

141 136  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



---

**"ORIENTACION DE LOS CENTROS DE REACCION  
DE RHODOPSEUDOMONAS SPHEROIDES R-26  
EN MEMBRANAS MODELO".**

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A**

**MARIA SITGES BERRONDO**

**México, D. F.**

**1980**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**

**Tesis Digitales**

**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# INDICE .

|          |                                                                                                                                         |      |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1.       | INTRODUCCION .                                                                                                                          | PAG. |
| 1.1.     | GENERALIDADES .                                                                                                                         |      |
| 1.1.1.   | Fotosíntesis .....                                                                                                                      | 1    |
| 1.1.2.   | Organismos Fotosintéticos.....                                                                                                          | 2    |
| 1.2.     | BACTERIAS FOTOSINTETICAS.                                                                                                               |      |
| 1.2.1.   | Ventajas de las Bacterias Fotosintéticas para<br>Investigar la Bioenergética de la Fotosíntesis...                                      | 3    |
| 1.2.2.   | Clasificación de las Bacterias Fotosintéticas....                                                                                       | 4    |
| 1.2.3.   | Morfología de <u>Rhodospseudomonas spheroides</u> ...                                                                                   | 7    |
| 1.3.     | PIGMENTOS FOTOSINTETICOS.....                                                                                                           | 9    |
| 1.4.     | POTENCIAL DE REDUCCION ESTANDAR.....                                                                                                    | 12   |
| 1.5.     | COMPONENTES DEL TRANSPORTE DE ELECTRO<br>NES EN BACTERIAS FOTOSINTETICAS.<br>INDUCIDOS EN LA LUZ O EN CRECIMIENTO<br>FOTOSINTETICO..... | 14   |
| 1.5.1.   | Centros de Reacción ( RC ).....                                                                                                         | 15   |
| 1.5.1.1. | Composición de los RC .....                                                                                                             | 19   |
| 1.5.1.2. | Espectro de Absorción del RC de <u>Rps. spher-</u><br><u>oides</u> .....                                                                | 20   |

|                                                                                          | PAG. |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1.5.1.3. P <sub>870</sub> y Aceptor Primario.....                                        | 22   |
| 1.5.1.4. Tiempos de Reacción de la Reacción Fotoquímica.....                             | 24   |
| 1.5.2. Aceptor Secundario.....                                                           | 25   |
| 1.5.3. Citocromos .....                                                                  | 28   |
| 1.6. TRANSPORTE DE ELECTRONES EN BACTERIAS FOTOSINTETICAS. ....                          | 32   |
| 1.7. COMPLEJO ANTENA.....                                                                | 36   |
| 1.8. MEMBRANAS MODELO .....                                                              | 37   |
| 1.8.1. Membranas lipídicas negras.....                                                   | 38   |
| 1.8.2. Liposomas.....                                                                    | 38   |
| II. METODOS.                                                                             |      |
| II.1. Cultivo de las Bacterias.....                                                      | 44   |
| II.2. Cosecha de las Bacterias.....                                                      | 47   |
| II.3. Obtención de cromatóforos de <u>Rhodospseudomonas spheroides</u> R-26 .....        | 47   |
| II.4. Aislamiento de los centros de reacción ( RC ) de <u>Rps. spheroides</u> R-26 ..... | 48   |
| II.5. Espectro de Absorción de los RC de <u>Rps. spheroides</u> R-26.....                | 50   |

|                                                                                                                                        | PAG. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| II.6. Obtención de los fosfolípidos de la yema de<br>huevo.....                                                                        | 50   |
| II.7. Purificación de lecitinas de yema de huevo.....                                                                                  | 51   |
| II.8. Identificación de la lecitina purificada.....                                                                                    | 51   |
| II.9. Obtención del detergente Tritón X 100 libre de<br>peróxidos.....                                                                 | 51   |
| II.10. Obtención de citocromo "c" reducido.....                                                                                        | 52   |
| II.11. Preparación de liposomas y reconstitución de las<br>membranas modelo.....                                                       | 52   |
| II.12. Medida del estado Redox del citocromo "c".....                                                                                  | 54   |
| II.13. Microscopía electrónica de los liposomas re-<br>constituidos con RC de <u>Rhodopseudomonas spher-</u><br><u>oides</u> R-26..... | 55   |
| II.14. Métodos de Análisis de Resultados.....                                                                                          | 57   |
| III. RESULTADOS.                                                                                                                       |      |
| III.1. Espectro de Absorción de los Centros de Reac-<br>ción de <u>Rhodopseudomonas spheroides</u> R-26.....                           | 59   |
| III.2. Los fosfolípidos oxidados oxidan al citocromo<br>"c" reducido.....                                                              | 64   |
| III.3. Los fosfolípidos en los que se ha evitado la<br>oxidación, no oxidan al citocromo "c" reducido..                                | 67   |

|        | PAG.                                                                                                               |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| III.4. | El detergente Tritón X 100 peroxidado, oxida al<br>citocromo "c" reducido..... 69                                  |
| III.5. | Fotografías de proteoliposomas de RC de <u>Rps.</u><br><u>spheroides</u> R-26 y lecitina pura..... 71              |
| III.6. | Reducción de citocromo "c" por los RC de <u>Rps.</u><br><u>spheroides</u> R-26 reconstituidos en liposomas..... 74 |
| III.7. | Resultados del Análisis de Varianza..... 82                                                                        |
| IV.    | DISCUSION..... 83                                                                                                  |
| V.     | BIBLIOGRAFIA ..... 95                                                                                              |

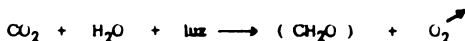
## 1.- INTRODUCCION.

### 1.1. GENERALIDADES.

#### 1.1.1. Fotosíntesis.

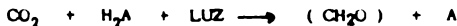
La primera evidencia de la fotosíntesis en bacterias, fue dada por Engelmann en 1888, cuando observó que las bacterias rojas se acumulaban en el espectro de absorción que coincidía exactamente con su espectro de acción.

Para aquel tiempo se conocía la fotosíntesis tipo planta con producción de oxígeno molecular ( $O_2$ ) y fijación de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) en presencia de agua:



Los trabajos de Mollisch en 1907 demostraron que no había producción de  $O_2$  cuando las bacterias eran iluminadas.

Van Niel en 1930 aclaró que las bacterias fotosintéticas son capaces de fijar  $CO_2$  sin liberar  $O_2$ . Como las bacterias fotosintéticas utilizan varias fuentes como reductor, por ejemplo el  $H_2S$ , dependiendo del grupo al que pertenecen, se planteaban varias alternativas que no se ajustaban a la fotosíntesis de las plantas superiores. Esto condujo a formular una ecuación generalizada para la fotosíntesis:



donde A representaría el oxígeno del agua en las plantas superiores ó el azufre de las bacterias fotosintéticas sulfurosas y el ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) ejemplificaría a un carbohidrato generalizado.

Este esquema de Van Niel implica que el oxígeno proviene del agua y no del  $\text{CO}_2$ , lo cual fue demostrado más tarde por Ruben y col. en 1941, quienes con el empleo de oxígeno isotópico para marcar el  $\text{CO}_2$  ó al agua, demostraron que el oxígeno liberado en la fotosíntesis de las plantas superiores provenía del agua y no del  $\text{CO}_2$ .

La fotosíntesis es un proceso en el que la energía de la luz es utilizada para fijar el  $\text{CO}_2$  y formar materia orgánica. La luz interviene en la fotosíntesis para dar lugar, por medio de reacciones fotoquímicas, a una molécula transportadora de energía, el adenosin trifosfato ó ATP y a un equivalente reductor, el nicotinamida-adenin dinucleótido-fosfato ó  $\text{NADPH}_2$  (Arnon, 1959; Arnon, 1960). Las diversas etapas de la fijación del  $\text{CO}_2$  a carbohidratos se conocen a partir de los trabajos de Calvin et al. de 1957. Por este proceso se obtiene toda la energía disponible en la Biosfera.

### 1.1.2. Organismos Fotosintéticos.

Existen dos tipos de organismos fotosintéticos:

- 1.- Los que producen oxígeno molecular durante la fotosíntesis como las plantas superiores, algas verdes rojas y pardas, cianofíceas, diatomeas, dinoflagelados y euglenas.

2.- Los que son capaces de reducir al  $\text{CO}_2$  en presencia de luz sin liberar oxígeno. Las únicas representantes de este tipo de fotosíntesis son las bacterias fotosintéticas.

## 1.2. BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS.

### 1.2.1. Ventajas de las bacterias fotosintéticas para investigar la Bioenergética de la fotosíntesis.

Hemos escogido a las bacterias fotosintéticas para trabajar en la Bioenergética de la Fotosíntesis porque presentan las siguientes ventajas ( Crofts, 1975 ):

1.- Las Rhodospirillaceae ( ver tabla I ), pueden obtenerse creciéndolas tanto fotosintéticamente como aeróbicamente de una forma reproducible.

2.- Los patrones de transporte de electrones se inducen creciendo a estas bacterias en diferentes condiciones de luz ó oxígeno.

3.- Existen mutantes.

4.- Los métodos para aislar cromatóforos y centros de reacción(II.3.; II.4.) ya están descritos.

5.- Por la estabilidad de las preparaciones de cromatóforos y centros de reacción.

6.- Por la simplicidad del sistema de transporte de electrones cíclico.

7.- Porque la iluminación provee tanto equivalentes oxidantes como reductores sin la necesidad de agregar sustratos que tienen pro-

biomas de permeabilidad.

8.- Porque la iluminación por destellos cortos provee extremadamente rápido un sólo equivalente oxidante o reductor.

9.- Hay fenómenos ligados a la energía, como el cambio de caroteno, la fluorescencia retardada, que sirven como indicadores del estado de alta energía.

Los puntos del 7 al 9, son particularmente convenientes para experimentos basados en medidas espectrofotométricas de cinética rápida del flujo de electrones.

#### 1.2.2. Clasificación de las bacterias fotosintéticas.

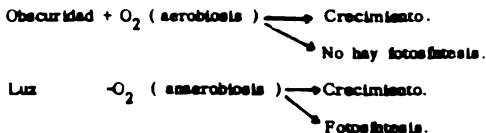
Las bacterias fotosintéticas se dividen con base en su pigmentación y con base en la fuente reductora que utilizan. Por su pigmentación se han subdividido en dos grupos: las bacterias verdes y las bacterias púrpuras. Las primeras son las Chlorobiaceae de la clasificación reciente o las Chlorobacteriaceae de la antigua clasificación. Las bacterias púrpuras se dividen a su vez en dos grupos dependiendo de la fuente reductora que utilizan: las Chromatiaceae que son sulfurosas y las Rhodospirillaceae que no lo son. ( ver tabla 1 ).

Las Chlorobiaceae son bacterias sulfurosas. Un género representativo de las bacterias verdes es Chlorobium. La coloración verde de algunos lagos de montaña es debida a este género. Estas bacterias viven en lagos y charcos ricos en azufre.

Chromatium y Thiospirillum son ejemplos de las bacte-

rias sulfurosas púrpura, antiguamente conocidas como Thiorodaceae. Habitan en medios acuosos ricos en  $H_2S$  y cerca de emanaciones volcánicas. Algunas veces se desarrollan en masa y cubren grandes áreas. Las bacterias púrpuras sulfurosas han sido encontradas en aguas que van desde una salinidad cercana a cero hasta salinidades cercanas a la saturación y desde temperaturas bajo cero, en hielos polares, hasta  $80^{\circ}C$  en aguas termales.

Las bacterias que se utilizaron para realizar la parte experimental de este trabajo pertenecen al grupo de las bacterias púrpuras no sulfurosas o Rhodospirillaceae. En especial se usó Rhodospseudomonas spheroides R-26, que es una mutante carente de carotenos. Estas bacterias son facultativas:



El crecimiento en medios oxigenados y sin luz es de tipo heterotrófico y depende de oxidación. Como sustratos estas bacterias utilizan ácidos orgánicos simples y algunas especies hidrógeno molecular (Gaffron, 1933-1935; Glover y col. 1952). En la naturaleza, las Rhodospirillaceae habitan en cuerpos de agua, pero no se conocen formando aglomeraciones masivas, ni tampoco se ha reportado su crecimiento en condiciones de salinidad ó a temperaturas extremas.

TABLA 1 ( Gromet, Elhann, 1977 ).

| Microorganismo.              | Bacterias Sulfurosas Verdes.                             | Bacterias Púrpura.                                          |                                                        |
|------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|                              |                                                          | Sulfurosas.                                                 | No Sulfurosas.                                         |
| Clasificación Antigua.       | Chlorobacteriaceae.                                      | Thiorodaceae.                                               | Athiorodaceae.                                         |
| Clasificación Reciente.      | Chlorobiaceae.                                           | Chromatiaceae.                                              | Rhodospirillaceae.                                     |
| Géneros representativos.     | <u>Chlorobium</u><br><u>Chloropseudomonas</u> .          | <u>Chromatium</u><br><u>Thiospirillum</u>                   | <u>Rhodospirillum</u><br><u>Rhodopseudomonas</u> .     |
| Pigmentos.                   | Bacterioclorofila "c", "j"<br>Carotenoides monocétlicos. | Bacterioclorofila "a" ó BChl. "b"<br>Carotenoides Acélicos. |                                                        |
| Puente de poder Reductor     | $H_2S$ ; S; $S_2O_3^{2-}$ ó $H_2$                        | $H_2S$ ; S; S; $S_2O_3^{2-}$ ; $H_2$                        | Compuestos Orgánicos<br>( $H_2$ en algunas especies ). |
| Relación con el $O_2$        | Anaeróbicas obligatorias.                                | Anaeróbicas obligatorias.                                   | Muchas especies<br>aeróbicas.<br>Facultativas.         |
| Crecimiento en la oscuridad. | Ninguno.                                                 | Ninguno.                                                    | Sí, aeróbico.                                          |

### 1.2.3. Morfología de Rhodopseudomonas spheroides.

La forma de Rhodopseudomonas spheroides es prácticamente esférica, su tamaño es del orden de 0.7 a 4 micras de diámetro. La coloración de la cepa silvestre es parda en anaerobiosis y roja en presencia de aire, la mutante R-26 de Rhodopseudomonas spheroides presenta una coloración azul-verde en los medios de cultivo líquido anaeróbicos que se exponen a la luz.

Rps. spheroides está constituida por una pared celular y una membrana plasmática separadas por el espacio periplásmico en donde se encuentra, entre otras proteínas, el citocromo " $c_2$ " que está involucrado en el transporte de electrones bacteriano. ( fig. 1 A ).

La membrana plasmática presenta una serie de invaginaciones llamadas cromatóforos que son de especial interés porque en ellos están ubicados los componentes que llevan a cabo la fotofosforilación.

Existen dos tipos de preparaciones de membranas fosforilantes en bacterias fotosintéticas:

1.- Los esteroplastos, donde la pared celular ha sido removida de la bacteria por medio de la enzima lisozima ( fig. 1 B ).

2.- Los cromatóforos, que son partículas obtenidas por ruptura mecánica, en donde parte del citocromo " $c_2$ " queda retenido en el interior de las vesículas ( fig. 1 C ).

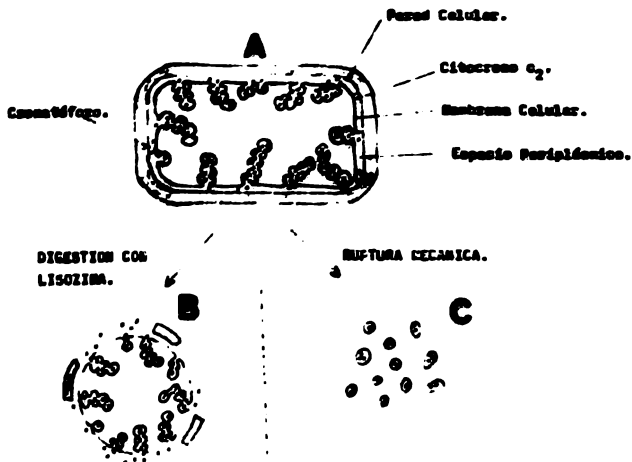


Fig. 1. Esquema General de Bacterias Fotosintéticas. A. Célula Completa. B. Endoplasma. C. Cromatófagos. Nótese que el citocromo " $c_2$ " queda retenido en el interior de los cromatófagos.

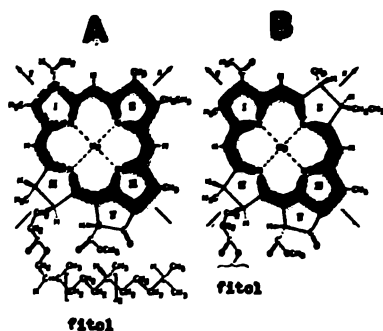
Mitchell ( 1967 ) y Scholes et al. ( 1969 ), con base en los movimientos de protones con iluminación, proponen que la polaridad de la membrana de los cromatóforos aislados es inversa a la polaridad del esteroplasto ó de la bacteria íntegra. Esto, ha sido comprobado por Crofts ( Prince, R.C. y col., 1974 ) por medio de anticuerpos contra centros de reacción y citocromo "  $c_2$  ".

### 1.3. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS:

También en las plantas verdes como en las bacterias fotosintéticas, las clorofilas son los pigmentos responsables de la conversión de energía lumínica a energía química.

La clorofila "a", es el pigmento de las plantas superiores y consiste en una molécula que contiene cuatro anillos pirrólicos sustituidos, uno de los cuales está reducido. Los anillos pirrólicos están dispuestos de tal manera que forman una estructura macrocíclica en la cual los cuatro átomos de nitrógeno centrales están coordinados con un ión magnesio, lateralmente, esta molécula posee una larga cadena hidrófoba o grupo fitol. ( ver fig. 2 A ).

