

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**EFEECTO DE LOS REACTIVOS MONO— Y BIFUNCIONALES  
EN EL FACTOR DE ACOPLAMIENTO (CF 1) DE  
CLOROPLASTOS 'IN SITU' Y AISLADOS**

**TRABAJO MONOGRAFICO  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
PRESENTA:  
EDUARDO HERNANDEZ HERRERA**

**MEXICO, D. F., 1982**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

# INDICE GENERAL

## ABREVIATURAS

## RESUMEN

## INTRODUCCION

## GENERALIDADES

- I. - Morfología del cloroplasto
- II. - Funciones del Cloroplasto
- III. - Factor de Acoplamiento
- IV. - Reactivos Químicos

## PROPIEDADES DEL CF1 AISLADO

- I. - Estructura del CF1
- II. - Actividad Enzimática y Sitios de unión

## PROPIEDADES DEL CF1 UNIDO A LA MEMBRANA

- I. - El Complejo ATPasa y sus Actividades.
- II. - Cambios Conformationales y sitios de unión a nucleótidos.
- III. - Funciones de las Subunidades de CF1
- IV. - Mecanismo de la Síntesis de ATP

## CONCLUSIONES

## BIBLIOGRAFIA

## A B R E V I A T U R A S

$\lambda$	-----	Angstrom
ADP-(C <sup>14</sup> )	-----	Adenosin difosfato marcado con carbono 14.
AMP, ADP, ATP	-----	Adenosin mono, di y trifos- fato.
ATPasa-Ca <sup>++</sup> , -Mg <sup>++</sup>	-----	ATPasa dependiente de calcio y magnesio.
ATP-(C <sup>14</sup> )	-----	Adenosin trifosfato marcado con carbono 14.
ATP-(P <sup>32</sup> )	-----	Adenosin trifosfato marcado con fosforo 32
CF1	-----	Factor de acoplamiento de los cloroplastos.
CF1-Fo	-----	Factor de acoplamiento CF1 unido a la membrana del tila- coide en el canal de protones Fo.
Cit-f	-----	Citocromo f
CuP	-----	Complejo de (ortofenantroleina) -Cu II

Dio-19	-----	Inhibidor de la captación de protones.
DMS	-----	Dihidrocloruro dimetil suberimidato.
DSS	-----	Dodecil sulfato de sodio
DTEM	-----	Ditioetil maleimida
DTP	-----	Dihidrocloruro dimetil-3, 3'-ditiobispropionimidato
DTNP	-----	2, 2'-ditiobis-(5-nitrotrimidina)
DCCD	-----	N, N'-diciclohexilcarbodiimida.
DDPM	-----	N(4-dimetilamino-3, 5-dinitrofenil)maleimida
DTT	-----	Ditiotreitol
$\Delta\psi$	-----	Diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana
$\Delta\mu_H$	-----	Puerza proton-motriz o diferencia de potencial electroquímico de protones.
$\Delta pH$	-----	Diferencia de concentración de protones.
$\epsilon$ -ADP	-----	1, N <sup>6</sup> eteno ADP
$\epsilon$ -AMP-FNP	-----	1, N <sup>6</sup> etenoadenilimido difosfato
EDTA	-----	Acido etilendiaminotetracetico

<b>F1</b> .....	Factor de acoplamiento de la mitocondria.
<b>Fd</b> .....	Fenilendiamina
<b>F<sub>2</sub>DNB</b> .....	1, 5-difluoro-2, 4-dinitrobenze- no
<b>Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup></b> .....	Ferrocianuro
<b>Fo</b> .....	Compuesto hidrofobico de la - membrana
<b>GTP</b> .....	Guanidina trifosfato
<b>H</b> .....	Protones
<b>H<sup>3</sup></b> .....	Deuterio
<b>HCL-Guanidina</b> .....	Hidrocioruro de Guanidina
<b>H<sub>2</sub>O<sup>3</sup></b> .....	Agua marcada con deuterio
<b>IA</b> .....	Iodoacetamida
<b>K1</b> .....	Costante de disociación
<b>Km</b> .....	Constante de Michaeli
<b>NADPH(NADP<sup>+</sup>)</b> .....	Nicotinadenin dinucleotido - oxidado (reducido)
<b>NED-CL</b> .....	7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole
<b>NED-tir</b> .....	El NED unido a el grupo fenol de la tirostina en el CFl
<b>NFM</b> .....	5 N(P-(2-benzoxazil)fenil) -- succinimido

NEPM-Cis	5 N(P-(2-benzotazol)fenil) succinimido-cisteina
NEM	N-etilmaleimida
OFBM	ortofenilenebismaleimida
OIB	ortiodosobenzoato
P680	Trampa de energía para PSII
P700	Trampa de energía para PS I
Pc	Plastocianina
Pi	Fosfato inorganico
PQ	Plastoquinona
PS I, II	Fotosintesis I, II
Q	Quinona (Aceptor de electron primario para PS II)
Q'	Quercetina
RuDP Carboxilasa	Ribulosa-5'-difosfato carboxila sa (carboxidismutasa)
SH	Grupo sulfidrido
X	Aceptor de electrones primario para PS I
Z	Donador de electrones prima-- rio para PS II



## RESUMEN

El Factor de acoplamiento de los cloroplastos ( CF1 ) es parte de un complejo enzimático, se encuentra localizado en la parte externa de la membrana del disco tilacoide. Usando el método de electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS se encontró que el CF1 está formado por cinco subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  denominación dependiente del decreciente peso molecular. La estequiometría  $2\alpha$ ,  $2\beta$ ,  $1\gamma$ ,  $1\delta$  y  $2\epsilon$  determinada por reacciones con reactivos bifuncionales es la aceptada. La localización de los grupos SH en la enzima aislada es importante, ya que estos sitios fueron los que interaccionaron con la mayoría de los reactivos mono y bifuncionales demostrando mediante ellos, la existencia de 12 a 13 grupos SH / mol de CF1.

El uso de reactivos mono y bifuncionales (NEM, IA, O-IB, DTNP, DTEM y OFEM ) sobre el CF1 unido a la membrana, en presencia de la luz, ocasionó interacción con los grupos SH y producción de cambios conformacionales que desacoplaron o inhibieron la transferencia de energía con la consecuente inhibición de la fotosíntesis.

Otros reactivos mono y bifuncionales utilizados fueron: P<sub>2</sub>DNB, DMS y DTP para determinar la estequiometría, encontrando que reaccionan con grupos amino y fenoles de las subunidades; NEM y DDFM fueron usados para medir distancias intersubunida-

des reaccionando con los grupos SH.

La función más importante del CFI in situ es la de actuar como ATP sintetasa. También actúa como ATPasa, aunque esta actividad es latente, puede activarse por el tratamiento con calor, tripsina y compuestos tioles. Estas dos funciones deben ser consideradas como dos procesos independientes.

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

La vida es hermosa, frágil y fugaz como los irisados rayos de luz que maravillosamente la sostienen e impulsan desde sus más remotos orígenes por medio de la fotosíntesis. Gracias a éste admirable proceso de universal alcance, el reino vegetal, partiendo de materias pobres en energía, convierte incesantemente la energía radiante en energía química, y abastece posteriormente, de materia rica en energía a todo el mundo vivo.

Es importante subrayar que las plantas no solo surten de materiales estructurales a los organismos no fotosintéticos, sino que les suministran la energía química en ellos almacenada, indispensable para el mantenimiento de las actividades vitales. A la fotosíntesis se debe, pues, el milagro de que la energía en forma de luz proveniente del sol antes de degenerar en calor, sea almacenada como energía química biológica.

Las plantas verdes han desarrollado en su evolución como centros energéticos, unos organelos citoplásmicos altamente especializados denominados cloroplastos, con objeto de convertir, con extraordinaria eficacia, la energía almacenada en la luz en energía química fisiológica.

Dentro del cloroplasto se localizan estructuras como son, granum

(conjuntos de tilacoides) y el sistema lamelar donde se encuentra todo el aparato fotosintético. La membrana del tilacoide - esta constituida por proteínas, lípidos, carbohidratos y otros - elementos menos importantes. Las proteínas membranales tienen múltiples funciones, una de las más importantes es la de - servir de factor de acoplamiento ( F1 ) para la síntesis de -- ATP (fotofosforilación).

El objetivo de la presente revisión es la de actualizar conocimientos acerca del factor de acoplamiento en cloroplastos de espinacas ( CF1 ), y la de relacionar los efectos de reactivos mono y bifuncionales sobre su estructura, actividad y funciones, encontrándose el CF1 aislado y unido a la membrana.

