI en cromatóforos de *R. palustris* que se logró fue de ~100 nmoles Pi min⁻¹ mg proteína⁻¹ y no pudo ser estimulada por desacoplantes. Tomando en cuenta que los cromatóforos no se encontraban sellados, se puede especular que no es posible obtener actividades mayores. Esta actividad es relativamente baja comparada con las de las H⁺PPasas vacuolares, que va desde 150

hasta 780 nmoles Pi min⁻¹ mg proteína⁻¹ (Maeshima, 2000) y comparada con la de *R. rubrum* que es 337.5 nmoles Pi min⁻¹ mg proteína⁻¹ en cromatóforos desacoplados (Romero y Cells, 1995).

En cuanto a la actividad sintética se pudo demostrar que la H⁺PPasa de *R. palustris* es al menos capaz de sintetizar PPi cuando está expresada en *Rhodobacter sphaeroides*, lo que hubiera sido muy difícil de lograr en cromatóforos de *R. palustris*. Sin embargo, la caracterización de la actividad sintética no pudo llevarse a cabo en este sistema debido a la baja actividad de la enzima (Sección 4.3.1.). Considerando que el vector pBBR1MCS-5 utilizado en la clonación, es de bajo número de copias y que el único promotor con el que cuenta es el de la propia H⁺PPasa, es muy probable que haya una baja expresión de esta proteína en *R. sphaeroides* y por ende baja actividad. Otro factor que podría influir sería que el promotor que viene con el gen no sea muy fuerte y no funcione adecuadamente en *R. sphaeroides*, este sistema podría ser mejorado utilizando un vector con un mayor número de copias y/o clonando el gen bajo un promotor fuerte.

Por otra parte, Nore, *et al* (1990) reportaron la síntesis de PPi en cromatóforos de *R. rubrum* y de *R. viridis*. En *R. rubrum*, la actividad es un orden de magnitud mayor y los autores proponen que se debe a que las membranas intracitoplásmicas de *R. viridis* son planas y son incompatibles con la formación de vesículas selladas, correlacionándolo con la baja estimulación de la hidrólisis de PPi y de ATP por desacoplantes y con la baja capacidad de síntesis de ATP (2 ordenes de magnitud menor que la de *R. rubrum*). Así pues, el uso de sistemas heterólogos como el ensayado en este trabajo podrían ser una buena alternativa para medir la síntesis de PPi de H⁺PPasas de bacterias cuyas membranas no formen cromatóforos.

Un aspecto interesante de la síntesis de PPi en bacterias fotosintéticas es si esta actividad se lleva a cabo *in vivo* o bien es solo una consecuencia de la reversibilidad de la reacción hidrolítica. A pesar de que la de H⁺PPasa de *R. rubrum* está bien caracterizada tanto bioquímica como molecularmente, poco se sabe acerca de su importancia y de su papel en el metabolismo de las bacterias fotosintéticas. Se ha postulado la hipótesis de que esta enzima funciona en *R. rubrum* como una bomba que genera un gradiente protonmotriz suficiente para la supervivencia de la bacteria en

condiciones de baja energía. En condiciones de alta energía la H⁺PPasa sintetizaría PPi, el cual se almacenaría en forma de gránulos de PPi que podrían ser hidrolizados en condiciones de baja energía, para formar un gradiente de H⁺ que la célula utilizaría y que le permitiría utilizar el ATP en otras funciones (Nyrén y Strid, 1991).

Se sabe que las H⁺PPasa vacuolares de plantas se utilizan para acidificar el interior de estas vesículas a expensas de la hidrólisis del PPi que se encuentra en el citosol y que su expresión y actividad se ven aumentadas en condiciones tales como el crecimiento activo (hipocotilos). Se presume que debido a la alta tasa de biosíntesis, las concentraciones de PPi intracelular se ven elevadas, es en esta condición donde la actividad de la H⁺PPasa supera a la de la V-ATPasa, para después igualarse en condiciones donde el crecimiento se torna más lento (plantas maduras). Asimismo, en condiciones de estrés tales como la baja temperatura y la anoxia (situaciones en las que la disponibilidad de ATP se ve reducida), la actividad y la expresión de la H⁺PPasa vacuolar se ven aumentadas para poder conservar la función de acidificación de las vacuolas gastando la menor cantidad de ATP posible. Análogamente, la H⁺PPasa bacteriana podría ser importante en situaciones donde la disponibilidad de ATP se viera restringida.