La bacterioclrofila "a", es el pigmento verde de las bacterias púrpuras y difiere de la clorofila "a" de las plantas verdes en que en vez del grupo vinil (  $\text{CH}_2=\text{CH}-$  ) del anillo I, se encuentra un grupo acetil (  $\text{CH}_3-\text{C}=\text{O}$  ) y en que carece de una doble ligadura ( ver fig. 2 ). Estas diferencias químicas, además de las diferencias



**Fig. 2. A. Clorofila "a" de las plantas superiores. B. Bacterio-clorofila de las bacterias fotosintéticas. El sombreado en los anillos representa la resonancia de los electrones de las dobles ligaduras conjugadas. Esquema tomado de Sauer, 1973.**

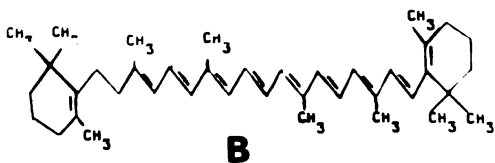
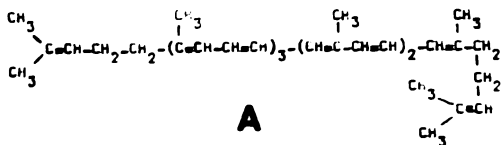


Fig. 3. A. Licopeno, molécula responsable de las coloraciones rojas de las bacterias púrpura. B. caroteno de las plantas superiores.

en la conjugación con la proteína, causan grandes diferencias de color y por lo tanto, los principales picos de absorción se encuentran en diferentes zonas del espectro. El pico máximo de la clorofila "a" pura, disuelta en acetona, se encuentra a 663 nm, mientras que en la célula intacta muestra dos o más picos máximos de absorción en el rojo, a 672 y a 683 nm. En cuanto a la bacterioclorofila "a", el pico máximo está en el infrarrojo.

Entre los pigmentos accesorios que absorben luz están los carotenos. Estos tienen sus máximos de absorción a longitudes de onda diferentes a las de las clorofilas y funcionan como receptores suplementarios de luz en las porciones del espectro visible que no corresponden a las clorofilas. En Rps. spheroides tipo silvestre los carotenos del centro de reacción absorben a 440, 474 y 505 nm.

Los carotenos de las bacterias púrpura son los que confieren a estas su coloración roja o púrpura. Estas coloraciones están relacionadas con el licopeno que contiene trece dobles ligaduras y carece de anillos a diferencia de los carotenos de las plantas verdes. ( ver fig. 3 ).

#### 1.4. POTENCIAL DE REDUCCION ESTANDAR.

Antes de escribir sobre el transporte de electrones en bacterias fotosintéticas, creemos conveniente definir la reacción de óxido reducción y el potencial de reducción estandar.

Las reacciones de óxido reducción, ó redox, son aquellas

en las cuales hay una transferencia de electrones desde un donador de electrones denominado agente reductor hasta un aceptor de electrones ó agente oxidante.

En algunas reacciones redox, la transferencia de electrones se hace por vía de la transferencia de átomos de hidrógeno.

La tendencia de un agente reductor a perder electrones se expresa por el potencial de reducción estandar, que se define como la fuerza electromotriz (emf), en volts, dada por media celda en la cual las especies oxidante y reductora están ambas presentes en una concentración 1 molar, a 25°C y a un pH de 7 en equilibrio con un electrodo, el cual puede aceptar electrones reversiblemente de las especies reductoras de acuerdo a la siguiente ecuación:

reductor  $\rightleftharpoons$  oxidante + "n" electrones ( ó "n" hidrógenos )  
donde "n" se refiere al número de electrones ó de átomos de H-  
transferidos.

El potencial de reducción estandar es la medida de la presión que el electrón de un par redox dado genera en el equilibrio bajo determinadas condiciones.

La ecuación que expresa la relación entre el potencial de reducción estandar de un par redox, su potencial observado y la razón de la concentración del aceptor y del donador de electrones es la ecuación de Nernst:

$$E_h = E_o - \frac{2.303 RT}{nF} \log \frac{[\text{Aceptor de electrones}]}{[\text{donador de electrones}]}$$

Donde:  $E_o$  = potencial de reducción estandar ( 1 M, 25°C, pH 7 )  
en volts.

$E_h$  = potencial observado con el electrodo, en volts.

$R$  = constante de los gases ( 8.31 joules grados  $^{-1}$  moles  $^{-1}$  ).

$T$  = temperatura en grados Kelvin.

$n$  = número de electrones transferidos en moles.

$F$  = faraday = 96,406 joules/volt.

El concepto de potencial de reducción estandar explica como los electrones ó hidrógenos van a fluir desde los componentes más electronegativos hacia los más electropositivos, con liberación de energía aprovechable por los seres vivos. La reacción contraria, hacia un componente con electronegatividad mayor, requiere de un suministro de energía.

#### 1.5. COMPONENTES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES EN BACTERIAS FOTOSINTETICAS INDUCIDOS EN LA LUZ O EN CRECIMIENTO FOTOSINTETICO.

Los componentes del transporte de electrones en bacterias fotosintéticas están localizados en los cromatóforos de la membrana de la bacteria y son, principalmente, los siguientes:

- 1.- El centro de reacción bacteriano ( RC ), que contiene al  $P_{870}$  y al aceptor primario de electrones.
- 2.- El aceptor secundario.
- 3.- Los citocromos ( c y b ).
- 4.- Un complejo "z" no identificado.

En la figura 4 están los Eb de estos componentes junto con otros encontrados en el crecimiento no fotosintético.

A continuación se analizarán cada uno de los componentes del transporte de electrones inducido por la luz.

#### 1.5.1. Centros de Reacción ( RC ):

En 1932, Emerson y Arnold ( 1932 b ), expusieron células de Chlorella ( alga verde ) a destellos de luz de  $10^{-5}$  segundos, alternados con períodos de oscuridad de duración creciente y midieron el desprendimiento de oxígeno por destello, encontrando un valor de saturación a 25°C con períodos de oscuridad de 0.04 segundos de duración. La idea de la existencia de una unidad fotosintética nació cuando los mismos autores ( Emerson, Arnold, 1932 a ) notaron que la razón entre el máximo número de moléculas de oxígeno desprendidas por destello y el número de moléculas de clorofila presentes era de 1/2500. A partir de esta relación sugirieron que por cada 2500 moléculas de clorofila hay una unidad capaz de reducir a una molécula de  $CO_2$ , cada vez que esta unidad es activada por la luz. La unidad fotosintética de las bacterias

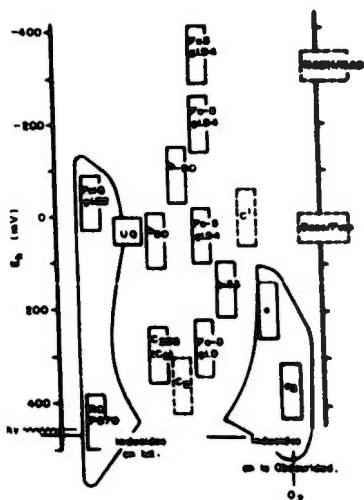


Fig. 4. Componentes de oxido-reducción de Rhodospirillum rubrum sphaeroides: a, a<sub>3</sub>, b, c<sub>2</sub> = citocromos. UQ = ubiquinona. RC = centro de reacción. Fe: Q= Aceptor primario. Fe-S = ferredoxinas. Los componentes identificados por espectrofotometría ó espectroscopía de resonancia paramagnética del electrón (EPR) están colocados de acuerdo con su potencial de óxido-reducción a pH 7. Esquema tomado de Dutton y Wilson, ( 1974 ).

es más pequeña que la de las plantas. Arnold ( citado por Van Niel en 1941 ), reportó que la razón entre el máximo número de moléculas de  $\text{CO}_2$  fijadas y el número de bacterioclorofilas presentes es de -- 1/400.

La identificación de los RC bacterianos comenzó en 1956, cuando Dyeens et al. ( 1956 ) observaron una pequeña disminución, inducida por la luz, de la absorción de la longitud de onda correspondiente a la banda de las bacterioclorofilas. Esta disminución es reversible ya que se recupera en la oscuridad o se produce por la adición de un oxidante como ferricianuro de potasio. Esto sugiere que la pérdida de absorción se debe a la salida de un electrón. ( ver fig. 5 ).

La evidencia decisiva de la existencia de centros de reacción en bacterias fotosintéticas fue el descubrimiento de una mutante - ( Siström, 1962 ) con casi todas las bacterioclorofilas presentes, pero que sin embargo no podía crecer fotosintéticamente en la luz pues carecía de la proteína del RC. Este experimento propició el interés en aislar los centros de reacción.

Actualmente se han descrito varios métodos para la separación de los RC. El método para el aislamiento de los RC de Rps. sphaeroides R-26 descrito por Clayton y Wang ( 1971 ), es el que se siguió en este trabajo para la separación de los RC de dichas bacterias, ya que es el más simple y con él se obtienen preparaciones puras.

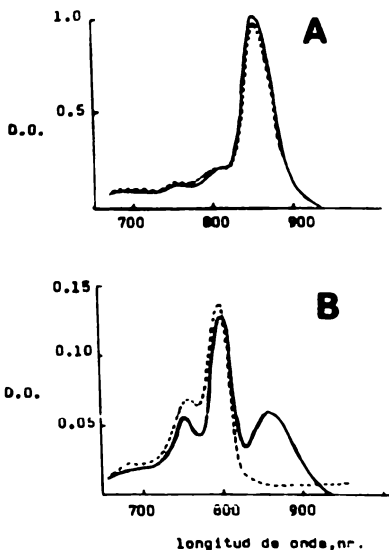


Fig. 5. Espectros de Absorción de los cromatóforos ( A ) y de los centros de reacción ( B ), aislados de la bacteria fotosintética Rps. spheroides. Curvas continuas = espectros medidos en luz débil. Curvas de trazos = espectros en luz fuerte. Obsérvese el blanqueo del  $P_{870}$ . D.O. = densidad óptica. Esquema tomado de Clayton ( 1974 b ).

El RC se define como la unidad de tamaño mínimo que retiene la actividad fotoquímica. La actividad fotoquímica se define como el -- blanqueo, ó desaparición reversible de la banda de absorción de longitud de onda a 870 nm. Este blanqueo es un criterio útil para detectar la funcionalidad de los RC. aislados.

#### 1.5.1.1. Composición de los RC:

Los RC de las bacterias fotosintéticas son proteínas integrales de la membrana del cromatóforo. Son unidades proteicas con grupos -- prostéticos unidos de forma no covalente. La proteína del RC. está integrada por tres subunidades proteicas denominadas: L, M y H de pesos moleculares de: 21,000, 24,000 y 28,000 respectivamente ( Ohtamura y col. 1975 ). La estequiometría de las tres subunidades fue determinada como una relación 1:1:1. Las dos subunidades pequeñas ( L, M ) han sido aisladas de la H y el complejo L-M resultante se encontró fotoquímicamente activo a temperatura ambiente. Esto puede sugerir que los pigmentos responsables de la reacción primaria están ubicados en estas subunidades proteicas (L-M). La composición de amino-ácidos de las tres subunidades es altamente hidrofóbica, aproximadamente el 70% de los amino-ácidos son no polares ( Steiner y col. 1974 ).

Los grupos prostéticos unidos a la proteína del RC son:

1.- Los pigmentos, representados por:

a.- Dos bacteriofeofitinas, que difieren de las bacterioclorofilas por carecer del magnesio central, en vez del cual poseen 2 Hidrógenos. Estas bacteriofeofitinas, más que un contaminante como se pensaba ( Clayton y Wang, 1971 ) parecen ser un verdadero componente del RC ( Reed y Peters, 1972; Straley et.al., 1973 ).

b.- Cuatro bacterioclorofilas, dos de ellas en forma dimérica ( Katz y Morris, 1973 ).

2.- Una ubiquinona.

3.- Un hierro no hemo.

#### 1.5.1.2. Espectro de Absorción del RC de Rps. spheroides.

El RC funciona como el iniciador de las reacciones de transferencia de electrones peculiares de la fotosíntesis. El espectro de los RC de R-26, que se encuentran libres del complejo antena muestra --- ( ver fig. 6 ) varios picos. Estos se han adjudicado a los siguientes -- componentes:

- Un pico a 280 nm que representa a las proteínas del RC, que contienen tirosina entre sus amino-ácidos.

- Un pico a 367 nm determinado, tanto por la bacteriofeofitina como por la bacterioclorofila.

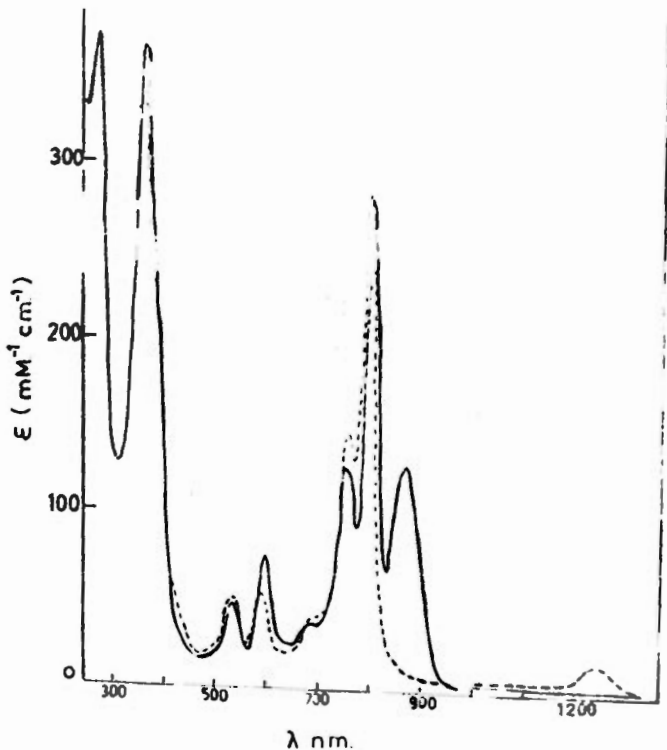


Fig. 6. Espectro de Centros de reacción de *Rhodospirillum rubrum* R-26 preparados por el método de Clayton y Wang, (1971). Línea punteada = iluminación ó adición de ferrisulfato de potasio.

- Dos picos, a 535 y a 759 nm, que corresponden a la bacteriofeofitina del RC.

- Un pico a 800 nm perteneciente a las bacterioclorofilas.

- Dos picos: a 600 y 870 nm correspondientes a la bacterioclorofila dimérica (  $P_{870}$  ). Las unidades de la bacterioclorofila dimérica se encuentran ligadas entre sí por un ión  $Mg^{++}$ , un grupo  $>C=O$  y un puente de agua. ( Katz y Morris, 1973 ).

#### 1.5.1.3. $P_{870}$ y Aceptor Primario.-

El acto fotoquímico primario en fotosíntesis bacteriana involucra la transferencia de electrones, inducida por la luz, desde un donador de electrones hasta un aceptor de los mismos. El papel de donador primario se adjudica al dímero de bacterioclorofila  $P_{870}$  donde --  $P$  indica al pigmento y 870 se refiere a la longitud de onda de la banda de absorción, que se blanquea cuando el complejo pierde un electrón.

Cuando la luz incide sobre el  $P_{870}$  este pigmento pasa a un estado excitado de singlete y el aceptor de electrones primario se reduce. Este último debe encontrarse en la vecindad del  $P_{870}$  de manera que pueda captar al electrón proveniente de éste, por lo cual debe formar parte del RC.

El aceptor de electrones primario se define como el primer intermediario que puede ser estabilizado durante un tiempo de milisegundos entre el  $P_{870}$  y el aceptor secundario.

Han sido postulados como posibles aceptores de electrones primarios ( Parson y Cogdell, 1975 ): el fierro no hemo y la ubiquinona. Las evidencias a favor de uno ó otra son las siguientes:

La presencia de cantidades estequiométricas de Fe en los RC ( Feher, 1971 ) y las observaciones de una clara señal de resonancia paramagnética del electrón ( Parson, 1968; Mc. Elroy y col., 1970; Dutton y col., 1973 ), llevaron a la hipótesis de que el fierro era el aceptor primario. Esta hipótesis fué puesta en duda por Loach y Hall, ( 1972 ) quienes reportaron que en preparaciones parcialmente depletadas de fierro se conservaba totalmente la actividad fotoquímica. Posteriormente, Feher et al., ( 1972 ) y Bolton y Coet, ( 1973 ), observaron una estrecha señal de resonancia paramagnética del electrón inducida por la luz, la cual demostraron que era debida al radical de la ubiquinona.

Los siguientes estudios han demostrado que el fierro sólo, no puede ser el aceptor primario de electrones. Los RC en los cuales el fierro fué sustituido por magnesio exhibieron una señal diferente de resonancia paramagnética del electrón inducida por la luz. No obstante, el tiempo de recombinación entre el donador y el aceptor primario permaneció sin cambio ( Feher et al., 1974 ). Como este tiempo de recombinación se considera un indicador sensible de la estructura electrónica y del estado conformacional del par donador aceptor ( Mc. Elroy y col., 1974 ) se concluyó que el ión del metal de transición solamente

juega un papel secundario en el fotoacto primario ( Feher et. al., 1974 ). Esto fue confirmado por otros estudios que demostraron que la valencia del fierro era la misma (  $Fe^{++}$  ) tanto en la forma oxidada como en la -- forma reducida de la molécula ( Feher et. al., 1974; Debrunner et. al., 1975 ).

