



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFECTO DE DESACOPLANTES ALQUIL-AMINAS SOBRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES Y LA BOMBA DE PROTONES EN CLOROPLASTOS DE ESPINACA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
MARTHA ARACELI LEZCANO BUSTAMANTE
MEXICO, D. F. 1980



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Con agradecimiento para el
Dr. Blas Lotina Henksen --
por su valiosa guía en el
desarrollo de éste trabajo

A mis padres
y a mis hermanos.

A Eduardo

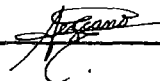
Jurado Asignado Originalmente
según el tema:

PRESIDENTE Paulina Castro Ardon
VOCAL Blas Lotina Hennsen
SECRETARIO Salvador Martín Sosa
1er. SUPLENTE Ezequiel Murillo G.
2o. SUPLENTE Ma.del Carmen Parra G.


Sitio donde se desarrolló el
tema:

Departamento de Bioquímica,
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Química, U.N.A.M.

Sustentante: Marta Araceli Lezcano Bustamante



Asesor: Dr. Blas Lotina Hennsen



DEPTO. DE PASANTES Y
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

I N D I C E

APENDICE	1
RESUMEN	3
ANTECEDENTES	5
MATERIALES Y METODOS	40
RESULTADOS Y DISCUSION	56
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFIA	76

A P E N D I C E

Abreviaturas empleadas en este trabajo:

ADP, ATP.....	Adenosin di y trifosfato
Asc.....	Ascorbato
BSA.....	Albúmina de suero bovino
CF ₁	Factor de acoplamiento - para la fotofosforilación en cloroplastos.
Cit b ₅₆₃	Citocromo b con una banda de absorción a 563 nm.
DBMIB.....	2,5-dibromo-3-metil-6-iso propil-p-benzoquinona.
DCIP.....	2,6-diclorofenolindofenol.
DCMU.....	3-(3,4-diclorofenil)-1,1- dimetilurea.
DMQ.....	2,5-dimetil p-benzoquinona.
E ₀ '.....	Potencial de óxido-reduc- ción, a pH=7; en Volts.
EDTA.....	Acido etilendiaminotetracé tico.
Fd.....	Ferredoxina.
MV.....	Metil viológeno.
NADP ⁺ (NADPH).....	Nicotín adenín dinucleóti- do oxidado (reducido).
PS I (II).....	Fotosistema I (II).

P ₆₈₀	Trampa de energía de PS II.
P ₇₀₀	Trampa de energía de PS I.
PC.....	Plastocianina.
PQ.....	Plastoquinona.
Q.....	Aceptor de electrones primario para PS II.
Rd.....	Reductasa.
RuDPcarboxilasa.....	Ribulosa-1,5-difosfatocarboxilasa, (carboxidismutasa).
SRF.....	Sustancia reductora de la <u>fe</u> rredoxina.
TNBS.....	Acido 2, 4, 6 trinitrobencen sulfónico.
X.....	Aceptor de electrones primario para PS I.
Z.....	Donador de electrones primario para PS II.

RESUMEN

Con la finalidad de contribuir a los estudios acerca del mecanismo de acoplamiento del transporte de electrones y la síntesis de ATP, procesos conjuntos que se llevan a cabo en la fotosíntesis, en el presente trabajo se experimentó con varias sustancias que tienen carácter desacoplante: monoaminas y diaminas libres como controles y sefarosa-alquilaminas inmovilizadas, con una longitud de brazo hidrocarbonado de 6, 10 y 12 átomos de carbono, además de una amida y de un ácido aminado con una cadena de 12 átomos de carbono. Todo esto con el propósito de dilucidar si existe uno o más sitios de acoplamiento en las reacciones parciales de la fotofosforilación en los PS I y PS II, comparado con toda la cadena transportadora de electrones (la suma de PS I y PS II), y sí empleando sustancias desacoplantes con una cadena de 12 átomos de carbono, que tienen una longitud de 21 Å, comprobamos que ésta sea la distancia crítica para el sitio de desacoplamiento como se ha reportado anteriormente (38), además de observar si se afecta la protonación del grupo amino modificando el grupo funcional, como en el caso de la amida y el ácido aminado.

Los datos encontrados indican que en el PS I todas las sefarosas-alquilaminas ensayadas activan en -

diferente proporción la velocidad del transporte de electrones, mientras que en PS II la inhiben. De igual manera se inhibe la bomba de protones y por tanto la síntesis de ATP en cada una de las aminas probadas.

Se ensayaron también cloroplastos sin CF_1 sobre la medición de la bomba de protones, con el objeto de observar si se revertía el efecto y aparecía nuevamente la bomba de protones, ya que debido al gran tamaño de la molécula de sefarosa y a la posibilidad de que el grupo amino interaccione en el sitio donde se anida el CF_1 , se esperaría que tapara el hueco que dejó en la membrana el CF_1 .

Los resultados obtenidos indican que la molécula de sefarosa-dodecametilenamina actúa como desacomplante clásico, por lo que no interacciona con el sitio que dejó el CF_1 , sino con el CF_1 residual de la membrana.

A N T E C E D E N T E S

Morfología del cloroplasto.-

Los cloroplastos poseen formas variadas, pero frecuentemente son estructuras elipsoidales que miden al rededor de 5 (1). El organelo está caracterizado por -- una envoltura que consiste en una doble membrana que de- limita el estroma del cloroplasto, y actúa como una ba-- rrera que es permeable al citoplasma y al estroma. La -- membrana del cloroplasto esta formada de múltiples vesí- culas aplanadas en forma de discos llamadas tilacoides, -- cada apilamiento recibe el nombre de grana. Los grana es tán interconectados por el sistema lamelar, el conjunto grana-lamela se encuentra en el estroma, y en este últi- mo se encuentran también las enzimas del ciclo de Calvin ácido desoxirribonucleico (DNA), granos de almidón, gra- sa y ribosomas (2). El sistema lamelar de la membrana in terna puede ser liberado del estroma al romper la membra- na externa, y así pueden obtenerse por centrifugación di ferencial cloroplastos clase II (ver Fig. 1).

Los grana contienen todos los pigmentos foto-- sintéticos del cloroplasto y también las enzimas necesar- ias para las reacciones primarias dependientes de la -- luz. El sitio donde se encuentran los sistemas destina--

dos a la captura de luz son las membranas de los tilacoides. Debido a la fundamental importancia de las membranas en los procesos biológicos, es preciso establecer su estructura, composición y funcionalidad para poder explicar de una forma más adecuada el proceso de la fotosíntesis.

Actualmente el modelo más aceptado es el de -- Singer y Nicholson (3), conocido como "Modelo del mosaico fluido". Consiste en una doble capa de fosfolípidos, discontinua con sus cadenas hidrofóbicas orientadas hacia el interior y las cabezas polares hacia el exterior; las proteínas se pueden encontrar tanto en el exterior -- (periféricas) como sumergidas dentro de la bicapa y parte en el exterior (integrales). Otras se hallan atravesando la membrana de lado a lado, estando ancladas por una serie de aminoácidos no polares que se fijan en la parte hidrofóbica de la bicapa y por algunos otros aminoácidos que son polares y se encuentran hacia los extremos (ver Fig. 2).

Las proteínas de este modelo predominan en la conformación α hélice anfipáticas (macromoléculas con una parte polar y otra zona grande hidrófoba), lo que favorece su unión a la membrana por sus extremos hidrófobos.

El modelo anterior es muy semejante al de Danieli y Davson (4); sólo se diferencia en que éste contiene proteínas fibrilares de conformación que están unidas a la bicapa del líquido constituyendo dos capas continuas, y fundamentalmente en que este modelo es rígido,

no presenta ninguna flexibilidad, lo que no explica el equilibrio dinámico que está asociado con los procesos vitales. Sin embargo el "Modelo del mosaico fluido" sí considera el equilibrio dinámico al proponer que los lípidos de la membrana se encuentran en estado líquido, lo que le dá fluidez, y las proteínas están flotando libremente, proporcionándole de esta manera movilidad a la membrana. Es necesario tener en cuenta que debe ser una estructura estable, en la que las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas estén maximizadas, además de encontrarse en el estado de energía libre más bajo. Este equilibrio termodinámico es solamente explicado por el "Modelo del mosaico fluido", por lo que es actualmente el más aceptado.

Fase oscura y fase luminosa de la fotosíntesis

La fase oscura se desarrolla dentro del espacio de la doble membrana, en donde se efectúa la asimilación de CO_2 para rendir finalmente una molécula de hexosa, que durante el proceso consumió 12 NADPH y 18 ATP generados en la fase luminosa; este proceso es conocido como el ciclo de Calvin (ver Fig. 3). (5)

La fase luminosa se efectúa en una serie de reacciones consecutivas que son: absorción de energía, transferencia de energía, separación de cargas, transporte de electrones, síntesis de ATP y reducción del NADP^+ . Estas reacciones se realizan en la membrana del tilacoi-

de, donde se encuentra la cadena transportadora de electrones; este proceso está acoplado a otro que es la síntesis de ATP.

Es por tanto importante, en primera instancia conocer las características de los pigmentos fotosintéticos que le dan esa capacidad de absorber la radiación visible con la cual se inician las reacciones fotoquímicas.

Son dos clases de pigmentos los más encontrados en las plantas, las clorofilas y los carotenos; en algas también ficobilinas. Las clorofilas son los pigmentos que dan a las plantas su característico color verde. Son solubles en disolventes orgánicos e insolubles en agua (6). Los carotenos y las ficobilinas son llamados -- pigmentos accesorios, porque el cuanto de luz absorbido por ellos puede ser transferido a la clorofila.

La molécula de clorofila contiene un núcleo de porfirina y una larga cadena lateral formada por 20 átomos de carbono llamada fitol. El núcleo polar está constituido por cuatro anillos pirrólicos unidos a un átomo de magnesio. La molécula de clorofila es un sistema conjugado que permite cambios de disposición de enlaces simples y conjugados en el anillo mismo; se trata de un sistema de resonancia que le confiere una gran estabilidad a la molécula de clorofila, en la que los enlaces simples y dobles conjugados poseen electrones móviles llamados π , los cuales no están relacionados con un solo átomo o un solo enlace sino con el sistema conjugado total. Se necesitan cantidades pequeñas de energía para --

desplazar éstos electrones pi a orbitales de mayor contenido energético (7). (ver Fig.4)

Se conocen dos tipos de clorofila, llamadas a y b. La clorofila a es la mas abundante, se encuentra en todos los organismos fotosintéticos que producen oxígeno molecular; en forma muy pura y disuelta en acetona presenta un máximo de absorción a 663 nm. En la célula intacta, la posición exacta del pico de absorción de la clorofila a varia de unas especies de plantas a otras, y las diferencias se atribuyen a la proximidad relativa de las moléculas de la clorofila a a otros pigmentos de las membranas de los tilacoides.

La clorofila b se encuentra en plantas superiores y algas verdes; en su estructura molecular contiene un oxígeno más y dos hidrógenos menos que en la clorofila a. (ver Fig.5). (8) Disuelta en acetona se han podido identificar dos picos con un máximo de absorción a 640 y 650 nm, por lo que se piensa que existen dos tipos de clorofila b. En el fotosistema II está presente en una mayor proporción la clorofila b. (6)

Los pigmentos accesorios poseen máximos de absorción a una longitud de onda distinta de las clorofilas debido a que su función es absorber la energía del espectro visible que no es captada por las clorofilas. La estructura molecular de los carotenoides consiste en una molécula poliisoprenoide larga, con dobles enlaces conjugados, y cada uno en sus extremos tiene un anillo de ciclohexano no saturado y sustituido (8). (ver Fig.5)

Los pigmentos de la ficobilina son tetrapirroles de cadena abierta que se encuentran conjugados con proteínas específicas. (ver Fig.5) La proteína conjugada de la ficoeritrobilina es la ficoeritrina, principal pigmento de las algas rojas. La ficocianina azul se encuentra en las algas azul-verdosas. (5)

Para iniciarse el proceso fotosintético es necesaria la incidencia de luz sobre los pigmentos; si uno de sus electrones absorbe un cuanto de luz y pasa a otro orbital la molécula se encuentra en estado excitado (ver Fig.6). Hay una relación cuantitativa entre el número de cuantos absorbidos y el número de moléculas activadas. Las reacciones fotoquímicas se caracterizan por los productos intermedios en los que un electrón ha pasado a un orbital externo de mayor nivel energético en un átomo o molécula electrónicamente excitado. Captada esta energía radiante, se transmite a través de los pigmentos hasta llegar al centro de reacción donde es convertida en energía química, con la producción de un equivalente oxidante y otro reductor. Es importante considerar que en el centro de reacción se alcanza el estado de singulete excitado y que después el aceptor primario de electrones se reduce, quedando oxidado el centro de reacción, que vuelve a su estado original cuando recibe un electrón del donador primario de electrones; este proceso se repite consecutivamente, dependiendo de la absorción de luz, (5) de esta manera continúan los eventos dependientes de la reacción luminosa con el transporte de electrones a --

través de toda la cadena transportadora, desde el agua - hasta el NADP^+ .

Transporte de electrones a través de la cadena fotosintética.-

Hill y Bendall (9) propusieron el modelo que - especifica las reacciones parciales que se llevan a cabo a través de toda la cadena. En PS II el agua se oxida -- para liberar oxígeno y reducir a Q, en tanto que el PS I reduce un aceptor electrónico de bajo potencial (X) y -- oxida a P 700. La secuencia transportadora de electrones fué deducida a partir de los potenciales estándar de oxi doreducción de los transportadores de electrones, de la interacción observada espectroscópicamente y de la experimentación con inhibidores y transportadores artificiales de electrones, que describiremos posteriormente.

La forma en que se encuentra distribuída la ca dena transportadora de electrones en la membrana se es-- quematiza en el modelo propuesto por Witt (10) en el que se describen los fotosistemas I y II formando una Z trans versal, con el sitio aceptor hacia afuera y el sitio donador hacia adentro, como se muestra en la Fig.7.

Se postula que cuando se ilumina el cloroplas- to, un electrón de su fotocentro reactivo que se encuen- tra en el pigmento clorofiliano es llevado hasta un acep- tor Q, y que después fluye en sentido descendente por la cadena central hasta el hueco electrónico en P700 del -- PS I que perdió electrones y los pasó a través de la ca-

dena transportadora hasta el NADP^+ provocando su reducción. El restablecimiento del centro activo del PS II a su estado reducido, es debido a la transferencia de electrones en el sentido del potencial decreciente, desde el agua con $E'_0 = +0.82 \text{ V}$, al centro activo (se desconoce su potencial estándar) con desprendimiento de oxígeno (11).

El aceptor primario de electrones en PS II es Q (12) que algunos investigadores han relacionado con el Citocromo C_{550} que tiene un potencial de oxido-reducción de $E'_0 = +0.035 \text{ V}$, y es reducido por los electrones provenientes de los pigmentos excitados por la incidencia de luz y oxidado por el PS I. La 3-(3,4 diclorofenil)-1 dimetil urea (DCMU) inhibe la reacción de oxidación, sin afectar la de reducción (13).

La siguiente molécula de la cadena transportadora es la plastoquinona PQ que al oxidarse Q, ésta se reduce. Se ha determinado su posición en la cadena transportadora de electrones porque al iluminar con luz sensible al PS I (760 nm) se oxida, y con luz sensible al PS II (680 nm) se reduce (14, 15). Sadewaser y Dilley (16) encontraron que extrayendo PQ en más del 50% del total, el transporte de electrones se inhibe completamente. Böhme y Cramer (17) demostraron que la DBMIB es un análogo de la PQ, y que inhibe la oxidación de $\text{cit } b_{559}$ (PS I) pero no la reducción por PS II.

El citocromo f, fué el primer componente encontrado; se localizó a partir de los datos de la PC y se ubica precediéndola. Tiene un potencial de oxido-reduc--

ción $E_0' = +0.365$ V. Algunos investigadores han demostrado experimentando con inhibidores, que esta localizada después de DCMU y DBMIB (18, 19).

La plastocianina PC es una proteína unida a cobre, con un potencial redox $E_0' = +0.37$ V. Es en general aceptado que se encuentra localizada después del citocromo f y antes de P700 (20).

P700 esta constituida por un grupo de moléculas de clorofila que presentan la propiedad de absorber luz a 700 nm en un pico que presenta un máximo de absorción; tiene un potencial redox $E_0' = +0.43$ V. Es oxidado por la luz que se absorbe por el PS I y reducida por la luz que se absorbe por el PS II (21).