En la actualidad, gracias al conocimiento de la secuencias del gen de *R. rubrum* y ahora el de *R. palustris*, es posible hacer estudios de expresión correlacionados con la actividad de la enzima en diferentes condiciones de crecimiento. Por ejemplo, esta enzima se encuentra en membranas de *R. rubrum* crecidas aeróbicamente en la oscuridad (Romero *et al*, 1991) y en este trabajo también se determinó su presencia en membranas respiratorias de *R. palustris* (datos no mostrados) por lo cual ésta sería una condición de estudio futuro. Por otra parte, el desarrollo de mutantes sin H⁺PPasa serviría para evaluar las consecuencias fenotípicas de la pérdida de esta enzima.

Un hecho interesante es el que dentro de la familia de la bacterias púrpuras no sulfurosas existen especies que poseen H⁺PPasa (*R. viridis*, *R. rubrum* y *R. palustris*) así como especies que no la tienen (*R. sphaeroides*, *R. capsulatus*, *R. blastica*, etc). Recientemente se ha descubierto que aquellas con H⁺PPasa tienen una PPasa citoplásmica clase A, mientras que las que no poseen H⁺PPasa tienen a su vez PPasa citoplásmica clase C (Celis y Romero, datos en prensa). Estas diferencias podrían estar

vinculadas a la regulación diferencial *in vivo* de estas enzimas en las bacterias. Un hecho que podría apoyar esta idea es que las PPasas de clase A de estas bacterias son inhibidas por intermediarios del Ciclo de Calvin como el 3-fosfoglicerato, mientras que las Clase C son insensibles a este intermediario. Una posible explicación es que las PPasas citoplásmicas de las bacterias con H^+PPasa están reguladas negativamente para evitar el ciclo fútil que se presentaría si la PPasa de membrana estuviera sintetizando PPI, el cual sería hidrolizado por la PPasa citoplásmica. Inhibiendo a la PPasa citoplásmica se aseguraría que una fracción del PPI producido en las reacciones biosintéticas fuera aprovechado. Alternativamente, si las dos enzimas funcionaran hidrolíticamente, el PPI hidrolizado por la H^+PPasa tendría la utilidad de ser usado para generar gradiente de H^+ . Sin embargo, todas estas son especulaciones, aun hacen falta muchos estudios para determinar la importancia fisiológica de estas dos enzimas.

Una utilidad adicional de las clonas transgénicas de *R. sphaeroides* que tienen la H^+PPasa de *R. palustris* sería estudiar el efecto de esta enzima en bacterias que naturalmente no la tienen. Igualmente interesante sería introducir una PPasa citoplásmica clase C (de las especies sin membranal) a alguna especie con H^+PPasa y tratar de suprimirle su propia PPasa citoplásmica, para posteriormente caracterizar esta quimera.

5. CONCLUSIONES.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, las conclusiones son:

En sus características bioquímicas, la H⁺PPasa de *Rhodospseudomonas palustris*:

1) Es específica para la hidrólisis del sustrato catión-PPI; en el siguiente orden de selectividad: $Mg^{2+} > Zn^{2+} = Co^{2+}$. El Ca-PPI no es sustrato.

2) El Mg^{2+} es el único catión activador en su forma libre, mientras que el Zn^{2+} y el Co^{2+} son inhibidores en su forma libre.

3) La cinética de la hidrólisis de Mg-PPI es de tipo sigmoideal, presentando una actividad máxima de alrededor de 85 nmoles de $PI \text{ min}^{-1} \text{ mg}$ de proteína⁻¹. La cinética con Mg^{2+} libre conserva la cinética sigmoideal y a partir de 0.5 mM la actividad decrece en función de la concentración de sustrato.

4) El pH óptimo para hidrólisis de Mg-PPI esta entre 6.5 y 7.0.

5) El máximo de actividad con Zn como sustrato a pH 5.8 es comparable con la máxima actividad obtenida con Mg a pH 7.0.

6) La H⁺PPasa de *R. palustris* es sensible a NaF, DCCD y análogos de sustrato (IDP y MDP). La hidrólisis del complejo Mg-PPI es independiente de la presencia de K⁺.