Cogdell y col., ( 1974 ) extrajeron con solventes orgánicos, ubiquinona a partir de cromatóforos y de centros de reacción y observaron una pérdida de la actividad fotoquímica, la cual se recuperó al agregar de nuevo la ubiquinona. Okamura y col., ( 1975 ) desarrollaron un método para remover las ubiquinonas y añadirlas de nuevo sin necesidad de emplear solventes orgánicos y demostraron que se requiere una ubiquinona por RC para llevar a cabo la actividad fotoquímica.

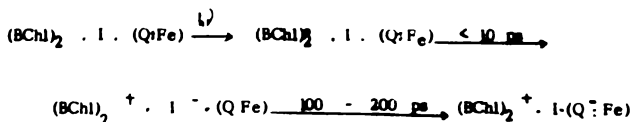
Una manera de reconciliar las evidencias contrarias a favor de fierro no hemo y a favor de ubiquinona es postular que el aceptor primario es un complejo fierro-ubiquinona.

#### 1.5.1.4. Tiempos de Reacción de la Reacción Fotoquímica.

La luz es absorbida por los pigmentos antena en  $10^{-15}$  segundos ( ver 1.7. ) y transferida en tiempos de nanosegundos a las bacterioclorofilas del R.C. ( Borisov y Godik, 1973 ). La energía de excitación es conservada en el RC. en forma de separación de cargas donde la bacterioclorofila dimérica (  $P_{870}$  ) es el catión y el aceptor primario

(Fe-UQ) se reduce y es el anión. Esta separación ocurre a través del dieléctrico de la membrana y produce un equivalente reductor de un lado de la membrana y un equivalente oxidante del otro.

Las velocidades con las cuales se producen estas reacciones entre la bacterioclorofila dimérica y el aceptor primario, a través de un intermediario, están descritas en el siguiente diagrama:



Donde:  $(\text{BChl})_2$  = Bacterioclorofila dimérica, P<sub>870</sub>

I = Intermediario, que muy probablemente es la bacteriofeofitina del RC.

(Q:Fe) = Complejo hierro no hemo-ubiquinona.

$(\text{BChl})^*$  = Estado excitado de singlete.

$(\text{BChl})^+$  = Catión de bacterioclorofila.

### 1.5.2. Aceptor Secundario.

Las ubiquinonas (UQ) han sido encontradas en grandes cantidades en bacterias fotosintéticas y parecen participar en el transporte de electrones fotosintético.

La extracción de  $UQ_{10}$  de los cromatóforos de Rhodospirillum rubrum disminuye grandemente la formación de ATP, la cual se activa de nuevo mediante la adición de  $UQ_{10}$  ( Okamaya et al., 1968 ).

Para que la UQ sea considerada como el aceptor secundario de la reacción de transferencia de electrones es necesario que tenga un Em negativo o cercano a cero, ya que el Em del  $P_{870}$  oxidado es del orden de -50 milivoltios.

Evidencias que indican que la ubiquinona es el aceptor secundario del transporte de electrones en bacterias fotosintéticas:

En los trabajos de Frenkel, ( 1970 ) y posteriormente de Evans y Crofts ( 1974 ), la UQ está localizada en el lugar correspondiente al aceptor secundario del transporte de electrones ya que la iluminación de los cromatóforos causa reducción de UQ endógena ( Bales y Vernon, 1963; Takamiya y Takamiya, 1967a; Takamiya y Takamiya, 1969 ).

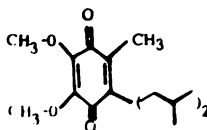
Halsey y Parson ( 1974 ), extrajeron con eter de petróleo cromatóforos leofilizados de Cromatium vinosum, de manera de depletarlos de las ubiquinonas y observaron que dichos cromatóforos perdían su capacidad de llevar a cabo la fotoquímica inducida por el segundo destello luminoso incluso cuando entre el primero y segundo destellos se dejaban pasar varios milisegundos. También demostraron que la cinética que se presenta cuando se agrega un inhibidor de la reacción, como la ortofenantrolina entre el aceptor primario y el secundario es

similar a la clásica que se presenta cuando se depleta de UQ al sistema. La pérdida de la fotoquímica producida por el segundo destello luminoso puede postularse que resulta de la eliminación ó destrucción del aceptor secundario, ya que la extracción no tiene ningún efecto en la foto-oxidación del aceptor del  $P_{870}$  ó del citocromo "c" en el primer destello luminoso. Sin embargo, los efectos de la extracción pueden ser completamente revertidos reconstituyendo los cromatóforos extraídos con el extracto en el cual se encuentra la UQ. La UQ pura puede reemplazar al extracto, restaurando también la reacción secundaria de transferencia de electrones. El análisis del extracto de Chr. vinosum, muestra que la UQ es el único material activo que contiene el extracto en cantidad detectable.

Estos experimentos nos llevan a la conclusión de que la UQ es el aceptor secundario de la transferencia de electrones en bacterias fotosintéticas.

La cantidad de UQ que contienen los cromatóforos es del orden de 5 a 10 moles por mol de  $P_{870}$  ( Cusanovich y Kamen, 1968; Fuller y col., 1961; Takamiya y col., 1967b; Halsey y Parson, 1974 ). No obstante parece que no toda la UQ de los cromatóforos constituye un mismo grupo, ya que el succinato, donador de electrones externo, es capaz de producir la reducción en la oscuridad de una buena parte del total de las ubiquinonas ( King y Drews, 1973; Parson, 1967; Sugimura y Okabe, 1962; Takamiya y Takamiya, 1969 ) pero no la de todas.

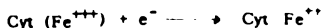
La fórmula de la  $UQ_{10}$ , es la siguiente:



Ubiquinona 10

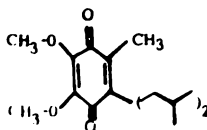
### 1.5.3. Citocromos.

Los citocromos son proteínas que forman parte del transporte de electrones. Como contienen hierro en un grupo hemo son capaces de experimentar oxidaciones y reducciones reversibles ganando o perdiendo un electrón por átomo de hierro.



Cada tipo de citocromo en su estado reducido posee tres bandas de absorción características ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), en el espectro visible, las cuales se conocen como bandas Soret. ( Fig. 7 )

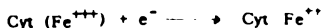
La fórmula de la  $UQ_{10}$ , es la siguiente:



Ubiquinona 10

### 1.5.3. Citocromos.

Los citocromos son proteínas que forman parte del transporte de electrones. Como contienen hierro en un grupo hemo son capaces de experimentar oxidaciones y reducciones reversibles ganando o perdiendo un electrón por átomo de hierro.



Cada tipo de citocromo en su estado reducido posee tres bandas de absorción características ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), en el espectro visible, las cuales se conocen como bandas Soret. ( Fig. 7 )

La foto-oxidación reversible del citocromo "c" en bacterias fotosintéticas, fue demostrada en 1954 por Duvysens. A partir de ese momento se encontró que cada especie de bacteria fotosintética examinada contenía, por lo menos, un tipo de citocromo "c". En Rhodospseudomonas viridis y gelatinosa se ha encontrado que existen dos tipos de citocromos "c" pegados a la membrana, uno de alto potencial y otro de bajo potencial. Ambos citocromos parecen dar sus electrones al  $P_{870}$  directamente ( Thornber y col., 1969; Case y col., 1970 ).

Por otro lado, Rhodospseudomonas spheroides y Rps. capsulata no poseen citocromo "c" de bajo potencial que ceda sus electrones al  $P_{870}$  oxidado ( Dutton y Jackson, 1972; Evans y Crofts, 1974 ).

Tanto en las bacterias púrpuras no sulfuroas como en las bacterias sulfuroas y en las bacterias verdes ha sido demostrada la presencia, además del citocromo "c", de otro tipo de citocromo denominado citocromo "b". ( Fowler, 1974; Knaff y Buchanan, 1975 ).

Rhodospseudomonas spheroides y Rps. capsulata presentan el citocromo del tipo "b" unido a la membrana, el cual después de ser fotoreducido se reoxida por el citocromo de alto potencial.

En cromatóforos de Rsp. rubrum, las reacciones de citocromos inducidas por luz son difíciles de seguir por su pequeña magnitud y por la gran interferencia que hay en la banda  $\alpha$ , debida a los carotenoides y en la banda Soret por la gran absorción inducida por la luz en el pico a 430 nm ( Smith y Baltscheffsky, 1959 ).

De manera de poder caracterizar las bandas  $\alpha$ , tanto del citocromo "c" como la del "b", Dutton y Jackson en 1972, trabajaron con mutantes de Rps spheroides deficientes en carotenos y midieron potenciométricamente un tipo de citocromo "c" de alto potencial, el  $C_{551}$ . Su Em fue de +0.29V. Este citocromo "c" es el donador de electrones de la bacterioclorofila del RC oxidada. Además, midieron tres citocromos del tipo "b" que reportaron con Em de: +0.15V, +0.05 V y -0.09 V. Parece que los dos primeros son los encargados de la reducción del  $C_{551}$ .

Para dilucidar la localización intracelular del citocromo "c", Prince y col. ( 1974 ), usaron antisuero de citocromo " $c_2$ " de Rhodospseudomonas spheroides, con el fin de localizar al antígeno en vivo. En preparaciones de cromatóforos, el citocromo " $c_2$ " no se encontraba disponible al antisuero mientras no se añadiera  $1\%$  de colato. Sin embargo, cuando los esterooplastos eran preparados a partir de las células intactas, el citocromo "c", era liberado en el sobrenadante y sensible al antisuero ( anti " $c_2$ " ). Estos resultados han llevado a concluir que el citocromo " $c_2$ " en vivo se encuentra localizado en el espacio peri-

plásmico de la bacteria, el cual se encuentra localizado entre la membrana y la pared celular de la misma.

En preparaciones de cromatóforos parte del citocromo "c", queda retenido en el interior del cromatóforo.

Para la parte experimental de esta tesis se empleó citocromo "c" de caballo, proteína que ha sido ampliamente usada en otros trabajos para reducir al  $P_{870}$  oxidado.

El uso de citocromo "c" de caballo, que se puede obtener comercialmente, evita tener que purificar el citocromo " $c_2$ " bacteriano.

## 1.6. TRANSPORTE DE ELECTRONES EN BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS.

El flujo de electrones en las bacterias fotosintéticas es cíclico ( fig. 8 ). La primera reacción, que es inducida por la luz, es la oxidación del  $P_{870}$  y la reducción del aceptor primario de electrones. -- Nótese que la energía de la luz es utilizada para llevar el potencial de reducción del  $P_{870}$  a un valor negativo.

Inmediatamente después de su aparición, el  $P_{870}$  oxidado, extrae un electrón del citocromo "c" situado en el espacio periplásmico. Por otro lado, el aceptor primario de electrones transfiere en seguida su electrón a la ubiquinona, molécula a la cual se le ha adjudicado el papel de aceptor secundario del transporte de electrones bacteriano. Los tiempos de reacción entre el aceptor primario y el citocromo " $c_2$ "

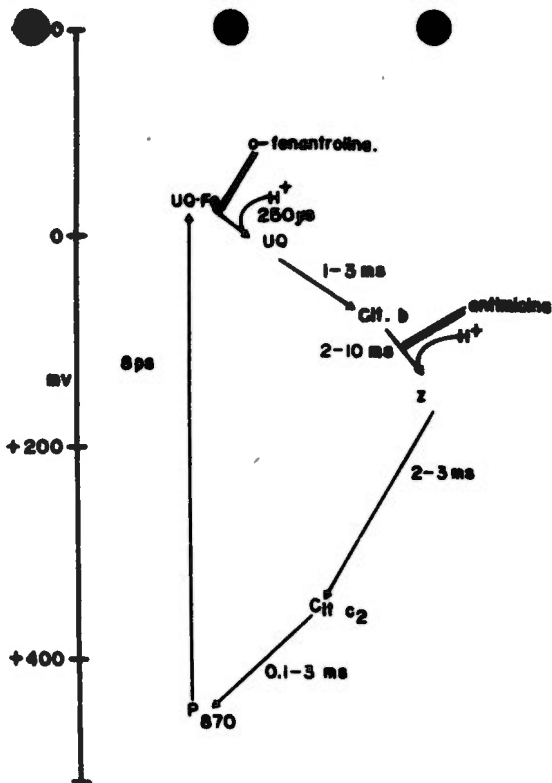
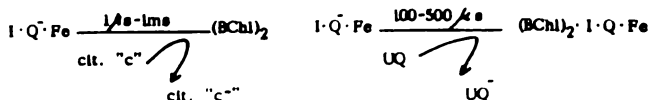


Fig. 8. Esquema que ilustra el flujo de electrones cíclico de las bacterias fotosintéticas. En las ordenadas se grafican los potenciales de reducción de los componentes del transporte de electrones fotosintético. Pg70 = Bacterioclorofila dimérica (RC), UQ.Fe = Aceptor primario, UQ (ubiquinona) = aceptor secundario, cti. "b" = citocromo "b", Z = intermediario no identificado, cti. "c<sub>2</sub>" = citocromo "c<sub>2</sub>". Las flechas dobles indican sitios de acción de los inhibidores señalados.

y entre el aceptor primario y la ubiquinona, se muestran a continuación:



I representa a un intermediario (BPhe) entre la bacterioclorofila dimérica del RC  $(\text{BChl})_2$  y el aceptor primario representado por un complejo hierro ubiquinona  $(\text{Q} \cdot \text{Fe})$ . La ubiquinona (UQ) representa al aceptor secundario y cit. "c" se refiere al citocromo "c"

La ubiquinona es una molécula liposoluble capaz de desplazarse en la membrana de manera que puede captar un protón del interior de la bacteria y una vez reducida, se oxida de nuevo cediendo su electrón al citocromo "b" y liberando su protón del interior de la bacteria y una vez reducida, se oxida de nuevo cediendo su electrón al citocromo "b" y liberando su protón hacia el exterior de la membrana plasmática de la bacteria (fig. 9). El citocromo "b", se oxida pasando su electrón a un intermediario "Z" no identificado aún, el cual toma a su vez un protón del interior de la bacteria para luego liberarlo al espacio periplásmico al oxidarse reduciendo de nuevo al citocromo "c", molécula que cierra el ciclo cuando reduce al  $\text{Pg}_{70}$  que se ha visto oxidado por la luz.

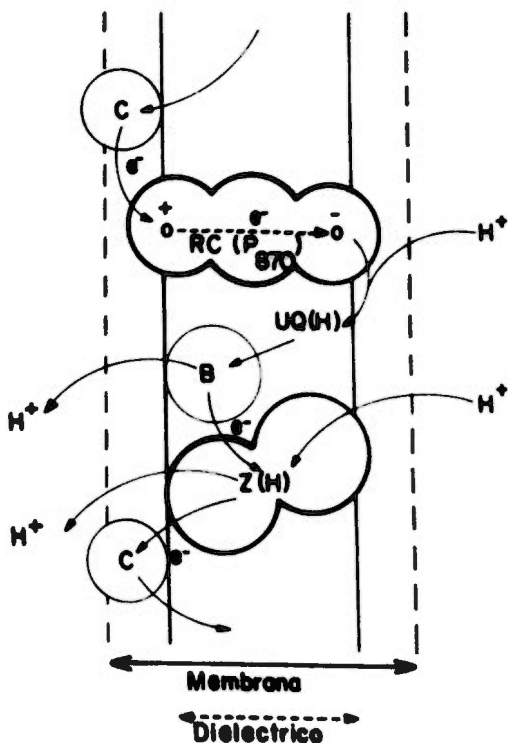


Fig. 9. Sistema de transporte de electrones de bacterias fotosintéticas como Bomba de protones. C = citocromo "c<sub>2</sub>", RC = centro de reacción (P<sub>870</sub>), UQ(H) = ubiquinona, B = citocromo "b", Z = complejo "Z" no identificado.

## 1.7. COMPLEJO ANTENA.

Los pigmentos antena están unidos a proteínas de manera no covalente dando lugar al complejo antena.

Para la extracción de los complejos proteína-pigmento de las bacterias fotosintéticas púrpura es necesario el empleo de solventes orgánicos (Fraker y Kaplan, 1971) ó el empleo de detergentes. Clayton y Clayton, (1972), usaron el detergente lauril dimetil amino óxido (LDAO) en su procedimiento para separar al complejo antena de Rps. spheroides y demostraron que, por lo menos, el 60% de la bacterioclorofila de los cromatóforos está asociada a pequeñas proteínas. Dicha fracción muestra los componentes 800 y 850 además de carotenos. La relación de la bacterioclorofila con la proteína fué del 17%. Con este procedimiento obtenían grandes agregados con pesos moleculares de 100,000, los cuales bajo ebullición con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1.5% se disociaban en pequeñas unidades (I.F. 10,000).

Las absorciones máximas de las bacterioclorofilas antena están cercanas a 800, 850 y 870 nanómetros. La bacterioclorofila del RC tiene su máxima absorción a 803 y a 867 nm ( $P_{800}$  y  $P_{870}$  respectivamente).

Trabajando con tres capas de Rhodospseudomonas spheroides, entre ellas la silvestre, Cogdell y Crofts, (1977) concluyeron que la mínima unidad funcional del complejo antena 800-850 consiste en una

molécula de caroteno por tres moléculas de bacterioclorofila donde la banda a 800 nm representa a una de estas moléculas de bacterioclorofila y las otras dos bacterioclorofilas son responsables de la banda a 850 nm.

