

00562  
2

14



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN DE LA OCTILGUANIDINA COMO  
UN INHIBIDOR DE LA FOTOFOSFORILACIÓN .

T E S I S

Que para obtener el Título de  
Maestría en Ciencias Químicas  
( Bioquímica )

P R E S E N T A

MINERVA LEONOR GONZALEZ IBARRA .

00562  
1983

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO , D. F .

1983



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## Abreviaturas

ATP	Trifosfato de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
$\epsilon$ ATP	1-N <sup>6</sup> -etenoadenosina trifosfato
BSA	Seroalbúmina de bovino
CF <sub>1</sub>	Factor de acoplamiento 1 ó ATPasa de cloroplasto
CF <sub>0</sub>	Segmento hidrofóbico de la ATPsintetasa
Chl	Clorofila
DEAE	Dietil amino etil
DTE	Ditioeritritol
DTT	Ditiotreitol
DL	Deshidrogenasa láctica
DCCD	N,N'-Diciclohexilcarbodimida
DBMIB	2,5-Dibromo 3 metil 6 isopropil-p-benzoquinona-dibromotimoquinona
DCMU	Diclorofenil 1,1-dimetilurea
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
EDAC	1-etil-3 ( 3 dimetilaminopropil )
Fd	Ferredoxina
Fp	Flavoproteína
H <sup>+</sup>	protones
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina dinucleotido

NADH	Nicotinamida Adenina dinucleotido reducido
nm	nanometros
NEM	N-etilmaleimida
PEP	Fosfoenolpiruvato
PK	Piruvato Kinasa
PMS	N-Metil Fenazina Metasulfato
Pi	ortofosfato inorgánico
PS I	Fotosistema I
PS II	Fotosistema II
PC	Plastocianina
PQ	Plastoquinona
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TRIS	Tris ( Hidroximetil ) aminometano
Tricine	( N-Tris [ Hidroximetil ] metilglicina )
TCA	Acido tricloroacético

## I N D I C E

Resumen	1
Generalidades	4
Introducción	29
Material y Métodos	34
Resultados	54
Discusión	92
Conclusiones	103
Bibliografía	105

## RESUMEN

## R E S U M E N

La regulación de la fotofosforilación y de la fosforilación oxidativa requiere del conocimiento de la funcionalidad de cada uno de los componentes que llevan a cabo esta compleja función. La existencia de una proteína inhibidora de la función catalítica del sistema fosforilante en mitocondrias , cloroplastos ( 1,2 ) y bacterias , con características estructurales y funcionales semejantes , ha permitido proponerla como un importante factor regulador . Sin embargo , su mecanismo de acción , sobre todo en la síntesis de ATP es aún incierto .

Trabajos previos ( 3 ) en mitocondrias de hígado y corazón de res han demostrado que la Octilguanidina inhibe la actividad ATPasa soluble y particulada, siguiendo un patrón cinético semejante al inhibidor natural , lo cual ha sugerido un posible sitio de acción común .

En la presente investigación hemos utilizado la octilguanidina como un modelo de la proteína inhibidora en cloroplasto y  $CF_1$  purificada .

Nuestros resultados señalan que la Octilguanidina inhibe la fotofosforilación y la actividad de ATPasa a través de su acción directa en la  $CF_1$  , en condiciones en las cuales la proteína inhibidora ha sido movilizad a de su sitio inhibitorio por la luz , calor y ditioeritritol.

Esto podría sugerir un sitio común de ambos inhibidores por lo que puede ser utilizado como un inhibidor modelo en el estudio del mecanismo de acción de la proteína inhibidora en el segmento  $CF_1$  de cloroplasto .



GENERALIDADES

## GENERALIDADES

Toda la energía consumida en los sistemas biológicos procede de la energía solar cuya transformación realizan los procesos fotosintéticos . Por lo tanto , la fotosíntesis es la primera etapa del flujo de energía a través de la biósfera y todos los seres vivos dependen de la energía solar para su subsistencia ya sea en forma directa como en los organismos autótrofos ó indirecta como en los organismos heterótrofos . La importancia de la fotosíntesis no sólo reside en la captación primaria de energía luminosa , sino que provee al medio ambiente del oxígeno necesario para compensar su pérdida por la combustión industrial y la respiración, y además , evita la acumulación rápida de gas carbónico en la atmósfera . Aunado a todo esto , el oxígeno molecular generado a través de la fotosíntesis , se acumula en la atmósfera formando una capa de ozono , que filtra las radiaciones ultravioletas y permite así la vida sobre la superficie terrestre .

El término fotosíntesis se refiere normalmente al proceso total mediante el cual se forma glucosa a partir de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  a expensas de la energía solar . Sin embargo , sólo en las primeras fases de la fotosíntesis la luz es directamente necesaria. En dichas fases , la energía luminosa captada se convierte en energía química

almacenándose en forma de un enlace de alta energía en la molécula del Adenosin Trifosfato ( ATP ). Estas primeras reacciones por consiguiente , reciben el nombre de reacciones luminosas . Las reacciones restantes , mediante las cuales la glucosa se forma a partir de  $\text{CO}_2$  a expensas de la energía química , pueden tener lugar en ausencia de la luz y se llaman reacciones oscuras . Las reacciones luminosas son exclusivas de las células fotosintéticas , mientras que muchas de las reacciones oscuras en las que se construye el esqueleto carbonado de la glucosa a partir de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  , también tienen lugar en las células heterotróficas .

En las plantas superiores el  $\text{CO}_2$  , el  $\text{H}_2\text{O}$  y la energía solar son los reactivos el  $\text{O}_2$  y los carbohidratos  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  son los productos. El proceso de la fotosíntesis tiene lugar en organelos llamados cloroplastos .

Es interesante mencionar la existencia de una gran similitud estructural y funcional entre la mitocondria y el cloroplasto. Estos organelos de doble membrana son capaces de obtener energía ya sea a través de la luz como en los cloroplastos ó de la oxidación de compuestos orgánicos como en las mitocondrias y almacenarla en forma de ATP .

Los cloroplastos poseen formas variadas , pero frecuentemente son estructuras elipsoidales de  $3-10 \mu\text{M}$  que son considerable

mente mayores a las mitocondrias . Del mismo modo que la mitocondria , el cloroplasto está rodeado por dos membranas . La membrana interna se pliega hacia el interior para formar las lamelas , semejantes a las crestas mitocondriales . A intervalos , las lamelas se espesan para formar estructuras llamadas discos tilacoidales. Los apilamientos de estos discos se conocen con el nombre de grana. Los grana contienen todos los pigmentos transportadores de electrones de los Fotosistemas I y II y las enzimas fosforilantes . La mayor parte de las enzimas que participan en las reacciones oscuras en las que se forma la glucosa , están localizadas en el estroma , material semifluido que baña las lamelas y los grana ( Fig. 1 ) . Los cloroplastos , al igual que las mitocondrias , llevan a cabo movimientos iónicos cuando son iluminados , de tal modo que los iones  $H^{+}$  se mueven hacia el interior y los iones  $K^{+}$  y  $Mg^{++}$  hacia el exterior . Por otra parte , las lamela y los grana experimentan cambios característicos en su forma y organización estructural durante los períodos intermitentes de luz y oscuridad ( 4 ) .

En ambos procesos , la fotofosforilación y la fosforilación oxidativa , el agua sirve como donador de hidrógeno ; pero en las mitocondrias además los hidrógenos también derivan de los sustratos como el piruvato ó los acidos grasos . Mientras que en los cloroplastos la ruptura del agua tiene lugar por medio de la luz y los pigmentos fotosintéticos , en las mitocondrias ésta se lleva a cabo a través del ciclo de Krebs . Aunado a esto , el aceptor de electrones

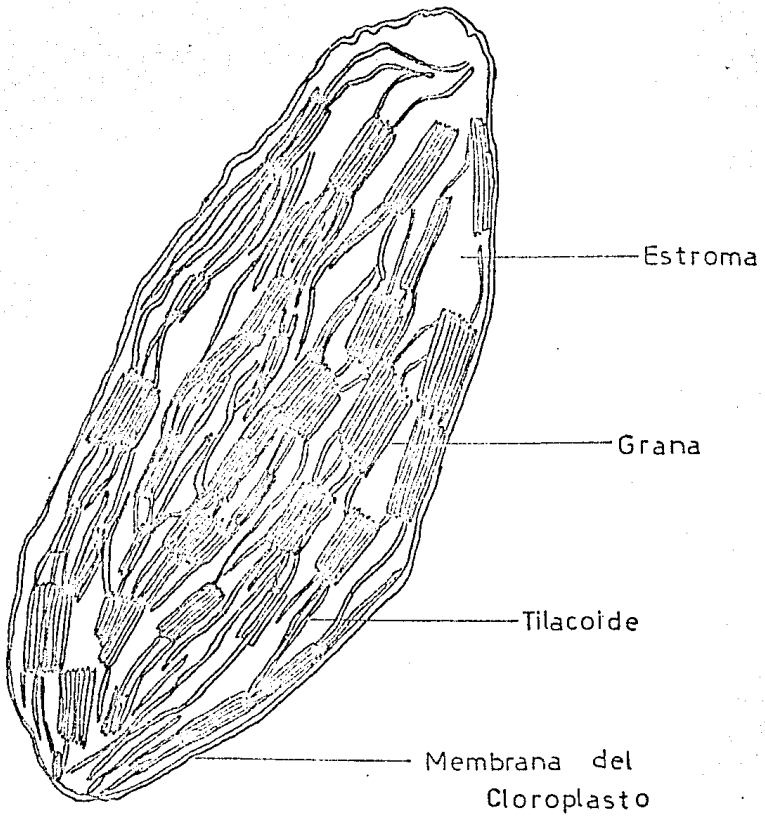
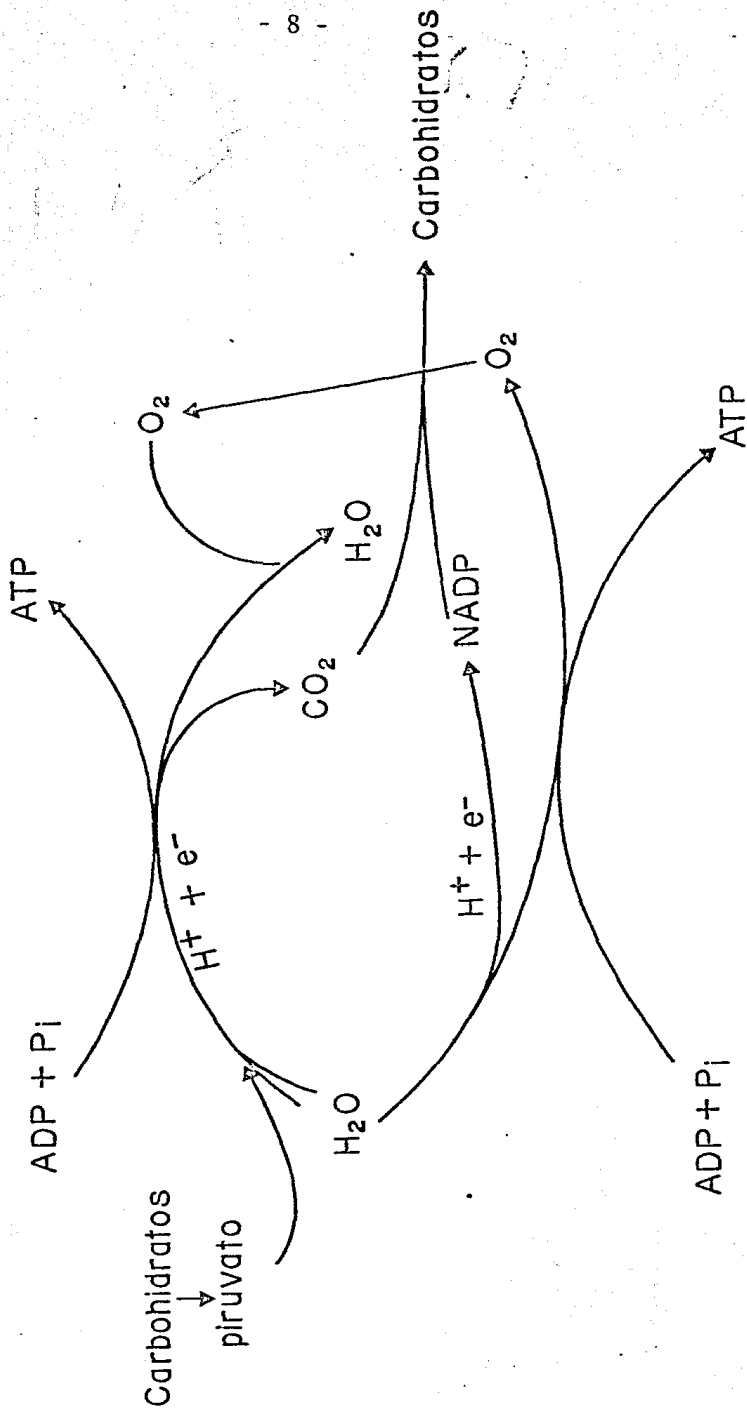


Fig. 1 . Esquema de un cloroplasto .

MITOCONDRIA



CLOROPLASTO

Fig. 2.. Flujo de Protones y Electrones en Cloroplastos y Mitochondrias.

en ambos es diferente : el oxígeno en las mitocondrias , y el  $\text{CO}_2$  ( Vía  $\text{NAD}^-$  y ciclo reductivo de las pentosas ) en los cloroplastos ( ver Fig. 2 ).

La Fig. 3. muestra un esquema de la cadena oxidativa de los cloroplastos que tiene similitudes con la cadena respiratoria en mitocondrias ya que en ambas existen flavoproteínas , proteínas con hierro no hemo , quinonas , citocromos , proteínas con cobre y Nicotinamin Adenin nucleótidos.

Durante el transporte de electrones en mitocondrias , los protones se mueven de la matriz mitocondrial hacia afuera . En cloroplastos , partículas subcloroplásticas y partículas submitocondriales de polaridad invertida los protones se mueven de afuera hacia adentro . Este movimiento vectorial de protones requiere de una organización asimétrica de la cadena oxidativa .

La Tabla I muestra algunas de las similitudes entre cloroplasto y partículas submitocondriales ( 4 ) . En estos sistemas generadores de energía se forma ATP , dada su gran similitud , es posible que el mecanismo de fosforilación fotosintética se asemeje al mecanismo de fosforilación oxidativa en mitocondrias . Haciendo factible , que la mayoría de las conclusiones obtenidas del estudio de la fotofosforilación pueden ser aplicadas al resto de las membranas transductoras de energía .

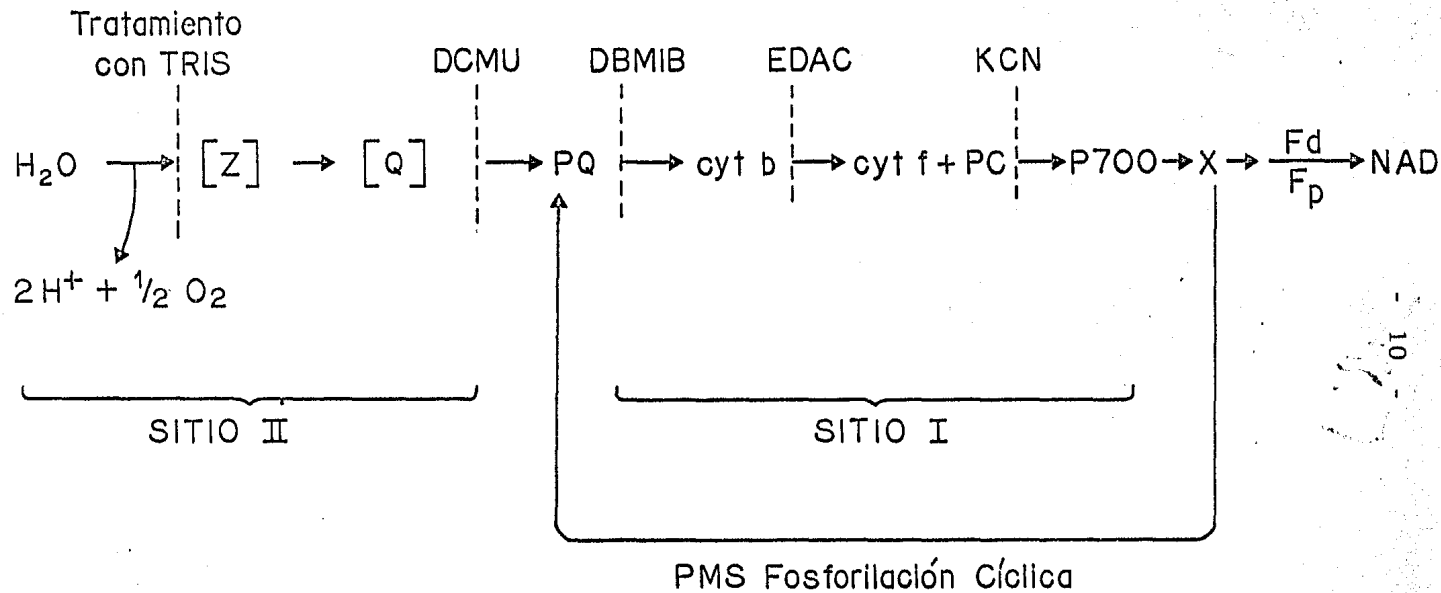


Fig. 3. Cadena Oxidativa y Fosforilación en cloroplastos.



## Eventos Primarios de la Fotosíntesis

Todos los organismos fotosintéticos tienen uno ó más pigmentos orgánicos capaces de absorber la radiación visible para iniciar las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis . Los pigmentos fotosintéticos se encuentran unidos a estructuras membranosas , por lo cual la conversión de la energía luminosa a energía química ocurre en la membrana .

Los pigmentos fotosintéticos pueden ser clasificados en 3 grupos principales : clorofilas , carotenoides y ficobilinas . La función de estos pigmentos es proporcionar un sistema eficiente para absorber la luz del espectro visible . La energía absorbida es transferida a los centros de reacción, donde es utilizada para las reacciones fotoquímicas . Los pigmentos relacionados en el proceso de absorción de la luz son conocidos como " pigmentos cosechadores de energía " ( 5 ) .

Existen dos tipos de clorofila a y b en plantas superiores y algas verdes . Ambas son solubles en solventes orgánicos ; la clorofila a es el pigmento más abundante y se encuentra en todos los organismos fotosintéticos que producen oxígeno . Se han postulado varias formas de clorofila a tomando en cuenta su máximo de absorción en la región del rojo del espectro visible :  $Chl_a$  660 ,  $Chl_a$  670 ,  $Chl_a$  680 ,  $Chl_a$  685 ,  $Chl_a$  690 y  $Chl_a$  700-720 . Las formas de  $Chl_a$  que absorben a longitudes de onda corta son fluorescentes y predominan en el PS II . Las formas de  $Chl_a$  que absorben a longitudes de onda más larga , son ligeramente fluorescentes y se encuentran en el PS I .

T A B L A

I

Similaridades entre la Fosforilación Oxidativa en Partículas Submitocondriales y Fotofosforilación en Cloroplastos

Propiedades	En Partículas Submitocondriales y Cloroplastos
Componentes del Transporte de electrones	Citocromos, flavoproteínas , quinonas , nucleótidos .
Movimiento de protones durante la oxidación	De afuera hacia adentro
Factor de acoplamiento	Similares en: Peso Molecular , composición de aminoácidos , estructura de subunidades , labilidad al frío .
Actividad ATPasa	Latente , puede ser desenmascarada con tripsina con pérdida de actividad de acoplamiento .
Proteína Inhibitoria	Presente
Reacciones de Intercambio	ATP-P <sub>i</sub> , ATP-H <sub>2</sub> O
Topografía	Organización Asimétrica
Estructura al Microscopio Electronico	• Membrana interna similar con esferas de 85 - 90 Å .

La clorofila b se encuentra en todas las plantas superiores y algas verdes . Su máximo de absorción en la región del rojo es a 650 nm. Recientemente se ha postulado la existencia de otras formas de Chl<sub>b</sub> : la Chl<sub>b</sub> 640 y la Chl<sub>b</sub> 650 . La mayor proporción de Chl<sub>b</sub> se detecta en el PS II .

Carotenoides . Son pigmentos de color amarillo y anaranjado que se encuentran en casi todos los organismos fotosintéticos . Generalmente se acepta que la mayoría de los carotenos está asociado al PS I y las xantofilas al PS II . Son solubles en solventes orgánicos , existiendo dos clases de carotenoides :

1. - Carotenos . Son hidrocarburos que absorben en la región del azul del espectro visible . Entre los carotenos más comunes , encontramos el b- caroteno .

2. - Carotenoles . Son alcoholes comúnmente llamados xantofilas .

Ficobilinas . Son pigmentos solubles en agua , presentes en algas rojas y azul-verde , con estructura de tetrapirroles de cadena abierta .

Las ficobilinas están generalmente asociadas con el PS II pudiéndose encontrar también en el PS I . Existen dos clases de ficobilinas :

i) Ficocianinas : Las cuales predominan en algas azul-verde y cuentan con un máximo de absorción a 630 nm.

ii) Ficoeritrinas : predominan en algas rojas y absorben alrededor de 540 nm .

La Fig. 4 muestra una distribución aproximada de los diferentes

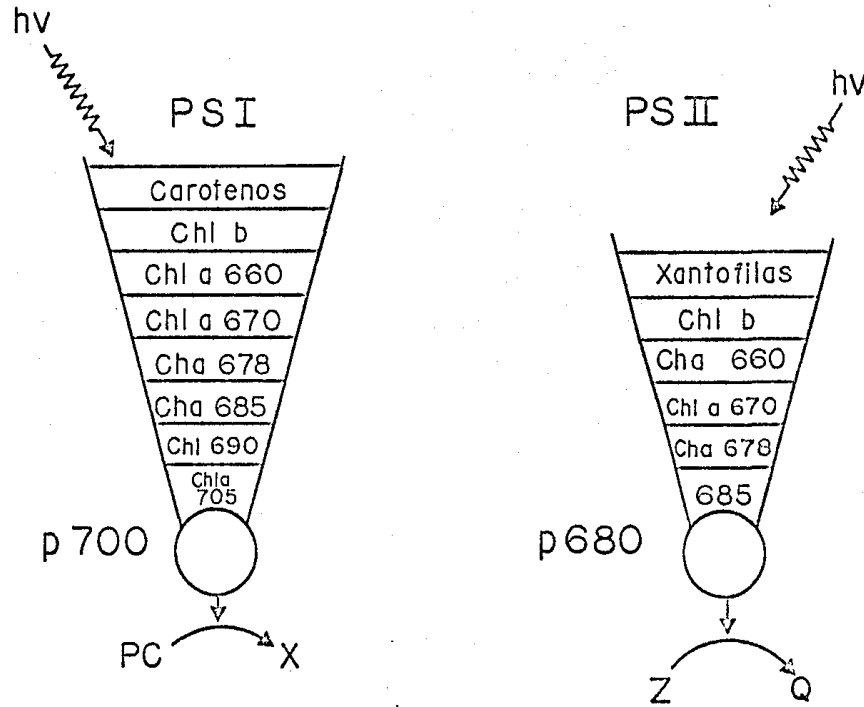


Fig. 4. Distribucion aproximada de los diferentes pigmentos en los dos Fotosistemas I y II de plantas verdes.

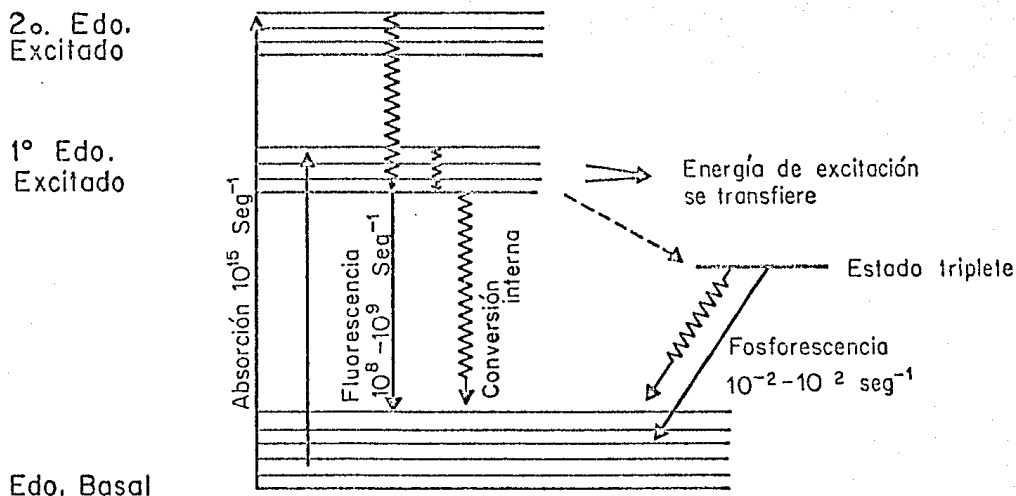


Fig. 5 . Transiciones entre los estados basal y excitado de una molécula . Una molécula puede alcanzar el estado excitado por la absorción de un quantum de energía ; el regreso al estado basal dependerá , como se muestra en la figura , de las transiciones que sufra la molécula .

pigmentos en los Fotosistemas I y II en plantas verdes . La Fig. 5 ilustra un esquema las reacciones moleculares de la transferencia de energía; las moléculas de clorofila , excitadas ya sea por la absorción directa de la luz ó a través de la transferencia de la energía de excitación por pigmentos accesorios , alcanzan el estado de excitación ó singulete . La energía potencial de la molécula en el estado excitado puede ser disipado en varias formas ya sea a) regresar al estado basal a través de una conversión de energía con pérdida de calor b) transferir su energía a otra molécula hasta que la energía finalmente alcance el centro de reacción donde es convertida en energía química de los productos de reacción y c) alternativamente la molécula puede regresar al estado basal con la liberación de un quantum de luz produciendo fluorescencia ó a través de un estado triplete produciendo fosforescencia ( 5 ) .

