

El pirofosfato inorgánico, metabolito clave de una bioenergética sostenible bajo condiciones crónicas de estrés en procariotas, protistas y vegetales

Aurelio Serrano

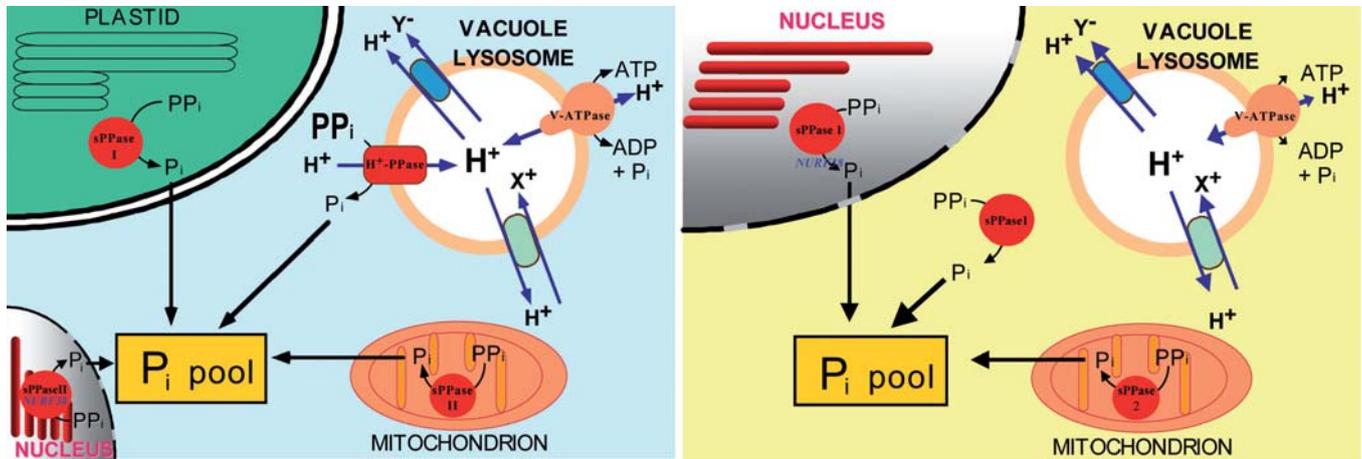
Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis
Avda. Américo Vespucio 49. 41092-Sevilla

El fósforo no sólo es un componente estructural esencial de diversas macromoléculas biológicas (ácidos nucleicos, fosfolípidos), sino que además juega un papel esencial en la bioenergética celular. Es asimilado por los organismos vivos en su forma más oxidada de ortofosfato (PO_4^{3-}), pero, a diferencia de los otros bioelementos primordiales, su asimilación no conlleva reducción sino energización a metafosfato ($\sim\text{PO}^3$), siendo el enlace pirofosfato (P-O-P) así generado la forma de energía química de enlace utilizada por todos los organismos vivos. Nuestro grupo estudia con un enfoque multidisciplinar (bioquímica, genética molecular y fisiología) los sistemas enzimáticos implicados en estos procesos, especialmente los basados en el pirofosfato inorgánico (PPI), una sencilla molécula rica en energía al igual que el ATP y considerado su precursor en la evolución bioenergética, y en los polifosfatos. El PPI es un componente celular que se genera en muchas reacciones anabólicas de biosíntesis de metabolitos y polímeros. Su hidrólisis es esencial para que esas reacciones discurren en la dirección correcta y se regenere el Pi necesario para las reacciones de fosforilación. Descubierta como componente celular por Severo Ochoa durante su estancia en el laboratorio de los Cori (San Louis, EE.UU.) en la década de 1940, el PPI constituye una encrucijada metabólica única al producirse en unas 250 reacciones bioquímicas, muchas de ellas esenciales para la vida. Por tanto, la hidrólisis del PPI es una reacción bioquímica universal que se ha mantenido a lo largo de la evolución, aunque las proteínas enzimáticas que la catalizan (pirofosfatasa inorgánica, PPasas, EC 3.6.1.1) pertenecen a distintos tipos que difieren en su secuencia de aminoácidos y estructura, así como en su mecanismo catalítico.