En resumen, los pigmentos antena en las *Thiorodaceae* y en las *Athiorodaceae* parecen presentarse en polipéptidos hidrofóbicos de pesos moleculares cercanos a 10,000 a los cuales está asociado un pequeño número de moléculas de pigmento. Dichos polipéptidos pigmentados se asocian formando grandes agregados que proporcionan un gran número de moléculas pigmento.

# 1.8. MEMBRANAS MODELO.

Una forma de estudiar los fenómenos físicos y químicos, como las propiedades dinámicas de una estructura es por medio de modelos. En la investigación de las membranas celulares, cuya naturaleza es lipídica, el uso de modelos ha proporcionado valiosa información. La fotosíntesis es un proceso fisiológico asociado a la membrana de la célula.

Existen dos modelos principales de membranas biológicas:

- 1). - Las membranas lipídicas negras ( BLM ).
- 2). - Los liposomas.

En ambos casos se busca la obtención de una bicapa lipídica.

### 1.8.1. Membranas lipídicas negras.

Las BLM se construyen usando un recipiente de teflón, el cual presenta un pequeño orificio, en el que se formará la bicapa. El orificio representa la única conexión entre dos compartimientos acuosos. ( ver Fig. 10-1 A )

Este modelo de BLM ( Fig. 10-1, B ) es muy útil para determinar con precisión cambios en la capacitancia y la conductancia eléctricas de ambos compartimientos.

### 1.8.2. Liposomas:

Al poner preparaciones secas de fosfolípidos sintéticos o naturales en contacto con soluciones acuosas, los lípidos forman una variedad de estructuras cristalinas líquidas. Los parámetros que determinan la fase líquida-cristalina particular que asumirán los lípidos en solución son: la temperatura y la relación agua-lípido. Los fosfolípidos que se equilibran con cantidades de agua relativamente grandes, de más del 20% de agua, presentan una estructura que consiste en láminas de bicapas de fosfolípidos agrupados, donde los grupos polares o cabeza, de los fosfolípidos interactúan con el agua. A estas configuraciones se les designa como mesofases esmécticas ó liposomas. Dichos liposomas pueden ser multilamelares o unilamelares.

La primera preparación de vesículas multilamelares de lípido fue obtenida por simple agitación mecánica de una muestra de fosfo-

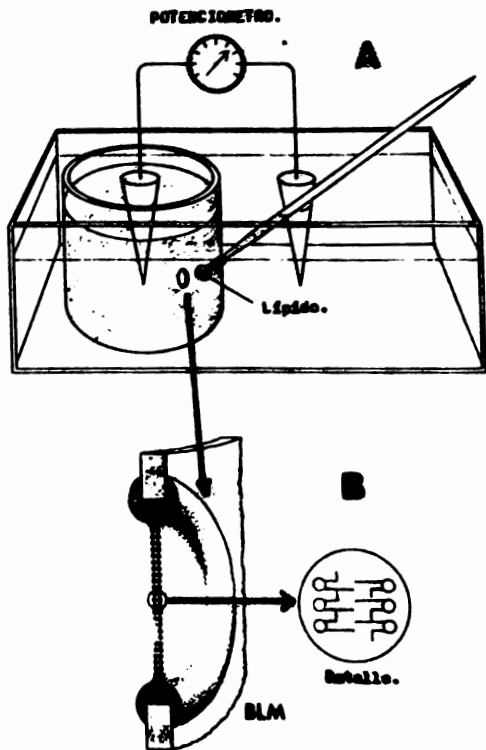


Fig. 10-1. Esquema del dispositivo para la obtención de las membranas lipídicas negras (BLM) en A. Membrana lipídica negra esquematizada en B. Esquema tomado de Bangham, (1975).

lípidos secos en solución salina ( Bangham et al., 1965 ). El producto de esta preparación es una mezcla de partículas de tamaño variado.

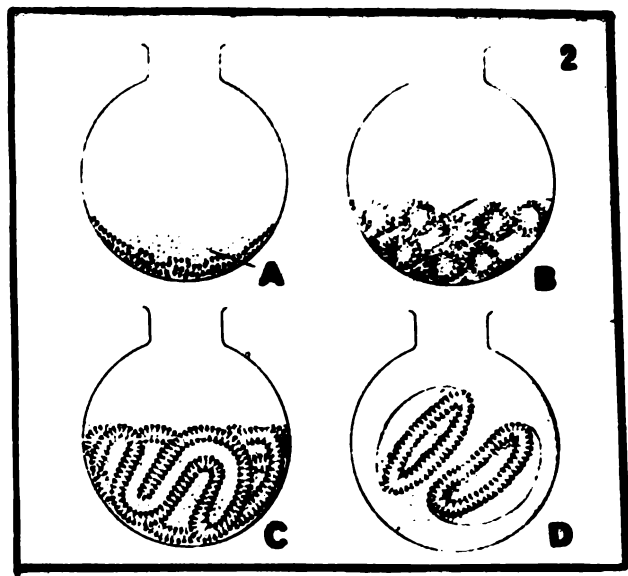
Cuando una suspensión lipídica que ha sido obtenida por agitación mecánica o sónica, las grandes partículas multilamelares se rompen y se producen tanto partículas multilamelares pequeñas como una población homogénea de vesículas unilamelares de 20 a 50 nm de diámetro ( Papahadjopoulos y Miller, 1967; Huang, 1969 ). Son en especial, estas vesículas unilamelares las que resultan de mayor interés para la experimentación de fenómenos biológicos . ( Fig. 10.2 ).

Los liposomas son un modelo que nos ofrece una serie de ventajas. Una de las mayores ventajas de este método es la ausencia de hidrocarburos o de otros materiales que sí se requieren en la preparación de las BLM. Otra ventaja es que conocemos la composición de los fosfolípidos que constituyen a la membrana que preparamos.

La microscopía electrónica ( Huang, 1969; Papahadjopoulos y Watkins, 1967 ) reafirma que los liposomas pequeños son vesículas cerradas formadas por una bicapa lipídica única.

La estabilidad de los liposomas permite que puedan ser sometidos a pruebas biofísicas como bioquímicas, tales como filtración en geles, ultracentrifugación, espectrofotometría, etc.

Estas vesículas tienen sensibilidad osmótica ( Bangham et al., 1967; Rendi, 1967 ), tienden a hincharse y eventualmente a romperse en medios hipotónicos y se encogen frente a soluciones hipertónicas. Esta



**Fig. 10.2.** Esquemas que ilustran la formación de liposomas. A. Interacción inicial entre el agua y el lípido seco. B. Cuando la concentración de agua es baja se forman tubos alineados con las cabezas hidrofílicas del fosfolípido hacia el exterior. C. Si se añade más agua se forman liposomas multilame-  
lares. D. Corte de un liposoma unilamellar. Esquema tomado de Bangham, 1975.

propiedad es análoga al comportamiento que presentan los esteroplastos es decir, las bacterias desprovistas de pared celular.

Los liposomas pueden ser reconstituidos en presencia de proteínas membranales de manera de poder estudiar un fenómeno específico de membrana.

Prente a las ventajas que nos brindan las preparaciones de liposomas existen una serie de desventajas que se pueden presentar.

Cuando se usan fosfolípidos con dobles ligaduras insaturadas, éstos son susceptibles de autooxidación. Para minimizar la oxidación se pueden usar atmósferas de nitrógeno, o hacerlos en presencia de un antioxidante como el DL tocoferol.

La sonicación prolongada acelera la oxidación de los lípidos. ( Hauser, 1971 ).

La formación de los liposomas no se produce con la misma facilidad con todos los fosfolípidos ( Huang, 1969; Kornberg y Mc. Connel, 1971 ). Los fosfolípidos ácidos producen los liposomas unilamelares con cierta dificultad ( Papanaujopoulos et. al., 1972 ), mientras que los liposomas constituidos con lecitina requieren de una sonicación más prolongada.

El conocimiento de los liposomas, ha servido para que se realicen reconstituciones de vascúlas membranales con actividad biológica ( Montal, 1976 ). Para ello existen varios métodos dentro de los cuales el procedimiento de diálisis de colato y el de sonicación son los dos más importantes ( Racker, 1975 ).

El método de diálisis de colato consiste en solubilizar componentes fosfolípidicos y proteicos en 2% de colato seguido de una eliminación lenta del detergente por diálisis.

En el segundo método se exponen suspensiones de fosfolípidos y proteínas de membrana en un medio acuoso y se sonicán.

El método empleado en la reconstitución de las membranas lípido-proteicas de nuestro trabajo es una combinación de ambos métodos y está descrito en el capítulo de metodología.

El objetivo de este trabajo es conseguir la orientación de los RC de Rhodospseudomonas spheroides R-26 en diferentes relaciones lípido: proteína, con el fin de encontrar la razón capaz de orientar asimétricamente a dicha proteína en las membranas modelo.

## II METODOS.

### II.1. Cultivo de las Bacterias.

Las bacterias fotosintéticas que se usaron pertenecen a las *Athiorodaceae* y su género es *Rhodspseudomonas spheroides*. Se empleó *Rps. spheroides* R-26, ésta es una mutante que carece de carotenos.

Los medios de cultivo que se prepararon para la multiplicación de estas bacterias fueron dos: el medio sólido y el medio líquido. El primero consiste en lo siguiente:

- Extracto de levadura (Bioxon de México) ..... 3 gr.
  - Peptona de gelatina (Bioxon de México) ..... 2 gr.
  - Agar bacteriológico (Bioxon de México) ..... 1 gr.
- para un litro de medio sólido.

El medio líquido se preparó según el método de Cohen Bazire et al. ( 1957 ), el cual es una modificación del método descrito por Hutner, ( 1950 ). Este medio se obtiene como sigue:

- Se prepara una solución de metales de la siguiente forma:

- 2.5 gr de EDTA ( etilén diamino tetra-acético )
- 5.0 gr de sulfato ferroso hidratado (  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  )
- 11.0 gr de sulfato de zinc hidratado (  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  )
- 1.54 gr de sulfato de manganeso (  $\text{Mn SO}_4$  )
- 0.39 gr de sulfato de cobre hidratado (  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  )

0.248 gr de nitrato de cobalto hidratado (  $\text{Co} (\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  )

0.177 gr de borato de sodio hidratado (  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  )

agua destilada hasta aforar a un litro.

La solución se pone a pH de 6.8.

- Se prepara una base concentrada que contiene:

20 gr de ácido nítrico triacético

28.9 gr de sulfato de magnesio

6.67 gr de cloruro de calcio hidratado

0.185 gr de molibdato de amonio

0.195 gr de sulfato ferroso

100 ml de la solución de metales.

Estas cantidades para 2 litros de solución.

- El medio líquido final, que se lleva a pH de 6.8,

contiene:

25% de base concentrada

25% de una solución de ortofosfato de potasio ( 136.09 gr/lit. pH 6.8 ).

25% de una solución de ácido succínico ( 100 gr/lit. pH 6.8 ).

6.25% de una solución de sulfato de amonio ( 100 g/lit ).

12.5% de una solución de  $\text{NaCl}$  ( 50 g/lit ).

2.5% de una solución de ácido L-Glutámico ( 25 gr/250 ml. pH 6.8 ).

2.5% de una solución de ácido L-Aspártico ( 5 gr/250 ml. pH 6.8 ).

1.25% de peptona.

Además se le añaden pequeñas cantidades de: vitaminas,

bióticas y de ácido ascórbico.

Ambos medios, sólido y líquido se llevan al autoclave durante media hora.

Una vez preparado y esterilizado el medio sólido, se deja enfriar y se siembran en él las bacterias con una aza de cultivo -- dentro de la campana de flujo laminar. Luego se someten a la obscuridad durante 24 horas, cubriendo los frascos de cultivo con papel aluminio de manera que las bacterias consuman el oxígeno del medio. -- Después se procede a la exposición luminosa hasta que el color de los pigmentos ponga de manifiesto el desarrollo fotosintético de las bacterias. En ese momento se procede a llenar con medio líquido los frascos de cultivo que contienen el medio sólido con las bacterias crecidas. De nuevo, el cultivo sólido-líquido se somete a la obscuridad para el mismo fin. Consumido el oxígeno del medio líquido, las bacterias se exponen de nuevo a la luz de manera que se puedan desarrollar anaeróbica y fotosintéticamente en el medio líquido.

Cuando las bacterias han alcanzado la fase logarítmica tardía de su curva de crecimiento, la cual se determina graficando la densidad óptica de una muestra de cultivo en el curso del tiempo, se pasan a un volumen mayor de medio líquido. Para obtener la cantidad necesaria de medio líquido cultivado con bacterias fotosintéticas ( de 24 a 36 litros ), se repite la operación pasando varias veces a volúmenes de medio líquido progresivamente mayores.

## II.2.- Cosecha de las bacterias:

Alcanzada la fase de crecimiento deseada en medio líquido éstas se cosechan en la centrífuga de flujo continuo Sharples. Esta operación permite la eliminación del medio líquido y la obtención de una "pasta" de bacterias fotosintéticas aglomeradas.

## II.3.- Obtención de los cromatóforos de Rhodospseudomonas R-26 :

El método que se siguió para la obtención tanto de cromatóforos como de RC de Rps. spheroides, fue el descrito por Clayton y Wang, ( 1971 ).

Cosechadas las células de la mutante azul-verdosa R-26, -- éstas se lavan y se suspenden en buffer Tris HCl pH 7.5. Luego -- se procede a romper las células pasando la suspensión dos veces -- a través de una prensa ( Sorvall Ribi Cell Fractionator ) a 18,000 psi de presión. El extracto obtenido, se centrifuga a 12,000 g. durante - 30 minutos con el fin de remover los desechos. El sobrenadante, extrac- to de color azul claro, se centrifuga durante hora y media a 100,000 g en la ultracentrífuga (Beckman, modelo LS-65 para recuperar una película azul oscura gelatinosa que contiene a los cromatóforos. El sobrenadante, líquido pardo, se elimina y la película densa se redispersa en Tris HCl 10mM pH 7.5. La suspensión resultante, se lava centrifugando - a 200,000 g durante 60 min. y se redispersa de nuevo en el mismo - buffer.

Obtenida, la suspensión final se ajusta a una densidad óptica de 50 en el espectrofotómetro Zeiss a 870 nm.

#### II.4. Aislamiento de los Centros de reacción ( RC ) de Rps, --- spheroides R-26.

La suspensión de cromatóforos ajustada se agita con 1% v/v de LDAO para romper los cromatóforos con el detergente. Luego, se procede a hacer un gradiente de sacarosa; para ello, se coloca la solución que ha sido sometida al detergente en los tubos de centrifuga, y -- con una jeringa, se colocan 3 ml. de una solución 0.5 M de sacarosa - bajo la solución de cromatóforos. A su vez, se inyecta una cantidad suficiente de sacarosa 1 M en el fondo del tubo de forma de llenarlo. Una vez hecho el gradiente, los tubos se centrifugan durante 90 min. a 200,000 g. De la centrifugación se obtiene lo siguiente:

- una banda azul cerca de la venciad 0.5 M/1 M que contiene al complejo antena.
- una película clara de fragmentos de pared celular y de otros desechos, en el fondo.
- un sobrenadante pardo-azuloso profundo en la parte superior.

En esta fracción se encuentran los centros de reacción con algunos contaminantes coloreados ( bacterioclorofilas y bacteriofeofitina ).

En seguida, la fracción de RC superior se trata con sulfato de amonio para eliminar ciertas proteínas.

La fraccionación con sulfato de amonio se hace como sigue:

Por cada ml. de la fracción de RC se agregan 0.3 gr. sulfato de amonio sólido, el cual se añade gradualmente mientras la mezcla se agita. Una vez añadido el sulfato de amonio sólido se continua agitando durante 5 min. más. Se procede a centrifugar durante 20 min. a 7,000 g. y se obtiene una fase insoluble, que contiene a los RC, la cual se eleva hacia la superficie. Este levitado se recupera y se disuelve en 1/3 del volumen original con Tris HCl 10mM pH 7.5 con 2% de LDAO. Se agita durante 10 min. y se le agrega un volumen igual de sulfato de amonio saturado pH 7 para alcanzar 50% de saturación. Se continua agitando durante 5 min. y se vuelve a centrifugar. De nuevo se recupera un levitado, el cual se disuelve otra vez en 1/3 de volumen original con Tris 10 mM pH 7.5 con 2% de LDAO. Se añade sulfato de amonio saturado para obtener un 30% de saturación. Se centrifuga, pero esta vez, se hace a un lado el levitado tratando el líquido submergente con mas sulfato de amonio saturado para alcanzar el 50% de saturación. El nuevo levitado, que se obtiene tras la centrifugación, es la fracción deseada, la cual se puede disolver en un poco de Tris HCl 10 mM y pH 7.5 que contenga 1% de colato. Este procedimiento se hace a temperatura ambiente.

Los RC de Rhodopseudomonas spheroides cepa silvestre, 2.4.1. fueron extraídos por una modificación del método de Clayton y Wang, (1971), la cual ha sido reportada por Cogdell et al. (1975; 1976 ).

### 11.5.- Espectro de Absorción de los RC de Rps. spheroides R-26.

Para sacar el espectro de absorción de los centros de reacción aislados a partir de Rhodospseudomonas spheroides se hizo uso del espectrofotómetro marca Aminco, fijando la longitud de onda desde 400 hasta 900 nm. y se corrió el espectro de densidad óptica (D.O.) versus longitud de onda ( $\lambda$ ).