Sólo una pequeña parte de las clorofilas , del centro de reacción , interviene en la transformación de la energía luminosa en energía química . Las clorofilas del centro de reacción son químicamente idénticas a las otras clorofilas de la unidad fotosintética , pero tienen propiedades especiales por estar localizadas en un ambiente favorable para la transferencia. Una de estas diferencias es el nivel de energía de su estado de excitación, menor que las otras clorofilas , que las hace atraparoras de energía . La energía absorbida por estas clorofilas salta desde la unidad fotosintética hasta un centro de reacción en un proceso muy rápido que ocurre en menos de  $10^{-10}$  segundos .

En las plantas verdes , hay dos sistemas de pigmentos , y por lo tanto dos tipos de unidades fotosintéticas . Cada unidad fotosintética tiene su centro de reacción : el P 700 en el Fotosistema I ( PS I ) y el P 680 en el Fotosistema II ( PS II ) .

Una vez que la energía , por los diferentes mecanismos mencionados alcanza el centro de reacción , es convertida en energía química con la producción de un equivalente oxidante y un equivalente reductor. Secuencialmente , el centro de reacción alcanza el estado excitado ó singulete , el aceptor de electrones primario es reducido inmediatamente y el centro de reacción queda oxidado recibiendo a su vez , un electrón de un donador primario de electrones y logrando de esta manera , regresar al estado basal . Quedando al final del proceso el donador primario oxidado y el aceptor primario reducido .

### Eventos Secundarios de la Fotosíntesis

Transporte de electrones . En el Fotosistema I se lleva a cabo la oxidación del citocromo f y la reducción del Nicotinamin adenín dinucleótido ; en el Fotosistema II se oxida la molécula de  $H_2O$  con la producción de  $O_2$  molecular y la reducción de ciertos intermediarios . La transferencia de electrones desde el  $H_2O$  al citocromo f completa la cadena ; este paso es exergónico y está acoplado a la síntesis de ATP ( fosforilación no cíclica ) . Mediante un flujo cíclico de electrones alre-

dedor del PS I es posible producir ATP en el proceso de fosforilación cíclica . El ATP y el NADP reducido , productos de las dos reacciones luminosas , son suficientes para que la fijación de carbono se lleve a cabo con la incorporación de  $\text{CO}_2$  a materia orgánica  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  .

El transporte de electrones , propuesto por Hill y Bendall ( 6 ) ó esquema Z , ilustrado en la Fig. 6 , contiene la vía de reacciones de oxido-reducción que se efectúan desde el  $\text{H}_2\text{O}$  hasta el  $\text{NADP}^+$  . De acuerdo con este modelo el Fotosistema II oxida el agua ( $E'_0 = + 0.8 \text{ v}$ ) a oxígeno libre , y reduce a Q ( $E'_0 = 0.0 \text{ v}$ ) , mientras que Fotosistema I reduce un aceptor de electrones de bajo potencial X ( $E'_0 = - 0.6 \text{ v}$ ) y oxida al P 700 ( $E'_0 = + 0.4 \text{ v}$ ) .

Se ha sugerido que "Q" puede ser equivalente a un componente que produce un cambio de absorbancia a 550 nm , conocido como C 550 y de igual manera "X" similar a un componente referido como P 430 .

El P 700 oxidado es reducido por el Q reducido a través de un transporte de electrones exergónico que esta acoplado a la fosforilación de ADP ( fosforilación no cíclica ) . Los transportadores de electrones implicados parecen ser el Cit 559 ( bajo potencial ) , el PQ , el Cit f y el PC en este orden . Bohme y Cramer en 1972 demostraron que existe un sitio de fosforilación entre el PQ y el Cit f . El aceptor de electrones de bajo potencial ( X ) en el PS I puede reducir a  $\text{NADP}^+$  ya



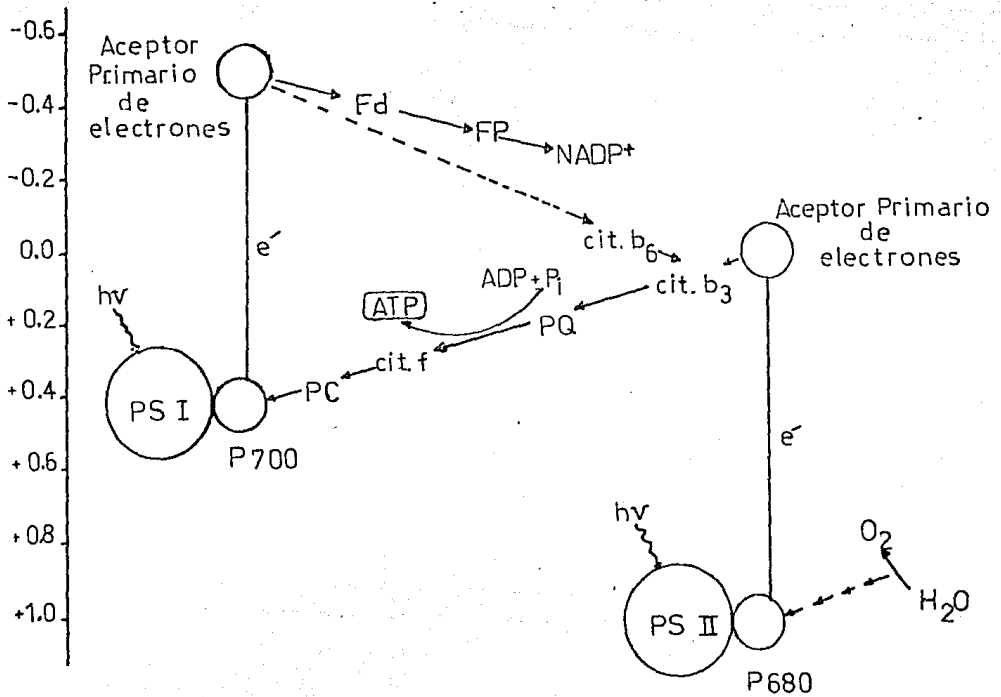


Fig. 6 . Diagrama de energía del transporte de electrones fotosintético vía fotosistema I y II , graficando en términos de potenciales de oxido-reducción estandar  $E'_0$  de los pares redox que interactúan. Esta representación es frecuentemente llamada esquema Z . Los dos sistemas estan conectados por una cadena de transporte de electrones central entre el aceptor primario de electrones del PS II y el P700 del Fotosistema I . El flujo de electrones no cíclico emplea ambos fotosistemas , empezando en el agua y finalizando en el NADPH . El flujo de electrones cíclico solamente requiere el PS I .

sea a través de FRS y Fd y generar así el NADPH puede entrar al ciclo de fijación de carbono ó regresar el electrón a un almacén intermedio de electrones ( probablemente Cit.  $b_6$  ). En este último caso , el transporte de electrones traza un circuito cerrado utilizando únicamente el PS I , el cual es referido como transporte cíclico de electrones y la formación de ATP que le acompaña es conocida como fotofosforilación cíclica .

Para que la fotofosforilación se lleve a cabo se requiere de un complejo protéico capaz de utilizar la energía derivada del transporte de electrones para formar ATP a partir de ADP y  $P_i$  . La elucidación de esta compleja clase de enzimas representa uno de los retos más importantes de la biología molecular .

De acuerdo con la Hipótesis Quimiosmótica de Mitchell ( 7 ) , la energía liberada de la transferencia de electrones genera un gradiente de protones ó electroquímico (  $\Delta \mu H^+$  ) el cual es utilizado por el complejo protéico llamado ATPasa , para formar el ATP .

Síntesis de ATP .- Los complejos  $H^+$  - ATPasa se han aislado e identificado en una gran variedad de membranas transductoras de energía : mitocondrias , cloroplastos y bacterias . Están compuestos de dos estructuras distintas : un sector catalítico , de naturaleza hidrofílica y un sector membranal de naturaleza hidrofóbica . La función

del sector catalítico (  $CF_1$  - ATPasa ) es catalizar la formación de ATP a expensas de la energía expresada como un flujo de protones. La función del sector membranal (  $CF_0$  ) es proveer al sector catalítico de un flujo específico de protones a través de la membrana .

### Factor de Acoplamiento de Cloroplasto ( $CF_1$ )

La fotofosforilación se encuentra acoplada al transporte de electrones a través de un intermediario común que es el gradiente de protones ó potencial electroquímico; un gran número de tratamientos aumentan el transporte de electrones e inhiben la síntesis de ATP y de esta manera , la fosforilación es desacoplada del transporte de electrones . El desacoplamiento puede ser explicado aduciendo que ciertos tratamientos pueden causar la liberación de las proteínas de la membrana implicadas en la síntesis de ATP y que bajo condiciones apropiadas , las proteínas pueden volver a unirse a ésta y restablecer la fotofosforilación . Por ejemplo , en cloroplastos tratados con soluciones salinas , se libera un complejo proteico al que se le ha llamado factor de acoplamiento ó  $CF_1$  . Por otro lado , en 1962 Jagendorf y Smith ( 8 ) encontraron que la fotofosforilación se desacopla al tratar membranas de tilacoides con soluciones diluidas de EDTA . Poco después Avron en 1963 ( 9 ) demostró que la proteína liberada por el tratamiento con EDTA , restablecía , en presencia de  $Mg^{++}$  parcialmente la fosforilación en membranas desacopladas con EDTA

identificándolo con el factor  $CF_1$ .

Purificación y Propiedades . - Se han desarrollado diferentes métodos con el objeto de obtener y caracterizar el factor de acoplamiento  $CF_1$ , que en un principio presentó serios obstáculos, porque se carecía de un ensayo adecuado para cuantificar su actividad; esto fué posible sólo cuando la actividad de ATPasa se hizo manifiesta ( 10 ).

Con el fin de solubilizar a la enzima adosada a la membrana se han efectuado extracciones con acetona y se ha purificado parcialmente con precipitación fraccionada con sulfato de amonio ( 10 ). Lográndose purificar mediante el empleo de electroforesis en geles de poliacrilamida y ultracentrifugación analítica ( 11 ).

Una técnica alternativa de solubilizar el factor de acoplamiento, consiste en el empleo de soluciones diluidas de EDTA. Puede ser purificado a través de una cromatografía de columna en DEAE- Celulosa y centrifugación posterior en un gradiente de sacarosa ( 12 ).

La liberación del factor de acoplamiento también se ha logrado mediante extracciones con cloroformo. Resultando ser un método conveniente de extraer la  $CF_1$  con todas sus subunidades, ya que mantiene la actividad de acoplamiento de la fotofosforilación ( 18 ). El método además permite obtener un buen rendimiento de la

enzima a partir de pequeñas cantidades . Un método fácil y rápido de cuantificar el grado de pureza de preparaciones de  $CF_1$  se basa en el hecho que a diferencia de otras proteínas , la  $CF_1$  carece de triptófano , por lo cual la relación de fluorescencia entre 300 y 350 nm se incrementa conforme se purifica la proteína ( 12 ) .

Estructura .- La ATPasa de cloroplasto es una proteína esférica con  $90 \text{ \AA}$  de diámetro , que puede observarse con tinción negativa mediante microscopía electrónica .

El aislamiento de la  $CF_1$  de la complejidad del medio que la rodea ha permitido un estudio más extensivo de la molécula . El peso molecular de  $CF_1$  determinado por ultracentrifugación es de 325,000 ( 11 ) y esto se ha confirmado por medio de difracción de rayos X , indicando que la proteína es casi esférica , con un coeficiente de sedimentación de 13.2 S y 0.745 ml/ g de volumen parcial específico . El contenido de aminoácidos ha sido reportado ( 11, 14 ) , detectándose además 3 mol de carbohidrato por mol de aminoácido . En la composición de aminoácidos , se observa que carece de triptófano , y los grupos amino terminal aparentemente están bloqueados. En la proteína desnaturalizada , se pueden cuantificar cerca de 8 grupos -SH , y 4 cisteínas más se encuentran formando puentes disulfuro . La proteína oligomérica se disocia en sus diferentes polipéptidos cuando se incuba a bajas temperaturas y en presencia de sales

( 15 ) , en consecuencia pierde su actividad ATPasa . La inactivación y consecuente disociación se previene en presencia de bajas concentraciones de nucleótidos y metales divalentes ó en presencia de lípidos de cloroplastos .

La  $CF_1$  es una proteína incolora , soluble en agua . Mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS , se ha demostrado que la  $CF_1$  esta compuesta de 5 subunidades diferentes , característica que es compartida con otras ATPasas . Cada uno de los polipéptidos se le ha denominado  $\alpha$  ,  $\beta$  ,  $\gamma$  ,  $\delta$  y  $\epsilon$  en orden decreciente de peso molecular : 59,000 ; 56,000 ; 37,000 ; 17,5000 y 13,000 respectivamente .

A diferencia de la aceptación general que existe en cuanto al número de subunidades que componen la ATPasa de diferentes fuentes , la estequiometría de estas subunidades es aún materia de gran controversia . Una estimación de la estequiometría de las subunidades fué realizada cuantificando la radioactividad relativa de cada subunidad en un gel de electroforesis con SDS de muestras de  $CF_1$  aislado de plantas de chícharo crecidas en  $^{14}CO_2$  ( 16 ) . Sugiriendo una composición de enzima de  $\alpha_2 \beta_2 \gamma \delta \epsilon_2$  . Estudios con reactivos de entrecruzamiento en  $CF_1$  también han indicado la misma composición , por lo cual esta estequiometría es la más aceptada ( 17 ) .

La función de cada una de las subunidades que componen

la  $CF_1$  , se ha investigado probando anticuerpos contra cada uno de los polipéptidos ( 18 ). Ninguno de ellos , por si sólo inhibe la actividad de ATPasa de la  $CF_1$  aislada . En cloroplastos , anti- $\alpha$  y anti- $\gamma$  inhiben la síntesis y la hidrólisis del ATP . Anti- $\alpha$  también inhibe la estimulación catalítica de captación de protones inducida por el ATP . La aglutinación de los cloroplastos es observada con anti- $\alpha$  y anti- $\beta$  , pero no con anti- $\gamma$  . Anti- $\epsilon$  ( 18 ) y anti- $\gamma$  ( 19 ) previenen la inhibición de la subunidad  $\epsilon$  de la  $CF_1$  previamente activada .

La composición de subunidades y el papel funcional de cada una de ellas se compara en la Tabla II .

Propiedades Catalíticas .- La  $CF_1$  purificada solamente presenta actividad de ATPasa y excepto por el intercambio  $Pi-^{18}O$  , ninguna otra reacción de intercambio como la de ATP-Pi ó la de ATP-ADP puede ser detectada .

Al igual que la enzima adosada a la membrana , la enzima aislada tiene actividad de ATPasa latente y debe ser activada por tratamientos como tripsina , calor ó por la incubación con altas concentraciones de ditioeritritol ( 10 , 20 , 21 ) .

A diferencia de la actividad ATPasa unida a la membrana , la cual es dependiente de  $Mg^{++}$  , la actividad ATPasa de la  $CF_1$  aislada es dependiente de  $Ca^{++}$  . Esta última bajo apropiadas concentraciones de ácidos dicarboxílicos y  $Mg^{++}$  , también presenta actividad ATPasa dependiente de Magnesio ( 22 ) .

T A B L A                      I I

Algunas propiedades de las subunidades que componen la  $CF_1$  de cloroplasto .

Subunidad	Peso Molecular	Probable Estequiometría	Funciones Sugeridas
Alfa	59 000	2	Regulatoria
Beta	56 000	2	Sitio Activo
Gamma	34 000	1	Transporte de Protones al Sitio Activo.
Delta	17 500	1	Unión a la membrana
Epsilon	13 500	2	Unión a la membrana, Inhibidor de ATPasa .



Los eventos que dan lugar a la aparición de la actividad de ATPasa no han sido dilucidados pero es posible que la activación ocurra como consecuencia de la disociación ó dislocación de la proteína inhibidora de la ATPasa ( 1 ), la cual se ha sugerido que es la subunidad epsilon .

Dado que la ATPasa contiene nucleótidos " fuertemente unidos " el proceso de activación pudiera implicar cambios en la afinidad de estos nucleótidos ( 23 ), ya sea liberando el ADP unido a sitios no intercambiables ó movilizándolo el ADP a sitios de intercambio .

El mecanismo de activación de la ATPasa depende de la energía , este proceso parece implicar cambios conformacionales que facilitan la reducción de enlaces disulfuro por compuestos reductores como el DTT ( 2 , 24 ) .

Recientemente se ha observado que la activación de la ATPasa implica la exposición de un enlace disulfuro en la subunidad  $\gamma$  ( 25 ). Dicho enlace puede ser bloqueado por N-etilmaleimida observándose , en consecuencia una inhibición tanto de la fotofosforilación como de la actividad de ATPasa inducida por la luz .

## INTRODUCCION

## I N T R O D U C C I O N

A través de toda la escala filogenética encontramos la existencia de  $H^+$ -ATPasas en mitocondrias de células eucarióticas, en cloroplastos de células vegetales y en membranas plasmáticas de bacterias aeróbicas ó anaeróbicas.

Siendo el ATP el recurso primario de energía para la mayoría de los procesos biológicos, resulta importante el conocimiento del funcionamiento de la  $H^+$ -ATPasa; complejo proteico que cataliza tanto la síntesis como la hidrólisis del ATP. Como se mencionó anteriormente, los complejos  $H^+$ -ATPasa se han aislado de numerosas fuentes, mostrando gran similitud en estructura y función. Además, resulta interesante añadir que todos los sistemas biológicos presentan como parte de su estructura, péptidos reguladores de las  $H^+$ -ATPasas.

Pullman y Monroy en 1963 (26) detectaron y aislaron una proteína mitocondrial de bajo peso molecular que específicamente inhibe la actividad hidrolítica del complejo ATPasa. Esta proteína es conocida como el inhibidor natural de la ATPasa y también ha sido aislada de levaduras (27), cloroplastos (28) y bacterias (29). Además de inhibir la hidrólisis del ATP es capaz de inhibir todas las reacciones dependientes de ATP (30) y se ha sugerido como un posible regulador de la ATPasa.

También se ha demostrado que la proteína inhibe la fotosforilación en cloroplastos ( 2 ) y la fosforilación oxidativa en mitocondrias ( 31 ) .

Inhibidores de la  $H^+$ -ATPasa aislados de corazón de res ( 26 ) , de hígado de rata ( 32 ) y de levaduras ( 27 ) han demostrado que éste péptido es diferente de las 5 subunidades que se encuentran formando parte de la  $F_1$  . En cambio , el inhibidor de la  $H^+$ -ATPasa de cloroplasto parece ser la subunidad épsilon . Nelson y colaboradores en 1972 ( 28 ) aislaron el inhibidor de la ATPasa de cloroplasto a partir de  $CF_1$  y demostraron que presentaba una sola banda en geles de poliacrilamida y un peso molecular semejante a la subunidad épsilon .

En general , los péptidos inhibidores de las  $H^+$ -ATPasas son estables al calor , álcalis , ácidos y al frío . Presentan un peso molecular de alrededor de 10 000 daltones y son inactivados por tripsina y por quimotripsina .

A excepción del inhibidor de cloroplasto ( subunidad épsilon ) todos los inhibidores requieren de un período de incubación con la  $F_1$  antes del ensayo para obtener una máxima respuesta inhibitoria . Siendo esta interacción incrementada en presencia de ATP , cationes divalentes (33) y a pH ácido de 6.5-6.8 ( 26 , 31 ) :

Trabajos recientes han demostrado ( 34 ) que el inhibidor de la ATPasa de corazón de res es no competitivo con respecto al ATP , ya que la unión del inhibidor a partículas submitocondriales ( partículas AS ) de corazón de res ó a la  $F_1$  de corazón no cambia la  $K_m$  para el ATP ó

la  $K_i$  para el ADP . Gomez-Puyou y colaboradores ( 37 ) encontraron una inhibición incompetitiva con ATP . Todos los resultados anteriores parecen indicar que el inhibidor no interactúa con el sitio catalítico de la  $F_1$  .

Recientemente Krull y Schuster ( 36 ) al estudiar la interacción del inhibidor con  $F_1$  usando como sustratos ATP e ITP , postularon la existencia de dos áreas de regulación en la enzima : una específica para nucleótidos y otra para el inhibidor .

Se ha sugerido que el inhibidor es desplazado del componente  $F_1$  del complejo  $H^+$  - ATPasa con el establecimiento de la fuerza protonotriz y que esta disociación induce la transición al estado activo ( 29,36), pero hasta ahora no existe una demostración directa de esta disociación física del inhibidor .

Trabajos previos ( 3, 37 ) han demostrado que ciertos cationes orgánicos , como la Octilguanidina afectan las propiedades catalíticas de la  $F_1$  y que en algunos aspectos su acción se asemeja al inhibidor natural de la ATPasa ; por ejemplo , ambos inhiben la actividad de ATPasa de partículas submitocondriales y  $F_1$  soluble , protegen a la  $F_1$  contra la inactivación por frío y afectan de manera muy similar la cinética de la actividad enzimática cuando se prueban en función de la concentración de Mg-ATP . Aunado a esto, la acción de la octilguanidina y el inhibidor natural son parcialmente aditivos , lo que ha permitido sugerir un posible sitio de acción común a ambos inhibidores .

Dada la gran similitud entre el efecto de la octilguanidina y el efecto del inhibidor natural en la actividad de las  $H^+$  - ATPasas se creyó conveniente su utilización como modelo de la acción del inhibidor natural .

En el curso de este trabajo , estudiamos la acción inhibitoria de la Octilguanidina en el cloroplasto , caracterizando su acción . Para ello , el efecto de la Octilguanidina sobre la  $H^+$  - ATPasa fué estudiada a dos niveles de integración , en el cloroplasto entero y en la  $CF_1$  aislada , lo cual nos permitió establecer semejanzas y diferencias con el inhibidor natural .

M A T E R I A L

Y

M E T O D O S

## Materiales y Métodos

### Aislamiento de Cloroplastos

El aislamiento de cloroplastos , Clase II ( sin membrana externa) se realizó siguiendo el método empleado por Mc Carty y col. ( 38 ) . Todas las operaciones se realizaron entre 0 y 4 °C . Se partió de 60 g de hojas de espinaca ( Spinacea oleracea L. ) previamente lavadas a las que se les disecó la vena central , antes de ser fragmentadas en pequeños pedazos. Posteriormente se homogenizan por 20" a velocidad máxima en una licuadora Osterizer modelo 403MV con 120 ml de medio de aislamiento consistente en : sacarosa 0.4 M , NaCl 10 mM y Tricine-NaOH 20 mM pH 8.0 . La suspensión se filtró a través de 4 capas de gasa y el filtrado se centrifugó 2 minutos a 200 x g en una centrifuga Sorvall refrigerada modelo RC-B5 , se descartó el sedimento que contenía células enteras , núcleos y paredes celulares . El sobrenadante se centrifugó 10 minutos a 3000 x g , obteniéndose un precipitado que contiene los cloroplastos el cual se lavó dos veces con 50 ml del siguiente medio : 0.4 M sacarosa , KCl 10 mM y Tricine-NaOH 20 mM pH 8.0 . Finalmente los cloroplastos resultantes se resuspendieron en 2 ml de medio de resuspensión que contiene los reactivos del medio anterior adicionados de BSA al 1 % y glicerol al 10 % como preservativos ( 39 ) . Se mantuvieron congelados durante dos semanas a -20 °C hasta el momento de usarse .

La Fig. 7 ilustra el esquema de aislamiento antes mencionado .



