



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

FOSFORILACION Y MALEIMIDAS UN ESTUDIO
EN CF_1 PARA TRATAR DE CONOCER LAS
CLAVES DE LA FOTOSINTESIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A
JORGE EDUARDO MORALES TORRES

MEXICO, D.F.

1982



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Prof	GUADALUPE VELEZ PRATT
VOCAL	Dr	ELAS LOTINA HENRISEN
SECRETARIO	Prof	ALFREDO ECHEGAY ALEMAN
1er SUPLENTE	M en C	MA TERESA REGUERO DEZA
2do SUPLENTE	Dr	VICTOR MANUEL LOYCLA VARGAS

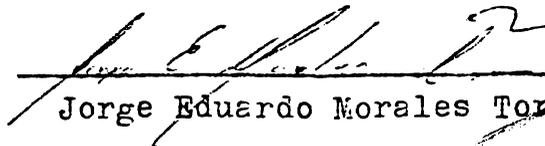
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Departamento De Fioquímica Vegetal
División De Estudios De Posgrado
Facultad De Química. U.N.A.M



EXAMENES DE
FAC. DE QUÍMICA

SUSTENTANTE


Jorge Eduardo Morales Torres

ASESOR DEL TEMA



Dr Blas Lotina Henriksen

A mi madre porque gracias
a ella soy todo lo que soy
y por su eterno apoyo com-
prension y cariño.

A mi hermana por su com-
prension y paciencia du-
rante el desarrollo de -
esta tesis

A la memoria de mi padre

EDUARDO MORALES

e

A la memoria de un gran amigo

RAMON PICAZO

Con agradecimiento para
el Dr Blas Lotina por -
todo el apoyo que me --
brindó.

A Eduardo Marambio así
Como a la Dra Martha -
Albores por su valiosa
colaboración.

A todos mis amigos
por toda la amis-
tad que me legaron.

C O N T E N I D O

<u>RESUMEN</u> - - - - -	I
<u>ABREVIATURAS</u> - - - - -	1
<u>INTRODUCCION</u> - - - - -	3
<u>FOTOSINTESIS</u> - - - - -	9
Morfología del cloroplasto - - - - -	10
Asimetría de membrana - - - - -	20
Fotosistemas I y II - - - - -	27
Bomba de Protones - - - - -	34
Hipótesis de Mitchell - - - - -	43
Fotofosforilación - - - - -	55
<u>MALEIMIDAS</u> - - - - -	71
Síntesis de maleimidas - - - - -	80
Comprobación de la estructura - - - - -	86
<u>MATERIALES Y METODOS</u> - - - - -	99
Determinación de clorofila - - - - -	100
Marcaje de cloroplastos de clase II con maleimidas bifuncionales - - - - -	101
Marcaje de cloroplastos de clase II con maleimidas bifuncionales previo marcaje con NEM en la oscuridad - - - - -	104
Medición del transporte de electrones - -	106
Medición de la bomba de protones - - - -	112
Medición de la fotofosforilación - - - -	114
<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u> - - - - -	116
<u>AGRADECIMIENTOS</u> - - - - -	158
<u>BIBLIOGRAFIA</u> - - - - -	159

R E S U M E N

En los últimos años, el interés por conocer el mecanismo de la síntesis de ATP ya sea en cloroplastos como en mitocondrias, ha sido el centro de atención de las personas que se dedican a la bioenergética o a la biofísica y aun no ha sido posible dilucidar cual es este, muchos son los métodos que han sido empleados en esta apasionante tarea, pero uno de los más interesantes es el entrecruzamiento de proteínas de membrana así como de las subunidades de las ATPasas, este método se basa en poner a funcionar a la ATPasa en presencia de dichos reactivos y se obtiene como consecuencia un bloqueo parcial o total de la actividad de las proteínas involucradas en este proceso, entonces se estudia cual o cuales son los procesos afectados como consecuencia del entrecruzamiento que se originó y entonces es posible dilucidar la función de las proteínas de membrana así como poder decir cual o cuales subunidades de la ATPasa están involucradas y entonces poder tener un panorama de los acontecimientos moleculares de la síntesis de ATP, en el presente trabajo, se emplearon N-derivados bifuncionales de maleimida como reactivos de entrecruzamiento entre grupos -SH de las diferentes proteínas, y en base a su capacidad de inhibición de las diferentes funciones estu-

II

diadas, se puede saber que moléculas son las que participan en este por demás interesante proceso y al mismo tiempo se puede saber si actúan o no otras proteínas de membrana en la síntesis de -- ATP, así como saber que distancia existe entre -- los grupos -SH de las proteínas involucradas en estos procesos, ya que estos N-derivados de maleimida que se emplearon tienen la característica de tener diferentes distancias entre sus dos -- centros reactivos.

ABREVIATURAS USADAS EN ESTE TRABAJO

ADP - - - - -	Adenosin difosfato
ATP - - - - -	Adenosin Trifosfato
BSA - - - - -	Albúmina de suero bovino
EM--- - - - -	Bis maleimida
BEM - - - - -	Bis etilenmaleimida
CF _I - - - - -	Factor de acoplamiento I para la fotofosforilación en cloroplastos
DTNEM-- - - -	Ditiobis-N-etilmaleimida
1,4-DMB - - - - -	1,4-Dimaleimidobutano
1,6-DMH - - - - -	1,6-Dimaleimidohexano
EDTA-- - - - -	Acido etilendiaminotetraacé- tico
E _{Fs y u} -- - - -	Fases exoplasmicas (s y u) que se observan al microscopio electrónico por la técnica de criofractura.
Fd - - - - -	Ferredoxina
MM - - - - -	Maleimida metilol
MV -- - - -	Metil viologeno
NADP ⁺ (NADPH) - - - - -	Nicotín adenín dinucleótido oxidado (reducido).
NEM - - - - -	N-etilmaleimida
PS I (II) - - - - -	Fotosistema I (II)
P ₆₈₀ - - - - -	Pigmento clorofiliano que - absorbe a 680 nm
P ₇₀₀ - - - - -	Pigmento clorofiliano que absorbe a 700 nm
PC- - - - -	Plastocianina
P _{F s y u} -- - - -	Fases inmersas en la mitad interior de la membrana del tilacoide observadas por la técnica de criofractura

Pi - - - - - Fosfato inorgánico 2
PQ - - - - - Plastoquinona
TPP - - - - - Glicoltiamina pirofosfato

1

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

Fotosíntesis; enlace entre dos mundos. Quizá sea esta la única manera de describir a este maravilloso proceso por medio del cual el mundo de lo inanimado cobra vida. Privilegio de las plantas verdes que solo es compartido por algunas bacterias y algas, la fotosíntesis hace acto de presencia cada día en el momento en que los rayos del sol iluminan el gran e infinitamente variado mundo verde que sostiene la vida del planeta Tierra.

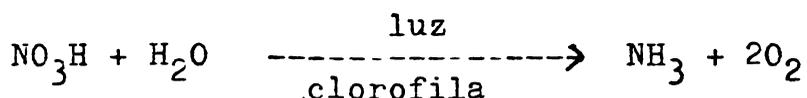
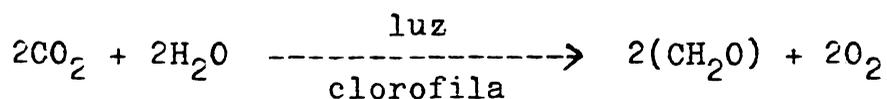
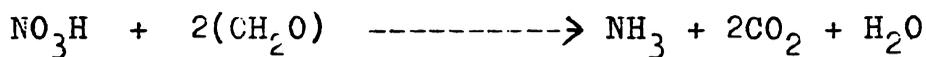
Pero a pesar de que el fenómeno de fotosíntesis ha mantenido con vida a la Tierra desde sus más remotos orígenes, fue hasta que J B Van Helmont -- (1577 - 1644) con su experimento con el sauce, -- llegara a su celebre conclusión, de la cual deseo -- hacer memoria "Y así 75 Kg de madera, corteza y -- raíces fueron formadas exclusivamente por agua".

Si bien es cierto que su conclusión fue equivocada, también es cierto que fue el primero en probar la idea de que las plantas se alimentan de suelo y agua, y por lo tanto merece llevar el crédito de ser el fundador del estudio de la fotosíntesis (1). - Años más tarde, Joseph Priestley aparte de descubrir el oxígeno, prueba que un volumen cerrado de aire, agotado por una bujía en combustión, podía restaurarse mediante una ramita de menta en el período de una semana, de modo que podía soportar nuevamente la combustión de la bujía, y llegó a la conclusión de que las plantas desprendían oxígeno, por un proceso que parecía ser inverso al de la respiración de los animales, pero él nunca asoció este hecho a la presencia de la luz. proceso que pocos años después descubrió Jan Ingenhousz, quien además asoció por primera vez este fenómeno únicamente a las plantas verdes de las plantas. Estos estudios se vieron reforzados con el descubrimiento de Jean Senebier (1742 - 1809) quien en 1782 encontró que las plantas absorben CO_2 de la atmósfera, y con los experimentos de Nicholas Saussure, quien en 1804 demostró experimentalmente que el agua también estaba involucrada químicamente en la nutrición vegetal (2). En 1845 - Rober Mayer, 3 años después de enunciar el principio de la conservación de la energía, formuló la esencia del proceso fotosintético en los siguientes

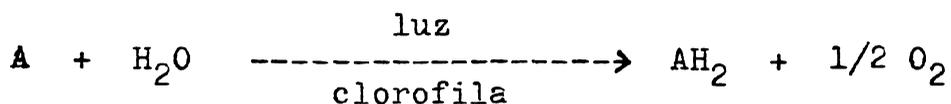
términos, " las plantas son capaces de absorber energía pero no de crearla" .

Años después en 1880, Engelmann descubre que los responsables del desprendimiento de O_2 son unos corpusculos que ahora llamamos cloroplastos.

De aquí en adelante el estudio de la fotosíntesis se estancó. En este periodo privó la idea de que el oxígeno producido en la fotosíntesis es debido a la fotólisis del CO_2 , siendo su último defensor el genial bioquímico alemán Otto Warburg, quien por otro lado en 1920 realizó el descubrimiento fundamental de que el alga Clorella pyrenoidiosa era capaz de desprender O_2 con la reducción concomitante de NO_3^- a NH_4^+ cuando no se añadía CO_2 . Sin embargo como el era un defensor acerrimo de la fotólisis del CO_2 , interpretó la reducción fotosintética del nitrato como el resultado neto de su reducción en la oscuridad por carbohidratos celulares, seguida de la escisión en la luz del CO_2 resultante de acuerdo con las siguientes ecuaciones:



Un avance vertiginoso en el esclarecimiento de la fotosíntesis ocurrió en 1931, cuando Van Niel demostró que la reacción básica de la fotosíntesis no era la fotólisis del CO_2 , sino la fotólisis del agua que en las plantas superiores resultaba en la formación de poder reductor y por consiguiente en la reducción fotosintética del CO_2 y la del N_2 , las cuales debían tener lugar más tarde en otras reacciones que no dependían de la luz, esto es, en reacciones oscuras. Las ideas expuestas en la hipótesis de Van Niel recibieron más tarde un fuerte apoyo experimental cuando Hill en 1938 obtuvo preparaciones de cloroplastos que catalizaban en la luz la reducción de sales férricas y otros aceptores de H_2 , de acuerdo con la siguiente ecuación, (hoy universalmente conocida como reacción de Hill).



Pocos años más tarde Rúben y Kamen demostraron mediante el uso de isótopos que el oxígeno producido en la fotosíntesis provenía del agua. Así, el agua que a partir de los experimentos de Van Helmont comenzó teniendo un papel preponderante en la nutrición vegetal y que durante siglos quedó reducida a un papel secundario en la hidratación del CO_2 , finalmente ha vuelto a ser de gran importancia en todo el proceso fotosintético (22).

En la fotosíntesis, tal y como sucede en las plantas superiores, el CO_2 es el aceptor final de los electrones generados por la luz absorbida, pero en la reacción de Hill, estos eran interceptados por un aceptor artificial de electrones y, por consiguiente, no llegaban al CO_2 . Es en 1951 -- cuando tres grupos de investigadores descubren -- que el NADP^+ (constituyente normal de los cloroplastos) podía substituir a los reactivos artificiales de Hill como aceptor electrónico. Más -- tarde, en 1954, D.I Arnon, M.B. Allen y F.R. Whately, descubrieron que cloroplastos aislados en presencia de ADP y Pi eran capaces de sintetizar ATP, llegando a la conclusión de que la síntesis de ATP era el mecanismo principal por medio del cual se conserva la energía luminosa absorbida - (2), pero aun faltaba poder explicar el mecanismo por el que el ADP se fosforilaba a expensas de la luz y de Pi (fotofosforilación).

Para explicar este mecanismo, existían dos -- hipótesis: La primera sugería un acoplamiento químico entre la cadena transportadora de electrones y la síntesis de ATP y la segunda, sugería un -- acoplamiento conformacional.

En base a esto, todos los investigadores se dieron a la tarea de identificar al compuesto responsable del acoplamiento de la fotosíntesis, --

hasta que alguien puso un alto en el camino, siendo el Dr Peter Mitchell quien en 1961 postuló la hipótesis de acoplamiento quimiosmótico. En esta hipótesis no se postula la existencia de ninguna maquinaria molecular en la que el flujo de energía -- procedente de la luz o de alguna oxidación se accple a la síntesis de ATP, en su lugar el papel crucial lo desempeña una membrana que separa las dos regiones del cloroplasto (18).

De acuerdo con la hipótesis de Mitchell se deduce que la generación de una diferencia en el potencial electroquímico dentro del cloroplasto por algún medio distinto de la iluminación resultaría en el establecimiento de un potencial capaz de generar ATP, lo que demostraron Hind y Jagendorf en el año de 1965. Años más tarde, en 1969, Williams postula que los protones generados en la cadena redox se depositan en la fase lipoproteica generándose protones anhidros gracias a la oxidación de los substratos y que dichos protones anhidros removeran agua del ADP y Pi en la región lipoproteica con la consiguiente formación de ATP.

Cualquiera que sea el mecanismo de la fosforilación del ADP, constituye uno de los problemas más interesantes y difíciles de resolver en nuestros tiempos y en este trabajo se intentó contribuir un poco a su solución.



F O T O S I N T E S I S

Consideremos lo que es la fotosíntesis, (en proceso de energía nada puede compararsele), tan importante es, que hace crecer a las plantas verdes. Este hecho que fue descrito por Ingenhousz, bien pudo haber sido la fuente de inspiración para buscar -- las claves de la fotosíntesis en las partes verdes de las plantas, las cuales al ser observadas más detenidamente, mostraron que su pigmentación verde (clorofila) no se hallaba uniformemente distribuida como podría pensarse a simple vista, aun más interesante fue el descubrimiento, al observar la célula de la planta de que la clorofila se hallaba confinada a -- unos organelos llamados cloroplastos (10).

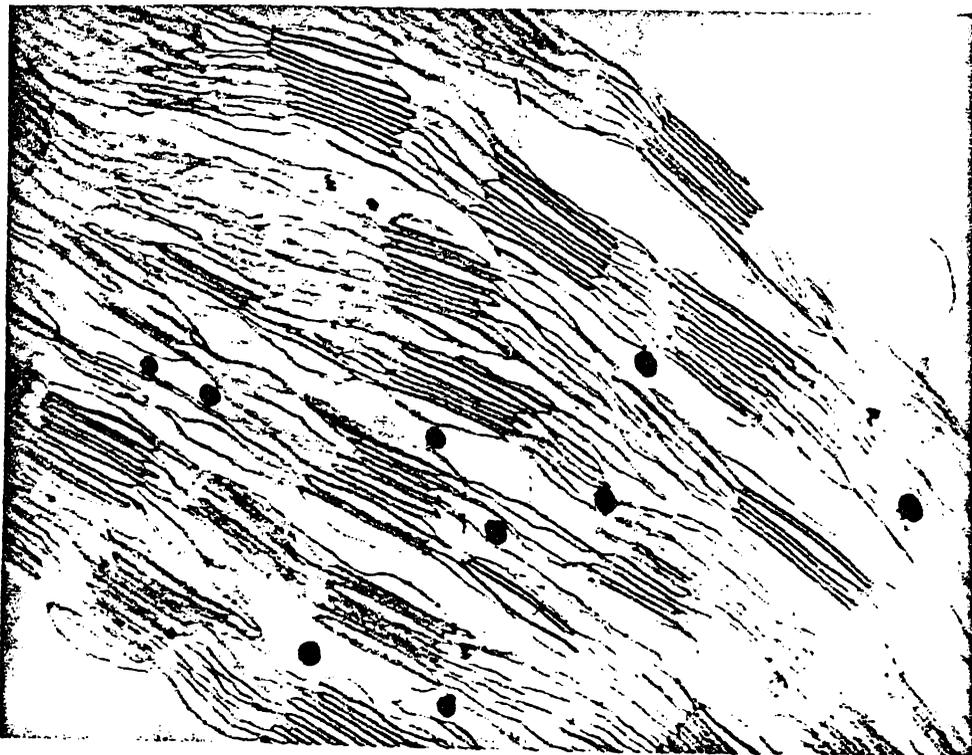
MORFOLOGIA DEL CLOROPLASTO

Los cloroplastos poseen formas variadas, pero frecuentemente son estructuras elipsoidales que miden alrededor de 5 a 10 μ . El organelo está caracterizado por una envoltura que consiste en una doble membrana que delimita al estroma del cloroplasto y actúa como una barrera que es permeable al citoplasma y al estroma. La membrana del cloroplasto está formada por múltiples vesículas aplanadas en forma de discos llamadas tilacoides, cada apilamiento recibe el nombre de grana. Los grana están interconectados por el sistema interlamelar, el conjunto grana-lamela se encuentra en el estroma y en este último se encuentran también las enzimas del ciclo de Calvin, ácido desoxirribonucleico (DNA), granos de almidón, grasa y ribosomas. El sistema lamelar de la membrana interna puede ser liberado del estroma al romper la membrana externa y así pueden obtenerse por centrifugación diferencial cloroplastos de clase II (fig II-I).

Los grana contienen todos los pigmentos fotosintéticos del cloroplasto y también las enzimas necesarias para las reacciones primarias dependientes de la luz. El sitio donde se encuentran los sistemas destinados a la captación de la luz, son las membranas de los tilacoides.



CLOROPLASTO NORMAL MOSTRANDO LA DISPOSICION DE LOS TILACOIDES Y LOS GRANA



CLOROPLASTO DE CLASE II SIN MEMBRANA EXTERNA

FIG. 1

FASE LUMINOSA Y FASE OSCURA DE LA FOTOSINTESIS

Ahora que sabemos en donde se lleva a cabo el proceso fotosintético, la siguiente pregunta a contestar es; como se verifica la fotosíntesis?. Aunque esto es casi el equivalente a preguntar como se originó la vida, y como es de esperarse aun no se ha contestado completamente, pero sí se conoce una serie de eventos secuenciados que se llevan a cabo durante el proceso fotosintético y es de ellos de los que vamos a hablar.

En primer lugar se sabe que la fotosíntesis -- consta de dos fases fundamentales una luminosa y -- una oscura (fig II-2).

Las primeras en llevarse a cabo son las reacciones luminosas y posteriormente se llevan a cabo las reacciones oscuras, que constan fundamentalmente de una serie de reacciones en las que el CO_2 se transforma en carbohidratos o en otros compuestos orgánicos.

Pero para que se lleve a cabo este proceso es indispensable que la planta tenga una cantidad suficiente de CO_2 . En el mar o en los lagos y rios, el CO_2 necesario para la fotosíntesis, se toma de las sales como el bicarbonato o carbonato disueltas en el medio que baña a las plantas. Las plantas terrestres, han de obtener su dióxido de carbono de

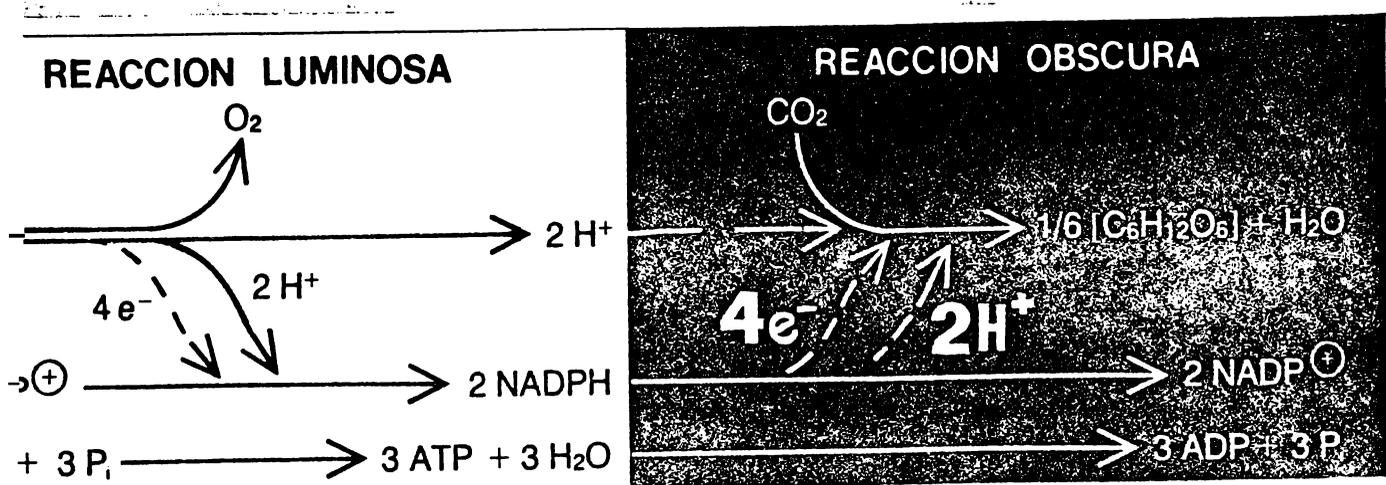


FIGURA II-2 reacciones luminosa y oscura de la fotosíntesis

la atmosfera, lo cual hacen a traves de pequeños - orificios en la epidermis de la hoja llamados estomas, estos orificios permiten no solamente la entrada de CO_2 , sino tambien la salida de vapor de agua desde las paredes celulares húmedas del exterior de la hoja.

En las plantas terrestres que consumen CO_2 durante la fotosíntesis, debe haber una diferencia en la concentración de CO_2 entre la atmosfera que rodea a la planta y el lugar de reacción del cloroplasto de la célula foliar. El dióxido de carbono entra en la hoja por un proceso de difusión ; por lo tanto se mueve de una zona de mayor concentración -- hacia otra de menor concentración. Desde el exterior, el CO_2 va difundir en una fase gaseosa y con -

ayuda de los estomas, pasa a través de los espacios intercelulares de la hoja y luego en una fase acuosa a través de las paredes celulares y en el interior de las células hasta llegar al cloroplasto, -- en forma de bicarbonato, así es mantenido con la -- ayuda de la anhidrasa carbónica, debido a que las -- paredes celulares son húmedas, el aire inmediatamente adyacente a ellas en los espacios intercelulares estará prácticamente saturado de vapor de agua a la temperatura de la hoja y como bajo casi todas las -- condiciones ambientales la temperatura externa de -- la hoja mantendrá el aire en condiciones no saturantes en el exterior, entonces el agua difundirá hacia afuera desde las células a través de los espacios intercelulares de la hoja y atravesando la superficie foliar saldrá a la atmósfera (47) .

Una vez que el CO_2 ha llegado, es incorporado al ciclo fotosintético de reducción del CO_2 , este ciclo está constituido por una serie de reacciones que reciben el nombre de ciclo de Calvin (llamado -- así en honor de Melvin Calvin), quien fue el primero en describir completamente este ciclo, que consta de los siguientes pasos (37).

- 1.- Carboxilación de la ribulosa 1,5-difosfato (RuDP).
- 2.- Reducción de PGA por $\text{NADPH}_2 + \text{ATP}$ o reducción -- directa de un intermediario de carboxilación para un transportador de electrones del tipo de --

- la la ferredoxina simbolizado por $E'(Fe-SH)_2$.
- 3.- Isomerización del gliceraldehído-3-fosfato en dihidroxiacetona fosfato.
 - 4.- Condensación de triosas-fosfato en fructosa -- 1,6-difosfato .
 - 5.- Defosforilación de fructosa-1,6-difosfato en fructosa-6-fosfato .
 - 6.- Transcetolización, equilibrio entre la fructosa-6-fosfato, el gliceraldehído-3-fosfato, la xilulosa-5-fosfato y la eritrosa-4-fosfato.
 - 7.- Transcetolización, equilibrio entre la fructosa-6-fosfato, la glicoltiamina pirofosfato (TPP) y la eritrosa-4-fosfato.
 - 8.- Transcetolización formación de sedoheptulosa-1,7-difosfato por condensación de dihidroxiacetona fosfato y la eritrosa-4-fosfato.
 - 9.- Defosforilación de sedoheptulosa-1,7-difosfato a sedoheptulosa-7-fosfato.
 - 10.- Transcetolización, equilibrio entre glicolil-TPP, sedoheptulosa-7-fosfato y ribosa-5-fosfato.
 - 11.- Epimerización de xilulosa-5-fosfato y ribulosa 5-fosfato .
 - 12.- Isomerización entre ribosa-5-fosfato y ribulosa-5-fosfato.

- 13.- Fosforilación de ribulosa-5-fosfato para dar ribulosa 1,5-difosfato.
- 14.- Equilibrio entre la glicolil-TPP y un transportador de glicol del tipo del ácido lipoico.
- 15.- Oxidorreducción condensando el acetilfosfato a los lípidos (?). Las relaciones entre el radical glicolil y el ácido glicólico son supuestas (fig II-3).

Puesto que este trabajo se halla encaminado al estudio de las reacciones luminosas de la fotosíntesis, daremos por suficiente este pequeño resumen de la fase oscura de la fotosíntesis y concentraremos nuestra atención en el estudio de la fase luminosa.

Ante todo estudiaremos a la membrana fotosintética, ya que es en ella en donde se llevan a cabo las reacciones luminosas.

El modelo más satisfactorio para describir a las membranas biológicas es el modelo del mosaico fluido propuesto por Singer y G L Nicolson en 1972.

En este modelo se postula que los fosfolípidos de las membranas se hallan ordenados en bicapas formando una matriz en la cual las moléculas lipídicas tienen un movimiento individual lateral, lo que da a esta bicapa fluidéz y flexibilidad, además de una resistencia eléctrica elevada y de relativa impermeabilidad.

Asimismo señala que las proteínas pueden estar parcial o totalmente embebidas en la membrana y que son globulares, lo cual explica el alto contenido de α helice.

El grado con que una proteína penetra en el interior de una fase lipídica, estará determinado por la secuencia aminoacida de la proteína y la localización sobre su superficie por los grupos R no polares de los aminoácidos. De esta manera las proteínas de la membrana, formarían una estructura de tipo mosaico no estático, lo que permite que las proteínas puedan difundirse en dos dimensiones (22).

Un hecho sumamente importante es que existe una asimetría absoluta de las proteínas y los carbohidratos que forman parte de las membranas. Las membranas son, por otro lado estructuras vectoriales es decir que sus componentes estan asimétricamente distribuidos entre las dos superficies, lo que da una base molecular para la asimetría funcional que explica las direcciones de los transportes vectoriales o reacciones que se llevan a cabo en las membranas y esto da como consecuencia que dichas reacciones tengan dirección y temporalidad. El significado funcional de la asimetría membranal aunque aun no ha sido explicado satisfactoriamente, sugiere que la asimetría lipídica junto con la de los grupos polares y la de los aminoácidos da como resultado

regiones de fluidez diferente, para las dos monocapas y que por consiguiente haya dirección en las reacciones en las que está involucrada la membrana (40) .

Para el caso de la membrana fotosintética, se han encontrado partículas de varios tipos, que son visibles en las membranas fotosintéticas cuando estas son expuestas a la técnica de criofractura; el curso de estas fracturas puede comenzar desde la mitad de una membrana hasta otra adyacente y se han encontrado cuatro diferentes tipos de fracturas : - E_F que designan a las fases exoplásmicas y P_F que designan a las fases inmersa (s y u) según su disposición . Para poder explicar estas 4 fases de fractura, podemos describir a la membrana esquemáticamente (fig II-4) .

Las partículas grandes $E.P_{FS}$ están inmersas - en la mitad inferior de la membrana del tilacoide y además comprenden el límite de otra membrana adyacente. Donde las dos membranas se encuentran - en contacto, se permite que las partículas grandes se reduzcan tanto en dimensión como en número. - La exposición de una fase designada como E_{Fu} , donde la fractura divide la parte más delgada de la membrana adyacente, tiene una exposición de fases diferente. Notándose que aquella superficie expuesta es la que incide en la mitad externa de la mem-

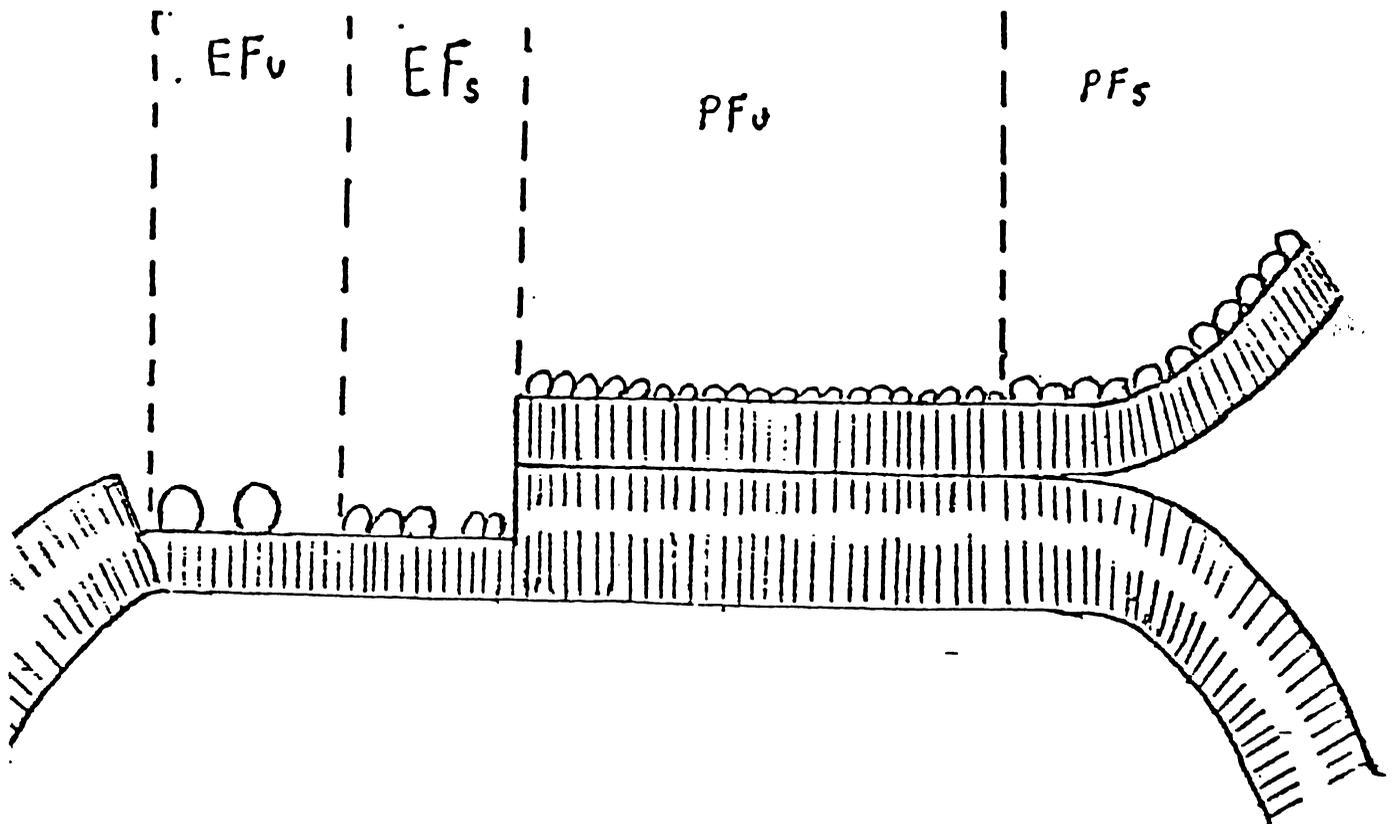


FIGURA II-4

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR EL METODO DE CRIOFRACTURA E_F (u y s) REPRESENTAN LAS FASES EXOPLASMICAS Y P_F (u y s) A LAS ENDOFLASMICAS

ASIMETRIA DE LA MEMBRANA DEL TILACOIDE

Los análisis de membrana que se han obtenido con el estudio de las fases obtenidas por la técnica de criofractura, han demostrado que las partículas que se encuentran en la mitad interna de la membrana del tilacoide, son completamente diferentes a las partículas expuestas en la otra mitad. En otras palabras, la membrana fotosintética es asimétrica, entonces tiene diferente polaridad, tanto en su interior como en su exterior y las partículas grandes E_F

y E_{Fu} , muestran las multiunitarias estructuras -- asociadas a PS II y algunas de las partículas P_{Fs} y P_{Fu} que se hallan asociadas a PS I, las porciones de los componentes de la cadena transportadora de electrones se encuentran cercanos a CF_I y probablemente tambien formen parte de las partículas P_F (32) (fig II-5).

Durante la fase luminosa, suceden una serie de reacciones en la membrana de los tilacoides, donde se localiza la cadena transportadora de electrones de H_2O a $NADP^+$ estos eventos son:

- Absorción de energía radiante
- Transferencia de energía
- Fotólisis del agua
- Separación de cargas
- Transporte de electrones
- Evolución de oxígeno
- Síntesis de ATP
- Reducción del $NADP^+$

Embebidos en la membrana de los tilacoides - se encuentran los pigmentos moleculares que inician el proceso de la fotosíntesis: Se distinguen tres principales variedades de clorofila, por pequeñas - diferencias en su estructura, estas son: la clorofila "a" (que es la forma más abundante), la clorofila "b" y la bacterioclorofila que es característica de las bacterias. Aunque las clorofilas son .

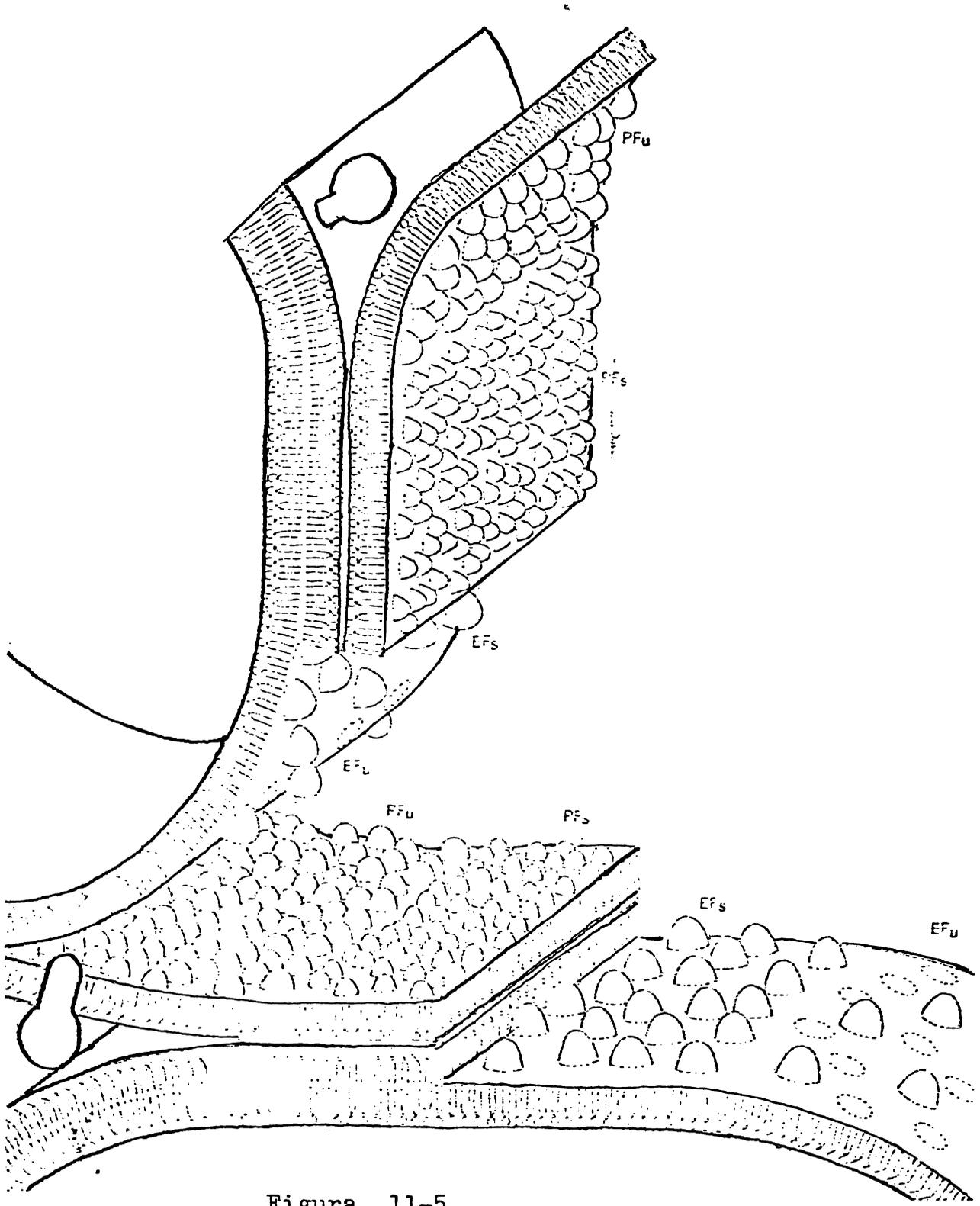


Figura 11-5

ESQUEMA TRIDIMENSIONAL DE LA MEMBRANA DEL CLOROPLASTO
SEGUN EL MODELO DEL MOSAICO FLUIDO.

los pigmentos más importantes de las plantas, no son los únicos presentes (23), como tampoco son los -- únicos que participan en la absorción de la luz; se encuentran los carotenoides (que son estructuras que poseen largas cadenas hidrocarbonadas unidas por dobles enlaces conjugados y un anillo de 6 miembros a cada lado, se conocen dos tipos fundamentales de ca rotenoides que son los α y los β carotenos). Otros pigmentos que participan en la fotosíntesis son las ficobilinas (característicos de las algas), que a su vez se dividen en ficoeritrobilina y ficocianobilina (fig II-6) .

Con los estudios de inducción de fluorescencia en los pigmentos fotosintéticos, se había observado que el rendimiento de la fluorescencia, siempre variaba entre dos valores límite, lo que sugería que la emisión de fluorescencia se sucede en dos partes, a) una emisión de rendimiento invariable y b) una - emisión de rendimiento variable en función del tiem po. Entonces se trató de explicar este fenómeno - por medio de las siguientes hipótesis:

1.- Hipótesis Del Rendimiento Unico

El complejo proteína-pigmento está parcialmen te bajo la forma no fluorescente y bajo una forma - fluorescente.