La sustancia reductora de la ferredoxina (SRF) se ha demostrado que es necesaria para la reducción del $NADP^+$ porque en cloroplastos extraídos de SRF, la capacidad reductora declina. Estas son evidencias indirectas de su localización inmediatamente después de P700 y antes de la ferredoxina; se propone que es una sustancia de bajo potencial, alrededor de -0.55 V (22).

La ferredoxina es una proteína que contiene -- azufre y hierro, con un potencial redox de $E_0' = -0.42$ V. Es indispensable para la reducción de $NADP^+$. Aunque se extraiga la Fd- $NADP^+$ -reductasa de los cloroplastos es reducida la ferredoxina, pero no se reduce el $NADP^+$ (23).

La enzima ferredoxin- $NADP^+$ -reductasa es una -- flavoproteína específica para sus donadores electrónicos ferredoxina o NADPH, pero no es específica para sus aceptores como el ferricianuro, DCIP, cit f, PC, $NADP^+$ y Fd.

La posición de la Fd-NADP⁺-reductasa se evidenció cuando se encontró que era indispensable para la reducción del NADP⁺ (24), y que la velocidad de su reducción en cloroplastos aislados es linealmente dependiente de la cantidad de Fd reducida por el NADP⁺; cuando se adiciona un anticuerpo contra la flavoproteína es inhibida completamente la reacción. Se ha encontrado también que la enzima forma un complejo 1:1 con la ferredoxina (25).

El nicotin-adenin-dinucleótido oxidado (NADP⁺) es el último aceptor electrónico en el proceso de transporte de electrones. Su especificidad es debida a la ferredoxin-NADP⁺-reductasa (26).

En este proceso se han identificado otros dos citocromos. Uno es el citocromo b559 con dos potenciales redox $E_0^h = +0.37$ y $E_0^l = +0.06$ V, de alto y bajo potencial. Se piensa que podría encontrarse entre PS I y II, inmediatamente después de Q. El citocromo b563 de potencial redox $E_0^l = -0.18$ V, mas bajo que los anteriores, no tiene una función definida y se cree que puede estar incluido en el flujo cíclico alrededor de PS I (ver Fig.8), (27).

De esta manera, a partir de lo anteriormente expuesto, de la excitación de la clorofila de P680 (PS II) se inicia la cadena transportadora de electrones, pasando así los electrones a través de Q, que inicialmente son reducidos y posteriormente oxidados, fluyendo los electrones a PQ, cit f, PC, P700, SRF, Fd-NADP⁺-Red. y finalmente a NADP⁺ que es reducido.

Es importante entonces considerar la localización espacial de la cadena transportadora, para poder --

correlacionar adecuadamente los procesos involucrados en él. Como ya mencionamos con anterioridad, se ha determinado experimentalmente que el PS I está localizado en la parte externa de la membrana y el PS II se encuentra en la parte interna (28), lo que coincide con el esquema de Witt (10), y con el hecho de que las enzimas del ciclo de Calvin se encuentran en el estroma, son dependientes del NADPH, que es el producto final del PS I.

Witt propuso también que se produce una carga negativa fuera y una carga positiva dentro de la membrana. Esta separación de carga produce un equivalente oxidante y otro reductor que se manifiestan finalmente en el donador primario de electrones y primer aceptor de la cadena transportadora (5).

El flujo de electrones no-cíclico está acoplado estequiométricamente con la formación de ATP. El mecanismo que permite este acoplamiento es hasta ahora desconocido. Se ha encontrado que en la superficie de la membrana existe una enzima compuesta de cinco cadenas polipeptídicas, que es indispensable para la síntesis de ATP, ya que se ha comprobado experimentalmente que cuando es extraída de la membrana se inhibe la síntesis de ATP (29) Este complejo enzimático es una ATPasa reversible, que por métodos específicos ha logrado aislarse y purificarse, y que comúnmente se conoce como factor de acoplamiento 1, o CF_1 (29). Cuando es adicionada a cloroplastos extraídos de ese CF_1 se ha observado que el efecto se revierte, es decir, que el gradiente de protones vuelva a

a formarse por tanto la síntesis de ATP en estos cloroplastos (30).

La explicación a este mecanismo molecular de la fotofosforilación ha motivado la investigación y el postulado de diversos modelos que describen el acoplamiento entre la cadena transportadora de electrones y el complejo enzimático que participa en la síntesis de ATP.

Hipótesis quimiosmótica de acoplamiento.-

Mitchell propuso en 1961 esta hipótesis alternativa diferente en el planteamiento a las anteriores, - que no explicaban la necesidad de membranas intactas fisiológicamente que participan directamente en la transferencia de protones, cuestiones que él enfatizó en su modelo, así como la importancia de reacciones vectoriales. (31)

Considerando que las reacciones principales se llevan a cabo en una membrana casi impermeable a protones o iones hidroxilo en un espacio interno, se supone que es en los tilacoides, debido a que, cloroplastos sin la doble membrana, efectúan la fotofosforilación. En la membrana están contenidos los transportadores de electrones que están acoplados al transporte vectorial de iones hidrógeno.

La hipótesis de Mitchell propone que para el paso de moléculas polares de bajo peso molecular a través de membranas debe existir un mecanismo que incremen-

te específicamente la permeabilidad de la membrana al soluto transportado, o que, cuando haya una acumulación -- contra un gradiente de concentración, la célula u organelo debe acoplar la energía derivada del metabolismo a la "translocación del soluto" a través de la membrana.

Una diferencia fundamental entre éste y otros modelos es la unión indirecta entre las reacciones exergónicas del metabolismo escalar y a la función endergónica del transporte vectorial. Mitchell propuso dos mecanismos generales para el transporte: la translocación de -- grupo y la translocación de sustrato.

En la translocación de grupo el transporte se produce a través de la asociación de una enzima o grupo- de enzimas con la membrana, de tal forma que el sustrato se acerca de la fase acuosa en un lado de la membrana y el producto se disocia en el otro lado, siendo esencial el carácter vectorial del mismo. Anteriormente Guggenheim (32) demostró que el transporte químico puede estar acoplado en forma reversible a la transformación química, - separando la reacción química espacialmente en dos medias reacciones conectadas internamente por un conductor específico para una especie química dada y conectado externamente por otro conductor de otra especie química que se requiere para completar la reacción, como se observa en la Fig. 9 Mitchell supuso que las dos reacciones estaban espacial y químicamente separadas y que las fuerzas que conectan los movimientos de las partículas involu-- cradas en la oxidoreducción junto con las de deshidra--

tación del ADP + POH, se comunicaban osmóticamente por el flujo de protones entre dos fases acuosas separadas por una membrana lipídica que contiene la cadena transportadora de electrones y el sistema $ATP_{asa}(CF_1)$, como se muestra en la Fig.10.

En la translocación de sustrato el transporte se produce por la difusión a través de la membrana del soluto no modificado químicamente, por medio de la presencia en la membrana de un acarreador específico o portador. La teoría quimiosmótica establece que las reacciones de transducción de energía están acopladas a través de la formación reversible de un gradiente electroquímico de "catión" (H^+ , Na^+ , Ca^{++}) definido por la ecuación:

$$\mu_c^+ = \Delta\Psi - \frac{RT}{nf} \ln \frac{(c^+)e}{(c^+)i}$$

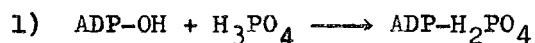
donde μ_c^+ es el potencial electroquímico del catión expresado en mV, $\Delta\Psi$ es el potencial de la membrana en mV, y $-\frac{(c^+)e}{(c^+)i}$ es la diferencia de concentración a los lados de la membrana. R y T son las constantes de los gases y f es la constante de Faraday.

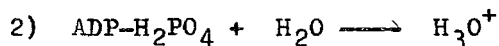
En este caso, la translocación de sustrato propone que los cationes deben ser transportados a través de las membranas en acarreadores funcionales en respuesta al potencial de membrana que en su interior es negativo. Los aniones deben entrar en acarreadores bifuncionales, en respuesta al gradiente de concentración de catión Na^+ intracelular o pH alcalino en el interior. El transporte -

de sustratos neutros, también en acarreadores bifuncionales, obedece al gradiente electroquímico (33).

Hipótesis de acoplamiento del protón anhidro.-

Este modelo fué propuesto por Williams como otra alternativa para explicar el mecanismo de acoplamiento del transporte de electrones y la síntesis de ATP, el cual especifica que los protones generados en la cadena redox se depositan en pequeños bloques en la fase lipoproteica de la membrana y la conexión con la energía osmótica es un factor secundario. Es importante considerar que en la membrana el volumen acuoso es muy pequeño en comparación con el volumen acuoso adyacente (interior y exterior de la vesícula del tilacoide), además de que en la membrana no hay homogeneidad hidrofóbica, sino que puede contener un volumen de moléculas de agua intercaladas como se muestra en la Fig. 11. Estas características permiten la absorción eficiente de los protones anhidros liberados a partir de la cadena transportadora de electrones por las moléculas de agua presentes en la fase lipoproteica; entonces, se puede decir que la fosforilación se lleva a cabo por la oxidación de átomos de hidrógeno de la fase lipoproteica que se conectan a través de la cadena transportadora y la ATPasa reversible. La formación de ATP a partir de ADP más fosfato consiste en una condensación y una deshidratación:





A pH bajo sí se estabiliza en una región membranal no acuosa, la reacción es termodinámicamente favorable hacia la derecha. De esta manera Williams postula que la oxidación de sustratos genera los protones -- anhidros necesarios para remover el agua del ADP + Pi -- en una región lipoproteica; subraya además que es necesario que exista una baja actividad de agua, para que -- se efectúe la reacción de deshidratación como en el caso de los ácidos fuertes no acuosos que requieren esta -- condición para favorecer la polimerización de fosfatos, y que la fase de conexión debe estar protegida de la -- entrada de agua, localizandose ésta en la fase lipoproteica con la finalidad de prevenir hidratación y deenergización irreversible del protón anhidro (34).

Consideraciones adicionales al concepto de acoplamiento del protón anhidro.-

Mitchell ha cuestionado el modelo presentado -- por Williams, haciendo una serie de observaciones interesantes, puntualizando los factores que deben ser tomados en cuenta inevitablemente y que nos ayuda a comprender -- mejor el problema del acoplamiento. (35).

Mitchell señala que el tipo de protón anhidro tiene un gran parecido con el intermediario químico clásico rico en energía, pero hasta ahora no se le conocen pruebas que lo respalden; además que la hipótesis de acoplamiento

plamiento protónico anhidro no incluye ninguna especificidad de translocación protónica en la ruta entre la región acuosa interna y la dilución acuosa media externa.- El mecanismo no conoce estequiometría, es irreversible y además no tiene un mecanismo quimiosmótico.

Todo lo anterior converge en el hecho de que estas reacciones se efectúan en la membrana del tilacoide, lo que implica un confinamiento estructural y una especificidad translocacional para determinar y acoplar las rutas de las reacciones del intermediario protón-anhidro; de otra manera, sólo podría explicarse por un enlazamiento covalente especificando enzimáticamente, que acoplara las reacciones como en el caso del modelo convencional del intermediario químico. Además de la especificidad translocacional de la salida de protones, en la que actúa como H_3O ó H^+-H_2O (uniportador) y como $2H^+-H_2O$ (symporter) para transformar la diferencia de potencial protónica ΔH^+ , entre la fase microscópica interna y la acuosa del medio a diferencia de potencial del agua ΔH_2O , como se muestra en la Fig.12, en un estudio comparativo con la minaturización del mecanismo quimiosmótico macroscópico, en el que se enfatiza que el modelo del protón anhidro no tiene especificidad translocacional por lo que tiene un grado desconocido de acoplamiento, y que como no tiene estequiometría definida no es reversible.

De lo anterior Mitchell concluye que el modelo del protón anhidro requiere de un acoplamiento fuerte y reversible, ambos por la inclusión de especificidad --

translocacional protónica, de tal manera que llegaría a ser un mecanismo quimiosmótico microscópico como él tiene sugerido en su modelo quimiosmótico macroscópico, o -- por la inclusión de un intermediario rico en energía que podría reaccionar específicamente con el agua, en la -- ATPasa como centro activo (35).

Se ha encontrado que una forma adecuada para -- abordar el problema del acoplamiento entre la síntesis de ATP y el transporte de electrones, mediante el uso de desacoplantes, que son sustancias que actúan disipando el gradiente protónico por lo que inhiben la síntesis de ATP y acelerando la velocidad del transporte de electrones.

Aunque se trata de un método indirecto, que incide precisamente en el proceso inverso al que tratamos de conocer, encontramos que nos proporciona datos valiosos que explican por medio de los mecanismos propuestos para el acoplamiento de estos procesos.

Los mecanismos que se proponen para las sustancias desacoplantes particularmente las sustancias alquilaminadas es que actúan interaccionando con algún componente de la membrana o como acarreador móvil de protones, disipando el gradiente de protones. Se ha postulado también que en su forma no protonada es más activa, por lo que a pH elevado la inhibición es mayor (36).

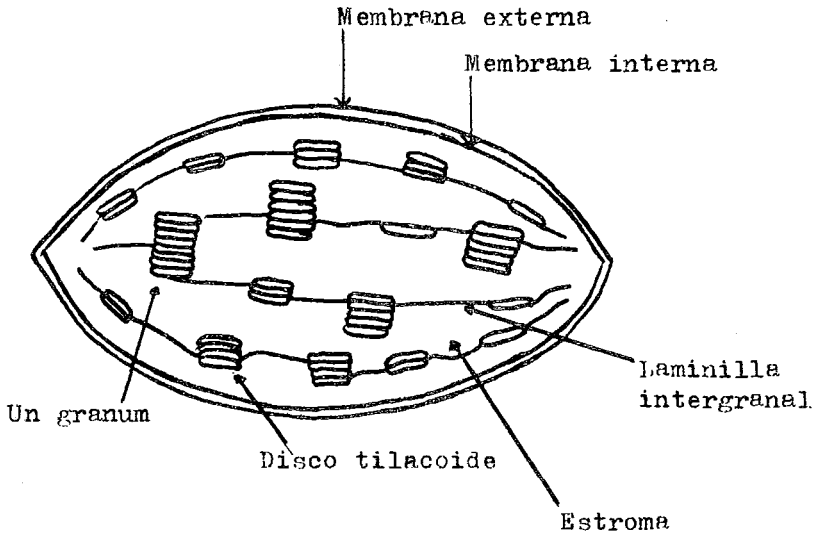
En trabajos anteriores se encontró que la dodecimetilnamina inmovilizada con sefaroza actuaba como desacoplante clásico, pero su mecanismo de acción tiene que ser muy particular, ya que debido a su gran tamaño la mo-

lécúla de sefarosa no puede penetrar en el interior de la fase acuosa del tilacoide y por tanto su mecanismo de acción no puede ser el de acarreador móvil de protones; entonces se pensó que podía tener propiedades detergentes y actuar disolviendo componentes de la membrana, destruyendo parte de ella, por lo que se desarrolló un trabajo en el laboratorio en el que se estudió la sefarosa-dodecametilenamina y su posible acción tensoactiva, por criterio de hinchamiento y contracción de cloroplastos y tensoactividad en relación a la bomba de protones, pero se encontró que no tiene efecto detergente (37), por lo que se postula que actúa protonándose en la fase membranal, disipando de ésta manera el gradiente de protones. Es importante entonces localizar él, o los sitios de desacoplamiento a través de toda la cadena transportadora de electrones, en el PS I y el PS II con sustancias amidadas de diferente longitud de brazo hidrocarbonado para calcular la distancia probable a la que se encuentra el sitio de desacoplamiento.

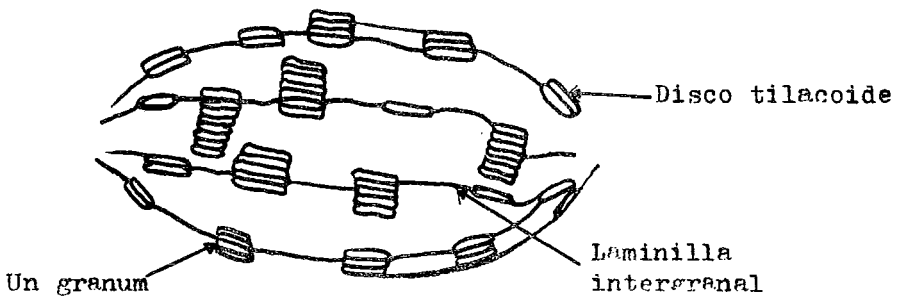
En el laboratorio se ha trabajado también con éstas mismas sustancias, desde una molécula de 2 hasta de 12 átomos de carbono, con un grupo amino primario, y se ha encontrado que las aminas con una cadena de 2, 4, 6, 8 y 10 átomos de carbono no desacoplan porque no presentan ningún efecto con respecto al control, en la velocidad del transporte de electrones a través de toda la cadena transportadora ($H_2O \rightarrow MV$), en concentraciones crecientes, pero la amina de 12 átomos de carbono activa

la velocidad en el transporte de electrones, lo que sugirió que la distancia crítica de desacoplamiento es de $\approx 21 \overset{\circ}{\text{A}}$, lo que mide el brazo hidrocarbonado de la dodecacetilnamina. Debido a esto, en los siguientes trabajos desarrollados en el laboratorio se estudió el efecto de estas aminas en las reacciones parciales de la cadena transportadora, que son el PS I y II en condiciones basales (sin ADP y Pi), encontrando un ligero efecto desacopante en las aminas de 6, 8, 10, y 12 átomos de carbono.