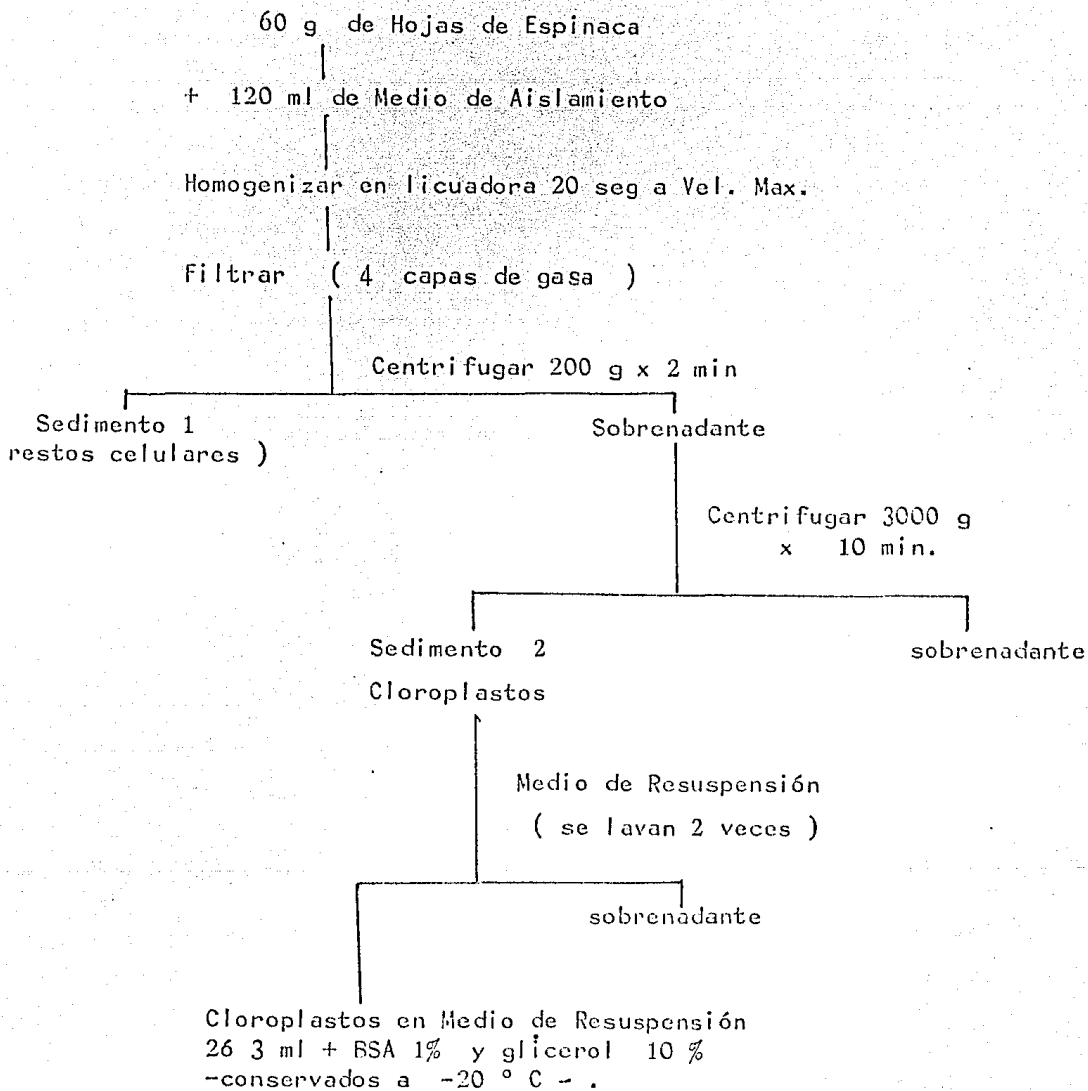


Fig. 7 .- Aislamiento de cloroplastos.

### Valoración del contenido de clorofila en cloroplastos :

La determinación del contenido de clorofila ( 40 , 41 ) en cloroplastos se realizó extrayendo 20  $\mu$ l de la suspensión de cloroplastos con 5 ml de acetona al 80 por 100 , la suspensión acétonica se mantiene en la oscuridad durante 5 minutos y se centrifugó en una centrífuga clínica a 200 g durante 5 minutos . Al extracto acétonico se le midió la absorbancia a 649 nm y 665 nm , utilizando acetona al 80 % como un blanco en un espectrofotómetro Carl Zeiss M4QIII 45261-PMQII 46250 .

El contenido de clorofila de la suspensión original se obtiene aplicando la fórmula :

$$\text{Clorofila total} : 6.45 ( A_{665} ) + 17.72 ( A_{649} ) .$$

### Determinación de la Actividad de ATPasa dependiente de $Mg^{++}$ en cloroplastos.

La suspensión de cloroplastos aislados con el método anterior y conservados a  $-20^{\circ}C$  se descongelan en baño a  $25^{\circ}C$  .

Para la evaluación de la actividad de ATPasa dependiente de  $Mg^{++}$  se requirió de un paso de activación previo que consistió en adicionar a la suspensión de cloroplastos conteniendo 0.2 mg de clorofila por ml Ditioneritrol 5-10 mM , Fenazina Metasulfato 0.05 mM , Tricine-NaOH 50 mM pH 8.0 y  $MgCl_2$  en un volumen final de 1 ml.

La mezcla de reacción fué iluminada durante 5 minutos con un haz de luz saturante proporcionado por una lámpara de proyector de 250 watts , colocada a una distancia de 30 cm. El haz luminoso se hace pasar a través de una solución de  $\text{CuSO}_4$  1% ( lente de Izawa ) con el objeto de concentrar el haz luminoso y eliminar los efectos calóricos de la luz . Para la determinación de la actividad de ATPasa- $\text{Mg}^{++}$  se tomaron alícuotas de 1 ml de cloroplastos activados y se transfirieron a tubos conteniendo la siguiente mezcla de incubación en un volumen final de 2.5 ml : 5 mM Tri-ATP pH 8.0 , 5 mM  $\text{MgCl}_2$  , 5 mM de Fosfoenolpiruvato , 5  $\mu\text{g}$  Piruvato Kinasa ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.74 mM, 50 mM Tricine-NaOH pH 8.0 . La concentración final de clorofila en la mezcla fué de 80  $\mu\text{g}$  por ml. La incubación se realizó por 10 minutos a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  en un baño con agitación ( American Optical modelo 496010 ) al cabo de los cuales la reacción se detuvo por la adición de TCA a la concentración final de 3 % .

La actividad de ATPasa- $\text{Mg}^{++}$  fué medida estimando colorimétrica\_ mente el fosfato inorgánico liberado del ATP por el método de Summer J.B.(42).

## Determinación Colorimétrica del Fosfato Inorgánico .

La suspensión de incubación precipitada con TCA se centrifugó 10 minutos a 2000 rpm en una centrífuga clínica . El contenido de fosfato inorgánico se midió en alícuotas de 2 ml de sobrenadante aforados a 2.6 ml con agua bidestilada a los que se les adicionaron sucesivamente 0.5 ml de  $H_2SO_4$  7.5 N , 0.5 ml de Molibdato de Amonio 6.6 % , 0.4 ml de Sulfato ferroso al 10% en  $H_2SO_4$  0.15 M después de 10 minutos se leyó la absorban-  
cia de cada muestra contra un banco de reactivos en un colorímetro Klett-Summerson con filtro 66 ( rojo ) . La evaluación del contenido de fosfato inorgánico se hizo contra una curva de calibración de una suspensión de  $KH_2PO_4$  a concentraciones en el rango de 0.25 a 1.0  $\mu$ mola de fosfato por ml.

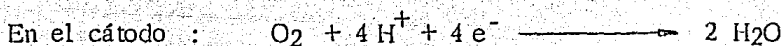
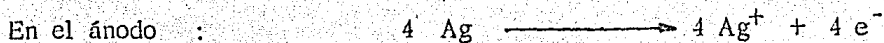
## Medida de la Velocidad del Transporte de Electrones en Cloroplastos :

La velocidad del transporte de electrones en cloroplastos se determinó midiendo el desprendimiento de oxígeno de la fotólisis del agua con un electrodo de oxígeno tipo Clark que tiene las ventajas con respecto al método manométrico , de su mayor sensibilidad , de permitir obtener velocidades iniciales y de obviar la interferencia de otros gases que simultáneamente pudieran desprenderse ó absorberse .

La medida de la concentración de oxígeno de una solución mediante el electrodo de oxígeno se basa en los métodos analíticos de polarografía . Esta técnica consiste en aplicar un potencial adecuado a un microelectrodo sumergido en una solución de un elemento electroreducible , como el oxígeno , y medir la corriente que se origina como consecuencia de su reducción en el electrodo . Para un potencial elegido , la intensidad de la corriente es función directa de la concentración del elemento . En el caso del oxígeno , la corriente generada es proporcional a la concentración de oxígeno disuelto en la solución cuando el voltaje es de 0.5 a 0.8 V .

El electrodo de tipo Clark consiste en un cátodo de platino y un ánodo de Ag-AgCl , inmersos en una solución saturada de Cloruro de Potasio y separados de la solución problema por una membrana de teflón permeable al oxígeno .

Prescindiendo de los estados redox intermedios , las reacciones que tienen lugar en los electrodos son las siguientes :



La regulación de la temperatura en la cámara de reacción se consigue haciendo pasar agua por una camisa que la rodea ; evitándose así oscilaciones de la temperatura que llevarían consigo cambios en la solubilidad del oxígeno y en consecuencia alterarían las medidas .

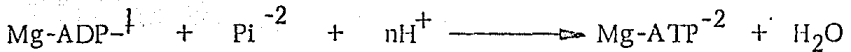
Mediante una barra magnética se consigue agitar el contenido de la cámara de reacción ; permitiendo de esta manera que el electrodo refleje la concentración real de oxígeno disuelto ; al evitar concentraciones locales de este elemento .

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 3 ml : 20 mM Tricine-NaOH pH 8.0 , sacarosa 100 mM , KCl 50 mM , MgCl<sub>2</sub> 5 mM , albumina libre de lípidos 0.1 % , 0.05 mM PMS y 20 µg Chl/ml . Para calibrar se emplearon 5 y 10 µl de Fe ( CN<sub>6</sub> )<sup>≡</sup> 0.05 M en lugar de PMS .

La velocidad de consumo ó producción de oxígeno se determinó comparando con la deflección de la pluma ocasionada después de adicionar una cantidad conocida de Fe ( CN<sub>6</sub> )<sup>≡</sup> .

## Fotofosforilación

La Fotofosforilación fué determinada de la tasa de consumo de  $H^+$  de acuerdo con la reacción :



donde  $n = 0.96$  a pH 8.0 en presencia de  $Mg^{+2}$  . Los cambios de pH inducidos por luz fueron detectados con la combinación de un electrodo de pH y un registrador . El trazo fué calibrado en equivalentes de  $H^+$  titulando la muestra con 0.001 N HCl . La iluminación actínica ( 560 nm ) fué aportada por una lámpara de 250 watts proporcionada por un proyector al pasarla por una solución 1%  $CuSO_4$  como filtro de luz infraroja . Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 3 ml , a temperatura ambiente .

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 3 ml : KCL 100 mM ,  $MgCl_2$  5 mM , 20-30  $\mu g$  Chl / ml , ADP 1 mM ,  $KH_2PO_4$  3 mM y PMS 30  $\mu M$  llevándose a cabo a pH 8.0 .

Para medir la captación de protones inducida por luz , la mezcla de reacción consistió de 100 mM sacarosa , 2 mM  $MgCl_2$  , 25 mM NaCl , 0.25 mM Tricine-NaOH pH 8.0 y 48  $\mu g$  Chl / ml llevándose a cabo a pH 6.0 .

## Aislamiento y Purificación del factor $CF_1$ de Cloroplastos

El aislamiento del factor de acoplamiento  $CF_1$  de cloroplastos se llevó a cabo por dos métodos diferentes :

A) Extracción con Baja Fuerza Iónica en presencia de EDTA ( 14 ).

B) Extracción por Cloroformo en presencia de Ditioeritritol ( 13 ).

Habiéndose obtenido mejor rendimiento y actividad específica empleando este último método .

A ) Extracción del  $CF_1$  con Baja Fuerza Iónica en presencia de EDTA

Aproximadamente 1 Kg de hojas de espinaca se homogenizaron en licuadora en medio aislamiento consistente en : 0.4 M de sorbitol , 0.02 M de Tricine-NaOH pH 8.0 y 10 mM NaCl obteniéndose cloroplastos siguiendo el método descrito anteriormente . El precipitado de cloroplastos se lavó 3 veces con NaCl 10 mM . Posteriormente se resuspendió en agua a una concentración de clorofila de 0.1 mg/ml ( 4 ó más litros ) y se le agregó EDTA a la concentración final de 0.75 mM . Se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se añadió a la suspensión DEAE- Celulosa previamente equilibrada en una relación de 1 ml de resina hidratada por cada 3 mg de clorofila y la mezcla se agitó durante 20 minutos . Posteriormente se filtró a través de un embudo Buchner de filtro poroso 40-60 C con el objeto de remover



la mezcla de reacción y eliminar los cloroplastos . La resina se lavó en el embudo haciendo pasar varias veces volúmenes de 200 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7.8 , 1 mM ATP y 2 mM EDTA y se montó en la columna de 10 x 25 cm . El  $CF_1$  fué eluído con 1 ml por mg de clorofila del mismo amortiguador conteniendo además 0.4 M NaCl ( Ver patrón de elución en la Fig. 13 ) . Las fracciones conteniendo proteína fueron precipitadas con  $(NH_4)_2SO_4$  a 50 % de saturación , en presencia de 2 mM EDTA , 2 mM ATP y 20 mM Tricine-NaOH pH 8.0 , almacenándose así a 4 °C .

Activación de la DEAE-Celulosa : Se equilibró con 0.5 N de NaOH , se lavó con agua hasta la neutralidad del lavado , se equilibró con 0.5 N HCl y se lavó con agua hasta la neutralidad del lavado . Finalmente se equilibró con 50 mM de Tris-HCl pH 7.8 y 1 mM ATP .

La Fig. 8 ilustra el esquema de purificación antes mencionado .

B ) Extracción del  $CF_1$  por el método del Cloroformo . ( Fig. 9 ).

Se partió de cloroplastos aislados por el método descrito anteriormente a partir de 1 Kg de hojas de espinaca . Los cloroplastos se hincharon en 10 mM de NaCl y 2 mM Tricine-NaOH pH 8.0 durante 20 minutos en hielo . La suspensión de cloroplastos se centrifugó a 10000 g por 10 minutos , resuspendiéndose a 2.5-3 mg Chl/ml en 0.25 M sacarosa , 10 mM Tris- $SO_4$  pH 7.6 , 1 mM EDTA , 2 mM ATP y 5 mM DTE a la temperatura ambiente. A esta suspensión de cloroplastos se le agregó medio volumen de cloroformo

agitándose energicamente en agitador Vortex durante 15 segundos . La emul\_ sión obtenida se separó por centrifugación a 300 g por 5 minutos a tem\_ peratura ambiente .

Se removió la capa superior acuosa , la cual contiene el  $CF_1$  , y se centrifugó a 12 000 g durante 30 minutos a temperatura ambiente . Obte\_ niéndose así un sobrenadante amarillo que contiene la ATPasa latente .

El sobrenadante así obtenido , fué concentrado a un pequeño volu\_ men ( 3-5 ml ) por ultrafiltración con un filtro Amicon PM 30 . La pro\_ teína fué precipitada con  $(NH_4)_2SO_4$  a 50 % de saturación en presencia de 20 mM Tricine-NaOH pH 8.0 , 1 mM EDTA y 1 mM ATP almacenándose a 4 °C .

La pureza de las preparaciones se evaluó por el patrón de bandas en una electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y midiéndose la relación de fluorescencia 300/ 350 .

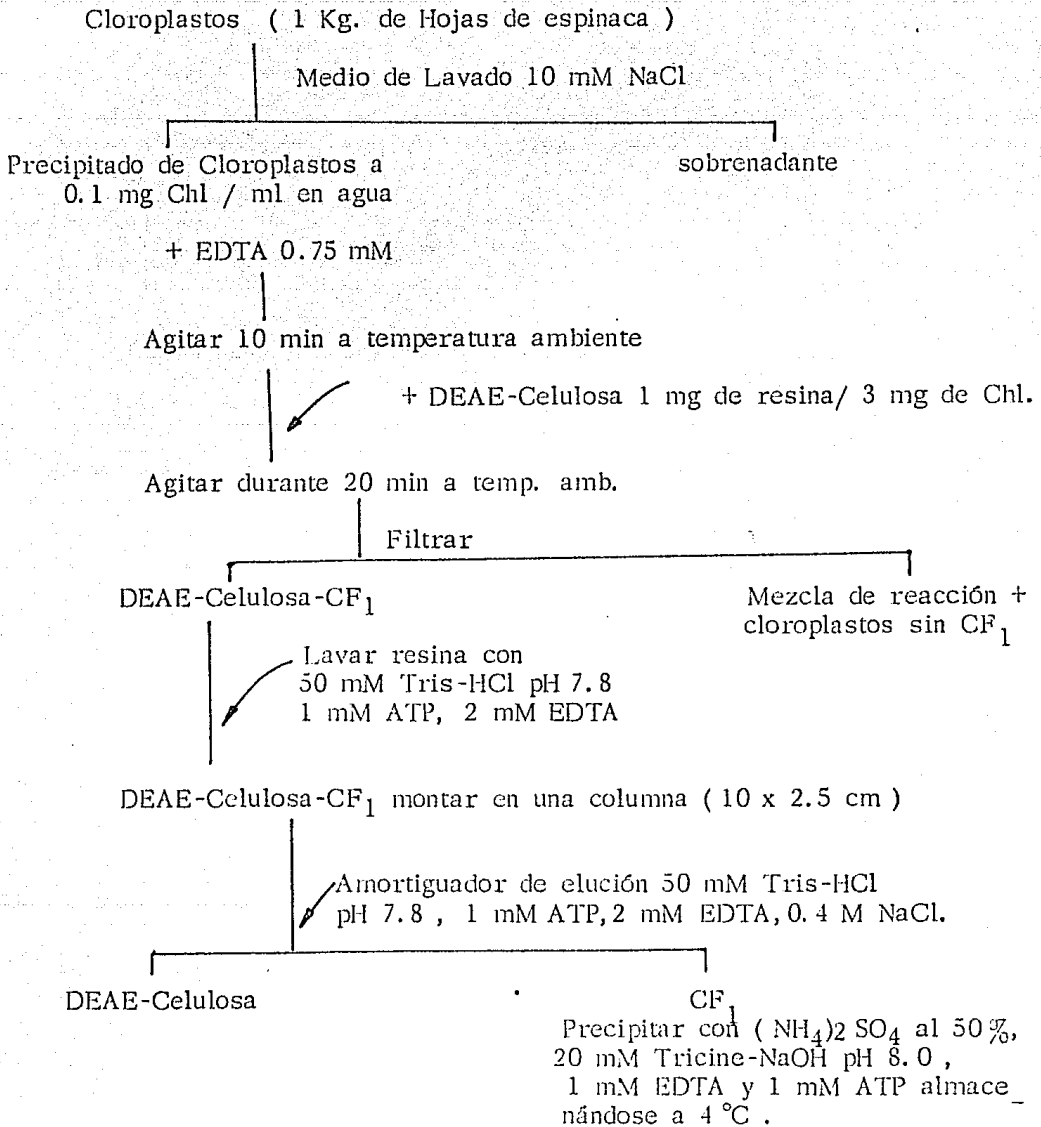


Fig. 8 Extracción de CF<sub>1</sub> con Baja Fuerza Iónica en presencia de EDTA .

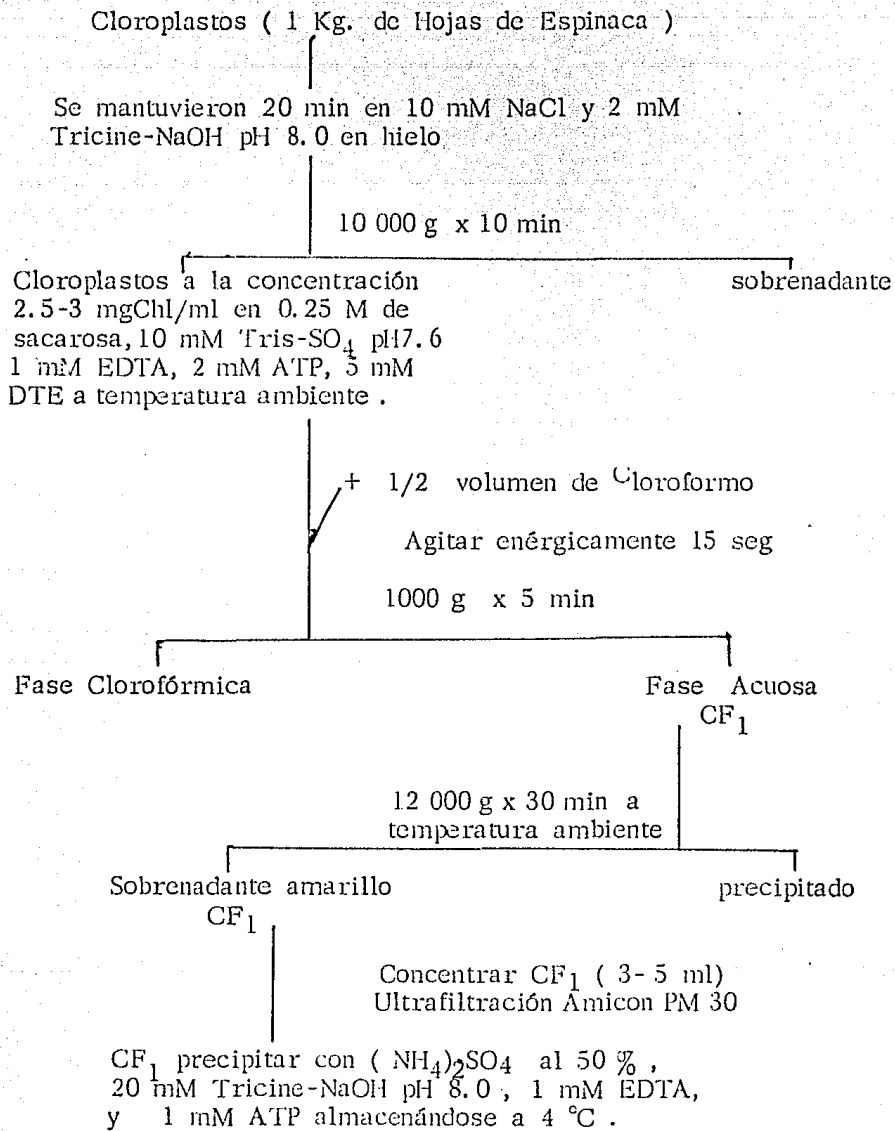


Fig. 9 . Extracción de CF<sub>1</sub> por el método del cloroformo .

## Electroforesis en Gel de Poliacrilamida .

Electroforesis en gel de poliacrilamida en placa según el método de Laemmli (44) se llevó a cabo en un aparato vertical a una concentración de 10 % de acrilamida y 0.26 % de bisacrilamida en presencia de 0.1 % de SDS .

Las muestras de proteína se resuspendieron en una solución conteniendo 0.1 % SDS, 20 mM Tris-HCl pH 7.8 , 0.1 %  $\beta$ - mercaptoetanol, 10 % sacarosa y 0.002 % Azul de Bromofenol. La electroforesis se llevó a cabo durante 5 horas a 40 mA .

Después de la electroforesis , los geles fueron teñidos en Azul de Coomasie R 0.5 % en 7 % de ácido acético y 30 % de metanol y desteñidos en una solución al 7 % de ácido acético y 30 % de metanol .

Relación de Fluorescencia      300/ 350 nm

Dado que la ATPasa de cloroplasto no contiene residuos de triptofano , la fluorescencia del CF<sub>1</sub> se eleva debido a residuos de tirosina a 302 nm en contraste con proteínas que contienen triptofano cuyo pico de emisión es a 350 nm . La intensidad del radio de fluorescencia 300 y 350 nm se correlaciona con la pureza de las preparaciones de CF<sub>1</sub> .

Muestras de 25  $\mu$ l se diluyen en 1 ml de 20 mM Tris-SO<sub>4</sub> pH 7.1 y se transfieren a una celda del fluorómetro . Las intensidades de fluores

cencia relativa a 300 y 350 nm se midieron a temperatura ambiente en un espectrofluorometro marca Farrand Mark I usando 280 nm de luz de excitación ( 12 ) .

Existen dos métodos de activación de la ATPasa soluble :

1. - Activación por tripsina .
2. - Activación por calor :

A partir de una alícuota de  $CF_1$  almacenado a  $4^{\circ}C$  en Sulfato de Amonio al 50% conteniendo aproximadamente 700  $\mu g$  de proteína se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos y el precipitado blanco se re-suspendió en un volumen mínimo de 10 mM de Tricine-NaOH pH 8.0 y 1 mM EDTA .