2.- Hipótesis De Dos Rendimientos

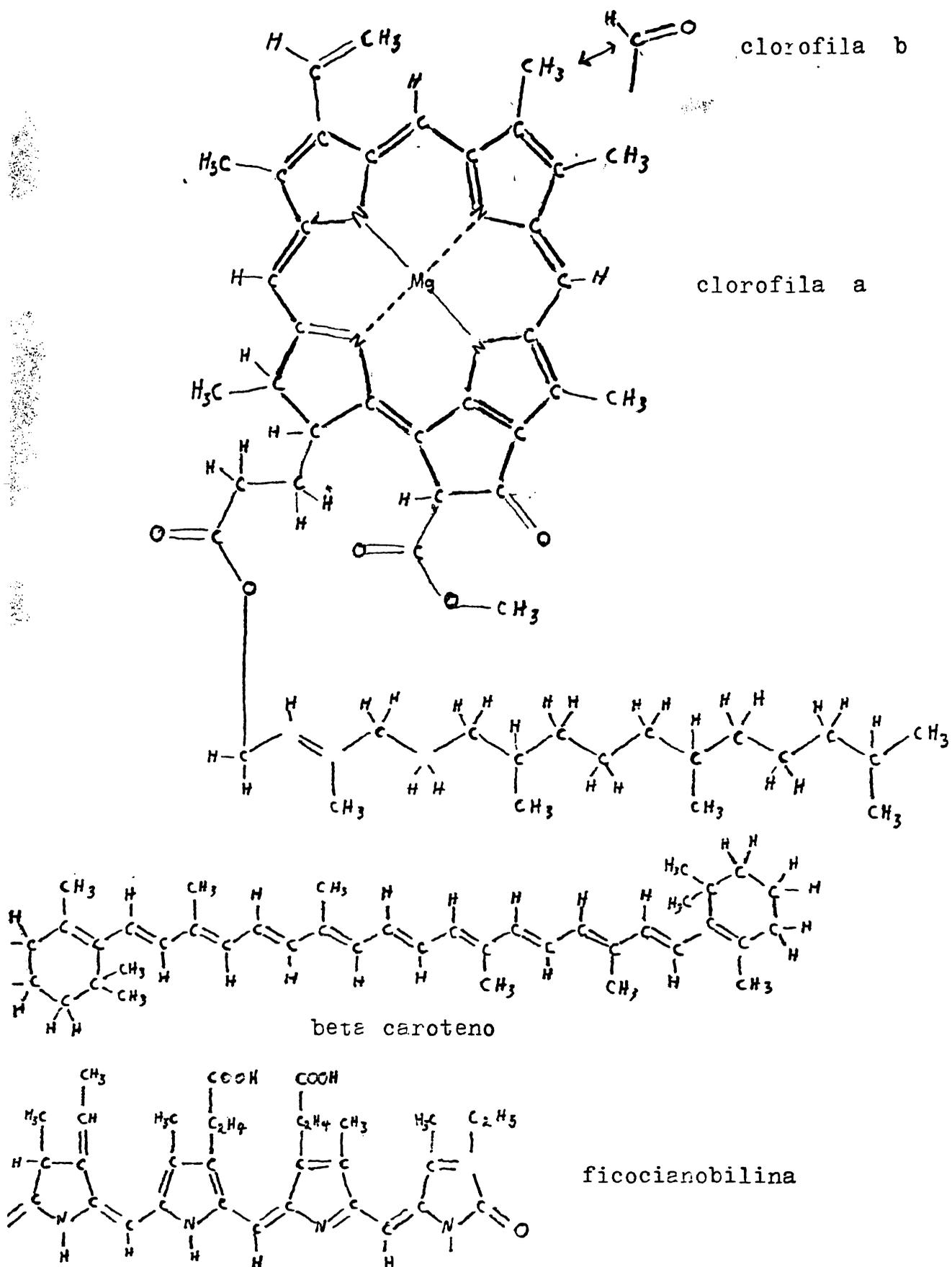


Figura 11-6

PIGMENTOS FOTOSINTETICOS

El complejo proteína-pigmento esta completamente bajo una forma no fluorescente ϕ_1 , mientras que - el estado de máximo rendimiento de sete se encuentra totalmente bajo una forma de rendimiento $\phi_2 > \phi_1$.

3.- Hipótesis De La Doble Emisión

El complejo proteína-pigmento es completamente no fluorescente y admite que la fracción invariable de la emisión de fluorescencia tenga un origen diferente del de la porción variable y por consiguiente se puede postular que el aparato clorofiliano es heterogéneo.

Más tarde los estudios de emisión de fluorescencia polarizada, confirmaron que la hipótesis de la - doble emisión era la que podía explicar sin lugar a dudas los fenómenos fluorescentes de los pigmentos - fotosintéticos (20,21). En estudios posteriores en los que se iluminaba simultaneamente con dos rayos monocromáticos, se observó que cuando se variaba la longitud de onda del segundo rayo, algunos de los pigmentos accesorios eran excitados simultaneamente a la excitación de la clorofila con luz del -- rojo lejano y la actividad fotosintética en esta zo na aumenta notablemente. Estos resultados sugie-- ren que las dos formas de clorofila pueden estar -- implicadas en la fotosíntesis en dos condiciones es peciales o sea que pueden constituir dos fotosiste-- mas.

Por conveniencia, fueron entonces separados estos dos fotosistemas que se denominaron; Sistema --- pigmentario I (PS I) que es un sistema de longitud de onda larga y sistema pigmentario II (PS II) que es un sistema de longitud de onda corta, sugerencia que fue hecha por Duysens et al . Estos dos sistemas pigmentarios poseen las siguientes características:

SISTEMA PIGMENTARIO I

Los pigmentos comprendidos en PS I, Absorben en la parte del espectro correspondiente al rojo lejano e incluyen a la clorofila "a" (forma que absorbe a 680 nm), así como a P₇₀₀ que es una forma especial de clorofila la cual tiene su máximo de absorción alrededor de los 700 nm y los datos experimentales indican que es un dímero de clorofila.

La identificación de este pigmento como una forma especial de clorofila que se halla acompañada de una forma resistente que absorbe a 430 nm y además de que cuando se extraen las preparaciones de P₇₀₀ con acetona u otros solventes orgánicos, -- únicamente se obtiene clorofila "a" + "b".

CARACTERISTICAS GENERALES DE PS II

El sistema pigmentario designado como PS II -- aun no ha sido bien identificado, pero se sabe que tiene las siguientes características: a) Los pigmento que absorben la luz, tienen su absorción máxi

ma a longitudes de onda cortas, en este PS II se encuentran incluidas las ficobilinas (en algas, no en plantas), la clorofila "b" y algunas formas de clorofila "a". b) PS II se halla más íntimamente asociado con el sistema de evolución de oxígeno. - c) PS II se halla acoplado a PS I por medio de los componentes del complejo intermediario de la cadena transportadora de electrones, cuyos estados redox son afectados por los dos sistemas pigmentarios. d) El sistema funcional completo con las enzimas asociadas a la evolución de oxígeno son mucho menos estables comparadas con PS I (46) .

Un avance muy importante en la investigación sobre la arquitectura del aparato fotosintético, fue el descubrimiento de que, al tratar químicamente o con iluminación intensa una mutante bacteriana sin carotenoides, se destruye la mayoría de las bacterioclorofilas llamadas antenas, que son químicamente inactivas y quedan únicamente expuestos los sitios químicamente activos, llamados centros de reacción, que se hallan funcionalmente separados de la mayoría de los pigmentos antena. Al conjunto de pigmentos antena y el centro de reacción se le da el nombre de unidad fotosintética y aunque en las plantas superiores no se han podido aislar los centros de reacción, numerosas evidencias experimentales favorecen la existencia de uni

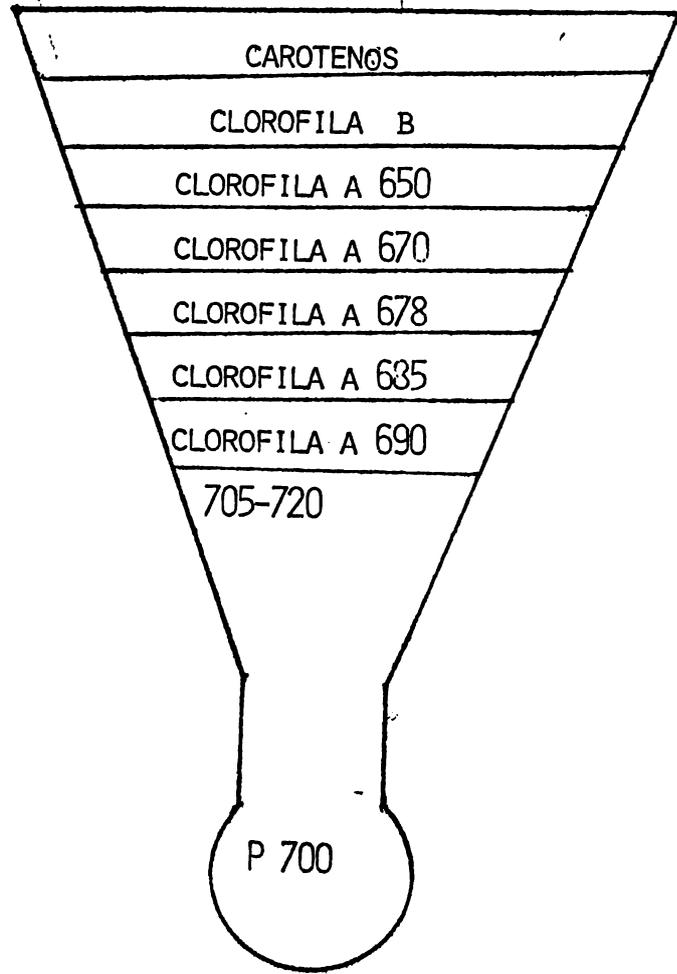
dades fotosintéticas en ellas.

La unidad fotosintética consta de aproximadamente 300 moléculas de clorofila, en las plantas superiores así como en las algas, que aparentemente es el mínimo número necesario para poder transportar un electrón, esta unidad incluye a un volumen de pigmentos que van a reemplazar a los pigmentos antena de la recolección de energía y un centro de reacción, que cuando la energía es atrapada y utilizada va a promover las reacciones químicas - - - (fig II-7).

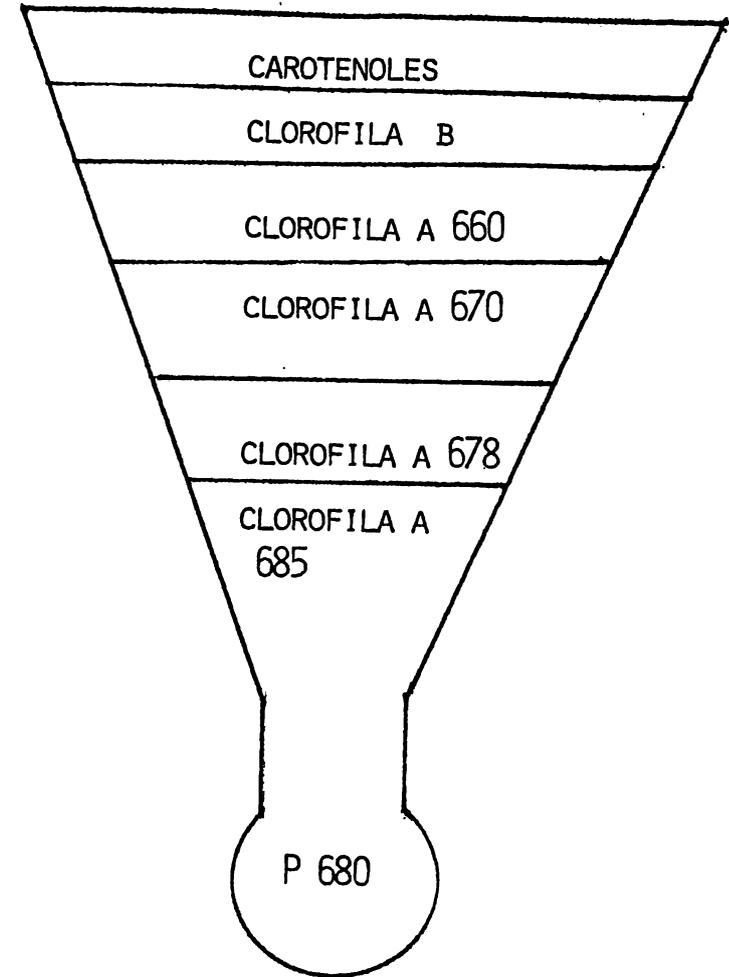
ABSORCION DE LUZ

Cuando un fotón es absorbido por un átomo o molécula, este va a producir un cambio en la configuración de la carga electrónica asociada con la valencia o bien con alguno de los electrones circunvecinos al núcleo del átomo, pero esta nueva conformación tiene más energía que la basal y entonces se dice que el átomo o molecula esta exitado. La transición desde el estado basal hasta el estado exitado, puede tener lugar unicamente bajo ciertas condiciones establecidas por la mecánica cuantica. Los electrones pueden ocupar unica y especificamente distintos estados de energía obtenida a partir de la absorción de un foton, esta energía debe ser combinada exactamente con la energía de transición de tal manera que la energía del foton es inversamen

FOTOSISTEMA I



FOTOSISTEMA II



te proporcional a su longitud de onda, tomando en cuenta que únicamente a ciertas longitudes de onda pueden ser absorbidos por un átomo o molécula --- (16,42).

Una vez que la luz es absorbida, su energía es pasada hacia la cadena transportadora de electrones, la cual puede ser dividida en tres reacciones, PS II , complejo de intermediarios de la cadena transportadora de electrones, PS I, así como un sistema de proteínas que van a llevar los electrones desde PS I hasta el NADP^+ ,

Sistema De Proteínas Desde PS I Hasta NADP^+ .-

Este sistema consta fundamentalmente de los siguientes componentes:

- a) Ferredoxina NADP^+ reductasa, esta enzima es una flavoproteína que contiene FAD^+ en su molécula y - cuya función es donar electrones a NADP^+ .
- b) Ferredoxina, es una proteína sulfurada cuyo - potencial redox es de $E_0 = - 0.42 \text{ V}$ y se ha demostrado que reduce a una gran variedad de aceptores de electrones como son ferricianuro, citocromo c , etc, pero su aceptor natural es la Ferredoxina NADP^+ reductasa.
- c) Sustancia reductora de la ferredoxina o sustancia X, es una sustancia con un bajo potencial redox (aproximadamente $- 0.55 \text{ V}$) que se encuentra entre PS I y la ferredoxina.

PS I .- Como ya se ha mencionado es un sistema pigmentario cuyo núcleo de reacción es P_{700} , que es una molécula especial de clorofila que es responsable de la captación de los electrones procedentes de PS II.

COMPLEJO DE INTERMEDIARIOS DE LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES

a) Plastocianina .- Es una cupro-proteína que posee dos átomos de cobre por molécula y cuyo potencial redox es + 0.37 V, se encuentra en una estequiometría de una molécula de plastocianina por cada 300 moléculas de clorofila.

b) Citocromo f .- Es una ferroproteína que tiene -- tiene un potencial redox de + 0.365 V y que se halla en una concentración aproximada de 0.25 % con respecto a la clorofila.

c) Plastoquinona .- Este compuesto fue descubierto en los cloroplastos aislados por Lester Y Crane, y se ha postulado que se encuentra entre PS I y la plastocianina, se ha localizado un sitio de acoplamiento entre la síntesis de ATP y la cadena transportadora de electrones en este sitio (acoplamiento que será discutido en detalle más adelante) .

PS II .- El centro de reacción de este sistema pigmentario es P_{680} y su principal función es aceptar los electrones provenientes de la fotólisis del agua y posteriormente enviarlos al resto de la

cadena transportadora de electrónes (4,46) .

Para que los electrónes puedan fluir desde el agua hasta el NADP^+ , es necesario que se eleve la energía del estado inicial, lo cual se logra cuando el primer foton es absorbido por el complejo antena, el cual se encuentra incluido en la superficie interna de la membrana, la energía de excitación se comunica rápidamente del complejo antena a la molécula de P_{680} (P substituye "pigmento") . En P_{680} la energía de la luz altera la distribución de los electrónes en el anillo porfirínico y permite que un electrón pueda ser transferido. El electrón de P_{680} es transferido aparentemente a un aceptor de electrónes situado en la superficie externa de la membrana, inmediatamente despues de ser absorbido el foton. El proceso se repite con la absorción de otro foton y las dos moléculas oxidadas de P_{680} son reducidas por dos electrónes procedentes del agua con la ayuda de una enzima que contiene manganeso. El átomo de oxígeno procedente de la molécula de agua se libera y sale afuera del cloroplasto; los dos protones pasan a la solución en el interior de la membrana interna. Los dos electrónes que atraviesan la membrana procedentes del P_{680} son captados en la superficie externa por

un transportador de hidrógeno que es la plastoquina (PQ), los dos electrones con la ayuda de dos protones extraídos de la solución externa (los cuales penetran por medio de una bomba de protones), - reducen la PQ a PQH₂ que retorna a través de la membrana a la superficie interna y una vez allí la PQH₂ libera los protones al interior y transfiere los electrones al citocromo f.

El siguiente transportador de electrones de la cadena que es la plastocianina lleva los electrones al segundo sistema fotoquímicamente activo, en donde P₇₀₀ al excitarse por absorción de luz en el complejo antena provoca que los electrones sean de nuevo trasladados a la superficie externa, donde - son captados por la substancia reductora de la ferredoxina (FRS), yendo de esta a la ferredoxina. De aquí los electrones van a un FAD con protones, - este toma dos protones del medio externo formando FADH₂ (fig II-8) .

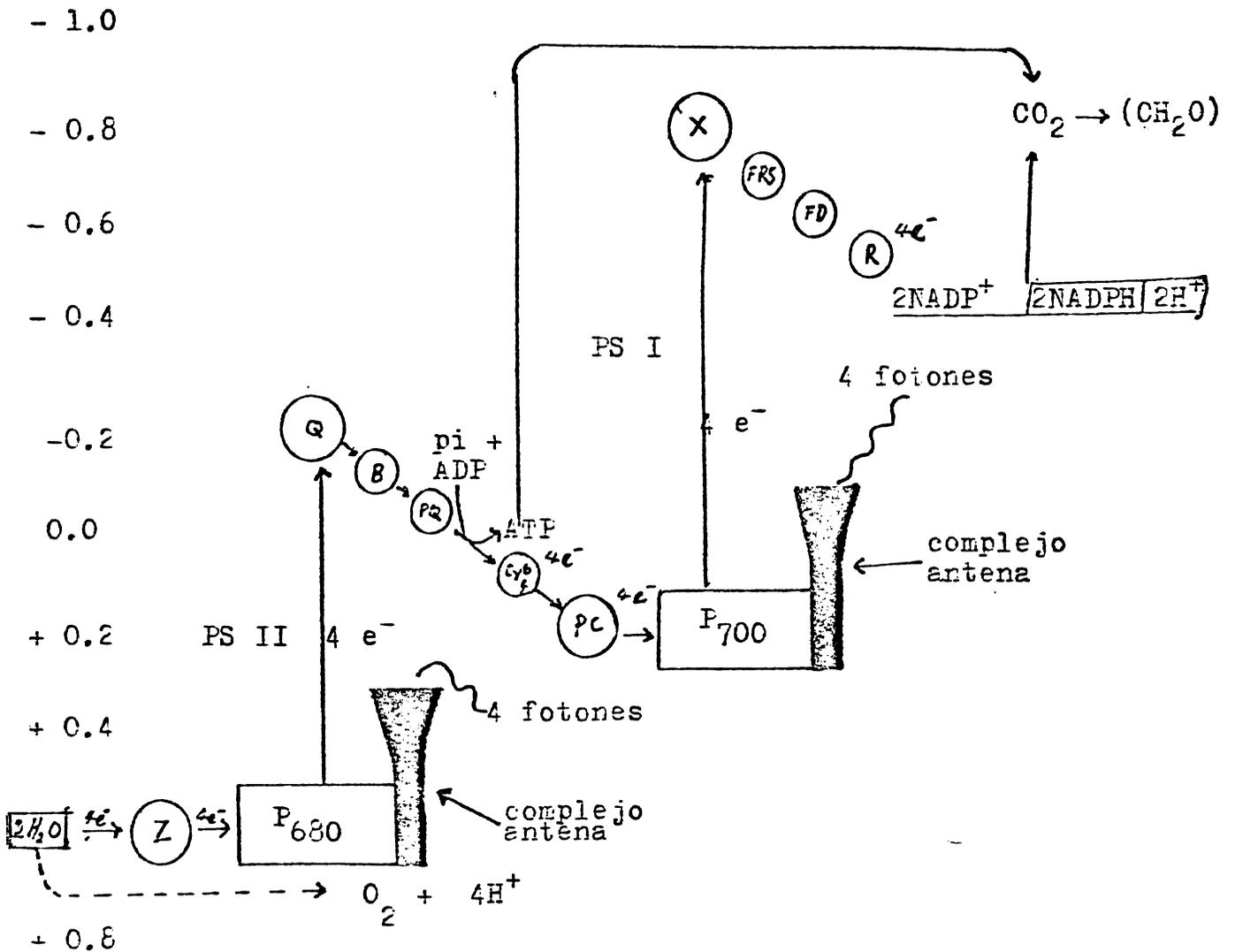
Cuando se ha completado el paso de dos electrones por la cadena, tres protones han quedado por fuera y cuatro han pasado al interior (18) .

BOBBA DE PROTONES

En ausencia de agentes fosforilantes, la luz induce la entrada de protones a cloroplastos, esta entrada puede ser continua bajo condiciones optimas de p^H y es posible establecer un gradiente

FIGURA 11-8

CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES EN DONDE PUEDE APRECIARSE LA DISPOSICION DE LOS DOS FOTOSISTEMAS Y SU INTERCONEXION POR MEDIO DEL COMPLEJO DE INTERMEDIARIOS DE LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES.



hasta de cuatro unidades de p^H . El número de protones que es tomado, es una función directa de la capacidad reguladora interna y el p^H generado por esta entrada de protones desde el exterior de la membrana del tilacoide hasta el interior así como los sitios de unión de los protones desde la fase externa hasta la comprendida en el interior, fueron identificados por flashes espectrofotométricos.

Estudios con indicadores de p^H , demostraron la existencia de dos sitios de entrada de protones en la parte exterior de la membrana y que están asociados con uno de los dos fotosistemas. Estos sitios fueron atribuidos a la reducción de la plastoquinona por PS II y la reducción del aceptor terminal de electrones por PS I, bajo la excitación con pulsos de luz cortos y repetitivos se encontró que cada sitio actuaba por separado y la estequiometría para cada uno de estos sitios es: $1 H^+/e^-$ para el sitio localizado en PS II y se halló una estequiometría variable para el sitio final, esta variación depende de la naturaleza del aceptor -- que se encuentra en este sitio que es atribuido a PS I, la estequiometría hallada para este sitio es de $1 H^+/e^-$ cuando se usa benzil viológeno, de $0.0 H^+/e^-$ para el ferricianuro que no une la reducción de los protones a p^H fisiológico y para el aceptor natural que es el $NADP^+$ es de $0.5 H^+/e^-$

Esta estequiometría fue recientemente cambiada por Fowler quien comprobó una estequiometría de $2H^+/e^-$ para cada uno de los sitios cuando el aceptor utilizado es el metil viológeno. En resumen, la bombe de protones en la membrana del cloroplasto transfiere protones a través de la membrana -- del tilacoide en cada uno de los sitios mencionados anteriormente (fig II-9).

La entrada de estos protones va a producir -- una diferencia de potencial, el cual estará influenciado por la permeabilidad de la membrana y la constante dieléctrica de la misma.

Ambas reacciones fotoquímicas PS I y PS II -- están ligadas a una serie de pasos electricamente neutros y la transferencia de protones mas electrones en plastoquinona desde el exterior hasta el interior de la membrana del tilacoide así como la -- oxidación del agua y la plastohidroquinona respectivamente por acarreadores que unen protones a las reacciones de reducción de tal forma que haya un -- proton por electrón en cada uno de los sitios de -- la membrana interna. La reducción de la plasto-- quinona y el $NADP^+$ inducida por la entrada de protones (un proton por electrón), es entonces lo que va a generar el potencial eléctrico, si bien es -- cierto que la rápida transferencia de electrones -- es al final de cuentas equivalente a la transloca-

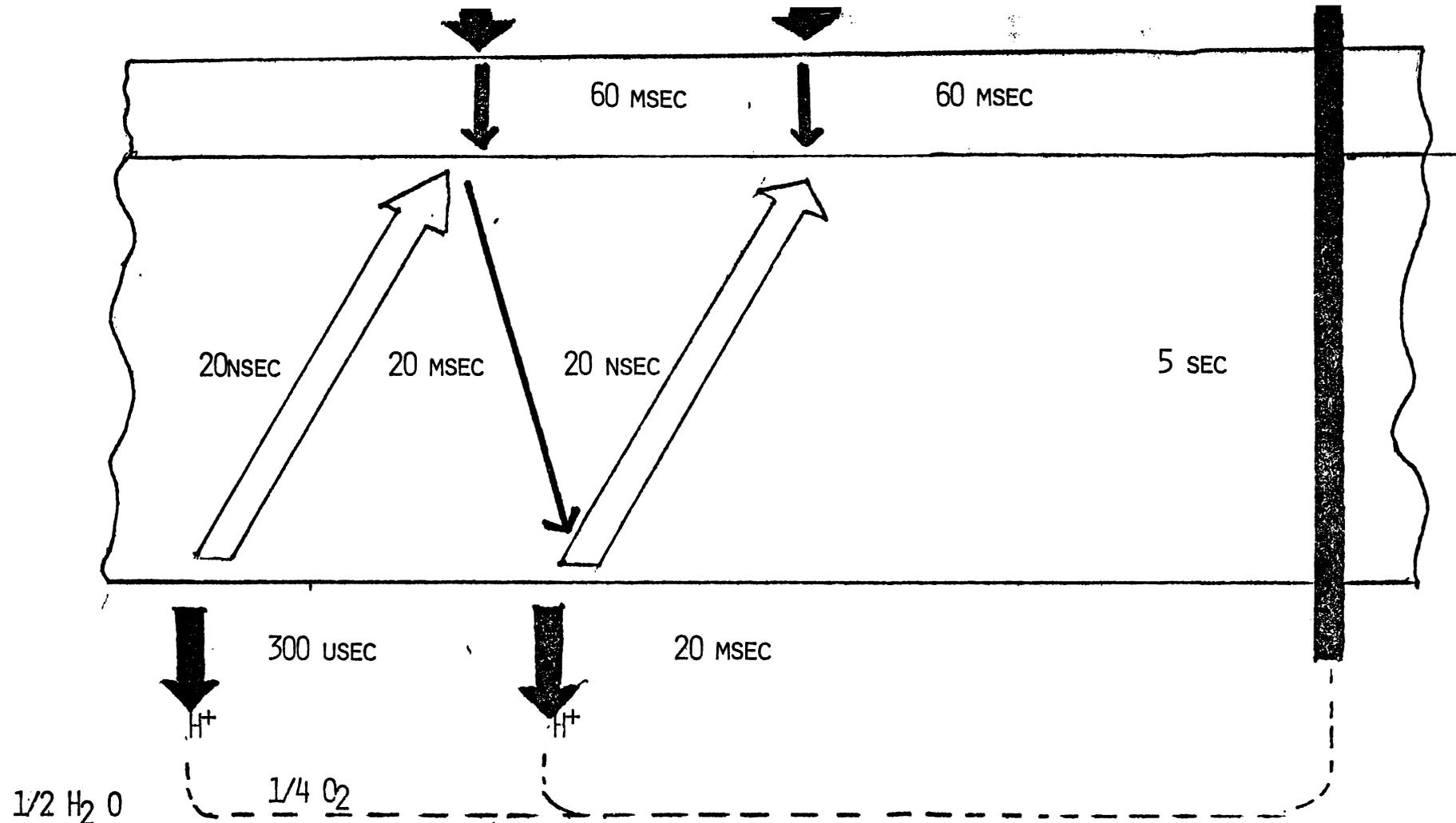


FIG. II-9

ESQUEMA DE LA BOMBA DE PROTONES EN DONDE SE MUESTRAN LOS DOS SITIOS DE ENTRADA DE PROTONES CONOCIDOS.

ción de protones por electrón a traves de la membra
na,.

Este potencial electroquímico, induce un potencial
de membrana, el cual es un parámetro útil pa-
ra caracterizar la posibilidad de generar trabajo -
útil (síntesis de ATP) de la translocación de iones
a traves de una membrana que separa dos fases acuo-
sas.

El potencial electroquímico en un punto A de -
una especie iónica, cualquiera que sea, estará dado
por :

$$\mu_k = \mu'_k + RT \ln a_k + Z_k F \Psi$$

Donde a_k es la actividad iónica, c_k es la con-
centración, k es la especie iónica, Ψ el potencial
eléctrico y μ_k el potencial de membrana.

Si se supone que:

$$\mu_k = \mu'_k \quad \text{entonces} \quad \mu_k = 0$$

por tanto se puede escribir la ecuación de la
siguiente manera:

$$\Delta \mu_k = 2.3 RT \log (a_k^{\text{in}} / a_k^{\text{ext}}) + Z_k F (\Psi - \Psi_0)$$

Que en el momento de haber un cambio en μ_k
ó μ'_k queda expresada como :

$$\Delta \mu_k = 2.3 RT \log (\Delta a_k) + Z_k F \Delta \Psi$$

que para el caso particular de los protones μ transportados se expresa como:

$$\mu_{H^+} = 2,3 RT \Delta p^H + F \Delta \Psi$$

Algo muy importante al respecto es que existe una deslocalización del campo eléctrico producido (gracias a la translocación de iones) cuando hay una iluminación continua, y se supone que ocurre porque hay una rápida separación de carga entre ambos fotosistemas, generando un dipolo localizado a través de la membrana y posteriormente habría una redistribución de iones en la membrana del tilacoide entre las dos fases acuosas.

Para poder probar la existencia de este potencial de membrana, se usaron técnicas de electrocromismo en cloroplastos (cambios de absorción debidos a la inducción artificial de potenciales electroquímicos), hallándose una relación lineal entre los cambios de absorción electrocrómicos y el voltaje generado a través de la membrana.

$$\Delta A \sim C \Delta \Psi = \Delta Q$$

Donde ΔA es la extensión de los cambios de absorción electrocrómica a 520 nm, ΔQ es el desplazamiento de carga por unidad de área de membrana y C es la capacitancia por unidad de área. Si

suponemos a la membrana como un capacitor sobre el que existen únicamente dos fotosistemas, en los que ocurre una translocación de dos cargas elementales por unidad de área de membrana, entonces una aproximación de este capacitor teórico membranar es :

$$\Delta \Psi = 2 e^{-}d / (\epsilon \epsilon_0 A)$$

Donde e^{-} es la carga elemental, d es el espesor de la cubierta dieléctrica de la membrana, A es el área de la membrana, ϵ es la constante dieléctrica y ϵ_0 es un factor dimensional.

Posteriormente estudios de inducción electrostática, terminaron de confirmar la existencia de este potencial de membrana y mostraron que la asimetría eléctrica generada, queda finalmente compensada por el consiguiente depósito de iones alrededor de los tilacoides (fig II-10).

Sin embargo aun hay grandes preguntas en relación al potencial de membrana, que aun no han sido contestadas, siendo las más importantes:

- 1.- La inconsistencia de los protones generados por la bomba de protones con la estequiometría del transporte de electrones.
- 2.- El mecanismo de la extremadamente rápida transferencia de electrones a través de la membrana, específicamente en cada centro de reacción.
- 3.- El mecanismo por medio del cual la plastoquino-

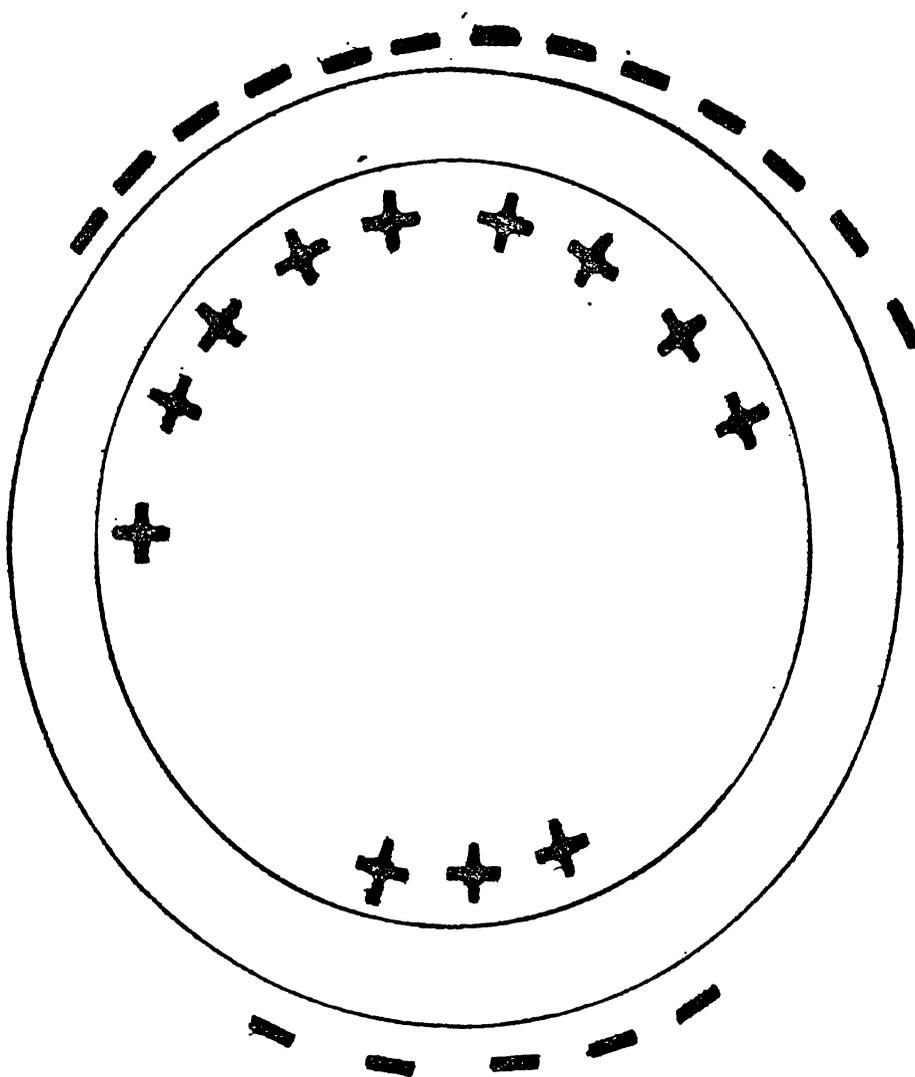


Figura 11-10

DEPOSITO DE IONES QUE COMPENSAN LA ASIMETRIA ELECTRICA
GENERADA POR LA BOMBA DE FOTONES

● IONES NEGATIVOS

+ IONES POSITIVOS

na transloca hidrógeno a travez de la membrana.

4.- La naturaleza química y estructural de la difu
sion desde el exterior de la membrana y su re-
levancia para fosforilación o el translocador
de protones , (5,19,44).

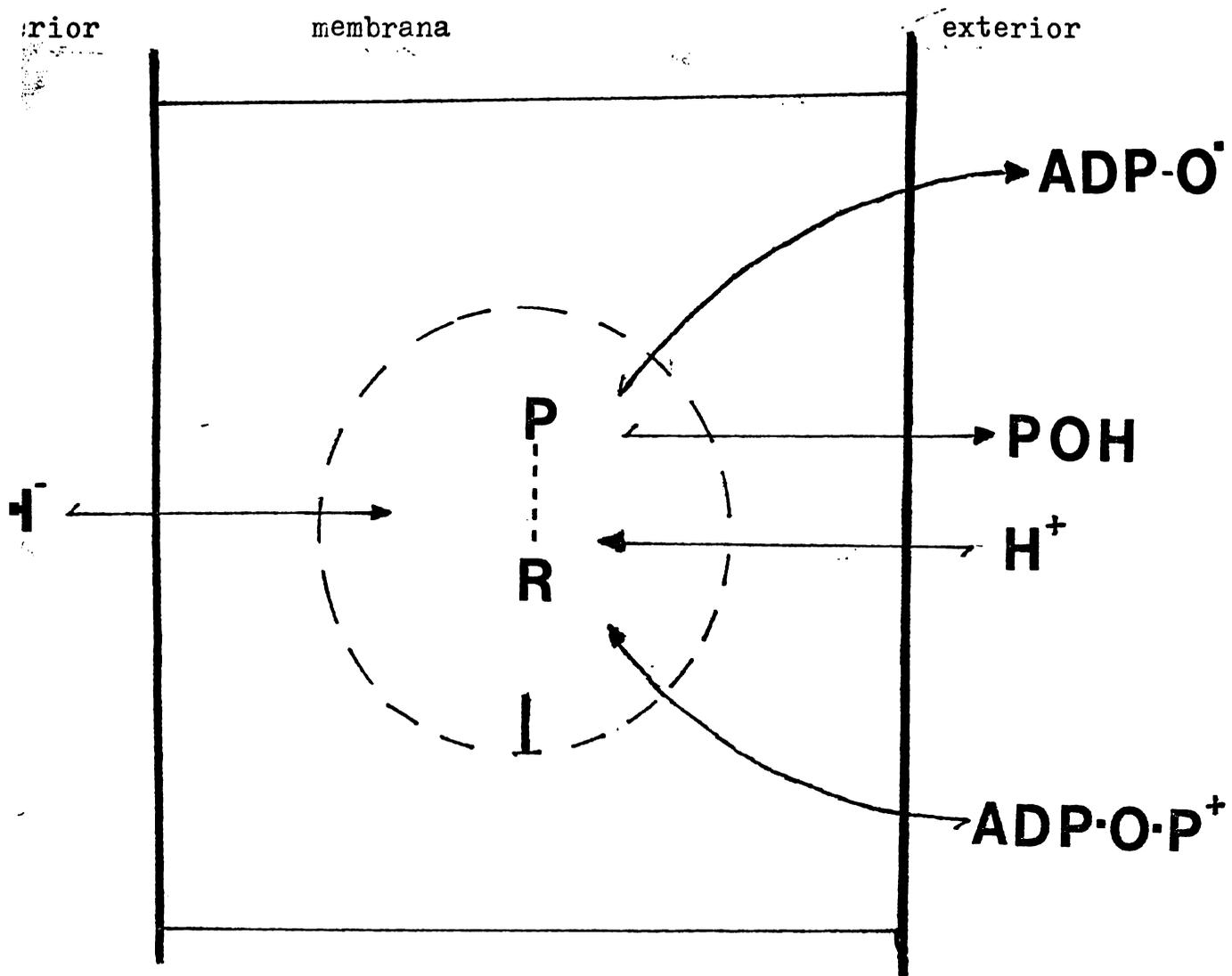
Una observación muy importante fue hecha por
M avron, quien halló una relación entre la magni--
tud de los gradientes de p^H y la síntesis de ATP.
En un estado basal, el p^H puede ser medido por la
variación de diferentes parámetros, incluyendo la
intensidad de la luz, la adición de varios inhibi-
dores de la cadena transportadora de electrones,-
así como la adición de desacoplantes. En todos
los casos anteriores se pudo observar que no había
fosforilación cuando los valores de Δp^H eran meno-
res de 2 y se veía que a valores altos había una -
dependencia de la fosforilación, de la transloca--
ción de protones hacia el interior del tilacoide,
y se observó que mientras mas grande era Δp^H , --
mejor era la fosforilación en los tilacoides, fe-
nómeno que es explicado satisfactoriamente por la
hipótesis quimiosmótica de Mitchell. (6).

HIPOTESIS DE MITCHELL

Los sistemas de ATPasa en mitocondrias y clo-
roplastos, se tienen que encontrar catalizados por
una reacción quimiosmótica en la que los protones

son translocados a travez de la membrana acoplada estequiométricamente a la síntesis de ATP o en su defecto con su hidrólisis, entonces se sugirió que había un sistema de oxido-reducción por medio de un sistema de citocromos que se hallaba organizado anisotropicamente a traves de la membrana (fig -- II-11) y entonces el combustible para la célula son los protones que pueden ser producidos de un lado y consumidos por el otro, entonces la hipótesis quimiosmótica depende termodinámicamente del hecho de que hay una distribución anisotrópica en el sistema de ATP esa.

En la hipótesis quimiosmótica, el primer paso esencial es la conversión de la energía libre derivada del transporte electrónico en un potencial osmótico. El segundo, requiere un proceso completo de acoplamiento, si hubiera este acoplamiento a la síntesis de ATP y el retorno efectivo del flujo de protones a traves de la membrana. - Krebs sugirió que el ATP podía ser sintetizado por un segundo sistema de transporte de electrones sin embargo esta sugestión y el posible mecanismo de acoplamiento de la fosforilación no concuerda con los sucesos que ocurren en la membrana.



Figura(11-11)

ESQUEMA DE LA ATPasa ANISOTROPICA POSTULADA POR EL Dr
 PETER MITCHELL EN 1961

Sistema De Hidro-Deshidratación Anisotrópico

Unicamente las reacciones de oxido-reducción -
están directamente acopladas a la transferencia de
iones o a la separación de H^+ y OH^- en los sistemas
electroquímicos, sin embargo en la idea de la trans-
locación de grupo se postula que debe existir un --
acarreador enzimático catalítico o en su defecto un
conductor específico de iones OH^- .

El sistema anisotrópico reversible de ATPasa de
de la hipótesis quimiosmótica (fig II-11), se ba-
sa en el concepto de que la región del centro acti-
vo de la membrana en donde se localiza la ATPasa es
específicamente permeable a los iones OH^- de un la-
do de la membrana y unicamente a los iones H^+ por -
el otro lado, y al tiempo que entra agua por ese --
lado, la hidrólisis del ATP podría ser reversible--
mente acoplada a la translocación de protones a tra-
ves de la membrana con una estequiometría de un OH^-
translocado por ATP hidrolizado.