7) Los desacoplantes, como el CCCP, tienen un pobre efecto sobre la actividad hidrolítica de PPI debido a que las membranas que se obtienen no están selladas.

8) El gráfico de Arrhenius no presenta quiebres y la E_a para la hidrólisis es de $62.7 \pm 2.63 \text{ kJ/mol}$.

En cuanto a la caracterización molecular encontramos que:

9) El gen está compuesto por 2,178 pb, su contenido de G+C es de 69%, presenta 2 posibles codones de inicio con sus 2 respectivas regiones de unión al ribosoma, una región terminadora de la traducción tipo rho independiente además de regiones putativas -35 y -10.

10) La proteína tiene 725 aminoácidos y una masa molecular calculado de 73.7 kDa en el caso de que se inicie en el primer codón, mientras que sería de 708

aminoácidos con un peso de 72 kDa si inicia en le segundo; su punto isoelectrico teórico es de 5,75. Presenta un 64% de identidad con la H⁺PPasa de *R. rubrum* y alrededor de un 40% de identidad con las H⁺PPasas de bacterias, algas y plantas.

11) Muestra un perfil de hidropatía clásico para proteínas con una alta hidrofobicidad, presentando de 13 a 15 cruces transmembrales.

12) La H⁺PPasa se puede expresar en *R. sphaeroides* aunque presenta una actividad hidrolítica más baja (20% del total), pero se estimula 58% con protonóforos, ya que estas membranas si están selladas. Esta enzima expresada en cromatóforos de *R. sphaeroides* es al menos capaz de sintetizar PPI y se ve estimulada con la adición de succinato y oligomicina, sin embargo la actividad sintética en este sistema heterólogo es baja.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Baccarini, A; Melandri, B.A. (1978) Coupling Factors, en: R.K. Clayton, W.R. Sistrom (Eds.), The Photosynthetic Bacteria, Plenum Press, New York and London, pp 615-628.
- Baltscheffsky, H. y von Stedingk, L. V. (1966) Bacterial photophosphorylation in the absence of added nucleotide. A second intermediate stage of energy transfer in light-induced formation of ATP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 22: 722-728.
- Baltscheffsky, M. (1967) Inorganic pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. Nature (London). 216: 241-243.
- Baltscheffsky, M. (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) Reversed energy conversion reaction of bacterial photophosphorylation. Arch. Biochem. Biophys. 133: 46-53.
- Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H. y Boork, J. (1982) Evolutionary and mechanistic aspects on coupling and phosphorylation in photosynthetic bacteria. En: Electron transport and photophosphorylation. Topics in Photosynthesis. Vol. 4 (Ed. Barber, J.) Cap. 7, pp.249-272. Elsevier Biomedical Press., Amsterdam, New York, Oxford.
- Baltscheffsky, M. y Nyrén, P. (1984) The synthesis and utilization of inorganic pyrophosphate. En: Bioenergetics (Ed. L. Ernster) pp 187-206, Elsevier, Amsterdam.
- Baltscheffsky, M; Nadanaciva, S y Shultz, A. (1998) A pyrophosphate synthase gene: molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*. Biochim. Biophys. Acta. 1364: 301-306.
- Baltscheffsky, M; Shultz, A; Baltscheffsky, H. (1999) H⁺-proton-pumping inorganic pyrophosphatase: a tightly membrane-bound family. FEBS Lett. 452:121-127.
- Boyer, P. D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E. y Slater, E. C. (1977) Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Ann. Rev. Biochem. 46: 955-1026.
- Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase a splendid molecular machine. Annu. Rev. Biochem. 66: 717-749.
- Bradford; M.M. (1976) A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein -dye binding. Anal. Biochem; 72, 248.
- Celis, H., Romero, I. y Gómez-Puyou, A. (1985) The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: Effects of Mg²⁺, phosphate and pyrophosphate. Arch. Biochem. Biophys. 236: 767-774.