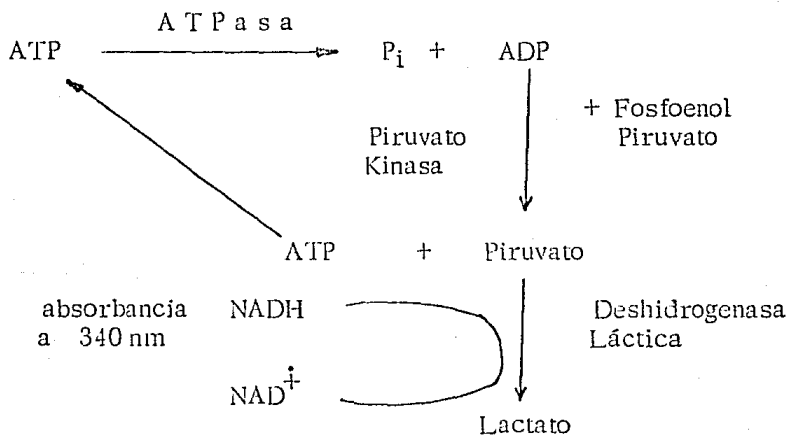
En un volumen final de 0.3 ml , conteniendo 50 mM Tricine-NaOH pH 8.0 , 30 mM ATP , 5 mM DTE se agregó la enzima a una concentración de proteína de 1500  $\mu g$  / ml . La mezcla se sumergió en un baño de agua a  $62^{\circ}C$  durante 2 minutos e inmediatamente se transfirió a un baño de agua a temperatura ambiente .

La actividad de ATPasa soluble puede ser medida en presencia de iones  $Ca^{++}$  ó  $Mg^{++}$  según las condiciones del medio .

### Actividad de ATPasa dependiente de $Mg^{++}$

La actividad de la enzima fué determinada midiendo el cambio de absorbancia a 340 nm del NADH en función del tiempo a temperatura ambiente , en presencia de un sistema regenerador de ATP y altas concentraciones de Bicarbonato de Sodio .

Se tomaron alícuotas de la enzima activada conteniendo 5  $\mu$ g de  $CF_1$  y se adicionaron a las celdas del espectrofotometro que contenían en un volumen final de 1 ml: 35  $\mu$ g NADH, 5 mM PEP , 5  $\mu$ g Piruvato Kinasa, 20  $\mu$ g Deshidrogenasa Láctica , 3 mM ATP pH 8.0, 2 mM  $MgCl_2$ , 40 mM Tris-HCl pH 8.0 y 60 mM de Bicarbonato de Sodio ( 45 ) . Las reacciones que se llevan a cabo se esquematizan de la manera siguiente :



La proteína fué estimada de acuerdo a Lowry y col. ( 46 ) .

## Actividad de ATPasa dependiente de $\text{Ca}^{++}$

La actividad de la enzima se determinó midiendo la cantidad de fosfato inorgánico liberado por la hidrólisis enzimática de ATP .

Se tomaron alícuotas de la enzima activada conteniendo  $5 \mu\text{g}$  de  $\text{CF}_1$  y se adicionaron a tubos conteniendo la mezcla de incubación siguiente :  $5 \text{ mM ATP}$  ,  $5 \text{ mM CaCl}_2$  ,  $50 \text{ mM Tricine-NaOH}$  pH 8.0 en un volumen final de  $1 \text{ ml}$  . La mezcla se incubó  $10 \text{ minutos}$  a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  , al termino del cual la reacción se detuvo adicionando TCA a una concentración final de  $5 \%$  . Se centrifugó la suspensión  $10 \text{ minutos}$  a  $2000 \text{ rpm}$  en una centrifuga clínica y se tomaron  $0.8 \text{ ml}$  del sobrenadante para la estimación del fosfato inorgánico liberado .



## Preparación de cloroplastos sin CF<sub>1</sub>

Cloroplastos aislados según el método anteriormente descrito se resuspendieron en un pequeño volumen con 10 mM NaCl , se determinó la concentración de clorofila y se ajustó a 1.5 mg/ml añadiendo NaCl 10 mM . La suspensión se diluyó a 0.1 mg/ml de clorofila con 0.75 mM EDTA pH 8.0 y 5 mM Tricine - NaOH pH 8.0 , incubándose a 4 °C durante 20 minutos. Al termino de los cuales se agregó 4 a 5 volúmenes del mismo medio y se centrifugó a 45,000 g durante 20 minutos. El precipitado obtenido que contiene los cloroplastos sin CF<sub>1</sub> se resuspendió en un pequeño volumen de NaCl 10 mM .

Cálculos realizados en la Fig. 19 y Tabla VI.

Los trazos potenciométricos de la fig. 18 se convirtieron en equivalentes de protones por una curva de titulación con HCl y se trataron matemáticamente con una doble exponencial, expresada en la siguiente ecuación:

$$(\Delta H^+)_{t=\infty} - (\Delta H^+)_t = (\Delta H_1^+) e^{-k_1 t} + (\Delta H_2^+) e^{-k_2 t}$$

donde  $(\Delta H^+)_{t=\infty}$  equivale a la cantidad de protones captados por el cloroplasto en el equilibrio;  $(\Delta H^+)_t$  equivale a la cantidad de protones retenida por los cloroplastos al tiempo  $t$  durante la fase oscura de la liberación de protones; y  $(\Delta H_1^+)$ ,  $(\Delta H_2^+)$ ,  $k_1$  y  $k_2$  representan la cantidad de protones translocados por dos reacciones sucesivas en el tiempo y sus respectivas constantes de velocidad de primer orden (73).

## RESULTADOS

## R E S U L T A D O S

En experimentos previos realizados en cloroplastos ( 2 ) , mi\_ tocondrias ( ) y partículas submitocondriales ( 36 ) se ha observado que al establecer la fuerza protomotriz generada por el transporte de electro\_ nes existe en el sistema fosforilante la liberación concomitante ó concerta\_ da de nucleótidos y la movilización de la proteína inhibidora de un sitio inhibitorio a otro sitio no inhibitorio , permitiendo que la actividad catalíti\_ ca se manifieste .

La demostración directa de la movilización del inhibidor no se ha logrado aún y en este trabajo realizado en cloroplastos se ha tratado de conocer más a fondo este importante mecanismo de regulación utilizando a la octilguanidina como un inhibidor modelo ya que el cloroplasto , al presentar el sistema fosforilante hacia la fase acuosa , evita los fenómenos de permeabilidad , resultando así un excelente sistema para estudiar la regulación ejercida en el sistema fosforilante por la proteína inhibidora .

En la primera parte de este trabajo se utilizó la medida de la actividad de la ATPasa dependiente de  $Mg^{++}$  inducida por luz en cloroplas\_ tos enteros tipo II , como monitor de la movilización del inhibidor .

La actividad de ATPasa dependiente de  $Mg^{++}$  en cloroplastos tie\_ ne ciertos requerimientos ilustrados en la Tabla III para obtener las condi\_ ciones óptimas de determinación de la actividad . Se hizo necesario emplear un sistema regenerador de ATP que mantiene el sustrato a concentraciones

Óptimas a lo largo de la determinación y evita la acumulación de ADP que es un inhibidor competitivo de la enzima ( 49 ). La actividad en estas condiciones es de 55.9  $\mu$ moles Pi/ hr / mg de Chl , baja de una manera importante si la determinación se realiza en ausencia de un sistema regenerador de ATP . La actividad es dependiente del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones , de ahí que sea necesario la adición de un aceptor de electrones artificial como PMS para observar la actividad acoplada ( 50 ) .

El requerimiento estricto del óxido reductor DTE en la determinación de la ATPasa observado en la Tabla III , pone de manifiesto la posible función de grupos sulfhidrilos en el proceso catalítico ( 11 ) .

Además datos reportados en la literatura ( 2, 11 ) indican que el DTE activa la ATPasa sin remover al inhibidor , ya que después de lavar el DTE la actividad de ATPasa regresa a su estado latente . De lo cual se ha sugerido que el DTE modifica la interacción del inhibidor con la  $CF_1$  ( 1 ) .

La actividad de ATPasa adosada a la membrana es dependiente de  $Mg^{++}$  ( 20 ) y la enzima solubilizada dependiente de  $Ca^{++}$  por lo que un buen criterio de integridad estructural es la medida de la ATPasa dependiente de  $Ca^{++}$  . La Tabla III muestra que en nuestra preparación la actividad detectada de ATPasa- $Ca^{++}$  de cloroplastos es bastante baja lo que indica que la preparación tiene poca ATPasa soluble . Por otro lado y confirmando la observación anterior , la inhibición por DCCD específica para la en

T A B L A    I I I

Caracterización de la ATPasa dependiente de  $Mg^{++}$ , activada por luz en cloroplastos de Spinacea oleracea L.

Condiciones	Actividad de ATPasa umoles Pi / hr / mg de Chl.
Completa	55.9
-PMS	0.48
-DTE	0.03
-Sistema Regenerador de ATP ( PEP + P. K. )	30.67
+ DCCD	18.84
+ $CaCl_2$	2.25
Completa + $NH_4Cl$ 0.74 mM	86.0

Alícuotas de cloroplastos conteniendo 0.2 mg de clorofila fueron previamente activadas durante 5 minutos por luz ( proporcionada por un proyector con lámpara de 250 watts ) en un volumen final de 1 ml en el siguiente medio de activación : Tricine-NaOH 50 mM pH 8.0,  $MgCl_2$  5 mM , PMS 0.05 mM y DTE 10 mM . Al final del periodo de incubación se agregó 1.5 ml de mezcla de reacción de ATPasa- $Mg^{++}$  que contenía ATP 5 mM ,  $MgCl_2$  5 mM , PEP 5 mM , 5  $\mu g/ml$  de piruvato kinasa y  $NH_4Cl$  0.74 mM incubándose durante 10 minutos a 35 °C .

zima particulada se observa en las preparaciones de cloroplastos utilizadas en el presente trabajo .

La Fig. 10 ilustra el efecto de diferentes concentraciones de octilguanidina en la actividad de ATPasa dependiente de  $Mg^{++}$  en cloroplastos enteros , observándose que la capacidad inhibidora del compuesto es mayor en la enzima activada por luz , mostrando una mayor sensibilidad que la reportada en partículas submitocondriales de corazón de res , en las que a concentraciones de  $700 \mu M$  se obtuvo un 80 % de inhibición ( 3 ) misma que se obtiene con concentraciones de  $60 \mu M$  sobre la ATPasa de cloroplastos . En ambas preparaciones , cloroplastos y mitocondrias de corazón existe una fracción de ATPasa insensible a la octilguanidina . En el sistema de cloroplasto existe una actividad basal observada en la oscuridad que también muestra cierta sensibilidad , aproximadamente 20 % , a bajas concentraciones de octilguanidina , que no se incrementa a mayores concentraciones del compuesto .

Dado que la actividad de ATPasa es estrictamente dependiente del acoplamiento del transporte de electrones , el efecto inhibitor observado podría deberse a un efecto primario sobre la cadena , que afectara indirectamente la actividad de ATPasa del cloroplasto . La Tabla IV muestra que la octilguanidina aún a concentraciones cercanas a 1 mM no inhibe el transporte de electrones basal , indicándonos su especificidad como inhibidor del sistema fosforilante .

Es importante hacer notar que la actividad de ATPasa inducida

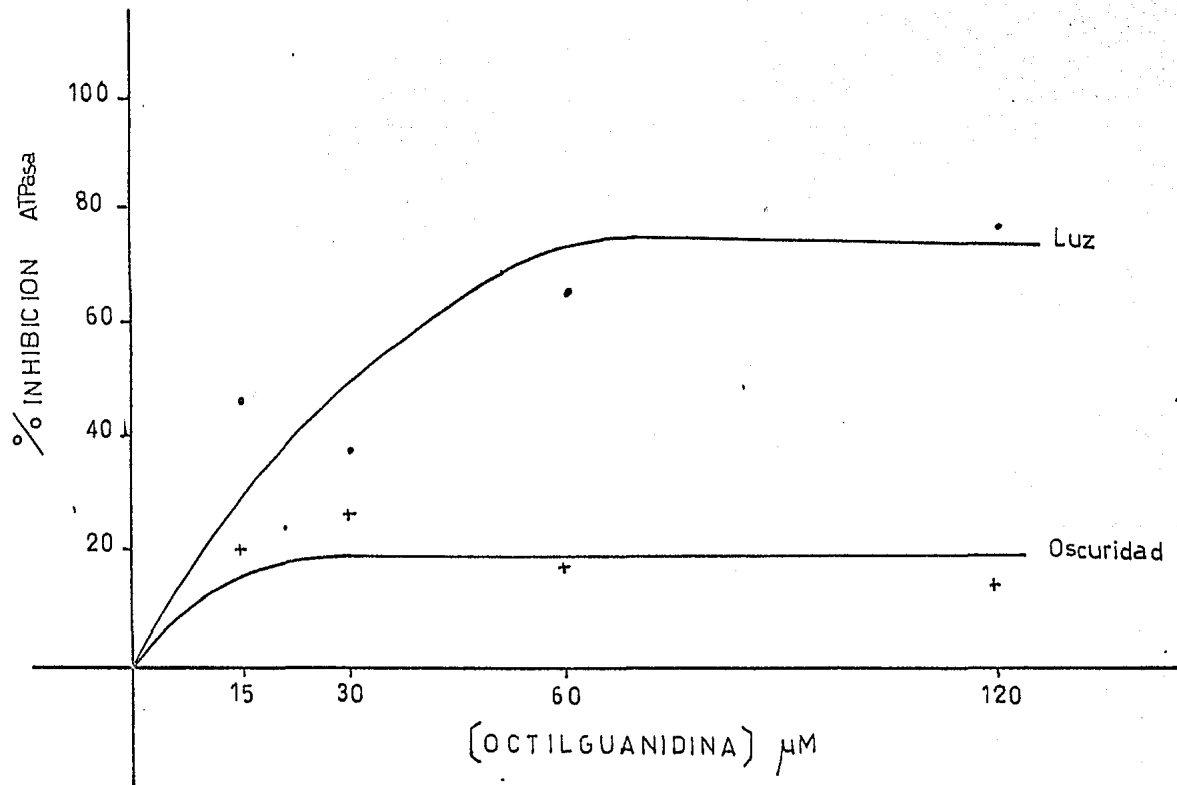


Fig. 10 Efecto de diferentes concentraciones de Octilguanidina sobre la actividad ATPasa-Mg<sup>++</sup> basal (mantenida en la oscuridad) e inducida por luz. Cloroplastos equivalentes a 0.2 mg de clorofila activados por luz ó mantenidos en la oscuridad en un volumen final de 1 ml en el medio de activación (Ver Tabla III) durante 5 min, se les agregó 1.5 ml de la mezcla de reacción de ATPasa-Mg<sup>++</sup> y se incubaron con las cantidades indicadas de Octilguanidina durante 10 min a 35°C.



T A B L A I V

Efecto de la Octilguanidina en el transporte de electrones de cloroplastos de Spinacea oleracea L.

Octilguanidina	$\mu\text{M}$	$\mu \text{ eq. } e^- / \text{ hr} / \text{ mg Chl.}$
0		347.69
120		325.90
200		325.90
333		412.80
666		412.80
999		347.69

El transporte de electrones se midió directamente en una suspensión de cloroplastos a través del consumo de oxígeno usando PMS 50  $\mu\text{M}$  como aceptor de electrones . Los cloroplastos conteniendo 20  $\mu\text{g} / \text{ ml}$  de clorofila se iluminaron en presencia de octilguanidina a las concentraciones indicadas en un medio conteniendo : Tricine-NaOH 20 mM pH 8.0 , sacarosa 100 mM , KCl 50 mM ,  $\text{MgCl}_2$  5 mM , PMS 50  $\mu\text{M}$  y albúmina desgrasada 0.1 % .

por la luz es el resultado de dos procesos sucesivos superpuestos : a) el proceso de activación , que probablemente implica la movilización de la proteína inhibidora de su sitio inhibitorio con la consecuente aparición de la actividad y b) la catálisis propiamente dicha . Por lo que se diseñaron experimentos que trataran de dilucidar en cual de ambos procesos actuaba la octilguanidina , ya que los experimentos de la Fig. 10 y el ilustrado en la Fig. 11 mostraban una mayor y más rápida inhibición en la enzima activada por la luz que en la actividad observada en la oscuridad .

La Fig. 11 muestra que el efecto inhibitorio del compuesto es máximo a 2 min de preincubación , en el que se observa el máximo de activación por luz y que la inhibición no aumenta a mayor tiempo de exposición del inhibidor en la preincubación . Lo cual indicaría que el efecto del inhibidor se debía a una interferencia en el proceso de activación por luz , el cual como ya se ha descrito , parece implicar el desplazamiento de la proteína inhibidora de su sitio inhibitorio ( 2, 3 ) en un proceso dependiente de energía .

Tomando en cuenta que en trabajos anteriores se había sugerido que la activación por DTE se debía al desplazamiento de la proteína inhibidora , se diseñaron los experimentos ilustrados en la Fig. 12 y 13 en los que se ensayó el efecto de la octilguanidina sobre la actividad de ATPasa en la presencia y ausencia de DTE en la luz y oscuridad .

Los datos presentados en la Fig. 12 ilustran el hecho de que en la estimulación de la actividad de ATPasa inducida por luz es necesaria la

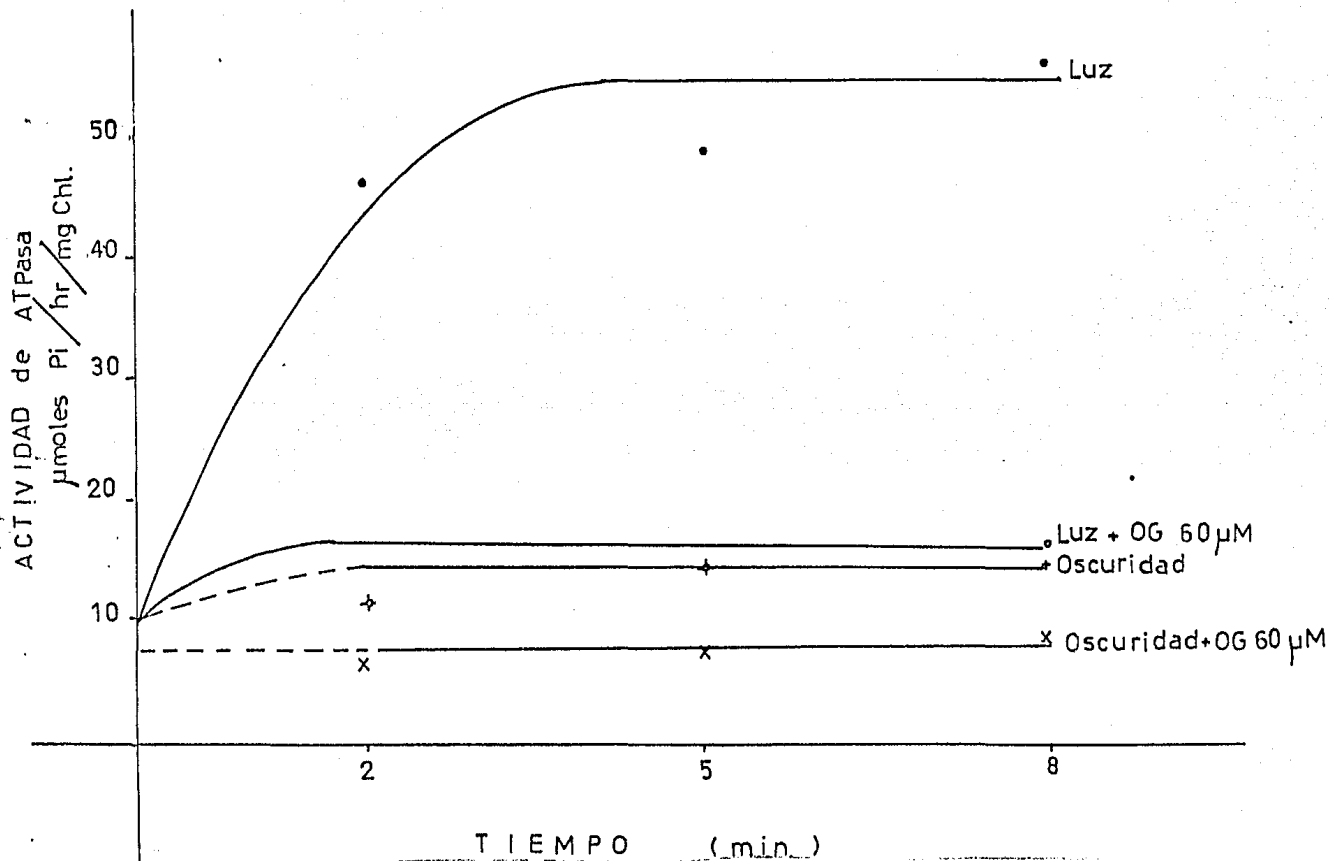


Fig. 11 . Efecto del Tiempo de Activación ó preincubación de Cloroplastos en la actividad de ATPasa-Mg<sup>++</sup> basal e inducida por la luz . Alícuotas de cloroplastos conteniendo 0.2 mg/ml de clorofila activados por la luz ó mantenidos en la oscuridad en los tiempos indicados , se transfirieron a la mezcla de reacción de ATPasa-Mg<sup>++</sup> y se incubaron con y sin Octilguanidina 60  $\mu\text{M}$  durante 10 min a 35 °C .

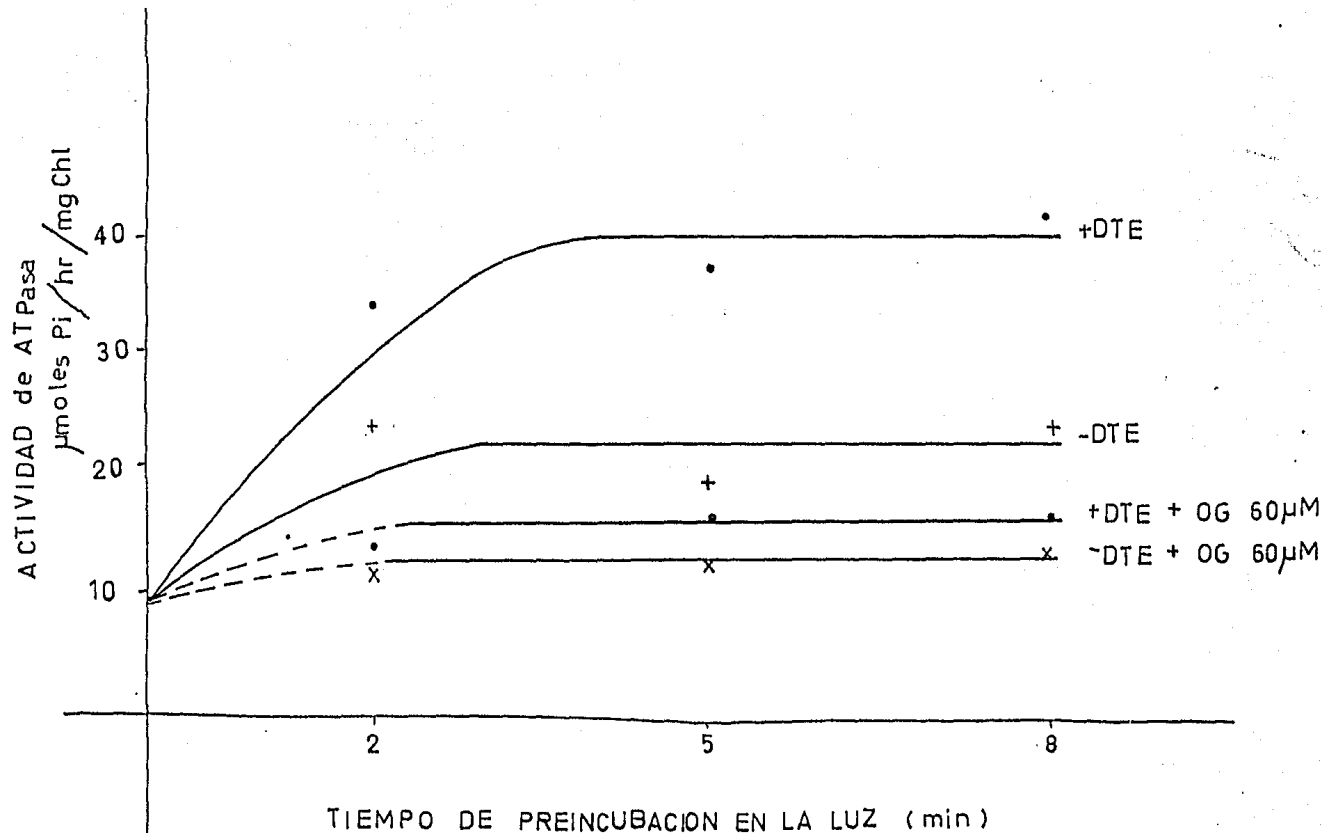


Fig. 12 . Efecto del Ditioneotritol sobre la Actividad de ATPasa inducida por la luz . Alícuotas de cloroplastos conteniendo 0.2 mg/ ml de clorofila fueron activadas por la luz en los tiempos indicados en presencia ó ausencia de DTE . Posteriormente se transfirieron a la mezcla de ATPasa-Mg<sup>++</sup> , incubándose cada muestra con y sin Octilguanidina 60 µM durante 10 min a 35 °C .

presencia de DTE para que esta se lleve a cabo ya que en ausencia de DTE los niveles de actividad de ATPasa son similares a la actividad basal ( ATPasa mantenida en la oscuridad ), en la misma figura se puede observar que la octilguanidina tiene un efecto inhibitor mas pronunciado sobre la ATPasa inducida por luz y en presencia de DTE . Lo cual podría indicar que se requiere de la movilización del inhibidor inducido por luz y DTE para que el efecto de la octilguanidina se manifieste . Es decir que se requiere de una enzima previamente activada para que la octilguanidina inhiba . En la Fig. 13 se estudió el efecto del DTE en la actividad basal con los cloroplastos mantenidos en la oscuridad . A pesar de que la actividad es baja y no existen grandes diferencias en presencia de DTE , la poca actividad existente es sensible al efecto inhibitor de la octilguanidina sugiriendo que se requiere una enzima activa para observar el efecto . Ambas figuras ( 12 y 13 ) parecen indicar que el efecto de la octilguanidina es preferentemente sobre la actividad , basal o inducida por la luz y DTE . Sin embargo quedaba por aclarar si la octilguanidina también inhibía ó modificaba el proceso de activación .