Postulados Basicos

Para poder comprender mejor la hipótesis de --
quimiosmótica es conveniente revisar los postulados
que involucra, el siguiente sumario contiene los --
postulados quimiosmóticos tal y como los concibió -
Mitchell en 1961 .

- 1.- Los sistemas de ATPasa localizados en la membrana de mitocondrias, cloroplastos, y bacterias fotosintéticas, son sistemas de hidrodeshidratación con terminales específicas para el agua y el ADP y su función normal es un acoplamiento reversible de la translocación de protones a través de la membrana, al flujo de uniones anhidras equivalentes entre el agua y el acoplamiento $ATP / (ADP + Pi)$.
- 2.- La localización en la membrana de la cadena de oxido-reducción de mitocondrias, cloroplastos y bacterias fotosintéticas, que catalizan el flujo de -- equivalentes reductores, semejantes a grupos H^+ y -- despues de electrones entre los substratos de diferente potencial de oxido-reducción, tienen como función normal acoplar la translocación de protones a través de la membrana al flujo de equivalentes re-- ductores durante la oxido-reducción.
- 3.- En la membrana de mitocondrias, cloroplastos y bacterias fotosintéticas, hay presentes sistemas de acarreadores para la difusión de substratos específicos que permiten el efectivo y reversible cambio de iones a través de la membrana y a su vez permiten la entrada de metabolitos esenciales (substratos y aceptores de fosfatos) sin colapsar el potencial de membrana.
- 4.- Los sistemas de los postulados 1,2 y 3 están localizados en un acoplamiento especial en la membra-

na que posee baja permeabilidad a protones, aniones y cationes.

Como consecuencia de estos postulados podemos observar que existen dos problemas esenciales al -- paso de moléculas polares de bajo peso molecular -- a travez de las membranas biológicas . Primero - debe existir un mecanismo que incremente específicamente la permeabilidad de la membrana al soluto --- transportado. Segundo cuando hay acumulación con tra un gradiente de concentración, la célula u orga nelo debe acoplar energía del metabolismo, a la --- translocación de soluto a travez de la membrana. - Entonces, se puede proponer que los mecanismos gene rales de transporte que resuelven estos problemas son la translocación de substrato y la translocación de grupo.

La translocación de substrato consiste en la - difusión a traves de la membrana del soluto no modi ficado químicamente por medio de la presencia en la membrana de un acarreador específico o portador . (fig II-12).

En la translocación de grupo, el caracter vec torial esencial del transporte se consigue a traves de la asociación de una enzima o grupo de enzimas - con la membrana de tal forma que el substrato se - acerca de la fase acuosa en un lado de la membrana y el producto es disociado en el otro lado (fig - II-13) .

FASE L

MEMBRANA

FASE R

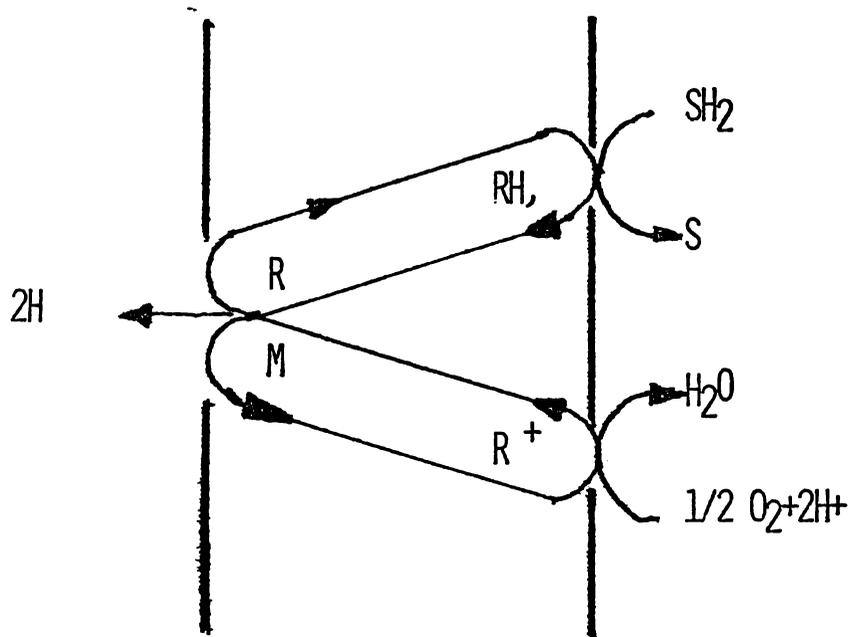


FIG. II-12 TRASLOCACION DE SUBSTRATO.

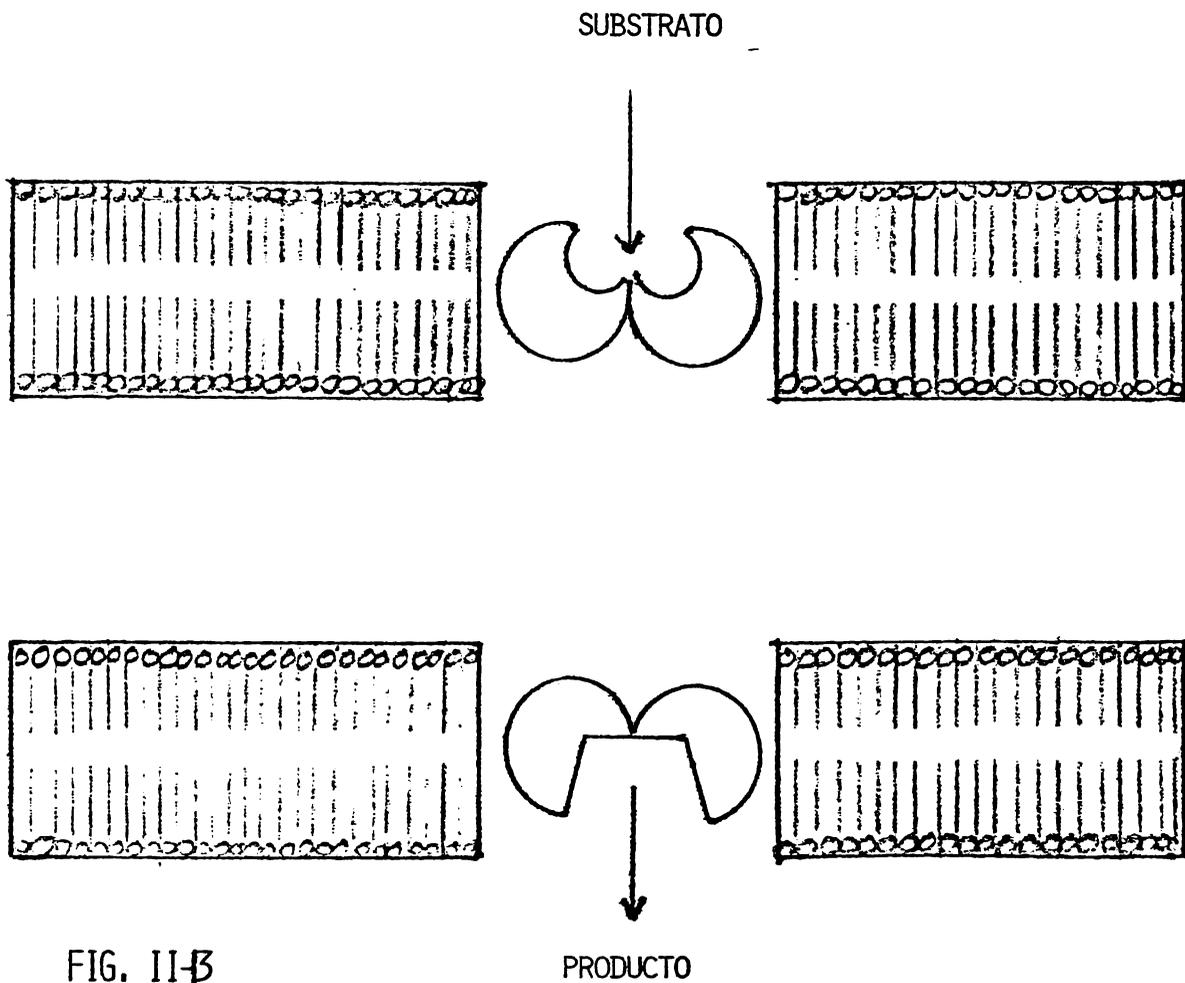
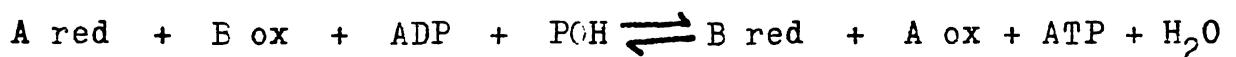


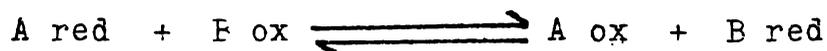
FIG. II-13

PRODUCTO

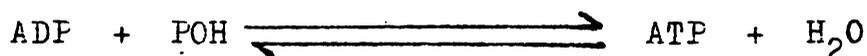
Para explicar el acoplamiento de la fosforilación del ADP al flujo de protones, Mitchell asumió que las dos reacciones que estaban espacial y químicamente separadas, esto es, que el proceso de la fosforilación oxidativa expresado como:



Puede ser separado en la reacción de oxido-reducción:



y en la reacción de hidro-deshidratación:



Y para acoplar estas reacciones Mitchell consideró que las fuerzas que conectan los movimientos de las partículas involucradas en la oxido-reducción, junto con las que participan en la deshidratación del $ADP + POH$, se comunicaban osmóticamente por el flujo cíclico de protones entre las dos fases acuosas separadas por una membrana lipídica que contiene la cadena oxido-reductora y el sistema de ATPasa. Considerando la distribución anisotrópica del sistema de ATPasa, la actividad electroquímica del agua en el centro activo ($[H_2O]_c$) para determinados puntos del equilibrio de hidrólisis

sis del sistema ATP / ADP , van a ser dados no por el producto $[H^+]_{R \text{ ó } L} \times [OH^-]_{R \text{ ó } L}$ en las fases acuosas (interna o externa), pero si por el producto -- $[H^+]_R \times [OH^-]_L$ donde [] indican las concentraciones relativas a la actividad química y R y L son las fases externa e interna respectivamente. La - relación de la actividad electroquímica ATP / ADP (incluyendo las formas iónicas), puede ser aumentada consecuentemente en la actividad de ATPasa, la - cual puede ser revertida para dar actividad de ADP fosforilasa y entonces quedaría en concordancia con la ley de acción de masas y para el equilibrio de - hidrólisis descrito, han de incluirse los siguientes elementos:

$$\frac{[ATP]}{[ADP]} = \frac{[P]}{K_I [H_2O]_c}$$

La actividad electroquímica de un componente en cierto lugar del equilibrio, define absolutamente la tendencia a escapar de las partículas de los componentes debido a la presión química y eléctrica que soportan las partículas que se hallan en este punto del equilibrio.

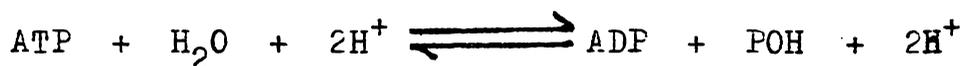
$$K_2 = \frac{[OH^-]_L \times [H^+]_L}{[H_2O]_L}$$

Donde K_2 es independiente del medio porque -

estamos usando actividades electroquímicas. Entonces podemos escribir que la actividad electroquímica del agua en el centro reactivo del sistema de ATPasa será el siguiente:

$$[H_2O]_L = [H_2O]_{aq} \times \frac{[H^+]_R}{[H^+]_L}$$

Si tomamos en cuenta que la reacción total de la ATPasa que puede ser representada por :



Entonces el equilibrio para la hidrólisis del ATP puede escribirse de la siguiente forma:

$$\frac{[ADP] \times [POH]}{[ATP]} = K [H_2O]_{aq}$$

La actividad electroquímica del agua en las fases acuosas L y R es entonces representada por $[H_2O]_{aq}$ y el producto $K [H_2O]_{aq}$ es entonces igual a la constante de hidrólisis y así se define normalmente. Cuando la reacción hidrolítica está estrictamente acoplada a la translocación de protones desde la fase R hasta la fase L, para la hidrólisis del ATP se puede emplear la siguiente representación:

$$\frac{[\text{ADP}] \times [\text{POH}]}{[\text{ATP}]} \cong K' [\text{H}_2\text{O}]_{\text{aq}} \times \frac{[\text{H}^+]_{\text{R}}^2}{[\text{H}^+]_{\text{L}}^2}$$

Suponiendo que: ADP, POH, y ATP, todos ellos participan en el equilibrio de la misma forma, cuando hay un potencial de membrana de E en milivolts (mV) entre las fases L y R, positivo en la fase L y negativo en la fase R, por definición se puede expresar de la siguiente manera:

$$\log \frac{[\text{H}^+]_{\text{L}}}{[\text{H}^+]_{\text{R}}} = p^{\text{H}}_{\text{R}} - p^{\text{H}}_{\text{L}} + \frac{\Delta E}{Z}$$

Donde $Z = 2.303 RT/F$; F es la constante de Faraday, R es la constante de los gases y E es el equivalente de energía libre que se genera en un sistema de translocación de H^+ por cadena transportadora de electrones, combinando estas últimas ecuaciones se tiene:

$$\frac{[\text{ATP}]_{\text{L}}}{[\text{ADP}]_{\text{L}} [\text{POH}]_{\text{L}}} = \left(2 p^{\text{H}}_{\text{R}} - p^{\text{H}}_{\text{L}} + \frac{\Delta E}{Z} \right) - \log K [\text{H}_2\text{O}]_{\text{aq}}$$

A 300°K , Z tiene un valor de 60 mV y la constante de hidrólisis para el ATP se halla en un valor de 5 ; si esto ocurre, entonces se puede substituir $p^{\text{H}}_{\text{R}} - p^{\text{H}}_{\text{L}}$ por Δp^{H} y puede escribirse

la ecuación como:

$$\log \frac{[\text{ATP}]_L}{[\text{ADP}]_L} \cong \text{Log } [\text{POH}]_L - 2 \Delta p^H + \frac{\Delta E}{30} - 5$$

En este caso las actividades electroquímicas del ATP, ADP \sim POH se encuentran aproximadamente en la misma fase y pueden ser equivalentes a sus concentraciones y se asume que $[\text{POH}]$ es 0.01 M, entonces :

$$\text{Log } \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}]} \cong \frac{\Delta E}{30} - 2 \Delta p^H - 7$$

La diferencia de potencial electroquímico necesario para que el equilibrio ATP / ADP acoplado y bajo estas condiciones, se expresa en mV y por lo tanto puede escribirse como:

$$\Delta E \cong 60 \Delta p^H \cong 210$$

De esta manera es posible considerar que la diferencia de potencial correspondiente a una diferencia de p^H puede escribirse como:

$$\Delta P \cong \Delta E - 60 \Delta p^H$$

Donde ΔP es la diferencia de potencial.

Es importante hacer notar que la mayor parte

de las evidencias experimentales apoyan el hecho de que p^H es un intermediario obligado en la síntesis de ATP y que además conduce a la síntesis de -- como lo demostraron Jagendorf et al (13,33,34,35,-40) .

FOTOFOSFORILACION

Como hemos visto en lo anteriormente expuesto, para la generación fotosintética del ATP no solamente se requiere la existencia de un gradiente de protones, sino además hace falta la presencia de una enzima capaz de utilizar la energía libre generada por este gradiente. Aunque el mecanismo quimiosmótico explica satisfactoriamente cómo la energía de las moléculas que se oxidan a través de moléculas transportadoras de electrones, se utiliza para formar ATP, a partir de ADP y POH, adolece de dos defectos:

Primero .- El sistema de ATPasa no se localiza en el interior de la membrana, sino que se halla localizada de manera anisotrópica y hacia el exterior de la membrana del tilacoide, aunque hay que hacer la aclaración de que la distribución anisotrópica se presenta no por la ATPasa sola, sino por el complejo Fo-ATPasa, en donde el complejo Fo se va a encontrar completamente embebido en la membrana y es entonces este complejo el que presente la caracte

terística de selectividad a los iones que pasan de uno u otro lado de la membrana y los llevará hasta el centro de reacción de dicha ATPasa.

Segundo No explica cuales son los eventos moleculares responsables de la síntesis de ATP.

Pullman et al, solubilizaron una ATPasa de - mitocondrias la cual era capaz de restaurar la actividad de ATPasa en partículas submitocondriales deficientes de ATPasa y esta ATPasa recibió el -- nombre de F_I .

Por otro lado, Jagendorf & Smith, fueron los primeros en encontrar que la fotofosforilación se desacoplaba cuando los tilacoides eran tratados - con soluciones diluidas de A D T A. Posteriormente Avron mostró que si agregaban poco después los extractos de E D T A a los tilacoides tratados, - entonces se restauraba parcialmente la fotofosforilación (6). Más tarde Mc Carty & Racker encontraron que esta proteína a la que Avron había llamado factor de acoplamiento 1 , era idéntica a la F_I de la mitocondria; además halló que las - preparaciones de CF_I (coupling factor I) eran dependientes de calcio y con el uso de antisueros específicos se inhibía fuertemente la actividad de ATPasa y la fotofosforilación; entonces era - evidente que CF_I jugaba un papel esencial en la fotofosforilación.

CF_I comprende aproximadamente el 10 % de las proteínas de la membrana del tilacoide y es una gran proteína de peso molecular de (325 000 daltons), presenta una forma esférica, la cual fue evidenciada al microscopio electrónico (fig II-14).

Con la ayuda de técnicas de electroforesis - en geles de poliacrilamida, fue posible descubrir que esta proteína esta compuesta por varias subunidades (7), generalmente se acepta que CF_I está formada por 5 subunidades polipeptídicas las cuales son nombradas de la α a la ϵ en orden decreciente de su masa molecular, sin embargo la estequiometría de estas subunidades aun se encuentra en controversia y se han reportado las siguientes estequiometrías: $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon$, $\alpha_2 \beta_2 \gamma_2 \delta \epsilon$, -- $\alpha_2 \beta_2 \gamma_2 \delta_{1-2} \epsilon_2$ y $\alpha_2 \beta_2 \gamma \delta \epsilon_2$. -

Por otro lado Fairb & Hammes dedujeron una estequiometría mínima de $\alpha_2 \beta_2 \gamma \delta \epsilon_2$ misma que fue encontrada por técnicas de dicroísmo circular por lo que se considera que esta es la estequiometría - existente en CF_I .

El contenido de sulfhidrilos en las subunidades de CF_I tampoco es consistente con la estequiometría 2:2:1:1:2.

Farron & Racker detectaron de 12 a 13 cisteínas por mol de CF_I y si asumimos la estequiometría

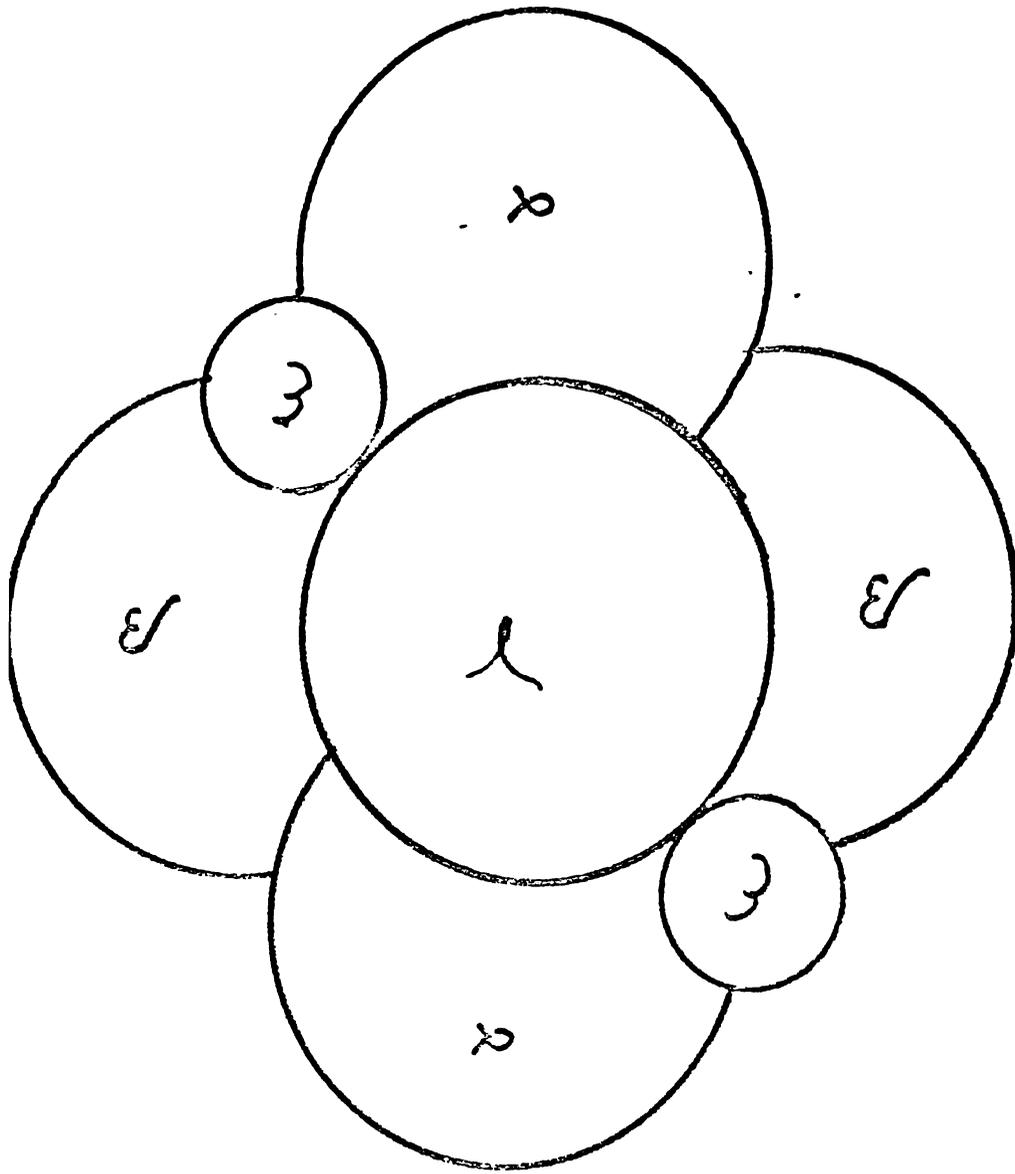


FIGURA 11-14

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA MOLECULA DE CF₁

2 : 2 : I : I : 2, entonces tiene que haber 14 cisteinas por mol de CF_I .

Considerando que CF_I está formado por 5 subunidades polipeptídicas, se estudió más a fondo cada una de estas y sus probables propiedades son :

SUBUNIDAD α

- masa molecular 59 000 - 61 000
- probable estequiometría (2)
- contenido de cisteína en % (2)
- se ha sugerido que tiene una función reguladora.

SUBUNIDAD β

- masa molecular 54 000 - 57 000
- probable estequiometría (2)
- contenido de cisteína en % (2)
- En cuanto a su función, existen evidencias indirectas de que esta es la subunidad catalítica. - Cantley et al han indicado la presencia de dos sitios de unión de nucleótidos en CF_I y estos sitios tienen la propiedad de unir : AMP , ADP , PNP , - ϵ ADP, ϵ AMP en presencia de Mg^{+2} .

Por otro lado, Nabeđryk et al , por medio de estudios de intercambio hidrógeno-deuterio, que son métodos altamente sensibles para analizar cambios -

estructurales, compararon la interacción de CF_I - con diferentes nucleótidos (AMP, ADP, ξ ATP y ξ ADP) y encontraron que estos se unían en 3 sitios diferentes, después de la fijación de ATP δ - ADP en el primer sitio de unión encontraron que los peptidos cambiados se encontraban en las subunidades β y ξ , sin embargo debido a las discrepancias existentes en la literatura, no es posible sacar una conclusión acertada (9, 38).

SUBUNIDAD γ

- masa molecular 34 000 - 39 000
- probable estequiometría (1)
- contenida de cisteína en $\%$ (3 - 6)
- Se ha observado que la utilización de suero anti-subunidad γ , junto con suero anti α , inhibe la actividad de ATPasa, lo cual puede sugerir que la subunidad γ puede inducir una conformación favorable en los cambios de CF_I , otra observación importante es que los N-derivados de maleimida, inhiben la fotofosforilación por reacción específica con la subunidad γ y se ha dicho que la maleimida bifuncional o-Fenilendimaleimida, entrecruza dos grupos -SH de la misma subunidad y se ha postulado que este entrecruzamiento modifica la estructura de la enzima cambiando la permeabilidad de la membrana;

sin embargo estos datos experimentales no son capaces de explicar porqué cuando se usan nucleotidos en los marcajes con maleimidas tales como ATP, ADP etc, se revierte el efecto de estos reactivos, puesto que en último caso, esto sugeriría que hay interacción con la subunidad catalítica; además, otro dato muy importante es que las maleimidas bifuncionales tambien inhiben la bomba de protones, lo que entonces tambien hace pensar que esta inhibición - se deba al abatimiento de Δp^H y no a una acción - directa sobre CF_I . En conclusión, si hay interacción con la bomba de protones y reversión de su -- efecto inhibitor en presencia de nucleotidos, no - es posible afirmar que δ tiene forzosamente un papel regulador del flujo de protones hasta el sitio catalítico de la enzima.

SUBUNIDAD δ

- masa molecular 17 000 - 20 000
- probable estequiometría (I)
- contenido de cisteína en % (I)
- En cuanto a su función, Nelson N (39), demostró que cuando se quitaban las moléculas de CF_I de la membrana del tilacoide y posteriormente se quitaba la subunidad δ , estas moléculas no eran capaces de restaurar la fotofosforilación, pero si se agre

gaba a esta mezcla una preparación enriquecida de subunidad δ , se observaba la restauración de la fotofosforilación, lo que llevó a la conclusión - de que la subunidad δ es la responsable del enlace entre la membrana y CF_I . Posteriores estudios empleando anticuerpos contra δ , confirmaron que δ era la subunidad responsable de la unión entre CF_I y la membrana (17,39).

SUBUNIDAD ϵ

- masa molecular 13 000 - 15 700
- probable estequiometría (2)
- contenido de cisteína en % (I)
- De su función se ha sugerido que va a servir como un inhibidor de la actividad de ATPasa.

Para la generación de ATP se requiere no solamente el enlace de la membrana con CF_I , sino que también es necesaria la integridad de los grupos -sulfhidrilo presentes en CF_I , lo cual fue comprobado por Vallejos y Andréo, quienes probaron que el reactivo específico de grupos -SH 2,2'-ditiobis(-5-nitropiridina) (DTNP), inhibía la fotofosforilación cuando los cloroplastos eran preincubados con este reactivo en la luz, inhibición que se --

podía prevenir con DTT (ditiotreititol), ADP + Pi y algunos desacoplantes, además DTNP inhibía el transporte de electrones basal y acoplado a la síntesis de ATP pero no cuando se desacoplaba es te previamente, posteriores estudios con o-lodo-benzoato, que también es un reactivo específico para oxidar grupos -SH; mostraron que este reactivo inhibe la síntesis de ATP y el transporte de electrones acoplado, esto indica que es necesaria la integridad de los grupos -SH para que se lleve a cabo la fotofosforilación, lo cual puede deberse, bien a que la reacción catalítica este intima mente involucrada con estos grupos ó como sugieren Vallejós et al, que los grupos -SH de la subunidad catalítica así como los de γ de alguna manera son capaces de conservar la energía en la molécula de CF_1 (3,47), sea cual sea la función de estos grupos -SH en la fotofosforilación, es algo que aun no se ha aclarado completamente.

Tomando en cuenta los antecedentes expuestos anteriormente, es posible concluir que CF_1 es la única parte del aparato fotosintético que acopla el flujo de protones proveniente del interior de la membrana del tilacoide a la síntesis de ATP. - Esto indica entonces, que CF_1 es la enzima responsable de la síntesis de ATP, pero también son necesarios otros factores hidrofóticos para esta-

bilizar el enlace de CF_I con la membrana del tilacoide, que es la fuente desde donde se va a permitir el flujo de protones a través de la membrana del tilacoide, con el CF_I y al mismo tiempo se encuentra en la membrana el complejo protéico llamado F_o , que unido con CF_I va a formar el complejo llamado F_o-CF_I o complejo de ATPasa (fig II-15)

Estos componentes de la membrana, son hidrofóbicos y constituyen el conjunto de proteínas que se sabe se encuentra dentro de la membrana y que probablemente la atraviesa y algo muy importante es que presenta una distribución anisotrópica. - A este complejo en su conjunto se le conce como complejo CF_I-F_o .

Esto quiere decir entonces, que F_o va a catalizar la transferencia transmembrana de protones, fenómeno que demostró Gould, en sus experimentos con trifenilestaño al demostrar que este compuesto podía restaurar la bomba de protones en cloroplastos a los que previamente se les había quitado CF_I (15) .

Los posibles mecanismos de la fosforilación que tiene lugar en el complejo CF_I-F_o , pueden separarse en dos categorías que son: directa e indirecta.

En el mecanismo directo, se une primero un ion fosfato y el ADP a la parte CF_I del complejo

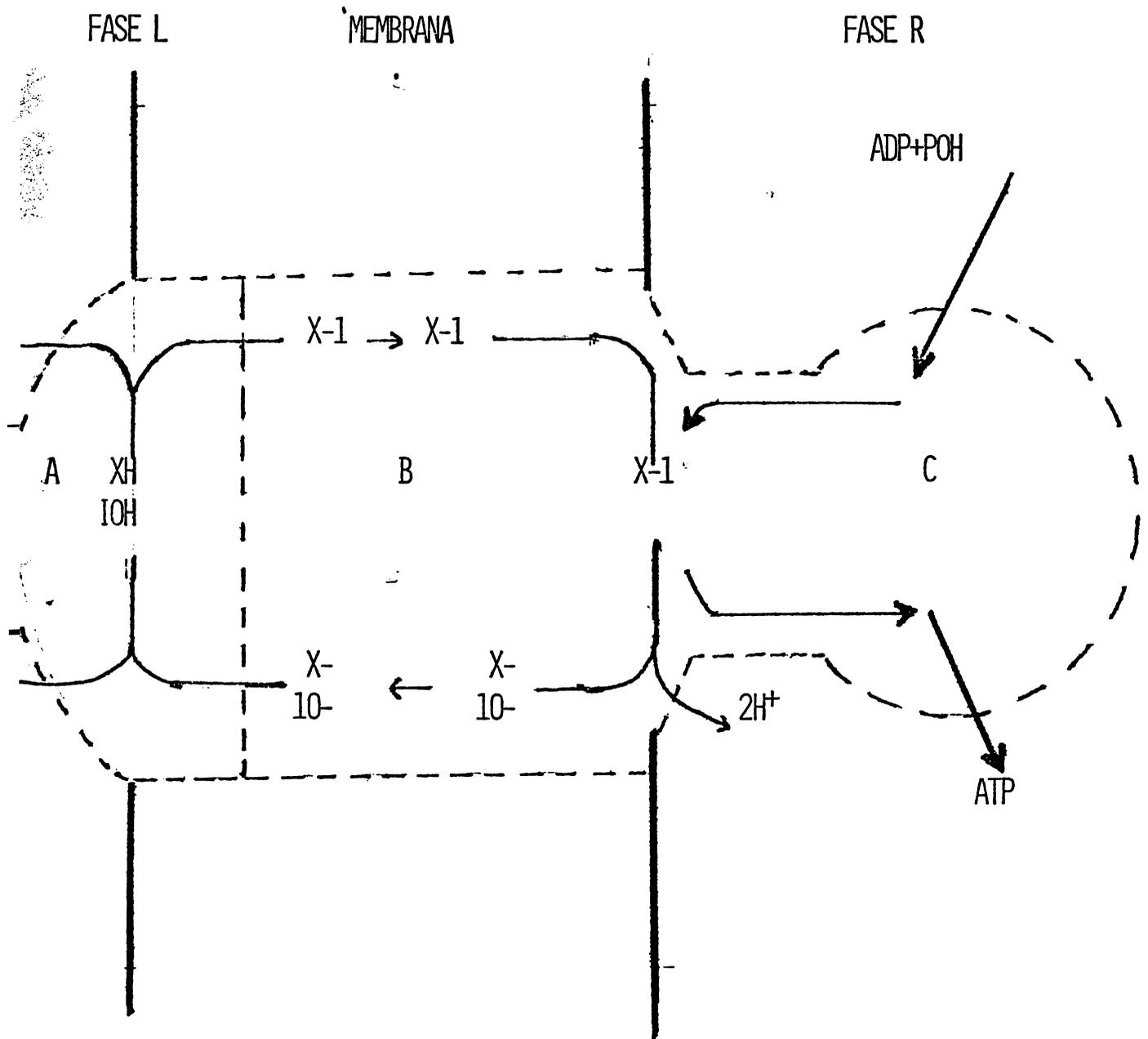


FIG. 15

DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA ATP_{ASA} ANISOTROPICA REVERSIBLE, EN DONDE SE INVOLUCRA LA NECESIDAD DE UN COMPLEJO DE PROTEINAS DE MEMBRANA.

enzimático. Los protones se trasladan a través de un canal de la parte Fo y atacan entonces a uno de los oxígenos del fosfato, que es separado para formar una molécula de agua. Finalmente un oxígeno del ADP ataca a la molécula de fosfato para formar una molécula de ATP y la molécula de ATP - entonces se separa de la enzima.

En el caso del mecanismo indirecto, hay toda una variedad de mecanismos indirectos, aunque el más probable puede ser, que en el locus activo de la enzima, podría ser que el ATP y el fosfato inorgánico se combinaran espontáneamente sin la adición de energía libre. La molécula de ATP resultante, quedaría entonces firmemente unida a la enzima y sería necesario aplicar energía para liberarla. La energía podrían suministrarla los protones uniéndose a la enzima en una porción distinta del locus activo provocando un cambio conformacional en la enzima, a este respecto Boyer et al propusieron una hipótesis de acoplamiento conformacional en la cual se sugiere que para que se lleve a cabo el cambio conformacional que implica un cambio específico para la actividad de ATPasa de la enzima y otro diferente para la síntesis de ATP y que este cambio conformacional era indispensable, sin embargo este modelo no indica de que manera se obtendría la energía necesaria para

llevar a cabo estas reacciones (8) (fig II-16).

Mc Carty & Fagan, demostraron que el mecanismo de la fosforilación más probable es el segundo, al demostrar la inhibición irreversible (dependiente de la luz) de la fotofosforilación y la actividad de ATPasa por NEM (N-etilmaleimida) demostrando que la luz provoca cambios conformacionales en CF_1 , dejando al descubierto los grupos reactivos (grupos -SH) para que pudieran reaccionar con NEM produciéndose así una inhibición que no se manifiesta cuando se agrega NEM en la oscuridad (22,29). Esto -- entonces confirma la hipótesis de Foyer, ya que demuestra la existencia de un cambio conformacional, aunque no en sus términos, pues este cambio conformacional está condicionado al flujo de protones a través de F_0 .

Ahora que hemos considerado todas las reacciones de los procesos luminosos de la fotosíntesis, podemos pensar en un esquema general que nos muestre el flujo de electrones acoplado a la formación de ATP, que además este en concordancia con la hipótesis de Mitchell, entre el sistema de transporte de electrones el cual se halla separado en la membrana del sistema anisotrópico de ATPasa tal y como se le considere en la actualidad (fig II-17).

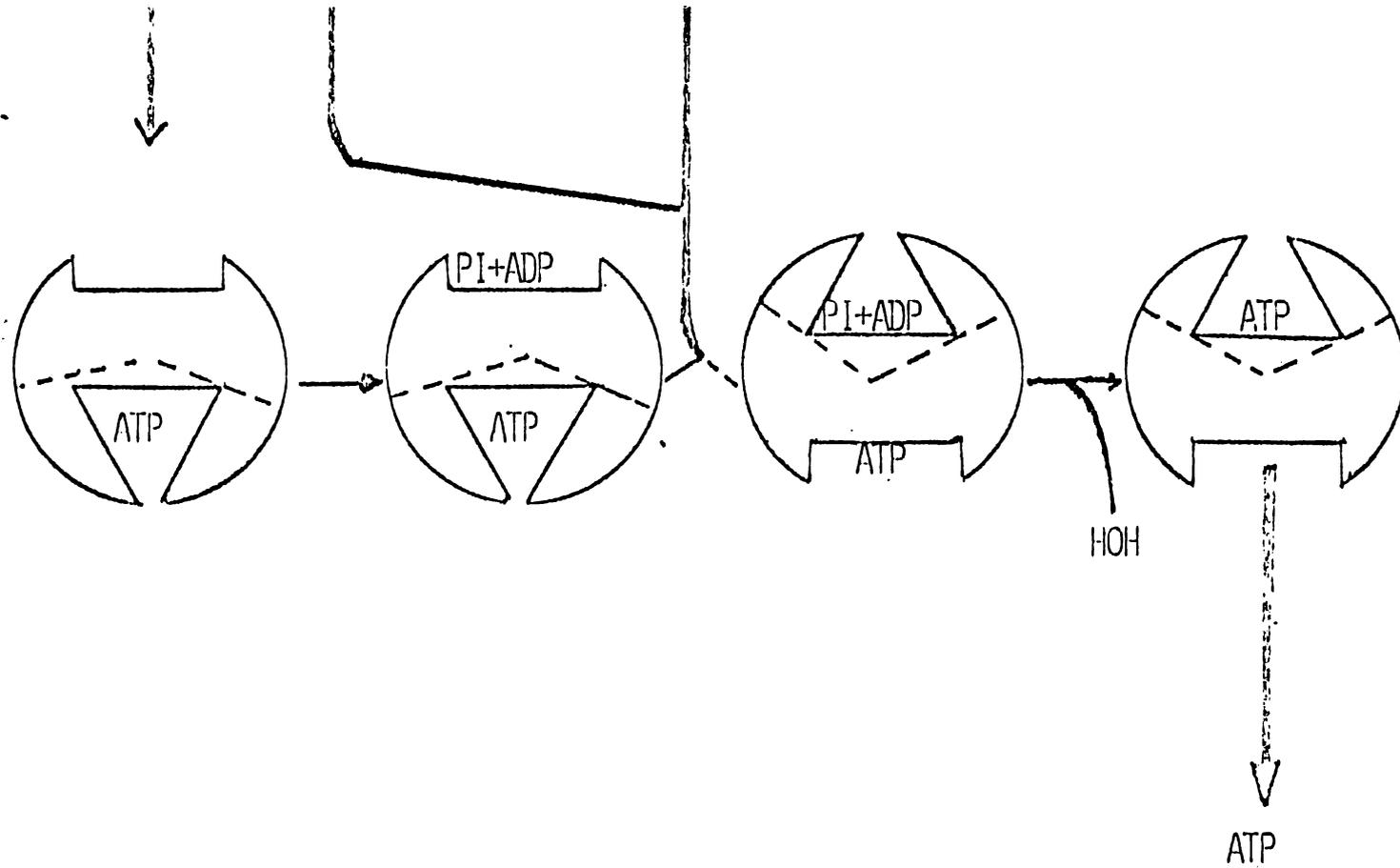


FIGURA 11-16

MECANISMO DE ACOPLAMIENTO CONFORMACIONAL COMO LO POSTULO BOYER

EN 1977

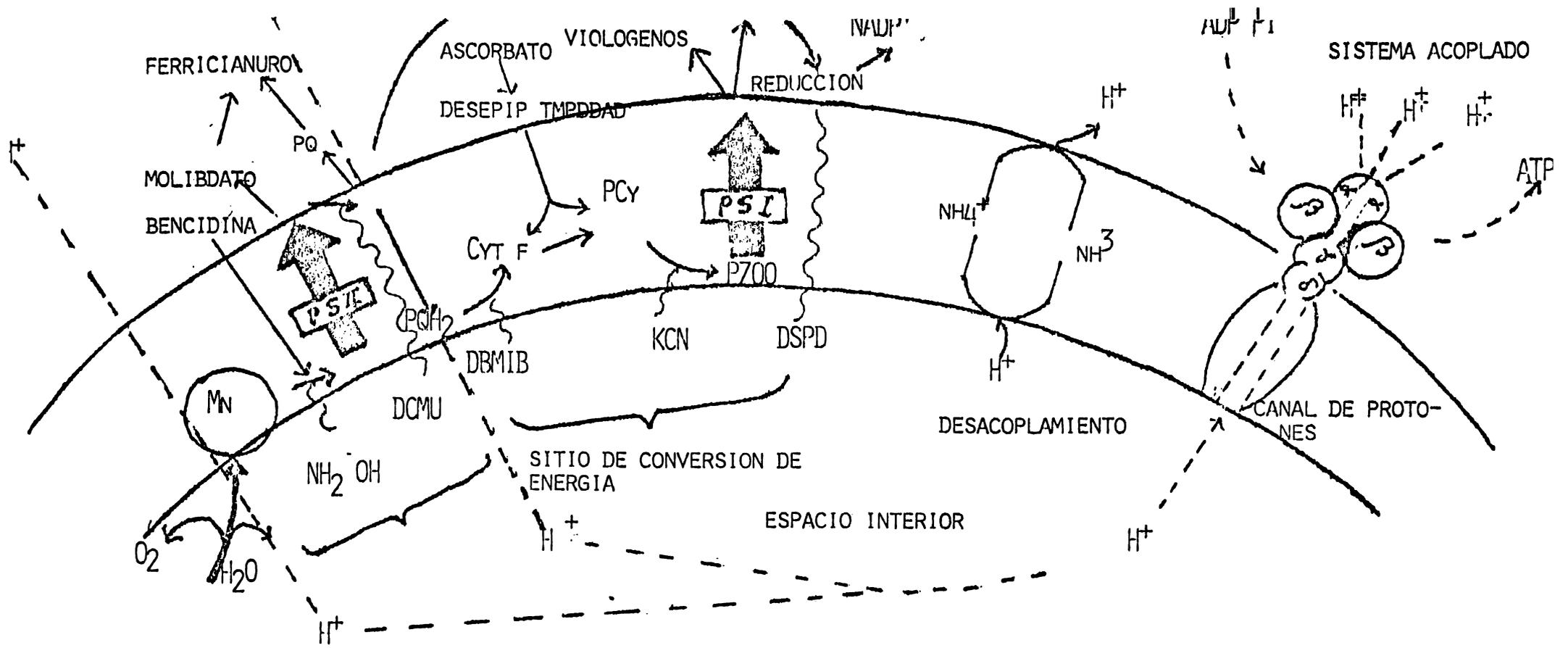


FIG 11-17

ESQUEMA GENERAL DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES FOTOSINTETICOACOPLADO A LA SINTESIS DE ATP, DE ACUERDO CON EL MECANISMO QUIMIOSMOTICO PARA EL ACOPLAMIENTO DEL FLUJO DE ELECTRONES CON LA FOTOFOSFORILACION LOS CUALES SE HAYAN FISICAMENTE SEPARADOS EN LA MEMBRANA

Finalmente es necesario hacer notar que a pesar de todo lo que se conoce sobre CF_1 , hay muchas cosas aun desconocidas y las preguntas a contestar en los proximos años serán fundamentalmente las siguientes:

- 1.- ¿ Cual o cuales son los componentes responsables de captar el potencial electroquimico y como funcionan estos componentes?
- 2.- ¿ Cómo interactúan molecularmente el componente catalítico, con el componente que transfiere la energia del potencial, así como el conocer el mecanismo por medio del cual se previenen fugas de energia en el sistema?
- 3.- ¿ Como detecta el componente catalítico el potencial quimico del sistema y cual es la función del H^+ ?
- 4.- ¿ Cual es el mecanismo de la sintesis de ATF a nivel del componente catalítico? y ¿ Qué implican los sitios reguladores del sitio catalítico ?