Tomando en cuenta todo lo mencionado anteriormente, en este trabajo se midieron el transporte de electrones en PS I y II en condiciones fosforilantes (ADP y Pi) y la bomba de protones con las aminas de 6, 10 y 12 átomos de carbono como muestra. Además se depletaron cloroplastos de su CF_1 y se adicionaron de sefarosadodecacetilnamina con la finalidad de observar si el grupo amino interaccionaba con el espacio libre dejado por el CF_1 , y la molécula de sefarosa tapara el hueco en la membrana. También se experimentó con una amida y un ácido aminado con una cadena de 12 átomos de carbono, para observar si modificando el grupo funcional de la amina se alteraba la protonación, al medir la velocidad del transporte de electrones a través de toda la cadena transportadora.



Cloroplasto normal de espinaca, mostrando la disposición de tilacoides, granum y membranas.



Cloroplasto de clase II, sin la doble membrana externa.

Fig. 1 Representación esquemática del cloroplasto

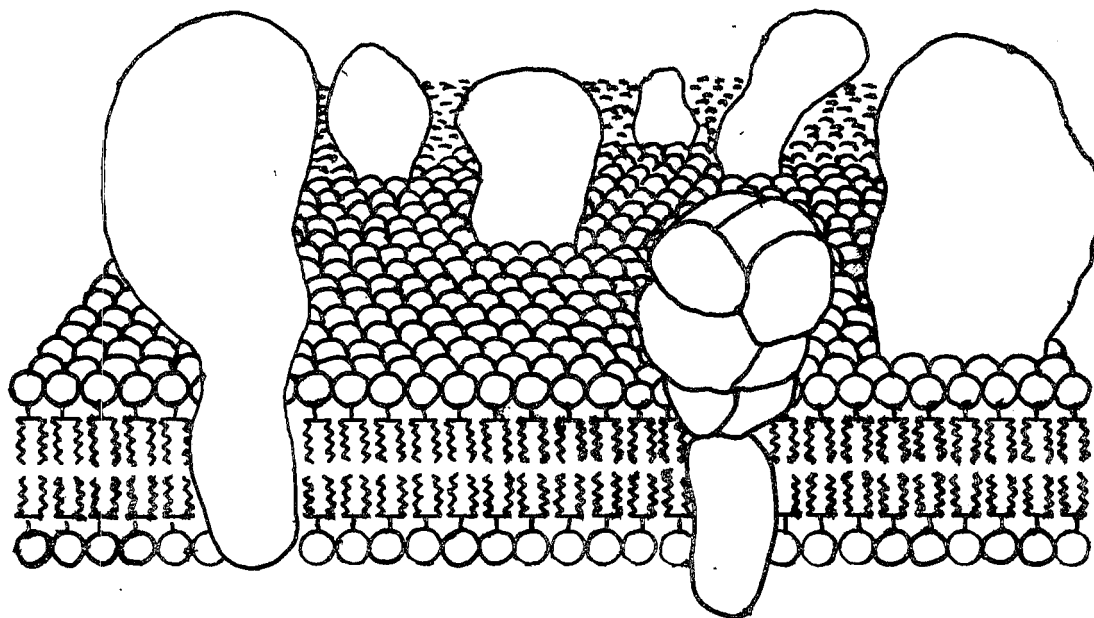


Fig. 2 Esquema tridimensional de la membrana del cloroplasto de acuerdo al "Modelo del mosaico fluido", en el que se muestran las proteínas distribuidas en la capa fluida de lípidos.

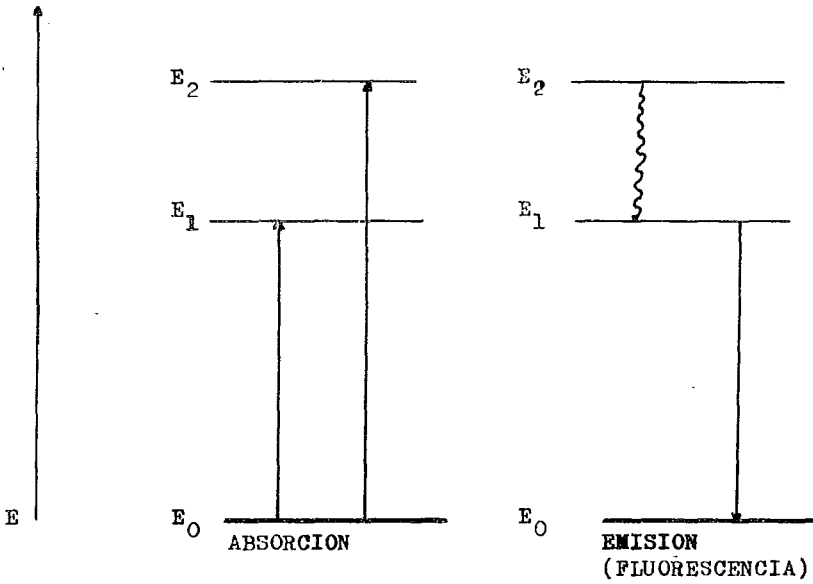
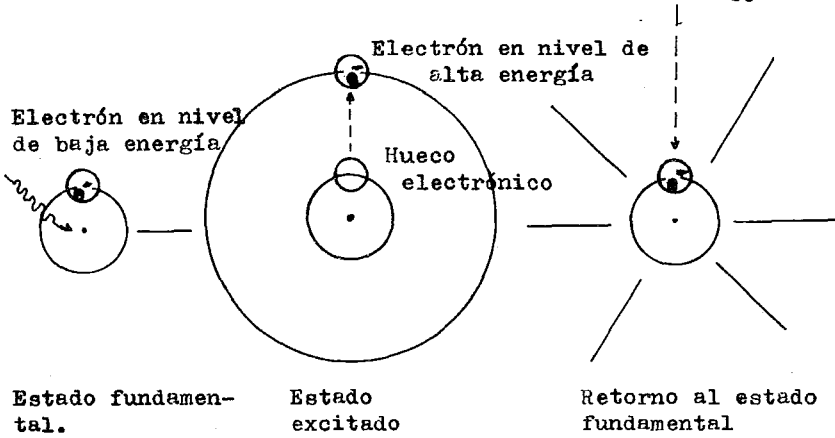
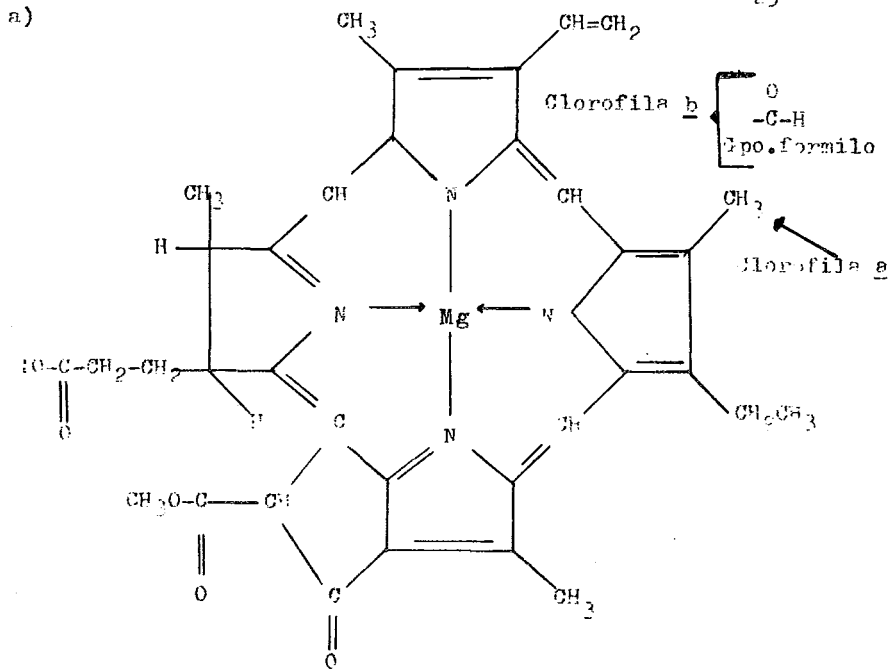


Fig. 4 Excitación de una molécula y pérdida de energía en su retorno al estado fundamental, en forma de fluorescencia y calor.



RO= Grupo fitilo

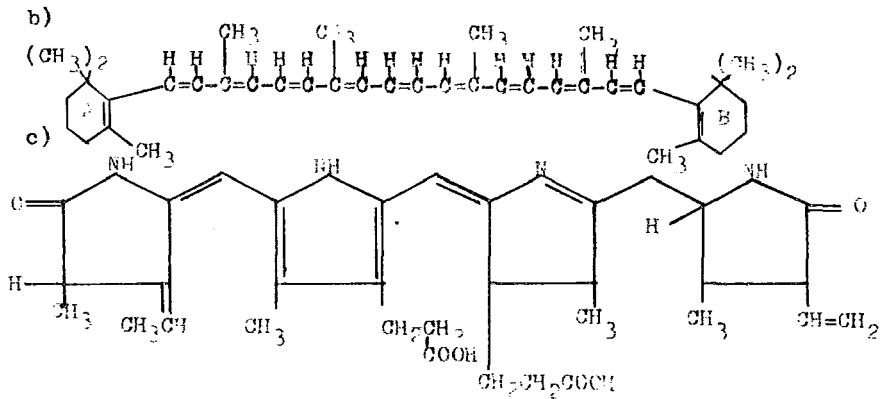


Fig. 5 a) Estructura de la clorofila a y b.
 b) Estructura de los carotenos.
 c) Estructura de la licopeno (rojo).

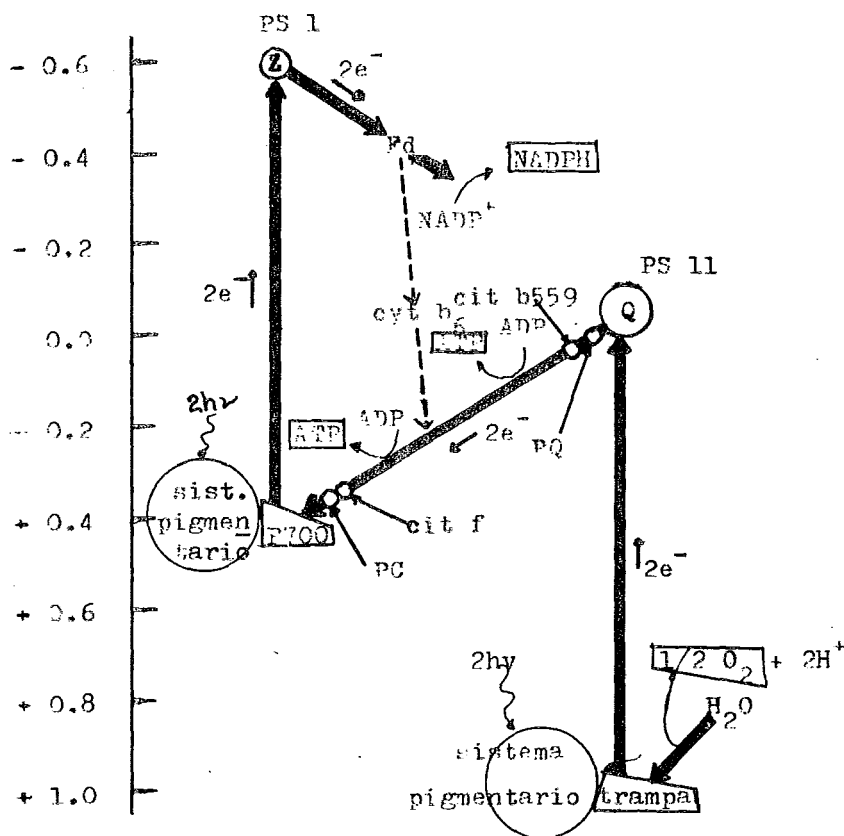


Fig. 7 Esquema Z propuesto por Witt, para el flujo de electrones en la fotosíntesis. Están ordenados en serie los FOTOSISTEMAS I y II, conectados por una cadena transportadora de electrones entre el aceptor Q del PS II y el P700 del PS I. Se inicia con la fotólisis del agua y finaliza en el NADPH.

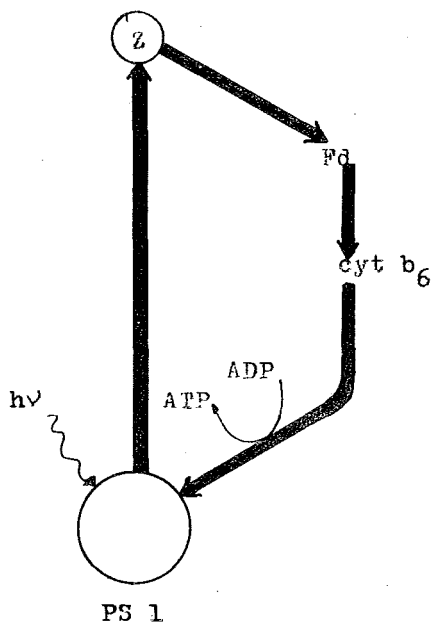


Fig. 8 Flujo cíclico alrededor del PS I: Los electrones elevados hasta Z en el PS I pueden volver al estado fundamental P700 por medio de una conexión que proporciona el citocromo b_6 , o por un transportador electrónico artificial tal como el metasulfito de fenazina (MPS).

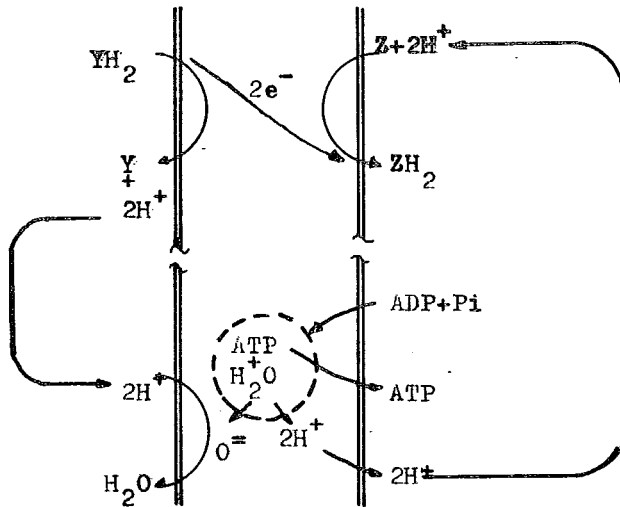


Fig. 9 Acoplamiento quimiosmótico.- De acuerdo al modelo propuesto por el Dr. Mitchell, el acoplamiento - del transporte de electrones y de la acumulación de iones hidrógeno a la formación de ATP, requiere una estructura - limitada por una membrana, como se observa en el esquema.

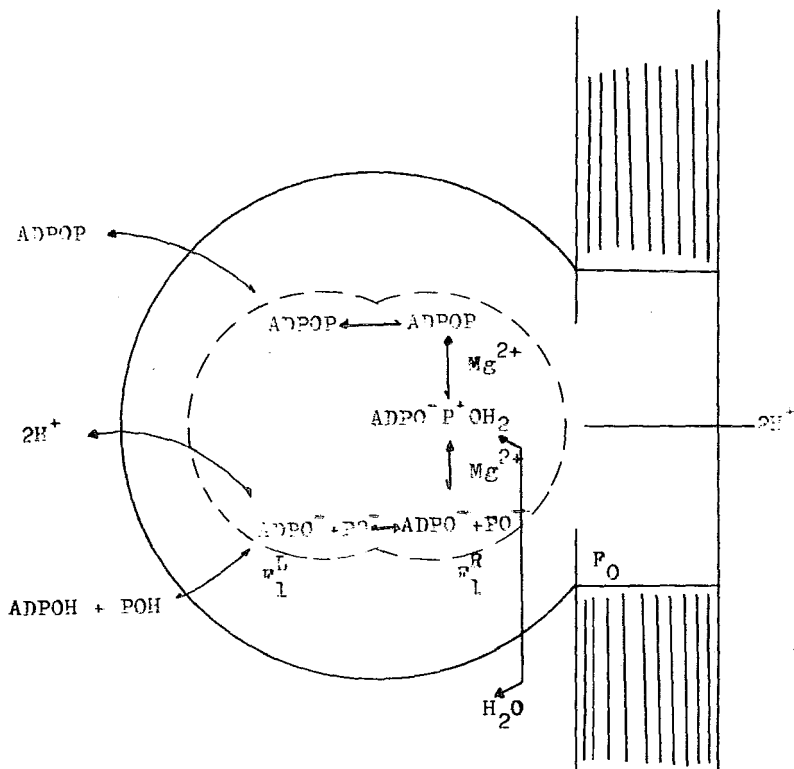


Fig. 10 Este esquema representa el flujo de reagentes en la ATPasa reversible CF_0 y CF_1 , durante la fosforilación-protónmotriz del ADP, como lo postula el Dr. Mitchell en su modelo quimiosmótico.