Una vez obtenido el espectro de absorción de los RC, estos fueron sometidos a oxidación por medio de un oxidante químico (ferricianuro) para detectar su funcionalidad mediante el blanqueo de la banda de longitud de onda ( $\lambda$ ) a 870 nm. ( Fig. 12 y 14 ).

También se sacaron espectros diferenciales de las formas oxidadas menos reducida del RC. ( Fig. 13 ).

### 11.6.- Obtención de los fosfolípidos de yema de huevo.

Se separan yemas de huevo y se mezclan con cloroformo-metanol 2:1, en un embudo de separación. La mezcla se agita y se deja reposar, hasta que se separan bien las dos fases. La fase inferior se extrae y se trata con una solución acuosa de NaCl al 9%, de manera de eliminar las proteínas que se encuentran presentes. En cada paso de la extracción se añade tocoferol como antioxidante. El disolvente se elimina en un evaporador rotativo y se obtiene la mezcla de fosfolípidos total de yema de huevo.

#### 11.7. Purificación de lecitina de yema de huevo.

En una columna se empaquen 62.5 gramos de óxido de aluminio y se lavan con 100 ml. de cloroformo. Luego se agregan a la columna 2.5 gramos de fosfolípidos de yema de huevo disueltos en 10 ml. de cloroformo, una vez que han penetrado los fosfolípidos se dejan caer lentamente 150 ml. de cloroformo y por último se añaden 200 ml. de cloroformo: metanol 9:1 para arrastrar la lecitina.

#### 11.8. Identificación de la lecitina purificada.

Para tener la certeza de que el fosfolípido aislado era fosfatidilcolina, se procedió a realizar cromatografía en gel de sílica del extracto obtenido, contra una muestra de lecitina pura.

#### 11.9. Obtención del detergente Triton X 100 libre de peróxidos.

Para eliminar los peróxidos del detergente Triton X 100 se utilizó el método de Glauind y Hartmann ( 1955 ), que consiste en añadir un exceso del  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y burbujear con nitrógeno. El detergente se extrae varias veces con cloroformo, solvente que después se elimina por evaporación rotativa .

## II.10. Obtención de citocromo "c" reducido.

Se pesa el suficiente citocromo "c" para tener una concentración de  $6 \times 10^{-4}$  M y se disuelve en Tris-HCl 10 mM pH 7.5.

A esta solución se le añaden poco a poco, y en constante agitación, cristales de ascorbato hasta que la coloración roja intensa del citocromo "c" se transforma en una coloración naranja que nos indica que la proteína se ha reducido.

Para eliminar el deshidroascorbato de la solución de citocromo "c", ésta se dializa durante 24 horas aproximadamente en dos litros de Tris-HCl 10 mM pH 7.5.

Para asegurarse que el citocromo "c" se encontraba reducido en su totalidad se midió, en el espectrofotómetro de doble haz entre 540 y 551 nm. en presencia de un filtro azul; una muestra preparado con citocromo "c" en Tris-HCl 10 mM pH 7.5., una muestra preparada de la misma forma más ferriclenuro y otra con ascorbato.

## II.11. Preparación de liposomas y reconstitución de las membranas modelo.

El método que se empleó para obtener las membranas modelo lípido-proteína fue una combinación de los métodos de sonicación y de dilución de colato, ya que esta técnica no modifica al complejo pigmento-proteína del centro de reacción.

El método que se siguió fue el siguiente:

Como se deseaba conseguir liposomas en los cuales la relación fosfolípido-proteína ( p/p ) fuera de 10:1, 30:1 y 50:1 había que preparar los 3 tipos de relaciones calculando la cantidad de lípido necesaria para cada una. Para ello se pesaban 3 tubos en los que luego se colocaba el lípido que se encontraba en un poco de cloroformo. Para evaporar el disolvente se usaba atmósfera de nitrógeno y se pesaban de nuevo los tubos para conocer la cantidad de fosfolípido presente y hacer la relación.

A los lípidos secos y pesados se les añadió la cantidad de -- buffer ( Sacarosa 0.25 M Tris 10 mM pH 7.5 Ditoltritol 1% ) necesaria para obtener 10mgr/ml. 30mgr/ml. y 50mgr/ml. de lípido respectivamente. Luego se añadió a cada uno de los tres tubos la cantidad de cloruro de magnesio suficiente para llevar la solución a una concentración 0.5 mM. Después, se procedió a agitar mecánicamente con el vortex de manera de formar liposomas multilamelares y enseguida se sonicó durante cuatro min. en el sonicador de manera de formar los liposomas unilamelares. Una vez obtenidos, éstos se rompieron con colato ( 10 mgr/ml ) y se añadió la cantidad necesaria de RC de R-26 para obtener la relación deseada.

De manera de poder reconstituir las membranas con los RC, se procedía a eliminar el detergente por medio de 3 diálisis sucesivas con el buffer de sacarosa 0.25 M Tris 10 mM pH 7.5. DTE 1%. Al -- eliminar el colato se reconstituían las bicapas de fosfolípidos que habían

integrado a las proteínas liposolubles ( RC ) en su estructura. El tiempo total de difusión fue aproximadamente de 48 horas.

### 11.12. Medida del estado redox del citocromo "c".

La medida de los experimentos se hizo con un espectrofotómetro de doble rayo marca Aminco ( mod. DW2<sub>g</sub> ). Este aparato puede ser usado para obtener espectros de absorción y para espectrofotometría cinética de doble rayo. La espectrofotometría de doble haz nos permite comparar, en una misma cubeta de medida, dos absorbancias: una que cambia ( máximo de absorción ) y una que no cambia ( punto isobéptico ).

El citocromo "c" es una proteína de coloración roja intensa en su estado oxidado y de color naranja en el estado reducido. El espectro de absorción del citocromo "c" ( ver Fig. 7 ), muestra uno de sus puntos isobépticos a 540 nm. y un máximo de cambio a 551 nm. Para medir el estado redox del citocromo "c", un haz del espectrofotómetro se fija a 540 nm. y el otro a 551 nm. Así, el aparato detecta solamente las diferencias entre esas longitudes de onda, las cuales son indicadoras de las oxidaciones o reducciones que experimenta el citocromo "c". Se escogieron, en especial, esos dos puntos ( 540 y 551 nm. ) del espectro de absorción del citocromo "c", pues no interfieren con las absorciones del centro de reacción.

Para medir, la orientación de los RC reconstituidos en membranas modelo, se adapta al espectrofotómetro de doble haz: un sistema de filtros y un dispositivo para suministrar iluminación lateral.

Los filtros que se adaptan al aparato son dos: un filtro que sólo permite el paso de luz en el infrarrojo y otro que sólo deja pasar luz en el azul. Los espectros de estos filtros se muestran en las figuras 11.2 y 11.3. Los filtros se disponen de la siguiente forma: el filtro infrarrojo se coloca lateralmente de manera que la iluminación actínica pase a través de él e incida en la cubeta de medida. El filtro azul, se coloca antes del fotomultiplicador de tal forma que sobre él incida la luz de medida después de atravesar la muestra. Con esta disposición se evita que la luz roja pase al fotomultiplicador y lo estimule ( ver Fig. 11.1 ).

La luz infrarroja oxida al  $P_{870}$  del RC y el cuocromo "c", al oxidarse en favor de la reducción del  $P_{870}$  produce un cambio registrable por el aparato.

#### 11.13. Microscopía electrónica de los liposomas reconstituidos con RC de Rhodospseudomonas spheroides R-26.

Para observar al microscopio electrónico las membranas modelo reconstituidas en las relaciones RC: fosfolípidos 1:10, 1:30 y 1:50 se usó el método de tinción negativa. Este método consiste en colocar sobre una rejilla con cubierta de carbón ( 400 mesh ) una gota de suspensión de

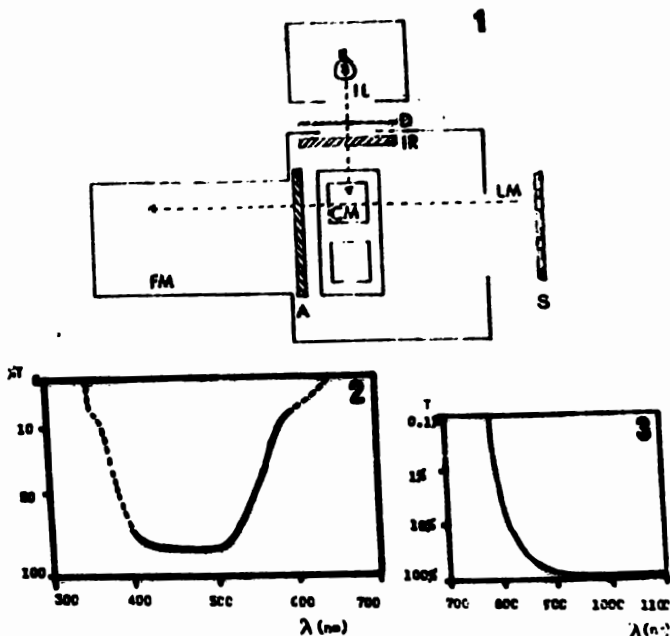


Fig. 11. 1. Diagrama del Espectrofotómetro de doble haz con dispositivo de iluminación lateral y sistema de filtros. Cámara de medida (CM) y Filtro Azul (A) Filtro Infrarrojo (IR) y Iluminación lateral (IL) y Fotomultiplicador (FM) y Luz de medida (LM) y Disparador (D) y Dispersor de haces (S). 2. Espectro del filtro de vidrio 4-96 (azul) de Corning Glass Works. Corning, N.Y. ordenadas = porcentaje de transmisión. 3. Espectro de filtro de gelatina 87-C (infrarrojo) de Eastman Kodak Comp., Rochester, N.Y. ordenadas = transmisión.  $\lambda$  = longitud de onda en nanómetros (nm).

liposomas, la cual se deja reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto, enseguida el exceso se elimina con papel filtro, de tal forma que queda una capa a la que, antes de secarse al aire, se le cubre con una gota de ácido fosfotúngstico al 20% en solución acuosa pH 6.8. El exceso de agente se elimina tocando la orilla de la rejilla con papel filtro. La capa delgada de material se deja secar al aire.

Una vez tratada la muestra con dicho método se observó al microscopio electrónico JEOL 100 operado a 60 K.V. Tanto el método de tinción negativa como las fotografías en el microscopio electrónico de las muestras, fueron realizadas por el Dr. Cárazez Trejo, del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular de la U.N.A.M.

#### 11.14. Método de Análisis de Resultados.

Los datos correspondientes a las tablas II y IV se obtuvieron calculando el % de oxidación que experimentaba una concentración 2 M de citocromo "c" previamente reducido cuando se ponía en presencia de los proteoliposomas de centros de reacción, con respecto a la oxidación de la misma proteína reducida ( cit. "c" ) por los proteoliposomas de RC en presencia del detergente Tritón x 100 por encima de su concentración micelar crítica ( c.m.c. ).

Estos porcentajes se calcularon para cada relación RC: fosfolípidos.

A los datos de 6 repeticiones del experimento con proteoliposomas de lecitina purificada y RC de Rpe sphaeroides R-26 en las razones 1:10, 1:30 y 1:50 RC: lípidos, se les aplicó un análisis estadístico de varianza seguido de la aplicación del criterio de la mínima diferencia significativa, ajustado por el método para "varianzas de error desiguales debido a tratamientos" ( Snedecor y Cochran, 1979 ).

Para los datos obtenidos a partir de las repeticiones del experimento con proteoliposomas de fosfolípidos de yema de huevo y RC de R-26, también en las relaciones mencionadas, se siguió el mismo tratamiento. En este caso no se requirió la aplicación del criterio de la mínima diferencia significativa.

### III RESULTADOS.

#### III.1. - Espectro de Absorción de los Centros de Reacción de Rhodospseudomonas spheroides R-26

Una vez aislados los centros de reacción ( RC ) de Rhodospseudomonas spheroides R-26, se sacó su espectro de absorción. En la figura 12 se muestra el espectro obtenido entre 708 y 900 nm de longitud de onda. En esta zona del espectro se puede apreciar el blanqueo de la banda de absorción a 870 nm que corresponde a la bacterioclorofila dimé-rica del  $P_{870}$ . Este blanqueo demuestra la funcionalidad de los centros de reacción que fueron aislados.

En la figura 13 aparece el espectro diferencial de los estados oxidado menos reducido de los RC de Rps. spheroides R-26. En esta figura podemos apreciar con más claridad el blanqueo del  $P_{870}$ .

El espectro de absorción entre 400 y 656 nm de Rps. spheroides R-26 se vé en la figura 14 A. En esta porción del espectro podemos apreciar la carencia de carotenos de la mutante. Para ilustrar mejor este hecho, en el trazo B de la figura 14 se ha colocado la misma porción del espectro ( entre 400 y 656 nm ) correspondiente a centros de reacción de Rps. spheroides tipo silvestre ( Cogdell et. al. 1975; 1976 )

Tanto en la mutante R-26 como en la variedad silvestre el espectro de absorción entre 700 y 900 nm es el mismo. Sin embargo,

entre 400 y 530 nm los espectros de absorción son diferentes. En el trazo B de la figura 14 se pueden apreciar los picos a 400, 474 y 505, los cuales corresponden a los carotenos que forman parte del RC de Rps. spheroides tipo silvestre. La bacteriofeofitina (BPhe) de los RC es la responsable de los picos a 534 y 537 nm que aparecen en la figura y los picos a 600 y 602 nm, pertenecen a las bacterioclorofilas dimericas del  $P_{870}$  de los centros de reacción.

La longitud de onda a la que fueron tomados los dos espectros de la figura 14 es la misma en el trazo A y en el B, pero la densidad óptica (D.O.) es diferente, de manera que puedan apreciarse - ambos espectros con claridad.

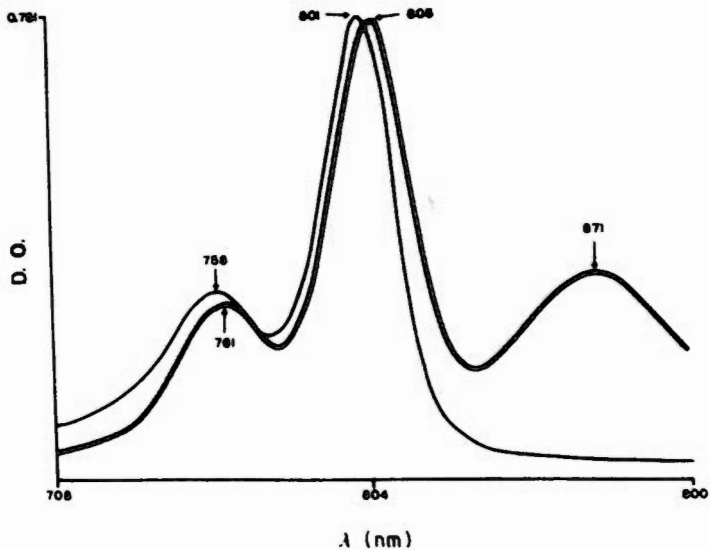


Fig. 12 Espectro de Absorción de los RC de Bp1, integración R-26 entre 700 y 900 nanómetros (en  $\lambda$ ). 766 nm = Bp1, 808 nm = Bp2, 871 nm = Bp1 dimerico (  $\lambda_{Bp1}$  ). Línea delgada = RC oxidados con ferricloruro de potasio. Línea gruesa = RC reducidos. Abscisa: Longitud de onda (  $\lambda$  ) en nanómetros. Ordenada: densidad óptica ( D.O. ).

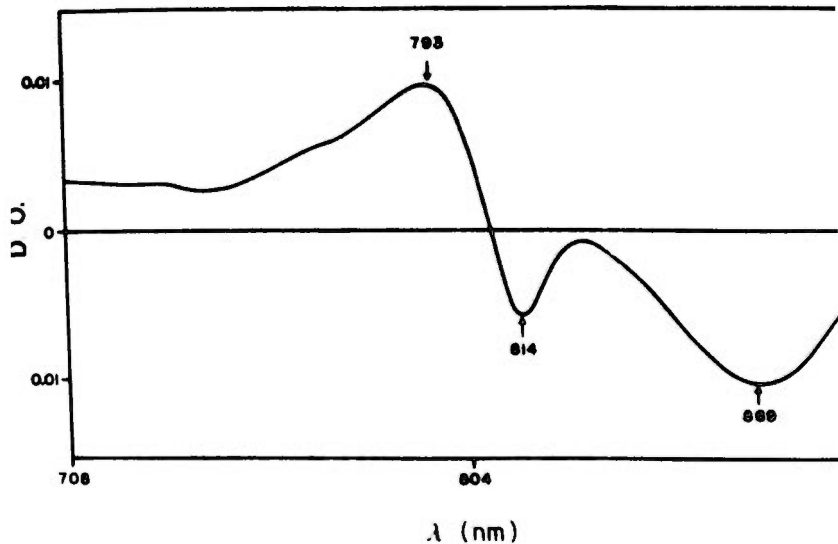


Fig. 13. Espectro diferencial de los estados oxidado menos reducido de los centros de reacción de *Rps. spheroides* R-26 entre 708 y 900 nanómetros ( nm ).