M A L E I M I D A S

Se ha establecido que los cloroplastos in vi-
tro e in situ , así como las partículas subcloro--
plásticas, sufren cambios conformacionales cuando
son iluminadas y como ya fue mencionado anteriormente
te, estos cambios están involucrados en la sinte--
sis de ATP. Estos cambios han sido observados --
por diferentes métodos, por ejemplo se ha demostrado
do que el tamaño medio de las partículas cloroplásti
ticas aumenta durante la iluminación y también se
ha observado contracción en otras condiciones. -
La contracción es reversible en oscuridad, pero -
el hinchamiento en ciertas condiciones no lo es. -
Además se ha descubierto que la membrana de los til
lacoides es más reactiva a ciertos productos cuando
do las reacciones se hacen en la luz, que cuando -
las reacciones se hacen en la oscuridad.

Uno de los métodos más prometedores para estudiar los cambios conformacionales de las membranas es la modificación química de grupos -SH (con N-derivados de maleimida), ya que estos estudios han sido encaminados a encontrar cual o cuales son los componentes que cambian su conformación estructural al verse afectados por la luz (40,41).

El primer trabajo que se reporta con el uso de N-derivados de maleimida como reactivos de modificación química, es el trabajo de Mc Carty et al, quienes demostraron que cuando se trataban cloroplastos con 1 mM de NEM en la luz pero no en la obscuridad, daba como consecuencia una parcial y permanente inhibición de la fotofosforilación así como una inhibición del transporte de electrones no cíclico en condiciones fosforilantes. Esto sugiere entonces que la luz produce un cambio conformacional que trae como consecuencia la exposición de los grupos -SH ó grupos que reaccionan con NEM. Posteriormente estos mismos autores, incubando moléculas de CF_1 aisladas en presencia de [3H] NEM y posteriormente desnaturalizando la proteína para obtener sus diferentes subunidades, corrieron una electroforesis de estas subunidades en un gel de poliacrilamida - SDS para poder separar dichas subunidades, y encontraron que [3H] NEM se hallaba casi en su totalidad en la banda correspondiente a

la subunidad γ , lo que demostraba que NEM actuaba específicamente en la subunidad γ de CF_I . Entonces esto indicaba que los grupos -SH de esta subunidad estaban involucrados en el proceso de fotofosforilación y algo más importante aun es que esto probaba que era necesario un cambio conformacional para que se llevara a cabo la síntesis de ATP, y al mismo tiempo probaba que NEM no afectaba a la bomba de protones.

Magnuson y Mc Carty, siguieron explotando la reacción de NEM con CF_I , el estudiar las interacciones del enlace membrana enzima con nucleótidos y encontraron que cuando se incubaban cloroplastos con 1 mM de NEM y bajas concentraciones de nucleótidos tales como ADP o ATP, se produce un fenómeno de protección de la inhibición de la fotofosforilación por NEM y entonces concluyeron que CF_I contenía múltiples sitios que podían reaccionar con los nucleótidos y que uno de esos sitios era la subunidad γ .

Esto quiere decir que γ tiene sitios para - - o que la interacción de las subunidades $\gamma-\beta$ induce a exponer grupos -SH que se protegen en la obscuridad, y también concluyeron que tanto ATP como ADP pueden modificar a CF_I en la luz (29,30,44).

Debido a que estos reactivos eran altamente específicos a los grupos -SH de CF_I , entonces se pensó en la posibilidad de que estos reactivos también

podían servir como reactivos de entrecruzamiento - (lo cual se logra preparando N-derivados bifuncionales de maleimida). El uso de reactivos de entrecruzamiento, es un método sumamente útil para localizar las proteínas involucradas en los cambios conformacionales que sufre la membrana y aun más - que papel desempeñan en las funciones biológicas, lo que entonces nos daría una idea de la estructura de la proteína. Aunque los detalles que se obtienen con la ayuda de técnicas espectroscópicas - son mucho mejores, estas últimas, no se pueden usar en este intervalo de dimensiones.

Weibs y Mc Carty encontraron en 1977 que la - maleimida bifuncional o-Fenilendimaleimida (OPDM) (fig III-1) inhibía la fotofosforilación en cloroplastos de espinaca (Spinacea oleracea) a concentraciones a bajo de 100 U M lo que quiere decir que es unas 500 veces más efectiva que NEM.

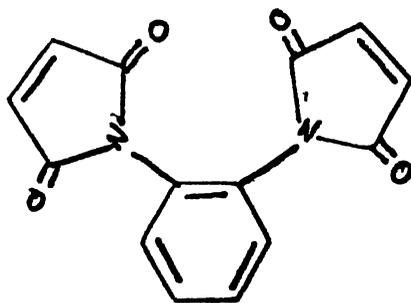
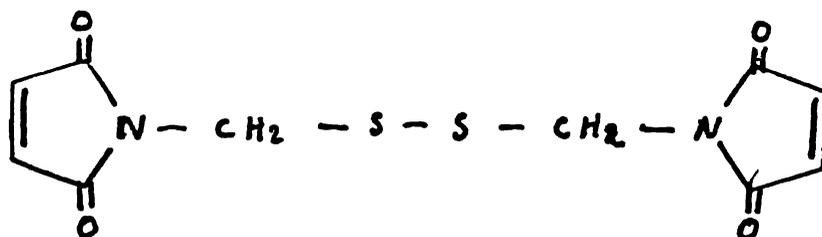


Figura III-1 ESTRUCTURA DE o-FENILENDIMALEIMIDA

Por otro lado los tilacoides tratados con OPDM mostraron un decremento en la bomba de protones y este decremento era restaurado por N,N-diciclohexil carbodiimida. Además observaron que ^{14}C OPDM era incorporada en las subunidades γ y ϵ del CF_1 , -- tanto en la luz como en la obscuridad y entonces es muy posible que OPDM reaccione con un grupo -SH de la subunidad γ accesible en la obscuridad y la -- otra función maleimida restante reaccionar con un -- grupo -SH de γ expuesto en la luz, lo que da un -- entrecruzamiento entre dos grupos -SH de γ (9).

Estos mismos autores en 1979 trabajaron con -- otra maleimida bifuncional, Ditiobis-N-etilmaleimida (DTEM), (fig III-2), encontrando que esta -- tambien era un potente inhibidor de la sintesis de ATP en cloroplastos y que además tambien era un potente inhibidor de la bomba de protones.

Figura III-2



ESTRUCTURA DE DITIOBIS-N-ETILMALEIMIDA

Sin embargo cuando se hidrolizaba el puente -

disulfuro que tienen las moléculas de DTEM unidas a tilacoides y luego se volvía a medir la fotofosforilación, se encontró que su efecto ahora era como el de una maleimida monofuncional del tipo NEM, o sea que inhibe la transferencia de energía pero ya no a la bomba de protones, y entonces interpretaron estos datos de la siguiente manera: La subunidad de CF_I contiene dos sitios reactivos para maleimida uno expuesto y otro embebido en la membrana o en la proteína, de tal manera que cuando se incuban los tilacoides en la luz con DTEM, una de las funciones maleimida se pega al grupo -SH expuesto en la obscuridad y la otra función maleimida se une al grupo -SH que se va a exponer como consecuencia de un cambio conformacional inducido por la luz, lo que se traduce en una inhibición de la fotofosforilación, que cuando se hidroliza el puente disulfuro de la maleimida, va ser revertida parcialmente esta inhibición y entonces su inhibición es similar a la obtenida con NEM (fig III-3).

A este respecto es interesante hacer notar que CPDM y DTEM son dos compuestos que tienen una diferente longitud entre sus centros reactivos (fig III-4), que hace poco probable que estas dos maleimidias se esten uniendo a los mismos grupos -SH, e incluso es factible que se esten uniendo a dos diferentes subunidades y no unicamente a una. Además,

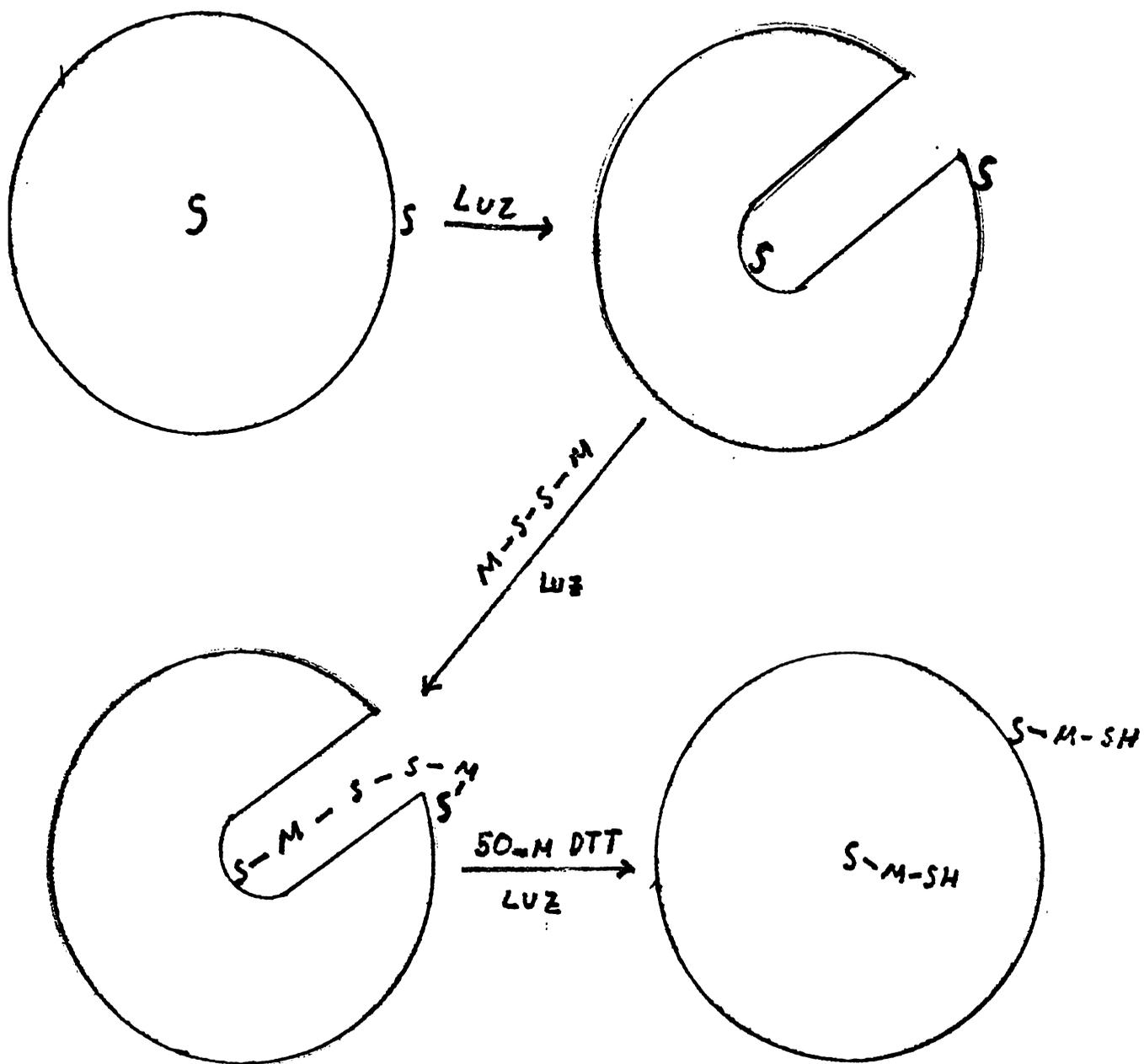


Figura 111-3

INTERPRETACION DE McCARTY SOBRE LA INHIBICION DE LA
 FOTOFOSFORILACION POR DTEM

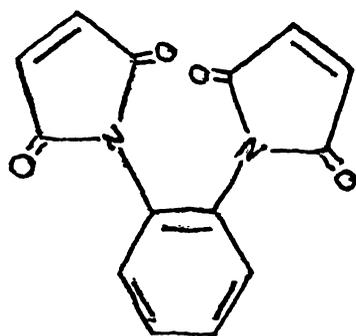
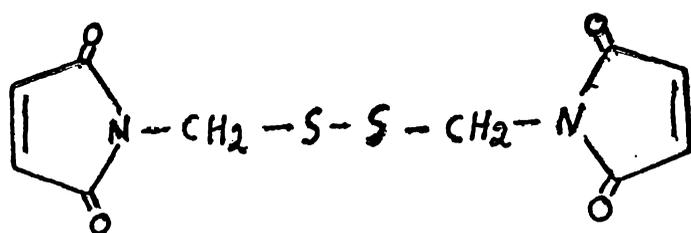


Figura 111-4

DISTANCIAS RELATIVAS EXISTENTES ENTRE LOS NUCLEOS REACTIVOS
DE DTEM Y o - FENILENDIMALEIMIDA

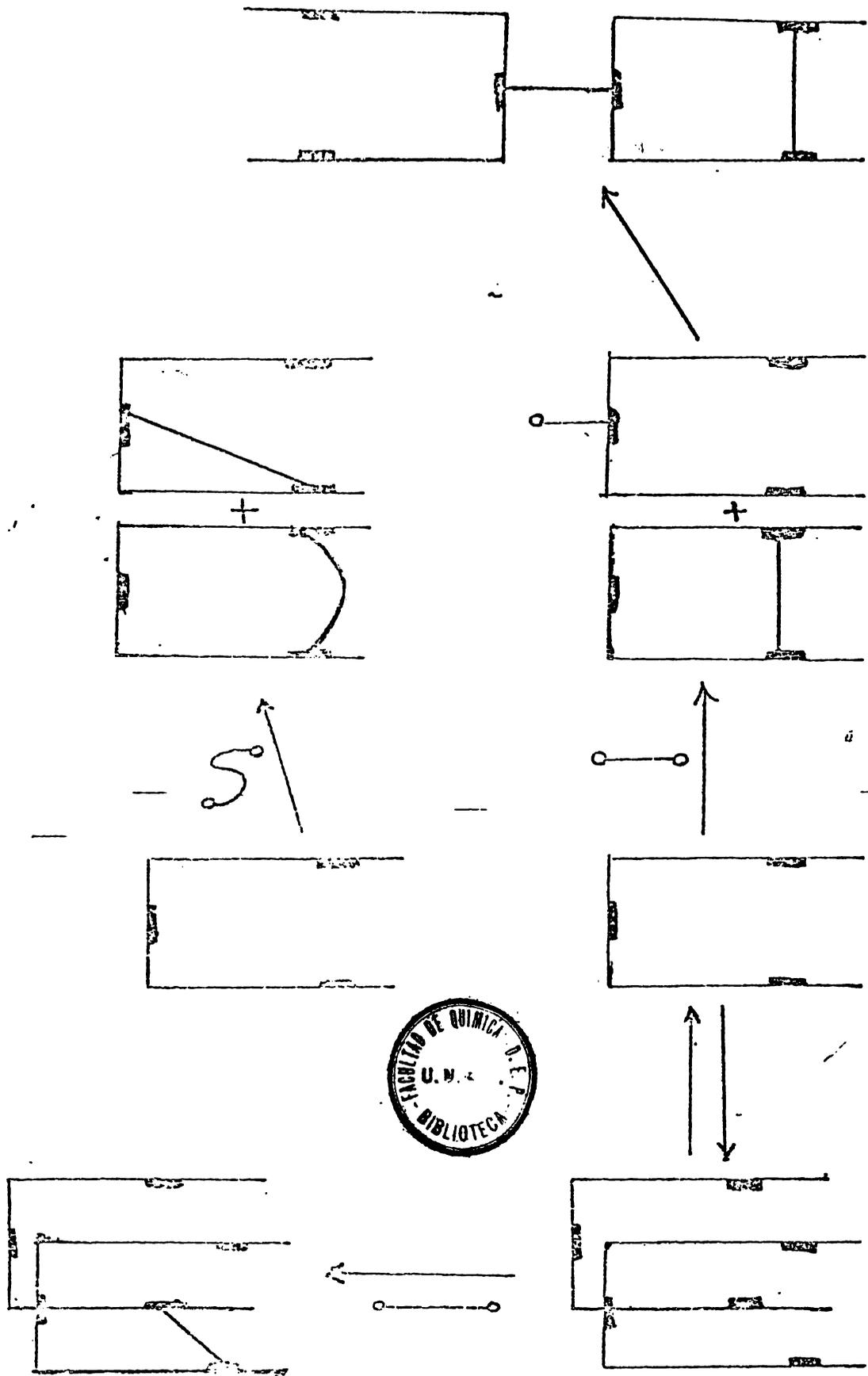


Figura 111-5

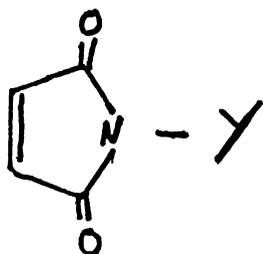
POSIBLES ENTRECRUZAMIENTOS QUE PUEDEN SUCEDER AL AZAR CUANDO SE USAN MOLECULAS BIFUNCIONALES.

uno de los problemas más importantes del uso de reactivos de entrecruzamiento en estudios de membranas, es el hecho de que el entrecruzamiento -- ocurra frecuentemente de manera azarosa (fig III-5).

Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto y dada la importancia de las maleimidias bifuncionales como reactivos de entrecruzamiento para la localización de los grupos -SH responsables de la -- síntesis de ATP, se decidió llevar a cabo la síntesis de diferentes maleimidias bifuncionales que difieren únicamente en la longitud de la cadena hidrocarbonada, que separa las funciones maleimida, lo que da la posibilidad de obtener diferentes entrecruzamientos que van a depender de la distancia -- existente entre las funciones maleimida y esto entonces abre la posibilidad de poder localizar la -- distancia existente entre los grupos -SH responsables de la síntesis de ATP, así como saber si únicamente se hallan en una subunidad o se encuentran distribuidos en dos o más de ellas.

SÍNTESIS DE MALEIMIDAS

Las maleimidias N substituidas son compuestos de fórmula general :



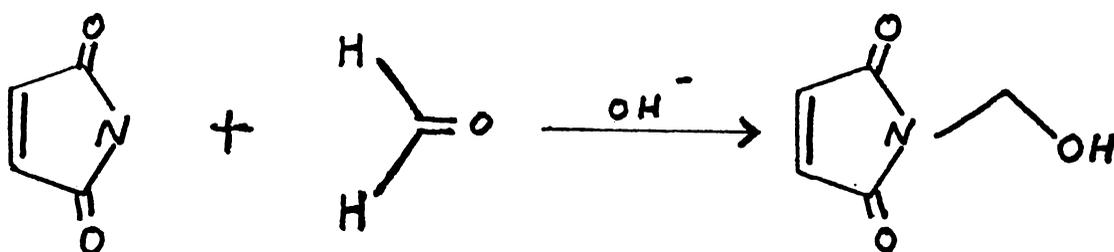
y la más sencilla de todas es la maleimida - -
 (1-N-pirrol-2,5-diona, y,y = H) cuya preparación
 data de 1904 en que plancher y Cattadori la obtuvier
 ron a partir de la oxidación del pirrol con ácido -
 crómico. Más tarde Ferson y Swiller prepararon la
 maleimida por medio de la formación del aducto furan
 o-anhídrido maleico.

Considerando la química de las maleimidias, se
 sabe que existen dos sitios reactivos en el anillo.
 La función carboxiimida y la doble ligadura, cada -
 una de las cuales tiene influencia sobre la reactivi-
 dad de la otra, causando que la maleimida sea un
 poco diferente a la carboxiimida de tipo cíclico u
 olefina cíclica. Aprovechando las ventajas de la
 función carboxiimida, se prepararon los derivados -
 N-sustituídos tanto monofuncionales como bifuncion
 ales (reactivos que fueron preparados por Patricia
 García y Ana Luisa Silva en el departamento de quí-
 mica Orgánica de la D E F G de la Facultad De Químic
 a) que más tarde serían usados como reactivos de
 entrecruzamiento.

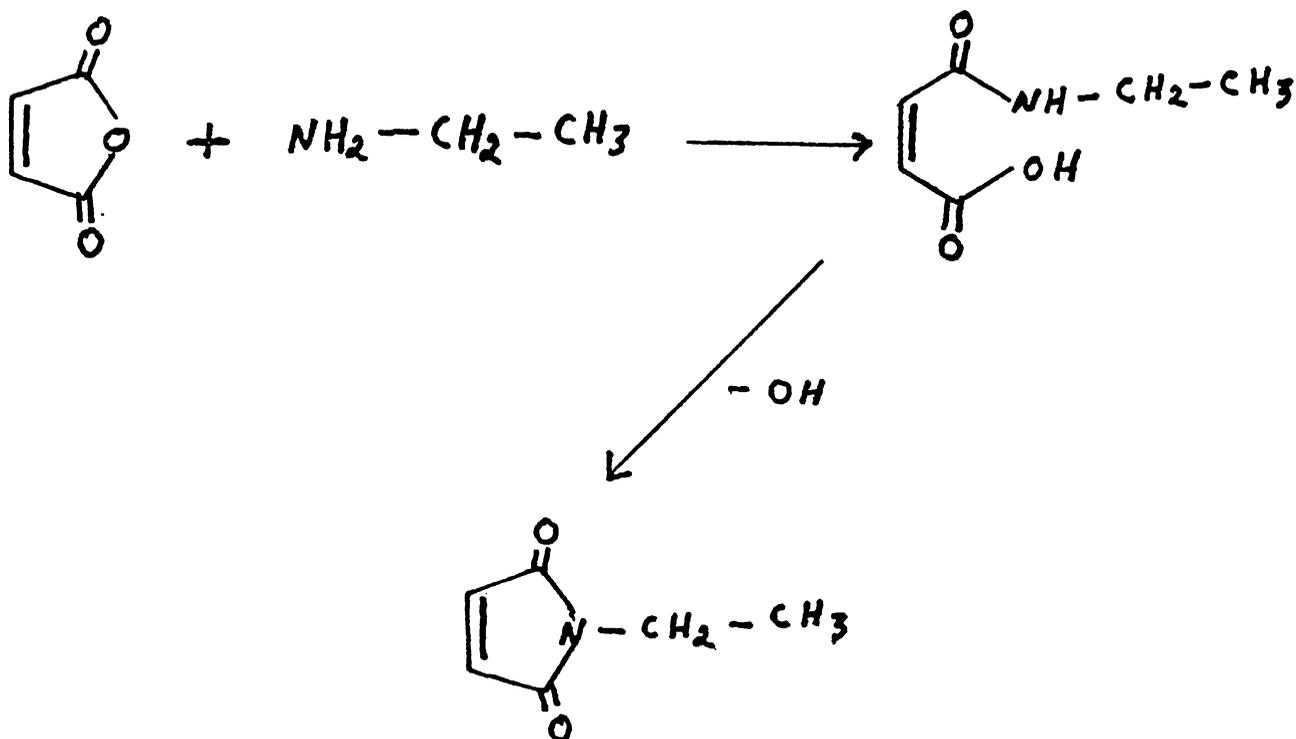
Los derivados N-sustituídos que fueron prepar

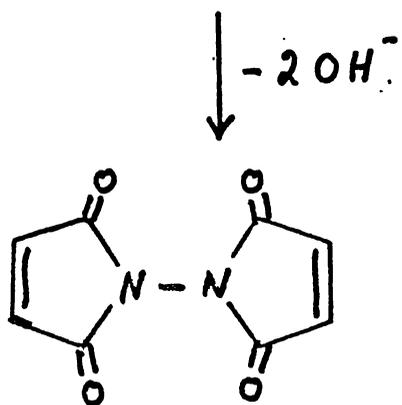
rados son los siguientes:

N-metilolmaleimida, la cual fue preparada a partir de maleimida y formaldehído al 40 % por medio de catálisis básica según la siguiente reacción:

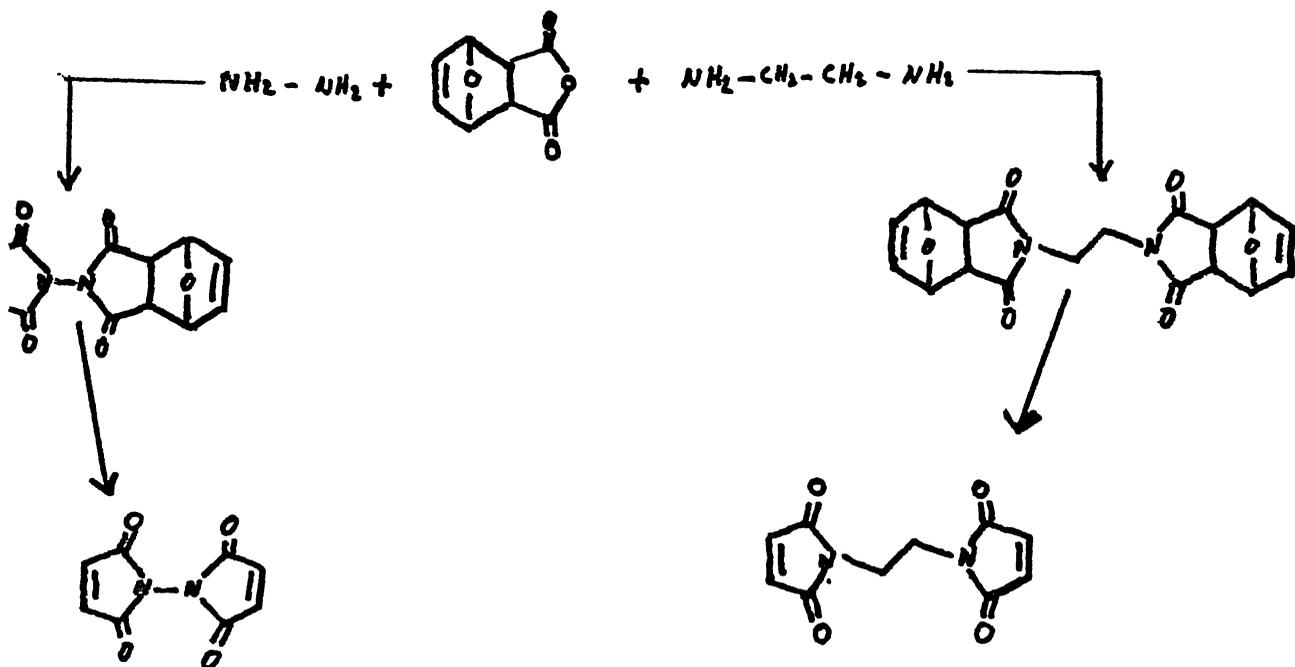


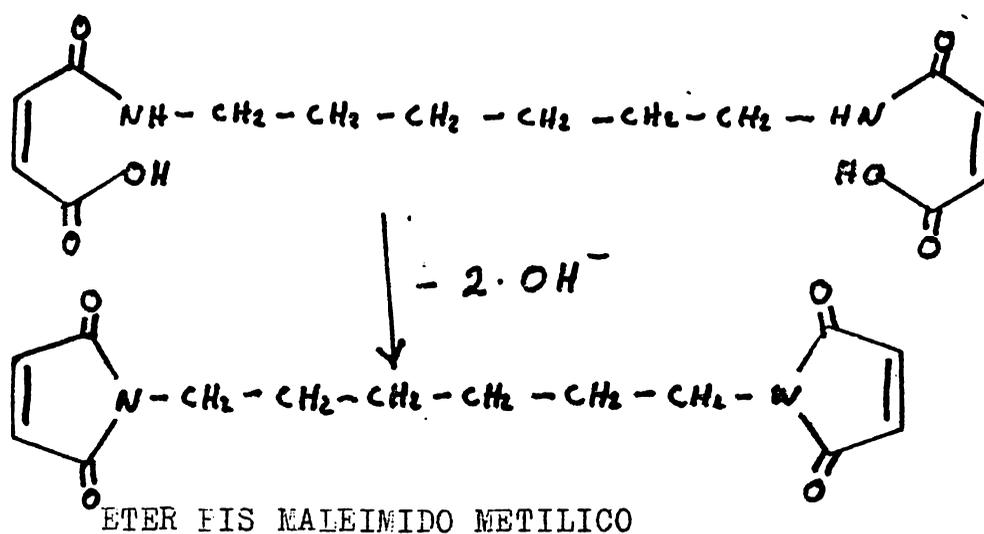
N-etilmaleimida





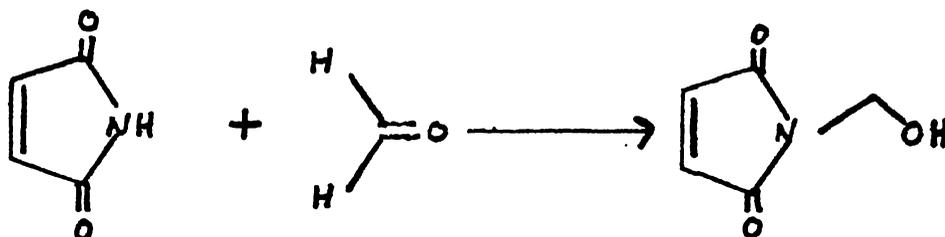
El segundo método consiste en la obtención del anhídrido 3,6-endoxo-1,2,3,6-tetrahidroftálico a partir de furano más anhídrido maleico, la cual es una reacción de Diels Alder, el anhídrido así obtenido se disuelve en ácido acético glacial y se le adiciona, en el caso de la obtención de EEM la etilamina y en el caso de la BM el hidrato de hidrazina y finalmente se efectúa una pirólisis de los aductos para obtener las maleimidias según las siguientes reacciones:



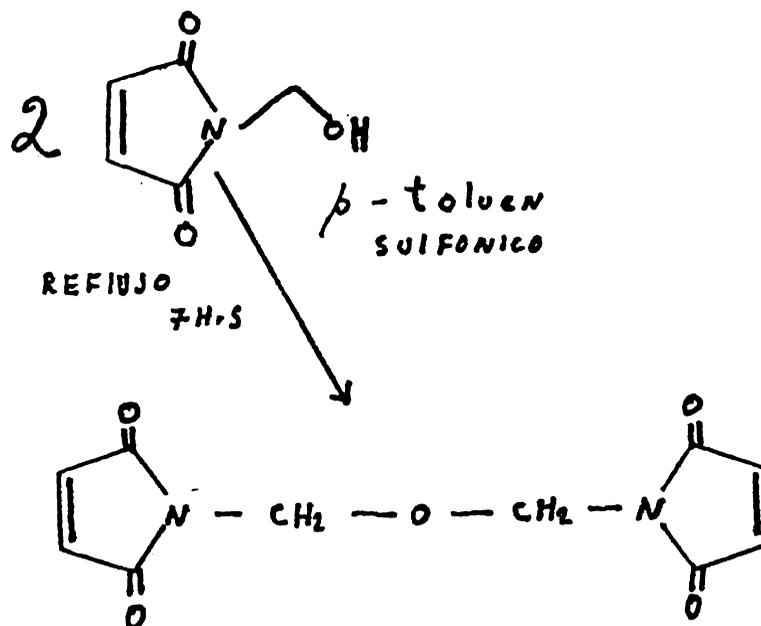


En este caso la metria prima es la maleimida monofuncional metilol, la cual es condensada con otra molécula igual obteniéndose así el éter.

a



b



COMPROBACION DE LA ESTRUCTURA

Una vez hecha la síntesis, la comprobación de la estructura se hace necesaria, ya que se ha informado la posibilidad de la obtención de isomaleimidadas y dada la importancia del uso que se les va a dar a estas maleimidadas, se procedió a identificar y confirmar la estructura de ellas, lo cual se logró por técnicas de espectroscopia en infrarrojo; Tabla I y por resonancia magnética protónica; Tabla II.

Cuando se hubo confirmado la estructura de estas maleimidadas, el siguiente paso fue probar su capacidad para reaccionar con grupos -SH, lo cual se hizo aprovechando la característica de las maleimidadas de absorber en el ultravioleta, dicha característica se usó para determinar la reactividad de las maleimidadas con grupos -SH, haciéndolas reaccionar con cisteína a un p^H adecuado y la disminución de la absorbencia consecuente se determinó a diferentes intervalos de tiempo Tabla III.

Uno de los parámetros importantes para el empleo de estos compuestos como reactivos de entrecruzamiento, es la distribución entre las fases celulares, para poder llevar a cabo el entrecruzamiento, y la forma en que se puede evaluar esto es con la ayuda de los coeficientes de partición, entonces se procedió a la determinación de los coeficientes de

	-O-H	N-N	C-H	C=O	C-OH	C-H	O-H
BEM	-----	-----	3100	1740y1710	---	840	-----
BM	-----	-----	3100	1760y1740	---	840	-----
EBMM	-----	-----	3100	-----	---	840	-----
1,4-DMB	-----	-----	3100	-----	---	840	-----
1,6-DMH	-----	-----	3100	-----	---	840	-----
MM	3500-3300	-----	3100	1700	---	840	-----
NEM	-----	-----	3100	-----	---	840	-----

BANDAS CARACTERISTICAS EN EL INFRARROJO DE DIFERENTES MALEIMIDAS

BEM= BIS ETILENMALEIMIDA, BM = BISMALEIMIDA, EBMM = ETER BISMALEIMIDO METILICO
 1,4-DMB 1,4 DIMALEIMIDO BUTANO, 1,6 DMH = 1,6 DIMALEIMIDO HEXANO

	N-N	O-H	VINILI COS	-CH-	-CH ₂ -
BEM	—	—	6.7 S 4H	---	3.7 S 4H
BM	—	—	7.02 S 4H	-----	-----
EBMM	-----	-----	-----	-----	-----
1,4-DMB	---	-----	-----	-----	-----
1,6-DMH	-----	-----	-----	-----	-----
MM	-----	5.42-5.63 S ⁱ D 2 0	6.88 S 2H	-----	4.98 S 2H
NEM	-----	-----	-----	-----	-----

BANDAS CARACTERISTICAS DE RESONANCIA MAGNETICA PROTONICA
PARA MALEIMIDAS

TABLA II

REACTIVIDAD DE MALEIMIDAS CON CISTEINA

1,6-DIMALEIMIDO HEXANO		N-N/- BISMALEIMIDA		BISETILENMALEIMIDA	
A	T (MIN)	A	T (MIN)	A	T (MIN)
0.413	0	0.62	0	0.22	0
0.391	10	0.019	2	0.167	7
0.368	25			0.182	15
0.347	40			0.149	30
0.306	70			0.102	60
0.245	130			0.012	90
0.195	190				
0.157	250				
0.131	310				
0.113	370				
0.086	490				

partición en un sistema agua/octanol para simular las condiciones celulares, obteniéndose los siguientes resultados:

- FEM	=	1.344
- BM	=	2.953
- 1,4-DMB	=	1.29
- 1,6-DMH	=	- - - -
- EBMM	=	0.752
- NEM	=	- - - -
- MM	=	0.1384

Aquí es muy importante hacer la aclaración de que los coeficientes de partición que se esperaban en base a sus grupos polares y masa molecular son: 1,6-DMH 1,4-DMB FEM NEM BM EBMM y los - - que se obtuvieron son : BM BEM 1,4-DMB EBMM - MM (41).

Otro factor que es determinante para poder - emplear las maleimidas bifuncionales, como reactivos de entrecruzamiento, es la existencia de la distancia adecuada entre los centros reactivos, ya que la maleimida puede ser muy reactiva hacia los grupos -SH, pero si estos no se encuentran a una distancia igual a la que hay entre los núcleos maleimídicos, no se llevará a cabo el entrecruzamiento, (fig III-6).