ADPO^L representa al ATP; ADPO^R y PO⁻ representan el ADP y Pi respectivamente. El F₁^L y F₁^R representan con figuras o estados del complejo-substrato F₁, en el sitio.

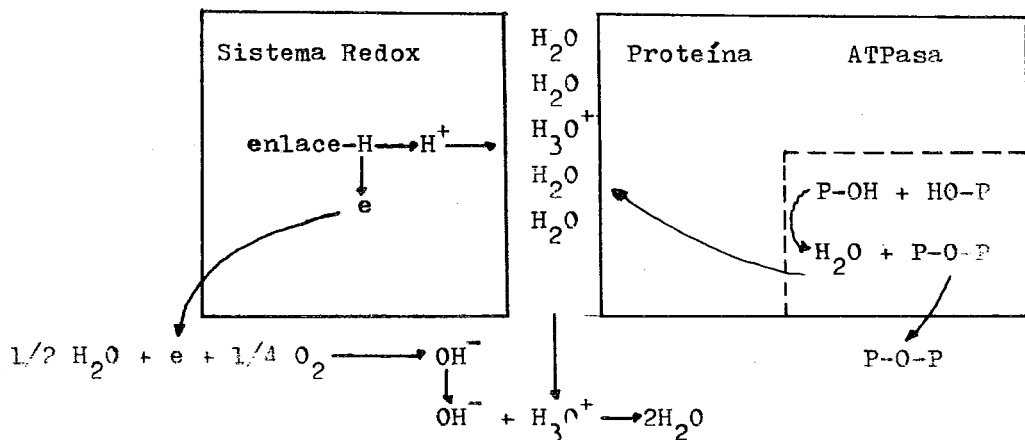


Fig. 11 Diagrama del mecanismo de acoplamiento del protón anhidro, postulado por el Dr. Williams. El modelo especifica que los protones generados en la cadena redox se depositan en pequeños bloques en la fase lipoproteica.

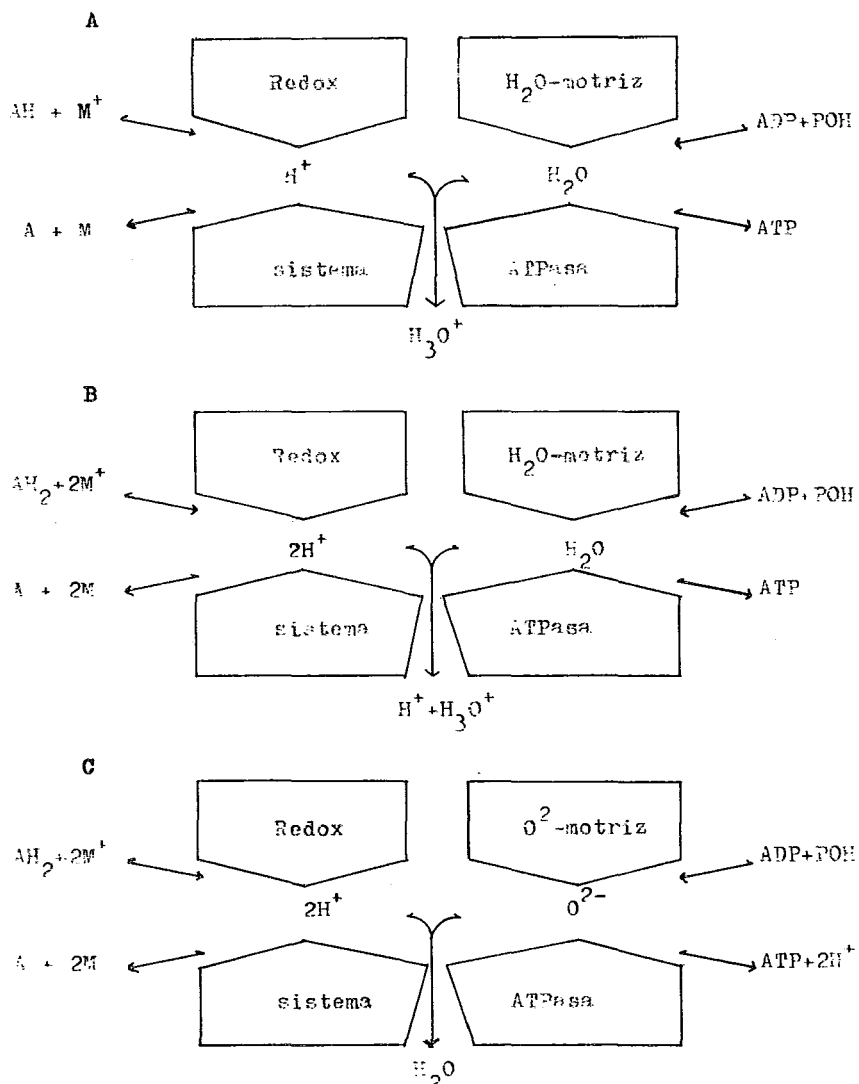
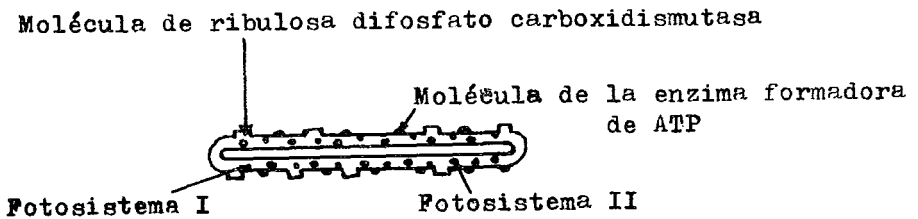
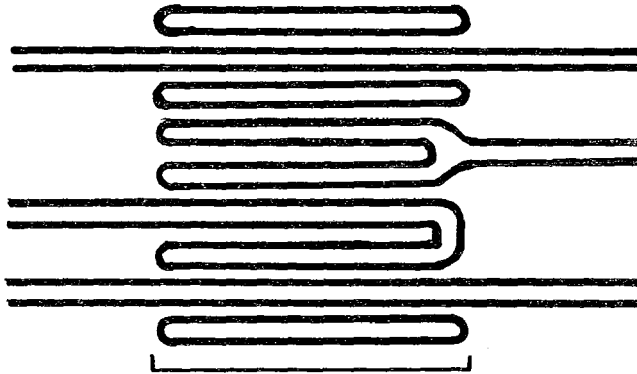


Fig. 12 En A y B observamos el mecanismo del proton anhidro, con una ruta de salida especifica para H⁺ ó 2 H⁺. En C, se observa la miniaturización del Modelo quimiosmótico macroscópico.



DISCO TILACOIDE



Apilamiento de discos tilacoides= grana

G R A N A

Fig. 1-A

Disposición de la membrana interna de un cloroplasto. En el disco tilacoide se representan las enzimas más importantes y los fotosistemas que se encuentran ahí. En el grana se muestra el modo en que se pliega y apila la membrana interna para formar lo.

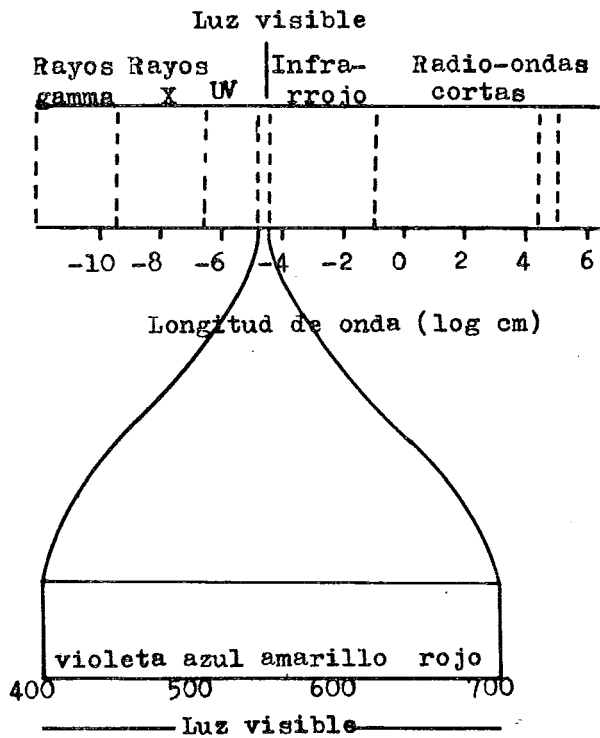


Fig. 4-A
Espectro de radiación electromagnética.

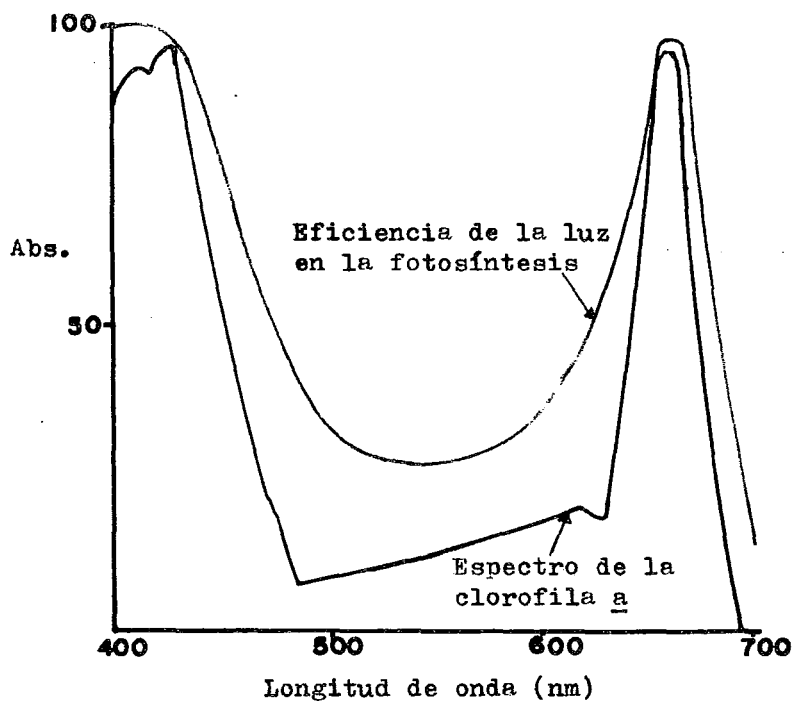


Fig. 5-A

Espectro de absorción de la clorofila a. La línea más clara representa el espectro de eficiencia de la luz en la fotosíntesis.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

I Aislamiento de cloroplastos clase II (sin doble membrana).

Esta técnica fué publicada en 1974 como resultado de los trabajos de Takakoi y col. (40), y se adaptó de la siguiente manera en el laboratorio: 30 g de hojas de espinaca (Spinacea oleracea) previamente lavadas, se guardan en el refrigerador la noche anterior, conservandolas húmedas. Se les quita la vena central y la punta, se pica finamente y se colocan en un vaso de licuadora - (que ha sido previamente enfriado en congelador durante 30 min.). Se adicionan 180 ml de medio de aislamiento (- 200 mM de sacarosa, 20 mM de tricina, 5 mM de $MgCl \cdot 6H_2O$, 50 mM de KCl, 0.1% de BSA y 0.5 mM de ascorbato), se licúa durante 5 segundos intermitentemente. Inmediatamente se filtra a través de 8 capas de gasa colocadas en un embudo de filtración rápida, para eliminar los pedazos de hoja que no fueron molidos. El homogenizado se coloca en los tubos de centrifuga previamente enfriados y se equilibran. Se centrifuga a 1,500 rpm durante 3 minutos (centrifuga MSE modelo LR-6); en este paso se elimina el sedimento que contiene las células enteras, núcleos y pared celular. El sobrenadante se centrifuga a 3,500 rpm -

durante 8 min. Se elimina el sobrenadante y el sedimento que contiene los cloroplastos se lava con medio de resuspensión (100 mM de sacarosa, 20 mM de tricina, 5 mM de $\text{MgCl}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 50 mM de KCl y 0.1% de BSA), cuidadosamente con un pincel de cerdas suaves se remueve el botón, se homogeniza y se centrifuga a 3,500 rpm por 8 min. Este procedimiento de lavado se repite dos veces con la finalidad de eliminar impurezas. Finalmente el sedimento se resuspende en 2 ml de medio de resuspensión y se conserva en un tubo de ensaye cubierto con papel aluminio, a baja temperatura en un baño de hielo. En esta metodología es importante conservar la temperatura a 4°C como máximo y a un pH= 8.

II Determinación de clorofila.

La valoración de la clorofila se hizo de acuerdo al método descrito por Strain y Svec (41) de la siguiente manera: A tres tubos de ensaye de 13 X 100 se le adicionan 5 ml de acetona al 80%. A dos de ellos se les pone una alícuota de 20 μ l de la suspensión de cloroplastos previamente homogenizados, se cubren los tres tubos con papel parafilm e inmediatamente se agitan en un vortex por 30 seg. y se incuban en la oscuridad durante 5 min.; se centrifugan las dos muestras en una centrifuga clínica mod. CL No.197 A, a velocidad máxima por 5 min., se decanta y al sobrenadante se le lee la absorbancia a 649 y 665 nm contra el blanco de acetona al 80% en un es

pectrofotómetro Carl Zeiss M4 Q III, 45309-PMQ II 46275, calculando los valores con la siguiente ecuación:

$$C_{\text{tot}}(\mu\text{g/ml}) = 6.45 (A_{665}) + 17.72(A_{649})$$

Ecuación que se obtuvo a partir de la deducción basada en los coeficientes de extinción específicos (42,-43).

III Preparación de cloroplastos deficientes en CF_1 .

Esta técnica fué adaptada a partir del reporte hecho por Racker (44) en la siguiente forma:

- 1.- Se aíslan cloroplastos como se explicó en la técnica anterior y se determina la concentración de clorofila.
- 2.- La suspensión obtenida se diluye a una concentración de clorofila de 1.5 mg/ml, por la adición de una solución de NaCl 10 mM, o de medio de resuspensión.
- 3.- Una alícuota de ésta suspensión se diluye a una concentración de clorofila de 0.1 mg/ml por adición de una solución de EDTA 0.75 mM a pH= 8.
- 4.- La suspensión resultante se incuba durante 5 min. a temperatura ambiente en la oscuridad y sin agitación.
- 5.- Esta suspensión se centrifuga a 15,000 rpm en la centrífuga J-21, durante 20 min. a una temperatura de 4°C.
- 6.- Los botones obtenidos son resuspendidos en

1 ml de medio de resuspensión y se determina la concentración de clorofila. El sobrenadante que se obtiene en el paso 5, es una fuente conveniente de CF_1 .

IV Preparación de Bromuro de cianógeno.

Este método fué desarrollado de acuerdo al reportado por Hartman y col. (45). El bromuro de cianógeno es un polvo cristalino blanco que funde entre 49 y 51°C con punto de ebullición de 60-62°C, que tiene la propiedad de activar la molécula de sefarosa. El procedimiento empleado fué el siguiente:

1.- En un matraz bola de tres bocas (en un baño de agua fría para conservar la temperatura) se colocaron un embudo de adición, un termómetro y un tubo de salida. Este sistema estaba provisto de agitación magnética.

El matraz contenía 50 g de bromo, el embudo de adición 17 g de NaCN en 120 ml de agua. Se fué adicionando gota a gota la solución de NaCN controlando la temperatura por debajo de 30°C.

2.- Cuando se ha terminado de adicionar la solución de NaCN el bromuro de cianógeno obtenido se destiló controlando la temperatura entre 60-62°C, recibiendo el destilado en otro matraz bola.