Siguiendo esta línea de pensamiento se diseñaron experimentos para separar el proceso de activación de la enzima de la actividad de esta y así poder puntualizar el efecto producido por la octilguanidina . En el experimento ilustrado en la Fig. 14 se redujo al mínimo el tiempo de activación : ( 30 seg ) y se emplearon distintas concentraciones de

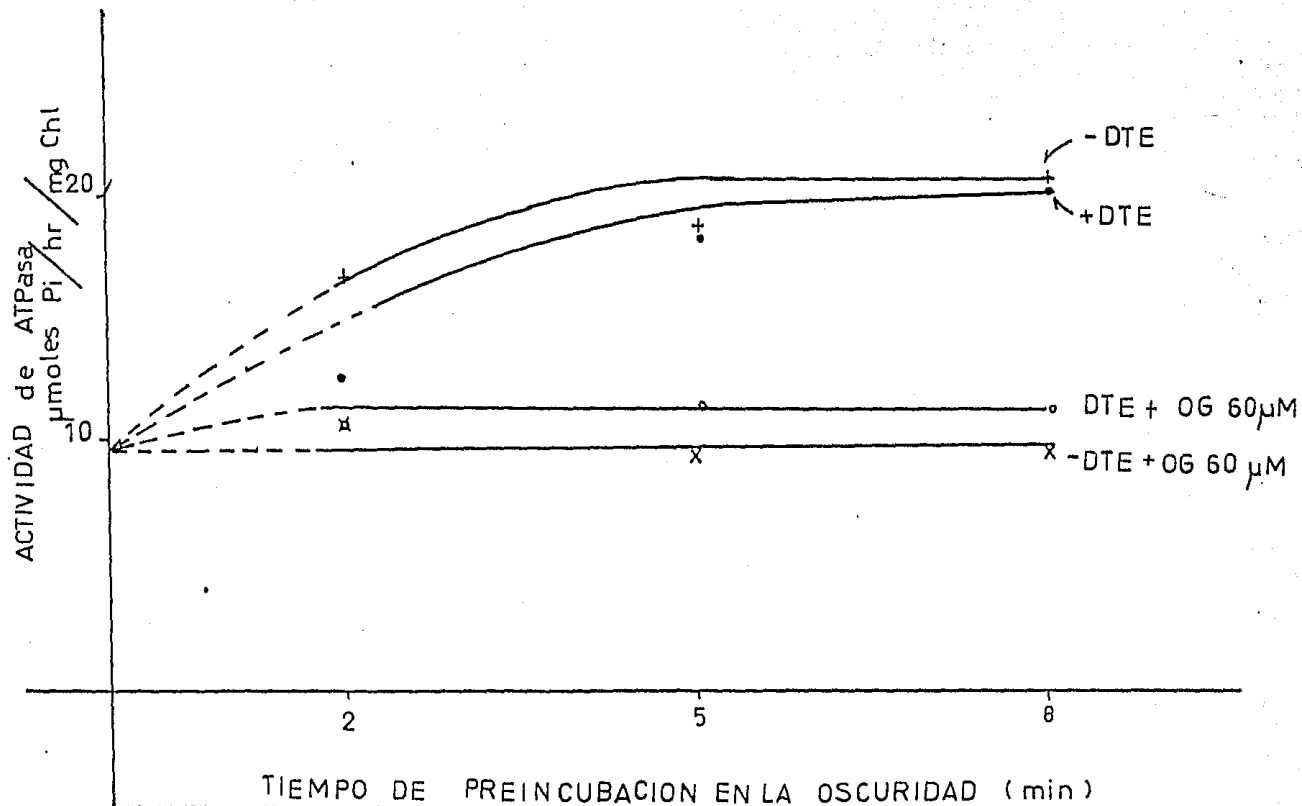


Fig. 13 . Efecto del Ditioeritritol sobre la Actividad de ATPasa basal . Alicuotas de cloroplastos conteniendo 0.2 mg/ml de clorofila fueron mantenidas en la oscuridad en los tiempos que se indican con y sin DTE . Posteriormente se transfirieron a la mezcla de ATPasa-Mg<sup>++</sup> , incubándose con y sin Octilguanidina 60  $\mu\text{M}$  durante 10 min a 35 °C .

octilguanidina ; tanto durante el proceso de activación como durante la medida de la actividad ; observándose que existe el mismo grado de inhibición producido por la octilguanidina a las diferentes concentraciones ensayadas si la enzima estuvo expuesta al inhibidor sólo durante la medida de la actividad como en la enzima expuesta al inhibidor en las dos fases la de activación y la de actividad . Esto nos permite concluir que la octilguanidina es un inhibidor específico de la actividad de ATPasa dependiente de  $Mg^{++}$  y que no parece ejercer ningun efecto en el proceso de activación inducido por la luz y DTE .

En un experimento semejante ilustrado en la Tabla III se observa que la inhibición de la octilguanidina sobre la actividad de ATPasa es solamente debida a su acción en la actividad de ésta y no sobre el proceso de activación , ya que el por ciento de inhibición observado es igual al que se presenta cuando la octilguanidina sólo está durante el período de incubación de la enzima activada .

En el experimento I de la Tabla V muestra que la adición de la octilguanidina en el período de preincubación ó activación de la enzima , no incrementa el porciento de inhibición ( 88 % ) obtenido cuando sólo se expone la enzima al inhibidor durante la medida de la actividad . Determinándose también , como muestra el experimento 2 de la misma Tabla , que el porciento de inhibición observado sólo depende de la concentración final de la octilguanidina durante el período de incubación de la ATPasa .

Habiéndose establecido que la acción inhibitora de la octilguanidina se ejerce sobre el sistema fosforilante medido como actividad de ATPasa se procedió a medir la reacción de síntesis de ATP . Como se muestra en

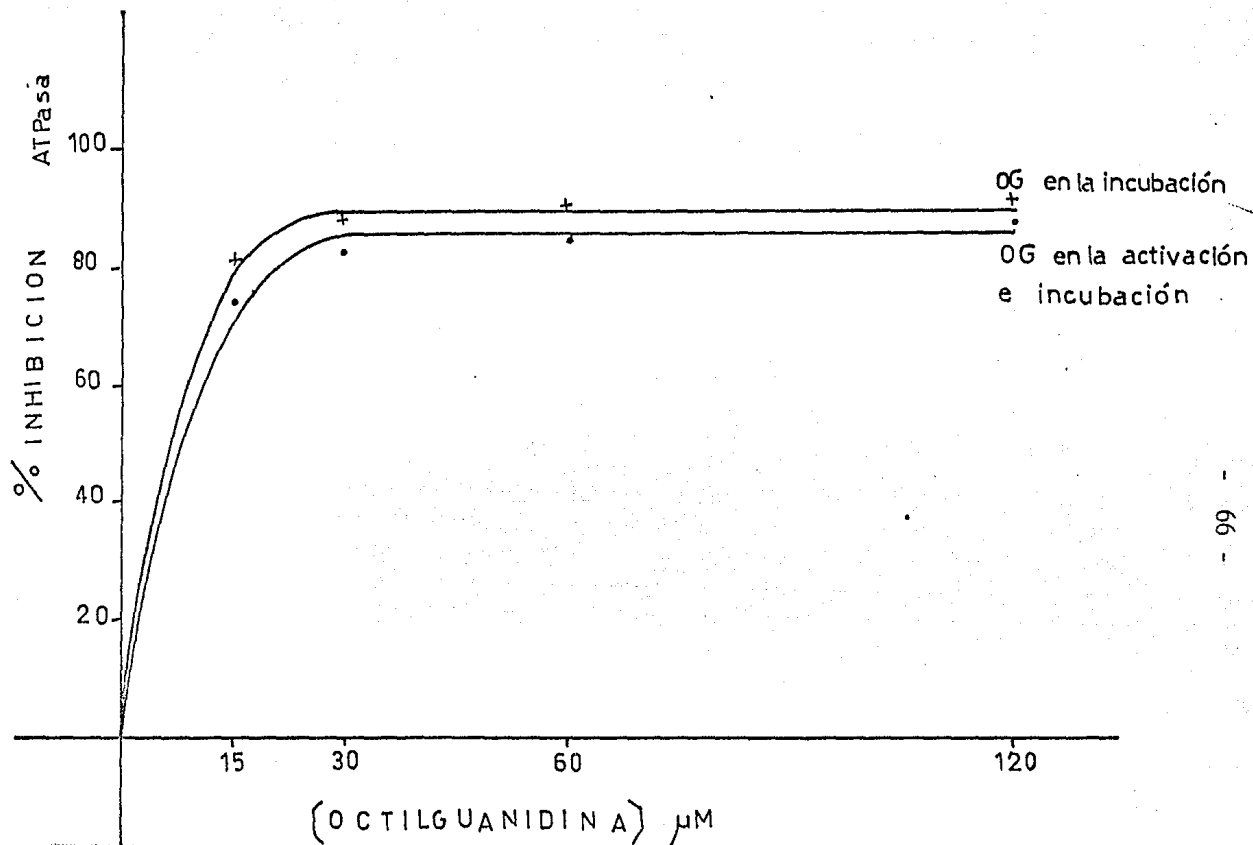


Fig. 14 . Efecto de la Octilguanidina sobre la activación y actividad de ATPasa-Mg<sup>++</sup> en cloroplastos . Alícuotas de cloroplastos conteniendo 0.2 mg/ml de clorofila fueron activadas con luz saturante durante 30 seg con y sin octilguanidina a las concentraciones indicadas . Posteriormente se incubaron con las cantidades indicadas de octilguanidina durante 10 min a 35 °C .



## T A B L A V

Acción Inhibitoria de la Octilguanidina sobre la Actividad de ATPasa  $-Mg^{++}$  de cloroplasto .

	Preincubación con Octilguanidina	Incubación con Octilguanidina	% Actividad ATPasa
Control	-	-	100
Exp. 1	60 $\mu$ M	60 $\mu$ M	11.3
	-	60 $\mu$ M	12.5
Exp. 2	60 $\mu$ M	24 $\mu$ M	53.08
	-	30 $\mu$ M	53.3

Alícuotas de cloroplastos conteniendo 0.2 mg/ ml de clorofila se activaron en la ausencia y en presencia de octilguanidina 60  $\mu$ M durante 5 min por luz . Al final del período de activación se agregó 1.5 ml de mezcla de reacción de ATPasa- $Mg^{++}$  que contenía ATP 5 mM pH 8.0 ,  $MgCl_2$  5 mM , PEP 5 mM , 5  $\mu$ g de piruvato kinasa ,  $NH_4Cl$  0.74 mM y octilguanidina 60  $\mu$ M donde se indica , incubándose 10 min a 35 °C .

la Fig. 15 al comparar la sensibilidad a la octilguanidina de la reacción de ATP sintetasa y de la reacción de ATPasa ; se encontró una sensibilidad mucho mayor a la octilguanidina de la reacción ATPasa . Por ejemplo ,  $30 \mu\text{M}$  de octilguanidina producen un 60% de inhibición de la actividad ATPasa , mientras a esa misma concentración unicamente se inhibe en un 20% la actividad de ATP sintetasa . Esta misma diferente sensibilidad de la ATPasa y de la sintetasa se observó con el inhibidor natural en partículas submitocondriales de corazón de res en las que éste sólo inhibe la primera fase de la síntesis de ATP pero inhibe en mucho mayor proporción a la ATPasa ( 51 ) .

Este hecho aunado a otras observaciones podría indicar que existen sitios diferentes para la síntesis y la hidrólisis del ATP susceptibles de ser estudiados separadamente en presencia de octilguanidina . Sin embargo , a concentraciones elevadas de octilguanidina la sintetasa es más sensible a la inhibición por octilguanidina que la ATPasa ya que a concentraciones de  $160 \mu\text{M}$  la sintetasa alcanza el 100% de inhibición , mientras que en la ATPasa no se observa más que el 70% de inhibición .

Para caracterizar el tipo de inhibición producida por la octilguanidina sobre la actividad de ATPasa en cloroplastos íntegros , se procedió a determinar los parámetros cinéticos . En la Fig. 16 se ilustra la actividad de ATPasa medida a diferentes concentraciones de ATP en presencia y ausencia de octilguanidina  $15 \mu\text{M}$  . Los datos obtenidos , graficados en una curva de Lineaweaver-Burk indican que la octilguanidina actúa como un

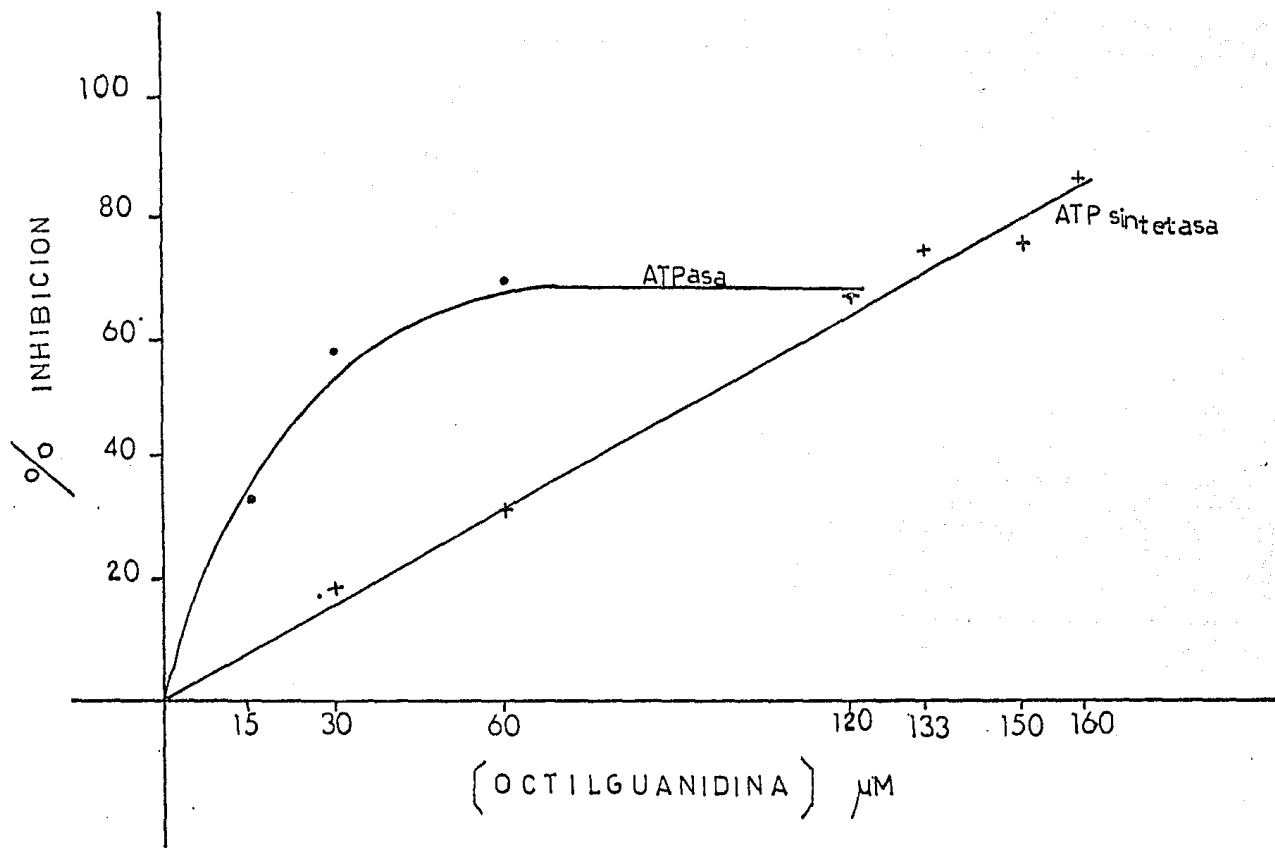


Fig. 15 . Efecto de la Octilguanidina sobre la actividad de ATPasa-Mg<sup>++</sup> y la de Fotofosforilación . La actividad de ATPasa-Mg<sup>++</sup> fué medida como se describió anteriormente ( Tabla III ) . La fotofosforilación se determinó de la tasa de consumo de H<sup>+</sup> . La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 3 ml : KCl 100 mM , MgCl<sub>2</sub> 5 mM , 20-30 μg/ ml de clorofila , ADP 1 mM , KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM y PMS 30 μM llevándose a cabo a pH 8.0.

inhibidor no competitivo de la hidrólisis del ATP , modificando solamente la velocidad máxima , sin alterar el valor de la  $K_m$  el cual fué de 1.25 mM , similar al reportado por otros autores ( 3 ) .

Al graficar los datos ( 72 ) como se ilustra en la Fig. 17 , se obtuvo el valor de la  $K_i = 9.25 \mu M$  bastante más baja que la observada en partículas submitocondriales de corazón de res que es de  $270 \mu M$  , indicando que el inhibidor tiene una alta afinidad por la enzima .

Los datos experimentales obtenidos hasta ahora , indicaban que la octilguanidina actuaba sobre el complejo ATPasa , el cual consta de dos segmentos : una parte hidrofílica ó factor de acoplamiento  $CF_1$  , que cataliza la síntesis ó hidrólisis de ATP y una parte hidrofóbica o factor  $CF_0$  cuya función principal es la de permitir el paso de protones a través de la membrana . Con el fin de establecer el sitio de acción de la octilguanidina en el complejo ATPasa , separamos funcional y estructuralmente los dos segmentos que componen este complejo y estudiamos el efecto sobre estos de la octilguanidina . Por lo cual se procedió a estudiar :

A. - El transporte de  $H^+$  en el cloroplasto entero y en cloroplastos carentes de  $CF_1$  .

B. - La actividad de ATPasa en el complejo  $CF_1$  purificado .

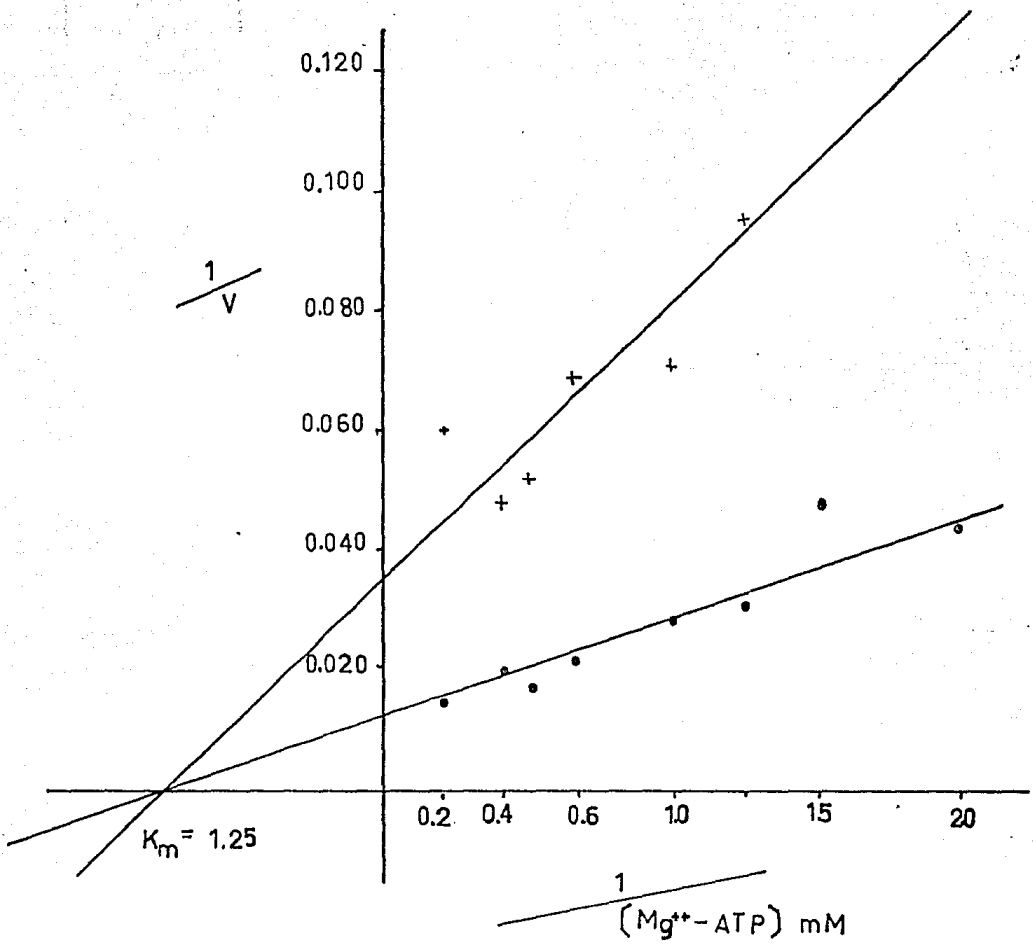


Fig. 16 . Efecto de la Octilguanidina en la actividad de ATPasa-Mg<sup>++</sup> de cloroplastos con diferentes concentraciones de ATP , representación de Lineaweaver -Burk . Se usaron las mismas condiciones experimentales de la Fig. 10 , en presencia de 15  $\mu$ M de octilguanidina (+) ó ausencia de octilguanidina (·) .

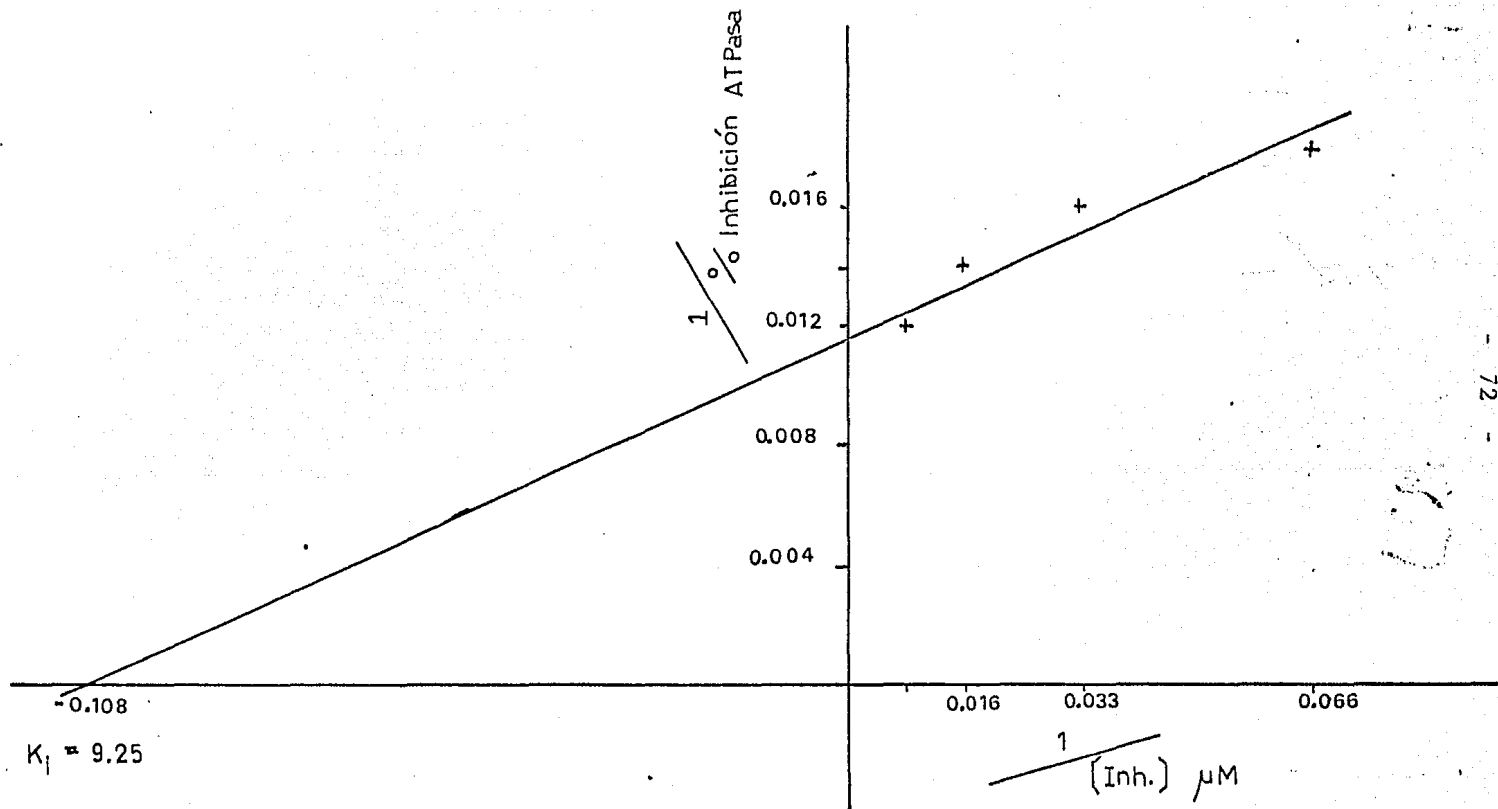


Fig. 17 . Doble recíproca del % de inhibición de la actividad de ATPasa-Mg<sup>++</sup> vs. concentración del inhibidor elaborada con los datos de la Fig. 10 .