Las maleimidas que fueron sintetizadas debido a que tienen longitudes de cadenas hidrocarbonadas

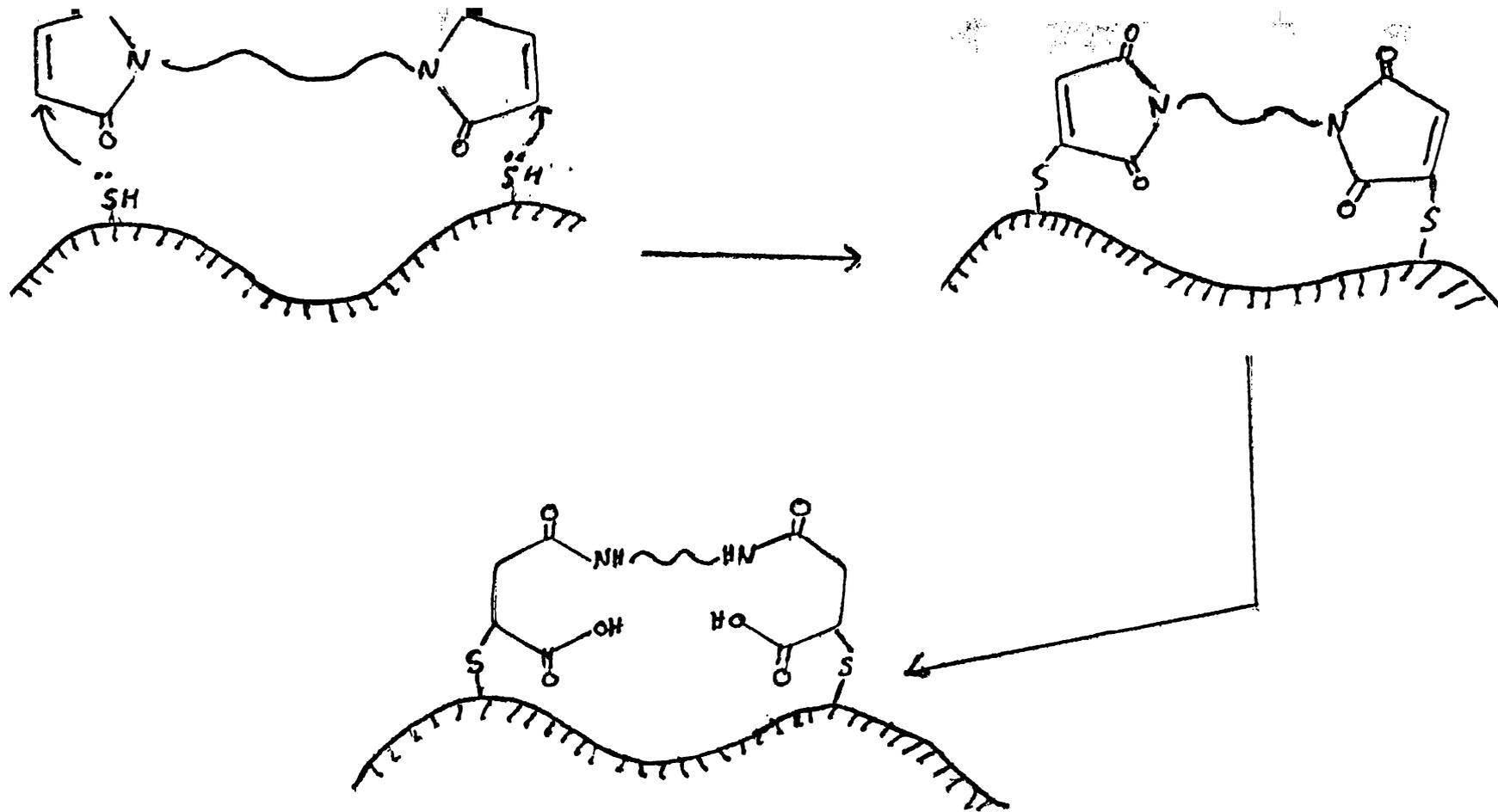
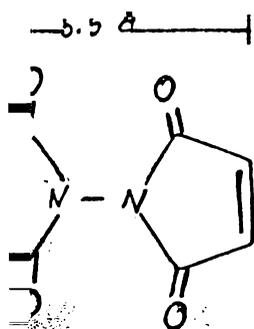


FIG. III-6

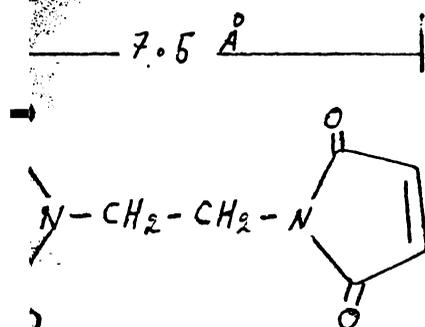
PROBABLE MECANISMO DE REACCION DE UNA MALEIMIDA BIFUNCIONAL CON DOS GRUPOS - SH VESINALES DE LA MEMBRANA EN DONDE SE MUESTRA LA IMPORTANCIA QUE TIENE LA IGUALDAD DE LAS DISTANCIAS EXISTENTES ENTRE LOS NUCLEOS REACTIVOS DE LA MALEIMIDA Y LA EXISTENTE ENTRE LOS GRUPOS - SH QUE VAN A REACCIONAR.

Figura 111 - 7



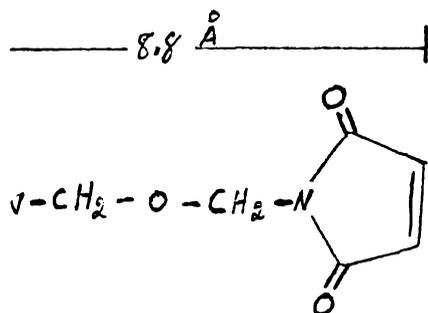
N,N- bisdimaleimida

MM = 192 g/mol



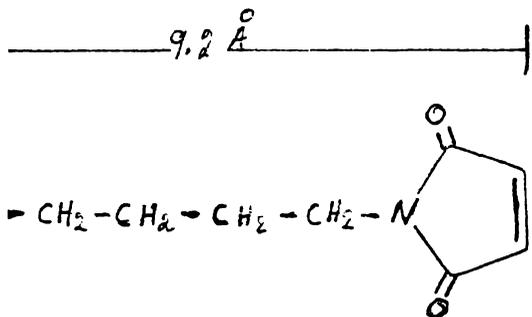
1,2- dimaleimido etano

MM = 220 g/mol



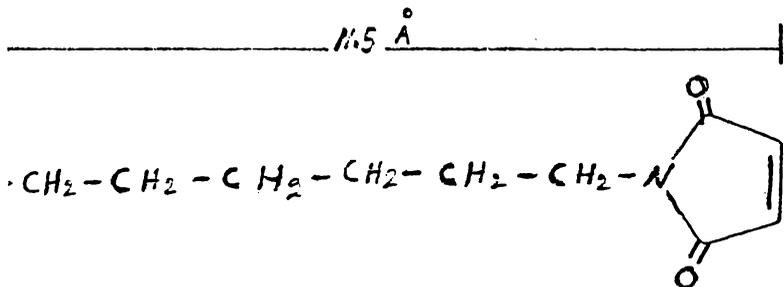
Eter-bis-maleimido metilico

MM = 236 g/mol



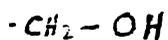
1,4- dimaleimido butano

MM = 248 g/mol



1,6-dimaleimido hexano

MM = 276 g/mol

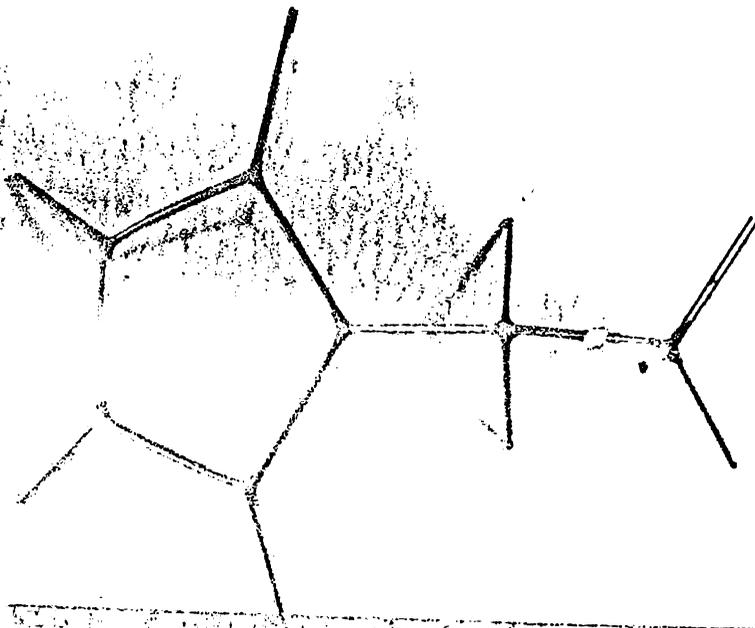


Maleimida metilol

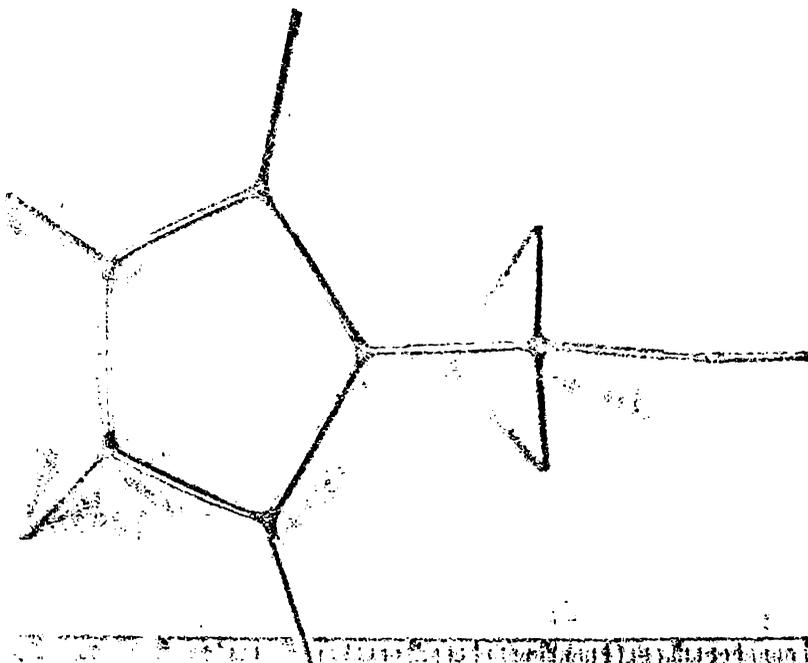
MM = 127 g/mol

diferentes, lo que nos va a permitir tener diferentes distancias entre centro reactivo y centro reactivo, lo que aunado a sus conformaciones más probables, nos va a permitir movernos en un rango desde los 5.5 A hasta los 11.5 A , como puede observarse en la figura (III-7).

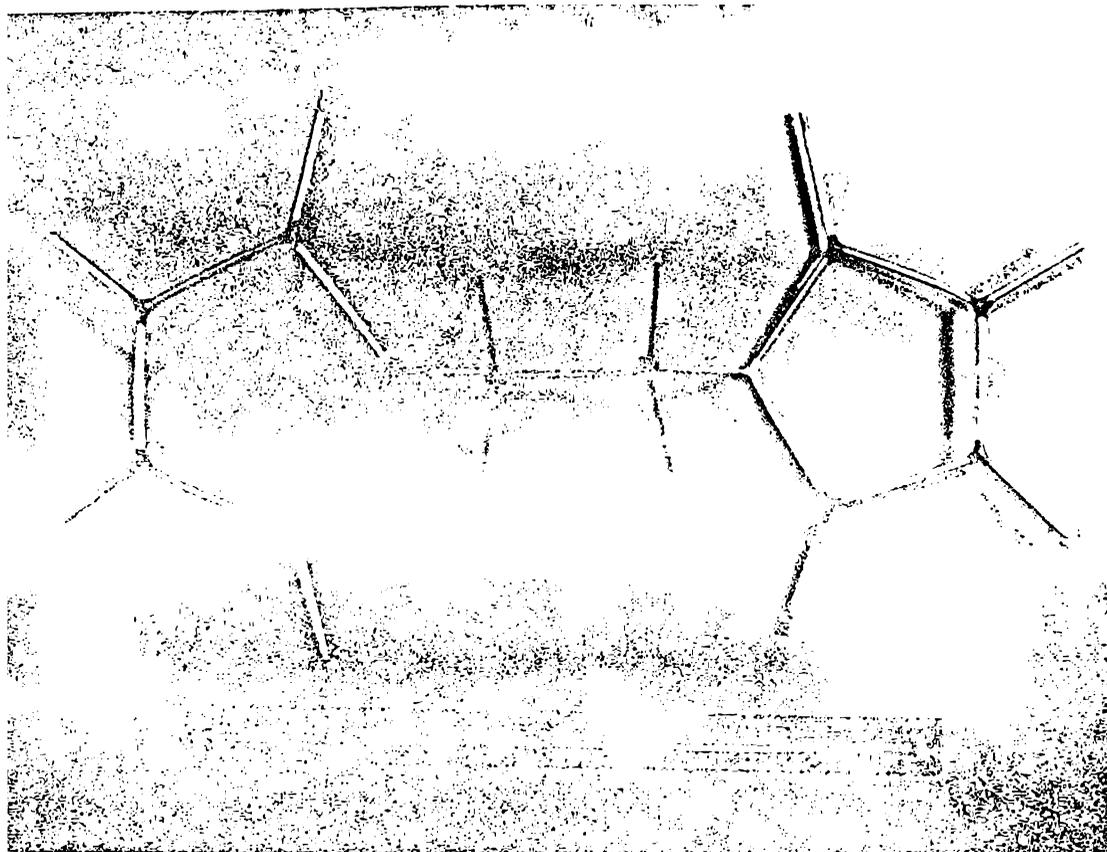
Los diferentes N-derivados de maleimida que - fueron probados en este trabajo van a presentar una conformación óptima y una conformación poco - - probable según el tipo de molécula de que se trate por tanto es necesario conocer como estan distri--buidos sus átomos en el espacio, lo cual lo podemos observar en las siguientes figuras.



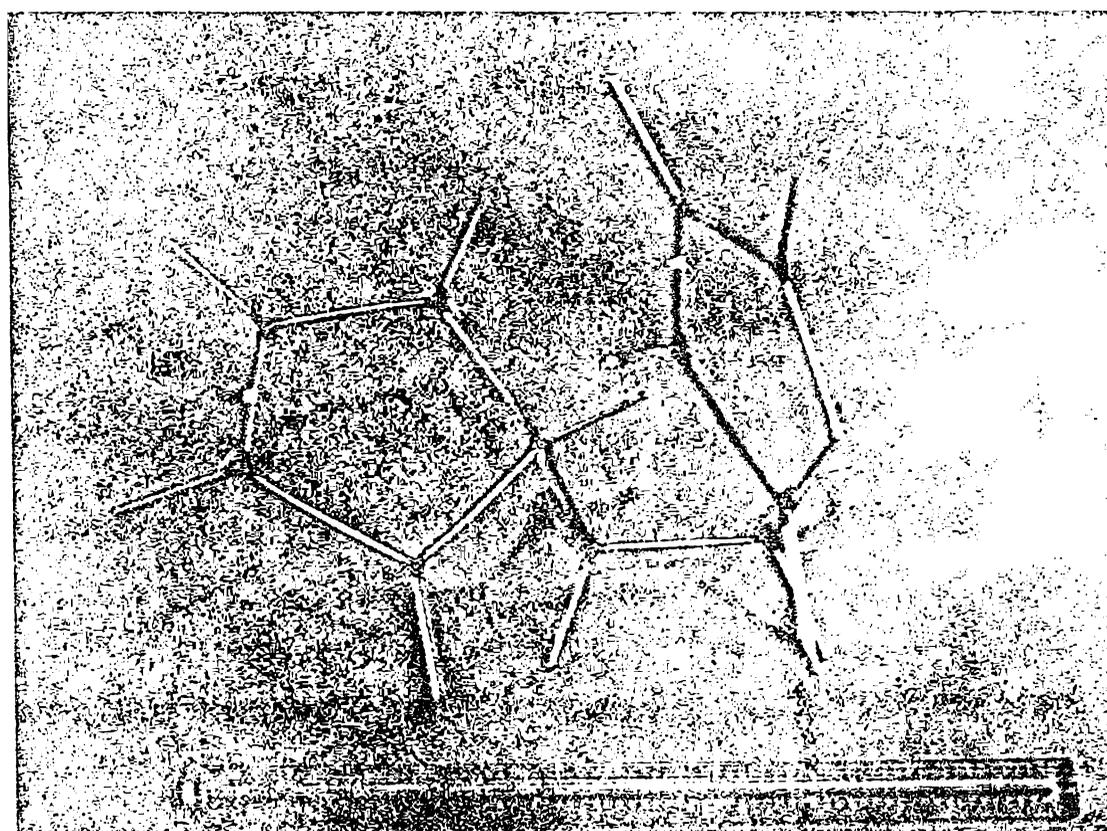
N-ETIL MALEIRIDA



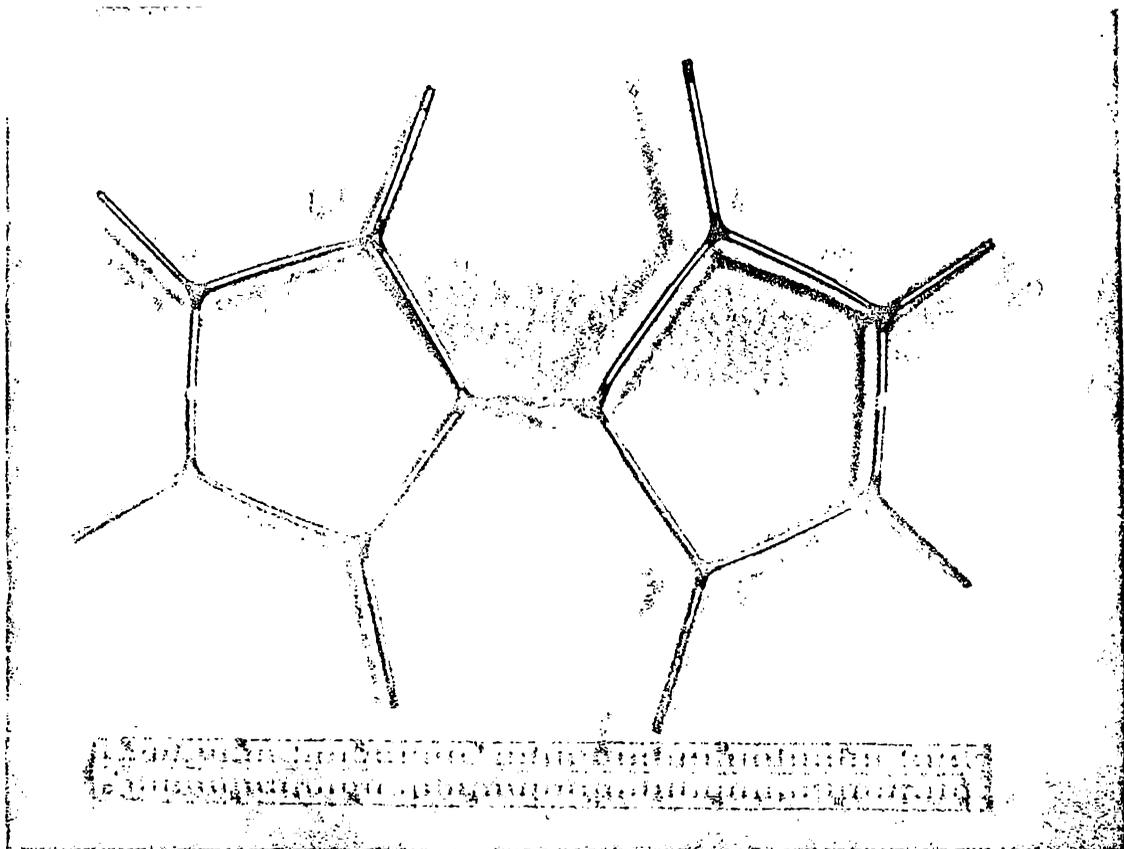
MALEIRIDA 3 ETIOL



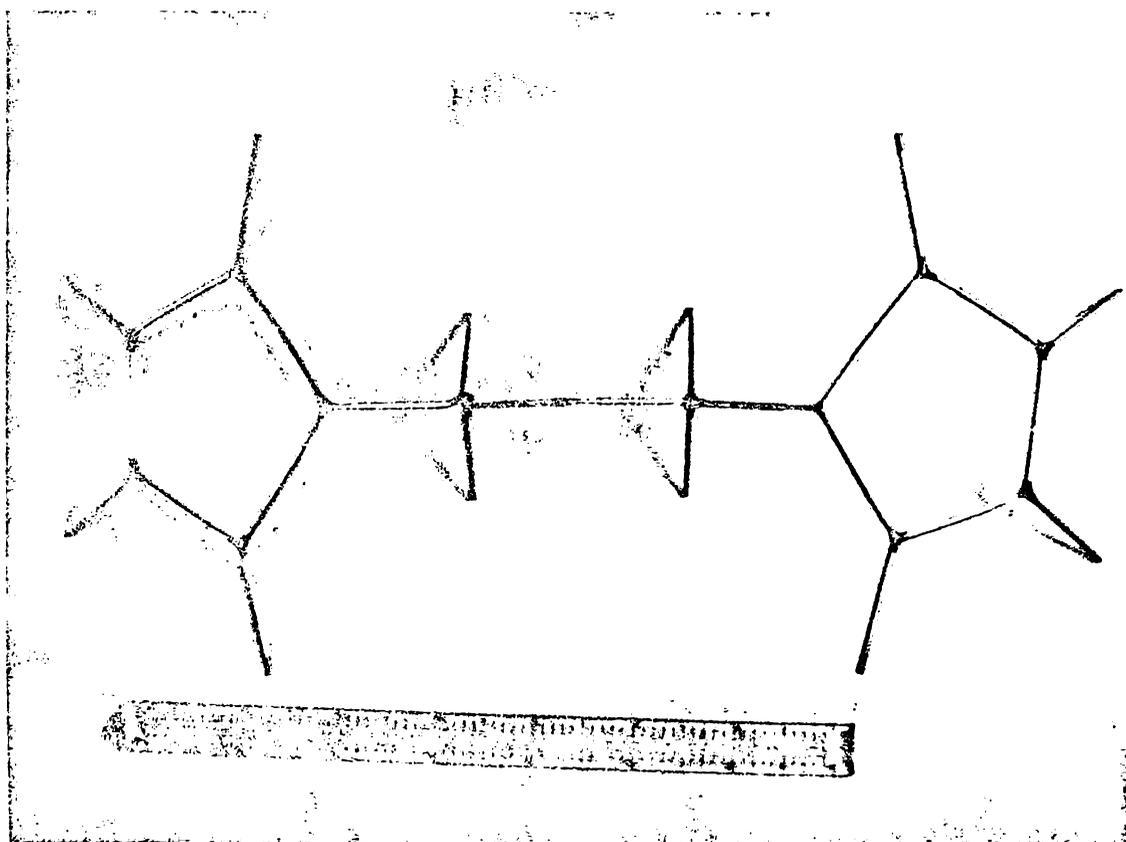
BIS ETILEN MALEIMIDA (conformacion más estable)



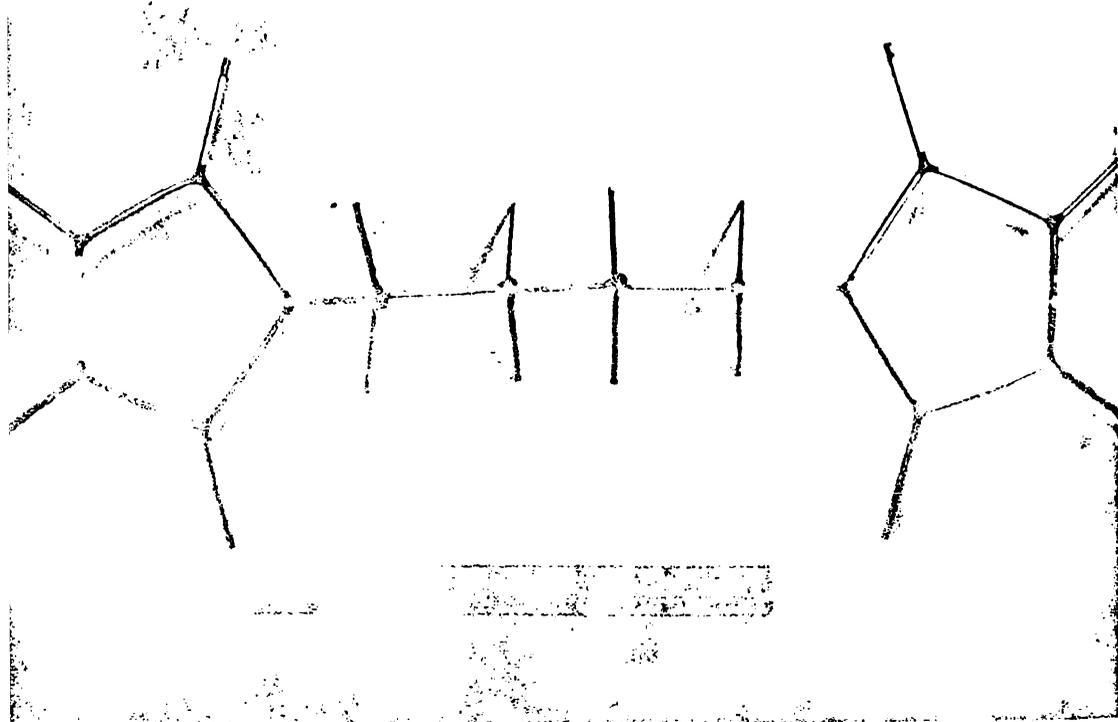
BIS ETILEN MALEIMIDA (conformación corta más estable)



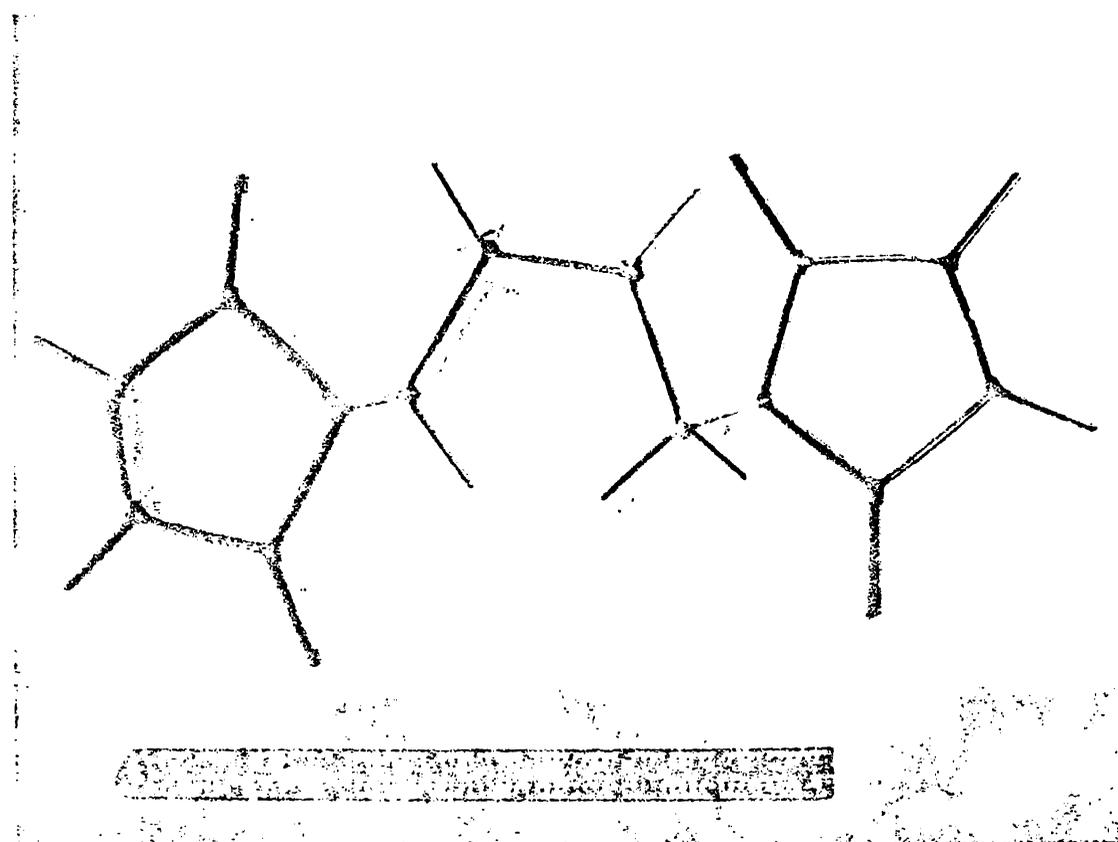
BIS MALEIMIDA (conformación más estable)



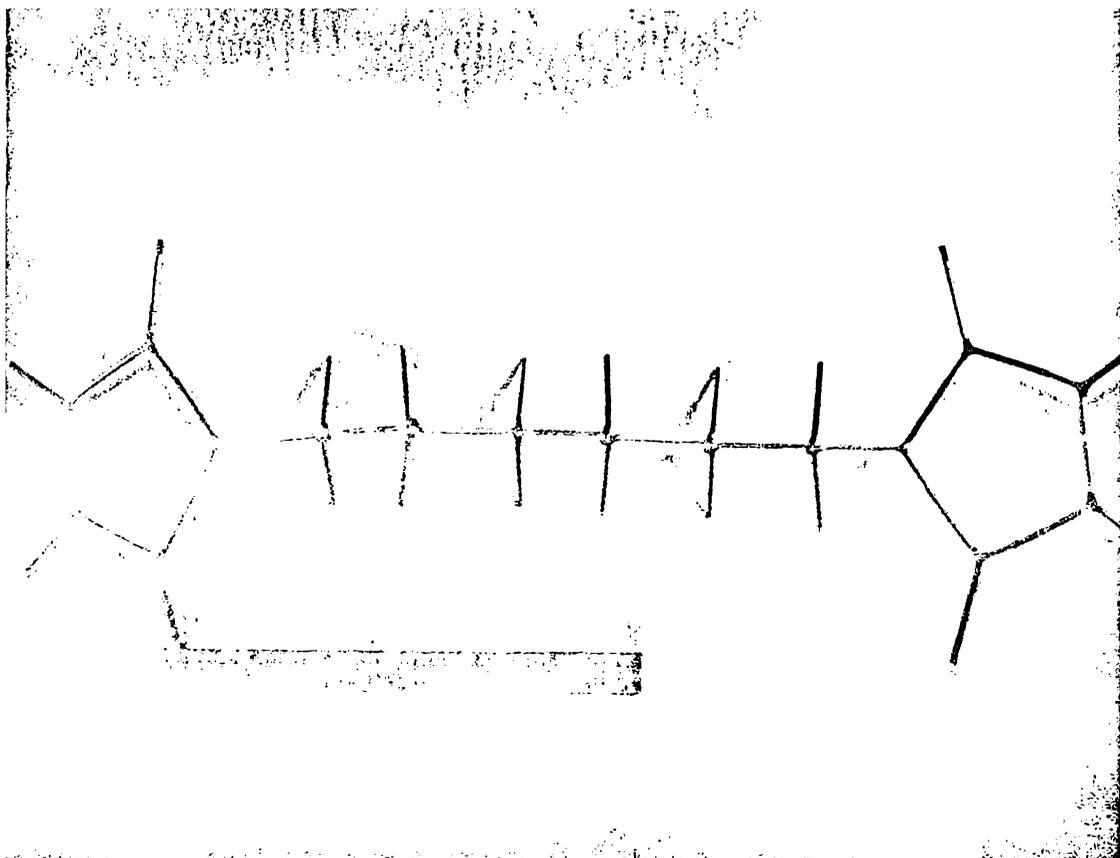
BIS MALEIMIDA (conformación estable)



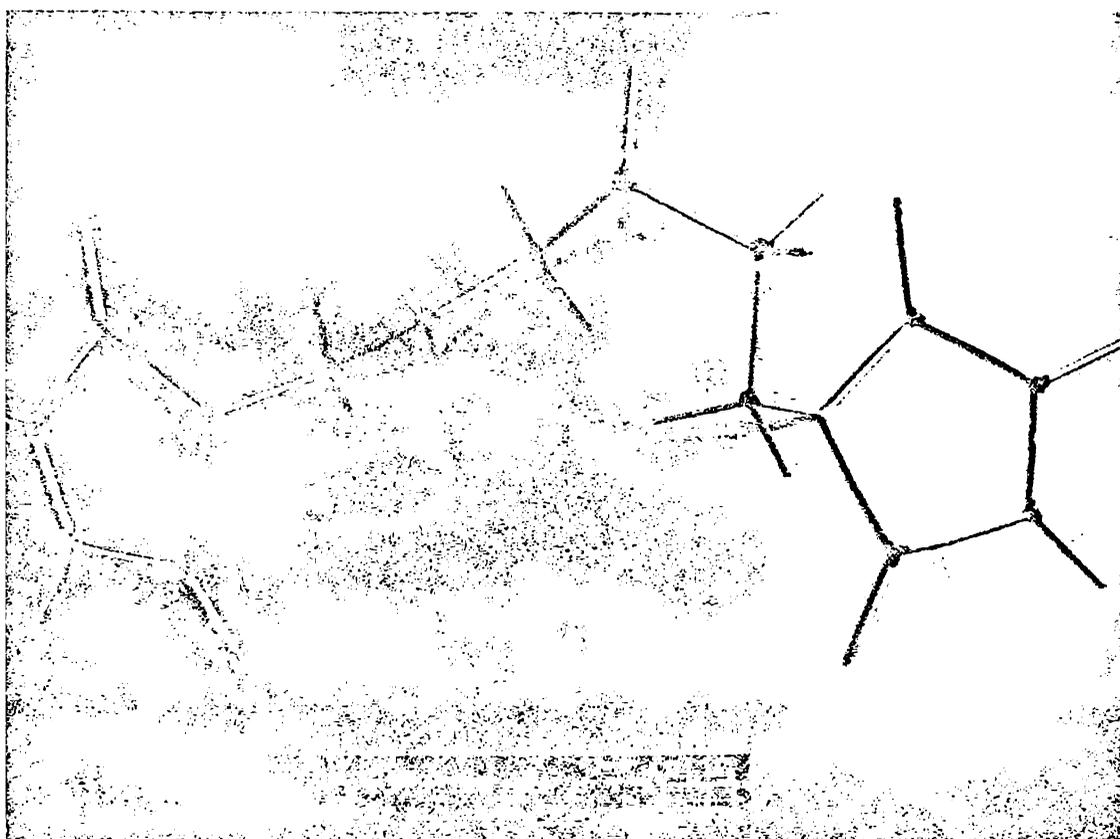
1,4-DIHALOIMIDOPYRROLANO (conformación más estable)



1,4-DIHALOIMIDOPYRROLANO (conformación certa más probable)



1,6-DIAZABICICLOHEXANO (conformación más estable)



1,6-DIAZABICICLOHEXANO (conformación corta más probable)

ción rápida, para eliminar los residuos de hoja - que no fueron molidos. El homogenizado se coloca en los tubos de centrifuga previamente enfriados y se equilibran. Se centrifuga a 1500 rpm durante 3 minutos (en una centrifuga MSE modelo LR-6 con cabezal); en este paso se elimina el se dimento que contiene las células enteras, núcleos y pared celular. El sobrenadante se centrifuga a 3,500 rpm durante 8 minutos. Se elimina el -- sobrenadante y el sedimento que contiene los clo- roplstos se lava con un medio de resuspension (- 100 mM de sacarosa, 20 mM de tricina, 5 mM de - - $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 50 mM de KCl); cuidadosamente con un tubo de ensayo que contiene hielo se remueve el - paquete de cloroplastos, se homogeniza y se centri fuga a 3 500 rpm por 8 minutos. Este procedimien to de lavado se repite dos veces con la finalidad de eliminar impurezas. Finalmente el sedimento se resuspende en 3 ml de medio de resuspension sin BSA 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 conser- var la temperatura a 4 °C como máximo y a un p^H de 8.00 .

II.- DETERMINACION DE CLO-OFILA

Esta determinación se realizóp por un método es pectrofotométrico, cuyas ecuaciones fueron deriva-

das de los coeficientes de absorptividad molar de las diferentes clorofilas (28,45).

A tres tubos de ensayo de 13 X 100 se les adiciona 5 ml de acetona al 80 %. A dos de ellos se les pone una alícuota de 20 μl de la suspensión de cloroplastos previamente homogeneizados, se cubren los tres tubos con papel parafilm e inmediatamente se agitan en un vortex por 30 segundos y se incu--ban en la oscuridad durante 5 minutos; se centrifugan las dos muestras en una centrífuga clínica modelo CL No 197 A , a velocidad máxima por 5 minu--tos, se decanta y el sobrenadante se le determina la absorbencia a 649 y 665 nm contra el blanco de acetona en un espectrofotometro Carl Zeiss M4 Q 111, 45309-PMQ 11.46275, calculando los valores con la siguiente ecuación:

$$\begin{array}{l} \text{clorofila total} \\ \text{en mg / ml} \end{array} = 6.45 (A_{665}) + 17.72 (A_{649})$$

III .- MARCAJE DE CLOPOPLASTOS DE CLASE II CON MALEIMIDAS BIFUNCIONALES

El marcaje de cloroplastos se realizó según una adaptación el método reportado por Mc Carty et al - para NEM (29).

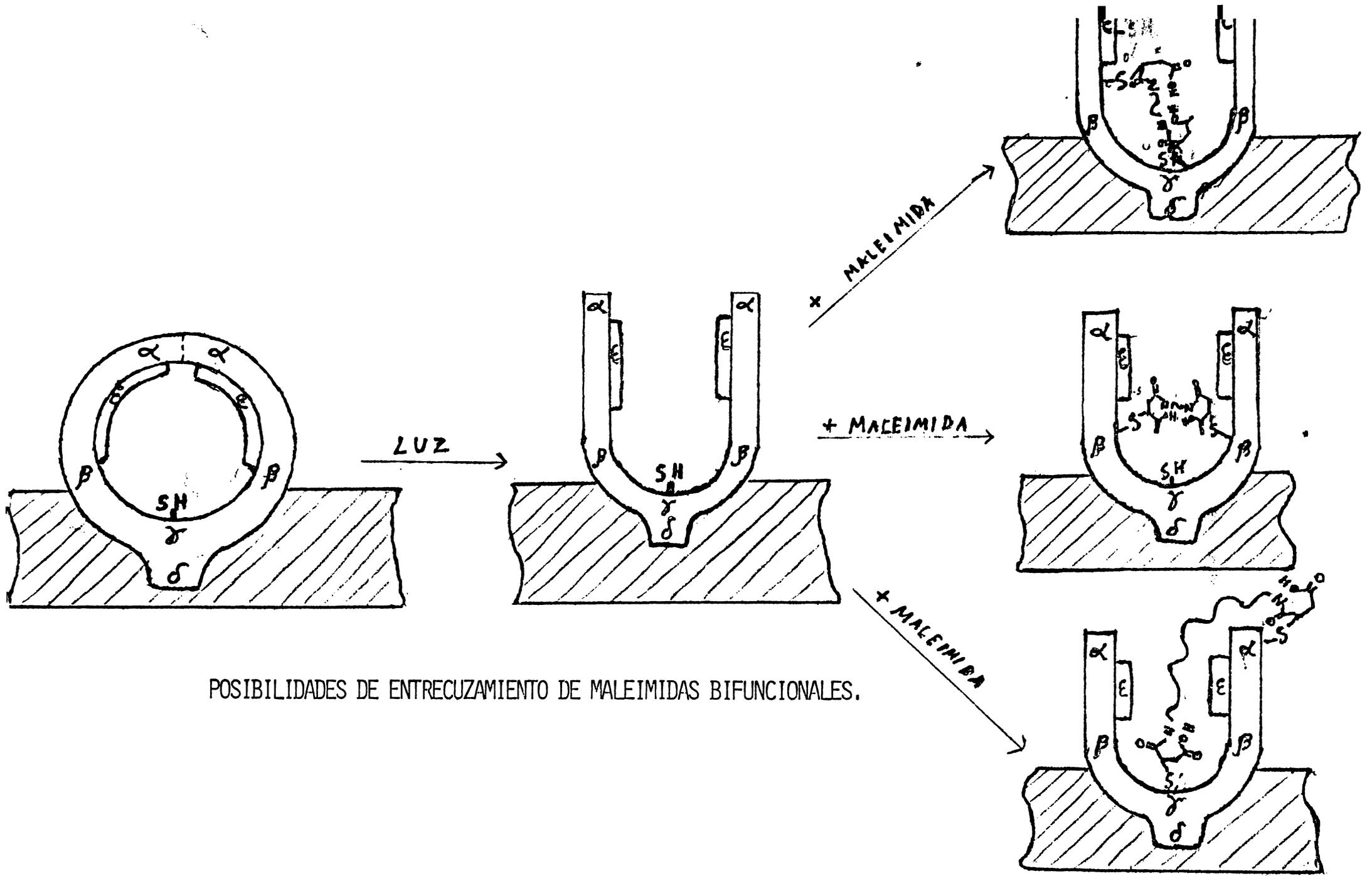
En una cubeta refrigerada por agua, se colcan

7 ml de un medio de resuspension (100 mM de saca-rosa, 20 mM de tricina, 5 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y 50 mM de KCl), se colocan 70 μ l de mv 0.5 M y 140 μ g de clorofila (20 U g /ml) y se incuba por un minuto en la luz y/o oscuridad con concentraciones crecien-tes de maleimidias bifuncionales (0.0, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM), una vez terminada la incuba--ción se procede a pasar el contenido de la cubeta a un tubo de centrifuga que previamente contiene - 15 ml de una mezcla de resuspension similar a la - anterior con la diferencia de que este contiene -- 0.1 % de BSA desgrasada y 0.05 ml de 2-mercaptoeta-nol concentrada (cuya función es parar la reacción) y se centrifugan los cloroplastos (ahora marcados) en una centrifuga MSE modelo LR-6 con cabezal a -- 5 000 rpm por espacio de 10 minutos despues de lo cual se desecha el sobrenadante (fig IV-1) .

Para la medición del transporte de electrones los cloroplastos marcados se resuspenden en 7 ml de una mezcla de reacción que contiene 100 mM de saca-rosa, 20 mM de tricina, 5 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y 50 mM de KCl y 0.1 % de BSA desgrasada.