3.- El destilado se calienta con $CaCl_2$ anhidro 10 g, sin dejar que se enfríe se filtra y se obtiene en un matraz bola en baño de hielo; este matraz se conecta

a su vez a un refrigerante con un matraz receptor previamente tarado. Se calienta el matraz con el contenido, -- controlando la temperatura nuevamente entre 60-62°C hasta que se ha agotado el máximo de remanente, obteniéndose de esta manera los cristales blancos del bromuro de cianógeno. Es conveniente tener muchas precauciones porque se trata de una sustancia extremadamente tóxica.

V Acoplamiento de las aminas a sefarosa.

El primer paso de este proceso se desarrolló de acuerdo a Cuatrecasas y col. (46, 47) que consiste en la activación de la sefarosa 4B previamente lavada con 1 lt de agua y 100 ml de Na_2CO_3 2 M. Después, con todas las - precauciones se adiciona 0.5 Vol. de una solución de bromuro de cianógeno (2 g de CNBr /ml de acetonitrilo), agitando fuertemente de 1-2 min. Después se vierte en un embudo de vidrio poroso (previamente enfriado) y se filtra - parcialmente sin dejar empacar la sefarosa lavando con - una solución de bicarbonato de sodio 0.1 M a $\text{pH} = 9.5$, agua fría y bicarbonato de sodio 0.2 M a $\text{pH} = 9.5$; Después de este último lavado se empaca y se obtiene la sefarosa activada.

En un volumen de bicarbonato de sodio 0.2 M y $\text{pH} = 9.5$, se disuelve previamente la diamina, en el caso de las diaminas de 10 y 12 átomos de carbono se emplean 2 lts. de dimetilformamida al 50% para disolverlas. Se - ajusta nuevamente el pH a 9.5 y cuando están completamen

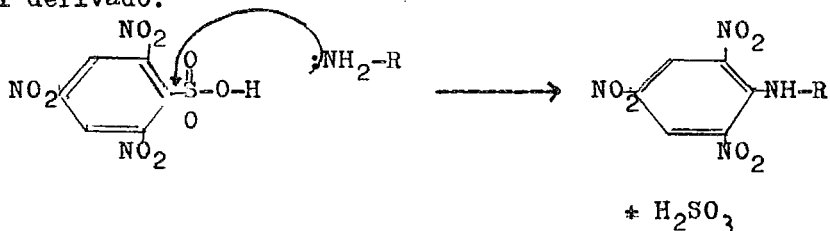
te disueltas se mezclan con la sefarosa activada.

La reacción de acoplamiento se lleva a cabo durante 20 hrs. a 4°C, con agitación suave y constante. Después de efectuada la reacción, se filtra el paquete y se lava con 20 ml de solución acuosa de acetato de sodio 0.1 M-cloruro de sodio 0.5 M pH= 4, y después con 20 ml de solución acuosa de urea 2 M-cloruro de sodio 0.5 M pH= 10.

Finalmente se empaca y se resuspende en 40 ml de agua cada sefarosa con su ligando.

VI Medición de grupos amino primarios libres.

Esta determinación se basa en el trabajo hecho por Okuyama y col. (48), mediante el empleo del ácido 2, 4, 6 trinitrobenzensulfónico (TNBS), que forma un derivado característico de color amarillo al unirse a un grupo amino primario libre. Esta reacción se efectúa por el ataque nucleofílico del nitrógeno de la amina al carbono del grupo sulfito, desplazándolo y formando el trinitrofenil derivado:



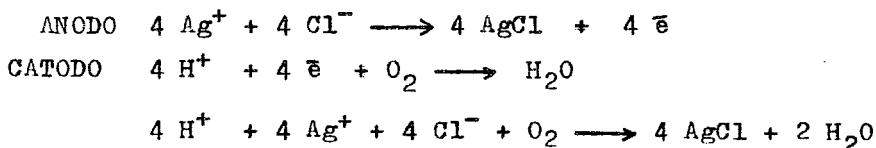
Este producto presenta un máximo de absorción de 345 nm, lo que nos permite preparar soluciones estándar de monoaminas a diferentes concentraciones midiendo su absorbancia para obtener una curva patrón, con la finali-

dad de interpolar las absorbancias de soluciones preparadas a partir de las sefarosas acopladas y conocer la concentración de grupos amino. El procedimiento empleado se resume en la tabla No. 1. El espectrofotómetro empleado es el Carl Zeiss M4 Q III, 45309-PM Q II 46275.

VII Medición del transporte de electrones.

Basándose en el hecho de que por efecto de la luz hay fotólisis del agua, y de que el oxígeno es un elemento electroreducible, originando una onda que se puede determinar por medio de un electrodo, que mide el gradiente electroquímico por efecto de la concentración de oxígeno manteniendo constante el voltaje aplicado, se empleó en este caso un electrodo tipo Clark (49) que mide los cambios de concentración de oxígeno que se producen por la fotólisis del agua. Este electrodo está compuesto por un cátodo de platino y un ánodo de plata los que están en contacto con una solución concentrada de cloruro de potasio, la que a su vez está contenida en una membrana de politetrafluoretileno (PTFE) que está en contacto con el medio de la reacción, protegiéndolo de sustancias contaminantes y siendo permeable a gases. Se considera - que la permeabilidad es selectiva, porque en el caso particular del oxígeno en la mezcla de reacción es el único que está variando. Aplicando un voltaje de 0.5-0.8 V a través de los electrodos, la corriente es proporcional a la concentración de oxígeno en la cubeta de reacción.

En el electrodo tipo Clark se efectúan las siguientes reacciones:



Los cambios de corriente detectados en el electrodo son traducidos a voltaje por un oxímetro construido por el Dr. Dilley (en la Universidad), y éste último es ta conectado a un registrador Beckman con una entrada máxima de 10 mV, lo que equivale a 1-2 eq electrónicos.

El esquema mostrado en la Fig. 13 ilustra la disposición del equipo empleado. El proyector Swyer's con una lámpara de 500 W para proporcionar luz a saturación, el rayo de luz pasa a través de una lente de Izawa que consiste en una solución de sulfato de cobre(2%), contenida en un matraz bola de 500 ml, que hace la función de filtro, concentrando la luz y eliminando calor de la cámara de reacción que tiene paso de corriente de agua para mantener la temperatura (como un refrigerante), esta sostenida por un agitador magnético, que mantiene homogénea la suspensión. La cámara de reacción tiene adaptado el electrodo tipo Clark, por una horadación hecha especialmente para este fin, donde se ajusta perfectamente.

Para medir las reacciones en PS I y PS II se utilizaron dos mezclas de reacción diferentes, pero ambas con un volumen total de 2 ml.

Mezcla de reacción estandar: Sacarosa 100 mM,

tricina 20 mM, KCl 50 mM, BSA 0.1%, MgCl \cdot 6H $_2$ O 5 mM y 20 g de clorofila/ml.

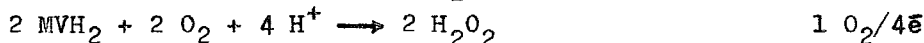
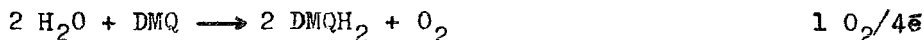
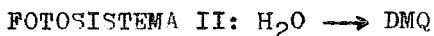
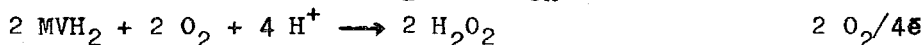
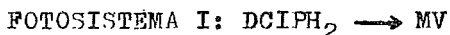
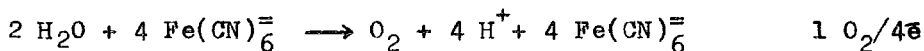
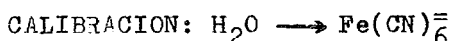
Para PS I: La mezcla de reacción estándar, más 2.5 mM de ascorbato, 0.4 mM de DCIP, 5 M de DCMU, 0.5 M de MV, 1 mM de ADP y 3 mM de KH $_2$ PO $_4$ (Pi).

Para PS II: La mezcla de reacción estándar, más 1 M de DBMIB, 0.5 mM de DMQ, 0.4 mM de Fe(CN) $^{=}$ $_6$, 1 mM de ADP y 0.3 mM de KH $_2$ PO $_4$ (Pi). (Ver Fig. 14).

La calibración se realizó con la mezcla de reacción estándar y 50 mM de ferricianuro.

En los dos fotosistemas se midió el transporte de electrones en condiciones fosforilantes, sin adicionar más reactivos, para obtener los trazos control. Después en otras alícuotas se probaron concentraciones crecientes de las monoaminas, diaminas, sefarosa-aminas, amida y ácido aminado.

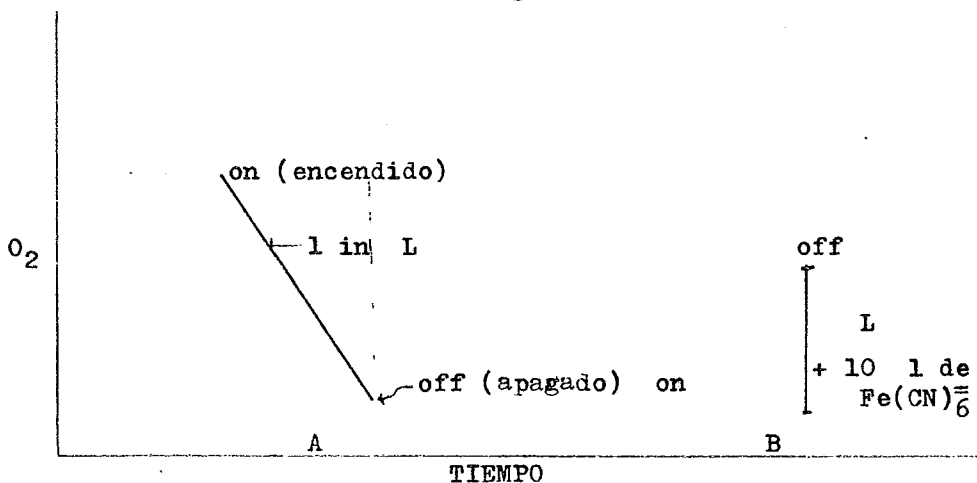
Las reacciones efectuadas en la mezcla son:



Los trazos obtenidos en el graficador nos indica la velocidad de consumo o producción de oxígeno, lo cual se puede determinar comparando la pendiente del control con los trazos obtenidos para diferentes concentraciones de la muestra problema, calibrando con la solución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{=}$ 0.05 M, que en $10 \mu\text{l}$ equivale a $0.5 \mu\text{eq}$ de e en 2 ml, lo que se emplea para hacer la conversión a microequivalentes de lectrones por hora por miligramo de clorofila, que es la expresión final del resultado:

$$\frac{0.5 \mu\text{eq } \bar{e}}{\text{No. de líneas recorridas al calibrar.}} \times \frac{60 \text{ min/hr.}}{\text{mg/ml clo. adicionada.}} = \mu\text{eq. } \bar{e}/\text{hr./mg clo}$$

La forma del trazo es la siguiente:



A= muestra problema;

B= calibración.

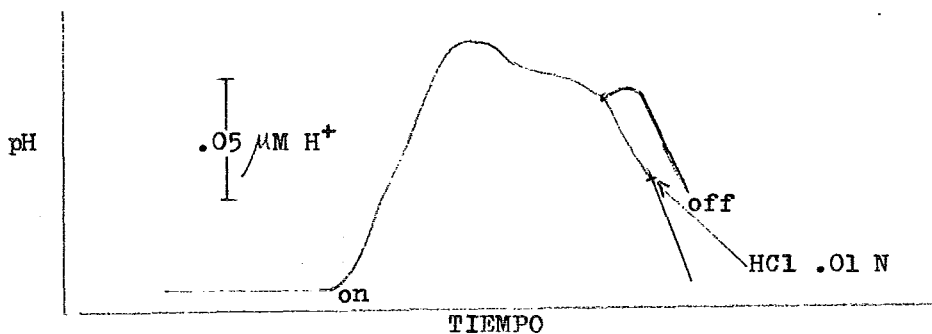
VIII Medición de la bomba de protones.

Se mide el gradiente de protones, registrando los cambios de pH en un potenciómetro (Corning Modelo 12 con escala expandida), a la mezcla de reacción que contiene los cloroplastos, cuando ésta es iluminada a un pH= 6.

La velocidad y el cambio de pH se pueden calcular por la diferencia de pendiente y tamaño del trazo, - debida a la alcalinización del medio al ser transportados los protones dentro del tilacoide. El flujo inverso de protones sucede cuando se apaga la luz, pero con una velocidad menor.

El medio de reacción estandar contiene: 100 mM de KCl, 5 mM de $MgCl \cdot 6H_2O$ y 0.5 mM de MV, además de 20 - g de clorofila/ml.

El trazo obtenido es el siguiente:



Los instrumentos empleados se esquematizan en la Fig. 15; el equipo consiste en un proyector Swyer's - con una lámpara de 500 W, haciendo pasar la luz por un - lente de Izawa, para concentrar los rayos y eliminar ca-

calor. La cubeta de reacción tiene una doble camisa con flujo de agua para conservar la temperatura, dentro de la cubeta de reacción se sumerge el electrodo conectado al potenciómetro, el cual está conectado a un graficador marca Beckman, que registra los cambios de pH por medio de los cambios de voltaje que registra.

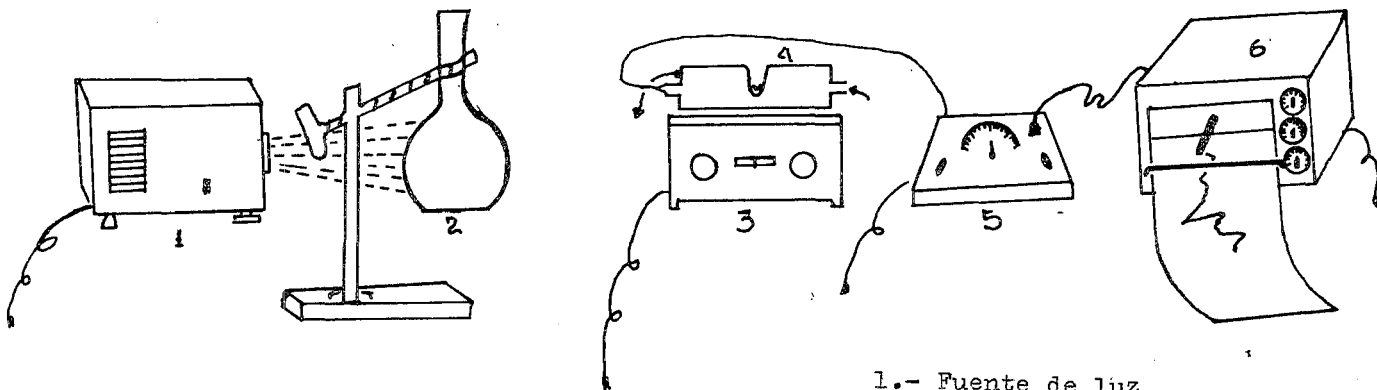
Cuando se iluminan los cloroplastos se genera un gradiente protónico en el que se están translocando los protones hacia el interior del tilacoide de los cloroplastos y por tanto se alcaliniza el medio externo que es el pH que mide el electrodo. Es característico de las sustancias desacoplantes el inhibir la formación de gradiente protónico inducido por la luz, por lo que para comprobarlo es necesario adicionar la sustancia desacoplante a la mezcla de reacción y observar el efecto

T A B L A 1 .

Determinación de grupos amino.

Tubo	Amina (ml)	NaHCO ₃ 4% pH 8.5	Agua (ml)	MeOH (ml)	TNBS mg/ml fresco	HCL concentrado	Lecturas Abs.	
1	-----	0.75	0.6	0.75	0.75	#	0.375	-----
2	0.025	0.75	0.575	0.75	0.75	#	0.375	-----
3	0.050	0.75	0.550	0.75	0.75	#	0.375	-----
4	0.075	0.75	0.525	0.75	0.75	#	0.375	-----
5	0.100	0.75	0.500	0.75	0.75	#	0.375	-----
6	0.40	0.75	0.200	0.75	0.75	#	0.375	-----
7	0.60	0.75	0.00	0.75	0.75	#	0.375	-----

#.- Incubar 2 hrs. a 40° C con agitación.



- 1.- Fuente de luz
- 2.- Lente de Izawa
- 3.- Base de agitación
- 4.- Cámara de reacción
- 5.- Oxímetro
- 6.- Registrador

Fig. 13 Diagrama que muestra la disposición del equipo para la medición del transporte de electrones.