A. - Efecto de la Octilguanidina sobre el transporte de Protones ó Factor  $CF_0$  .

El experimento ilustrado en la Fig. 18 realizado con cloroplastos enteros muestra el efecto de diferentes concentraciones de octilguanidina en la captación de protones inducida por la luz . Observándose que con concentraciones bajas de octilguanidina , del orden de las requeridas para inhibir la ATPasa no producen ningún efecto sobre el transporte de  $H^+$  y que se requiere de concentraciones altas de octilguanidina para modificar ó alterar el trazo característico producido por la bomba de protones .

Con el análisis cinético de la liberación de  $H^+$  de la Fig. 18 , se obtuvieron los valores de las constantes  $k_1$  y  $k_2$  correspondientes a las constantes de velocidad de liberación de  $H^+$  de la fase rápida y de la fase lenta respectivamente , ilustrados en las figuras 19 y 20 . La octilguanidina a concentraciones elevadas modifica ambas constantes de velocidad probablemente atribuibles a efectos inespecíficos sobre la permeabilidad de los protones .

La Tabla VI muestra un análisis comparativo del efecto de diferentes concentraciones de octilguanidina sobre la captación de  $H^+$  , actividad de ATPasa y la fotofosforilación de cloroplastos enteros , observándose que su acción inhibitoria es altamente específica para la porción hidrofílica ó  $CF_1$  , ya que inhibe a la ATPasa de una manera importante desde una concentración de  $15 \mu M$  de octilguanidina . Por otro lado  $50 \mu M$  de octilguanidina produce muy poco efecto en la captación y liberación

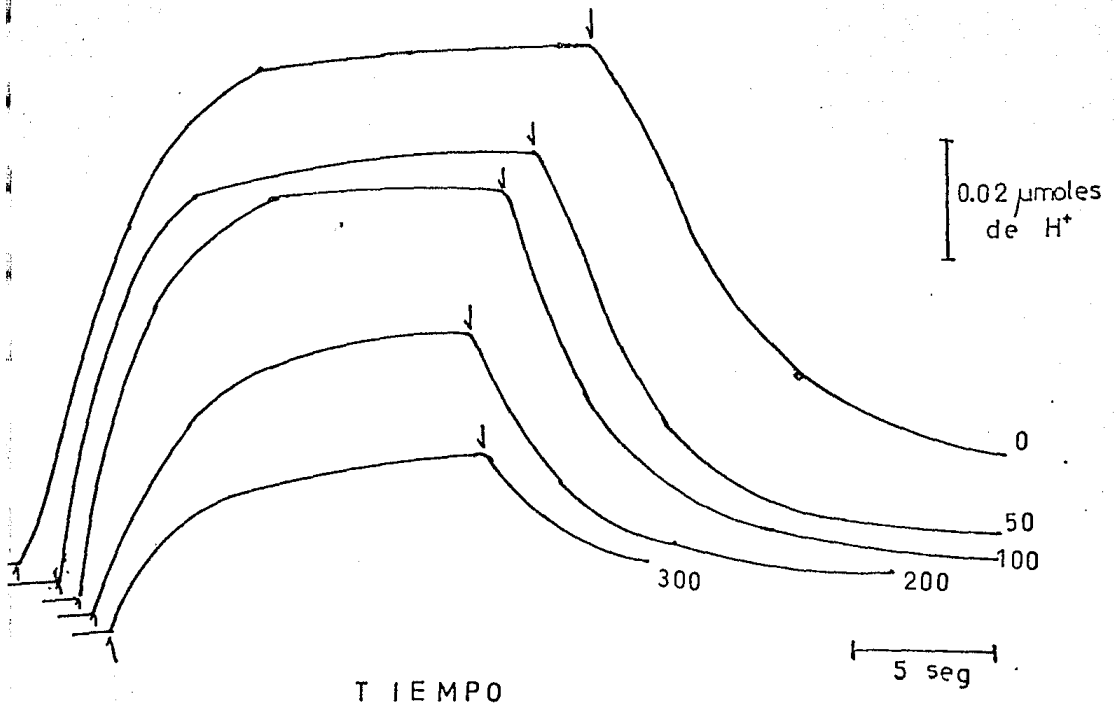


Fig. 18 . Efecto de la Octilguanidina en la Translocación de Protones inducida por la luz . La mezcla de reacción ( 3 ml ) contiene sacarosa 0.1 M ,  $MgCl_2$  2 mM , Tricine-NaOH 0.25 mM pH 8.0 , PMS 10  $\mu$ M , 20  $\mu$ g/ml de clorofila y las cantidades indicadas de Octilguanidina .  $\uparrow$  indica el momento de exponer los cloroplastos a la luz y  $\downarrow$  indica cuando la fuente luminosa se apaga .



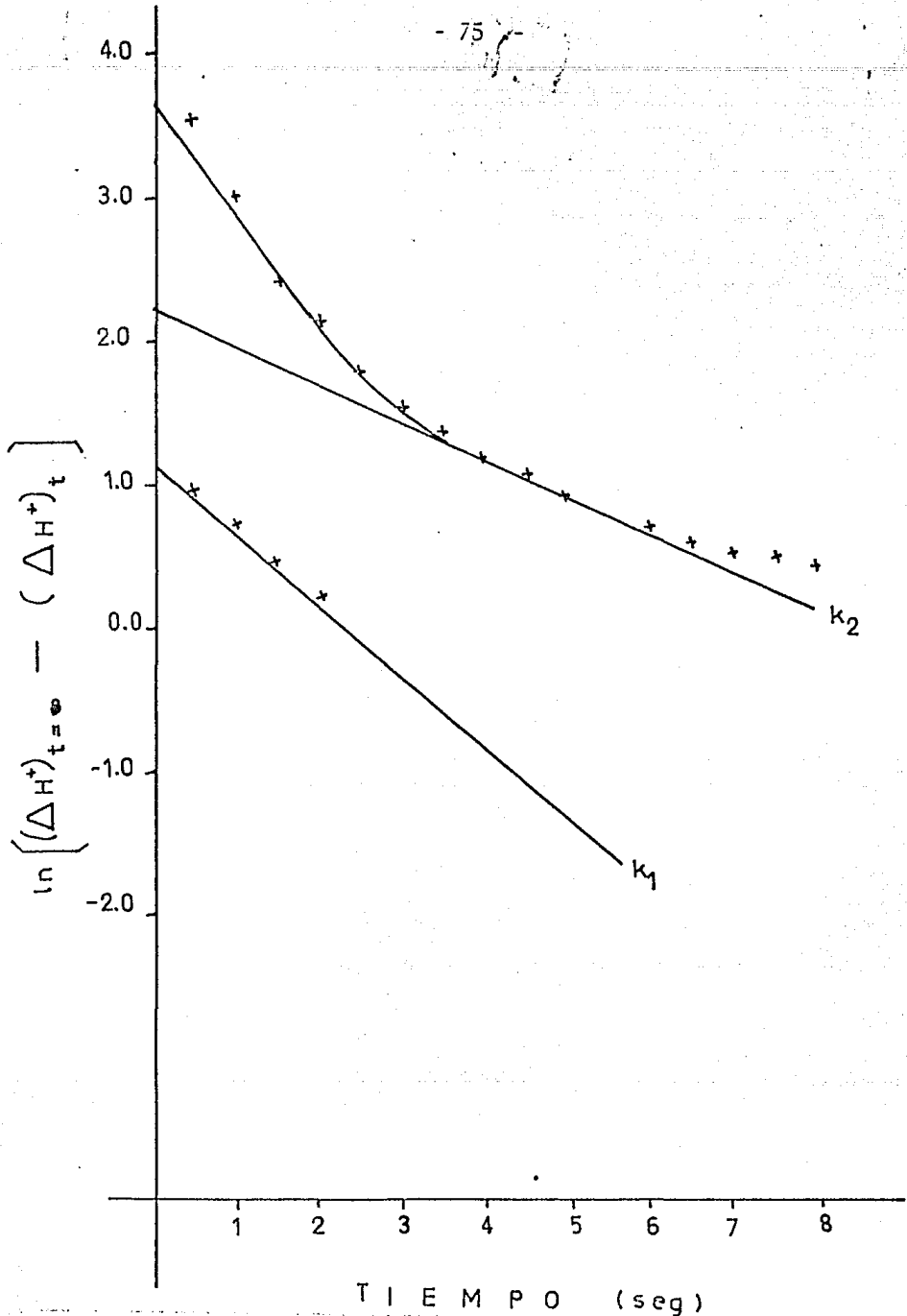


Fig. 19 . Analisis cinético de la liberación de protones en cloroplastos. La liberación de protones fué matemáticamente separada en 2 reacciones de primer orden ( 73 ). Condiciones experimentales especificadas en la Fig. 18 .

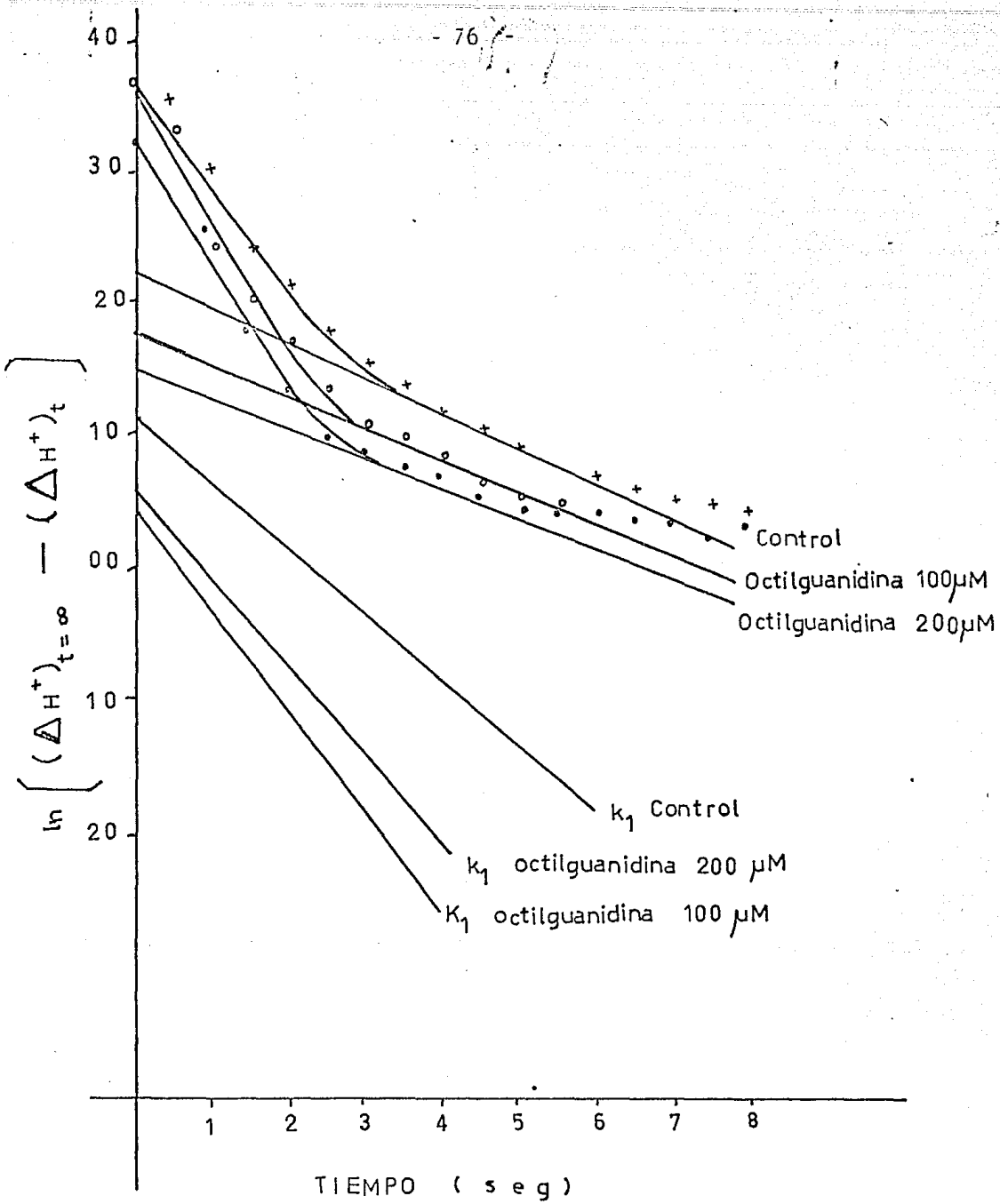


Fig. 20 . Cinética de la liberación de  $\text{H}^+$  en cloroplastos en presencia de diferentes concentraciones de octilguanidina . ( Condiciones experimentales especificadas en la Fig. 18 ) .

de protones que empieza a mostrar variaciones a concentraciones mayores de  $100 \mu\text{M}$ , lo cual tal vez implique efectos inespecíficos ó de otro tipo de la octilguanidina. A altas concentraciones, si se comparan los valores de  $t_{1/2}$  de la salida de protones, podemos observar que la octilguanidina estimula la liberación de protones, modificando en mayor grado la  $k_1$  ó constante de velocidad de la fase rápida y muy ligeramente la  $k_2$  ó constante de velocidad de la fase lenta. Nuevamente la comparación de la alta sensibilidad a la actilguanidina observada en la ATPasa contrasta con la resistencia de la fotofosforilación que a bajas concentraciones de octilguanidina permite separar ambas reacciones.

La remoción de  $\text{CF}_1$  ó factor de acoplamiento de la membrana de tilacoides resulta en un gran incremento en la permeabilidad de protones, por lo que el trazo característico asociado con la captación de protones desaparece ( 52, 53 ). Estudios previos han demostrado que ciertos compuestos como el trifenil estaño ( 54 ) ó el DCCD ( 55 ) restablecen la captación de protones en cloroplastos a los que se les ha eliminado el complejo enzimático  $\text{CF}_1$ , bloqueando la salida de protones al interactuar con el canal de protones ó  $\text{CF}_0$ . Utilizando este tipo de preparación es posible estudiar el canal de  $\text{H}^+$  aislado sin interferencia del efecto sobre la ATPasa. En los experimentos de la Fig. 21, la eliminación de  $\text{CF}_1$  produce una disminución importante en la captación y salida de  $\text{H}^+$  ( trazo c ) en comparación con la observada en cloroplastos íntegros ( trazo a ). La adición de DCCD a los cloroplastos sin  $\text{CF}_1$  restablece

T A B L A                      V I

Efectos Comparativos de Diferentes Concentraciones de Octilguanidina  
 en la ATPasa , la Fotofosforilación y la Captación de H<sup>+</sup> .

Octilguanidina uM	ATPasa μmoles Pi/h/mg Chl	Fotofosforilación μmoles ATP/h/mg Chl	Captación de H <sup>+</sup> μmoles H <sup>+</sup> /mg Chl	t 1/2 seg	k <sub>1</sub> seg <sup>-1</sup>	k <sub>2</sub> seg <sup>-1</sup>
-	46.25	221	1.6	5.9	0.44	0.16
50	18.75	152	1.3	5.9	-	-
100	13.25	73.4	1.1	4.3	0.65	0.32
200	-	30.6	0.82	3.6	0.64	0.24
300	-	-	0.45	2.9	-	-

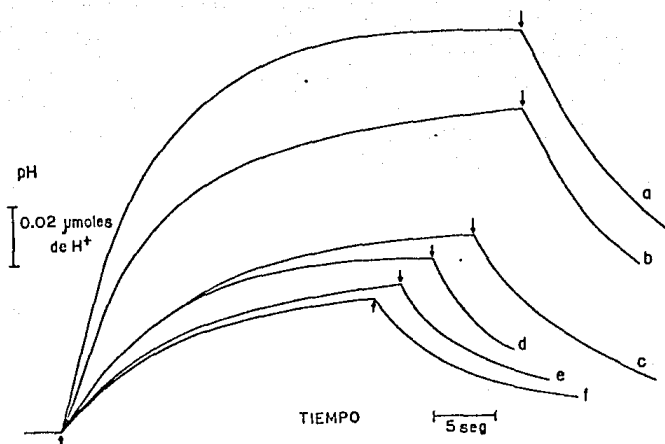


Fig. 21 . Efecto de diferentes inhibidores en la captación de  $H^+$  .  
 Las condiciones experimentales son similares a la Fig. 18.  
 a) Cloroplastos íntegros ; b) Cloroplastos carentes de  $CF_1$   
 en presencia de  $55 \mu M$  de DCCD; c) Cloroplastos sin  $CF_1$   
 d) Cloroplastos sin  $CF_1$  con Octilguanidina  $50 \mu M$  ;  
 e) Cloroplastos sin  $CF_1$  con Octilguanidina  $150 \mu M$  ;  
 f) Cloroplastos sin  $CF_1$  con Octilguanidina  $300 \mu M$  .

el trazo original , indicando que el inhibidor del flujo de  $H^+$  permite la acumulación de  $H^+$  y su disipación al apagar la luz . Sin embargo la adición de diferentes concentraciones de octilguanidina no produce el efecto del DCCD sino al contrario inhibe la captación y modifica la salida probablemente debido a una acción detergente inespecífica en la membrana ó por efecto de la octilguanidina en la  $CF_1$  residual de las partículas .

#### B. - Efecto de la Octilguanidina sobre la ATPasa soluble ó $CF_1$ .

Se utilizaron dos métodos para aislar la ATPasa . La Fig. 22 muestra el patrón de elución de la  $CF_1$  en la columna de DEAE- Celulosa que corresponde a uno de los métodos empleados . Tambien se obtuvo la enzima utilizando el método de extracción con cloroformo . El grado de pureza de ambas preparaciones se determinó en geles de poliacrilamida con SDS , como se ilustra en la Fig. 23 en la que se observa aproximadamente un 80% de pureza de acuerdo con la actividad específica reportada , además de mostrar que contiene las 5 subunidades antes mencionadas .

A diferencia del factor de acoplamiento mitocondrial  $F_1$  , el  $CF_1$  de cloroplastos no posee actividad de ATPasa a menos que sea apropiadamente activada . La exposición de la enzima a la tripsina ( 10 ) , calor ( 17 ) ó altas concentraciones de DTT ( 20 ) inducen la transición hacia una ATPasa activa la cual es dependiente de calcio .

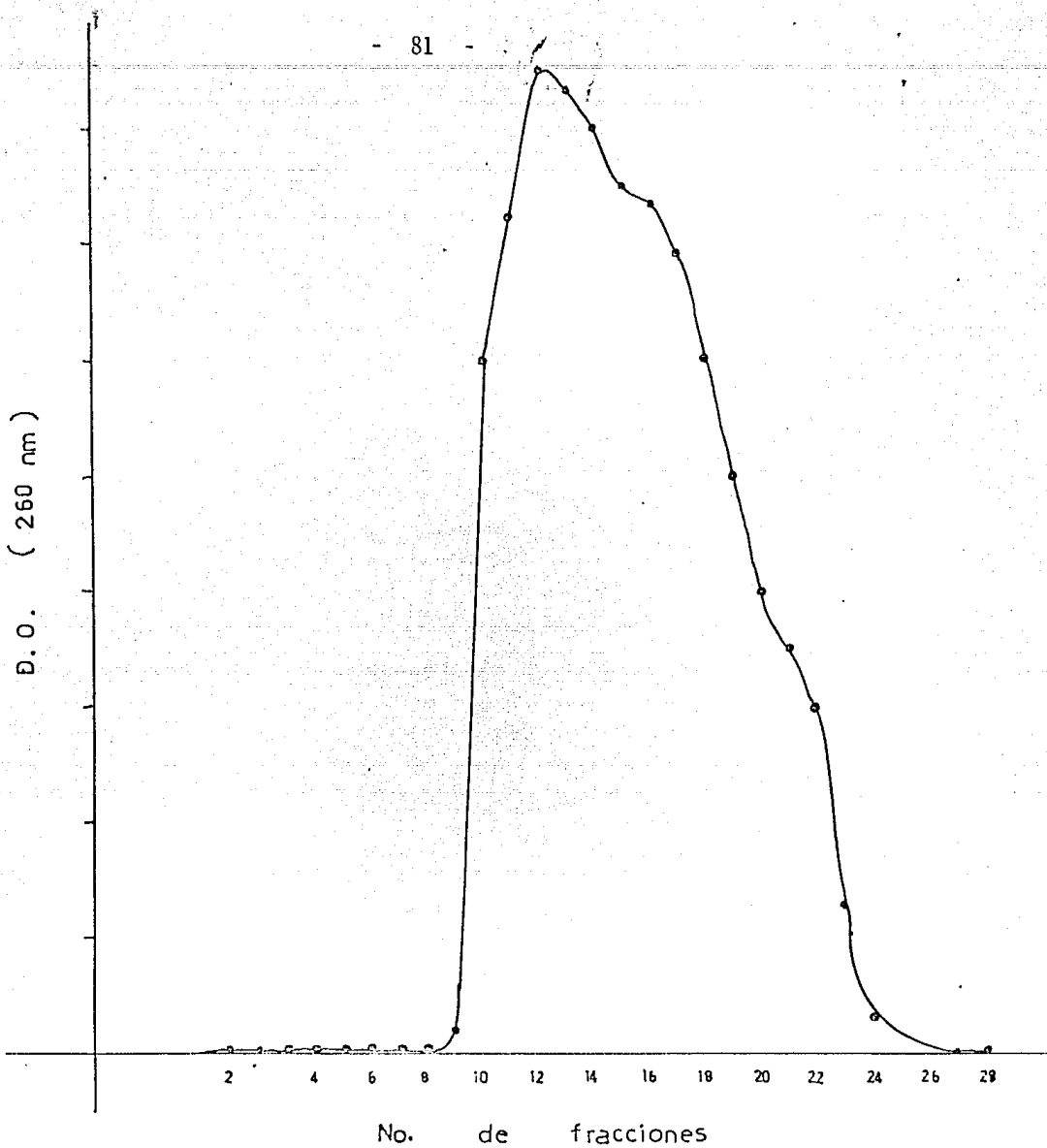


Fig. 22 . Cromatografía de CF<sub>1</sub> en la columna de DEAE-Celulosa .  
La columna se preparó como se describió en Material y  
Métodos .

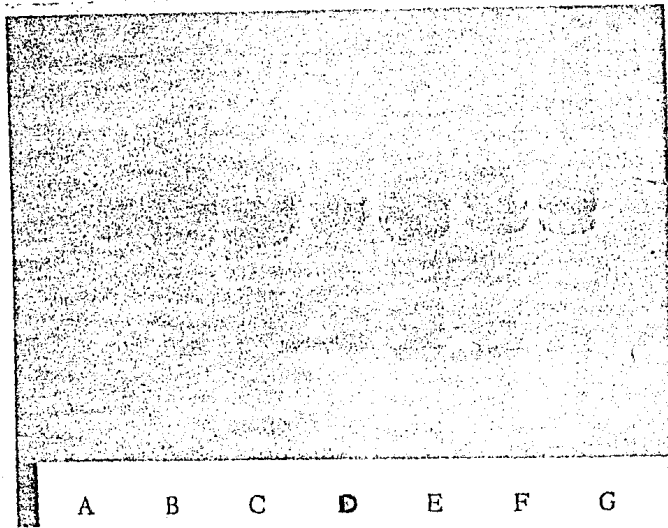


Fig. 23 . Patrón electroforético de  $CF_1$  en acrilamida con SDS .  
A. - 25  $\mu\text{g}$  de  $F_1$  de mitocondrias de corazón de res ; B y C ,  $CF_1$  extraído con cloroformo 25  $\mu\text{g}$  y 12.5  $\mu\text{g}$  respectivamente ; D y E ,  $CF_1$  extraído con cloroformo 12.5  $\mu\text{g}$  y 25  $\mu\text{g}$  respectivamente ; F y G ,  $CF_1$  extraído con EDTA 25  $\mu\text{g}$  y 12.5  $\mu\text{g}$  respectivamente .