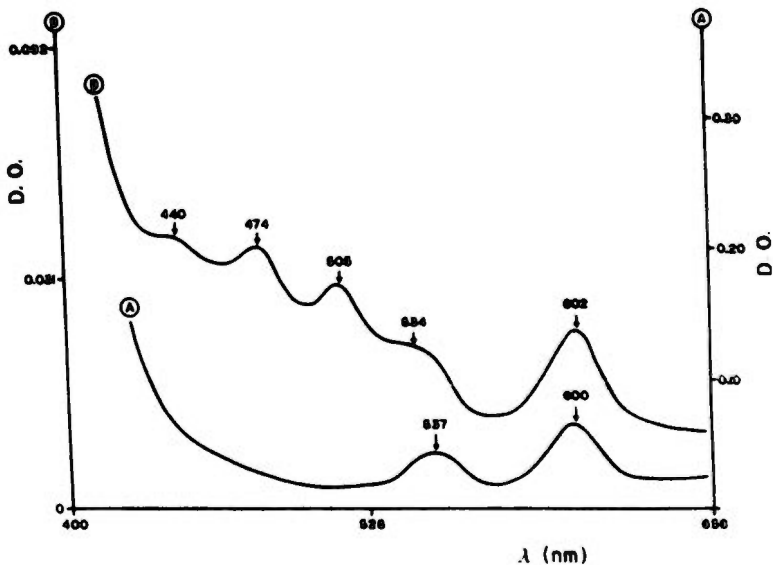


Fig. 14. Comparación entre los espectros de absorción de Res.  
espectroscópica R-26 (A) y de Res. espectroscópica tipo alvostre  
 (B), entre 400 y 680 nm. 440, 474 y 505 nm = Carotenos,  
 534 y 537 nm = BPs, 600 y 602 nm = BPs dimeros (P<sub>600</sub>).

### III.2. Los fosfolípidos oxidados, oxidan al citocromo "c" reducido.

Los resultados de la figura 15 fueron obtenidos a partir de la medida espectrofotométrica del estado redox del citocromo "c". Al medir una muestra de RC en presencia de citocromo "c" reducido se observa que, antes de exponer la muestra a iluminación, no se presenta deriva exponencial en el trazo. Al suministrar la luz lateral infrarroja se puede apreciar la respuesta correspondiente a la oxidación del citocromo "c" ( cit. "c" ) reducido, por el  $P_{870}$  el cual a su vez ha sido oxidado por la incidencia de la luz lateral. Obsérvese que cuando se suprime la iluminación, se corta la respuesta ( Fig. 15 A ).

El trazo que se observa al medir una muestra que, además de RC y citocromo "c" reducido, contiene fosfolípidos de azolectina sonificados, presenta deriva exponencial antes de iluminación ( Fig. 15 B ). Aunque la cantidad de RC ( 12.5  $\mu$ M ) disponibles es la misma en las muestras que corresponden a los trazos A y B, la deriva exponencial, bajo iluminación, es menor en el trazo B que en el A ya que el fosfolípido oxidado de la muestra B, ha consumido parte del citocromo "c" reducido.

El trazo correspondiente a una muestra con fosfolípidos de azolectina sonificados sin RC en presencia de citocromo "c" reducido, presenta deriva exponencial. Al añadir ferricianuro de potasio se puede

observar que el citocromo "c" reducido se ha oxidado casi totalmente, razón por la cual la deriva inicial se ha atenuado en el trazo ( Fig. 15 C ).

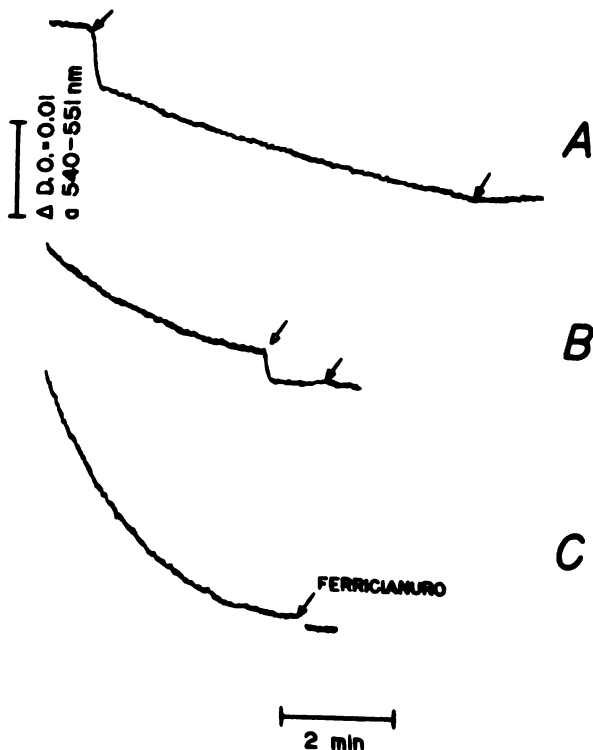


Fig. 15. Trazos espectrofotométricos del estado redox del citocromo "c" que demuestran que los fosfolípidos oxidados, oxidan al citocromo "c" reducido. A.- RC de R-26 12.3  $\mu$ M; citocromo "c" 5  $\mu$ M, en 3 ml de Tris-H Cl 10 mM pH 7.4. B.- Lo mismo que en A, más 0.2 ml de fosfolípidos de azolectina sonicados. C.- Como en B, pero sin RC de R-26.  $\longrightarrow$  = Suministro de Iluminación lateral.  $\longrightarrow$  = Iluminación lateral infrarroja aumente.

III.3. Los fosfolípidos en los que se ha evitado la oxidación no oxidan al citocromo "c" reducido.

Tanto los fosfolípidos de azolectina, como los fosfolípidos obtenidos a partir de yema de huevo, producen deriva exponencial en el trazo al ser puestos en contacto con el citocromo "c" reducido. Esta oxidación de la proteína reducida por los lípidos se presenta cuando se emplean fosfolípidos que han sido guardados por algún tiempo -- ( Fig. 16 A ). Si en el momento de medir dichos lípidos, en presencia de citocromo "c" reducido, se añade a la muestra un antioxidante como el D.L. tocoferol la respuesta no se ve modificada y sigue apareciendo la deriva exponencial en el trazo. ( Fig. 16 B ). Sin embargo, cuando se extraen los fosfolípidos de azolectina o de yema de huevo, en presencia de tocoferol o bajo estrictas condiciones de atmósfera de nitrógeno se elimina la deriva exponencial en presencia de citocromo "c" reducido -- ( Fig. 16 C ).

En resumen podemos decir que los fosfolípidos recién preparados, o aquellos donde se ha evitado la oxidación, no reaccionan con el citocromo "c" reducido.

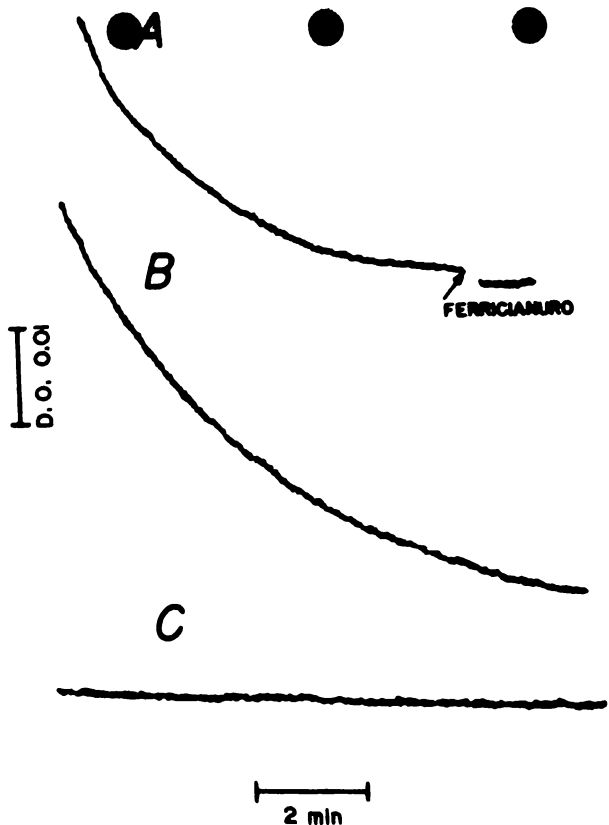


Fig. 16. Los fosfolípidos en los que se ha evitado la oxidación no oxidan al citocromo "c" reducido. A. - 0.2 ml de fosfolípidos de azolectina sonicados, citocromo "c"  $5 \mu\text{M}$ , en 3 ml de Tris-H Cl 10 ml pH 7.4. B. - Lo mismo que en A, más D.L. tocoferol. C. - Como en A pero con fosfolípidos de yema de huevo extraídos en atmósfera de nitrógeno ( ó en presencia de D.L. tocoferol ).

III.4. El detergente Tritón X 100 peroxidado, oxida al citocromo "c" reducido.

El trazo que resulta de medir el estado redox del citocromo "c" de una muestra que contiene liposomas de lecitina purificada en presencia de tocoferol reconstituidos con RC de Rps. spheroides R-26, citocromo "c" reducido y detergente Tritón X 100, presenta deriva espontánea antes de iluminación ( Fig. 17 A ). Como se puede observar la presencia del detergente oxidado nos impide saber que porcentaje de la respuesta se debe a los RC cuando éstos son iluminados, ya que tanto el detergente como los RC están contribuyendo a la oxidación del citocromo "c" reducido.

En una muestra preparada de igual forma, pero empleando Tritón X 100 tratado por el método de Glavind y Hartmann ( 1955 ) se evita la deriva espontánea del trazo antes de la iluminación ( Fig. 17 B ). Esto, nos permite adjudicar al  $P_{870}$  toda la oxidación que experimenta la proteína en presencia de luz.

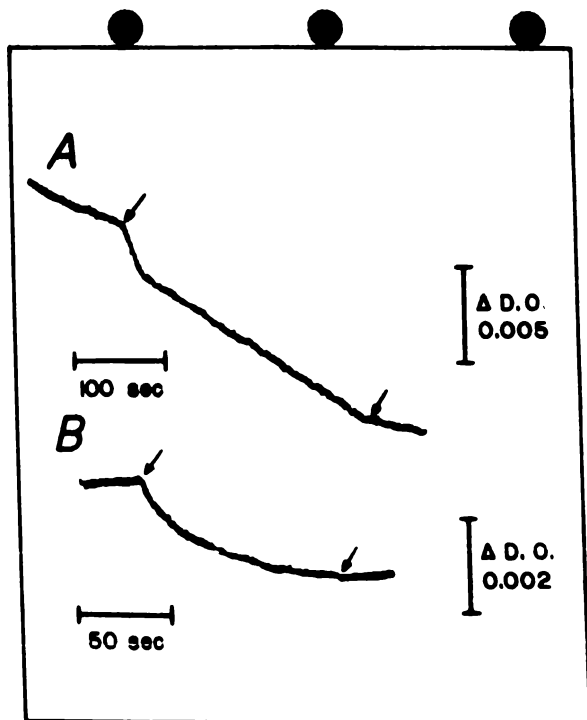


Fig. 17. Trazos espectrofotométricos del estado redox del citocromo "c" en los que se observa que el detergente Tritón X 100 peroxidado, oxida al citocromo "c" reducido. A. - 0.1 ml de liposomas que contienen 0.127  $\mu$ M de RC en 3 ml de amortiguador Sacarosa 0.3 M, Tris-H Cl 10 mM pH 7.5, citocromo "c" 2  $\mu$ M, Tritón X 100 peroxidado 400  $\mu$ M. B. - Como en A pero con el Tritón X 100 tratado por el método de Glauind y Hartmann, ( 1955 ) ( libre de peróxidos ).  
 —→ = Suministro de iluminación lateral infrarroja a la muestra. —→ = Iluminación lateral infrarroja ausente.

III.5. Fotografías de proteoliposomas de RC de Bpa. spheroides R-26 reconstituidos en liposomas.

En la figura 18 se muestran las fotografías que se obtuvieron en el microscopio electrónico de las muestras de liposomas de lecitina purificada reconstituidos con centros de reacción de Bpa. --- spheroides R-26 en las tres relaciones fosfolípido: proteínas.

La figura 18 A corresponde a la fotografía tomada a la razón 10:1; la 18 B, fue tomada a la relación lípido: centros de reacción 30:1 y la 18 C a la razón 50:1.

Es importante apreciar, en las 3 fotografías, que las membranas modelo de las diferentes relaciones son unilamelares y presentan una gran variabilidad de tamaños en los 3 casos.

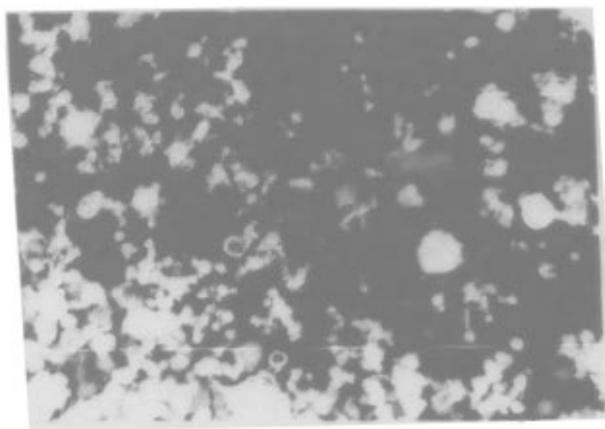
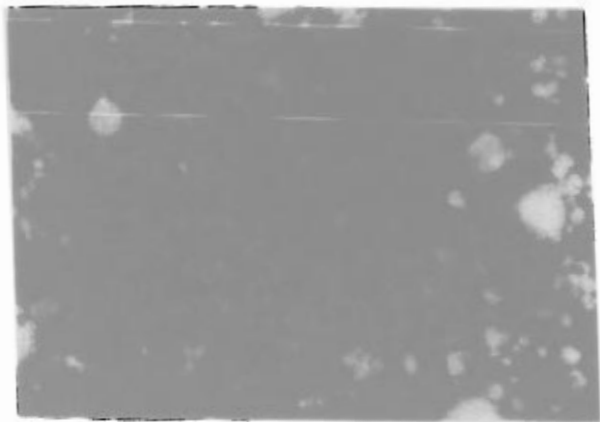


Fig. 18.A.

Fig. 18. Fotografías obtenidas al microscopio electrónico de los liposomas de lecitina purificada reconstituidos con RC de *Rps. sphaerulus* R-26. A - Relación RC: fosfolípido 1:10. B - Relación 1:30 C - Relación 1:50 10  $\mu$ m. = 1  $\mu$ .



Fig. 10.9.



III.6. Reducción del citocromo "c" por los RC de Rps. spheroides  
R-26 reconstituídos en liposomas.

En la figura 19 se muestra un experimento ilustrativo de la oxidación del citocromo "c" reducido, por los centros de reacción de Rhodospseudomonas spheroides R-26 en membranas modelo de lecitina purificada de yema de huevo extraída en presencia de tocoferol. Las letras A, B y C señalan las relaciones RC: fosfolípido 1:10, 1:30 y 1:50 respectivamente.

En los trazos señalados con el número 1 se midió la reducción del citocromo "c" por los RC de cada relación y en los trazos señalados con el número 2 se midió lo mismo pero en presencia del detergente Tritón X 100 en una concentración superior a su concentración micelar crítica ( c.m.c. ).

En el experimento ilustrado en la fig. 19 se obtuvieron los siguientes resultados: en la relación 1:10 el 7.1% de los RC oxidaron el citocromo "c" previamente reducido, en la relación 1:30, el 35% y en la relación 1:50 el 56%.

Los datos obtenidos a partir de 6 experimentos se expresan en la tabla II. La tabla IV muestra los datos correspondientes a otros 6 experimentos en donde se emplearon fosfolípidos de yema de huevo extraídos en presencia de D.L. tocoferol en vez de lecitina pura.

El análisis de varianza al que fueron sometidos los datos

de la tabla II nos dice que: la diferencia entre grupos es significativa a un 99% de confianza ( ver tabla III ).

Como la variación dentro de cada uno de los grupos es muy grande, se aplicó el criterio de la mínima diferencia significativa corregido por el método para varianzas de error desiguales debido a tratamientos, el cual resultó significativo al 99.97% para las relaciones 1:10 y 1:30 y al 98% para las relaciones 1:30 y 1:50.

Por otro lado el análisis de varianza ( ver tabla V ) aplicado a los datos de la tabla IV confirma la variabilidad entre y dentro de los grupos siendo absolutamente no significativo.

La figura 20, en donde se comparan los datos correspondientes a los liposomas constituidos con: RC de Rps. spheroides tipo silvestre (A) y con RC de Rps. spheroides R-26 (B), nos sugiere que en el segundo caso ( B ) existe una tendencia en las respuestas de las preparaciones sin Tritón X 100 ( Fig. 19 trazos I y fig. 20 B ) a oxidar una cantidad sucesivamente mayor de citocromo "c" a medida que aumenta la cantidad de lípido con respecto a la cantidad de proteína ( RC ), aunque la dispersión entre los datos de cada una de las relaciones entre sí sea muy grande.

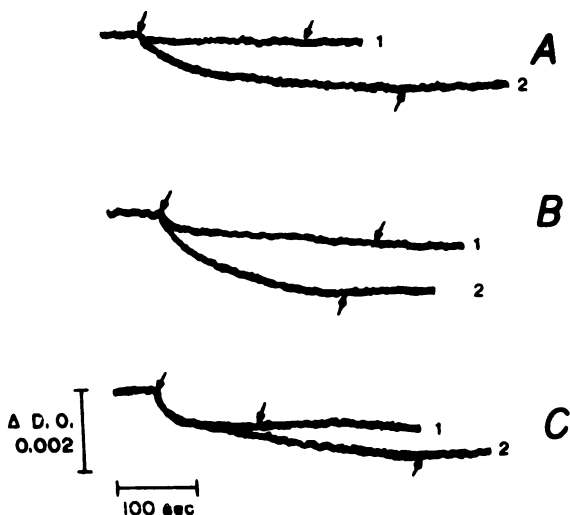


Fig. 19. Trazos espectrofotométricos del estado redox del citocromo "c" en donde se aprecia la orientación de los RC de *Rps. spheroides* R-26 reconstituidos en liposomas preparados con lecitina pura de huevo extraída en presencia de tocoferol. A.- Relación RC: lecitina 1:10. B.- Relación 1:50. C.- Relación 1:30. 1.- 0.1 ml de liposomas que contienen  $0.127 \mu\text{M}$  de RC, citocromo "c" reducido  $2 \mu\text{M}$ , amortiguador sacarosa  $0.3 \text{ M}$  Tris- $\text{H}^+\text{Cl}$   $10 \text{ mM}$  pH 7.5 para aforar a 3 ml. 2.- Idem que en línea Trón X 100  $400 \mu\text{M}$  tratado por el método de Jaund y Hartmann, (1955).  $\downarrow$  - suministro de iluminación lateral infrarroja a la muestra.  $\uparrow$  - iluminación lateral infrarroja ausencia.