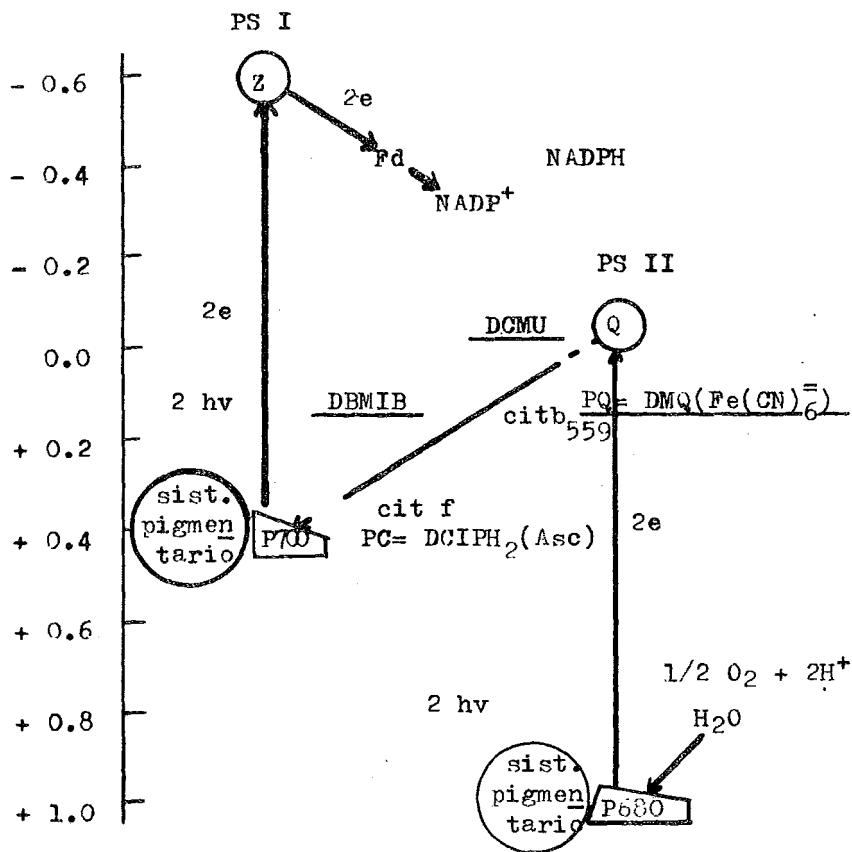
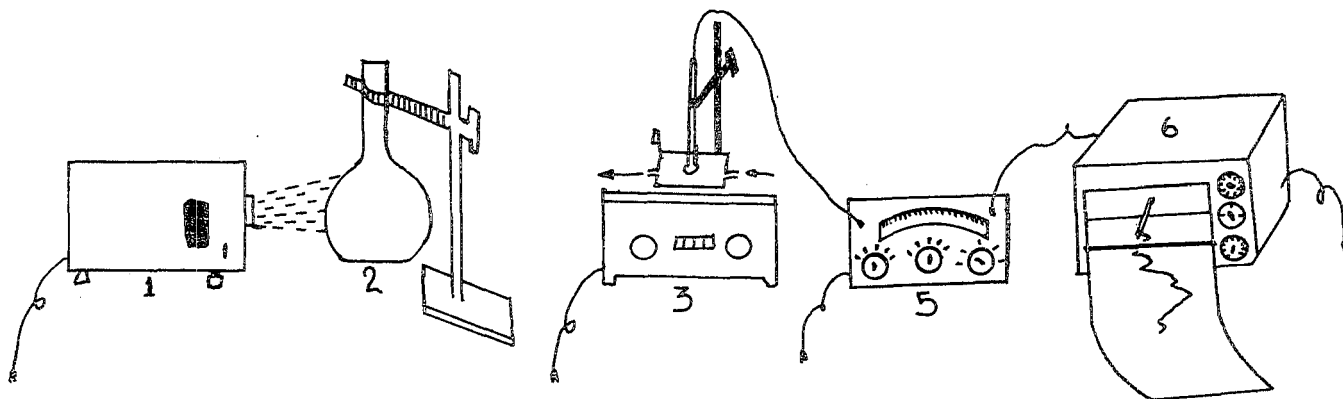


Fig. 14 Esquema Z para el flujo de electrones en la fotosíntesis. Se indican sitios de acción de los inhibidores y aceptores de electrones artificiales empleados en la medición del transporte de electrones de PS I y II.



- 1.- Fuente de luz
- 2.- Lente de Izawa
- 3.- Base de agitación
- 4.- Cámara de reacción
- 5.- Potenciómetro
- 6.- Registrador.

Fig. 15 Diagrama que muestra la disposición del equipo para la medición de la bomba de protones.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

I Efecto de las aminas alquílicas sobre el -- transporte de electrones en PS I (DCIP \longrightarrow MV), en condi ciones fosforilantes(ADP + Pi).

En la Fig. 16 observamos la gráfica del porcien to de la velocidad del transporte de electrones en PS I con respecto al control, contra la concentración crecien te de las diaminas, con fórmula general $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-NH}_2$ en donde $n= 6, 10$ y 12 átomos de carbono, hexametilendiamina decametilendiamina y dodecacetilendiamina respectivamente.

La dodecacetilendiamina produce una marcada acti vación, alrededor del 80%, en cambio la decametilendia- mina y la hexametilendiamina activan cerca de un 25%. Los resultados indican que la dodecacetilendiamina tiene una mayor actividad desacoplante, lo que sugiere que la lon- gitud del brazo hidrocarbonado le confiere estas propie- dades, ya que es la única diferencia entre las tres ami- nas mencionadas.

En la Fig. 17 encontramos la gráfica del efecto de las monoaminas, con fórmula general $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH}_3$ -- donde $n= 5$ y 11 átomos de carbono, hexametilenami na y do decametilenamina, que al igual que las diaminas, presenta un mayor efecto desacoplante la amina de doce átomos de carbono, que la de seis(hexametilenamina).

De acuerdo a los resultados obtenidos, no se puede dilucidar aún, cual sería el mecanismo de acción de las aminas, ya que se encuentran moviéndose libremente a través de la membrana, por lo que es necesario inmovilizarlas. En este caso se empleó sefarosa 4B, que es un polímero de gran tamaño, impidiendo de esta manera -- que la amina atravesase la membrana.

En la Fig. 18 se observa el efecto de la sefarosa-alquilaminas de 6, 10 y 12 átomos de carbono, que son sefarosa-hexametilenamina, sefarosa-decametilenamina y sefarosa-dodecametilenamina respectivamente, en concentraciones crecientes sobre la velocidad del transporte de electrones en PS I. Se debe tomar en cuenta que las concentraciones empleadas llegan hasta 0.1 M, que en comparación con otras sustancias desacoplantes como el NH_4Cl y etilenamina que necesitan una concentración hasta de 10 y 5 mM, son mucho menores, lo que indica que tiene una mayor eficiencia desacoplante. Los datos encontrados nos muestran la activación del transporte de electrones en PS I, que es casi la misma para las diferentes sefarosa-alquilaminas de 6, 10 y 12 átomos de carbono; a diferencia de las monoaminas y diaminas, que conforme aumenta la longitud del brazo hidrocarbonado, aumenta la activación del transporte de electrones. Esto nos sugiere -- que existe una zona general de desacoplamiento en la membrana del tilacoide a través de la cadena transportadora de electrones, debido a que todas las sefarosas-alquilaminas producen desacoplamiento, descartando la posibili-

dad de que sea un sitio de desacoplamiento a una distancia de 21 Å como se postuló con anterioridad.

II Efecto de las aminas alquílicas sobre el transporte de electrones en PS II ($H_2O \rightarrow DMQ$), en condiciones fosforilantes (ADP + Pi).

Los resultados se muestran en la Fig. 19, el efecto de las aminas alquílicas en concentraciones crecientes en relación al por ciento de activación o inhibición en la velocidad del transporte de electrones en PS II en condiciones fosforilantes, observamos que la dodecametilendiamina, decametilendiamina y hexametilendiamina inhiben la velocidad del transporte de electrones, a excepción de la concentración 1 mM de la dodecametilendiamina en la que se observa una ligera activación con respecto al control.

En la Fig. 19 se encuentran los resultados de la adición de hexametilamina y dodecametilamina sobre la velocidad del transporte de electrones en PS II, en los que observamos una marcada inhibición, conforme aumenta la concentración hasta 1 mM, datos que coinciden con los encontrados con monoaminas alquílicas de cadena corta (39).

En la Fig. 21 muestra los resultados del efecto de las sefaroalquilaminas sobre la velocidad del transporte de electrones en PS II, observamos también una marcada inhibición con la sefaroal-dodecametilamina, sefaroal-decametilamina y sefaroal-hexametilamina.

na, a excepción de la concentración 1 mM de la sefarosa-dodecametilenamina en la que hay activación.

Los resultados coinciden con los reportados anteriormente, con aminas alquílicas de cadena corta, que al penetrar la membrana, las aminas varían el pH interno provocando una inhibición del rompimiento de la molécula de agua, y por lo tanto inhibiendo el transporte de electrones hasta DMQ, que se efectúa en PS II, entonces este postulado se puede aplicar en este caso, asumiendo que la inhibición observada se debe a que la sefarosa-alquilamina, al interaccionar con la membrana varía su pH interno interfiriendo el rompimiento de la molécula de agua. Si fuera posible neutralizar la interferencia esperaríamos encontrar, al igual que en PS I una activación en la velocidad del transporte de electrones.

III Efecto de la amida $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_{11}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$ y el ácido aminado $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_{11}-\overset{\text{H}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$, sobre la velocidad del transporte de electrones de $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{MV}$ en condiciones fosforilantes (ADP + Pi).

En la Fig. 22 se observa una activación del transporte de más de un 150%, al adicionar concentraciones crecientes de amida, hasta 1 mM. En cambio el ácido aminado activa la velocidad del transporte de electrones cerca de un 95%. Estos efectos observados son característicos de sustancias desacoplantes, comparativamente con la dodecametilendiamina y dodecametilenamina que tienen

la misma longitud de brazo hidrocarbonado, para comprobar si la distancia de $21 \overset{\circ}{\text{Å}}$ es donde probablemente se encuentra el sitio, de desacoplamiento, y si al variar las características del grupo amino, por los diferentes grupos funcionales integrados a la cadena del brazo hidrocarbonado, se favorece o no, la protonación del grupo amino.

IV Efecto de las aminas alquílicas sobre la -- Bomba de protones.

La principal característica de las sustancias desacoplante es que activan la velocidad del transporte de electrones e inhiben la síntesis de ATP, debido a --ésto se midió el gradiente de pH, como una medida indirecta de la síntesis de ATP.

Se empleó la mitad de la concentración desacoplante máxima, utilizada en la medición del transporte de electrones, ya que se ha postulado que la energía liberada del pH, durante el transporte de electrones, es empleada para sintetizar ATP.

Se encontró una marcada inhibición de la captación de protones, aproximadamente un 50% con respecto al control con las diaminas de 6, 10 y 12 átomos de carbono. Los experimentos se realizaron iluminando con luz a saturación, prendiendo y apagando tres veces, para observar el efecto de abatimiento de la actividad de los cloroplastos, conforme al tiempo de exposición de la luz y su capacidad quimiosmótica o electroquímica. (Ver Fig. 23)

Como podemos observar, el trazo control, en la primera iluminación (on), la amplitud de la curva indica que se capta la máxima cantidad de protones, alcalinizándose el medio hasta un máximo, cuando apagamos (off) se observa una salida lenta de protones, entonces se vuelve a encender (on) se observa nuevamente el efecto de la -- captación de protones, solamente que la amplitud de la -- curva es ligeramente menor, en la última curva se observa otra ligera disminución de la captación de protones, -- esto se debe a un efecto de desgaste, por varios períodos de exposición a la luz actínica.

Al hacer un experimento similar al anterior, -- pero en presencia de un desacoplante, dodecametilendiamina, inhibe en un 40% aproximadamente, los trazos obtenidos son semejantes al control, con la diferencia de la -- amplitud en las curvas, que en este caso son menores debido al efecto desacoplante de la diamina. En esta misma figura observamos el efecto de la decametildiamina, que inhibe en una proporción aproximada del 30%, inicialmente, porque en las siguientes iluminaciones el efecto inhibitorio es menor. De igual manera la hexametildiamina inhibe en un 25% aproximadamente.

En la Fig. 24 observamos el efecto de la sefarosa-dodecametilendiamina y la sefarosa-decametilendiamina, con respecto al control, en las que se encuentra una -- inhibición del 40 y 30% respectivamente.

Es importante notar que cuando se ha adicionado desacoplante e iluminamos, la inhibición inicial observa

da es mas acentuada que la de las sucesivas iluminaciones, con respecto al control.

La inhibición del gradiente de protones por las diferentes aminas, no tiene una marcada relación con la longitud de su brazo hidrocarbonado, por lo que no se puede concluir que las aminas de 12 átomos de carbono sean las mas eficientes.

V Efecto de la sefarosa-dodecametilenamina sobre la bomba de protones, en cloroplastos depletados de CF_1 .

Se observa en la Fig. 25, los cloroplastos sin CF_1 que presentan pequeños cambios de pH, comparado con el control, debido a que hasta ahora con las técnicas aplicadas, se obtiene una actividad residual que indica que no fué eliminado todo el CF_1 . Como se ha postulado en el "Modelo del mosaico fluido" (3) el factor de acoplamiento CF_1 (que es una proteína compuesta por 5 subunidades polipeptídicas), que está unida electrostáticamente a la membrana, como una proteína periférica, puede ser extraída de ella resultando en un hueco en la membrana que provoca que se disipe el gradiente de protones. Además Mitchell (13) ha postulado que el CF_1 está conectado con el canal de protones que atraviesa la membrana.

En el presente trabajo se inmovilizó dodecametilenamina a sefarosa, asumiendo que el grupo amino de la sefarosa-dodecametilenamina reconozca y forme algún -

tipo de interacción con el canal de protones, tapando el hueco dejado por el CF_1 .

Los resultados obtenidos nos indican que, los cloroplastos sin CF_1 adicionados de sefarosa dodecametilnamina, disminuyen la amplitud y extensión del cambio de pH, comportandose como un desacoplante clásico, lo -- que no coincide con los resultados esperados.

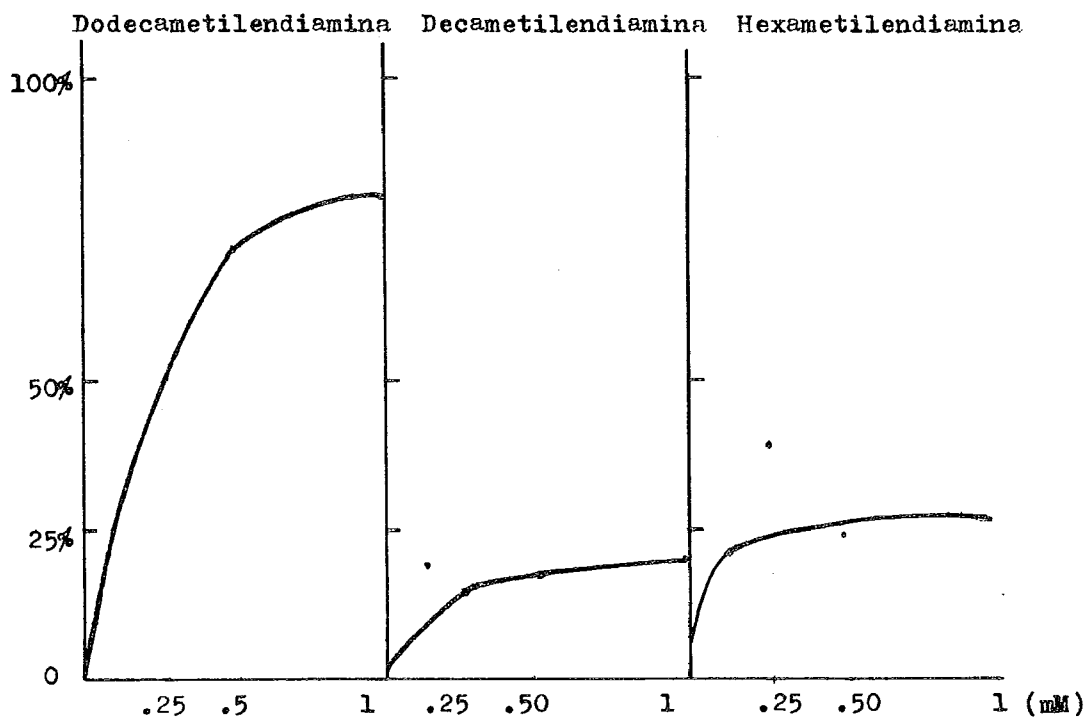


Fig. 16 Efecto de las DIAMINAS sobre el Transporte de electrones en PS I, empleando concentraciones crecientes de diamina. La velocidad en el transporte de electrones se expresa en microequivalentes de electrones por hora por miligramo de clorofila, pero en éste caso esta referida al control que se considera cero y se grafica el por ciento de activación, en cada caso.