## GENERALIDADES.

## I. - MORFOLOGIA DEL CLOROPLASTO.

En las plantas superiores los cloroplastos son los organelos celulares con capacidad fotosintética, presentándose en una variedad de tamaños, formas y números, con una estructura elipsoidal que mide de 5 a 10 micras de diámetro (71) (Figura # 1 ). Dichos organelos están constituidos por una membrana externa doble muy frágil llamada envoltura que delimita el estroma del cloroplasto y sirve de barrera de permeabilidad entre el citoplasma celular y el estroma del cloroplasto ---- (figura # 1-a ).

En el interior del cloroplasto hay gran número de estructuras membranosas intimamente empacadas que se llaman lamelas (figura # 1-b), presenta otras estructuras aplanadas en forma de disco llamadas tilacoides (figura # 1-c), las cuales están aplanadas formando los granum (figura # 1-d), estos están interconectados mediante la membrana con el sistema lamelar (figura # 1-e). En el estroma del cloroplasto (figura # 1-f) se encuentra una fase líquida que es la matriz en la cual se localizan enzimas del ciclo de Calvin, fotosintéticas, que ayudan en

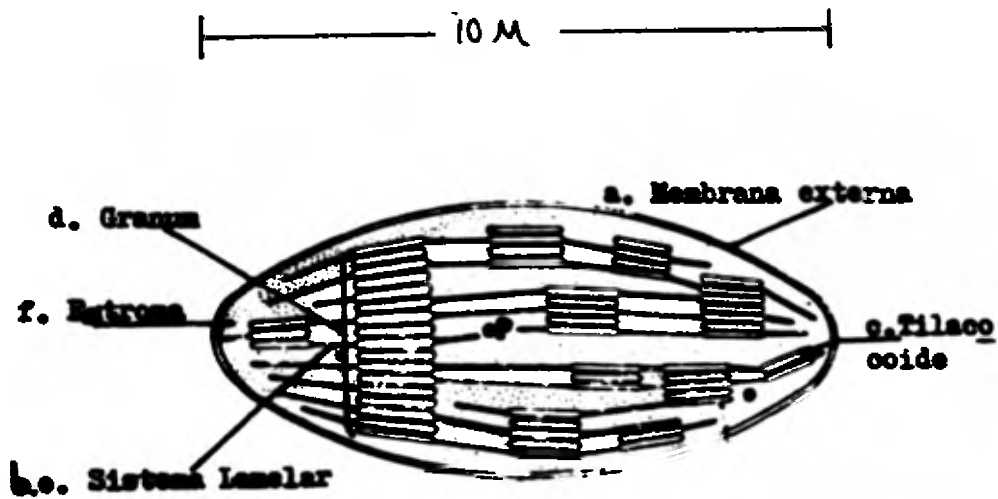


Figura # 1 .- Representación Esquemática del cloroplasto.  
(7L).

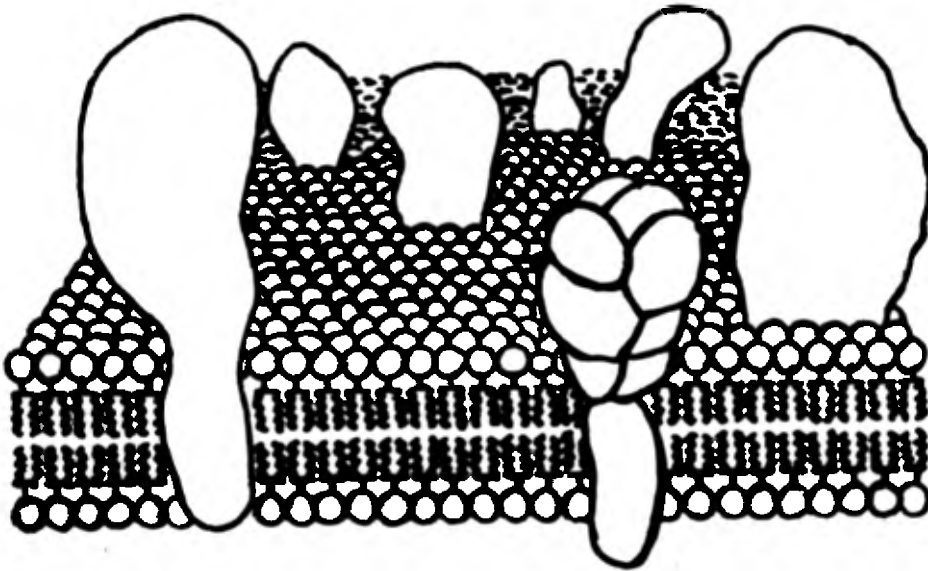
la síntesis de ácidos nucleicos, ácidos grasos y que tienen los mecanismos de autoregulación y replicación de cloroplasto.

La membrana del cloroplasto está formada por proteínas, lípidos, clorofilas, otros pigmentos y restos de moléculas pequeñas solubles en agua.

Debido a la fundamental importancia de las membranas en los procesos biológicos, el modelo más aceptado es el de Singer y Nicholson (69) conocido como "modelo del mosaico fluido" (figura # 2), el que presenta una doble capa de fosfolípidos discontinua con sus cadenas hidrofóbicas orientadas hacia el interior y las cabezas polares hacia el exterior, las proteínas que son llamadas integrales se encuentran tanto en la periferia como dentro de la bicapa de fosfolípidos o atravesando la membrana de lado a lado. En el modelo predominan las proteínas con la conformación  $\alpha$ -hélice-amfipática (modelo con parte polar y zona hidrofóbica), lo que favorece su unión a la membrana por sus extremos hidrofóbicos. En condiciones fisiológicas los lípidos de la membrana, se encuentran en estado líquido, permitiendo que las proteínas floten libremente y se mantenga el equilibrio dinámico.

#### Sistema de pigmentos.

En el sistema lamelar de un cloroplasto (granum y lamelas) se encuentra localizado todo el aparato fotosintético, utilizado para la conversión de la energía solar en energía química. En



**Figura #2 .-** Esquema tridimensional del modelo membranal del "modelo fluido". Los cuerpos sólidos representan a las proteínas globulares integrales que se encuentran distribuidas al azar dentro de la bicapa lipídica (69).



la tabla # 1 y figura # 3, se muestra la clasificación de los pigmentos en las plantas verdes y su estructura (61). La función de estos pigmentos es suministrar a la planta un sistema eficiente en la absorción de luz a través del espectro visible, esta energía es entonces transferida a los centros de reacción donde es utilizada para las reacciones fotoquímicas, el conjunto de pigmentos involucrados en la absorción de luz y transferencia de energía se conocen como pigmentos cosechadores de luz.

Las Clorofilas, son los pigmentos que dan a las plantas su color verde característico, existen dos clases en las plantas superiores:

Clorofila a. - Es el pigmento más abundante y está presente en todos los organismos fotosintéticos que producen oxígeno molecular. Hay varias formas de clorofilas a, la que absorbe luz de longitud onda corta (660) localizada en PS-II y otra que absorbe luz de longitud de onda mayor (670) y que se encuentran en PS-I.

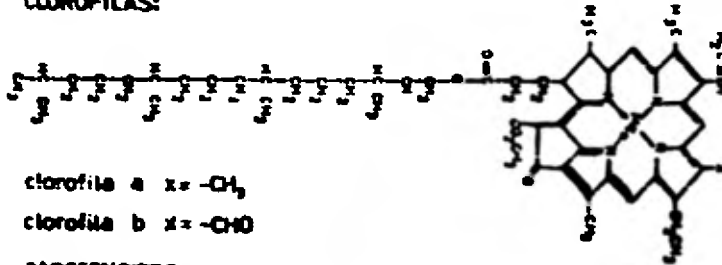
Y la b encontrada en plantas superiores cuya estructura molecular contiene un oxígeno más y dos hidrógenos menos que la clorofila a, se encuentra en PS-II. Se cree que hay dos tipos de clorofila b, la que absorbe luz de longitud onda corta (640) y la que absorbe luz de longitud de onda mayor (650) (30)

Los Carotenoides. - Son los pigmentos naranja y amarillo encon-

Pigmentos	Ocurrencia	Funciones
<b>I. <u>Clorofilas</u></b>		
Clorofila A	Todas las plantas fotosintetizadoras (excepto bacterias)	Cosechadora de luz, centro de reacción.
Clorofila B	Plantas superiores y algas verdes.	Cosechadora de luz verdes.
<b>II. <u>Carotenoides</u></b>		
<b>Carotenos <math>\alpha</math> y <math>\beta</math></b>		
	$\alpha$ En muchas hojas y ciertas algas. En algas rojas y un grupo de algas verdes (Siphonales). Es el caroteno que existe en mayor cantidad.	Principalmente como antioxidante, cosechadores de luz en menor grado.
	$\beta$ Principal caroteno de las demás plantas.	
<b>Xantofilas</b>		
Luteína	Principal carotenol de hojas verdes, algas verdes y rojas.	Sirven poco como cosechadores de luz, sufren un ciclo de oxidación y desoxidación, la función del cuál se desconoce.
Zeaxantina	Segundo mayor carotenol de hojas	
Violaxantina		

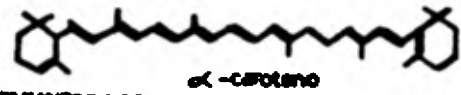
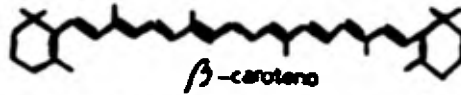
Tabla #1 .- Clasificación de Pigmentos (61) .