El PPI, como compuesto rico en energía intrínsecamente generado en el anabolismo, puede sustituir al ATP en la bioenergética celular. Evidencias recientes indican que un número creciente de organismos (muchos procariotas y protistas, y todo el linaje evolutivo fotosintético) serían capaces de desarrollar bajo condiciones crónicas de estrés una bioenergética sostenible en la que el PPI, un sustrato abundante y “barato” para la célula, y las sencillas PPasas de membrana jugarían un papel clave. Sin embargo, tras casi 30 años desde la identificación de la primera PPasa translocadora de H^+ en

el tonoplasto de plantas, su aparente redundancia funcional con la V-ATPasa en las endomembranas de eucariotas y, sobre todo, el reciente descubrimiento de PPasas translocadoras de sodio (Na^+ -PPasa) en ciertos procariotas indican que la bioenergética del PPI tiene todavía múltiples facetas por revelar. Los estudios llevados a cabo por nuestro grupo tratan de clarificar el papel fisiológico del PPI como “moneda energética” y su posible valor adaptativo frente a condiciones de estrés, así como las implicaciones biotecnológicas en relación con algunos de los graves problemas, como la salinización, que amenazan un desarrollo agrícola sostenible.

Las PPasas se clasifican en dos tipos principales: pirofosfatasa soluble (sPPasas), que hidrolizan PPI con generación de calor únicamente, y las pirofosfatasa de membrana translocadoras de iones (principalmente de protones, H^+ -PPasas) que generan gradientes electroquímicos transmembranales, y son las bombas primarias de iones más sencillas estructuralmente hasta ahora descritas. En 1997, nuestro grupo inició una línea de investigación sobre las PPasas de microorganismos fotosintéticos centrándose en aspectos estructurales, funcionales y evolutivos, la cual ha generado seis Tesis Doctorales (2001-2011), y una serie de publicaciones y presentaciones invitadas en reuniones científicas (1997-2011). Así, demostramos que la H^+ -PPasa, la proteína clave en la bioenergética del PPI, no sólo está presente en todos los linajes evolutivos de organismos fotosintéticos - desde las primitivas bacterias anoxigénicas hasta las plantas superiores, pasando por los diversos grupos de microalgas - sino también en procariotas y protistas heterótrofos muy diversos, tanto parásitos como de vida libre. Ello indicaría que la capacidad de usar el PPI como compuesto útil en la bioenergética celular está mucho más extendida de lo que se pensaba. Mediante una estrategia de genómica funcional comparada, nuestro grupo consiguió por vez primera la complementación funcional de la sPPasa citosólica de levadura por diversas H^+ -PPasas de bacterias, protistas y plantas, lográndose así reconstruir en un organismo heterótrofo el escenario metabólico relativo a la bioenergética del PPI propio de eucariotas fotosintéticos (véase esquema). Este estudio mereció ser publicado en los *Proceedings of the National Academic of Sciences de EE.UU.* Actualmente se



Escenarios metabólicos en relación con la hidrólisis del PP_i generado en el citosol de una célula vegetal fotosintética (p.e. microalga) (izquierda) y una célula fúngica/animal (derecha). Todos los compartimentos subcelulares donde se genera PP_i poseen PPasas. Obsérvese que la célula vegetal carece de sPPasa citosólica, cuya función la realizan (con aprovechamiento energético) la H^+ -PPasa de la membrana vacuo-lisosomal y ciertas enzimas glicolíticas (no representadas), pero posee en sus dos tipos de organelos energéticos, cloroplastos y mitocondrias, dos sPPasas Familia I específicas (Gómez García y col. 2006). Por el contrario, los hongos y animales poseen una sPPasa citosólica y otra isoforma mitocondrial muy similares, ambas de la Familia I. La localización nuclear de una sPPasa parece ser cierta en ambos escenarios y es objeto de estudio en la actualidad. Un escenario parecido al descrito para los eucariotas fotosintéticos se podría dar en diversos protistas heterótrofos, algunos de ellos parásitos y con plástidos residuales (apicomplejos).

está utilizando este sistema para estudios de genómica funcional con PPasas de diverso origen, tanto solubles como de membrana.

Las sPPasas Familia I de eucariotas fotosintéticos, tanto microalgas como plantas, se localizan sólo en orgánulos celulares. Nuestro grupo caracterizó bioquímicamente por vez primera una sPPasa monomérica plastídica y esclareció su filogenia molecular (estrechamente relacionada con sus ortólogos citosólicos de hongos/animales). Sobre esta base, planteamos una sustitución funcional muy temprana en la historia evolutiva de los plástidos, de la sPPasa cianobacteriana ancestral por su homóloga de la célula eucariótica hospedadora. Las sPPasas de eucariotas fotosintéticos son las únicas sPPasas monoméricas funcionales descritas. Asimismo, demostramos mediante la inactivación de genes (mutagénesis insercional, RNAi) que la sPPasa citosólica es una enzima esencial en levadura, células animales y diversos procariontes fotosintéticos, mientras que en microalgas su deficiencia sólo afecta la funcionalidad del orgánulo correspondiente. Por otra parte, identificamos en protistas patógenos (tripanosomátidos, etc.) nuevas sPPasas organelares con propiedades catalíticas inusuales (colaboración con el Instituto de Parasitología y Biomedicina del CSIC). La posible regulación coordinada de sPPasas y H^+ -PPasas en organismos que tienen ambos tipos de PPasas no homólogas (todas las plantas, y numerosos protistas y procariontes), es un tema de gran interés para nuestro grupo. Otro tema relevante es el significado fisiológico de la sPPasa nuclear y su posible interacción con complejos proteicos nucleares, ya que en

Drosophila se ha descrito como subunidad NURF-38 del complejo remodelador de la cromatina.