**TABLA II.**

| <b>Reducción de citocromo c por RC de <u>Rhodospirillum rubrum</u> R-26 reconstituidos en liposomas de lecitina purificada de yema de huevo.</b> |                                |                                |                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <b>Número de Experimentos</b>                                                                                                                    | <b>Relación RC:lipido 1:10</b> | <b>Relación RC:lipido 1:30</b> | <b>Relación RC: lipido 1:50</b> |
| 1                                                                                                                                                | 10                             | 65                             | 81                              |
| 2                                                                                                                                                | 24                             | 38                             | 48                              |
| 3                                                                                                                                                | 20                             | 31                             | 42                              |
| 4                                                                                                                                                | 7                              | 35                             | 56                              |
| 5                                                                                                                                                | 27                             | 50                             | 66                              |
| 6                                                                                                                                                | 8                              | 17                             | 32                              |

TABLE III

Datos obtenidos de la aplicación del análisis de varianzas a los resultados de los experimentos con protocliposomas de lecitina purificada y RC de Egg. spheroides R-26

| Fuente de variación                   | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Varianzas | Razón de varianzas |
|---------------------------------------|--------------------|-------------------|-----------|--------------------|
| Debida a la razón<br>RC: fosfolípidos | 2                  | 4442.3            | 2221.15   | 10.14 **           |
| Debida al error experimental          | 15                 | 3284.2            | 218.94    |                    |
| Total                                 | 17                 | 7726.5            |           |                    |

F ( 3.68 )      10.14 > 3.68

\*\* = Diferencia significativa al 99% de confianza.

TABLA IV.

Reducción de citocromo "c" por RC de Rhodospirillum rubrum spheroides R-26 reconstituidos en liposomas de fosfolípidos de yema de huevo.

| Número de Experimento. | Relación<br>RC: lípido<br>1: 10 | Relación<br>RC: lípido<br>1: 30 | Relación<br>RC: lípido<br>1: 50 |
|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1                      | 88                              | 43                              | 66                              |
| 2                      | 50                              | 57                              | 75                              |
| 3                      | 50                              | 83                              | 76                              |
| 4                      | 13                              | 15                              | 30                              |
| 5                      | 15                              | 54                              | 100                             |
| 6                      | 48                              | 88                              | 56                              |

**TABLA V**

Datos obtenidos de la aplicación del análisis de varianzas a los resultados de los experimentos con protosporocomas de fosfolípidos de yema de huevo y RC de Rps. experimentos R-26

| Fuente de variación                   | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Varianza | Razón de varianzas |
|---------------------------------------|--------------------|-------------------|----------|--------------------|
| Debida a la razón<br>RC: fosfolípidos | 2                  | 1614              | 807      | 1:19               |
| Debida al error experimental          | 15                 | 10857             | 677      |                    |
| Total                                 | 17                 | 11771             |          |                    |

$F(3,68) \quad 1.19 < 3.68$

Análisis no significativo.

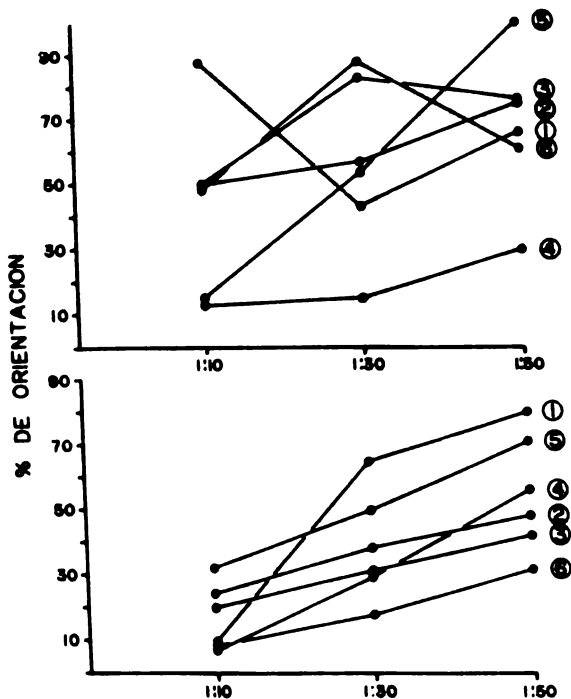


Fig. 20. Comparación de las respuestas obtenidas con liposomas reconstituidos con RC de *Rps. sphaeroides* R-26, preparados con fosfolípidos de yema de huevo (A) y preparados con lecitina purificada (B). Los puntos de A corresponden a los datos obtenidos de la tabla IV y los de B a los datos de la tabla II.

### III.7. Resultados del Análisis de Varianza.

Resultados del análisis de la mínima diferencia significativa ajustado por el método para "varianzas de error desiguales debido a tratamientos".

1. - Comparación entre los datos de las relaciones 1:10 y 1:30.

g.l. (grados de libertad)=7.

t ("t de Student") = 3.30

El análisis resulta significativo al 99.97% de confianza.

2. - Comparación entre los datos de las relaciones 1:30 y 1:50.

g.l. = 9

t = 1.67

El análisis entre estas dos relaciones es significativo al 98% de confianza.

## IV. DISCUSION.

Cuando la luz de longitud de onda apropiada incide sobre el  $P_{870}$  de los proteoliposomas, se produce una separación de cargas de manera que una parte del RC es oxidante mientras que la contraria es reductora. Como el citocromo "c" es una proteína hidrofílica con peso molecular de 12,000, éstas características le impiden atravesar la membrana del proteoliposoma, de tal forma que sólo reaccionará con aquellos RC que expongan el lado oxidante hacia el lado externo del liposoma (Prince y col., 1974). Por medio de los cambios producidos en el estado redox del citocromo "c" nos fue posible detectar la orientación de los RC en los proteoliposomas de las diferentes relaciones (1:10, 1:30 y 1:50). Añadiendo el detergente Tritón X 100 el proteoliposoma se hace permeable al citocromo "c" de manera que éste puede reaccionar con la totalidad de RC presentes en la muestra. A partir de estos datos, se calculó el porcentaje de RC orientados con la parte oxidante hacia el exterior del liposoma en cada relación. No obstante para poder medir la orientación de los RC en las membranas modelo en la forma descrita era preciso:

- 1.- Garantizar que los proteoliposomas estuvieran cerrados y fueran unilamelares.
- 2.- Garantizar que de todas las moléculas presentes en el momento de medir la respuesta, solamente el RC reaccionara con el citocromo "c" reducido, que jugaba el papel de molécula detectora de

la orientación de los centros de reacción.

Las fotografías obtenidas en el microscopio electrónico de las muestras de proteoliposomas de lecitina purificada y RC de Rps. spheroides R-26, que fueron tratadas con tinción negativa, permiten apreciar que tanto en la razón RC: fosfatidil colina 1:10 ( fig. 18 A ) como en la 1:30 ( fig. 18 B ) y la 1:50 ( fig. 18 C ), contamos con poblaciones de proteoliposomas formados por una sola lamela o bicapa. Es importante notar que no hay liposomas multilamelares presentes en las muestras.

El prerrequisito 2, que significaba lograr que los RC de Rps. spheroides, fueran las únicas moléculas responsables de la oxidación del citocromo "c" previamente reducido, planteó varias dificultades ya que observamos que los trazos obtenidos a partir del estado redox del citocromo "c" en el espectrofotómetro de doble haz, con las muestras de proteoliposomas de RC, mostraban deriva espontánea antes de ser expuestos a iluminación ( fig. 15 ). Esta observación nos llevó a pensar que probablemente los fosfolípidos que estábamos empleando para hacer las membranas modelo, se hallaban en su estado oxidado. Notamos que cuando usábamos fosfolípidos que habían permanecido guardados durante algún tiempo ( "viejos" ) estos eran capaces de oxidar a la proteína ( citocromo "c" ) reducida. Con objeto de eliminar este artefacto se pensó en obtener fosfolípidos recientemente preparados para evitar su oxidación, extrayéndolos en presencia de un antioxidante ( D.L. tocoferol ). Los fosfolípidos fueron aislados a partir de yema de huevo ya que la obtención de la materia

prima no representaba ninguna dificultad, además de que el rendimiento es bueno y el método de extracción es conocido.

Los trazos del estado redox del citocromo "c" que obtuvimos en el espectrofotómetro de doble haz a partir de las muestras de proteoliposomas de RC y fosfolípidos en los que se había evitado la oxidación por medio de la extracción con tocoferol carecían de deriva exponencial antes de suministrar la iluminación infrarroja. ( Fig. 16 ).

Por otro lado el detergente Tritón X 100 también producía una deriva exponencial en presencia de citocromo "c" reducido ( fig. 17 A ) por lo que pensamos que esta molécula también se encontraba oxidada. El tratamiento de dicho detergente por el método de Glaund y Hartmann, ( 1955 ) eliminó tal deriva exponencial. ( fig. 17 B ).

Una vez eliminados los artefactos en la medición de la respuesta seguimos buscando la forma de obtener una membrana modelo donde los centros de reacción se orientaran asimétricamente y decidimos -- hacer los liposomas con fosfatidil colina, ya que las orientaciones de las diferentes razas RC: fosfolípidos de yema de huevo, presentaban mucha variación. ( fig. 20 A ).

La lecitina es un fosfolípido neutro muy abundante en la naturaleza que en la bacteria Rps. spheroides se encuentra constituyendo el 23% de los fosfolípidos que integran al cromatóforo ( Gorchein, 1968 ).

Un experimento ilustrativo de los resultados obtenidos con los proteoliposomas de RC de Rps. spheroides R-26 y lecitina purificada es

el que aparece en la figura 19 (experimento 4 de la tabla II ). Comparando los trazos que aparecen en dicha figura se puede apreciar como las respuestas obtenidas, bajo iluminación, en la condición 1: muestras de proteoliposomas en presencia de citocromo "c" y en la 2: muestras a las que además se ha añadido Tritón X 100, se alejan más entre sí a medida que la concentración de fosfatidil colina de la muestra disminuye. Esto nos sugiere que manteniendo la misma concentración de RC a medida que la cantidad de fosfolípido usado para la reconstitución del liposoma es menor, los centros de reacción orientan preferencialmente su extremo oxidante hacia el interior del liposoma. Aunque la orientación asimétrica de los RC en estas membranas modelo, no ha sido del todo exitosa, es evidente que los proteoliposomas de lecitina ya presentan una tendencia -- creciente a la orientación de la carga positiva hacia el medio exterior a los liposomas a medida que la cantidad de lípido aumenta, ó bien una tendencia a la orientación de la carga negativa hacia el interior del liposoma a medida que la cantidad de lecitina disminuye. ( fig. 20 B ).

El análisis estadístico de varianza aplicado a los datos obtenidos en la tabla II nos dice que existe una diferencia significativa del --- 99.975% para las relaciones 1:10 y 1:30. Entre las relaciones centros de reacción: fosfatidil colina 1:30 y 1:50, la diferencia es significativa al 98%. Esto quiere decir que el comportamiento de los proteoliposomas de cada una de las relaciones, el cual se manifiesta en el porcentaje de orientación asimétrica de los RC hacia uno u otro lado de la membrana modelo,

es diferente para cada razón proteína: lecitina empleada ( Tabla III ). El criterio de la mínima diferencia significativa tuvo que ser ajustado por el método para "varianzas de error debido a tratamientos", ya que los porcentajes de orientación dentro de una misma relación eran muy diferentes de un experimento al otro. Este problema, aún no resuelto puede ser debido a algún factor que no se ha estado controlando. Las fotografías de los proteoliposomas de RC y lecitina, muestran que en las 3 relaciones ( 1:10, 1:30 y 1:50 ), existen poblaciones de proteoliposomas de distintos tamaños. Una posible alternativa de trabajo podría consistir en pasar los liposomas de cada relación a través de una columna diferencial con el fin de separar las poblaciones de liposomas dimensionalmente iguales y ver si existe una muestra de tamaño homogéneo que oriente a los RC asimétricamente en su totalidad.

Otro factor que contribuye a la orientación de proteínas reconstituidas en membranas modelo, es la temperatura, ( Wickner, 1977 ). Aunque con el método de preparación de los proteoliposomas de centros de reacción sonicando únicamente al lípido se evita exponer a los centros de reacción a la temperatura del sonicado, durante los cambios de buffer y mientras se manipulan las muestras durante el experimento, es difícil que la temperatura sea estrictamente controlada. Probablemente, los cambios de temperatura hayan contribuido a la variación observada en las muestras de una misma relación de un experimento al otro.

El pH es otro factor que determina la forma en la cual se

orientan las proteínas en los liposomas ( Happe y col., 1977 ). No obstante, los proteoliposomas de RC fueron mantenidos constantemente a pH de 7.5 de manera que éste parámetro físico probablemente no contribuyó a la variación observada dentro de la misma relación en cada caso.

Por otro lado las membranas biológicas contienen del 20 al 80% de proteína, por peso. Los valores mas altos generalmente se han encontrado en membranas biológicamente activas. Nuestras relaciones RC: Fosfolípido ( 1:10, 1:30 y 1:50 ) en los liposomas reconstituidos contienen 10%, 3.3% y 2% de proteína respectivamente. Los resultados estadísticos de este trabajo demuestran que entre los proteoliposomas con 10% y 3.3% de proteína la diferencia es del 99.975 de confianza, mientras que cuando se comparan los proteoliposomas con 3.3 y 2% de proteína la diferencia es menor ( 98% ).

A medida que aumenta la cantidad de lípido en relación con la proteína, nos vamos alejando cada vez más de las proporciones funcionales de una membrana biológica. Por el contrario, las concentraciones mayores al 10%, sin sobrepasar al 70% aproximadamente de proteína con respecto al lípido, se acercan más a las condiciones reales de las membranas naturales. Hacer experimentos con concentraciones de proteína más elevadas es uno de nuestros futuros proyectos. Para este trabajo fueron escogidas las relaciones 1:10, 1:30 y 1:50, pues a pesar de que en las membranas biológicas metabólicamente activas, por ejemplo cromatóforos de las bacterias fotosintéticas, contienen canti-

des cercanas al 80% de proteína, el centro de reacción sólo representa un porcentaje pequeño ( del 2 al 5 % ) de la proteína membranal total, ya que los acarreadores del transporte de electrones, los péptidos en donde están insertos los pigmentos del complejo antena, etc., también son proteínas.

En la tabla IV se recopilan los datos obtenidos a partir de proteoliposomas preparados con fosfolípidos de yema de huevo y reconstituidos con RC de Rps. spheroides R-26 en las 3 relaciones también usadas para los liposomas de lecitina purificada. A diferencia de la tendencia a la orientación preferencial del extremo oxidante del RC hacia el exterior de los liposomas, a medida que la cantidad de lecitina era mayor, estas poblaciones de liposomas de fosfolípidos de yema de huevo, muestran una gran variabilidad, entre y dentro de cada grupo ( fig. 20 A ). El análisis estadístico de varianza aplicado a estos datos, nos dice que no existe diferencia significativa entre las 3 poblaciones de proteoliposomas ( con 10%, 3.3% y 2% de proteína ), razón por la cual resultó innecesario aplicar la prueba de la mínima diferencia significativa a los datos de la tabla IV.

Nosotros hemos pensado que la variación tan pronunciada que presentaron los experimentos realizados con fosfolípidos de yema de -- huevo pudo haberse debido a los motivos que indicamos a continuación.

1.- La materia prima, huevos de gallina de la cual eran extraídos los fosfolípidos provenía de varias fuentes como supermercados, granjas, etc.

2. - Los fosfolípidos aislados de yema de huevo, iban acompañados de una coloración naranja, en ocasiones más intensa que en otras. El espectro de estos fosfolípidos con "color" demostró que este se debía a la presencia de carotenos.

Drachev y col., (1976), encontraron que tanto los proteoliposomas como los cromatóforos de Rhodospirillum rubrum generan una diferencia de potencial eléctrica transmembranal dependiente de la luz, la cual miden entre dos celdas de electrodos de Ag/AgCl. Ellos dicen que la dirección del campo eléctrico en los proteoliposomas puede regularse añadiendo complejo antena a la mezcla reconstituida. Los proteoliposomas con RC generan un campo eléctrico de una dirección opuesta a la que se genera en el cromatóforo, mientras que los proteoliposomas de RC que contienen una cantidad suficiente de complejo antena producen una diferencia de potencial como en el cromatóforo.