## CLOROFILAS:

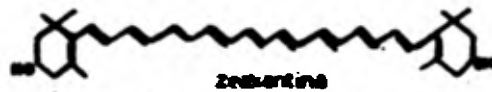
clorofila a  $x = -CH_3$ clorofila b  $x = -CHO$ 

## CAROTENOIDES:

## A) CAROTENOS:



## B) XANTOFILAS:



**Figura 73** .- Estructura de los principales pigmentos del aparato fotosintético (61).

trados en casi todos los organismos fotosintéticos. Hay dos clases de carotenoides: Los carotenos que son hidrocarburos que absorben la luz azul y de entre ellos el beta caroteno es el más común, Y los carotenoles llamados comunmente xantofilas.

Se acepta que la mayoría de los carotenos estan presentes en PS-I y las Xantofilas en PS-II (30). Los carotenoides son llamados pigmentos accesorios ya que su función es absorber la energía del espectro visible que no es captada por las clorofilas.

## II.- FUNCIONES DEL CLOROPLASTO.

### Fase Oscura (Ciclo de Calvin).

La fase oscura se desarrolla dentro de la matriz o estroma, en donde ocurre la asimilación de  $\text{CO}_2$  para rendir finalmente una molecula de hexosa, usando ATP como fuente de energía y al NADPH como agente reductor, durante el proceso se consumen 12 NADPH y 18 ATP (20) (figura # 4).

### Fase Luminosa. -

Aquí las reacciones van en serie; absorción de energía radiante por los pigmentos "antena" y centros de reacción, separación de cargas, transferencia de electrones, reducción de  $\text{NADP}^+$  y síntesis de ATP.

Dichas reacciones se realizan en la membrana del tilacoide que es donde se localiza la cadena transportadora de electrones provenientes de la oxidación del agua (figura # 5), formando un ----

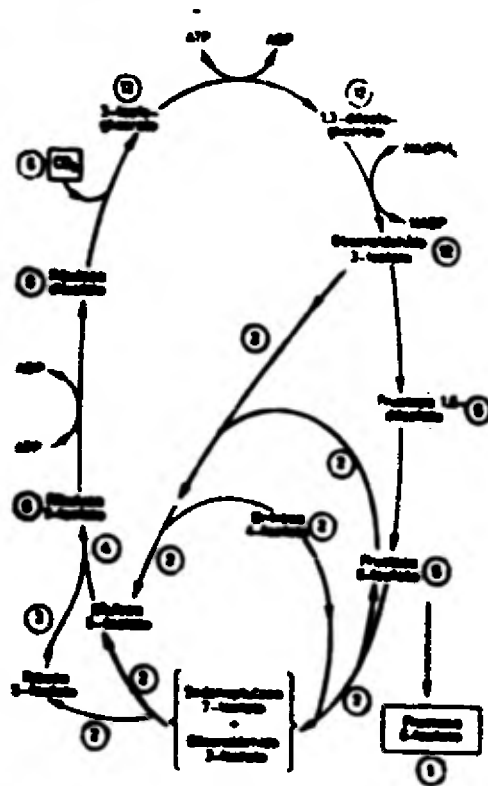


Figura # 4 .- Ciclo de Calvin o ciclo de la reducción fotosintética del carbono. Las cifras encerradas en círculo indican el número de moléculas que participan en una vuelta completa del ciclo. El ciclo representa la síntesis neta de una molécula de fructosa 6 fosfato a partir de 6 moléculas de dióxido de carbono (20).

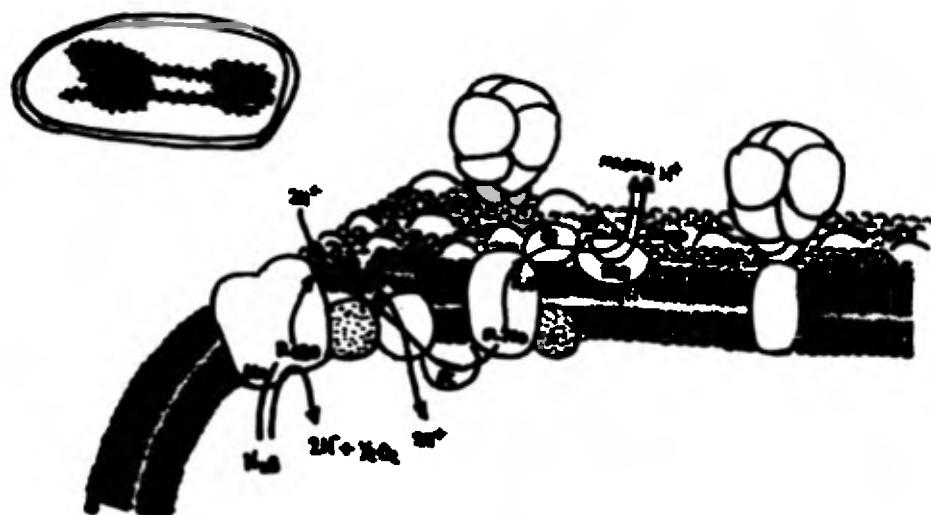


Figura #5 .- Cadena transportadora de electrones en la membrana del tilacoide en cloroplasto de espinaca (26).

$\Delta pH$  que es usado en sentido contrario que en las mitocondrias, por el complejo CFI-Fo para sintetizar ATP, por lo que podemos decir que la fotofosforilación está acoplada al transporte de electrones mediado por el gradiente electroquímico de protones.

Para iniciar el proceso fotosintético es necesaria la incidencia de luz sobre los pigmentos. La energía luminosa absorbida por los pigmentos accesorios es transferida a la clorofila a y a la b que se encuentran en los centros de reacción específicos vía otras moléculas de clorofila.

Cuando la luz es absorbida en forma de cuanto por electrones de los pigmentos, estos electrones pasan a otros orbitales y la molécula se encuentra en un estado excitado (figura # 6).

Hay una relación cuantitativa entre el número de cuantos absorbidos y el número de moléculas activadas. Las reacciones fotoquímicas se caracterizan por los productos intermedios en los que un electrón ha pasado a un orbital externo de mayor nivel energético en un átomo o molécula electrónicamente excitado. Captada esta energía radiante, se transmite a través de los pigmentos hasta llegar al centro de reacción donde se convierte en energía química, con la producción de un equivalente oxidante y otro reductor. Es importante considerar que el centro de reacción alcanza el estado de singulete excitado y que después el aceptor primario de electrones se reduce, quedando