El método utilizado para activar la ATPasa fué por medio de calor , el cual aparentemente implica el desplazamiento del inhibidor e induce el estado activo de la enzima . Mediante el uso de un Multi Block Heater ( Lab. Line Co. ) se determinó la temperatura óptima de activación . La Fig. 24 muestra que 60 °C es la temperatura a la que se obtiene la máxima activación , la curva de tiempo a 60 °C ( Fig. 25 ) mostró que se requieren entre 2 y 4 minutos para alcanzar el máximo de actividad de ATPasa . En la curva de proteína ( Fig. 26 ) se ilustra que ésta no es lineal con la concentración y que la máxima actividad específica de la ATPasa-Ca<sup>++</sup> medida en las condiciones ya descritas , se observa con 5 µg de enzima activada , por lo cual en los experimentos subsecuentes se utilizó esta cantidad de enzima .

La sensibilidad de la CF<sub>1</sub> a la octilguanidina se ilustra en la Fig. 27 observándose que ésta es menos sensible a la octilguanidina cuando se encuentra en forma soluble que cuando esta adosada a la membrana , en esta última condición con octilguanidina 60 µM se obtiene un 60 a 70 % de inhibición en la actividad de ATPasa de cloroplastos íntegros mientras que con la enzima aislada octilguanidina 100 µM apenas produce un 20 % de inhibición . Indudablemente la solubilización de la enzima produjo modificaciones estructurales que alteraron su sensibilidad a la octilguanidina , fenómeno que es también compartido con el inhibidor natural con el que se requiere menor cantidad con partículas submitocondriales que con la enzima soluble para producir el mismo grado de inhibición ( 56 ) .

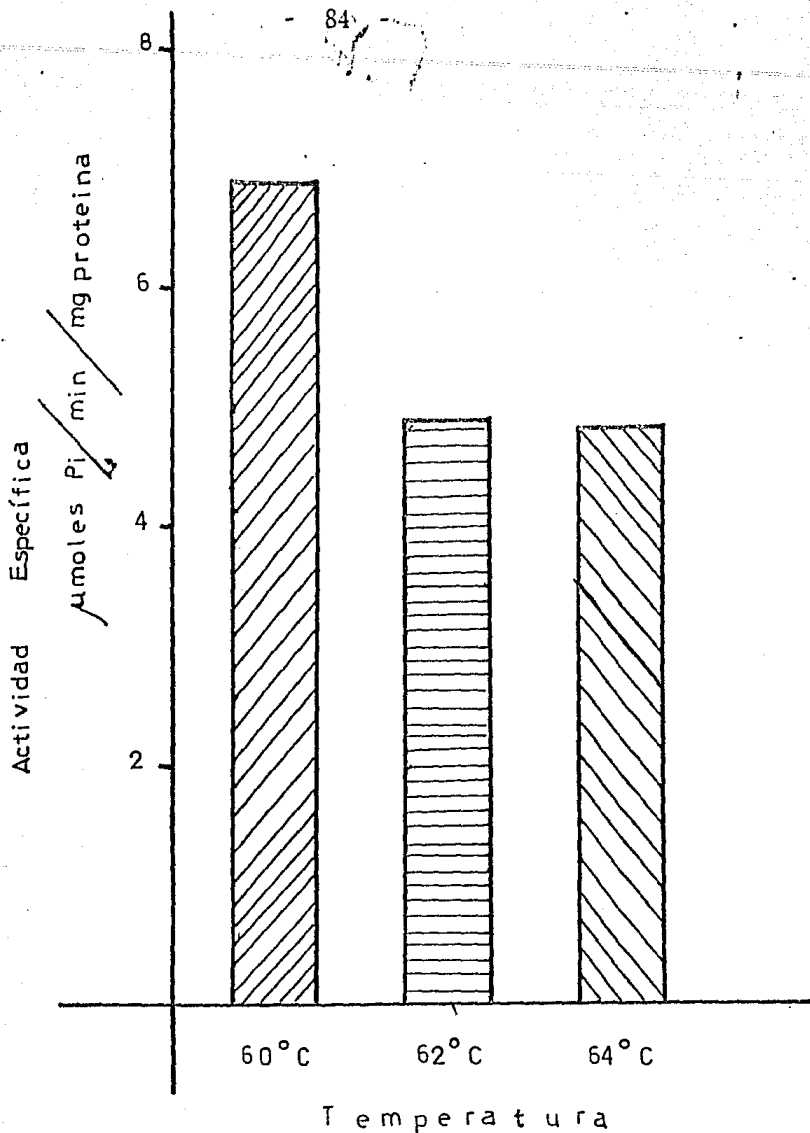


Fig. 24 . Efecto de la Temperatura en la activación por calor de la ATPasa . Una alícuota de la enzima almacenada en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% se centrifugó y se resuspendió en un medio que contenía Tricine-NaOH 10 mM pH 8.0 y EDTA 2 mM . Muestras de 500 µg de  $\text{CF}_1$  en un volumen final de 0.3 ml se calentaron durante 2 min con Ditione 5 mM , ATP 30 mM pH 8.0 y Tricine-NaOH 40 mM pH 8.0 a las temperaturas indicadas . Se utilizaron 5 µg de  $\text{CF}_1$  activado para determinar la actividad de ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  como se describió en Métodos .

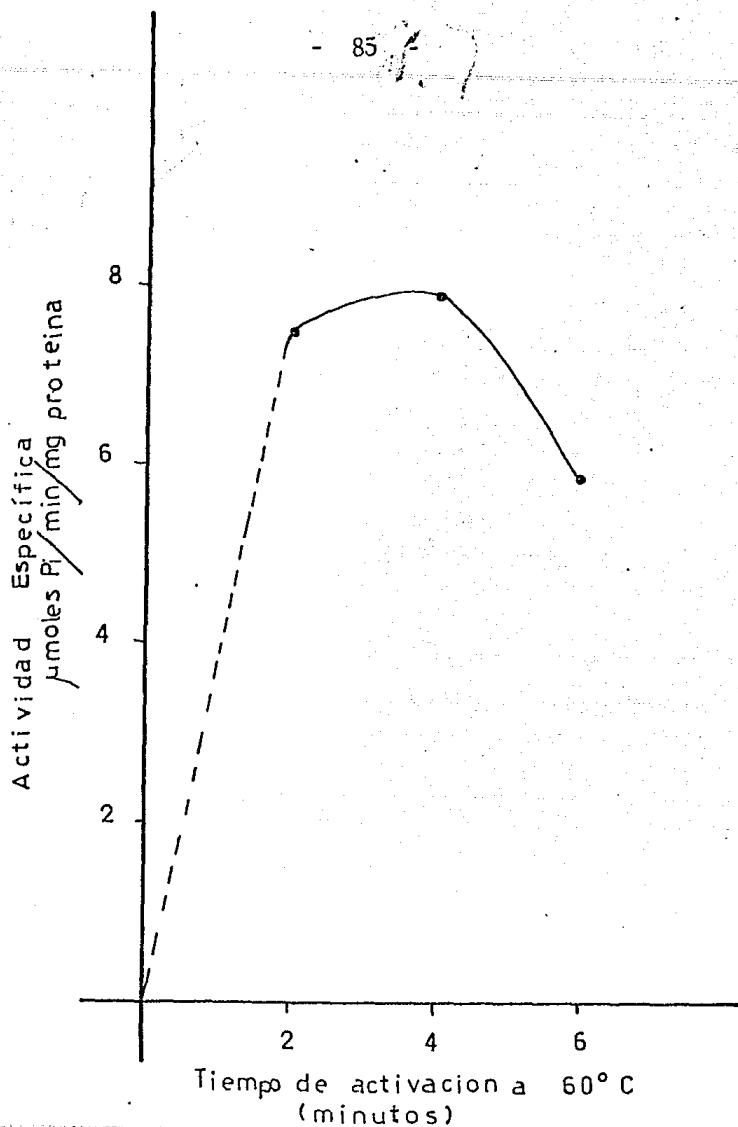


Fig. 25 Efecto del tiempo de activación a 60 °C en la actividad de ATPasa-Ca<sup>++</sup>. La enzima se preparó como se describe en la Fig. 15 . Muestras de CF<sub>1</sub> se activaron a 60 °C. en un medio que contenía 40 mM Tricine- NaOH pH 8.0 , 2 mM EDTA , 30 mM ATP , 5 mM DTE y 1500 μg/ml de enzima a los tiempos indicados . Se utilizaron 5 μg de CF<sub>1</sub> activado para determinar la actividad de ATPasa.

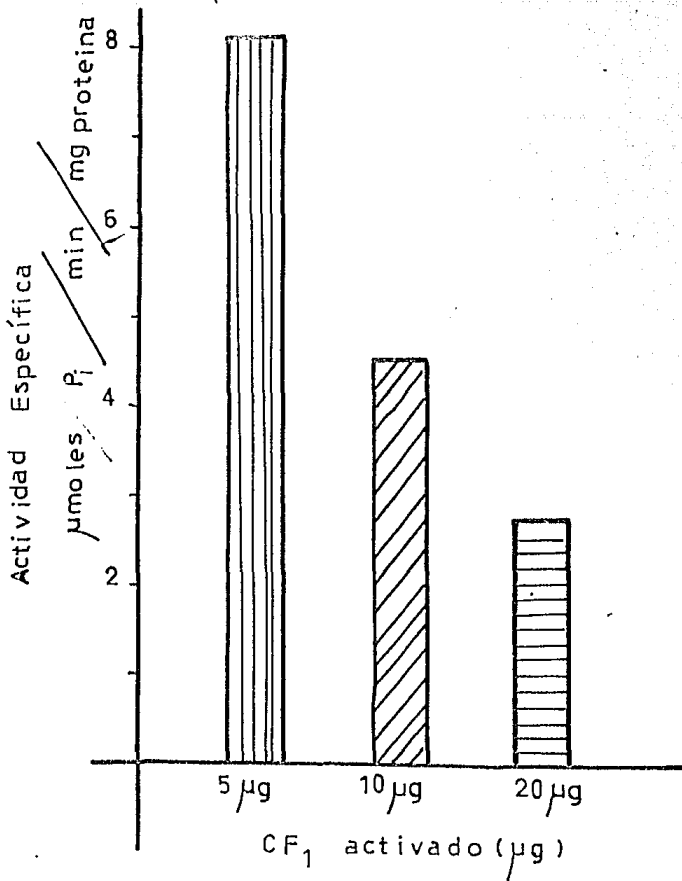


Fig. 26 Efecto de la concentración de enzima en la actividad de ATPasa-Ca<sup>++</sup>. La enzima fue preparada y activada como se describió en la Fig. 16. Diferentes concentraciones de enzima activada se utilizaron para determinar la actividad de ATPasa-Ca<sup>++</sup>.

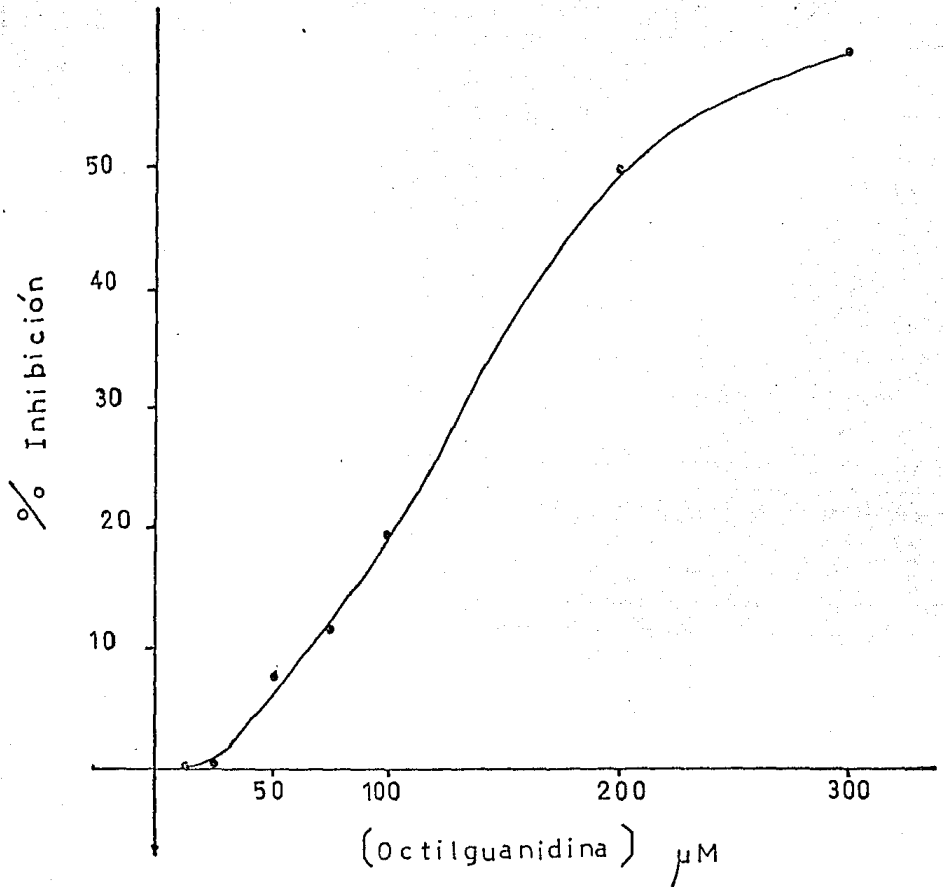


Fig. 27 Efecto de diferentes concentraciones de octilguanidina sobre la actividad ATPasa- $\text{Ca}^{++}$ . La enzima fue preparada y activada como se describe en la Fig. 16. Se utilizaron muestras de  $5 \mu\text{g}$  de  $\text{CF}_1$  activado para determinar la actividad ATPasa en un volumen de 1 ml que contenía; 50 mM Tricine-NaOH pH 8.0,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, 5 mM ATP pH 8.0 y las concentraciones de octilguanidina indicadas.

Para comparar si los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) son afectados de la misma manera por la octilguanidina que en el cloroplasto íntegro, la actividad de ATPasa se midió a diferentes concentraciones de ATP- $Ca^{++}$  en presencia y ausencia de octilguanidina  $100 \mu M$  (Fig. 28). Se observa que la octilguanidina sigue comportándose cinéticamente como un inhibidor no competitivo de la hidrólisis del ATP alterando únicamente la velocidad máxima, sin afectar el valor de la  $K_m = 1.81 \text{ mM}$ , la cual fue muy semejante a la observada en la Fig. 16 con cloroplastos íntegros ( $1.25 \text{ mM}$ ).

Cabe señalar que el cambio alotópico en cuanto al requerimiento de catión,  $Mg^{++}$  cuando la enzima se encuentra en el cloroplasto y  $Ca^{++}$  cuando se encuentra en forma soluble, no afectó el tipo de inhibición producido por la octilguanidina. Es posible cuantificar actividad de ATPasa dependiente de  $Mg^{++}$  en la enzima aislada utilizando altas concentraciones de ión Bicarbonato. Como se muestra en la Fig. 29 la actividad de ATPasa- $Mg^{++}$  en la enzima aislada se inhibe con octilguanidina, observándose que la presencia de Bicarbonato reduce la capacidad de la octilguanidina para inhibir la actividad de ATPasa, de una manera similar al péptido inhibidor.

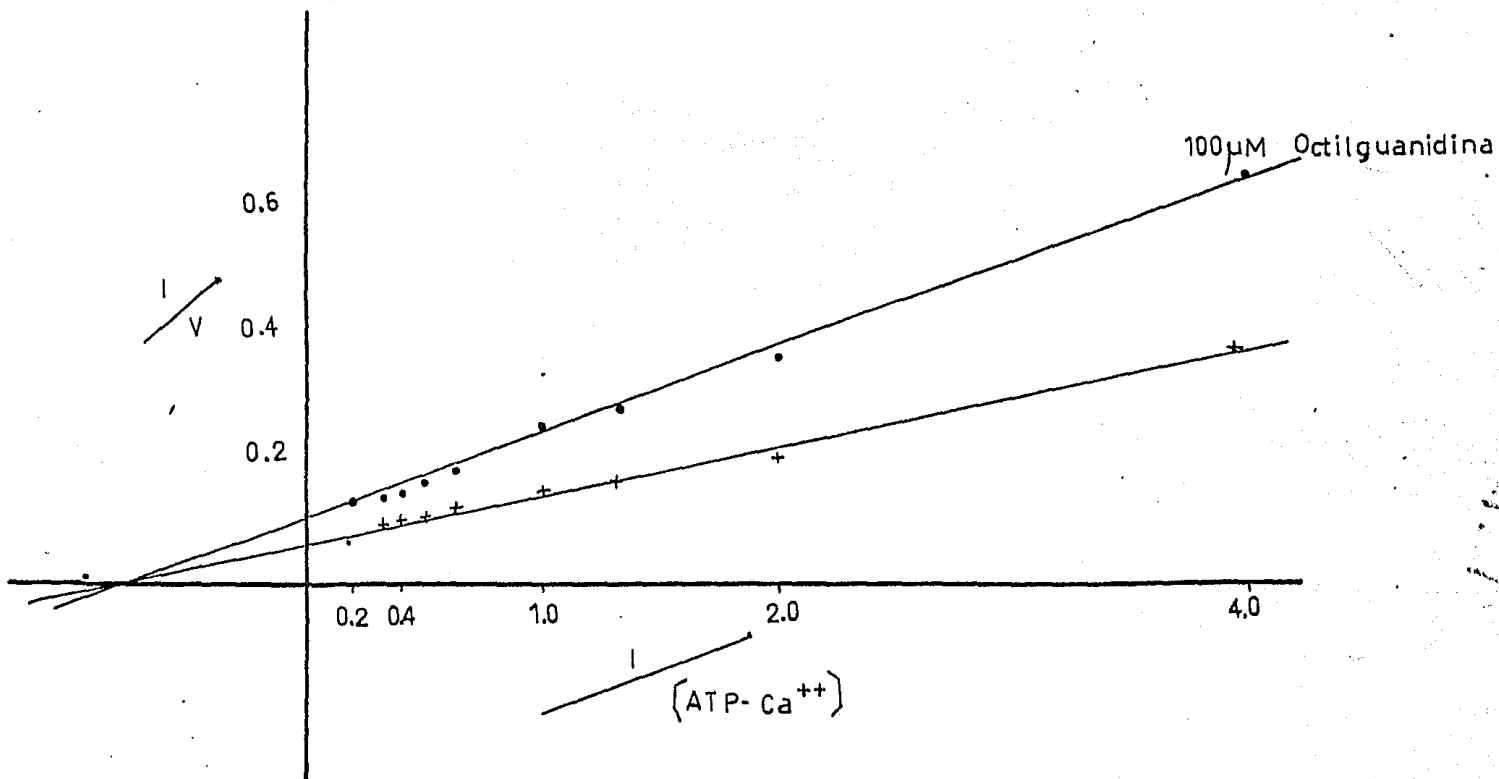


Fig. 28 Efecto de la octilguanidina en la actividad ATPasa- $Ca^{++}$  de la enzima aislada con diferentes concentraciones de ATP, representación de Lineweaver -Burk. Las condiciones experimentales fueron como en la Fig. 18, en presencia de 100 uM de octilguanidina ( · ) ó ausencia de octilguanidina ( + ).

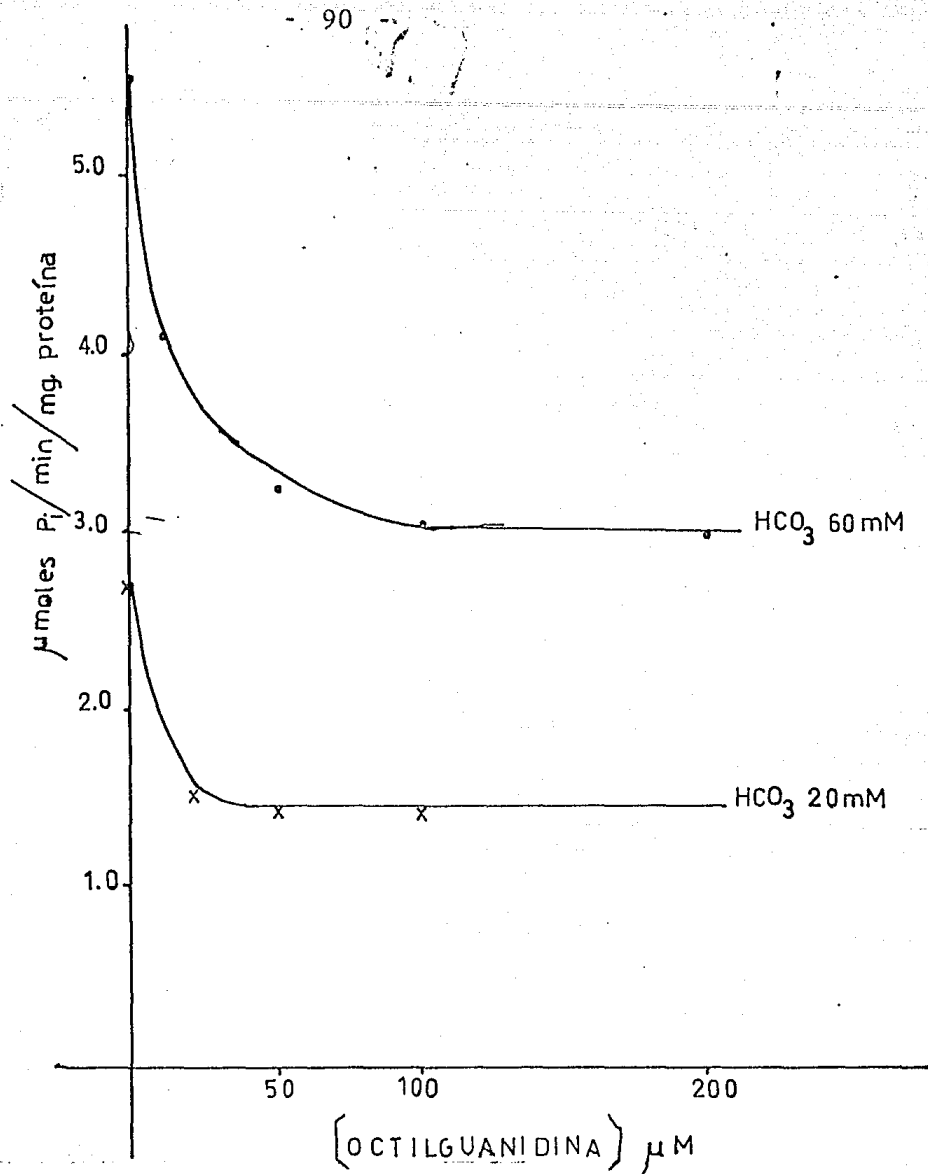


Fig. 29 Efecto de la octilguanidina en la actividad ATPasa- $\text{Mg}^{++}$  de la  $\text{CF}_1$  aislada. La enzima se preparó y activó como en la Fig. 16. Muestras conteniendo 5  $\mu\text{g}$  de  $\text{CF}_1$  activado se utilizaron para cuantificar la actividad de ATPasa- $\text{Mg}^{++}$  en un volumen de 1 ml. que contenía: 35  $\mu\text{g}$  NADH, 5 mM PEP, 5  $\mu\text{g}$  Piruvato Kinasa, 20  $\mu\text{g}$  Deshidrogenasa Láctica, 3 mM ATP pH 8.0, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 40 mM Tris-HCl pH 8.0 y 60 mM de Bicarbonato de sodio.



## DISCUSSION

## DISCUSION

La regulación de la fotofosforilación requiere del conocimiento de la funcionalidad de cada uno de sus componentes . La existencia de una proteína inhibidora de la función catalítica en diversos sistemas biológicos ha permitido proponerla como un importante factor regulador, sin embargo su mecanismo de acción es aún desconocido .

Como la octilguanidina inhibe la actividad de ATPasa tanto de la enzima soluble como particulada en mitocondrias de hígado y corazón de res de una manera similar a la proteína inhibidora , es decir , su efecto inhibitorio es aditivo , son cinéticamente similares y ambas previenen la inactivación por frío , se ha sugerido un sitio de acción común . Con estos antecedentes , hemos creído conveniente utilizar la octilguanidina como un inhibidor modelo de la proteína inhibidora en cloroplastos .