- Celis, H. y Romero, I. (1987) The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: Effects of pH and divalent cations. *J. Bioenerg. Biomembr.* 19: 255-272.
- Celis, H., Escobedo, S. y Romero, I. (1998) Triphenyltin as an inhibitor of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 358: 157-163.
- Chen, J; Brevet, A; Fromat, M; Leveque, F; Schmitter, JM; Blanquet, S y Plateau; P (1990) Pyrophosphatase is essential for growth in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 5686-5689.
- Coopernan, B.S; Baykov, A y Lahti, R (1992) Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends. Biochem. Sci.* 17: 262-266.
- Cohen-Bazire, G; Sistrom, W.R. y Stainer, R.Y. (1957) The kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.* 49: 25-68.
- Cullen, PJ; Kaufman, CK; Browman, WC y Kranz, RG. (1997) Characterization of the *Rhodobacter capsulatus* housekeeping RNA polymerase. In vitro transcription of photosynthesis and other genes. *J. Biol. Chem.* 272 (43): 27266-73.
- Drozdowicz, Y; Lu, Y; Patel, V; Fitz-Gibbon, S; Miller, J y Rea, A. (1999) A thermostable vacuolar-type membrane pyrophosphatase from the archeon *Pyrobaculum aerophilum*: implications for the origins of pyrophosphate-energized pumps. *FEBS. Lett.* 460: 505-512.
- Edwards, G. E., Nakamoto, H., Burnell, J. N. y Hatch, M. D. (1985) Pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C_4 Photosynthesis: Properties and mechanism of light dark regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 255-286.
- Engelman, D.M., Steitz, T.A. y Goldman, A. (1986) Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15: 321-353
- Evans, H. J. y Wood, H. G. (1968) The mechanism of the pyruvate, phosphate dikinase reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61: 1441-1453.
- Floodgard, H. y Fleron, P. (1974) Thermodynamic parameters for the hydrolysis of inorganic pyrophosphate pH 7.4 as a function $[Mg^{2+}]$, $[K^+]$ and ionic strength determined from equilibrium studies of the reaction. *J. Biol. Chem.* 249: 3464-3465.
- Futai, M., Noumi, T. y Maed, M. (1989) ATP synthase (H^+ -ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 111-136.
- Guillory, R. J. y Fisher, R. R. (1972) Studies on the light dependent synthesis of inorganic pyrophosphate by *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochem. J.* 129: 471-481.
- Hatch, M. D. y Slack, C. R. (1968) A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C_4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem. J.* 106: 141-146.
- Harvey, G. W. y Keister, D. L. (1981) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria: $P_i = HOH$ oxygen exchange catalyzed by membrane-bound inorganic

- pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Biochem. Biophys. 208: 426-430.
- Helkinheimo, P; Pohjanjoki, P; Helminen, A; Tasanen, M; Cooperman, B.S.; Goldman, A; Baykov, A; Lahti, R. (1996) A site-directed mutagenesis study of *Saccharomyces cerevisiae* pyrophosphatase Functional conservation of the active site soluble inorganic pyrophosphatases. Eur. J. Biochem. 239, 138-143.
 - Hutner, S.H. (1950) Anaerobic and aerobic growth of purple bacteria (Athiorhodaceae) in chemically defined media. J. Gen. Microbiol. 4:286-293.
 - Jiang, S; Fan, S; Yang, S y Kuo, S. (1997) Purification and Characterization of Thylakoid Membrane-Bound Inorganic Pyrophosphatase from *Spinacia oleracea* L. Arch. Biochem. Biophys. 346: 105-112.
 - Keister, D. L. y Yike, N. J. (1967a) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. I. Succinate-linked ATP-driven NAD⁺ reduction by *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. Arch. Biochem. Biophys. 121: 415-422.
 - Keister, D. L. y Yike, N. J. (1967b) Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. II. The energy-dependent reduction of oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide in chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*. Biochemistry 6: 3847-3857.
 - Keister, D. L. y Minton, N. L. (1971) ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42: 932-939.
 - Kelljens, J. T., van Erp, R., Mooijart, R. J., van der Drift, Ch. y Vogels, G. D. (1988) Inorganic pyrophosphate synthesis during methanogenesis from methylcoenzyme M by cell-free extracts of *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain AH). Eur. J. Biochem. 172: 471-476.
 - Kornberg, A. (1957) Pyrophosphorylases and phosphorylases in biosynthetic reactions, en Advances in Enzymology Vol. 18 (Ed. F. F. Nord) pp. 191-240. Interscience, Nueva York.
 - Kovach, M; Elzer, P H; Hill, S; Robertson, G; Farris, M; Roop, R M y Peterson, K. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166: 174-176.
 - Kramer, R. (1985) Characterization of pyrophosphate exchange by the reconstituted adenine nucleotide translocator from mitochondria. Biochim. Biophys. Res. Commun. 127: 129-135.
 - Lahti, R. (1983) Microbial inorganic pyrophosphatases. Microbiol. Rev. 47: 169-179.
 - Lawson, J. W. R. y Veech, R. L. (1979) Effects of pH and free Mg²⁺ on the Keq of the creatine kinase reaction and other phosphate hydrolysis and phosphate transfer reactions. J. Biol. Chem. 254: 6528-6537.
 - Lipmann, F. (1965) The origin of prebiological systems, p. 259, Academic, Nueva York y Londres.
 - Lowry, O.H; Rosebrough, N.J; Farr, A.L. y Randal, R.J. (1951) protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
 - Lundin, M; Baltscheffsky, H y Ronne. (1991) Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. J. Biol.Chem. 266: 12168-12172.