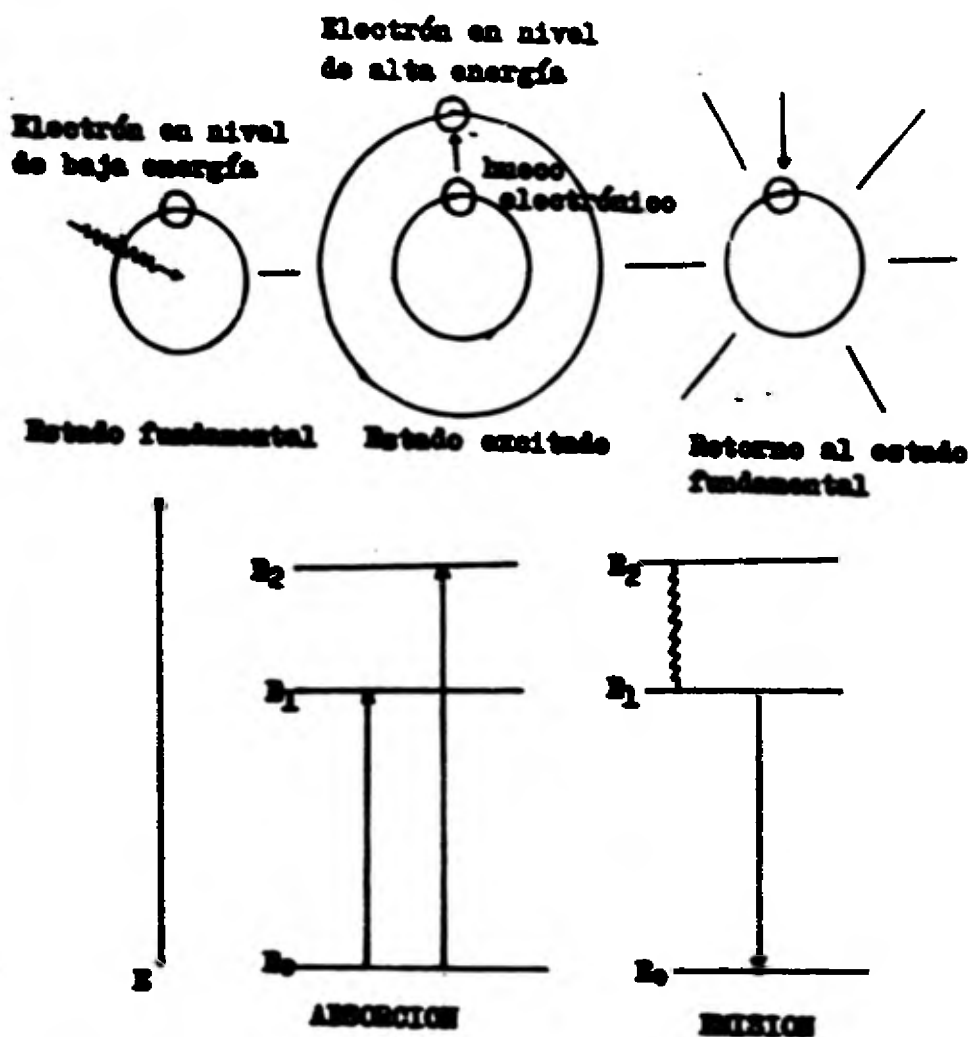


Figura #6 .- Excitación de una molécula y pérdida de su energía en su retorno al estado fundamental (76).



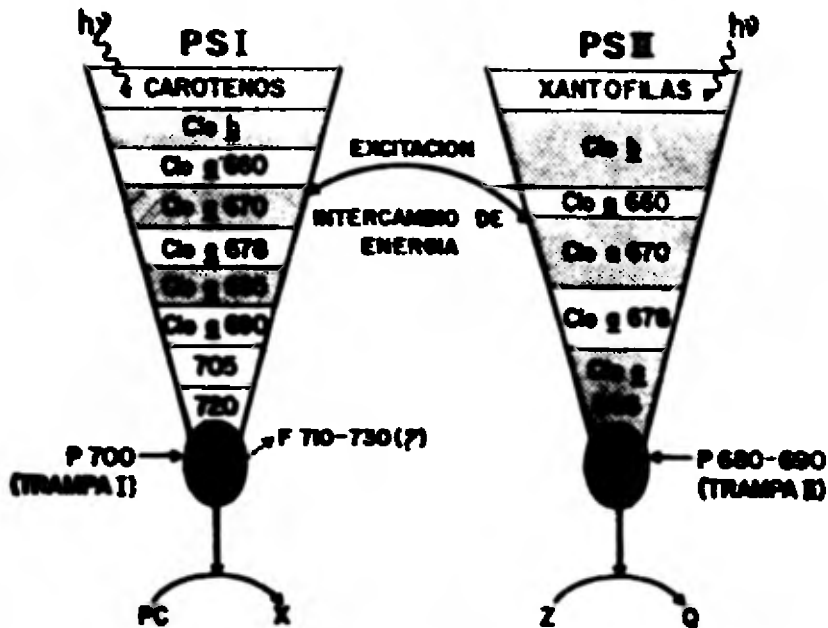
oxidado el centro reacción , que vuelve a su estado original cuando recibe un electrón del donador primario de electrones; este proceso se repite consecutivamente, dependiendo de la absorción de la luz ,(20) de esta manera continua el evento dependiente de la reacción luminosa con el transporte de electrones a través de toda la cadena transportadora, desde el agua hasta el NADP+.

El hecho de que existan dos sistemas de pigmentos que absorben luz de longitud de onda diferente indica que el transporte de electrones tiene lugar en dos etapas principales y con eventos --- fotoquímicos en el centro de reacción específico .

La figura # 7 ilustra un esquema de la transmisión de la energía a través de cada sistema de pigmentos.

El proceso de transporte de electrones a través de la cadena -- fotosintética fue propuesta por Hill y Bendall (25). La forma en que se encuentra distribuida la cadena transportadora de electrones en la membrana se esquematiza en el modelo propuesto por Witt (26), en él se muestran los fotosistemas I y II en forma de - Z transversal ( figura # 8).

Cuando se ilumina al cloroplasto un electrón de su fotocentro --- reactivo que se encuentra en el pigmento clorofiliano es llevado - hasta un aceptor Q del PS-II y después fluye en sentido descendente por la cadena central a través de PQ, Cit f y PC, hasta el --- banco electrónico en P-700 o centro de reacción del PS-I que perdió un electrón y lo pasó a través de la cadena que pasa por X, -



**Figura #7 .-** Hipótesis de la distribución aproximada de los diferentes pigmentos en los dos fotosistemas pigmentarios en plantas verdes. Los números que siguen a la clorofila representan la absorción máxima de la porción roja del espectro (25).

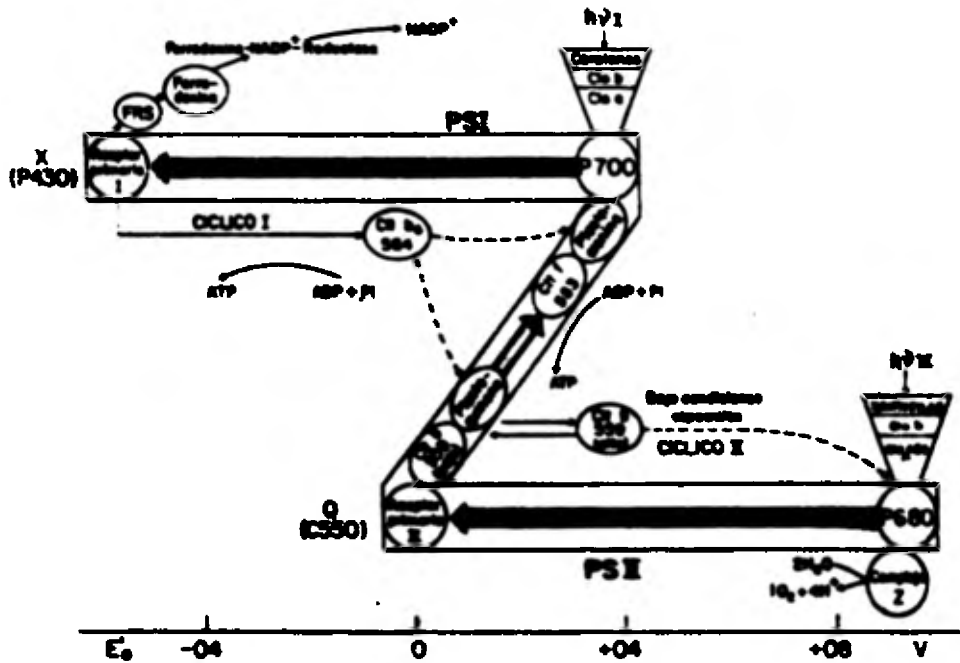


Figura # 8 .- Esquema en Z para el flujo de electrones en la fotosíntesis. Las dos flechas gruesas, horizontales representan las dos reacciones luminosas, todas las otras son reacciones a la oscuridad. El flujo de electrones desde el agua hasta NADP<sup>+</sup> se designa como "no cíclico". Desde el aceptor primario (del PSI) a los intermediarios entre los dos fotosistemas - plastoquinona o plastoquinina - como "cíclico I". Un flujo cíclico en PS-II puede existir y se designaría como "cíclico II" (81).

Fd, FdNADP reductasa hasta el  $\text{NADP}^+$  provocando la reducción. 25

de este último.

El restablecimiento del centro activo del PS-II a su estado reducido es debido a la transferencia de electrones en el sentido del potencial decreciente cuando se fotoliza el agua ( figura # 8).

El  $\text{NADP}^+$  es el aceptor electrónico final de la cadena transportadora de electrones en la fotosíntesis, tanto el  $\text{NADP}^+$  como distintos tipos de aceptores electrónicos artificiales tales como  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  y quinonas pueden ser fácilmente reducidos por el sistema intacto aislado, esto sugiere que los aceptores de PS-I son reducidos en el lado externo de la membrana del tilacoide. Así el NADPH formado en la fase luminosa es aprovechado por las enzimas del ciclo de Calvin durante la fase oscura de la fotosíntesis.