Nuestros resultados muestran que la octilguanidina inhibe no competitivamente la actividad de ATPasa tanto de la enzima soluble como de la enzima unida a la membrana , de una manera similar a la proteína inhibidora .

Se utilizó la actividad de ATPasa inducida por la luz en cloroplastos enteros , como monitor de la movilización del inhibidor . Previamente se probó la integridad estructural y funcional de los cloroplastos . Mediante su sensibilidad a cationes divalentes la enzima membranal presenta propiedades alotópicas y es dependiente de  $Mg^{++}$  , mientras que la enzima soluble

es más activa en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ . La Tabla III muestra que la actividad de ATPasa dependiente de calcio en cloroplastos enteros fué muy baja, lo cual indica una buena integridad estructural de los cloroplastos empleados, además el sistema muestra alto grado de acoplamiento, ya que la actividad puede ser incrementada en presencia de desacoplante  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Otro criterio de integridad funcional es la sensibilidad de la ATPasa de  $\text{Mg}^{++}$  inducida por la luz a la Diciclohexilcarbodimida (38) un potente inhibidor de ésta como se observa en la Tabla III. Este hecho confirma que la  $\text{CF}_1$  está correctamente insertada al canal de  $\text{H}^+$  de la  $\text{CF}_0$ .

Los cloroplastos presentan actividad de ATPasa que en la oscuridad está en estado latente. La iluminación de cloroplastos en presencia de compuestos reductores como el DTE incrementa la actividad de ATPasa, sin inhibir la fotofosforilación (20). La activación de la ATPasa con DTE puede observarse en la oscuridad siendo más pronunciada en la luz y permanece durante varios minutos. La Tabla III muestra la dependencia de un agente reductor, en la actividad de la ATPasa estimulada por la luz.

El mecanismo de activación de la ATPasa por reductores de grupos sulfhidrilos ha sido objeto de numerosas investigaciones. La purificación del factor de acoplamiento ( $\text{CF}_1$ ) produce una enzima con actividad latente de ATPasa susceptible de ser activada por calentamiento ó por digestión con tripsina. El mecanismo de activación de la ATPasa permanece aún incierto y probablemente implique cambios conformacionales en  $\text{CF}_1$  dependientes de energía; que podrían resultar en la exposición de un enlace disulfuro (21)

ó en la dislocación de la proteína inhibidora ( 2 ). Añadiendo además , que el proceso de activación parece implicar cambios en las propiedades de unión de los nucleótidos de  $CF_1$  membranaral ( 49 ) . Los cambios durante el proceso de activación en  $CF_1$  pueden ser permanentes ó transitorios. Estudios realizados por Farron ( 11 ) observando la transformación por calor de la  $CF_1$  latente al estado activo no mostraron ningún cambio en las propiedades hidrodinámicas de la enzima , ni en el peso molecular , la composición de aminoácidos y la movilidad en geles de poliacrilamida , de estos datos se ha concluido que a diferencia del factor de acoplamiento mitocondrial  $F_1$  , la  $CF_1$  no forma complejo disociable con una proteína de bajo peso molecular que inhibe específicamente a la ATPasa , sugiriendo que cambios conformacionales pueden ser los responsables de la activación de la ATPasa . Siendo además un proceso asociado con cambios en la distribución de grupos sulfhidrilos en la proteína , ya que el número total de grupos -SH no varía antes y después del tratamiento con calor ( 11 ) indicando que ninguna reducción ú oxidación neta se produce durante la activación . Durante la activación por calor y no en la inducida por digestión con tripsina , el proceso de activación se inhibe si se hace una alquilación de residuos sulfhidrilos previa .

La reactividad de grupos sulfhidrilos ha sido investigada en la enzima soluble y en la unida a la membrana . Farron y Racker ( 21 ) reportaron que dos grupos sulfhidrilos reaccionan con iodoacetamida en la enzima soluble latente y dos grupos adicionales se exponen durante la activación por

calor . Deters y colaboradores ( 58 ) observaron un incremento en la incorporación de iodoacetamida en la subunidad  $\gamma$  de  $CF_1$  activada por calor. Por otro lado , también en la activación de la ATPasa por la luz estan implicados grupos -SH ; Mc Carty y Fagan ( 59 ) reportaron una incorporación de NEM marcado con tritio en las subunidades  $\epsilon$  y  $\gamma$  de  $CF_1$  membranaral en la oscuridad y una incorporación adicional en la subunidad  $\gamma$  después de la exposición a la luz . Sin embargo , Cantley y Hammes en 1976 ( 62 ) demostraron que los grupos sulfhidrilos expuestos con la luz no estan relacionados con el sitio de hidrólisis del ATP , los sitios de unión de nucleótidos ó con los sitios de unión de quercetina .

Al examinar los datos ilustrados en las Figs. 10 y 11 , estos mostraron que la octilguanidina inhibe preferentemente la enzima activada por la luz que la actividad basal . Pensando que la posible acción inhibitoria de la octilguanidina radicara en el proceso de activación inducido por la luz y como ya se mencionó , el mecanismo de activación de la ATPasa en la membrana implica cambios conformacionales dependientes de energía , facilitados por la reducción de un puente disulfuro por compuestos reductores como el DTE ( 11 ) , se estudió el efecto de la octilguanidina en la actividad de ATPasa-Mg<sup>++</sup> con y sin DTE en la luz y en la oscuridad como se ilustra en las Figs. 12 y 13 .

Los resultados obtenidos muestran que la octilguanidina inhibe la actividad de ATPasa basal ó inducida por luz y DTE , requiriéndose de la enzima activada por cualquier mecanismo , para que la octilguanidina ejerza su efecto inhibitorio .

La Fig. 13 muestra el efecto inhibitorio de la octilguanidina en la actividad de ATPasa en la oscuridad y es posible observar que el DTE en estas condiciones activa a la enzima ( 20 ) y que esta enzima activada es inhibible por octilguanidina .

Los experimentos anteriores indicaban un efecto inhibitorio de la octilguanidina en la ATPasa , pero no nos permitían afirmar su posible participación en el proceso de activación . Los datos ilustrados en la Fig. 14 y Tabla V muestran que la octilguanidina produce igual inhibición si esta presente en la activación ó en la actividad , permitiendonos descartar tal posibilidad y concluir que la octilguanidina inhibe específicamente la actividad de ATPas-Mg<sup>++</sup> y parece no ejercer ningún efecto en el proceso de activación inducido por la luz ó por DTE . Las Figs. 10 y 11 mostraron que la octilguanidina inhibe la actividad de ATPasa dependiente de Mg<sup>++</sup> de cloroplastos sin alterar el transporte de electrones ( Tabla IV ) a través de una interacción específica con el sistema fosforilante , en ambas actividades , la fosforilación y la ATPasa ( Fig. 15 ) .

Como la síntesis e hidrólisis del ATP y las reacciones de intercambio ocurren en cloroplastos energizados por la luz ó por una transición ácido-base y son igualmente inhibidas por desacoplantes , inhibidores de transferencia de energía y anti-CF<sub>1</sub> ( 63 , 64 ) se ha pensado que todas estas reacciones : síntesis , hidrólisis y recambios ocurren en el mismo sitio catalítico de la CF<sub>1</sub> a través de reacciones reversibles . Sin embargo , datos recientes ( 65 ) hacen difícil seguir apoyando esta conclusión . Ya que la especificidad para el sustrato en la reacción de

hidrólisis del ATP , síntesis del ATP ó las reacciones del intercambio ATP-P<sub>i</sub> es diferente . Observándose que la inhibición de la ATPasa no necesariamente conduce a la inhibición de la capacidad de síntesis de ATP , aunque ambas reacciones se efectúen en la misma enzima , siendo un ejemplo de lo anterior la diferente sensibilidad a  $\epsilon$ -ATP , el cual inhibe fuertemente la hidrólisis del ATP , sin afectar de la misma manera la síntesis del ATP ( 60 ).

Como se ilustra en la Fig. 15 existe diferente sensibilidad a la octilguanidina en la síntesis y en la hidrólisis del ATP y este hecho fuertemente apoya la idea de que la síntesis y la hidrólisis del ATP pueden ocurrir a través de rutas complejas con la participación de diferentes sitios ó estados conformacionales de la ATPasa ( 67 ) . Aunado a esto , es interesante mencionar que aún a altas concentraciones de octilguanidina , solamente se alcanza del 60-70 % de inhibición de la actividad de ATPasa-Mg<sup>++</sup> ( Fig. 10 ), pero concentraciones altas son capaces de inhibir casi totalmente la síntesis ( Fig. 15 ) habiéndose observado un comportamiento similar en presencia de otros inhibidores de la transferencia de energía ( 68 ) lo anterior parece apoyar la posible existencia de múltiples formas de la enzima .

Una vez descartada la posibilidad de que la octilguanidina ejerciera su efecto inhibitor en el proceso de activación , que implicaba la exposición de grupos sulfhidrilo ó la movilización de la proteína inhibidora y demostrar el efecto de la octilguanidina sobre la actividad de ATPasa actuando en el sistema fosforilante , se procedió a puntualizar su sitio de acción y su posible mecanismo , haciendo hincapié en su efecto semejante a la proteína inhibidora.

Trabajos previos ( 34, 69 ) utilizando el péptido inhibidor de la ATPasa de corazón de res (  $F_1$  ) mostraron que inhibía la actividad de ATPasa de manera no competitiva con respecto al ATP . Indicando que ni la  $K_m$  para el ATP ni la  $K_i$  para el ADP cambiaban con la unión del inhibidor a partículas submitocondriales ó a la  $F_1$  . Por otro lado Gomez-Puyou y colaboradores ( 3 ) encontraron una inhibición incompetitiva del inhibidor natural con respecto al ATP . La Fig. 16 muestra el tipo de inhibición producida por la octilguanidina sobre la actividad de ATPasa dependiente de  $Mg^{++}$  en cloroplastos íntegros , observándose que la octilguanidina se comporta como un inhibidor no competitivo y comparable con el tipo de inhibición que se observaba para la proteína inhibitoria .

Estudios recientes llevados a cabo por Galante y colaboradores ( 61, 57 ) muestran que el complejo  $H^+$ - ATPasa-Inhibidor de corazón de res aún puede interactuar con agentes que reaccionan con el sitio de hidrólisis del ATP . Todos estos datos han permitido concluir que el péptido inhibidor no interactúa directamente con el sitio catalítico en  $F_1$  . Observándose también que la octilguanidina , de manera similar al péptido inhibidor , inhibe a la ATPasa interactuando en otro sitio diferente al sitio de hidrólisis del ATP .

La inhibición de la fosforilación en cloroplastos enteros ejercida por la octilguanidina sobre el sistema fosforilante podría deberse a una acción de ésta sobre sus dos componentes el hidrofóbico ó  $CF_0$  y el catalítico ó  $CF_1$  .



El mecanismo por el cual los protones son conducidos a través de  $CF_0$  y la membrana del tilacoide a  $CF_1$  es poco conocido, sin embargo, existe evidencia que sugiere que en la regulación de la conducción de protones por  $CF_0$  participan uno ó más residuos  $-SH$  ( 25 ) críticos dentro de  $CF_1$ , posiblemente localizados en la subunidad  $\gamma$  de la enzima ( 59 ). La remoción de  $CF_1$  de la membrana de los tilacoides resulta en un gran incremento de la permeabilidad transmembranal de los protones y la abolición del incremento de pH inducido por la luz asociado con la captación neta de  $H^+$ . Si en estas condiciones se utilizan inhibidores como el DCCD ( 38 ) y el Trifenil estaño ( 54 ), los cuales interrumpen la conducción de protones a través de  $CF_0$ , se restablece la captación de los  $H^+$  inducida por la luz.

Como se observa en las Figs. 18 y 21 la octilguanidina no modifica la conducción de los protones a través de  $CF_0$  a concentraciones a las cuales inhibe un 70% la ATPasa.

Los resultados hasta aquí obtenidos, indicaban que la octilguanidina inhibía la actividad de ATPasa a través de su interacción con el factor de acoplamiento  $CF_1$ . Por lo que los resultados siguientes trataron de estudiar esta interacción. Como se ilustra en la Fig. 28, la octilguanidina inhibe la actividad de ATPasa de la enzima soluble y de una manera similar al inhibidor natural, ésta es menos sensible, requiriéndose una concentración más alta de inhibidor para producir el mismo grado de inhibición que en la enzima membranal. Por otro lado el tipo de inhibición de la

octilguanidina , al igual que el péptido inhibidor , es no competitivo , lo cual implicaría que ambos actúan en un sitio diferente del sitio de hidrólisis del ATP .

Dadas las propiedades alotópicas de la  $CF_1$  purificada , la actividad de ATPasa a diferencia de la observada en cloroplastos enteros que es dependiente de iones magnesio ( 70 ) , es dependiente de iones calcio, observándose solamente un 3 % de la actividad ensayada con otros cationes divalentes como el  $Mg^{++}$  , el  $Mn^{++}$  , el  $Ni^{++}$  ( 10 ) . Sin embargo , en presencia de ciertos efectores alostéricos como el maleato ó el bicarbonato se induce a la enzima aislada a tener actividad apreciable de ATPasa dependiente de  $Mg^{++}$  ( 22 ) . A este respecto , recientemente ( 71 ) Hochman y Carmeli reportaron que esta serie de compuestos actúan , dependiendo de las condiciones de incubación , como efectores alostéricos de la actividad de ATPasa de  $CF_1$  , activando ó inhibiendo la actividad . Observándose que en presencia de bicarbonato , se incrementa 10 veces la afinidad por el ATP y se disminuye 2 veces la  $K_i$  para el ATP libre , ambos efectos promueven la estimulación de la ATPasa .

Por otro lado , resultados adicionales ( 30 ) indican que altas concentraciones de bicarbonato reducen la capacidad del peptido inhibidor para suprimir la actividad de ATPasa de  $F_1$  . Observándose un grado menor de inhibición por la proteína inhibidora en presencia de bicarbonato .

La Fig. 29 , muestra que con bicarbonato y  $Mg^{++}$  en  $CF_1$  soluble es posible observar una actividad apreciable de ATPasa . Confirmándose además , que la octilguanidina , en presencia de altas concentraciones de bicarbonato y de manera similar al peptido inhibidor , disminuye su capacidad de interactuar con la  $CF_1$  .

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. - La octilguanidina es un inhibidor de la ATPasa y de la fosforilación en cloroplastos . Pudiendo a concentraciones bajas inhibir preferentemente la ATPasa sin modificar sensiblemente la fotofosforilación por lo que su sitio de acción nos permitirá ahondar sobre los procesos de la transducción energética en el tilacoide .

2. - Tiene un sitio de acción específico para  $CF_1$  , sin modificar ningún segmento de la cadena de transporte de electrones , ni la conducción de los  $H^+$  a través de  $CF_0$  .

3. - No tiene efecto sobre el mecanismo de activación por luz y reactivos reductores de grupos sulfhidrilos en cloroplastos enteros .

4. - Ejerce su efecto inhibitorio actuando de una manera específica y directa sobre el factor de acoplamiento  $CF_1$  .

5. - Tiene semejanzas cinéticas con el inhibidor natural de la ATPasa . Ambos ejercen un tipo de inhibición no competitivo para en ATP , su afinidad es mayor en la enzima particulada que en la soluble y su efecto inhibitorio es modificado por efectores alostéricos como el bicarbonato . Estos resultados sugieren sitios comunes ó cercanos en la  $CF_1$  , por lo que resulta un reactivo de gran utilidad en la dilucidación del sitio de acción del inhibidor natural y su mecanismo de regulación en la catálisis del sistema fosforilante .

## BIBLIOGRAFIA

## B I B L I O G R A F I A

1. - Nelson N., Nelson H. y Racker E. ( 1972 ) J. Biol. Chem .247 : 6506-6510 .
2. - Harris D.A. y Cfofts D. ( 1978 ) Biochim Biophys Acta. 502: 87-103 .
3. - Gomez-Puyou M.T. , Gomez-Puyou A. y Salmon A. ( 1977 ) Biochim Biophys Acta . 461 : 101-108 .
4. - Racker E. ( 1976 ) A new Look at Mechanisms in Bioenergetics . Academic Press. Nueva York . 27-43 pp.
5. - Govindjee., Govindjee R. ( 1975 ) En : Bioenergetics of Photosynthesis. ( Ed. Govindjee ) . Capítulo 1 . 2-43 pp . Academic Press. Nueva York.
6. - Hill R. y Bendall F. ( 1960 ) Nature ( Londres ) 186: 136-141 .
7. - Mitchell P. ( 1966 ) Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation . Glynn Res. Bodmin , Cornwall . Inglaterra .
8. - Jagendorf A.T. y Smith M. ( 1962 ) Plant Physiol . 37: 135-141 .
9. - Avron M. ( 1963 ) Biochim. Biophys. Acta 77: 699-702 .
10. - Vambutas V.K. y Racker E. ( 1965 ) J. Biol. Chem. 240 : 2660- 2667.
11. - Farron F. ( 1970 ) Biochemistry 9 : 3823-3828 .
12. - Lien S. y Racker E. ( 1971 ) Methods in Enzymology 23 : 547- 555 .
13. - Younis H.M., Winget G.D. y Racker E. ( 1977 ) J. Biol. Chem . 252 : 1814-1818 .
14. - Binder A., Jagendorf A.T. y Ngo E. ( 1978 ) J. Biol. Chem. 253:3094-3099.
15. - Lien S. y Racker E. ( 1972 ) J. Biol. Chem . 248 : 3520-3524 .
16. - Nelson N. ( 1977 ) Biochim Biophys Acta 456 : 314 - 338 .
17. - Baird B.A. y Hammes G.G. ( 1976 ) J. Biol. Chem. 251 : 6953-6962 .
18. - Nelson N. , Deters D.W., Nelson H. y Racker E. ( 1972 ) J. Biol. Chem . 248 : 2049-2055 .

19. - Nelson N., Nelson H. y Racker E. ( 1972 ) J. Biol. Chem. 247 : 7657-7662 .
20. - Mc. Carty R. E. y Racker E. ( 1968 ) J. Biol. Chem. 243 : 129-137 .
21. - Farron F. y Racker E. ( 1970 ) Biochemistry 9: 3829-3841 .
22. - Nelson N. ( 1972 ) J. Biol. Chem. 247 : 6506- 6510 .
23. - Baird B. y Hammes G. G. ( 1978 ) Biochim. Biophys. Acta 549:31-53.
24. - Bakker-Grunwald T. y Van Dain K. ( 1974 ) Biochim. Biophys. Acta 347 : 290- 298 .
25. - Mc Carty R. E., Pittman P. R. y Tsuchiya Y. ( 1972 ) J. Biol. Chem. 247 : 3048 - 3051 .
26. - Pullman M. y Monroy G. ( 1963 ) J. Biol. Chem. 238: 3762-3769.
27. - Ebner E. y Maier K.L. ( 1977 ) J. Biol. Chem. 252 : 671- 676 .
28. - Nelson N., Nelson H. y Racker E. ( 1972 ) 247: 7657-7662.
29. - Smith J.B., Sterweis P.C. y Heppel L.A. ( 1975 ) J. Supramol. Struct. 3 : 248- 255 .
30. - Cintron N.M. y Pedersen P.L. ( 1979 ) Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 38 : 456-461 .
31. - Cintron N.M. y Pedersen P.L. (1979 ) Methods in Enzymology 55: 408- 414 .
32. - Chan S. H. P. y Barbour R.L. ( 1976 ) Biochim. Biophys. Acta 430 : 426- 433 .
33. - Hortsman L.L. y Racker E. ( 1970 ) J. Biol. Chem. 245: 1336- 1344.
34. - Van de Sadt R.J., De Boer B.L. y Van Dam K. ( 1973 ) Biochim. Biophys Acta 292 : 338- 349 .
35. - Krull K. W. y Shuster S.M. ( 1981 ) Biochemistry 20: 1592- 1598.
36. - Gomez-Puyou A., Gomez-Puyou M.T. y Ernster L. ( 1979 ) Biochem. Biophys Acta 547: 252-257 .
37. - Gomez-Puyou M.T., Gomez-Puyou A. y Beigel A. ( 1976 ) Arch. Biochem. Biophys. 173 : 326-331 .



38. - Mc Carty R. E. y Racker E. ( 1967 ) J. Biol. Chem. 242: 3435-3439.
39. - Wasserman A. R. y Fleischer S. ( 1968 ) Biochim. Biophys Acta 153 : 154- 169 .
40. - Strain H.H., Cope B.T. y Svec W.A. ( 1971 ) Methods in Enzymology Vol. 23 : 452-476 .
41. - Vernon A. ( 1960 ) Analytical Chemistry 32 ( 9 ) : 1144- 1150 .
42. - Sumner J.B. ( 1974 ) Science ( Wash. D.C. ) 100: 413-415 .
43. - Clark L.L. , Wolf R. y Granger D. ( 1953 ) J. Appl. Physiol . 6 : 189 - 191 .
44. - Laemmli U.K. ( 1970 ) Nature 227: 680 - 685 .
45. - Steele J.A., Uchytíl T.F. y Durbin R. D. ( 1978 ) Photosynthetica 12 ( 1 ) : 68-69 .
46. - Lowry O.H. , Rosenbrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. ( 1951 ) J. Biol. Chem. 193 : 265-275 .
47. - Chance B. y Nishimura M. ( 1967 ) Methods in Enzymology Vol. X 99 : 642-650 .
48. - Gould J.M. ( 1978 ) FEBS LETTERS 94 ( 1 ) : 90-94 .
49. - Cantley L.C. y Hammes G.G. ( 1979 ) Biochim. Biophys Acta 549 : 31- 36 .
50. - Marchant R. y Packer L. ( 1963 ) Biochem Biophys Acta 75: 458-461.
51. - Pedersen P.L., Schwerzmann K. y Cintron N. ( 1981 ) Current Topics in Bioenergetics Vol. 11 : 149- 197 . Academic Press . Nueva York .
52. - Mc Carty R. E. ( 1971 ) Methods in Enzymol. 23 : 251- 253 .
53. - Mc Carty R. E. y Racker E. ( 1966 ) Brookhaven Symp. Biol. 19 : 202 - 214 .
54. - Gould J.M. ( 1976 ) Eur. J. Biochem 62 : 567- 575 .
55. - Uribe E. ( 1972 ) Biochemistry 11 : 4228- 4236 .

56. - Asami J. , Juntti K. y Ernster L. ( 1970 ) Biochim. Biophys. Acta 205 : 307- 311 .
57. - Gomez-Puyou M. T. , Nordenbrand K. , Muller U. , Gomez-Puyou A. y Ernster L. ( 1980 ) Biochim. Biophys. Acta 592 : 385- 395 .
58. - Deters D. W. , Nelson N. , Nelson H. y Racker E. ( 1975 ) J. Biol. Chem. 250 : 1041- 1047 .
59. - Mc Carty R. E. y Fagan J. ( 1973 ) Biochemistry 12: 1503-1507 .
60. - Strotman H. , Bickel-Sandkotters S. y Edelman K. ( 1979 ) Biochim. Biophys. Acta 545 : 122- 130 .
61. - Galante Y. , Wong S. Y. y Hatefi Y. ( 1980 ) Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol. 39 : 1844- 1849 .
62. - Cantley L. C. y Hammes G. G. ( 1976 ) Biochemistry 15 : 9- 14 .
63. - Avron M. ( 1978 ) FEBS LETTERS 96 : 225-232 .
64. - Shavit N. , Skye G. E. y Boyer P. D. ( 1967 ) J. Biol. Chem. 242 : 5121- 5130 .
65. - Penefsky H. S. ( 1974 ) J. Biol. Chem. 249: 3579- 3582 .
66. - Avron M. ( 1960 ) Biochim. Biophys acta 40 : 257- 272 .
67. - Shosman V. y Shavit N. ( 1979 ) Eur. J. Biochem. 94: 87-92 .
68. - Datta D. B. , Ryrie I. J. y Jagendorf A. T. ( 1974 ) J. Biol. Chem. 249 : 4404- 4411 .
69. - Ernster L. , Asami K. , Juntti K. , Coleman J. y Nordenbrand K. ( 1979 ) Methods Enzymol. 55 : 399-407 .
70. - Petrack B. , Caston A. , Sheppy F. y Farron F. ( 1965 ) J. Biol. Chem. 240 : 906- 914 .
71. - Hochman Y. y Carmeli C. ( 1981 ) Biochemistry 20 : 6293-6297.
72. - Lennarz G. ( 1975 ) Arch. Biochem, Biophys. 167 : 72-79 .
73. - Papa S. , Guerrieri F. , Simone . , Lorusso M. y Larosa D. ( 1973 ) 292 : 20- 38 .