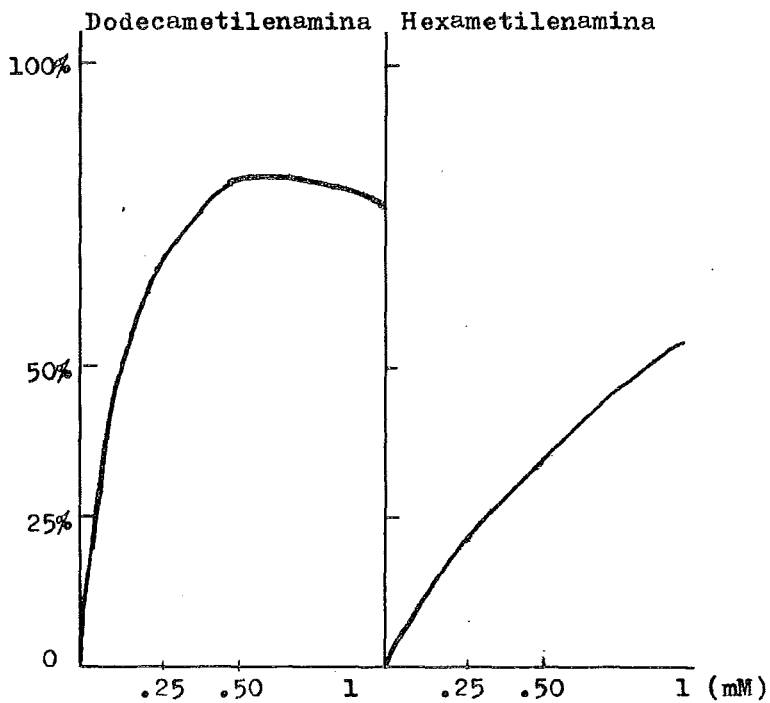


Fig. 17 Efecto de las monoaminas libres sobre la velocidad del transporte de electrones en PS I, en condiciones fosforilantes. Se grafica el porcentaje de activación con respecto al control.

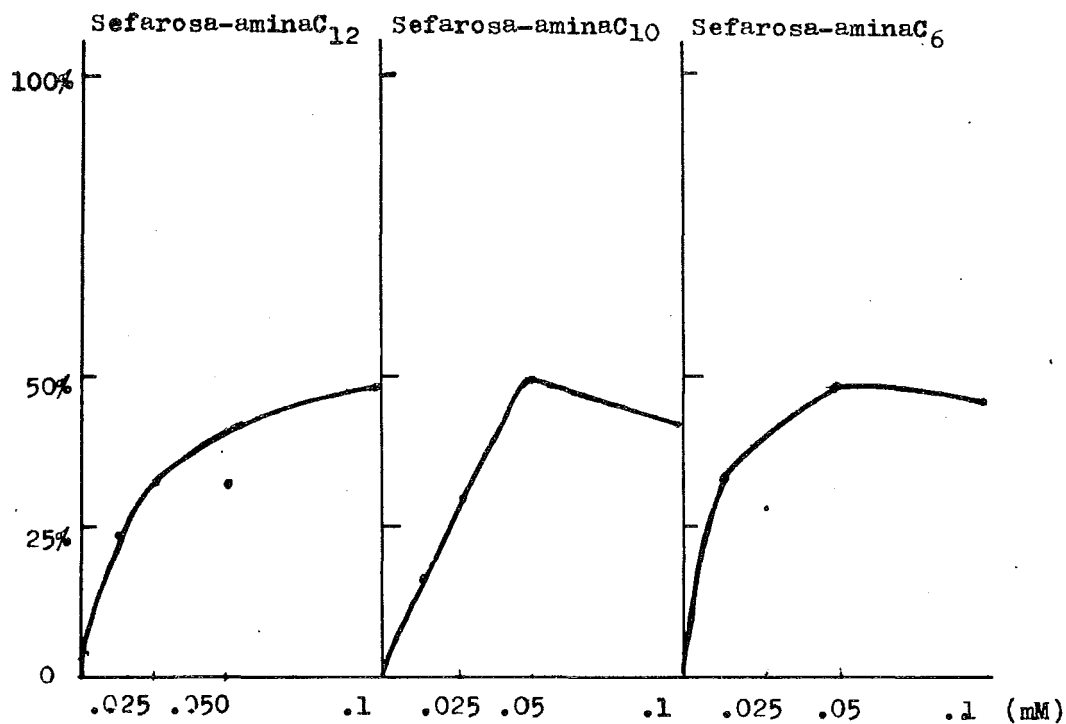


Fig. 18 Efecto de las sefaroasa-aminas sobre el transporte de electrones en PS I, en condiciones fosforilantes. Graficando el por ciento de activación con respecto al control.

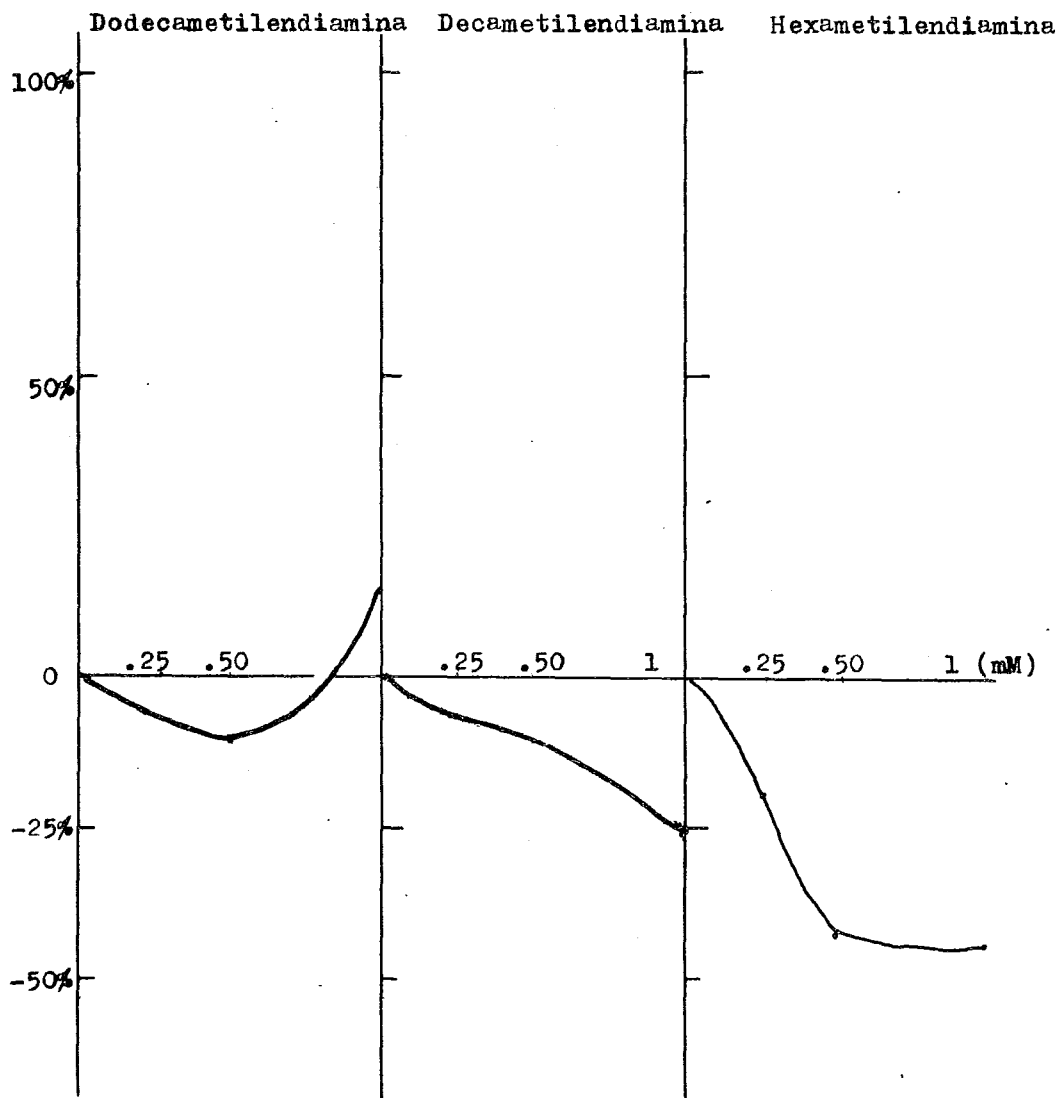


Fig. 19 Efecto de las diaminas sobre el transporte de electrones en PS-II, en condiciones fosforilantes. Graficando el por ciento de inhibición o activación encontrados.

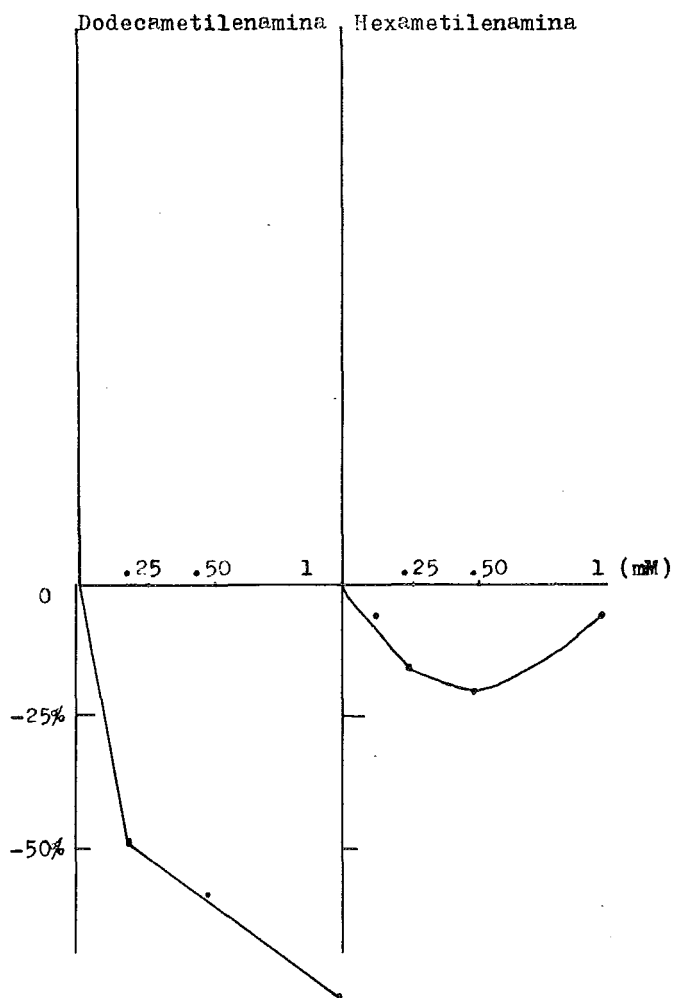


Fig. 20 Efecto de las monoaminas sobre el transporte de electrones en condiciones fosforilantes en PS II. Graficando el por ciento de inhibición o activación con respecto a concentraciones crecientes de amina.

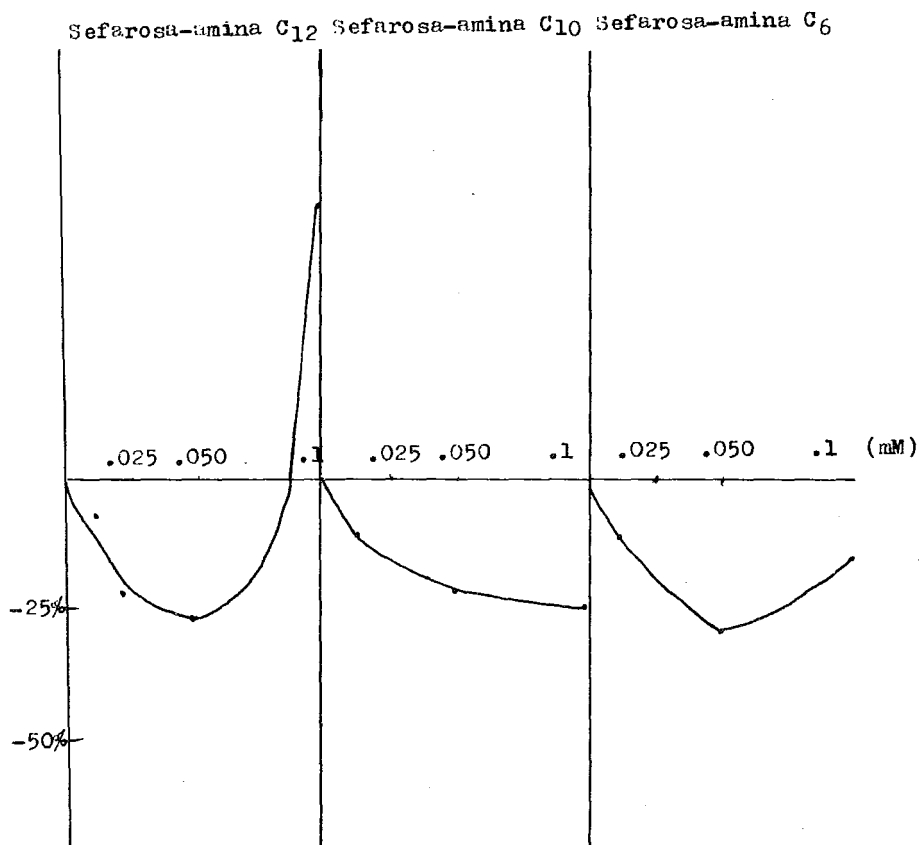


Fig. 21 Efecto de las sefarosa-aminas sobre el transporte de electrones fosforilante en PS II. Graficando el porcentaje de activación o inhibición con respecto al control, empleando concentraciones crecientes de aminas.

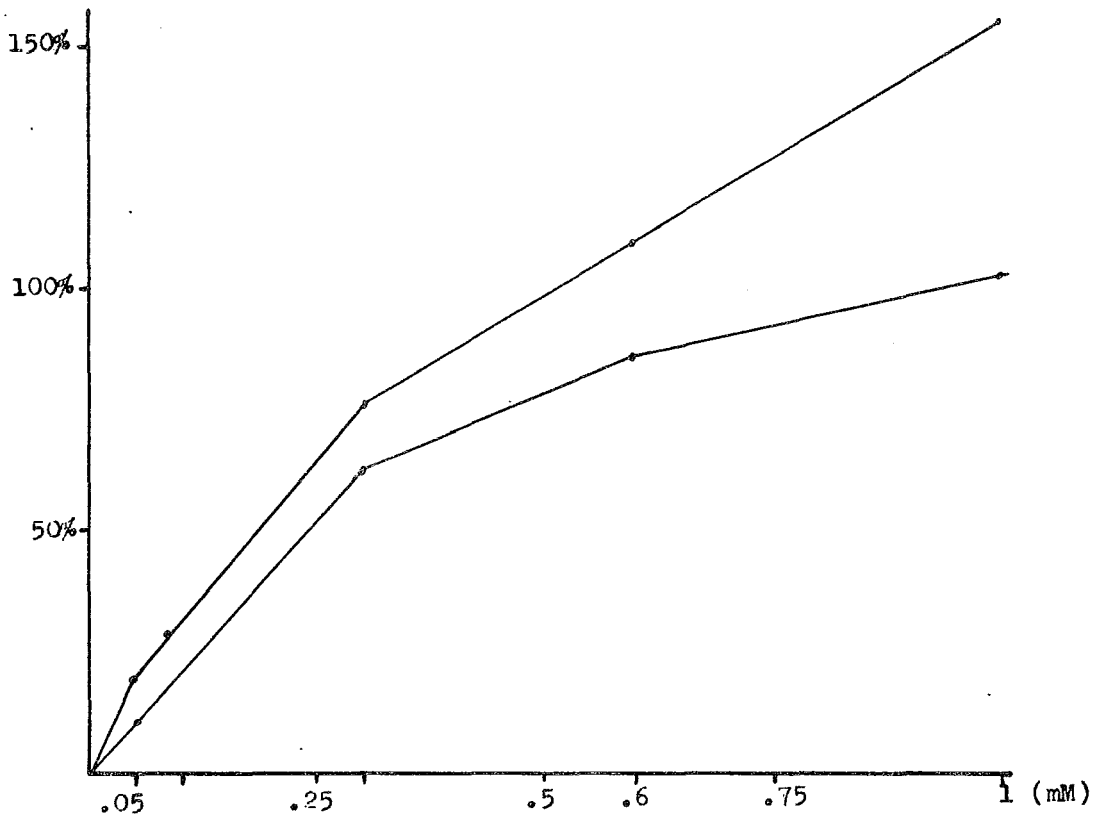


Fig. 22 Efecto de la amida y el ácido aminado sobre la velocidad del transporte de electrones de H_2O — MV Es decir, a través de toda la cadena transportadora.