Actualmente se sabe que la fotofosforilación del cloroplasto en vegetales y la fosforilación oxidativa de las mitocondrias y bacterias están muy relacionadas.

Ahora bien, el mecanismo por el cual un flujo electrónico puede dar lugar a la formación de una molécula de alto nivel energético, representa uno de los problemas teóricos y experimentales más interesantes en la Bioquímica actuales. Hasta el momento una hipótesis que trata de explicar el acoplamiento de estos 2 procesos ( el transporte de electrones y la síntesis de ATP) es la efectuada por el Dr. Mitchell (45), basándose en puntos funda --

mentales que corresponden a sistemas funcionales y estructurales específicos .

### Hipótesis Quimiosmótica de Acoplamiento .

Es una hipótesis alternativa dependiente de membranas intactas, de consideraciones de la fisiología de las membranas en adición a la bioquímica tradicional, enfatiza la importancia de las reacciones vectoriales provocando transferencia de protones a través de la membrana. Se describe en 5 postulados:

- 1- Las reacciones principales ocurren en una membrana relativamente impermeable a protones la cual encierra un espacio interno.
- 2- La membrana tilacoidal del cloroplasto contiene los transportadores de oxidación-reducción, y allí el flujo de electrones de un acarreador a otro tiene que estar obligadamente acoplado al transporte vectorial de iones hidrógeno, cuando los cloroplastos efectúan la función del exterior al interior, el flujo de reductores equivalentes alternan con un acarreador de electrones a su acarreador de hidrogenos (PQ) y otra vez regresan el primero (figura # 9).
- 3- Este flujo neto de iones de la membrana produce dos efectos;
  - a)- Permite que el interior sea más ácido que el exterior, estableciendo un gradiente de pH;
  - b)- Logra que el interior sea más electropositivo. Para prevenir la formación de una diferencia de

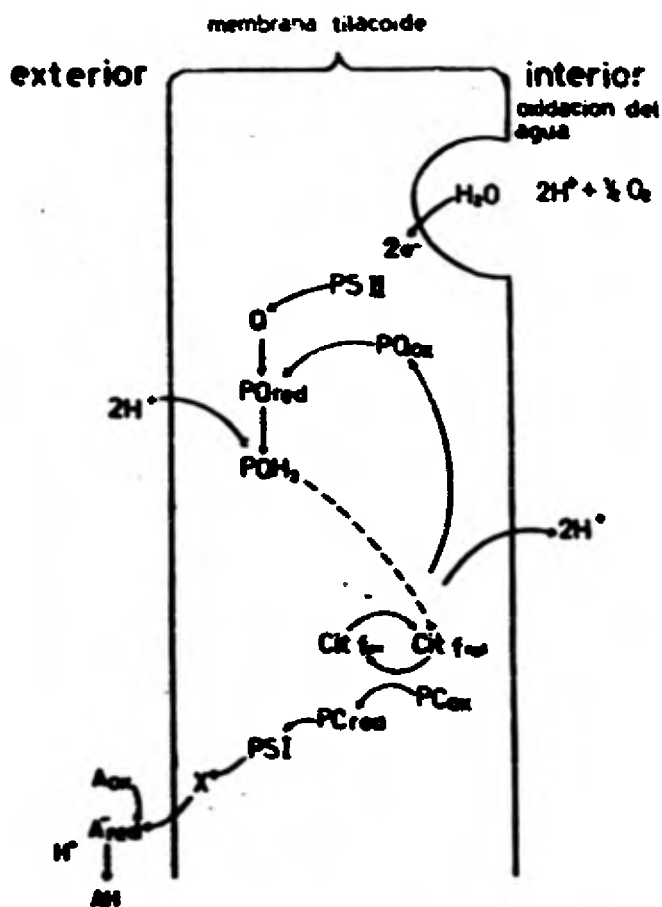


Figura # 9.- Acoplamiento entre el flujo de equivalentes reductores a través de la membrana, con la translocación de iones hidrógeno desde el exterior hacia el interior (45).

cargas eléctricas excesiva debe existir una forma que permita una libre difusión de otros iones, acareadores específicos en sentido inverso al flujo de hidrógenos ó bien que otros entren al mismo tiempo para neutralizar las cargas positivas.

4- La suma de las dos fuerzas generadas por la diferencia en la concentración de iones hidrógeno ( $\Delta pH$ ) y la diferencia de potenciales eléctricos a través de la membrana ( $\Delta \psi$ ) es llamada fuerza protonmotriz o diferencia de potencial electroquímico de protones ( $\Delta \mu H$ ), expresada en unidades eléctricas ( millivoltios).

$$\Delta \mu H = \Delta \psi + \frac{RT}{F} (\Delta pH)$$

Donde R = es la constante de los gases

T = la temperatura absoluta.

F = la constante de Faraday.

La fuerza protonmotriz es la que maneja la síntesis de ATP.

5- La fuerza protonmotriz actúa para formar ATP vía una enzima anisotrópica unida a la membrana que utiliza el flujo de hidrógenos en sentido inverso, es decir hacia el CFI o complejo ATPasa sintetasa (sintetizando ATP en la dirección indicada y actuando como ATPasa en la dirección contraria).

En el diagrama de la figura # 10 muestra las formas más simplificadas que el Dr. Mitchell ha propuesto en el modelo la acción de ésta enzima trabajando como una ATPasa.

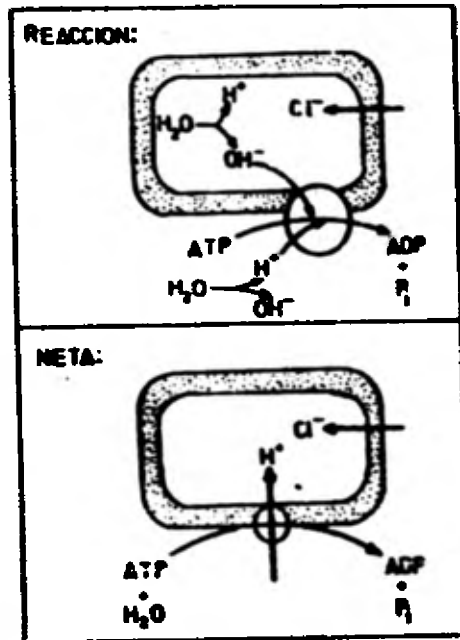


Figura #10.- Mecanismo de acción de una ATPasa vectorial uni—  
 da a la membrana de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica. El rec—  
 tángulo representa la membrana de la vesícula y el círculo a la—  
 ta la ATPasa. El cuadro superior representa la reacción en la cual  
 los componentes del agua se mueven vectorialmente desde lados op—  
 puestos de la membrana para ser usados en la síntesis de ATP. El  
 cuadro inferior indica la reacción neta de un protón moviéndose —  
 hacia el interior por cada ATP hidrolizado. La síntesis de ATP —  
 se llevaría a cabo si seguimos las flechas en sentido contrario  
 (45).



La doble función de ésta enzima ( síntesis y degradación de ATP) será uno de los objetivos de la revisión bibliográfica, estudiando ambas actividades por modificaciones químicas y entrecruzamientos.

### III.- FACTOR DE ACOPLAMIENTO ( CFI )

Durante la reacción de fotofosforilación o síntesis de ATP se encuentra acoplado, al flujo de electrones ( vía un intermediario común ) el gradiente electroquímico de protones. Un determinado número de reactivos o de tratamientos incrementan o aceleran el flujo de electrones desacoplados, ya que no tienen capacidad de sintetizar ATP. Dicho desacoplamiento puede ocurrir, por ejemplo, durante el tratamiento con EDTA causando la liberación de una proteína de la membrana del tilacoide, dejando así un hueco por donde se saldrán los protones bajo condiciones apropiadas. La proteína liberada se puede recolocar a la membrana recuperándose la fotofosforilación sin estimular el flujo de electrones. En estas condiciones el reacomplamiento de la proteína da como resultado la síntesis de ATP así como el transporte de electrones, a ello se le ha denominado factor de acoplamiento ( F1 ) o complejo ATP-asa sintotasa ( 33 )

Bajo algunas circunstancias reactivos sintetizados incrementan la fosforilación en preparaciones que han sufrido desacoplamiento de su proteína. Por ejemplo con N,N-diciclohexilcarbodiimida ( DCCD)

se estimula la fosforilación en los tilacoides de cloroplastos de espinacas tratados con EDTA, indicando que el CFI remanente efectúa la síntesis de ATP.