Para la medición de la bomba de protones y la fotofosforilación, se resuspendió a los cloroplas-tos marcados en 7 ml de una mezcla de reacción que contiene 100 mM de KCl y 5 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

/



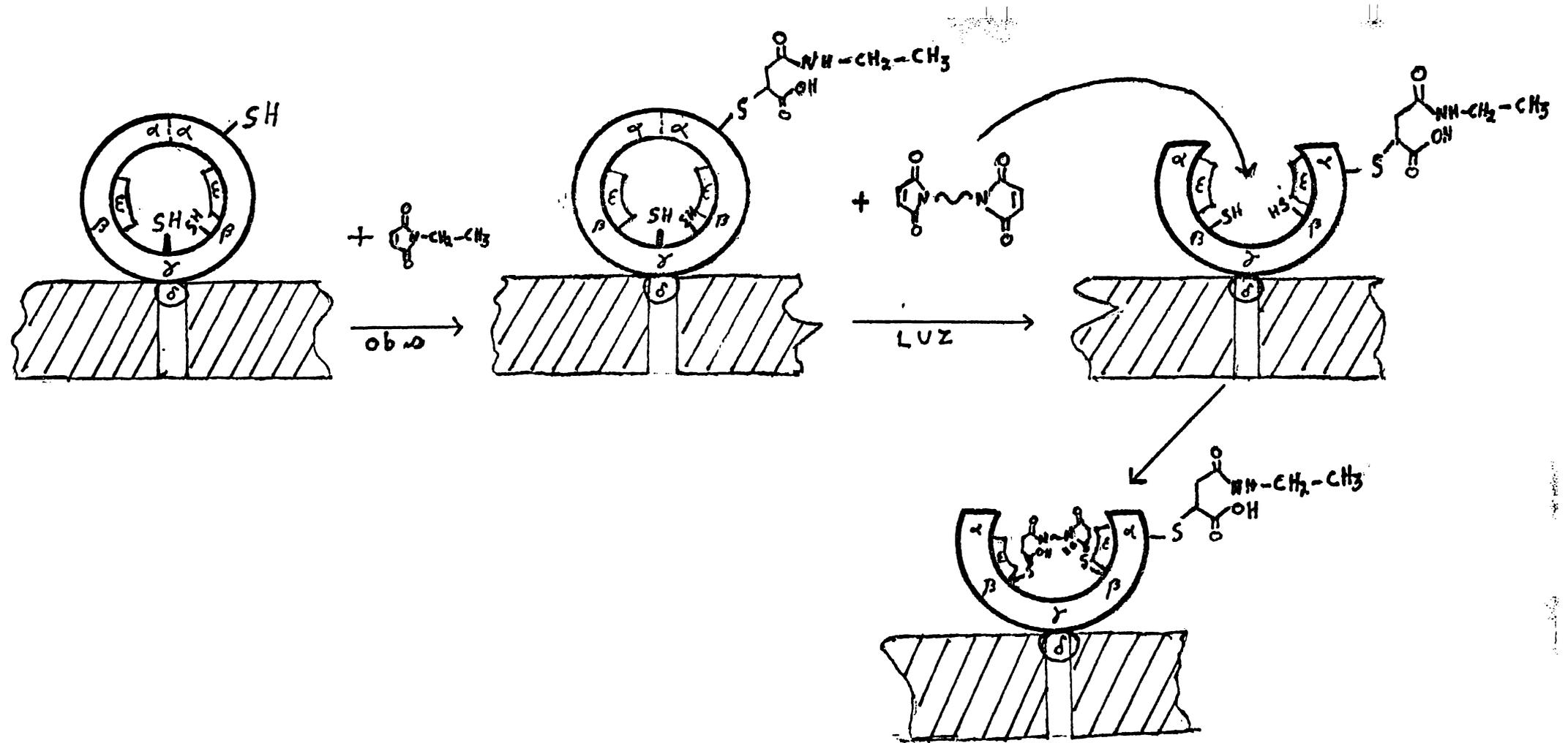
POSIBILIDADES DE ENTRECIZAMIENTO DE MALEIMIDAS BIFUNCIONALES.

Para realizar los marcajes se siguió el esquema que se muestra a continuación:

tubo	ml de M R	concentración de maleimida	periodo de incubación
1	7	- - - -	1 min
2	7	- - - -	1 min
3	7	0.05 mM	1 min
4	7	0.05 mM	1 min
5	7	0.1 mM	1 min
6	7	0.3 mM	1 min
7	7	0.5 mM	1 min

IV .- MARCAJE DE CLOROPLASTOS DE CALES II CON MALEI
MIDAS BIFUNCIONALES PREVIO MARCAJE CON NEM EN
LA OSCURIDAD.

En una cubeta de vidrio refrigerada por agua se colocan 7 ml de medio de resuspensión sin BSA (100 mM de sacarosa, 20 mM de tricina, 5 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 50 mM de KCl) a los cuales se agregan 70 U l de MV 0.5 M (aceptor artificial de electro_{nes}) y 140 μ g de clorofila. Se incuba por un minuto con 0.1 mM de NEM en la obscuridad e inmediatamente despues se incuba con concentraciones crecientes de maleimida bifuncional por un minuto en presencia de luz (fig IV-2); una vez termina-



FUNDAMENTO DEL MARCAJE DE TILACOIDES CON MALEIMIDAS BIFUNCIONALES PREVIO MARCAJE COMUN EN LA OSCURIDAD.

da la incubación, se procede a pasar el contenido de la cubeta a un tubo de centrífuga que previamente contiene 15 ml de medio de resuspension con 0.1 % de BSA desgrasada y 0.05 ml de 2-mercaptoetanol (para parar la reacción) y se centrifugan los -- cloroplastos a 5 000 rpm por espacio de 10 minutos en una centrífuga MSE modelo LR-6 con cabezal, despues de lo cual se desecha el sobrenadante y se -- procede a medir la bomba de protones y la fotofosforilación.

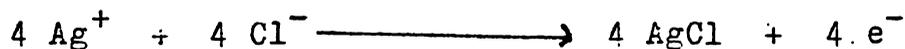
V .- MEDICION DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES

Basándose en el hecho de que por efecto de - la luz hay fotólisis del agua, y de que el oxígeno es un elemento electroinducible, originando una onda que se puede detectar por medio de un electródo, que mide el gradiente electroquímico por efecto de la concentración de oxígeno manteniendo constante el voltaje aplicado, se empleo en este caso un electródo de tipo Clark (12) que mide los --- cambios de concentración de oxígeno que se produ-- cen por la fotólisis del agua. Este electródo es ta compuesto por un cátodo de platino y un ánodo - de plata los que estan en contacto con una solu--- ción concentrada de cloruro de potasio, la que a - su vez esta contenida en una membrana de politetra

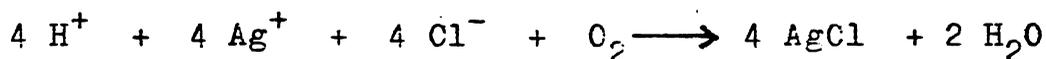
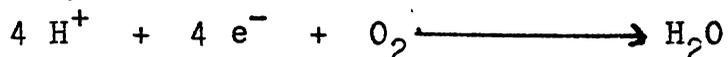
fluóroetileno (PTFE) que está en contacto con el medio de reacción, protegiendo al electródo - de sustancias contaminantes y siendo permeable a gases. Se considera que la permeabilidad es selectiva, porque en el caso particular del oxígeno en la mezcla de reacción es el único que está variando. Aplicando un voltaje de 0.5 a 0.8 Volts a través de los electrodos, la corriente es proporcional a la concentración de oxígeno - en la cubeta de reacción.

En el electródo de tipo Clark se efectúan las siguientes reacciones:

Anodo

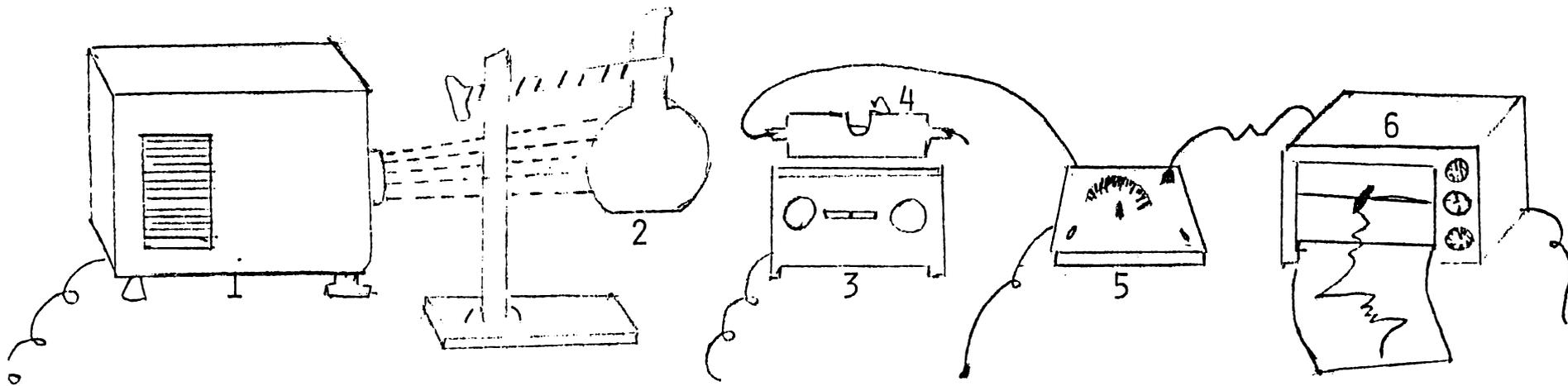


Cátodo



Los cambios de corriente detectados en el - electródo son traducidos a voltaje por un oxímetro construido por el Dr Richard Dilley (en nuestro laboratorio), este último está conectado a un registrador Beckman con una entrada de máximo de 10 mV, lo que equivale a 1-2 equivalentes electrónicos.

El esquema mostrado en la figura (IV-3) -



- 1.- FUENTE DE LUZ
- 2.- LENTE DE IZAWA
- 3.- BASE DE AGITACION
- 4.- CAMARA DE REACCION
- 5.- OXIMETRO
- 6.- REGISTRADOR

DIAGRAMA QUE MUESTRA LA DISPOSICION DEL EQUIPO PARA LA MEDICION DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES

ilustra la disposición del equipo empleado, que - consta de lo siguiente: Un proyector Sawyers con una lámpara de 500 W para proporcionar luz hasta - saturación, el rayo de luz pasa a través de una -- lente de Isawa que consiste de una solución de sul- fato de cobre al 2 %, contenida en una matraz de - bola de 500 ml, que hace la función de filtro, con centrando la luz y eliminando el calor de la lampa- ra para que este no llegue a la cámara de reacción la cual a su vez se encuentra refrigerada por agua esta cámara está sostenida sobre un agitador magné- tico que mantiene homogénea la suspensión y la cual a su vez tiene adaptado el electrodo de tipo Clark, donde se ajusta perfectamente.

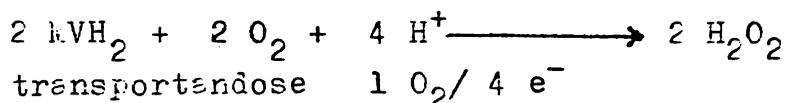
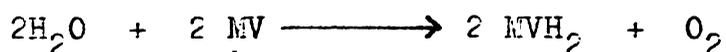
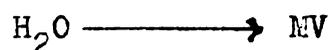
Para medir las reacciones, se usó una mezcla de reacción standard que contiene : 100 mM de saca- rosa, 20 mM de tricina, 50 mM de KCl, 5 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y 0.1 % de BSA desgrasada.

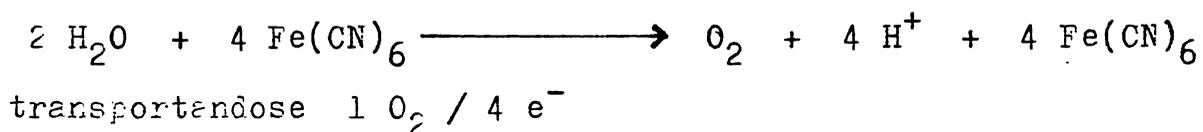
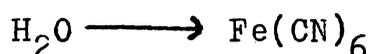
La calibración se realizó con la mezcla de - reacción standard y 50 mM de ferricianuro.

En todas las maleimidias se probó el transpor- te de electrones basal así como el fosforilante.

Las reacciones efectuadas en la mezcla son:

Reacción Total PS I + PS II



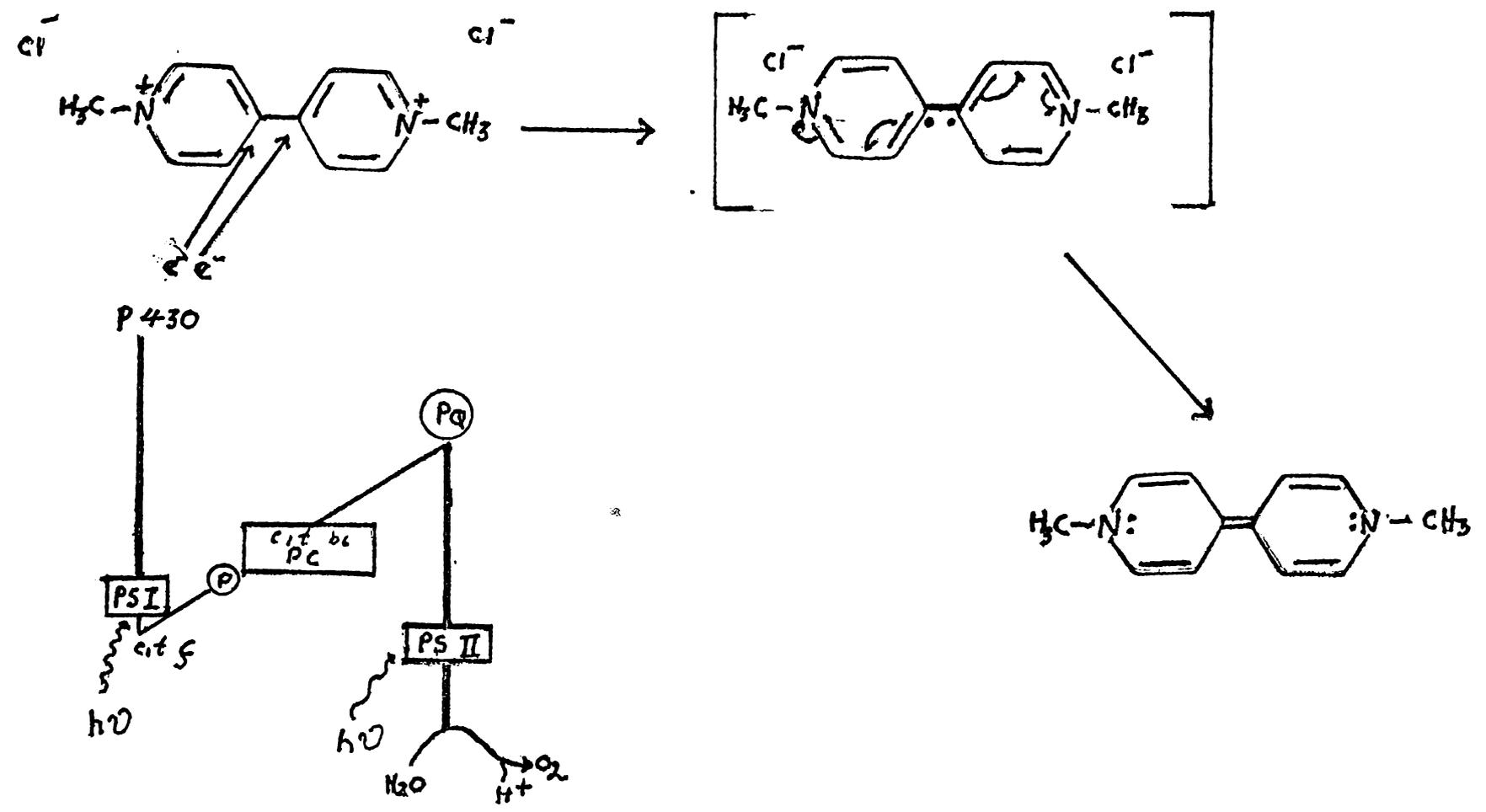
Calibración

Los trazos obtenidos en el graficador nos indican la velocidad de consumo o producción de oxígeno, lo cual se puede determinar comparando la pendiente del control con los trazos obtenidos para los diferentes problemas con las maleimidas, calibrando con una solución de $\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.05 M que cuando se agregan 10 μl equivale a 0.5 μeq de e^- en 2 ml, lo que se emplea para hacer la conversión a microequivalentes de electrones por hora por miligramo de clorofila, que es la expresión final del resultado :

$$\frac{0.5 \mu\text{eq } e^-}{\text{No de líneas recorridas al calibrar}} \times \frac{60 \text{ min/Hr}}{\text{mg/ml de clorofila adicionada}} =$$

$\mu\text{eq } e^- / \text{Hr} / \text{mg}$ de clorofila.

FIGURA IV-4



PROBABLE MECANISMO DE REACCION ENTRE EL METIL VIOLOGENO Y LOS ELECTRONES LIBERADOS POR LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES

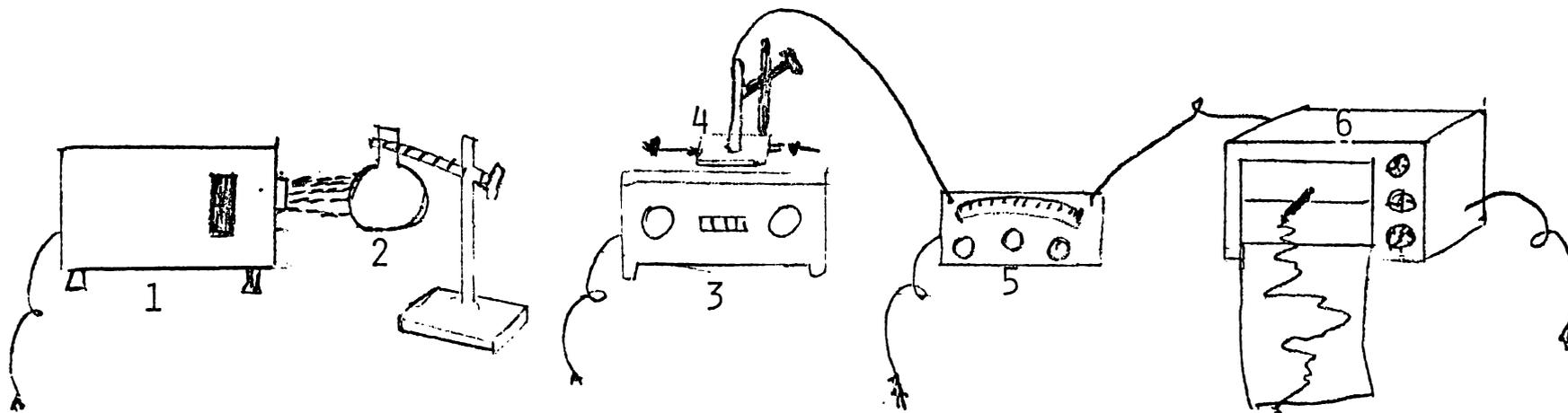
VI .- MEDICION DE LA BOMBA DE PROTONES

Se mide el gradiente de protones, registrando los cambios de p^H en un potenciómetro (Corning modelo 12 con una escala expandida), a la mezcla de reacción que contiene los cloroplastos, cuando esta es iluminada a un $p^H = 6$.

La velocidad y el cambio de p^H se pueden calcular por la diferencia de pendiente y tamaño del trazo, debida a la alcalinización del medio al ser transportados los protones hacia adentro de los tilacoides. El flujo inverso de protones sucede cuando se apaga la luz, pero con una velocidad menor.

El medio de reacción estándar contiene 100 mM de KCl y 5 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y 0.5 mM de MV, tiene además 20 μ g de clorofila por ml.

Los instrumentos empleados se esquematizan en la fig IV-5 ; el equipo consiste de un proyector Sawyers con una lámpara de 500 W, haciendo pasar la luz por una lente de Isawa, para concentrar los rayos y eliminar el calor. La cubeta de reacción tiene 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 Beckman, que registra los cambios de p^H por medio de los cambios



- 1.- FUENTE DE LUZ
- 2.- LENTE DE IZAWA
- 3.- BASE DE AGITACION
- 4.- CAMARA DE REACCION
- 5.- POTENCIOMETRO
- 6.- REGISTRADOR

DIAGRAMA QUE MUESTRA LA DISPOSICION DEL EQUIPO PARA LA MEDICION DE LA BOMBA DE PROTONES.

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 p^H que mide el electródo.

VII .- MEDICION DE LA FOTOFOSFORILACION

Se mide la generación de iones OH^- que son -- expulsados hacia el medio externo del tilacoide, lo cual se logra registrando los cambios de p^H en un potenciómetro (Corning modelo 12 con una escala - expandida), a la mezcla de reacción, cuando esta es iluminada a $p^H = 8$.

La velocidad de síntesis de ATP se puede calcular por la diferencia de la pendiente de los problemas con las diferentes mezclas en contraste con el trazo control y calibrando con $5 \mu l$ de HCl 0.05 N .

El medio de reacción standard contiene 100 mM de KCl y 5 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.5 mM de MV, $10 \mu l$ de Pi 0.3 M/ ml y $10 \mu l$ de ADP 0.1 M / ml.

Los instrumentos empleados se esquematizan en la figura IV-5 y el equipo es el mismo que se describió para la bomba de protones.

Cuando se iluminan los cloroplastos se inicia

la síntesis de ATP trayendo como consecuencia la liberación de iones OH^- provenientes del fosfato inorgánico, reacción que se lleva a cabo en la ATPasa del cloroplasto, y como la síntesis de ATP se va a llevar a una velocidad constante entonces se va a observar una constante liberación de iones OH^- lo cual se va a reflejar en una constante alcalinización del medio externo.

Los trazos obtenidos en el graficador nos indican la velocidad de síntesis de ATP, lo cual se puede determinar comparando la pendiente del control con los trazos obtenidos por los diferentes problemas con maleimidias, calibrando con HCl 0.05 N $5 \mu\text{l}$ que equivale a $0.05 \mu\text{eq}$ de H^+ lo que se emplea para hacer la conversión de microequivalentes de ATP por hora por mg de clorofila, que es la expresión final del resultado :

$$\frac{0.05 \mu\text{eq ATP}}{\text{No de líneas recorridas al calibrar}} \times \frac{60 \text{ min / Hr}}{\text{mg/ml de clorofila adicionada}} =$$

$\mu\text{eq ATP / Hr / mg de clorofila.}$

5

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

1.- Efecto de maleimidias monofuncionales en el -
transporte de electrones basal y fosforilante.

En las figuras V-1 y V-3 , podemos observar -
el efecto de las maleimidias monofuncionales sobre
el transporte de electrones basal cuando se incuban
los cloroplastos en presencia de maleimidias en la
luz y cuando se incuban en la obscuridad, se puede
observar que MM inhibe el transporte de electrones
basal cuando se incuba en la luz pero no cuando se
incuba en la obscuridad, lo que sugiere que MM es
un inhibidor del transporte de electrones, pero pa
ra que pueda inhibir necesita de la presencia de -
la luz probablemente porque la luz induce un cambio
conformacional en la membrana, que permite su en--
trada hasta la cadena transportadora de electrones
o bien que se exponen grupos -SH que en la obscuri
dad no estan expuestos y entonces puede haber reac
ción con la maleimida monofuncional. Si esto es
así, entonces es facilmente explicable porque el -

transporte de electrones fosforilante es inhibido por MM y no por NEM como puede observarse en las figuras V-2 y V-4.

2.- Efecto de maleimidas monofuncionales en la -- bomba de protones y fotofosforilación.

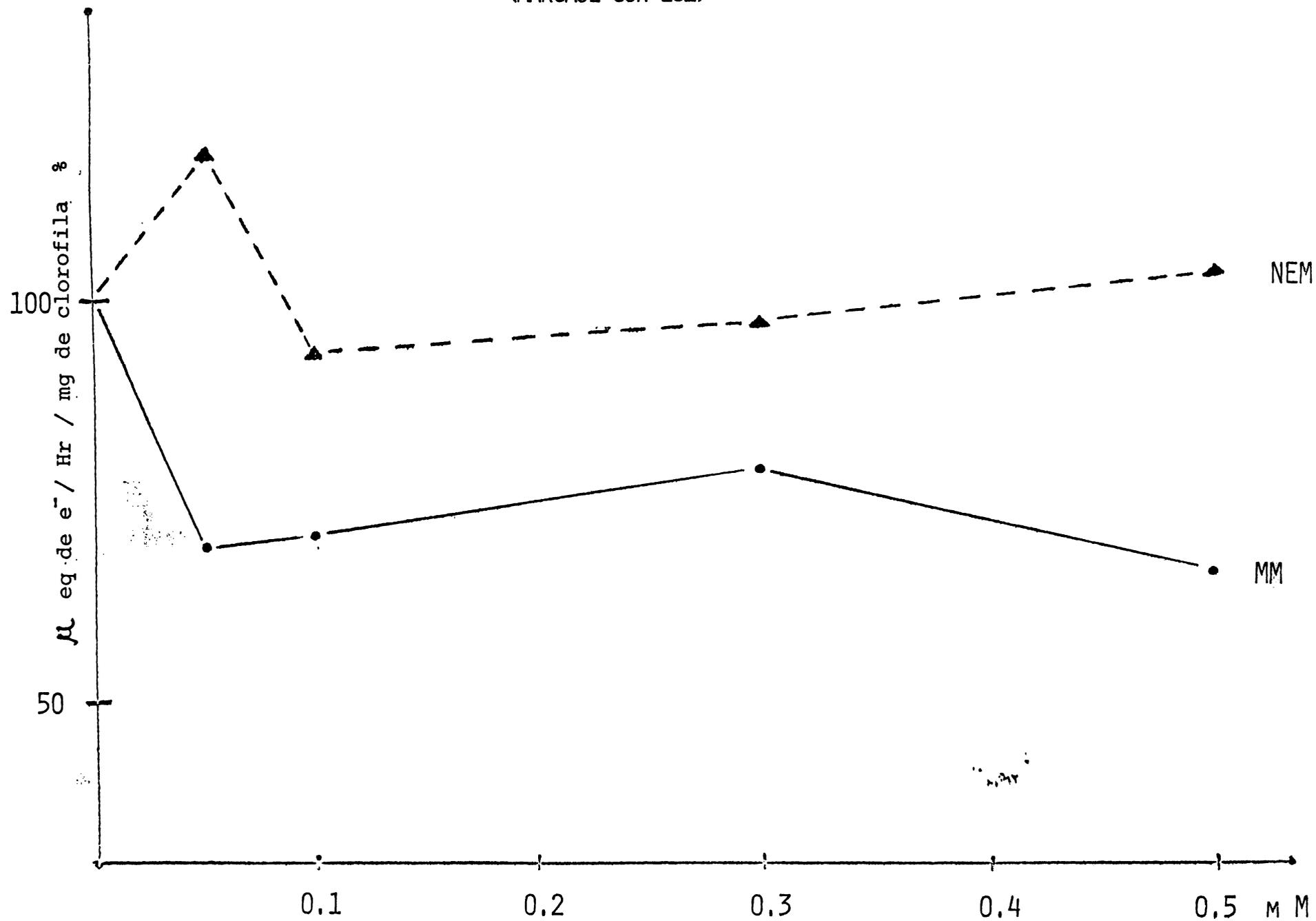
En las figuras V-5 y V-7 puede observarse que ni MM ni NEM, tienen ningun efecto sobre la bomba de protones, lo que nos permite concluir que su -- efecto no es a nivel de las reacciones de transferencia de energía, ya que no hay inhibición de de la generación de Δp^H . Cuando se midió la fotofosforilación (figuras V-6 y V-8), se pudo observar -- que NEM inhibía la fotofosforilación cuando se incubaba en la luz y no en la oscuridad, lo que demostraba que NEM es un inhibidor específico de CF_I como ya estaba reportado en la literatura. Sin -- embargo en el caso de MM, se vio que aparte de inhibir la fotofosforilación cuando se incubaba en -- la luz, tambien presentaba un efecto inhibitorio -- en la oscuridad cuando este compuesto se halla en altas concentraciones, lo cual está concordando con el hecho de que este compuesto es un inhibidor de la cadena transportadora de electrones y es intersante notar que la única diferencia que tiene este compuesto con NEM es un grupo OH^- en vez del CH_3 -- de NEM, pero como puede verse esta diferencia es -- más que suficiente para cambiar el sitio de reacción

con grupos -SH que va a preferir el reactivo y así afectar diferente función.

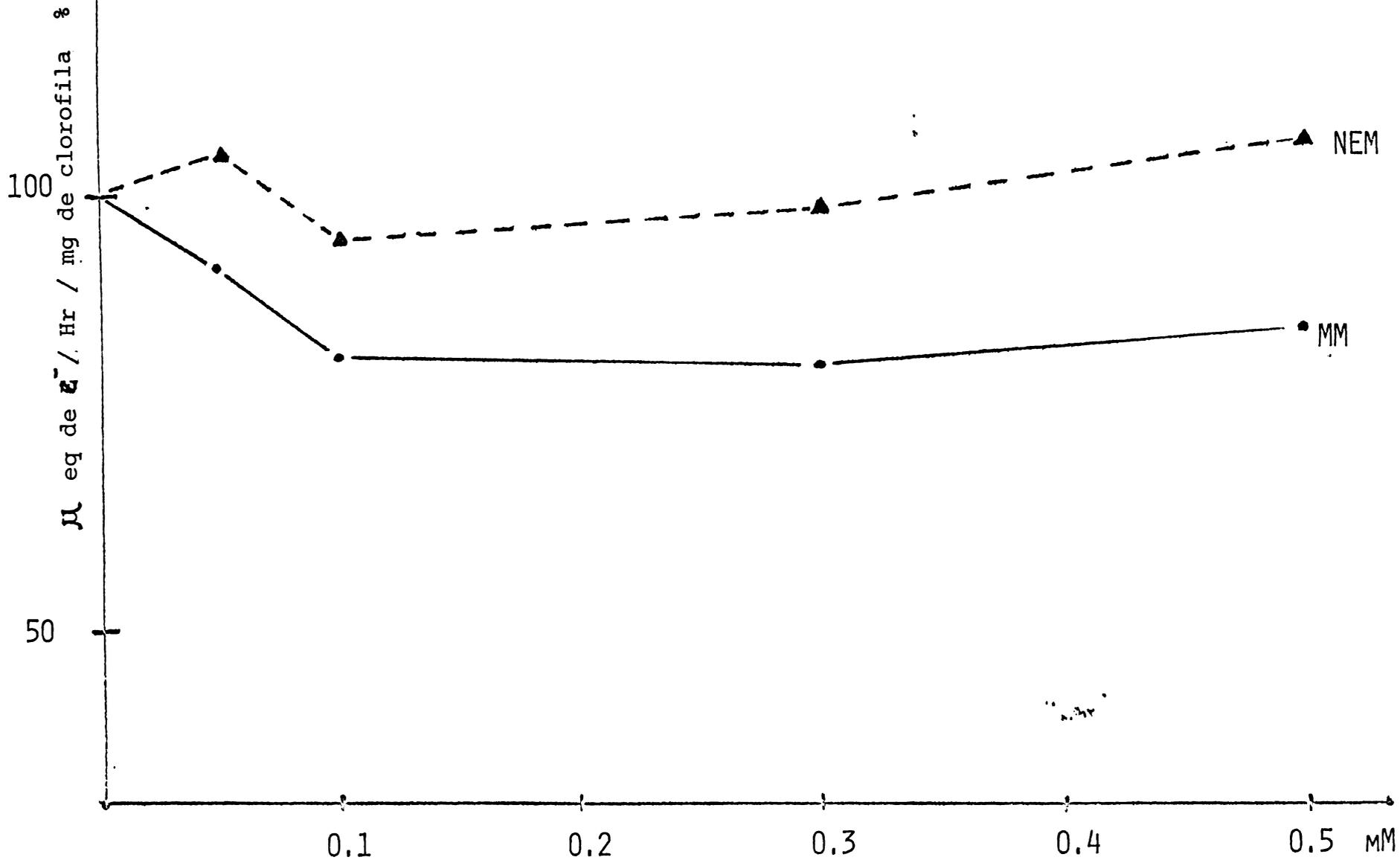
3 .- Efecto de maleimidias bifuncionales en el transporte de electrones basal y fosforilante.

En las figuras V-9 y V-11, se puede observar el efecto de las diferentes maleimidias en el transporte de electrones basal y como puede verse, BM, EBMM, y 1,4-DMB no presentan ningun efecto sobre el transporte de electrones basal cuando se incuban en la luz, mientras que cuando se incuban en la obscuridad solo BM y EBMM no presentan ningun efecto sobre el transporte de electrones basal. Con respecto a las demás maleimidias, puede verse que PEM y 1,6-DMH son inhibidores del sistema de transporte de electrones ya que inhiben el transporte de electrones basal tanto en luz como en obscuridad, sin embargo un dato interesante se tiene con 1,4-DNB ya que este no inhibe en la luz pero si en la obscuridad, lo que puede sugerir que se este uniendo a una proteina de membrana que este intimamente ligada con la cadena transportadora de electrones. y que tiene grupos -SH que estan accesibles en la obscuridad y en cambio en la luz es probable que sufra un cambio conformacional de tal forma que ahora se encuentran escondidos dichos grupos -SH y entonces no son detectados por la maleimida. -

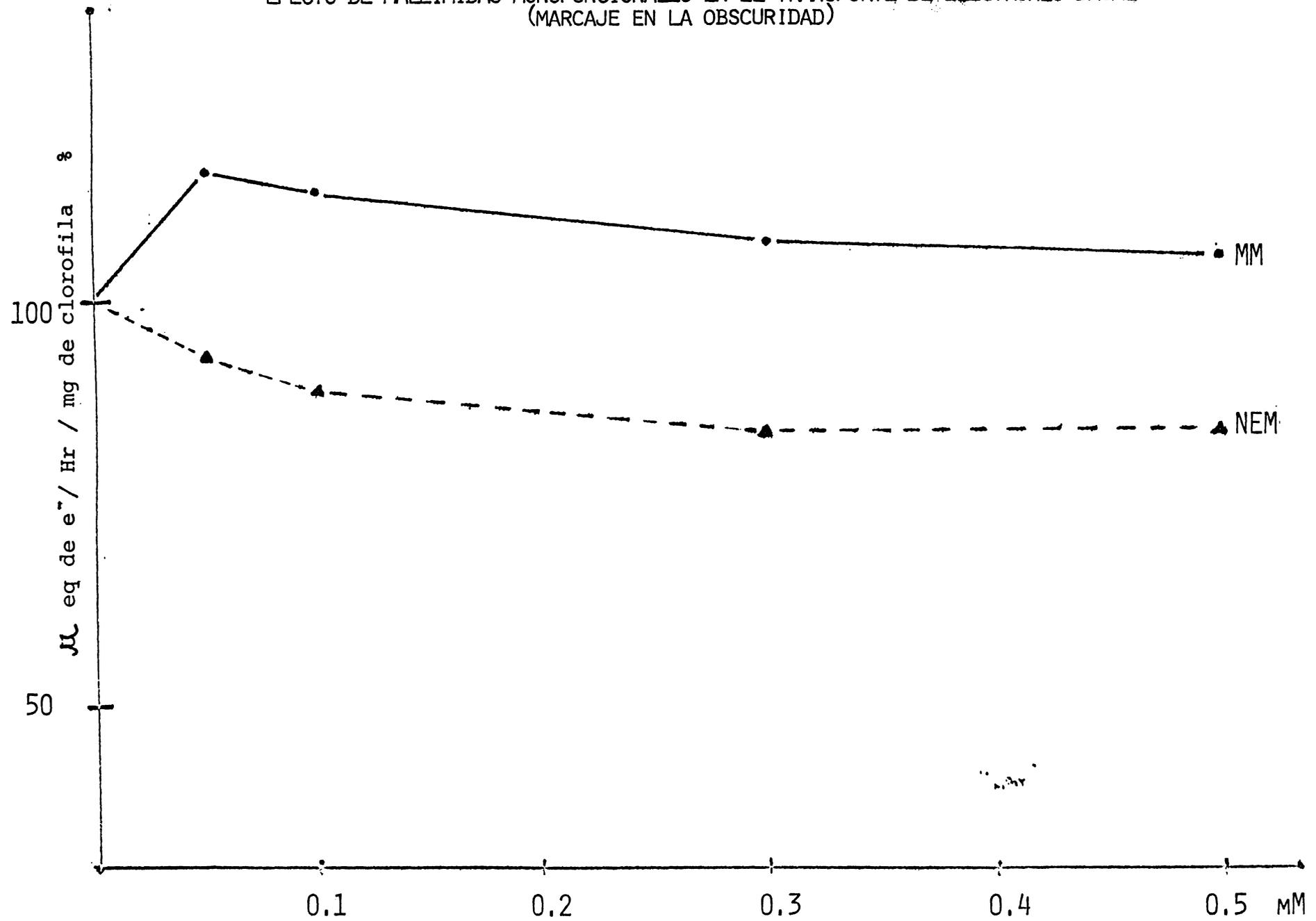
(MARCAJE CON LUZ)

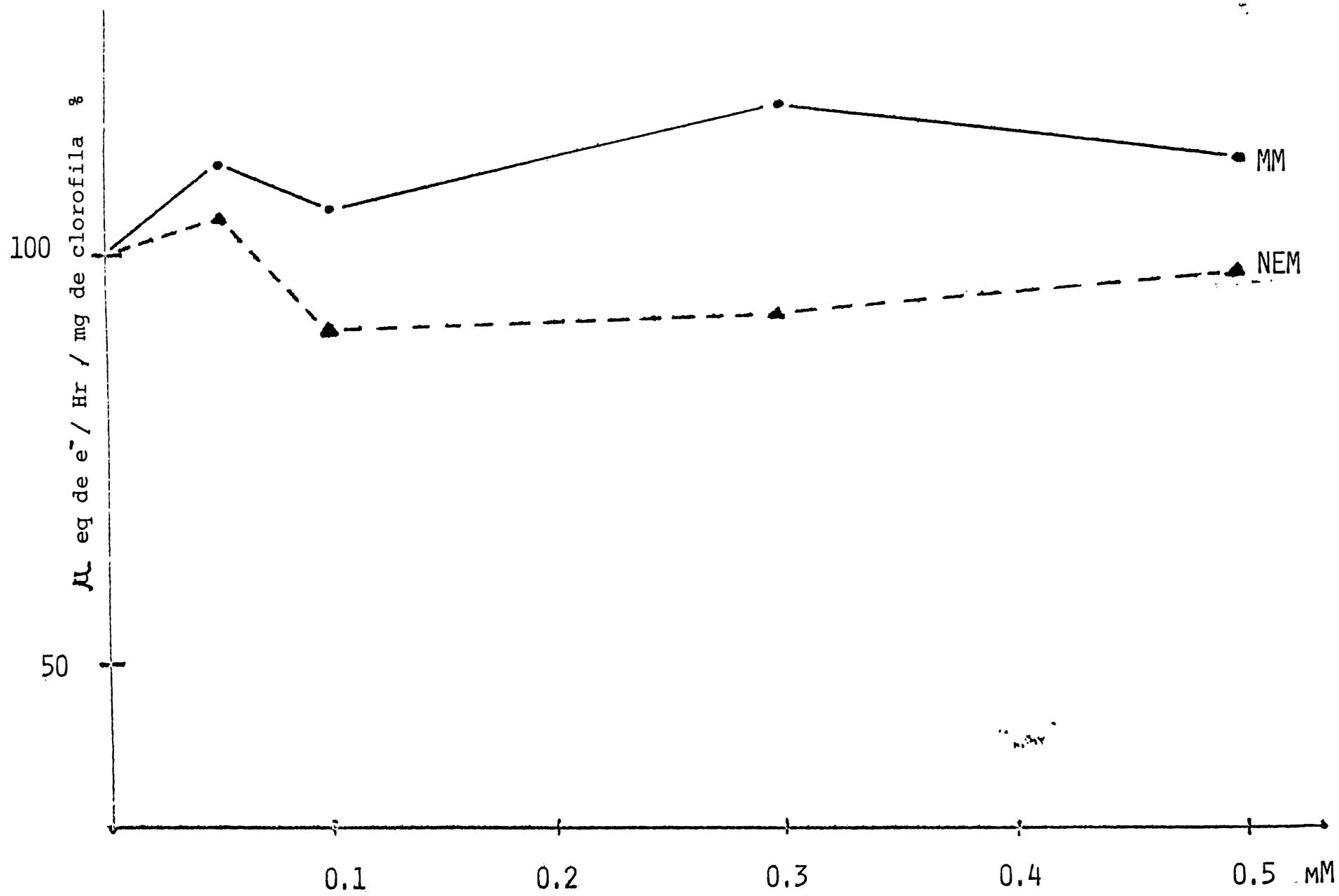


(MARCAJE CON LUZ)