La H^+ -PPasa es un homodímero con subunidades de 70 kDa, por lo que su gran simplicidad estructural en comparación con las complejas ATPasas la puede hacer de gran utilidad para esclarecer el mecanismo básico de la transducción de energía por los sistemas bioquímicos. Nuestro grupo obtuvo, en colaboración con grupos de Dinamarca y Francia, la primera evidencia directa (obtenida por TEM y "Single-Particle Análisis") de que la H^+ -PPasa es un homodímero. Actualmente se están desarrollando colaboraciones con grupos de Dinamarca y Reino Unido para obtener información estructural precisa (tomografía molecular, cristales 2D y 3D) sobre diversas H^+ -PPasas microbianas y vegetales que conduzca a determinación de su estructura molecular. La amplia distribución de H^+ -PPasas en microorganismos fotosintéticos y heterótrofos diversos - bacterias fotosintéticas anoxigénicas, bacterias y arqueas extremófilas primitivas, protistas fotosintéticos con plástidos ancestrales (cianelas), o protistas parásitos de carácter arcaico (apicomplejos y tripanosomátidos)- es una cuestión sobre la que nuestro grupo ha trabajado activamente, habiéndola presentado como evidencia de una bioenergética ancestral mantenida en el presente por organismos sometidos frecuentemente a situaciones de estrés (nutricional, biótico, etc). En este sentido, diversos resultados obtenidos por nuestro grupo con bacterias púrpuras fotosintéticas apoyan claramente la existencia de una bioenergética de estrés basada en el PP_i en la que la H^+ -PPasa jugaría un papel clave.

Grupo de Investigación Bioenergética del Fosfato

El Grupo "Bioenergética del Fosfato" es desde 1997 un Grupo de Investigación consolidado (BIO-261) de los sucesivos Planes Andaluces de Investigación, Desarrollo e Innovación, así como una unidad estructural del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Centro Mixto del CSIC y la Universidad de Sevilla. Centra sus líneas de investigación en los mecanismos biológicos de transducción de energía usando como sistemas de estudio tanto proteínas enzimáticas solubles como proteínas integrales de membrana translocadoras de iones, así como complejos multiproteicos implicados en fotosíntesis. Promovido inicialmente por el Profesor Manuel Losada (Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica 1995; jubilado en 2006), ha sido dirigido desde sus comienzos por el Dr. Aurelio Serrano, Investigador Científico del CSIC. Está formado por personal perteneciente al CSIC y la Universidad de Sevilla: investigadores, profesores, becarios predoctorales y personal técnico. Desde su inicio, la labor investigadora del grupo ha sido financiada por los sucesivos Planes Nacionales de I+D+i y Programas de Proyectos de Investigación de la Junta de Andalucía, así como por diversos Proyectos de Cooperación Internacional europeos, nacionales y autonómicos. Las líneas de investigación se desarrollan con un enfoque multidisciplinar y están en gran medida relacionadas con el fosfato como compuesto clave en bioenergética. La labor investigadora del grupo en este área fue reconocida internacionalmente con la organización en 2001 del *2nd International Meeting on Inorganic Pyrophosphatases*, que tuvo lugar en el CIC-Cartuja de Sevilla, con la participación de los más destacados expertos sobre esta temática procedentes de Europa, Norteamérica y Japón, y de cuyo Comité Organizador fue Presidente el Dr. Serrano y Presidente Honorario el Profesor Losada. Desde entonces ha aumentado la visibilidad internacional del grupo, y se han establecido un número creciente de colaboraciones internacionales con grupos de trabajo relevantes en este campo.



Miembros del Grupo de Investigación Bioenergética del Fosfato en 2010. De izquierda a derecha: Isabel Jiménez (personal técnico), José R. Pérez-Castiñeira, Aurelio Serrano, Gloria Serrano-Bueno, Rosana Herrera, Ilham Mardad (becaria AECID) y Agustín Hernández.