#### Descubrimiento del Factor de acoplamiento ( FI ). -

Los primeros estudios que demuestran la existencia del factor de acoplamiento ( FI ) fueron llevados a cabo por Jagendorf y Smith ( 29 ) quienes encontraron que en los tilacoides de cloroplastos tratados con soluciones de EDTA la fosforilación no se llevaba a cabo en ciertas regiones protéicas de la membrana. Avron ( 3 ) demostró que un factor lábil al calor se separa durante el tratamiento con EDTA y que al adicionar el captador de EDTA en presencia de  $Mg^{++}$  se restauraba parcialmente la fosforilación en la membrana desacoplada. Lo anterior sugirió que ese factor lábil es de tipo protéico .

Vambutas y Racker ( 75 ) observaron que los tilacoides contienen poca o nula actividad de ATPasa, demostrando que durante el tratamiento con tripsina los tilacoides desarrollaban una actividad de ATPasa dependiente de  $Ca^{++}$ . En ese estudio la solubilización de la ATPasa latente se obtuvo al incubar los cloroplastos con EDTA precipitar el sobrenadante con acetona y efectuar extracción de los polvos acetónicos con soluciones reguladoras, encontrándose que estas preparaciones estimulan la fosforilación en los tilacoides que se encuentran expuestos a un lavado con baja fuerza iónica. -

Esta preparación es por consiguiente análoga al factor de acoplamiento (F1) en las mitocondrias, en los cloroplastos se denominó factor de acoplamiento-CF1.

Actualmente se usa el método de Lien y Racker (31) para la purificación homogénea del CF1, a través de la liberación del CF1 con EDTA purificado por cromatografía, usando columna de DEAE-Sefadex y centrifugando en un gradiente de densidad de sacarosa, la preparación obtenida es homogenizada. Se ha demostrado en estas condiciones que el CF1 tiene una actividad específica de ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  y es capaz de hidrolizar 34 micromoles de ATP por miligramo de proteína por minuto (16).

#### IV.- REACTIVOS QUÍMICOS (83).

El uso de métodos químicos directos se ha empleado para el estudio de los pliegues en las cadenas polipeptídicas de las proteínas, basándose en la localización de las uniones químicas intra o intercadenas. El enlace disulfuro es el que se encuentra más comúnmente, su hallazgo es un paso importante para determinar el modelo tridimensional de las proteínas.

El método más versátil es la reacción de la proteína con reactivos bifuncionales, los cuales poseen dos grupos reactivos capaces de reaccionar con ella formando puentes entre los sitios de las cadenas de aminoácidos.

En la reacción de la proteína con los reactivos bifuncionales, 3 tipos de

productos son los importantes , los cuales nos dan información acerca de la estructura y función de la proteína , estos productos son:

1. -- Proteína con enlace cruzado intramolecular . - La determinación de este tipo de enlace da información específica acerca de distancias interresiduales de proteínas, situándolas en su estructura terciaria, además mide el efecto de los enlaces covalentes en su estabilidad.

2. - Proteína con enlace cruzado intermolecular ( homopolímeros ). Este enlace proporciona un modelo excelente de interacción proteína - proteína ( subunidades ) y da estabilidad a las proteínas activas, con peso molecular alto.

3. - Complejos proteicos con enlaces cruzados intermoleculares. Compuesto de proteínas diferentes ( heteropolímeros ) o de proteínas más otras moléculas. Nos informan acerca de las interacciones proteína-proteína, ejemplo interacción antígeno-anticuerpo.

**Selección del Reactivo y Condiciones de reacción. -**

La selección del reactivo adecuado puede ser determinada primero -- mente por el producto específico deseado . La selección está limitada por el rango de estabilidad de la proteína y del reactivo en cuestión.

Es importante diferenciar dos tipos de reactivos: los homofunciona-- les, los cuales tienen dos grupos reactivos idénticos y los heterobifun-- cionales, los cuales tienen grupos reactivos diferentes, estos últimos permiten que se lleva a cabo una reacción secuencial controlada de cada grupo reactivo en turno.

Un grupo de reactivos heterobifuncionales fueron probados ( 86 ), donde los dos grupos presentes son reactivos bajo diferentes condiciones, uno de los grupos es reactivo en la oscuridad y el otro reacciona a la luz o fotoactivable (los derivados diazoalquilo y arilazidas son ejemplos de grupos fotoactivables) con este tipo de agentes la secuencia de la reacción puede ser definida.

Un problema común con los reactivos bifuncionales es la baja solubilidad en soluciones amortiguadoras acuosas, por lo tanto cuando se desean uniones con todos los sitios proteicos se usa mezcla de solventes como acetona-agua, dioxano-agua. Si no es posible la utilización de soluciones acuosas para la reacción el método más indicado es adicionar a la solución proteica una solución concentrada del reactivo disuélto en un solvente orgánico ( acetona , alcohol ).

Es importante conocer que la velocidad óptima de reacción se obtiene cuando el reactivo es añadido lentamente ( en forma continua o con incrementos pequeños ). Velocidades bajas de reacción son obtenidas cuando al reactivo se le permite precipitarse o cuando es añadido como sólido.

Los principales parámetros a considerar en la elección de las condiciones de reacción son; concentración proteica , cociente de concentración proteica-reactivo , pH y fuerza iónica.

En la figura # 11 se ilustran las condiciones de la reacción que favorecen a sus diferentes productos. X representa una forma de

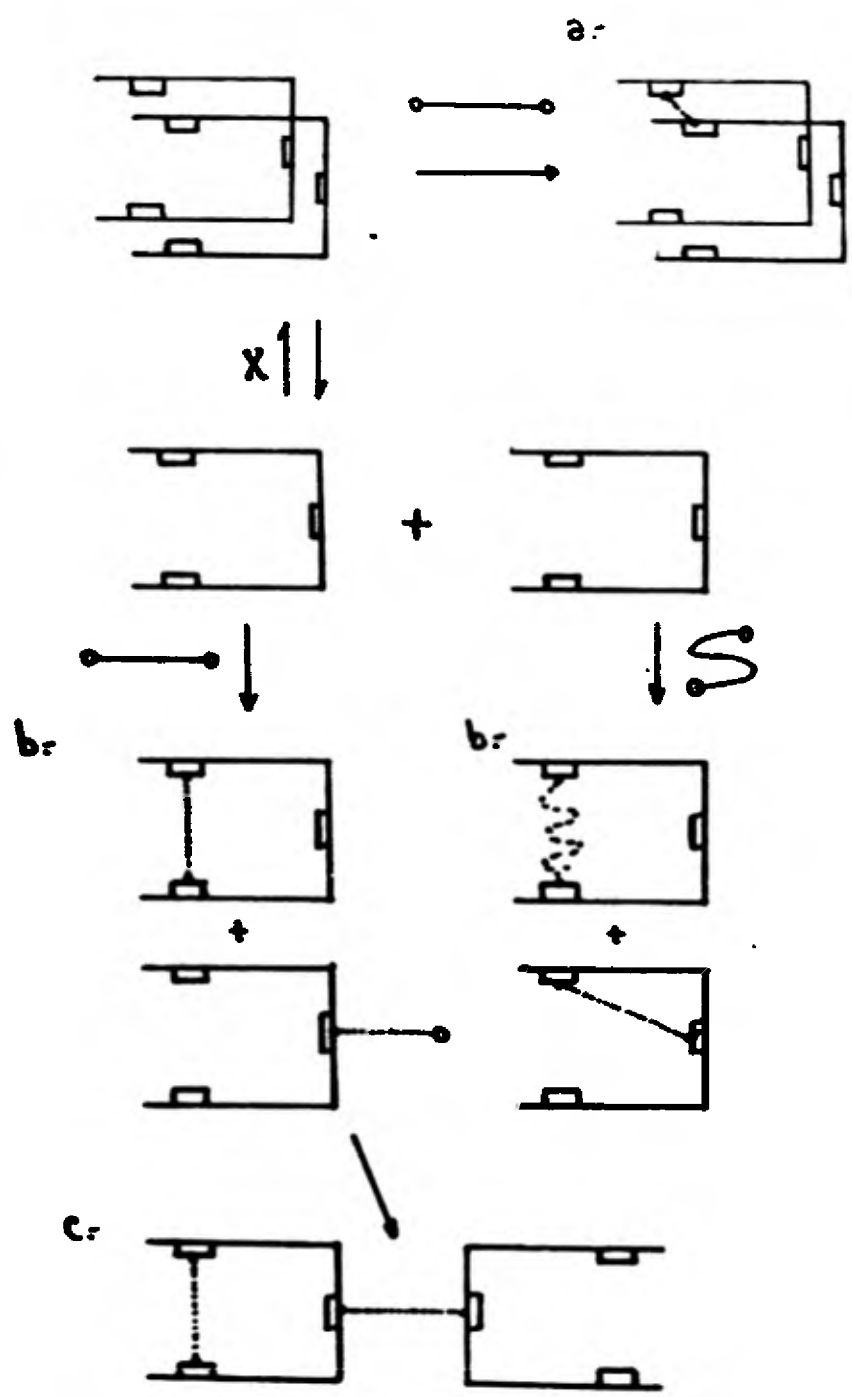


Figura # 11 .- Consideraciones que pueden ser usadas en la selección del reactivo. X= equilibrio monómero-dímero, a= unión de dos proteínas, b = enlaces intramoleculares de una proteína simple, c = enlaces intermoleculares (83).

equilibrio monómero-dímero siendo considerado el caso más común. Una alta posibilidad de unión de dos proteínas podría localizarse en la parte superior ( figura # 11-a ), una menor posibilidad de unión en la parte inferior. Si se desea un enlace intramolecular de una proteína simple, la condición de la reacción que favorece la forma monomérica es la baja concentración proteica ( figura # 11-b). Si se desea un enlace intermolecular ( figura # 11-c) entre monómeros es necesario que las condiciones de la reacción sean seleccionadas para estabilizar un sistema de asociación entre ellos.