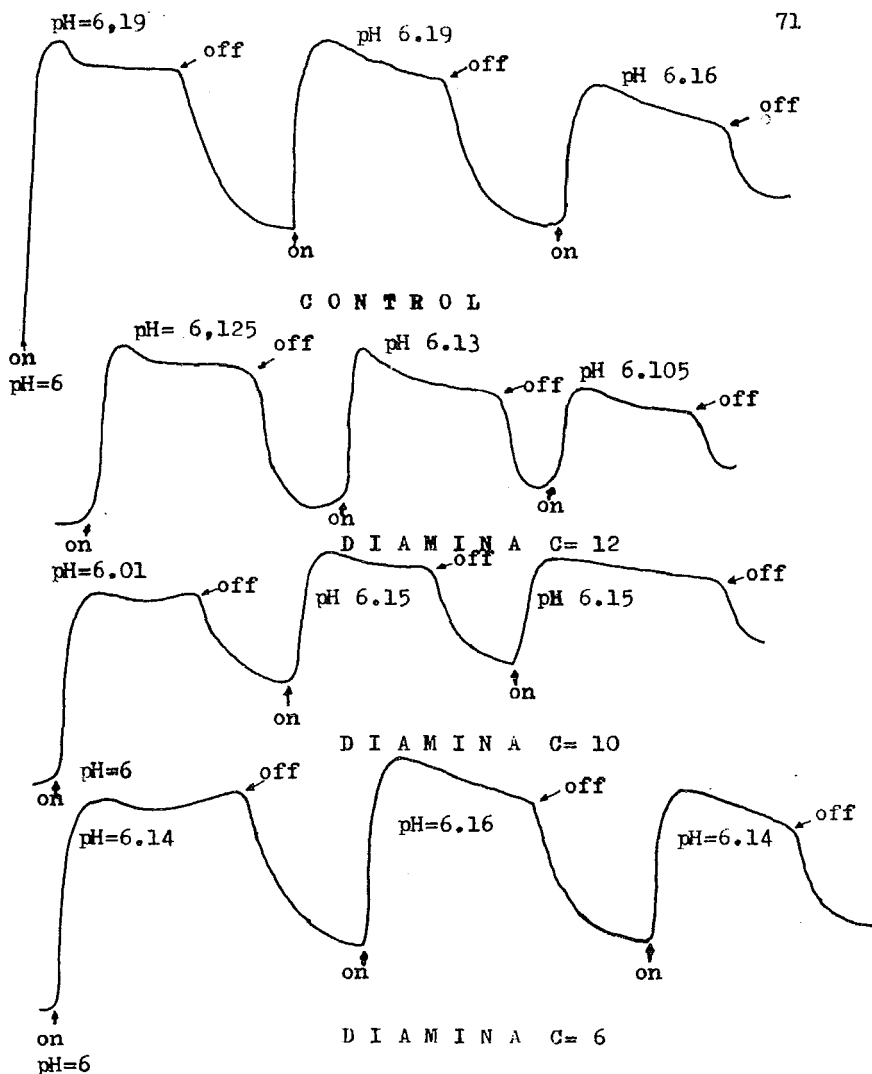


Fig. 23 Medición de la Bomba de protones, por medio de cambios de pH, contra el tiempo, prendiendo y apagando tres veces (on)(off), la misma mezcla de reacción por cada trazo. El pH inicial es de 6.

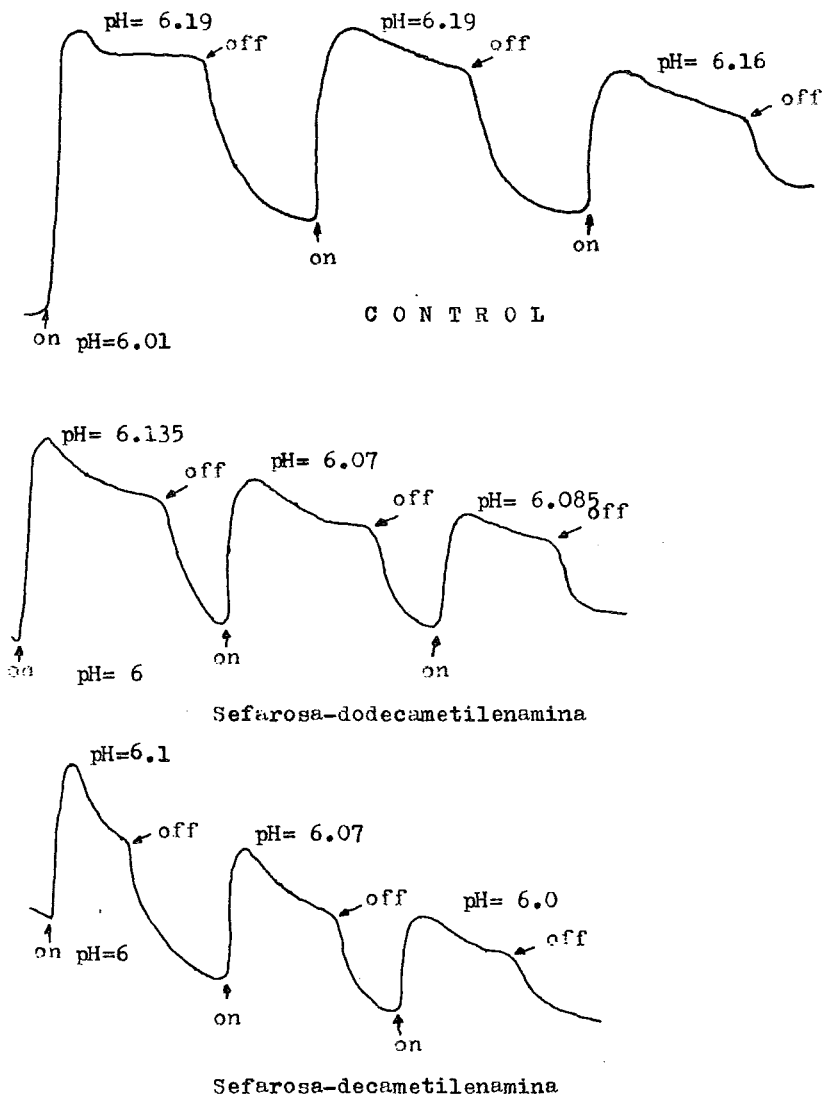
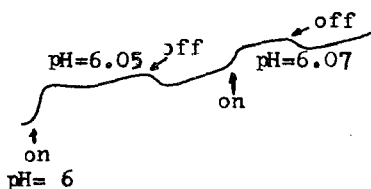
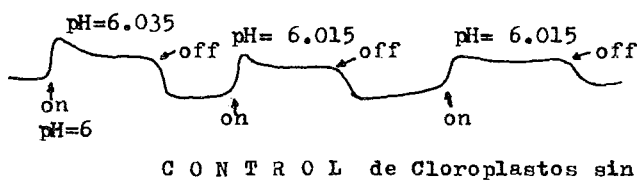
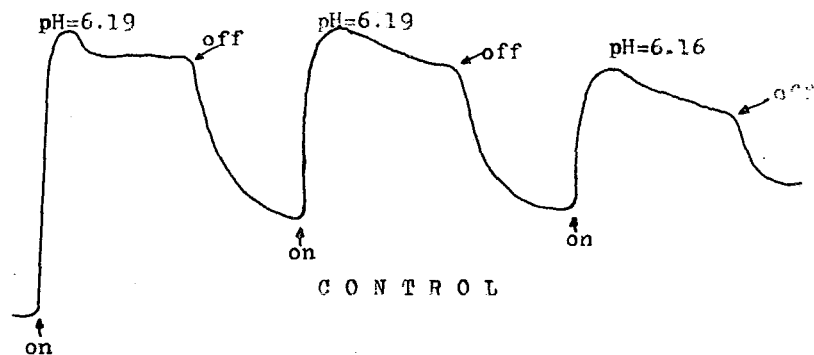


Fig. 24 Medición de la Bomba de protones, por medio de cambios de pH, contra el tiempo, en cloroplastos normales, adicionados de sefarosa-aminas, en concentraciones crecientes, comparado con el trazo control.



Cloroplastos sin CF₁ adicionados de Sefarosa-dodecarmetilenamina.

Fig. 25 Trazos obtenidos al efectuar la medición de la Bomba de protones en cloroplastos depletados en CF₁. - El experimento se realizo, con un pH inicial de 6, con tres períodos Luz-oscuridad. Se puede observar que al adicionar sefarosa-dodecametilenamina a cloroplastos sin CF₁, disminuye el gradiente de protones debido al efecto desacoplante de la sefarosa-amina.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos indican que existe una zona de desacoplamiento en PS I y probablemente otra en PS II. Que no hay una diferencia significativa en el grado de desacoplamiento por las alquil-aminas de diferente longitud de brazo hidrocarbonado, lo que descarta la posibilidad de encontrar el sitio de desacoplamiento a una distancia de $21 \overset{\circ}{\text{A}}$, como se propuso con anterioridad(38), y nos sugiere que, es una Zona de desacoplamiento.

El efecto del ácido aminado, que tiene un pK_b de 5 por el lado del ácido carboxílico y de 9.5 por el lado de la amina, parece no influir en la mayor protonación del grupo amino que cuando se encuentra en forma de grupo amino libre, por lo que se comporta como un desacoplante clásico sobre la velocidad del Transporte de electrones a través de toda la cadena transportadora ($H_2O \rightarrow MV$).

El efecto de la amida es el de activador de la velocidad del Transporte de electrones a través de toda la cadena ($H_2O \rightarrow MV$), que comparada con las aminas reportadas con anterioridad, tiene un efecto mayor, a pesar de la estructura de la molécula que por el lado de la amida tiene un pK_b de 2, lo que indica que prácticamente no se protona, por lo que su acción desacoplante puede ser atribuida a que se forme un complejo de transferencia de carga en algún sitio de la zona de desacoplamiento, o bien -

que interaccione con alguna sustancia específica encargada del acoplamiento entre el Transporte de electrones y la Síntesis de ATP, como se ha postulado en la Teoría del intermediario químico, sin descartar la posibilidad de - que el efecto mesomérico del grupo amida influirá positivamente en la protonación del grupo amino libre que está en el otro extremo de la cadena y que por tanto fuera similar al efecto de las aminas libres, de acuerdo a la teoría quimiosmótica.

La teoría quimiosmótica microscópica propuesta por el Dr. Mitchell, parece ser la más adecuada, para explicar el mecanismo de acción de las aminas alquílicas unidas a sefaroza. Esta teoría retoma proposiciones hechas por el Dr. Williams en su modelo del protón hidromotriz - (35), ambas teorías coinciden en el hecho de que los procesos: Transporte de electrones y síntesis de ATP se llevan a cabo en la membrana del tilacoide.

Los métodos empleados no nos permiten aún definir, si las aminas desacoplantes, al protonarse actúan sobre un protón hidromotriz, pero si sabemos que ésta reacción debe tener una estequiometría definida y una especificidad traslocacional, que contribuyen a la reversibilidad del proceso, cuestiones que explica el Dr. Mitchell en su modelo quimiosmótico microscópico.

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

- 1.- Stryer, L., Bioquímica, Edit. Reverté (1976) cap.19
- 2.- Lehninger, A., Bioquímica, Edit. Omega (1972) cap.21
- 3.- Singer, S.J.y Nicholson, L.G., Paabs Rev. Vol.2, No.3 y 4 (1973) 519
- 4.- Danielli, J.F.y Davson, A.J. Cell comp.Physiol., 5 - (1935) 495.
- 5.- Giese, Arthur, Fisiología Celular, Edit. Interamericana (1975) cap. 19.
- 6.- Lehninger, A., Bioenergética, Edit.F.E.I.S.A.(1975) - cap. 6
- 7.- Ville, Claude, Biología, Edit. Interamericana (1979) cap. 7
- 8.- Nason, Alvin. Biología, Edit. Limusa (1976) cap. 17.
- 9.- Hill y Bendall F., Nature, London, 186 (1960) 136.
- 10.- Witt, H.T., Quant.Rev. Biophys., 4 (1971) 365.
- 11.- Arnon, D., Whatley, F.R. y Allen, M.B., J.Am. Chem. Soc.
- 12.- Avron, M., Biochemistry of photophosphorylation, in: Structure and function of chloroplast, Govindjee., Acad. Press Inc. New York:149 (1967).
- 13.- Gromet-Chanan, Z. y Avron, M. Plant Physiol., 40, - 1053 (1965).
- 14.- Böme, H.y Cramer, W.A., FEBS LETT., 15, 349 (1964).
- 15.- Sadewasser, D.A. y Dilley, R.A., sin publicar 20p.
- 16.- Dilley, R.A. Prog. Photosynthesis Res., 3 (1968) - 1354.
- 17.- Böme H.y Cramer, W.A., Biochem. Acta 283 (1972) 302.
- 18.- Böme H y Cramer, W.A. Biochem., 11:1155 (1972).

- 19.- Gould, M. e Izawa, S., Currente topics Bioenergetics. Sanadi., Acad. Press Inc., New York: 1, 75 (1966).
- 20.- Forth, G. Methods in Enzimology, 23 (1971), 447.
- 21.- Saverk, K. Bioenergetics of Photosynthesis, edit. by Govindjee Academic Press.
- 22.- Trebst, A. Proc. I-t Congr. Photosynthesis, 2nd (G.- Forti et al), Junk, The Hauge (1972) 399.
- 23.- Buchanan, B.B. y Arnon, D.J., Methods in Enzimology (1971) 23, 413.
- 24.- Davenport, H.E., Nature, London, 199 (1963) 151.
- 25.- Avron M. y Chance B., Brookhaven Symp. Biol., 19 (1966), 149.
- 26.- Forth, G. Methods in Enzimology 23 (1971) 447.
- 27.- Avron, M., Bioenergetics of Photosynthesis ed. by Govindjee, Academic Press, New York (1975) cap. 7.
- 28.- Dilley, R.A., Peters, A. y Shaw, E. R., J. Membrane -- Biol., 8: 163 (1972).
- 29.- McCarty Richard, Chloroplast deficient in coupling Factor 1, 251 (196) Methods Biochem.
- 30.- Gould, Mitchell, Eur. J. Biochem., 62, 567-575 (1976).
- 31.- Mitchell, P. Nature, 191:144 (1961)
- 32.- Guggenheim E.A. (1933) Modern Thermodynamics by the Methods of Willard Gibbs.
- 33.- Gómez Lojero C., I Reunión de la Rama Bioenergética, 21 (1979).
- 34.- Lotina Hennsen B., I Reunión de la Rama Bioenergética 57 (1979).
- 35.- Mitchell, P. FEBS LETTERS, Vol. 78 No.1 (1977).
- 36.- Izawa, S. y Good N.E., Methods in Enzimology, Acad. Press, New York, 24:355 (1972).
- 37.- González I. M., Tesis profesional, Fac. de Ciencias UNAM, México: 65 p. (1979).

- 38.- Arias, C. Tesis profesional, Fac. de Química, - UNAM, México: 116 p. (1977).
- 39.- García G.S., Tesis profesional, Fac de Ciencias-Biológicas, UAG, Gro. México, 64 p. - (1979).
- 40.- Takakoi, T, Torres Pereira y Packer L. Biochem.- Biophys. Acta, 352: 160 (1974).
- 41.- Strain, H. y Svec, W.A., Methods in Enzimology, - Acad. Press, New York, (1965)
- 42.- Gottschalk, W., Müller, F. Plant, 61: 259 (1964).
- 43.- Mackinnov, G. J. Biol. Chem., 140: 315 (1940).
- 44.- Mc Carty R.E. y Racker E. Brookhaven Symp. Biol. 19 (1966) 202.
- 45.- Hartman, W.W., Dreger, E. Adams R. y Ozanne, I.L. Org. Synthesis, 2, 150 (1943).
- 46.- Cuatrecasas, P. Biol. Chem., 245: 3059 (1970).
- 47.- March, S.C. Parikh I. y Cuatrecasas, P., Anal. Biochem. 60: 149 (1974).
- 48.- Okuyama, T., Satake K.J., Biochem., 47: 654 (1960)
- 49.- Clark, L. C. Wolf, R. Granger, D. y Taylor, Z.J. Appl. Physiol., 6: 189 (1953).