Las líneas de trabajo que se desarrollan actualmente van dirigidas a esclarecer las relaciones estructura-función en H^+ -PPasas, la optimización de su expresión heteróloga en sistemas modelo mediante quimeras con diversos péptidos señal, y la realización de estudios de genómica funcional con sPPasas y H^+ -PPasas, con énfasis en su posible relación con la proliferación celular y tolerancia a estrés. El significado fisiológico de las Na^+ -PPasas, una nueva clase de PPasas de membrana, recientemente descubierta en procariotas de hábitats salinos, y su posible implicación en tolerancia a salinidad, es un tema de creciente interés para nuestro grupo. Ya que estas Na^+ -PPasas procarióticas tienen homólogos identificados por nuestro grupo en protistas fotosintéticos marinos de diversos grupos filogenéticos, la generación de una fuerza Na^+ -motriz a expensas del PPI podría ser un mecanismo de transducción de energía común a microorganismos pro- y eucarióticos. La validación funcional de estas nuevas Na^+ -PPasas eucarióticas, y su significado fisiológico y posible ori-

gen evolutivo por transferencia génica horizontal, son actualmente objeto de estudio por nuestro grupo.

Finalmente, hay que resaltar el creciente interés del metabolismo del PPI y las H^+ -PPasas en biomedicina: I) los bifosfonatos son análogos estructurales del PPI no hidrolizables por las PPasas que se emplean en el tratamiento del cáncer y diversas enfermedades óseas, y II) estudios recientes indican que las H^+ -PPasas se encuentran en diversos protistas parásitos, entre ellos los agentes causantes de enfermedades epidémicas muy graves como la malaria y la enfermedad del sueño. Los estudios sobre estas proteínas de membrana, en particular la determinación de sus estructuras tridimensionales, ayudarán de forma decisiva al diseño de fármacos eficaces contra estas enfermedades y, en este sentido, mantenemos colaboraciones con la Univ. de Copenhagen (DK) y el *Imperial College* (RU) por un lado, y con la Universidad de Athens (EE.UU.) y el Instituto de Parasitología y Biomedicina del CSIC por otro.

REFERENCIAS

- Perez-Castiñeira JR, López-Marqués RL, Losada M y Serrano A. (2001). A thermostable K^+ -stimulated vacuolar-type pyrophosphatase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. FEBS Lett 496: 6-11.
- Perez-Castiñeira JR, Gómez-García R, López-Marqués RL, Losada M y Serrano A. (2001). Enzymatic systems of inorganic pyrophosphate bioenergetics in photosynthetic and heterotrophic protists: remnants or metabolic cornerstones? Int Microbiol 4: 135-142.
- Perez-Castiñeira JR, Alvar J, Ruiz-Perez LM y Serrano A. (2002). Evidence for a wide occurrence of proton-translocating pyrophosphatase genes in parasitic and free-living protozoa. Biochem Biophys Res Comm 294: 567-573.
- Sittenfeld A, Mora M, Ortega JM, Albertazzi F, Cordero A, Roncel M, Sánchez E, Vargas M, Fernández M, Weckesser J y Serrano A. (2002). Characterization of a photosynthetic *Euglena* strain isolated from an acidic hot mud pool of a volcanic area of Costa Rica. FEMS Microbiol Ecol 42: 151-161.
- Perez-Castiñeira JR, López-Marqués RL, Villalba JM, Losada M y Serrano A. (2002). Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and plant H^+ -translocating pyrophosphatases. Proc Nat Acad Sci USA 99: 15914-15919.
- Serrano A, Pérez-Castiñeira JR, Baltscheffsky H y Baltscheffsky M. (2004). Proton-pumping inorganic pyrophosphatases in some Archaea and other extremophilic prokaryotes. J Bioenerg Biomemb 36: 127-133.
- Gómez García R, Ruiz-Pérez LM, González-Pacanoska D y Serrano A. (2004). A novel calcium-dependent inorganic pyrophosphatase from the trypanosomatid *Leishmania major*. FEBS Lett 560: 158-166.
- López-Marqués RL, Perez-Castiñeira JR, Losada M y Serrano A. (2004). Differential regulation of soluble and membrane-bound inorganic pyrophosphatases in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* provides insights into a pyrophosphate-based stress bioenergetics. J Bact 186: 5418-5426.
- Gómez-García MR, Losada M y Serrano A. (2006). A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eukaryotes. Biochem J 395: 211-221.
- Fourat L, Iddar A, Valverde F, Serrano A y Soukri A. (2007). Effects of oxidative and nitrosative stress on *Tetrahymena pyriformis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J Euk Microbiol 54: 338-346.
- Serrano A, Perez-Castiñeira JR, Baltscheffsky M y Baltscheffsky H. (2007). Proton-pumping inorganic pyrophosphatases: past, present and future. IUBMB Life 59: 76-83.
- Drake R, Serrano A y Pérez-Castiñeira JR. (2010). N-terminal chimeras with signal sequences enhance the functional expression and alter the subcellular localization of heterologous membrane-bound inorganic pyrophosphatases in yeast. Biochem J 426: 147-157.