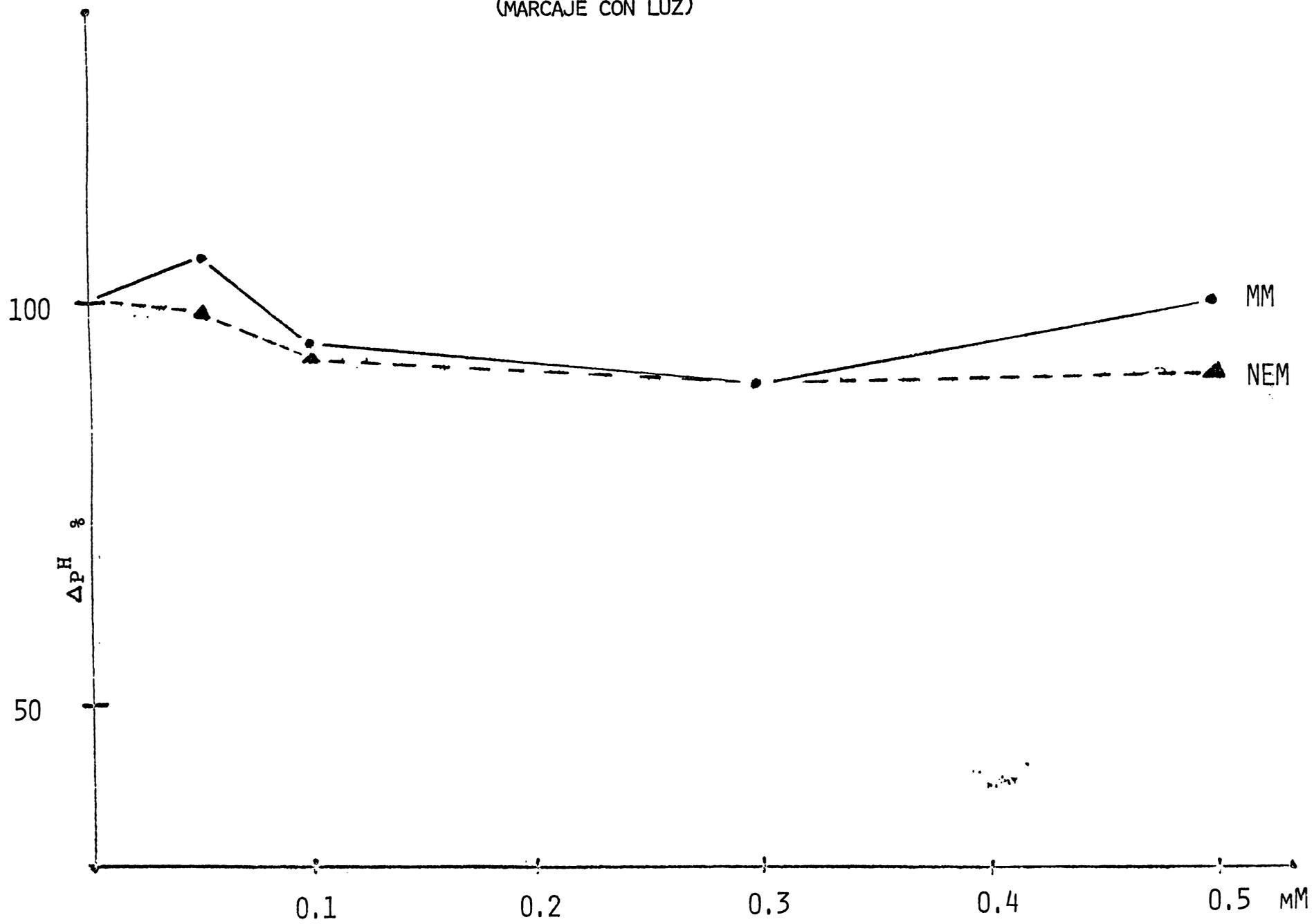


EFECTO DE MALEIMIDAS MONOFUNCIONALES EN EL TRANSPORTE DE ELECTRONES BASAL
(MARCAJE EN LA OSCURIDAD)

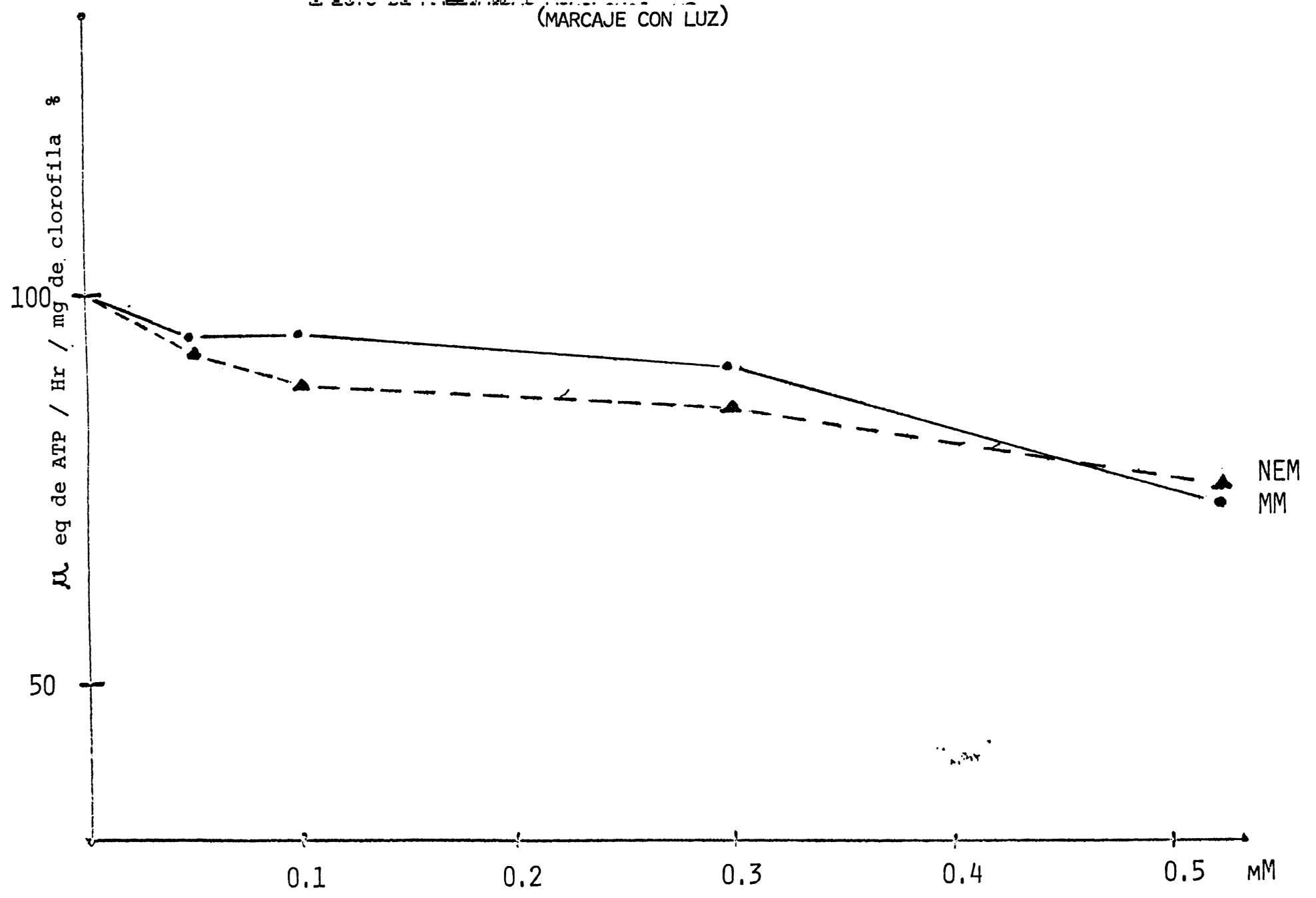




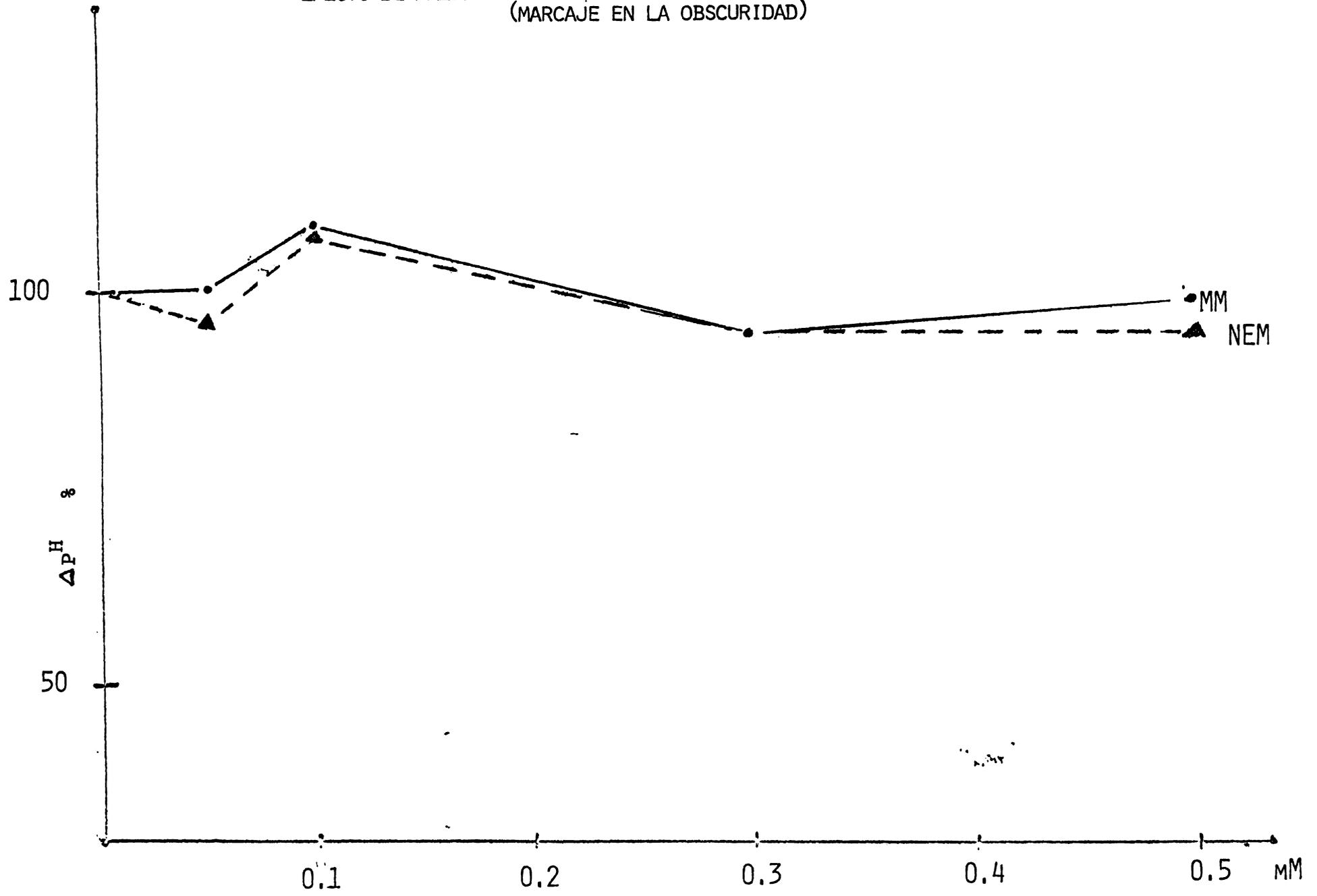
(MARCAJE CON LUZ)



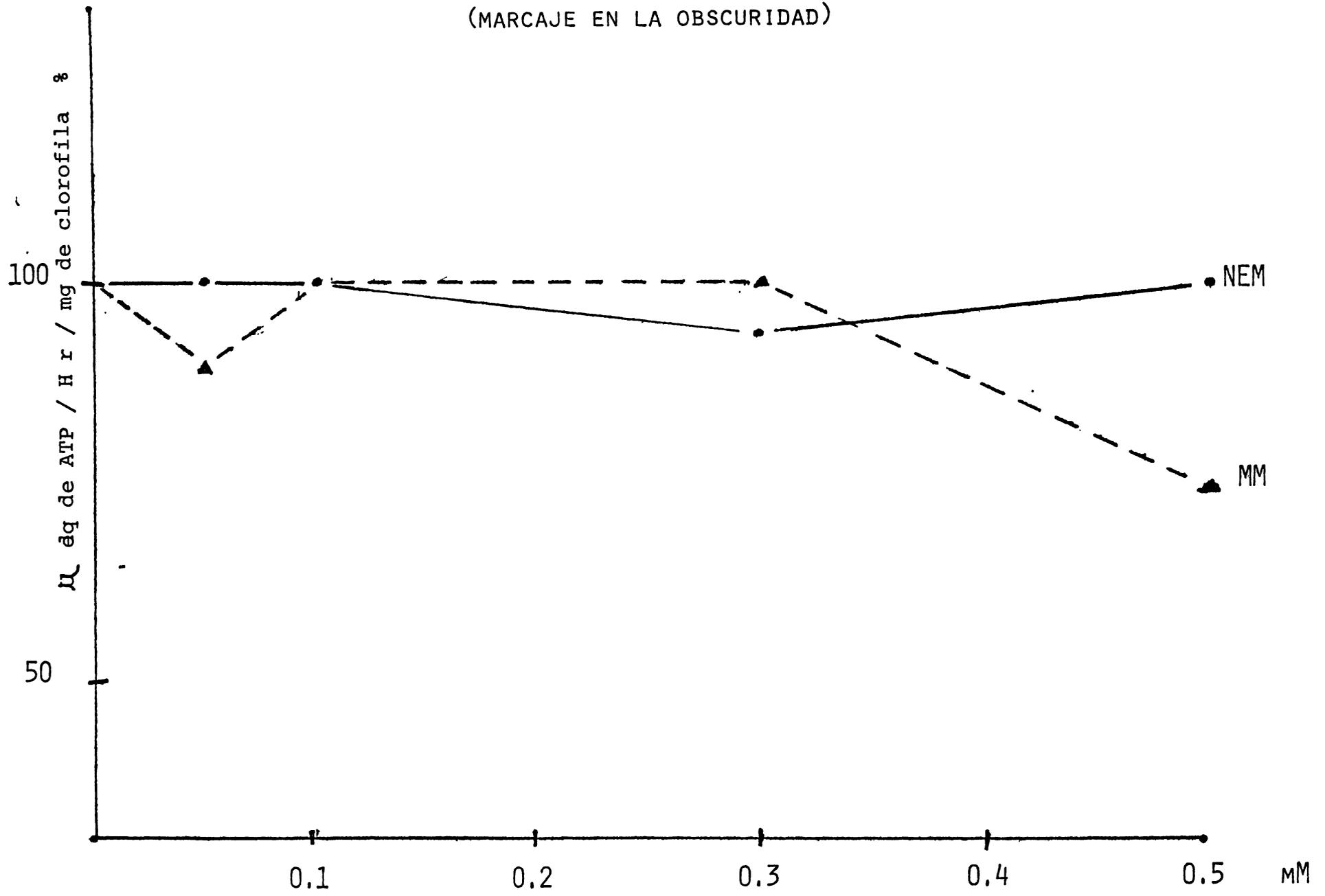
(MARCAJE CON LUZ)



ELETO DE FRECUENCIA POR ENCUBIMIENTO EN LA OBSCURIDAD
(MARCAJE EN LA OBSCURIDAD)



(MARCAJE EN LA OSCURIDAD)

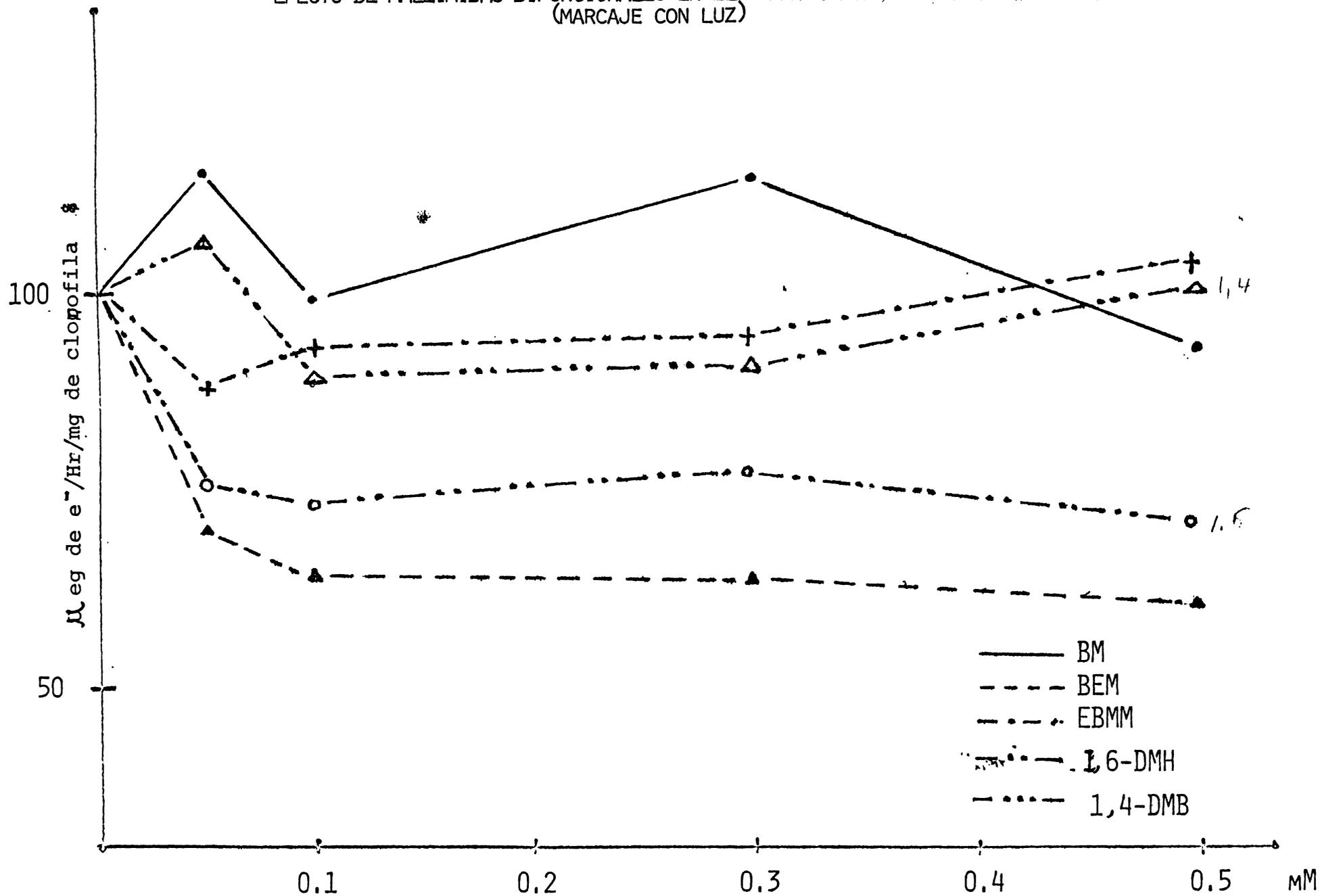


Además es importante hacer notar que al ser maleimidas de diferentes longitudes hidrocarbonadas lo más lógico esperable es que se encontrará una distancia óptima de inhibición y sea de la cadena transportadora de electrones o de la síntesis de ATP, pero como puede verse aquí, no hay relación entre la longitud de la cadena hidrocarbonada y la inhibición.

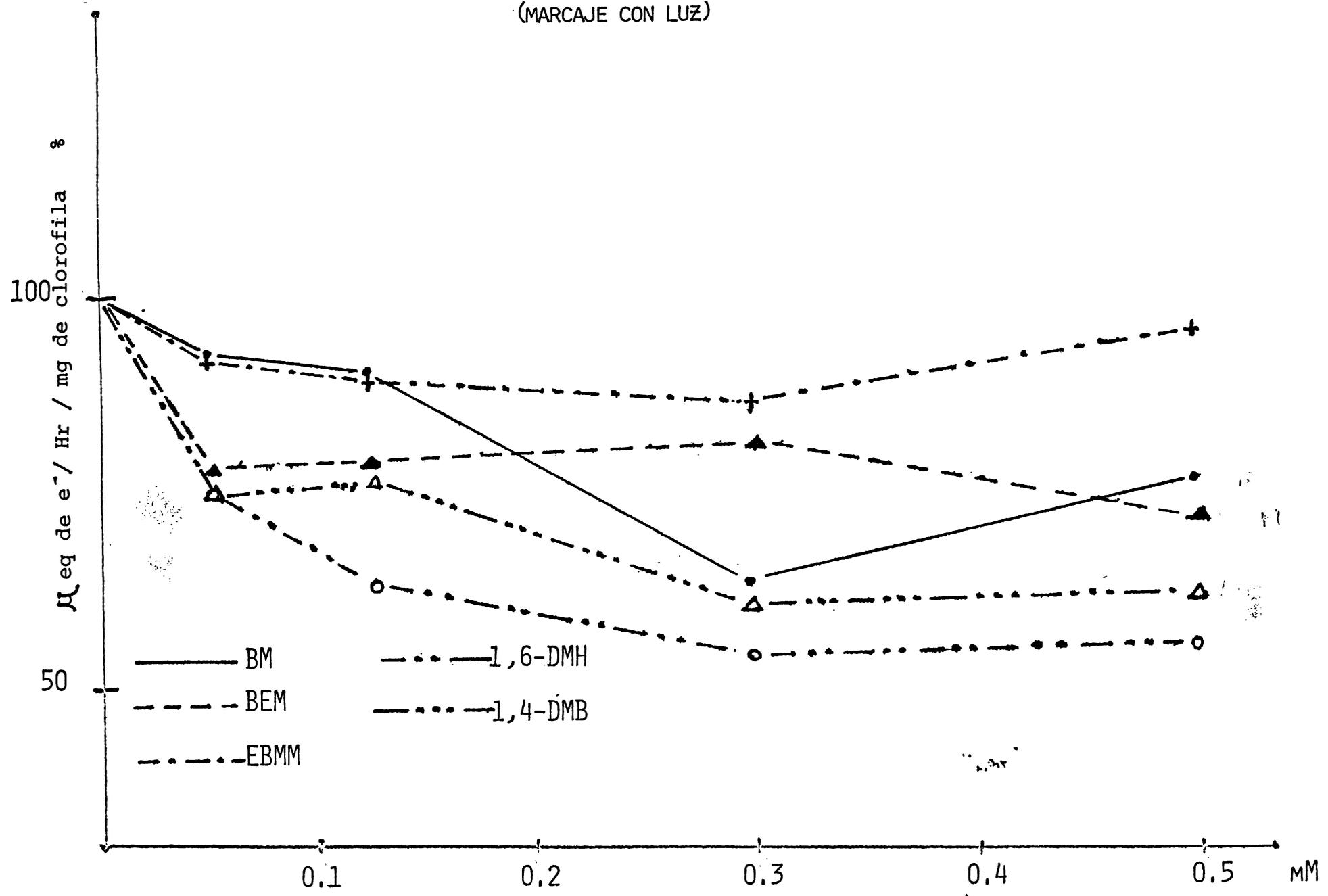
Con respecto al transporte de electrones fosforilante (figuras V-10 y V-12) se puede observar que el transporte de electrones fosforilante es afectado por todas las maleimidas a excepción de EBM cuando se incuban los tilacoides con maleimidas en la luz. Para el caso de EEM y 1,6-DMH era lógico ya que como dijimos antes son inhibidores del transporte de electrones, lo que es comprobado por la inhibición que muestran estos compuestos en la oscuridad (fig V-12), aquí es interesante hacer notar que 1,4-DMF activa el transporte de electrones fosforilante en la oscuridad.

En el caso de 1,4-DMB se observa entonces una inhibición del transporte de electrones fosforilante cuando se incuban los tilacoides con maleimidas en la luz lo cual podría sugerir que este compuesto o está actuando sobre la ATPasa ó está actuando a nivel de las reacciones de transferencia de energía; sin embargo, este mismo compuesto muestra un

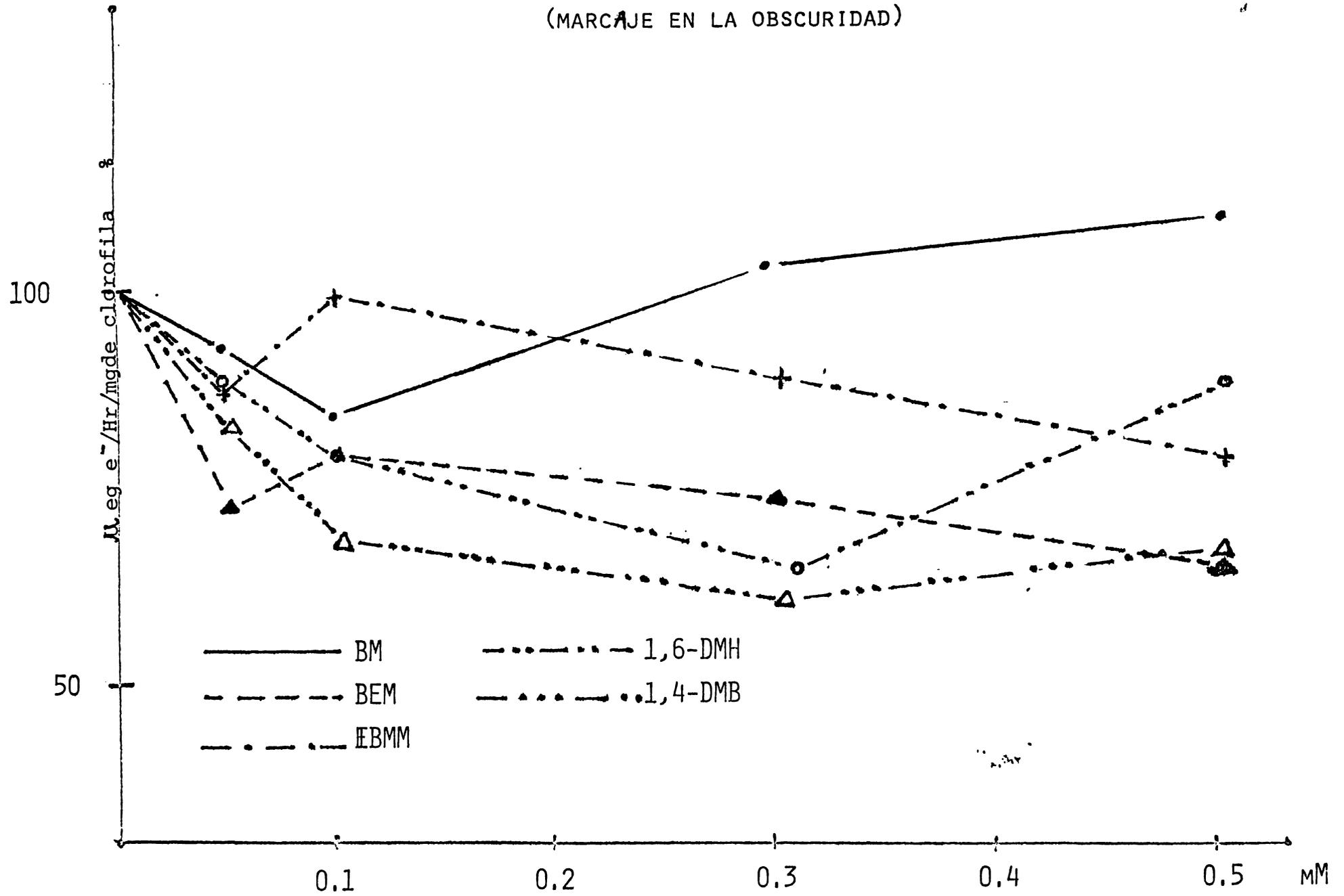
EFECTO DE MALEIMIDAS BIFUNCIONALES EN EL TRANSPORTE DE ELECTRONES BASAL
(MARCAJE CON LUZ)



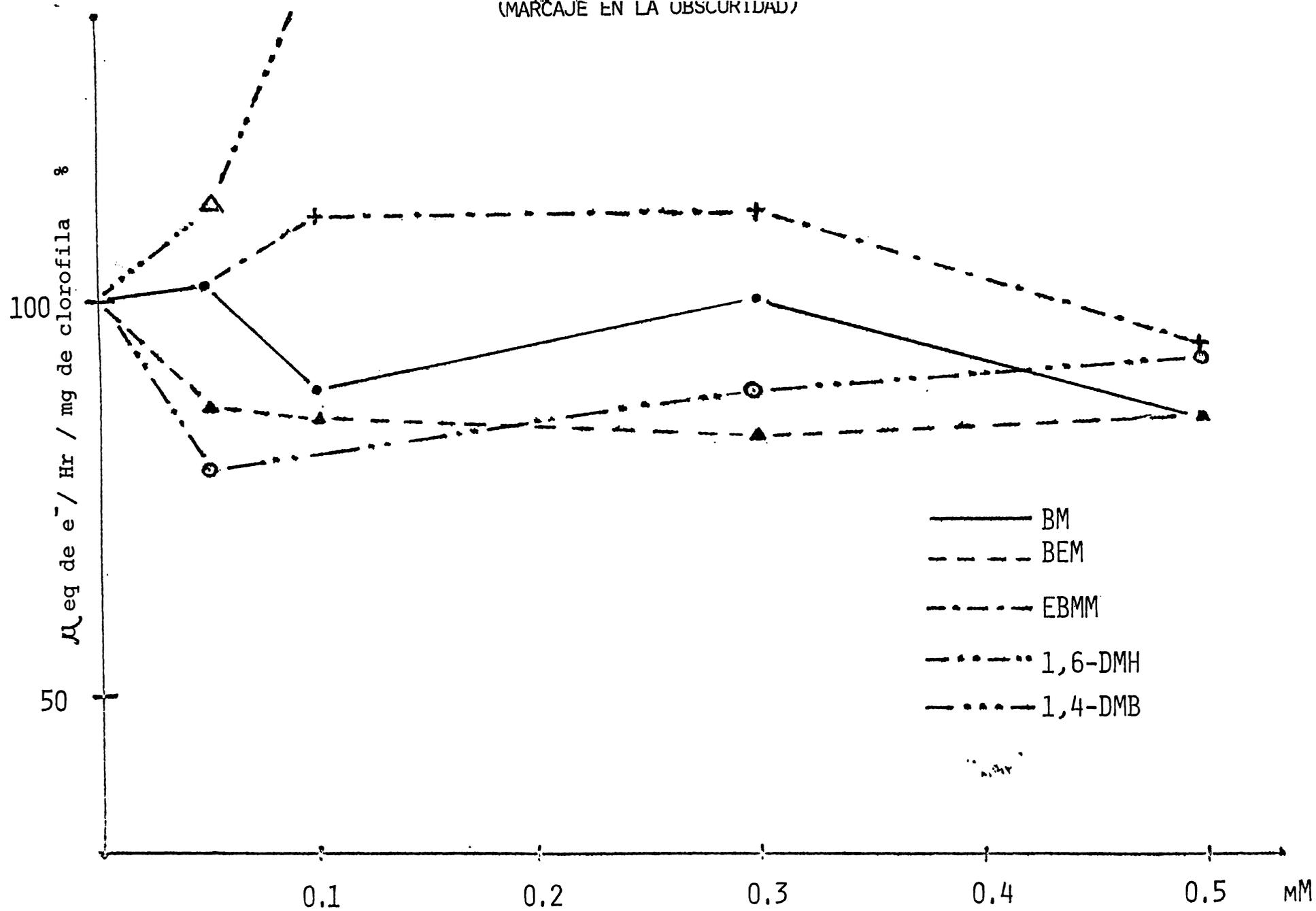
(MARCAJE CON LUZ)



ELECCIÓN DE TALLERES DIFERENCIALES EN EL TRABAJO DE [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]
 (MARCAJE EN LA OSCURIDAD)



(MARCAJE EN LA OSCURIDAD)



incremento en el transporte de electrones fosforilante cuando se realiza la incubación en la oscuridad y entonces esto podría sugerir que es un desacoplante, pero esto se sabrá cuando se analicen los resultados de la bomba de protones y fotofosforilación. Para BM se puede observar una ligera inhibición del transporte de electrones fosforilante tanto cuando se incuba en la luz como en la oscuridad lo que entonces sugiere que entonces sugiere que este compuesto o actúa a nivel de las reacciones de transferencia de energía o bien sobre la ATPasa, pero aun es más interesante notar que EBMM casi no actúa en el transporte de electrones fosforilante ni en la luz ni en la oscuridad, lo que entonces quiere decir que EBMM está entrecruzando en grupos -SH diferentes a los que entrecruzan las demás maleimidias.

4.- Efecto de maleimidias bifuncionales sobre la - bomba de protones.

Como puede observarse en las figuras V-13 y V-15 las maleimidias 1,6-DMH y BEM no presentan ningun efecto en la bomba de protones ni cuando se incuba en la luz ni cuando se incuba en la oscuridad, lo cual concuerda con el hecho de que inhiben a la cadena transportadora de electrones, pero para que esto sea realmente concordante, es

necesario entonces proponer que estas maleimidias -
inhiben a nivel de PS II y no antes, ya que si fuera
así deberían inhibir a la bomba de protones, --
para el caso de 1,4-DMB se puede observar que inhibe
a la bomba de protones tanto en luz como en obscuridad
unicamente cuando se halla en altas concentraciones,
siendo mayor su efecto cuando la incubación
se hace en la luz, tal vez porque se una a --
alguna proteína íntimamente ligada a la cadena --
transportadora de electrones como se había sugerido
anteriormente y de ser así esta proteína debe es-
tar en PS II. El compuesto más interesante en la
inhibición de la bomba de protones, es el EBDM ya
que este es el más potente inhibidor de la bomba -
de protones y solamente inhibe en presencia de la
luz, lo cual puede sugerir que este compuesto ac-
tuá específicamente sobre la bomba de protones y
solamente la inhibe en presencia de la luz lo cual
indica que es indispensable la luz para que se pueda
llevar a cabo esta inhibición tal vez porque la
luz induce un cambio conformacional que permite -
que se expongan grupos -SH a los cuales se puede
unir este compuesto siendo muy importante el he-
cho de que estos grupos -SH tienen una distancia -
igual a la que existe entre los centros reactivos
de esta maleimida lo que explica porque solamente
esta maleimida produce este efecto de inhibición

de la bomba de protones.

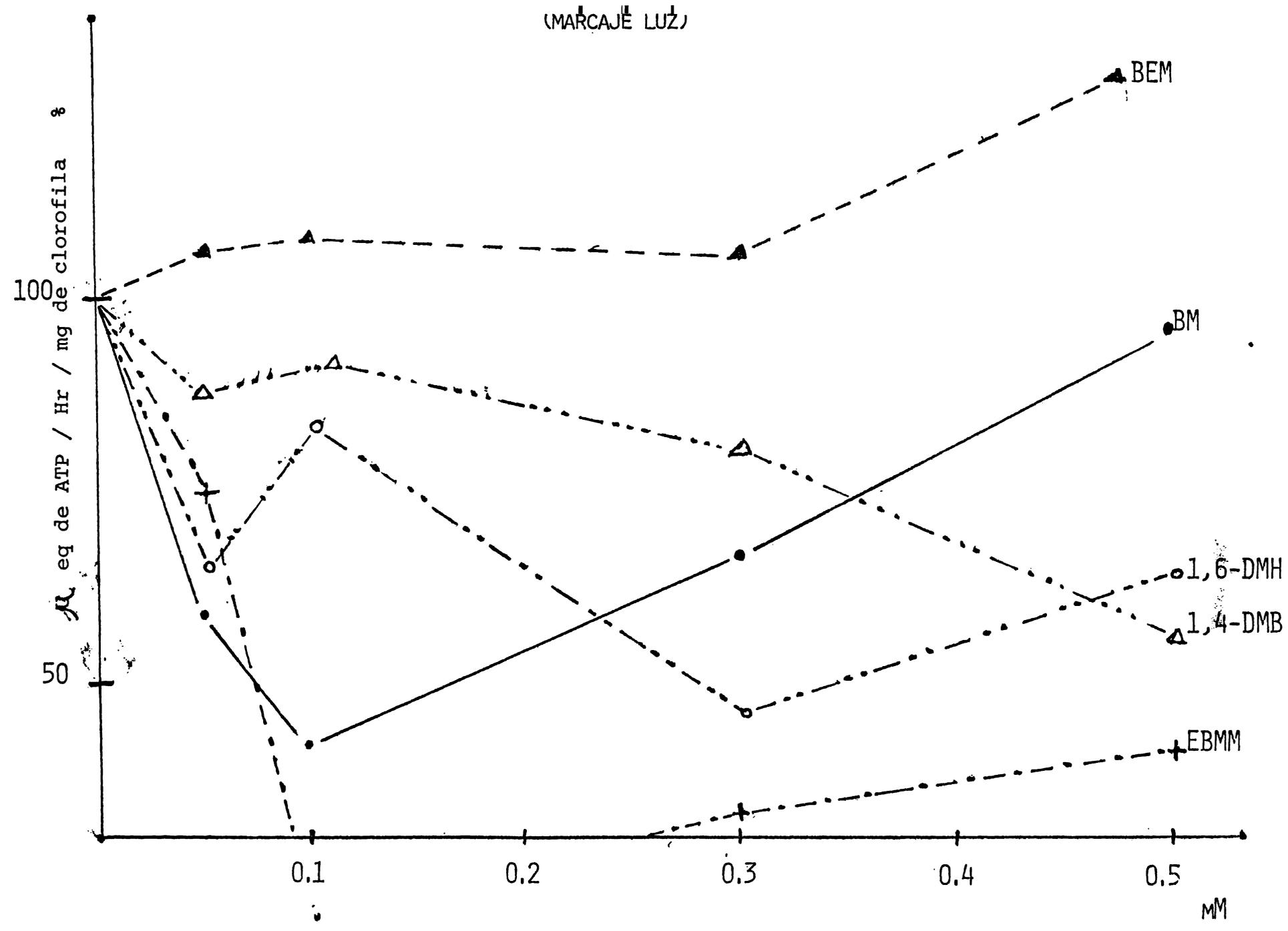
Finalmente tambien se puede observar que BM es un potente inhibidor de la bomba de protones cuando se incuba con tilacoides en la luz, pero esta maleimida presenta un efecto de inhibición sumamente interesante, ya que inhibe unicamente a la concentración de 0.1 mM y despues de esta concentración se revierte su efecto inhibitorio como puede observarse en la figura V-13, en cambio cuando los tilacoides se incuban en la obscuridad no se presenta ningun efecto inhibitorio.