- Maeshima, M (2000) Review: Vacuolar H⁺ - pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 37-51.
- Mansurova, S. E., Shakhov, Yu. A. y Kulaev, I. S. (1975) Synthesis of inorganic pyrophosphate by animal tissue mitochondria. *FEBS Lett.* 55: 94-98.
- Matthews, P. M., Williams, S. R., Seymour, A. M., Schwartz, A., Dube, G., Gadian, D. G. y Radda, G. K. (1982) A ³¹P-NMR study of some metabolic and functional effects of the inotropipinefrine and ouabain, and the ionophore RO-2985 (X537A) in the isolated perfused rat heart. *Biochim. Biophys. Acta* 720: 163-171.
- McLaughlin, J y Aley, S (1985) The Biochemistry and Functional Morphology of the *Entamoeba*. *The Journal of Protozoology.* 32: 221-240.
- Meyer, W y Schafer, G. (1992) Characterization and purification of a membrane-bound archaeobacterial pyrophosphatase from *Sulfolobus acidocaldarius* Eur. J. Biochem. 207: 741-746.
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by the chemiosmotic type mechanism. *Nature* 191: 144-148.
- Mitchell, P. (1967) Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: Natural fuel cells and solar cells. *Fed. Proc.* 26: 1370-1379.
- Miller, S. L. y Parris, M. (1964) Synthesis of pyrophosphate under primitive earth conditions. *Nature* 204: 1248-1250.
- Moyle, J., Mitchell, R. y Mitchell, P. (1972) Proton-translocating pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett.* 23: 233-236.
- Nicholls, D. G. (1982) *Bioenergetics*. Academic Press, Nueva York. pp. 1-22.
- Nishikawa, K., Hosi, K., Suzuki, J., Yoshimura, S. y Horio, T. (1973) Formation and decomposition of pyrophosphate related to bacterial photophosphorylation. *J. Biochem.* 73: 537-553.
- Nore, B; Nyrén, P; Salih, GF and Strid A. (1990) Photosynthetic formation of inorganic pyrophosphate in phototrophic bacteria. *Photosynth. Res.* 24: 75-80.
- Nyrén, P. y Lundin, A. (1985) Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Anal. Biochem.* 151: 504-509.
- Nyrén, P., Nore, B. y Baltscheffsky, M. (1986) Studies of photosynthetic inorganic pyrophosphatase formation in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochim. Biophys. Acta* 851: 276-282.
- Nyrén, P., Nore, B. F. y Strid, A. (1991) Proton-pumping N_i N_i' dicyclohexylcarbodiimide-sensitive inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: Purification, characterization and reconstitution. *Biochemistry* 30: 2883-2887.
- Nyrén, P y Strid, A (1991). Hipótesis: the physiological role of the membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase in some phototrophic bacteria. *FEMS. Microbiol. Lett.* 77: 265-270.
- Ordaz, H., Sosa, A., Romero, I. y Celis, H. (1992) Thermostability and activation by divalent cations of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Int. J. Biochem.* 24: 1633-1638.
- Randahl, H. (1979) Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in *Rhodospirillum rubrum*. *Eur. J. Biochem.* 102: 251-256 .