Obviamente existen múltiples variables que afectan la interacción reactivo-proteína y del reactivo.

#### Caracterización de los Productos. -

La caracterización de los productos requiere el mismo procedimiento que la caracterización de las proteínas modificadas con reactivos monofuncionales. El exceso de reactivo es eliminado por diálisis, filtración en gel o cromatografía; la mezcla reaccionante es fraccionada en sus componentes en base al tamaño ( filtración o sedimentación ) o en base a sus propiedades iónicas, o de solubilidad ( intercambio de iones, electroforesis o sistemas de partición ) y cada derivado proteico será caracterizado por parámetros bioquímicos, físicos y químicos.

Existen sin embargo dos preguntas relacionadas con la reacción proteína - reactivo bifuncional ; 1. - ¿ Ambos grupos funcionales de ca-

- da molécula de reactivo reacciona con la proteína ( reacción mono o bifuncional ) ? ; 2.- ¿ Dónde se forma el enlace, intra o intermolecularmente ? . Para el enfoque de la primera pregunta es necesario degradar, aislar y cuantificar individualmente los residuos protéicos, si esto no es posible se determinará la cantidad de reactivo incorporado a la proteína y el número de aminoácidos reaccionantes por mol de reactivo incorporado , para este último el método más correcto consiste en utilizar un reactivo radioactivo, determinando el total de radioactividad en el derivado protéico . Los métodos basados en absorción ultravioleta o de fluorescencia tienen dos limitaciones ; la primera, si el reactivo reacciona con más de un residuo en la proteína, cada derivado puede tener diferentes características espectrales; la segunda, los efectos microambientales en la proteína forman derivados idénticos que deben tener diferente absorptividad molecular y producir emisión de cuantos en diferentes proteínas . En muchos casos el reactivo puede reaccionar con el solvente y el solvente "blanco " habrá de ser incluido en experimentos paralelos. Una vez determinado el número de moles de reactivo incorporado por mol de proteína, el paso a seguir es cuantificar el número de moles de aminoácidos reaccionantes . El análisis cuantitativo del aminoácido después de una hidrólisis completa puede ser efectuado con una precisión de  $\pm 2\%$  . Esto es suficiente si la reacción involucra



20 % o más del total de cualquier aminoácido. Cuando los derivados son separados rápidamente, otro método se usa como la preparación cuantitativa de derivados estables con residuos no reactivos entre la evaluación del número de residuos reaccionantes con el reactivo bifuncional del número liberado por hidrólisis. Si el cociente es 2 se concluye que el reactivo reacciona bifuncionalmente y que cada molécula ha formado un puente covalente. Con un cociente de 1, el reactivo tiene solo una vía monofuncional y el segundo grupo funcional reacciona o lo hace con el solvente, dando producto estable sustituido monofuncionalmente. Cocientes que fluctúan entre 1 y 2 o viceversa significan una mezcla de derivados con puentes y sin ellos.

Sobre la segunda pregunta: Si dímeros o polímeros han sido formados por enlaces intermoleculares. - Ellos pueden ser detectados por cualquiera de los métodos convencionales, tales como medición hidrodinámica, filtración con gel etc. La dificultad principal encontrada para distinguir puentes intra o intermoleculares es causada por falsas positivas, en muchos casos, cambios químicos mínimos de una proteína causan agregación del producto siendo importante -- distinguir entre unión no covalente y covalente, en el caso de que la proteína reaccione con el reactivo bifuncional. La solución más lógica de este problema incluye el uso de solventes o agentes capaces de romper fuerzas no covalentes, como las sales de guanidina, urea, detergentes, dioxano y valores extremos de pH. Con ello -

sería posible establecer inequívocamente si se forman puentes intermoleculares.

#### Degradación e identificación de enlaces pépticos. -

La determinación de enlaces covalentes dentro de la proteína esta basada en las técnicas para la localización de uniones disulfuro , cualquier método para separar una unión peptídica puede ser usado para realiza una digestión parcial del derivado proteico; la digestión con enzimas seleccionadas tipo tripsina, quimiotripsina y pepsina son técnicas muy usadas. A pesar de aislar el enlace peptídico, lo cual es facilitado por marcación de cualquier característica en el reactivo (radioactividad, calor) el problema de identificación de uniones peptídicas permanecen , por lo que esta fase es simplificada si se logra romper o remover el puente sintético y trabajar con cada uno de los péptidos separados individualmente.

#### Clasificación de los reactivos.

##### 1. -Maleimidias Bifuncionales.

Los derivados N-sustituídos de las maleimidias son conocidos como agentes específicos para los grupos SH (44), son los reactivos para proteínas más específicos, reaccionan bajo múltiples condiciones y con un mínimo de error. La absorción ultravioleta asociada con la reacción de los derivados de las maleimidias con grupos SH nos dan un método para el seguimiento exacto de la reacción. Los derivados N-sustituídos de las bismaleimidias proveen mayor especificidad y son reactivos fáciles de utilizar.

Muchos son los derivados que han sido sintetizados y estudiados - DTEM, OFEM como bifuncionales y DTNP, DDPM como monofuncionales, todos son insolubles en agua y son generalmente adicionados como sólidos. Los N-aril y N-etilmaleimidias (NEM) han sido preparados y son utilizados como reactivos monofuncionales - análogos.

Los productos de la reacción con proteínas no siempre son susceptibles de ser separados en sus componentes, sobre todo aquellos - con unión tipo imido.

## 2.-Alqui Haluros Bifuncionales.

Son reactivos que reaccionan primariamente con grupos SH, sulfuros, imidazoles y amino de las proteínas. A un pH neutro o ligeramente alcalino, la reacción con grupos SH de las proteínas se - facilita a un pH alto (muy alcalino) la reacción con grupos amino - es mayor. La reacción con las proteínas puede ser seguida por - el grado de captación de KOH a un pH fijo (88).

La experimentación con los primeros reactivos descubiertos de este grupo al reaccionar con lisosimas y al determinarles la localización de los enlaces demostró: que los productos tienen dos tipos de derivados con acción monofuncional (70%) y bifuncional (30%). - Un ejemplo de reactivo monofuncional es la Iodobacetamida. Los - compuestos descubiertos posteriormente fueron preparados específicamente para reaccionar con el sitio activo de la quimi tripsina

(57), en éstos la idea fue introducir un sustrato afin (anillo aromático) dentro del reactivo y que las dos funciones alquilantes formaran puentes peptídicos estrechamente relacionados con el sitio de unión del sustrato.

### 3.-Aril Haluros Bifuncionales.

Dos son los prototipos de estos reactivos homobifuncionales (p.p'-difluoro m-m' dinitrodifenilsulfuro 1,5 difluoro-2,4 dinitrobenzeno).

Estos reactivos tienen las siguientes características: son insolubles en agua, reaccionan en una fase preferentemente con grupos amino, fenólicos de la tirosina, sulfhidrilo e imidazoles, requieren un pH alto para una rápida reacción, son adicionados generalmente con una solución concentrada de acetona. Los productos formados son visibles en el espectro ultravioleta, la hidrólisis alcalina de sus derivados libera los aminoácidos reaccionantes, teóricamente separables por reducción catalítica (82).

Estos reactivos fueron elaborados para reaccionar con diferentes tipos de colágena y proteínas solubles. Además el estudio de la estructura tridimensional de la ribonucleasa (44) la síntesis de polipéptidos y la formación de uniones covalentes en pares de proteínas (5), como ejemplo de ellos tenemos al F2DNB.