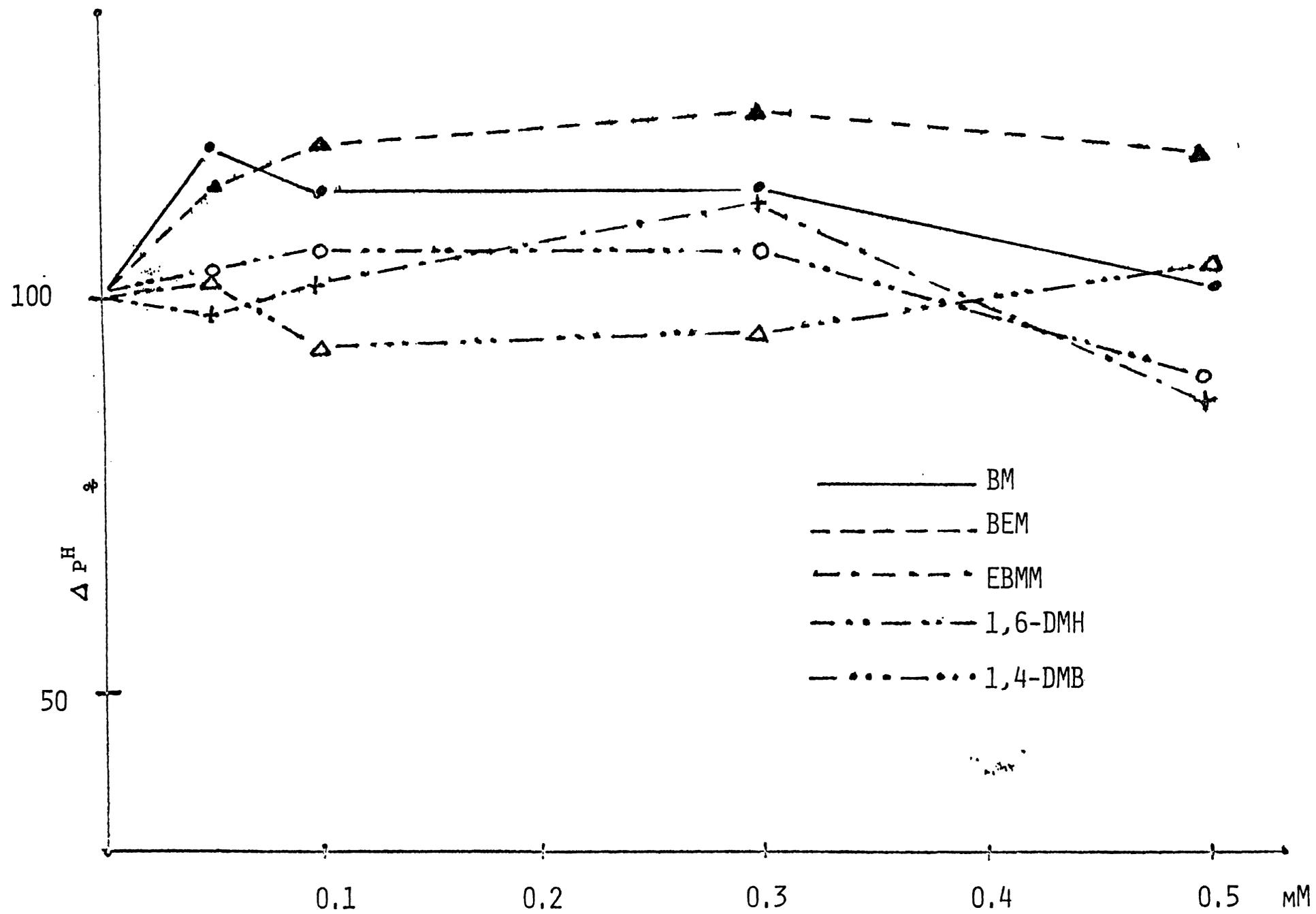
5.- Efecto de maleimidias bifuncionales en la fotofosforilación.

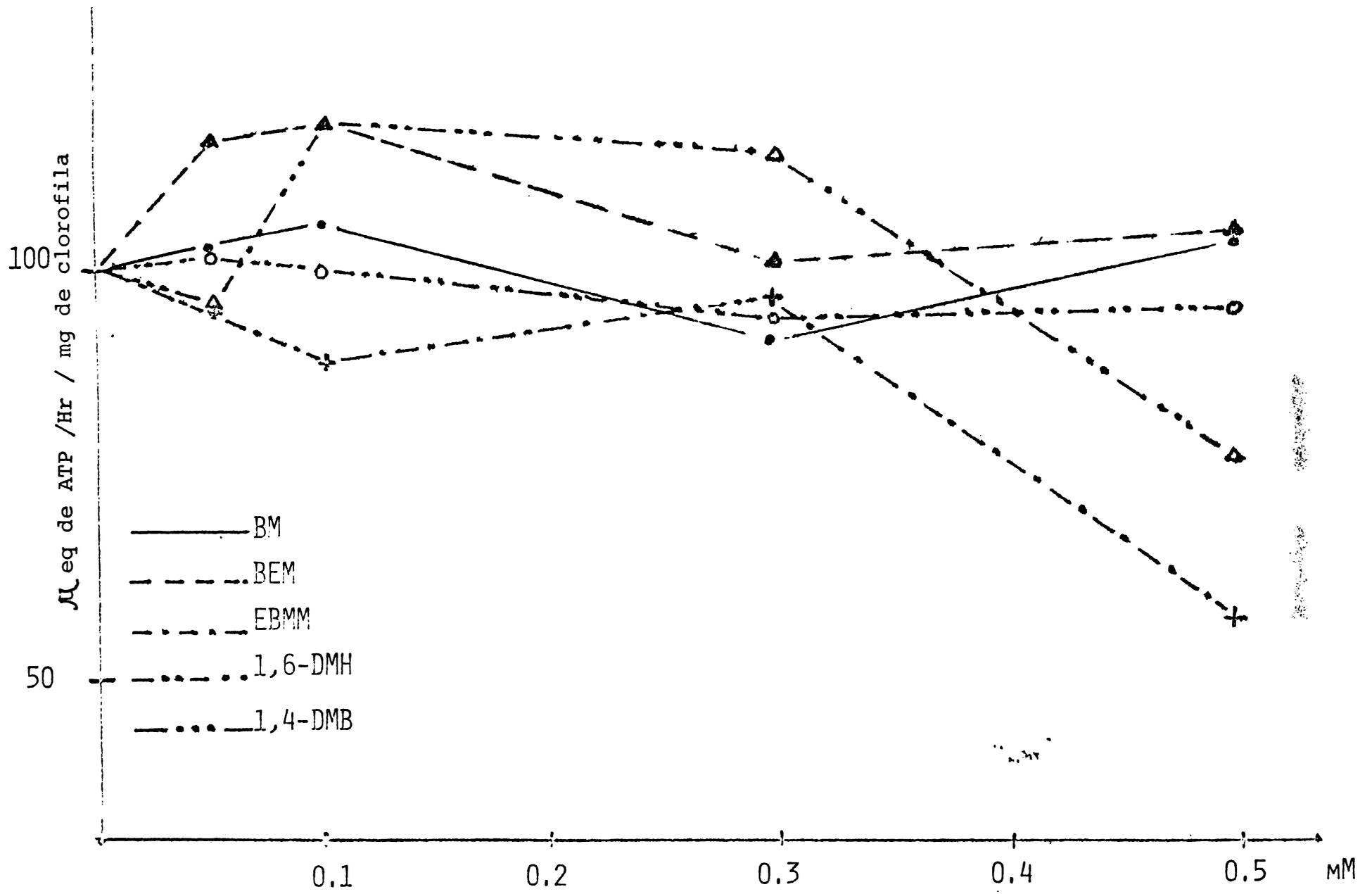
En las figuras V-14 y V-16 se muestra el -- efecto de las amleimidias bifuncionales en la fotofosforilación y como puede verse a excepción de -- EBMM y 1,4-DME que inhiben potentemente la foto-- fosforilación, las demás maleimidias no presentan ningun efecto sobre la fotofosforilacion cuando - los tilacoides son incubados con las maleimidias - en la oscuridad.

En el caso de la incubacion con la luz, nuevamente se ve que EBMM es el mas potente inhibidor de la fotofosforilacion lo cual es logico porque - este compuesto es el más potente inhibidor de la - bomba de protones, lo que entonces nos confirma --

(MARCAJE LUZ)







que este compuesto actúa a nivel de la bomba de protones pero no nos descarta la posibilidad de que actúe a nivel de CF_1 , por otro lado se vuelve a ver este efecto de EM de inhibir a la concentración de 0.1 mM y luego revertir su efecto, lo que también indica que también actúa a nivel de bomba de protones. Se ve una inhibición de 1,4-DMB la cual nuevamente se hace muy evidente a concentraciones altas lo que entonces confirma que está -- actuando sobre cadena transportadora de electrones como ya se dijo y entonces esta inhibición de la fotosíntesis no es más que un reflejo de su acción en la cadena de transporte de electrones, -- también puede observarse una inhibición por parte de 1,6-DMH la cual se debe a que como ya se mencionó es un inhibidor de la cadena de transporte de electrones y en el caso de EM es interesante e -- intrigante ver que siendo un inhibidor de la cadena de transporte de electrones no inhiba a la fotosíntesis.

De lo anteriormente expuesto, se puede concluir que ; EM es un inhibidor de la cadena de transporte de electrones.

1,6-DMH inhibe a la fotosíntesis debido a que es un inhibidor de la cadena transportadora de electrones.

1,4-DMB es un compuesto que probablemente se encuenen

tre actuando sobre una proteína de membrana intimamente ligada con la cadena de transporte de electrones y de ser así muy probablemente esta proteína se encuentra en PS II.

EBMM Se encuentra actuando o bien a nivel de la bomba de protones o bien sobre alguna subunidad de la ATPasa que sea capaz de bloquear o no el canal de protones.

BM Tiene una acción similar a la de EBMM, pero esta está actuando a un nivel diferente lo cual es lógico porque es muy diferente la distancia entre los núcleos reactivos de BM y de EBMM.

6.- Efecto de maleimidas bifuncionales en la fotofosforilación y bomba de protones previo marcaje con NEM en la oscuridad.

Como con los datos anteriores era muy difícil concluir que EBMM inhibía únicamente a la bomba de protones, era necesario probar esta hipótesis, además si teníamos una reacción de entrecruzamiento con subunidades de CF_I era necesario saber si los grupos -SH que estábamos entrecruzando eran los que se exponen en la luz o se trataba de un entrecruzamiento como el reportado por el Dr Mc Carty en su revisión de 1980 en donde se indica que hay un entrecruzamiento entre un grupo que se expone en la

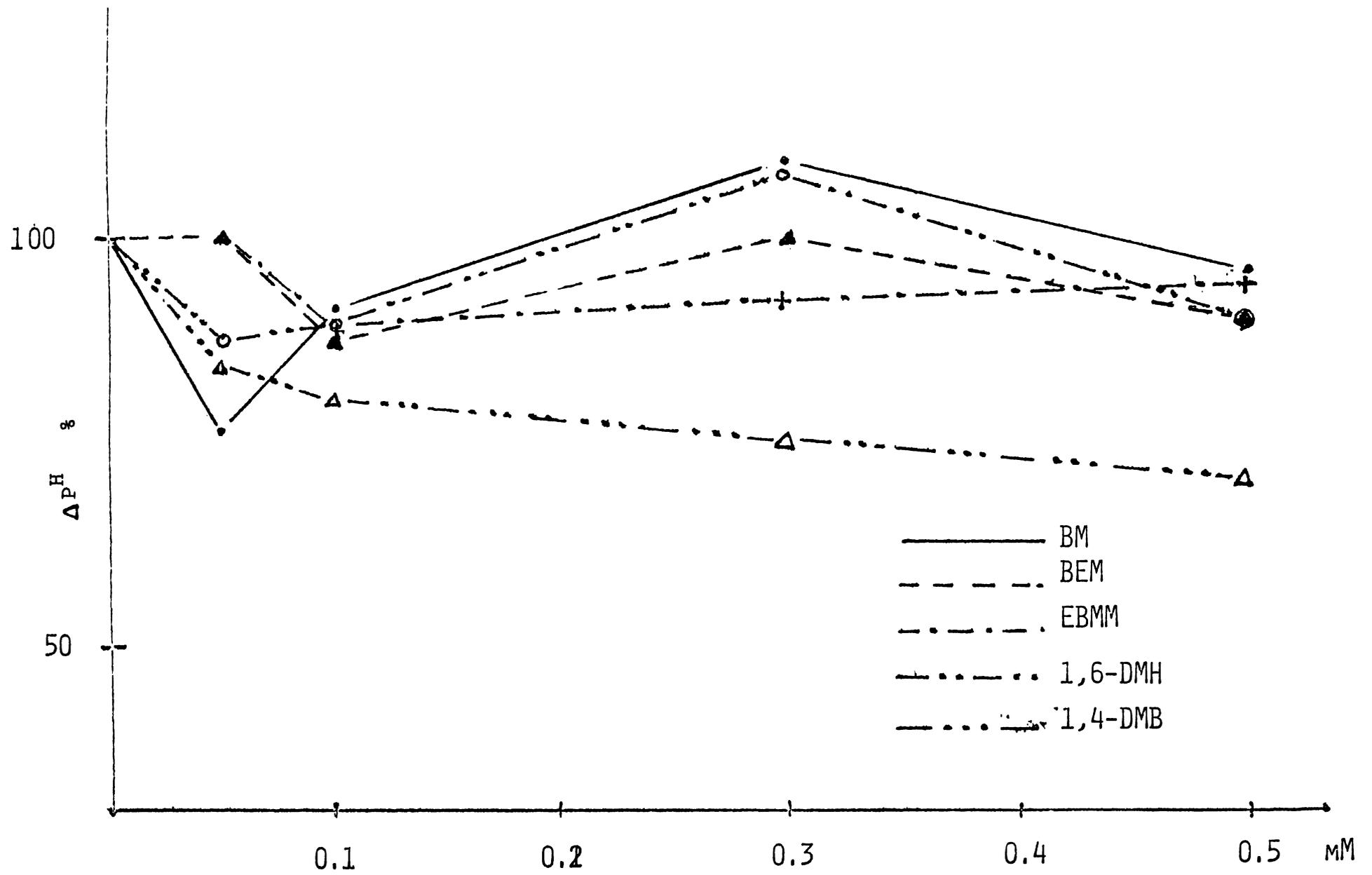
obscuridad y un grupo que se expone en la luz, o eran dos grupos de diferentes subunidades que se exponen en la obscuridad, por lo que se decidió realizar una incubación con NEM en la obscuridad (ya que se ha comprobado que en estas condiciones NEM no afecta a ninguna de las mediciones que se van a realizar) para bloquear los grupos -SH que pudieran servir de ancla para que se unieran estas maleimidias bifuncionales, y los resultados que se obtuvieron son los siguientes:

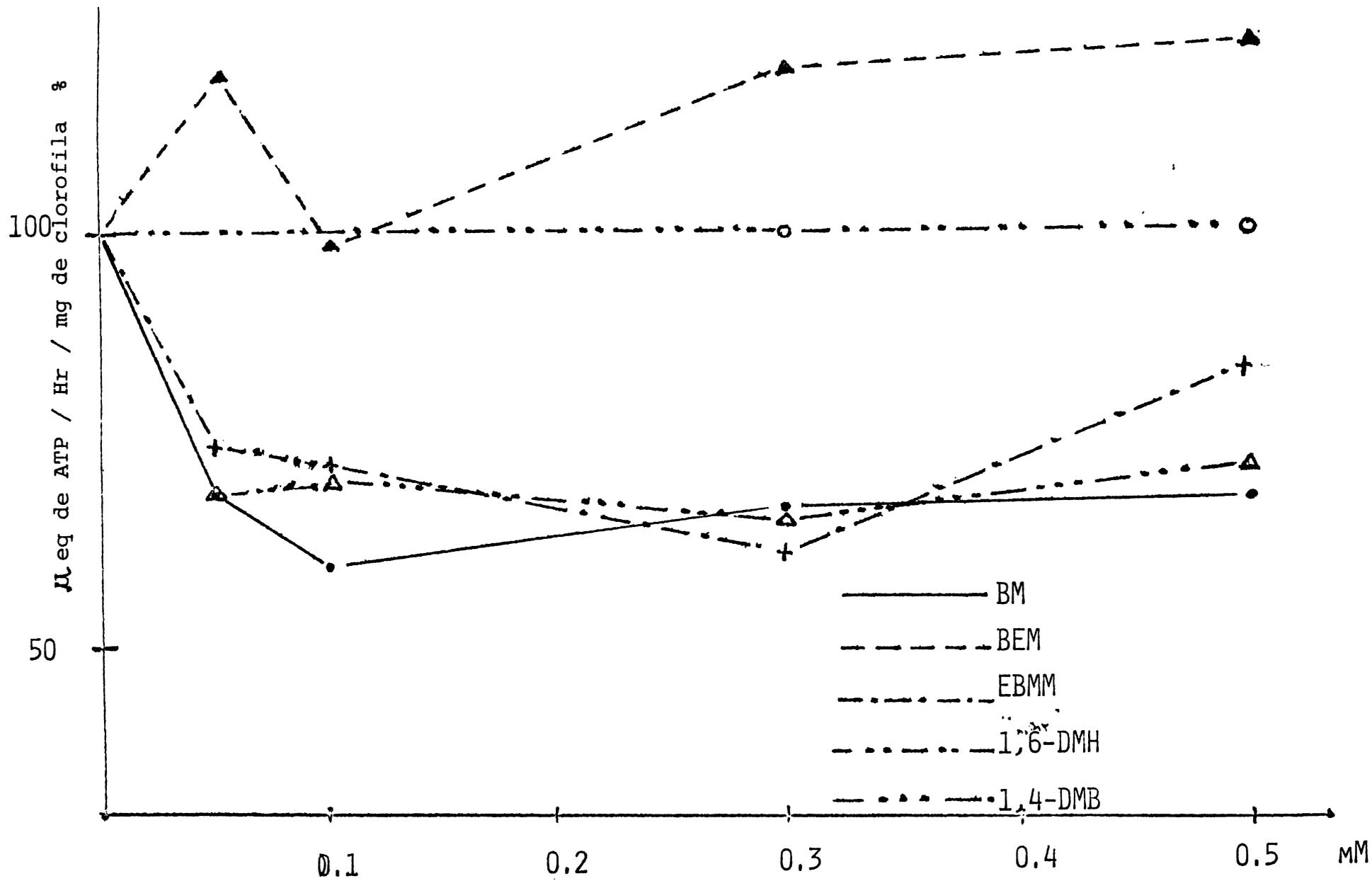
Bomba de protones .- Como puede verse en la figura V-17 ninguna de las maleimidias bifuncionales actúa ahora sobre la bomba de protones a excepción de -- 1,4-DME, lo que termina de comprobar que este compuesto actúa a nivel de la cadena transportadora de electrones y no en bomba de protones, lo cual se sugiere ya que la cinética de inhibición es igual a la observada en la figura V-13, por otro lado -- esto confirma que hay un entrecruzamiento entre -- dos grupos -SH que están expuestos en la obscuridad y EBMM es quien se pega en ellos, ya que cuando se bloquean estos ya no se puede pegar EBMM y entonces ya no es capaz de inhibir a la bomba de protones, lo que entonces abre la posibilidad de que EBMM es un compuesto muy específico para la bomba de protones y entonces con la ayuda de EBMM se puede tratar de localizar en que parte de la

membrana se haya localizada la bomba de protones, finalmente es interesante observar que EM sigue conservando su cinética de inhibición en la bomba de protones pero este compuesto se une a dos grupos -SH que se exponen únicamente en la luz.

Fotofosforilación

Como puede observarse en la figura V-18 BEM -- conserva su misma cinética de inhibición que en los casos anteriores, caso curioso es el 1,6-DMH ya que este compuesto ahora no inhibe nada, lo quiere decir entonces que si está actuando a nivel de la ATPasa o también pudiera significar que este compuesto necesita de grupos -SH que se expongan en la luz para que pueda actuar en la cadena transportadora de electrones y es por eso que aquí no muestra efecto, pero con los datos que se tienen no puede ser aclarado. Para el caso de 1,4-DMB es importante hacer notar que aquí ha cambiado la cinética de inhibición lo que sugiere que además de actuar en la cadena transportadora de electrones como ya se describió, también interacciona con la ATPasa y en este caso actúa en diferentes lugares, o bien es posible que como ahora ya no hay grupos con los cuales puede anclarse, entonces ataca a la ATPasa. Cuando se analiza la cinética de inhibición de EM ahora se ve que ha desaparecido por completo esa inhibición a 0.1 mM que después se revertía y ahora se tiene





una cinética de inhibición constante, lo que nos indica de que se une a dos grupos -SH que solamente se exponen en la luz y antes se unía a uno expuesto en la luz y otro expuesto en la oscuridad o a lo mejor a dos expuestos en la oscuridad que no eran responsables de la síntesis de ATP pero como había entrecruzamiento entonces se impedía el libre movimiento de las subunidades de la molécula de CF_I . Finalmente cuando se ve la inhibición de EBM se ve que hay una inhibición menor de la observada anteriormente pero con la misma tendencia lo que entonces indica que hay un efecto sumado de inhibición de la bomba de protones y otro de inhibición de la ATPasa, sin que por esto este compuesto deje de ser útil como para ser usado para localizar a la bomba de protones en la membrana.

Ahora que ya se sabía que estos compuestos tenían una acción directa o indirecta sobre CF_I - lo que nos faltaba saber es si ellos actuaban sobre la subunidad catalítica o no, lo cual se pudo saber al incubar tilacoides con estos compuestos en presencia de nucleótidos como ATP, ADP y los resultados son los siguientes:

EFFECTO DE B M EN LA BOMBA DE PROTONES

CONDICIONES DE TRATAMIENTO	$\Delta \text{pH} \%$
LUZ	100.00
LUZ + B M	81.8 ± 9.90
LUZ + B M + P _i	77.19 ± 9.90
LUZ + B M + P _i + ADP	105.19 ± 17.30
LUZ + B M + ADP	97.4 ± 16.30
LUZ + B M + ATP	94.1 ± 17.60
LUZ + B M + ATP + P _i	94.3 ± 6.70

Marcaje en luz por 1 minuto con 0.1 mM de B M en medio de resuspensión.

EFFECTO DE B M EN LA FOTOFOSFORILACION

CONDICIONES DE TRATAMIENTO	SINTESIS DE ATP %
LUZ	100.00
LUZ + B M	78.20 ± 10.40
LUZ + B M + P _I	71.50 ± 25.40
LUZ + B M + P _I + ADP	79.50 ± 4.90
LUZ + B M + ADP	83.10 ± 13.90
LUZ + B M + ATP	85.40 ± 20.00
LUZ + B M + ATP + P _I	102.60 ± 7.10

Marcaje con luz por 1 minuto con 0.1 mM de B M en medio de resuspension sin B S A

EFFECTO DE B E M EN LA FOTOFOSFORILACION

CONDICIONES DE TRATAMIENTO	SINTESIS DE ATP %
LUZ	100.00
LUZ + B E M	86.20 ± 13.00
LUZ + B E M + P _i	84.00 ± 21.90
LUZ + B E M + P _i + ADP	95.00 ± 12.42
LUZ + B E M + ADP	97.00 ± 21.00
LUZ + B E M + ATP	103.60 ± 20.40
LUZ + B E M + ATP + P _i	113.81 ± 13.85

Marcaje con luz por 1 minuto con 0.1 mM de B E M en medio de resuspension sin B S A

EFFECTO DE B E M EN LA BOMBA DE PROTONES

CONDICIONES DE TRATAMIENTO	Δ pH %
LUZ	100.00
LUZ + B E M	92.50 ± 8.20
LUZ + B E M + P _i	101.55 ± 23.00
LUZ + B E M + P _i + ADP	96.32 ± 13.70
LUZ + B E M + ADP	103.20 ± 3.34
LUZ + B E M + ATP	105.18 ± 16.50
LUZ + B E M + ATP + P _i	99.57 ± 8.30

Marcaje con luz por 1 minuto con 0.1 mM de B E M en medio de resuspension sin B S A

EFEECTO DE E B M M EN LA BOMBA DE PROTONES

CONDICIONES DE TRATAMIENTO	ΔpH %
LUZ	100.00
LUZ + E B M M	80,55 ± 9,49
LUZ + E B M M + P _i	83,35 ± 10,40
LUZ + E B M M + P _i + ADP	99,69 ± 10,60
LUZ + E B M M + ADP	108,64 ± 24,12
LUZ + E B M M + ATP	93,94 ± 12,71
LUZ + E B M M + ATP + P _i	91,58 ± 13,8

Marcaje con luz por 1 minuto con 0.1 mM de E B M M en medio de resuspension sin B S A

EFEECTO DE E B M M EN LA FOTOFOSFORILACION

CONDICIONES DE TRATAMIENTO	SINTESIS DE ATP %
LUZ	100.00
LUZ + E B M M	40.72 ± 22.20
LUZ + E B M M + P _I	55.66 ± 19.52
LUZ + E B M M + P _I + ADP	46.8 ± 32.80
LUZ + E B M M + ADP	94.40 ± 27.04
LUZ + E B M M + ATP	105.36 ± 12.10
LUZ + E B M M + ATP + P _I	130.15 ± 39.52

Marcaje con luz por 1 minuto con 0.1 mM de E B M M en medio de resuspension sin B S A

EFFECTO DE 1,4 - D M B EN LA BOMBA DE PROTONES

CONDICIONES DE TRATAMIENTO	Δ pH %
LUZ	100.00
LUZ + 1,4-- D M B	87.94 \pm 12.34
LUZ + 1,4 - D M B + P _i	87.61 \pm 12.05
LUZ + 1,4 - D M B + P _i + ADP	91.45 \pm 16.99
LUZ + 1,4 - D M B + ADP	106.53 \pm 21.62
LUZ + 1,4 - D M B + ATP	95.83 \pm 7.75
LUZ + 1,4 - D M B + ATP + P _i	117.72 \pm 16.6

Marcaje en la luz por 1 minuto con 0.1 mM de 1,4 - D M B en medio de resuspension sin B_S A

EFECTO DE 1,4 - D M β EN LA FOTOFOSFORILACION

CONDICIONES DE TRATAMIENTO	SINTESIS DE ATP %
LUZ	100.00
LUZ + 1,4 - D M β	52.92 \pm 29.28
LUZ + 1,4 - D M β + P _i	70.39 \pm 27.12
LUZ + 1,4 - D M β + P _i + ADP	105.89 \pm 15.72
LUZ + 1,4 - D M β + ADP	93.6 \pm 12.02
LUZ + 1,4 - D M β + ATP	69.21 \pm 21.86
LUZ + 1,4 - D M β + ATP + P _i	88.42 \pm 10.33

Marcaje en la luz por 1 minuto con 0.1 mM de 1,4 - D M β en medio de resuspension sin B S A

EFECCIO DE 1,6 - D M H EN LA BOMBA DE PROTONES

CONDICIONES DE TRATAMIENTO.	Δ pH %
LUZ	100.00
LUZ + 1,6 - D M H.	107.00 \pm 11.84
LUZ + 1,6 - D M H + P _i	107.11 \pm 1.47
LUZ + 1,6 - D M H + P _i + ADP	91.68 \pm 20.00
LUZ + 1,6 - D M H + ADP	108.25 \pm 7.14
LUZ + 1,6 - D M H + ATP	108.21 \pm 8.84
LUZ + 1,6 - D M H + ATP + P _i	96.38 \pm 5.95

Marcaje en la luz por 1 minuto con 0.1 mM de 1,6 - D M H en medio de resuspension sin B S A

EFEECTO DE 1,6 - D M H EN LA FOTOFOSFORILACION

CONDICIONES DE TRATAMIENTO	SINTESIS DE ATP %
LUZ	100.00
LUZ + 1,6 - D M H	94.94 ± 4.02
LUZ + 1,6 - D M H + P _i	86.64 ± 11.78
LUZ + 1,6 - D M H + P _i + ADP	112.67 ± 6.02
LUZ + 1,6 - D M H + ADP	100.00 ± 15.00
LUZ + 1,6 - D M H + ATP	92.21 ± 11.57
LUZ + 1,6 - D M H + ATP + P _i	74.10 ± 15.45

Marcaje en la luz por un minuto con 0.1 mM de 1,6 - D M H en medio de resuspension sin P.S.A

Como puede verse en las tablas V-1 y V-2 el efecto de BM practicamente no se ve afectado por la acción de los nucleotidos al igual que para el caso de BEM - que se muestra en las tablas V-3 y V-4. Pero para el caso de EBEM se ve que hay una reversión parcial - de su efecto tanto en bomba como en fotofosforilación lo que puede indicar que este compuesto está pegando en el sitio catalítico de la enzima, lo cual explica porque se revierte su efecto en la fotofosforilación y tambien es posible que se este uniendo a alguna subunidad que regule el flujo de protones y esto explicaría el porque de la reversión de la bomba de protones. en el caso de 1,4-DNB tambien se ve una reversión parcial de su efecto, lo que nos confirma que si actúa sobre CF_I y que probablemente su acción sea sobre la subunidad catalítica. Finalmente en 1,6-DMH no se observa ningun cambio.

De lo anteriormente expuesto, se puede concluir - que las maleimidias bifuncionales que poseen una distancia entre grupo reactivo y grupo reactivo que se halle en el intervalo de los 8.8 A a los 9.2 A son -- probablemente capaces de entrecruzar a la subunidad - catalítica de CF_I y otra subunidad que se halle a una distancia aproximada de 8.5 A. Pero tambien es posible observar que esta distancia no es única ya que BM que tiene 5.5 A tambien inhibe la sintesis de ATP, lo que quiere decir que hay diferentes grupos -SH invo--

lucrados en la fotofosforilación que además se encuentran a diferentes distancias entre sí. Lo único que entonces queda saber es cual o cuales son las subunidades involucradas en este proceso, lo cual solo se podrá saber por medio de la electroforesis de las diferentes subunidades que fueron entrecruzadas tanto con maleimidias frías como ahora haciendo uso - de maleimidias radioactivas, pero como eso no es parte del objetivo de este trabajo solo me corresponde dejar esta posibilidad abierta, así como la posibilidad de localizar a la bomba de protones con ayuda de estos reactivos de entrecruzamiento, lo cual espero que pronto sea realizado.

A G R A D E C I M I E N T O S

Como es de imaginarse, este trabajo nunca hubiera podido hacerlo solo, por eso es que por medio de la presente, quiero hacer patente mi más -- profundo agradecimiento a quienes colaboraron en su realización.

Al Dr Blas Lotina Hennsen, por el tiempo que dedicó para dirigirme este trabajo, así como su revisión, pero más que nada por su paciencia.

A la QFB Ma Del Carmen Farra por invitarme al laboratorio donde habría de realizar mi tesis .

A Mercedes Eaca porque esta tesis es tan suya como mía y sobre todo porque siempre me brindó su mano amiga así como su estímulo y comprensión.

A Victor Manuel Loyola por su valiosa colaboración y sus magníficas fotografías de las moléculas.

A mi madre y a mi hermana por su eterno apoyo y estímulo cuando realizaba este trabajo.

A la Dra Martha Albores y al Dr Eduardo Marambio quienes gracias a su dedicación y esfuerzo hicieron posible que Patricia y Ana pudieran sintetizar los reactivos que usé.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de esta tesis y que ahora escapan a mi memoria.

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

- 1.- Albores M, García P, Morales J and Lotina B ; Maleimides and Bis Maleimides in Photosynthesis. Second Chemical Congress Of The North American Country ,(1980).
- 2.- Allen M B, Arnon Daniel I, Capindale J E, Whately F R and Durhan Lois J; Photosynthesis by Isolated Chloroplasts , J Am Chem Soc 77 , - 4140-4155, (1955).
- 3.- Andreo Carlos S and Vallejos Ruben H ; Sulphydryl Groups In Photosynthetic Energy Conservation, Biochem Biophys Acta 423, 590-601, (1976)
- 4.- Avron M ; The Electron Transport Chain In Chloroplasts In Bioenergetics Of Photosynthesis. - Govindjee, Acad Press Inc New York, 373-386 (1975).
- 5.- Avron M ; Energy Transduction In chloroplasts; Ann Rev Biochem , 46 143-155, (1977)
- 6.- Avron M ; A Coupling Factor In Photophosphorylation , Biochem Biophys Acta 77, 697-699 , - (1963).
- 7.- Binder Andres, Jagendorf André and Ngo Esther; Isolation and Composition Of The Subunits Of Spinach Chloroplasts Coupling Factor Protein, J Biol Chem 253, 3094-3100 , (1978).
- 8.- Boyer Paul D ; Coupling Mechanism In Capture Transmission And Use Of Energy, Ann Rev Biochem 46, 957-966, (1977).

- 9.- Cantley Lewis C and Hammes Gordon G ; Characterization Of Nucleotide Binding Sites On Chloroplast Coupling Factor I , Biochem , 14, 2968-2975 , (1975).
- 10.-Comas Juan et al Unidad Diversidad y Continuidad De Los Seres Vivos, C.E.C.S.A, Cap 15, - - México, (1973).
- 11.-Conn Eric E & Stumpf P K, Bioquímica Fundamental 2^a Edición, México, Ed Limusa Wiley S.A (1974)
- 12.-Clark L C ; Wolf R, Granger D y Taylor Z, J Appl Physiol , 6, 189, (1953).
- 13.-Fillingame Robert H; The Proton Translocating Pump Of Oxidative Phosphorylation, Ann Rev Biochem 49, 1079-1113, (1980)
- 14.-García G Salvador; Tesis profesional, Fac de Ciencias Químico Biológicas U A G , Chilpancingo - Guerrero, 64 pp (1979).
- 15.-Gould J Michael; Dithiol-Specific Reversal Of - Triphenyl-Tin Inhibition Of CF_0 - Catalized Transmembrane Proton Transfer In Chloroplasts , Febb Lett, 94, 90-94, (1978).
- 16.-Govindjee & Govindjee R ; The Primary Events Of Photosynthesis, Scientific American, 231, - 88-92 , (1977).
- 17.-Hassan M Younis, G Douglas Winget and Efraim - Racker, Requirement Of The δ Subunit Of Chloroplast Coupling Factor I For Photophosphorylation, J Biol Chem, 252, 1814-1818. (1977).

- 18.- Hinckle Peter C and Mc Carty Richard E, Como Fabrican ATP las Células, Investigación y Ciencia, 20 58-75, (1978).
- 19.- Junge Wolfgang, Membrane Potentials In Photosynthesis, Ann Rev Plant Physiol 28, 503-536, (1977).
- 20.- Lavorel Jean.; Hétérogénéité De La Chlorophylle In Vivo I, Biochem Biophys Acta 60, 510-523, (1962).
- 21.- Lavorel Jean ; Hétérogénéité De La Chlorophylle In Vivo II, Biochem Biophys Acta 88, 20-36, (1964).
- 22.- Lehninger A : Bioquímica 2^a Edición, Barcelona, Ed Omega S.A. Cap 22 (1978).
- 23.- Levine RP, The Mechanism Of Photosynthesis, - Scientific American 222 , 58-70, (1969).
- 24.- Lezcano B Araceli; Tesis profesional, Fac Química U N A M, México, 78 pp (1981).
- 25.- Lozada Manuel, Los Distintos Tipos De Fotosíntesis y su regulación, Investigación y Ciencia, 19, 7-18, (1977).
- 26.- Magnuson R P and Mc Carty R E : Influence Of Adenine Nucleotides On The Inhibition Of Photophosphorylation In Spinach Chloroplasts By N-Ethylmaleimide, J Biol Chem, 250, 2593-2598, (1975)

- 27.- Magnuson R E and Mc Carty R E ; Light-Induced Exchange Of Nucleotides Into Coupling Factor I In Spinach Chloroplast Thylakoids, J Biol Chem 251, 7417-7422 (1976).
- 28.- Mackinney G ; Absorption Of Light By Chlorophyll Solutions, J Biol Chem 140, 315-322 (1941).
- 29.- Mc Carty R E, Pitman F R and Tsuchiya Yoko : - Light-Dependent Inhibition By N-ethylmaleimide J Biol Chem 247, 3048-3051. (1972).
- 30.- Mc Carty and Fagan J , J Biochem, 12, 1503-1507 (1973).
- 31.- Mc Carty R E; Roles Of A Coupling Factor For - Photophosphorylation In Chloroplasts, Ann Rev Plant Physiol 30, 79-104, (1979).
- 32.- Miller K R, The Photosynthetic Membrane; Scientific American 241, 102-113, (1979).
- 33.- Mitchell Peter; Coupling Of Phosphorylation To Electron And Hydrogen Transfer By A Chemiosmotic Type Of Mechanism , Nature 191, 144-148, (1961).
- 34.- Mitchell Peter; Chemiosmotic Coupling In Oxidative And Photosynthetic Phosphorylation, Biol Rev 41, 445-502, (1966).
- 35.- Mitchell Peter ; A Chemiosmotic Molecular Mechanism For Proton Translocating Adenosine Triphosphatases Febs Letters 43, 189-194, (1974).

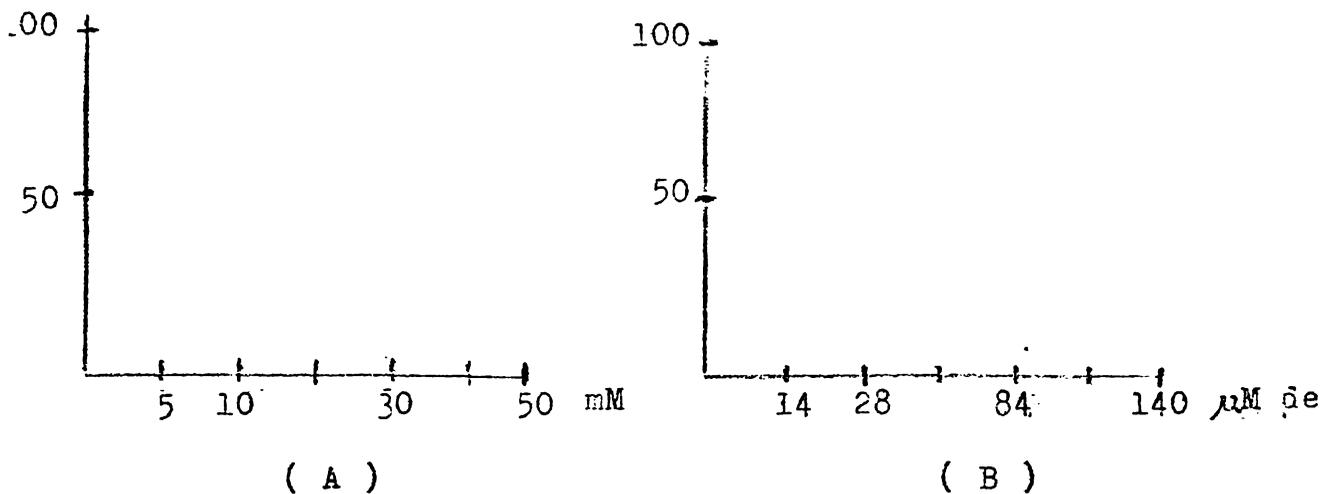
- 36.- Moroney J V, Mc Carty R E ; Reversible Uncoupling By A New Bifunctional Maleimide J Biol Chem 254, 51-89, (1979).
- 37.- Moyses Alexis ; Les Chloroplastes Activité Photosynthétique et Metabolisme Des Glucides. Biochemistry Of Chloroplasts V II I V Goodwin, Academic Press 91-129 (1967).
- 38.- Nabeđryk R, Viala E, Calvet P, Thieri J Galmiche J M and Girault G ; Interaction Of Adenine Nucleotides With The Coupling Factor Of Spinach Chloroplasts Febs Letters, 79, 139-143, --- (1977).
- 39.- Nelson Nathan and Karni Ophira; The Role Of Subunit In The Coupling Activity Of Chloroplast Coupling Factor I, Febs Letters 70, 249-253, (1976).
- 40.- Primera Reunion De La Rama De Bioenergética. Sociedad Mexicana De Bioquímica, Sn Miguel Regla Hgo, México (1979) pp 21-33, 70 .
- 41.- Silva Fortillo Ana Luisa, Tesis profesional - Fac De Química U N A M México (1981).
- 42.- Solis Corina, Tesis profesional Fac De Ciencias U N A M México (1980).
- 43.- Takacky Takeshi, Torres Pereira J and Parker - Lester; Factors Afecting The Stability Of Chloroplast Membranes In Vitro, Biochem Biophys - Acta 352, 260-267 , (1974)

- 44.- Trebst A and Avron M Edited ; Photosynthesis I
New York, Springer-Verlag (1977).
- 45.- Vernon Leo P ; Spectrophotometric Determina-
tion Of Chlorophylls and Pheophytins In Plant
Extracts Analitical Chemistry 32, 1144-1150,
(1960).
- 46.- Verno Leo P and Avron M ; Photosynthesis Ann
Rev Biochem 34, 269-270, (1965).
- 47.- Whittinghan C P ; El Mecanismo De La Fotosintesis
H Blume Editores, Madrid, (1976).

E R R A T A S

P 69 .- En la parte superior izquierda de la representación esquemática de la membrana dice: - - - DESEPIP TMPDDAD y debe decir: DCPIP TMPD,DAD.

En las figuras V-1 a V-8 se encuentra la escala (A) en el eje de las abscisas y la escala que debe tener es la escala (B) .



En las figuras V-9 a V-18 se encuentra la -- escala (A) y las escalas correctas son las siguientes:
Para EM , BEM , EFMM es la escala (B).
Para 1,6-DMH es : 10,43, 128 y 214 μ M respectivamente.
Para 1,4-DMB es : 20, 42, 128 y 214 μ M respectivamente.

En la leyenda de las tablas V-1 a V-6 se menciona 0-1 mM y es 28 μ M ; en las tablas V-7 y V-8 es 20 μ M para las tablas V-9 y V-10 es 10 μ M .