- Rea, P. y Poole, R. (1985) Proton-translocating inorganic pyrophosphatase in red beet (*Beta vulgaris* L.) tonoplast vesicles. *Plant Physiol.* 77: 46-52.
- Reeves, R. (1968) A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. *J. Biol.Chem.* 243: 3202-3204.
- Romero, I. y Celis, H. (1992) Evidence of an essential carboxyl residue in membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 617-624.
- Romero, I. y Celis, H. (1995) Comparison of the hydrolysis of $Zn-PPi^{2-}$ and the $Mg-PPi^{2-}$ as substrates and the effect of free cations upon membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochimie.* 77: 949-952.
- Rubtsov, P., Efremovich, N. y Kulaev, I. (1976) *Akad. Nauk SSSR* 230: 1236-1237.
- Sarafian, V; Kim, Y; Poole, R y Rea, P. (1992) Molecular cloning and sequence of *Cdna* encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 1775-1779.
- Sebald, W. y Watcher, E. (1978) Energy conservation in biological membrane en: G. Schäfer, M. Klingenberg (Eds.) Springer-Verlag, Berlin. pp 228-236.
- Senior, A. E. (1988) ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol. Rev.* 68: 177-231.
- Schiff, J. A. (1972) A green safe-light for the study of chloroplast development and other photomorphogenetic phenomena, en: *Methods in Enzymology* (Ed. San Pietro, A.) Vol. 24, Parte B, pp.321-322, Academic Press. New York, London.
- Schöcke, L y Schink, B. (1998) Membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase of *Syntrophus gentianae*, a syntrophically benzoate-degrading fermenting bacterium. *Eur. J. Biochem.* 256: 589-594.
- Scholes, P; Mitchell, P. y Moyle, J.(1969) The polarity of proton translocation in some photosynthetic microorganisms. *Eur. J. Biochem.* 8: 450-454.
- Schwarm HM, Vigerschow H, Knobloch K. (1986). Kinetic characterization and partial purification of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase from *Rhodopseudomonas palustris*. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 367(2):127-33.
- Schwerzmann, K. y Pedersen, P. L. (1986) Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 250: 1-18.
- Sillén, L. G. y Martell, A. (1971) Stability constants of metal-ion complexes: Supplement No. 1, Special publication No. 25. The Chemical Society, London.
- Sosa, A., Ordaz, H., Romero, I. y Celis, H. (1992) Mg^{2+} is an essential activator of hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. J.* 283: 561-566.
- Sosa, A. y Celis, H. (1995) H^+/PPi Stoichiometry of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 316: 421-427.
- Strid, A., Karlsson, I. y Baltscheffsky, M. (1987) ΔpH - and $\Delta \psi$ induced ATP and PPi synthesis in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Acta Chem. Scandinavica* B41: 116-118.
- Sumner, J.B. (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* 100: 413-415.

- Van Niel, C. B. (1935) Photosynthesis of bacteria. Harbor Symp. Quant. Biol. 3: 138-150.
- Wang, Y., Leigh, R., Kaestner, K. y Sze, H. (1986) Electrogenic H⁺-pumping pyrophosphatase in tonoplast vesicles of oat roots. Plant Physiol. 81: 497-502.
- Woese, C. R. (1987) Bacterial Evolution. Microbiol. Rev. 51: 221-271.
- Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, W. L. (1990) Bacterial Evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 4576-4579.
- Young, T.W., Kuhn, N.J., Wadeson, A., Ward, S. Burges. D. y Cooke, G.D. (1998) *Bacillus subtilis* ORF yybQ encodes a manganese-dependent inorganic pyrophosphatase with distinctive properties: the first of a new class of soluble pyrophosphatase? Microbiology 144, 2563-2571
- Zancani, M; Macri, F; Peruffo, A; Vianelo, A. (1995) Isolation of the catalytic subunit of a membrane-bound H⁺-pyrophosphatase from pea stem mitochondria. Eur. J. Biochem. 228: 138-143.
- Zweier, J. L. y Jacobus, W. E. (1987) Substrate-induced alterations of high energy phosphate metabolism and contractile function in the perfused heart. J. Biol. Chem. 262: 8015-8021.
- Zhen, R.G; Kim, E.J. y Rea, P.A. (1997) Acidic residues necessary for pyrophosphate-energized pumping and inhibition of the vacuolar H⁺ pyrophosphatase by N',N'- dicyclohexylcarbodiimide J. Biol Chem 272: 22340-22380.