Los complejos antena son proteínas integrales de las membranas de las bacterias fotosintéticas y se encuentran constituidos por clorofilas y carotenos unidos a proteínas. El hecho de que los centros de reacción de los proteoliposomas reconstituidos con fosfolípidos de yema de huevo que contenían carotenos experimentaran una orientación diferente a la que observamos en el caso de liposomas de RC reconstituidos con lecitina pura, no nos permite decir de ninguna manera que de los componentes del complejo antena, el pigmento responsable de influenciar la orientación de los RC en los proteoliposomas sea el caroteno. Para ello, sería necesario otro tipo de experimento, por ejemplo

preparando:

A.- Poblaciones de liposomas con fosfolípidos carentes de pigmentos y reconstituídos con centros de reacción y con complejos antena, B.- Liposomas de fosfolípidos reconstituídos con carotenos y centros de reacción, C.- poblaciones de liposomas de fosfolípidos sin carotenos y con RC (control). La comparación de las orientaciones de RC, obtenidas con los tres tipos de poblaciones de proteoliposomas nos podría llevar a aclarar esta hipótesis.

No obstante, una posible explicación a la variación que se aprecia en la fig. 20 A, podría residir en la presencia de cantidades variables de carotenos en estos liposomas. Algunos trazos de esta figura muestran que en la relación 1:50 hay un porcentaje de orientación del extremo oxidante de RC hacia el medio exterior al liposoma, menor que en las otras dos relaciones. Es decir, que si comparamos la tendencia que manifiestan los proteoliposomas de lecitina pura que carece de pigmentos, con algunas respuestas obtenidas a partir de los proteoliposomas de fosfolípidos de yema de huevo, podríamos decir que la polaridad ha sido invertida. Es también interesante notar que la concentración de fosfolípidos en la relación 1:50 es mayor ( 50 mgr/ml ), que en las otras 2 relaciones ( 30 y 10 mgr/ml ) y que por lo tanto, en la relación 1:50 la cantidad de caroteno también lo es, de manera que si este pigmento influenciara la orientación, podríamos suponer que la relación 1:50 sería la más afectada.

Al comparar las respuestas obtenidas a partir de los proteoliposomas de lecitina con las de los proteoliposomas de fosfolípidos de yema de huevo, podríamos preguntarnos dos cosas: de que tipo de lípidos está constituido el cromatóforo de la bacteria fotosintética de la que estamos extrayendo los centros de reacción y si existe alguna influencia del tipo de lípido en la orientación de la proteína. Para responder a la primera pregunta: la composición lipídica de cromatóforos purificados a partir de Rps. spheroides consiste en 23% de fosfatidil colina, 35% de fosfatidiletanolamina y 34% de fosfatidil glicerol ( Gorcheln, 1968 ). Para responder el segundo punto, podemos citar a Happe y col. ( 1977 ), quienes para la preparación de proteoliposomas de rodopsina, emplearon varios tipos de fosfolípidos ácidos y observaron que en todos, el comportamiento de la bacteriorodopsina al mismo pH es semejante. El factor determinante en la orientación de la rodopsina es el grado de disociación de los grupos fosfato del fosfolípido, el cual va ligado al pH empleado y no al tipo de lípido. Estos mismos autores encontraron que en proteoliposomas de cardiolipina y bacteriorodopsina a pH inferiores a 2.75 la salida de protones era favorecida, mientras que la entrada de protones se favorecía a pH superiores a 2.75.

Por otro lado, Wickner ( 1977 ), reconstituyó la proteína de la cápsula del virus M-13 en liposomas de lecitina y a la temperatura de fusión del ácido graso encontró que las proteínas se disponían asimétricamente en el liposoma.

Casey y col. ( 1979 ), trabajando con citocromo oxidasa reconstituida, también encontraron que hay una dependencia de la translocación de protones relacionada con la razón enzima lípido usada en la reconstitución .

En resumen podemos decir que en la orientación asimétrica de las proteínas en membranas modelo influyen los siguientes factores:

- 1.- el pH.
- 2.- la temperatura.
- 3.- la razón lípido : proteína.

Los dos primeros requieren de la aplicación de condiciones drásticas como pH cercanos a 2.75 y temperatura de fusión, para la consecución de la asimetría. El RC de las bacterias fotosintéticas es una proteína que se desnaturaliza bajo estas condiciones. El dominio del tercer método representaría una forma accesible para conseguir la asimetría de un mayor número de proteínas sin desnaturalizarlas. Aunque consideramos a la variación de la razón lípido: proteína como un método prometedor para orientar proteínas ya que no se aleja de las condiciones naturales de temperatura y pH de las membranas biológicas, es importante subrayar que este trabajo no persigue reproducir las condiciones fisiológicas de las membranas biológicas, el objetivo es orientar asimétricamente, a la proteína del centro de reacción en las membranas modelo, independientemente de que tanto nos acerquemos o nos alejemos de las condiciones de las membranas naturales. Sin embargo es probable que

la relación que nos orienta a la proteína del centro de reacción se acerca a aquella que la naturaleza ha escogido para el arreglo de las membranas biológicas.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que existe una tendencia a la orientación del lado oxidante de los RC hacia el exterior del liposoma a medida que aumenta la cantidad de fosfolípido en relación con la proteína.

El hecho de encontrar una forma de orientar proteínas de la importancia metabólica del RC en membranas modelo nos permitirá conocer más a fondo las interacciones de las proteínas con el lípido en donde se encuentran y conocer más a fondo procesos tan importantes como la fotosíntesis, en los cuales, estas proteínas juegan un papel decisivo. Ya que los métodos de formar estas membranas modelo ó liposomas son al azar, el propósito de generar membranas experimentales asimétricas puede tener importancia en dos aspectos:

1.- Su utilidad para estudiar fenómenos de membrana en el laboratorio en forma controlada y en forma semejante a como se encuentran en la naturaleza.

2.- Poder inferir por medio de estos experimentos los posibles factores físicos que influyen en la orientación de proteínas en las membranas naturales.

## V. BIBLIOGRAFIA .

Arnon, D.I. "Conversion of light into chemical energy in Photosynthesis".

Nature Vol. 184. pp 10-21 ( 1959 ).

Arnon, D.I. "The chloroplasts as a Functional Unit in Photosynthesis".

Handbuch der Pflanzen Physiologie. Vol. 5. pp. 773-829.

Springer Verlag ( 1960 ).

Bales, H., Vernon, L.P. ( 1963 ) Bacterial Photosynthesis, ed. H. Gest.

A. San Pietro L.P. Vernon, 269-74. Yellow Springs,

Ohio: Antioch. Press.

Bangham, A.D., Standish, M.M. y Watkins, J.C. ( 1965 ) J. Mol.

Biol. 13: 238-252.

Bangham, A.D., De Gier , J. y Greville, G.D. ( 1967 ) Chem.

Phys. Lipids. 1, 225-246.

Bangham, A.D. ( 1975 ) En: Cell Membranes. Biochemistry, Cell

Biology and Pathology. Editores G. Weissman y R. Claiborne,

H.P. Publishing. Co. Inc. New York, N.Y., pp. 79-88 .

Bolton, J.R. y Coet, K. ( 1973 ) Photochem. Photobiol. 18, 417-421

Borisov, A.Y. y Godik, V.I. ( 1973 ) Biochim. Biophys. Acta. 308:  
227.

Calvin, M. y Bassham, J.A. ( 1957 ) "The Path of Carbon in Photosint  
synthesis" Prentice - Hall, Inc.

Case, G.D., Parson, W.W. Thorneber, J.P. ( 1970 ) Biochim. Biophys.  
Acta. 223: 122-128.

Casey, R.P., Chappell, J.B. & Azzi, A. ( 1979 ) Biochem. J. 182:  
149-156.

Clayton, R.K. y Wang, R.T. En : Methods in Enzymology Vol. 23  
ed. Anthony San Pietro, Academic Press, New York &  
London ( 1971 ) pp. 696-704.

Clayton, R.K. y Clayton, B.J. ( 1972 ) Biochim. Biophys. Acta 283:  
492-504.

Clayton, R.K. ( 1974 a ) En: Luz y materia viviente: guía para el estudio  
de la fotobiología. Vol. I: La parte física. Editorial  
Reverté, S.A.

Clayton, R.K. ( 1974 b ) En: Luz y materia viviente : guía para el estudio de la fotobiología. Vol. II: La parte biológica. Editorial Reverté, S.A.

Cogdell, R.J., Brune, D.C. y Clayton, R.K. ( 1974 ) FEBS Lett.  
45: 344-347.

Cogdell, R.J., Monger, T.G. y Parson, W.W. ( 1975 ) Biochim. Biophys.  
Acta 408: 189.

Cogdell, R.J., Parson, W.W. y Kerr, M.A. ( 1976 ) Biochim. Biophys.  
Acta 430: 83.

Cogdell, J.C. y Crofts, A.R. ( 1977 ) Biochim. Biophys. Acta 502:  
409-416.

Cohen-Bazire, G., Siström, W.B., Stainer, R.Y. ( 1957 ) J. Cell  
Comp. Physiol. 49: 29.

Crofts, A.R. En: "Perspectives in Membrane Biology" ed. S. Estrada  
y C. Gitler. Academic Press. New York and London.  
( 1975 ) pp. 373-407.

Cusanovich, M.A., Kamen, M.D. ( 1968 ) Blochim. Biophys. Acta 153:  
376-396.

Debrunner, P.G., Schultz, C.E., Peher, G., Okamura, M.Y. ( 1975 )  
Biophys. J. 15, 226 a.

Drachev, L.A., Prolov, V.N., Kaulen, A.D., Kondrashin, A.A.,  
Samuilov, V.D., Semenov, A.Y. y Skulachev, V.P. ( 1976 )  
Blochim. Biophys. Acta 440: 637-660.

Dutton, P.L., Jackson, J.B. ( 1972 ) Europ. J. Biochem. 30: 495-510.

Dutton, P.L., Leigh, J.S. y Reed. D.W. ( 1973 ) Blochim. Biophys.  
Acta 292: 654-664.

Dutton, P.L. y Wilson, D.F. ( 1974 ) Blochim. Biophys. Acta 346:  
165-212.

Drysdale, L.N.M. ( 1954 ) Nature ( London ) 173: 692-693.

Drysdale, L.N.M., Hulskamp, W.J., Vos, J.J. y Van der Hart, J.M.  
( 1956 ) Blochim. Biophys. Acta 19: 188.

Emerson, R., Arnold, W. ( 1932 a ) J. Gen. Physiol. 15: 391.

Emerson, R. y Arnold, W. ( 1932 b ) J. Gen. Physiol. 16: 191.

Engelmann, Th. W. ( 1888 ) Botan. Zh. 46: 661-669.

Evaas, E.H. y Crofts, A.R. ( 1974 ) Biochim. Biophys. Acta 375:  
89-102.

Feher, G. ( 1971 ) Photochem. Photobiol. 14: 373-388.

Feher, G., Okamura, M.Y. y Mc. Elroy, J.D. ( 1972 ) Biochim.  
Biophys Acta 267: 222-226.

Feher, G., Isaacson, R.A., Mc. Elroy, J.D., Ackerson, L.C. y  
Okamura, M.Y ( 1974 ) Biochim. Biophys. Acta 368:  
135-139.

Fowler, C.F. ( 1974 ) Biochim. Biophys. Acta 257: 327-331.

Fraker, P.J., Kaplan, S. ( 1971 ) J. Bacteriol. 108: 465-473.

Frenkel, A.W. ( 1970 ) Biol. Rev. 45: 569-616.

Fuller, R.C. Smillie, R.M. Rigopoulos, N., Yount, V. ( 1961 )

Arch. Biochem. Biophys. 95: 197-202.

Gaffron, H. ( 1933-1935 ) Biochem. Z. 260: 1-17 ( 1933 ) 275: 301

319 ( 1935 ).

Glaudet, y Hartmann, ( 1955 ) Acta Chem. Scand. 9 : 3.

Glover, J., Kamen, M.D. y Van Gendereen, H. ( 1952 ) Arch. Biochem.

Biophys. 35: 384-408.

Gorcheln, A. ( 1968 ) Proc. Roy Soc. 3 170: 279-297.

Gromet-Elhanan, Z. "Electron Transport and Photophosphorylation in

Photosynthetic Bacteria" En: Encyclopedia of Plant Physio-

logy. New Series, Vol. 5 Photosynthesis I. Editores: A.

Trebs y M. Avron. Springer-Verlag Berlin Heidelberg ( 1977 )

pp. 337- 362.

Halsey, Y., Parson, W.W. ( 1974 ) Biochim. Biophys. Acta.

Happe, M., Teather, R.M., Overath, P., Knabbing, A. y Oester-

held, D. ( 1977 ) 465: 415-420.

**Hauser, H.O. ( 1971 ) Biochim. Biophys. Res. Commun. 54: 1049-1055.**

**Huang, C.H. ( 1969 ) Biochemistry, 8: 344-352**

**Hummer, S.H. ( 1950 ) J. Gen. Microbiol. 4: 286-293**

**Katz, J.J. y Morris, J. ( 1973 ) Curr. Top. Bioenerg. 5: 41.**

**King, M.T., Drews, G. ( 1973 ) Biochim. Biophys. Acta 305: 230-248.**

**Kneff, D.B., Buchanan, B.B. ( 1975 ) Biochim. Biophys. Acta 376:  
549-560.**

**Kornberg, R.D. y Mc. Connell, H.M. ( 1971 ) Biochemistry. 10:  
1111-1120.**

**Loach, P.A. y Hall, R.L. ( 1972 ) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.  
69: 786-790.**

**Mc. Elroy, J.D., Feher, G. y Mauzerall, D. ( 1970 ) Biophys. Soc.  
Abstr. 10: 204 a ( Abstr. no. FAM-B7 ).**

**Mc. Elroy, J.D., Feher, G. y Mauzerall, D.C. ( 1974 ) Biochim.  
Biophys. Acta 333: 261-278.**

Mitchell, P. ( 1967 ) Fed. Proc. 26: 5 pp. 1370-1379.

Mollische, H. ( 1907 ) Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen, Jena.

Montal, M. ( 1976 ) Ann. Rev. Biophys. Bioenerg. 5: 119.

Niel Van, C.B. ( 1935 ) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.  
3: 138-150.

Niel Van, C.B.: "The Bacterial Photosynthesis and Their Importance  
for the General Problem of Photosynthesis" Advan. Enzymol.  
Vol. 1 pp. 263-328 ( 1941 ).

Okamaya, S., Yamamoto, N., Nishikawa, K., Horio, T. ( 1968 ).  
J. Biol. Chem. 243: 2995-2999.

Okamura, M.Y., Isaacson, R.A. y Feher, G. ( 1975 ) Proc. Nat.  
Acad. Sci. U.S.A. 72: 3491.

Papahadjopoulos, D. & Miller, N. ( 1967 ) Biochim. Biophys. Acta  
135: 624-638.

Papahadjopoulos, D. & Watkins, J.C. ( 1967 ) Biochim. Biophys.

Acta 135: 699-662.

Papahadjopoulos, D.S., Nir & Ohkita, S. ( 1972 ) Biochim. Biophys.

Acta 266: 651-583.

Parson, W.W. ( 1967 ) Biochim. Biophys. Acta 143: 263-265.

Parson, W.W. ( 1968 ) Biochim. Biophys. Acta 153: 248-259.

Parson, W.W. y Cogdell, R.J. ( 1975 ) Biochim. Biophys. Acta 461:

105-149.

Prince, R.C., Hauska, G. & Crofts, A.R. ( 1974 ) Biochem. Soc.

Trans. 2: 534-537.

Racker, E. ( 1975 ) Proc. Tenth FEBS Meeting. pp. 25

Reed, S.W., Peters, G.A. ( 1972 ) "Characterization of Pigments in

Reaction Center Preparations from *Rhodospseudomonas spheroides*".  
J. Biol. Chem. 247: 7184-7152.

Rendi, R. ( 1967 ) Biochim. Biophys. Acta 135: 333-346.

Ruben, S., Randall, M., Kamen, M.D. & Hyde, J.L. ( 1941 )

J. Amer. Chem. Soc. 63: 877.

Sauer, K. "Primary Events and the trapping of Energy" En: Bioenergetics of Photosynthesis. Ed. Govindjee. Academic Press. New York. San Fco. London. ( 1975 ) pp. 118.

Scholes, P., Mitchell, P. & Moyle, J. ( 1969 ) Eur. J. Biochem. 8: 450.

Sistrom, W.R. ( 1962 ) J. Gen. Microbiol. 28: 607-616.

Smith, L. & Beltscheffsky, M. ( 1959 ) J. Biol. Chem. 234: 1575.

Snedecor, G.W. y Cochran, W.G. ( 1979 ). Métodos Estadísticos Ed. C.E.C.S.A. 6a. Impresión 321-418.

Steiner, L.A., Okamura, M.Y., López, D.A., Moskowitz, E., Feher, G. ( 1974 ) Biochemistry 13. 1405-1410.

Straley, S.C., Parson, W.W., Mauzerall, D.C. Clayton, R.K. ( 1973 ) Biochim. Biophys. Acta 305: 597-609.

Sugimura, T., Okabe, K. ( 1962 ) J. Biochem. Tokyo 52: 235-236.

Takamiya, K.I., Takamiya, A. ( 1967 a ) Plant Cell Physiol. 8: 719-730.

Takamiya, K.I., Nishimura, M., Takamiya, A. ( 1967 b ) *Plant Cell Physiol.* 8: 79-86.

Takamiya, K.I., Takamiya, A. ( 1969 ) *Plant. Cell Physiol.* 10: 113-127.

Thorber, J.P., Olson, J.M., Williams, D.M. Clayton, M.L.  
( 1969 ) *Biochim. Biophys. Acta* 172: 351-354.

Wickner, W.T. ( 1977 ) *Biochemistry*, 16: 254-258.