### 4.-Isocianatos Bifuncionales.

Hasta el momento son seis los compuestos de este tipo ( 1.-Xilileno-diisocianato - 2.-Tolueno - 2,4- diisocianato - 3.-Tolueno - 2 - Iso-  
cianato - 4 - isotiocianato - 4.- 3 - metoxidifenilmetano - 4,4 - di-

socianato - 5. -2, 2' -Dicarboxi - 4, 4 - Azofenildiisocianato - 6. -Hexa-  
metilendiisocianato), que reaccionan con aminoácidos y proteínas (56).  
Los isocianatos en general reaccionan con aminas formando ureas sus-  
tituidas con alcoholes para formar uretanos, a un pH neutro o alcalino  
la mayor reacción es con los grupos amino. Los derivados resultantes  
pueden ser separados por hidrólisis ácida ( HCL 6N, 105 °C, 20 hs).  
Sólo uno de los seis compuestos es soluble en agua, los grupos alifá-  
ticos de los isocianatos son menos reactivos que los aromáticos. Los  
di-isocianatos proveen una gran variedad de uniones. Los primeros --  
cuatro reactivos utilizados han sido para formar uniones covalentes -  
entre dos diferentes moléculas de proteínas, los dos restantes para el  
estudio de la mioglobina (17), quimiotripsina y ribonucleasa (56).

#### 5.-Reactivos Alquilantes Bifuncionales.

Este grupo de reactivos incluye una amplia variedad de compuestos de  
diferentes dimensiones y reactividad, también tiene análogos monofun-  
cionales. Cualquier reactivo alifático o aromático derivado del ácido -  
dicarboxílico ó ácido disulfónico puede reaccionar como alquilante bi-  
funcional, formando en laces covalentes con la proteína. Dos grupos -  
de compuestos se han estudiado: 1. -Nitrofenil ester del ácido dicarbo-  
xílico. - Su reactividad específica no es muy alta, los grupos amino --  
alfa y epsilon del reactivo son los más accesibles. Para hacer reaccio-  
nar estos reactivos con la proteína se necesitan condiciones extremas

(exceso de reactivo) 2.-Sulfonil cloruros aromáticos. Estos reactivos son insolubles en agua e hidrolizan rápidamente a sulfonil cloruros - (24), reaccionan con grupos amino, resultando un enlace sulfonamida estable. Los reactivos alquilantes heterobifuncionales son de los más usados actualmente para el estudio de reacciones con metionil-RNAT sintetasas.

#### 6.-Imidoesteres Bifuncionales.

Los reactivos imidoester mono y bifuncionales con fácilmente sintetizados a partir de nitritos análogos (70), son solubles en agua, reaccionan con alta especificidad sobre grupos amino primarios de las proteínas con las que forman amidinas, reaccionan con residuos de lisina sin ocasionar cambios importantes en la proteína. Algunos reactivos se usan para determinar distancias interresiduales en ribonucleasas (23), otros se usan para explorar el arreglo arquitectónico de las lipoproteínas de la membrana del eritrocito y actualmente, para el estudio de la estructura de las subunidades de proteínas oligoméricas (13). Un ejemplo de este grupo son DMS y DTP (bifuncionales).

#### 7.-Dialdehídos Alifáticos.

Algunos reactivos fueron hechos reaccionar con DNA para el estudio del mecanismo del daño por radiación, demostrándose la formación de enlaces con él (7). Los reactivos poseen baja especificidad para algunos grupos funcionales en la proteína, sin embargo, grupos amino y SH son puntos primarios de reacción. La reacción con grupos amino da derivados -

estables; al reaccionar con proteínas solubles produce la formación de un enlace intermolecular.

#### 8. -Misceláneos.

Múltiples reactivos bifuncionales o polifuncionales que no corresponden a la clasificación anterior son incluidos aquí al demostrarse que causan enlaces con proteínas. Algunos de ellos parecen actuar como agentes condensantes, facilitando la formación de uniones amida entre el grupo amino de lisina y el grupo carbonil del ácido aspártico o glutámico en la proteína (84). En otros reactivos solo un grupo funcional está presente para formar unión covalente, el segundo grupo funcional interactúa con el sitio activo de la proteína; algunos de los reactivos incluidos en este grupo son: el O-IB y el DTNP.

## PROPIEDADES DEL CF1 AISLADO

### I. - ESTRUCTURA DEL FACTOR DE ACOPLAMIENTO

El CF1 es una proteína soluble en agua, de color verde claro y alta afinidad a unión no covalente con nucleótidos (33). A la microscopía electrónica se observa como una esfera de 90 a 95 Å de diámetro. (19).

Estudiado por electroforesis el CF1 purificado muestra cerca de tres moles de carbohidratos por 100 moles de aminoácidos, se le detectaron ribosa, galactosa y glucosa como azúcares predominantes (63).

Harris y Slater reportan que el CF1 contiene menos de un mol de ADP y ATP/mol de CF1 (22), otros estudios refieren una relación mayor, hasta de 1:1.

Al igual que en las mitocondrias el F1 de cloroplastos y el F1 bacteriano es lábil y disociable en frío (32).

El peso molecular del CF1 fue determinado usando la técnica de ultracentrifugación (16), se procedió a centrifugar a altas velocidades una muestra de CF1 de 0.36 mgs/ml, (10,000 a 14,000 rpm) obteniendo un peso molecular de 325,000 con una desviación estándar de  $\pm 600$ , dicha cifra fue comparada con una obtenida a bajas velocidades (4,400 rpm) y una concentración protéica de 0.6 mgs/ml, siendo el peso molecular así manifestado de 358,000  $\pm$  3,100. Cuando se efectuó el mismo procedimiento de ultracentrifugación con HCl-guanidina 5 M el peso molecular determinado fue de 62,000.

El peso molecular obtenido mediante ese estudio es similar al encontrado en el factor de acoplamiento de otras membranas, por ejemplo



para el F1 mitocondrial es de 360,000 (67).

Como toda gran proteína el CF1 está compuesto de subunidades la estructura de las mismas fue determinada por microscopía electrónica (33). Con el uso de electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS (64) se encontró que el CF1 contiene 5 cadenas polipeptídicas identificadas como subunidades y denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  de acuerdo con su peso molecular decreciente, algunas de sus propiedades son expuestas en la tabla #2. El tratamiento con piridina seguido de sulfato de amonio en forma fraccionada y técnicas de cromatografía permiten la separación de las subunidades del CF1 en forma desnaturalizada, obteniéndose el mismo número de subunidades (50,51).

Otro método usado por Binder es la separación de las subunidades, disociando la enzima con dodecilsulfato de sodio (DSS) seguido de una cromatografía con hidroxilapatita en biogel P 300 (6).

Los polipéptidos tienen diferente composición de aminoácidos y propiedades antigénicas diferenciadas claramente unas de otras (6).

Farron (16) mediante el análisis del CF1 purificado encontró que esta enzima está compuesta de los siguientes aminoácidos: lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, glicina, alanina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina y fenilalanina. La determinación de aminoácidos de las subunidades fue también efectuado por Nelson (50), cuantificando el contenido de ácido cítrico por la oxidación del ácido per fórmico de las subunidades. Binder (6) por identificación del ácido cítrico y titulación con 2,2 ditió -

Subunidad del CP1	P.M. $10^{-3}$	Probable Estequiometría(b)	Contenido de grupos SH.	Funciones que se sugieren.
$\alpha$	59 <sup>a,b</sup> , 61 <sup>c</sup>	2	2 <sup>o</sup> , 2 <sup>a</sup>	Regulador
$\beta$	54 <sup>b</sup> , 56 <sup>a</sup> , 57 <sup>a</sup>	2	2 <sup>o</sup> , 2 <sup>a</sup>	Contiene al <u>si</u> tio activo
$\gamma$	34.5 <sup>c</sup> , 37 <sup>a</sup> , 39 <sup>b</sup>	1	3 <sup>o</sup> , 6 <sup>a</sup>	Transporte de protones al <u>si</u> tio activo.
$\delta$	17.5 <sup>a</sup> , 20 <sup>b</sup> , 20.8 <sup>c</sup>	1	1 <sup>o</sup> , 0 <sup>a</sup>	Dá fijación a la membrana
$\epsilon$	13 <sup>a</sup> , 13.5 <sup>b</sup> , 15.7 <sup>c</sup>	2	1 <sup>o</sup> , 1 <sup>a</sup>	Inhibidor de— la actividad — de ATPasa. Fija ción a la mem- brana.

Tabla # 2 .- Propiedades de las subunidades del CP1(33).

a.-Datos de Nelson 1973

b.-Datos de Baird y Hammes 1976

c.-Datos de Binder 1978.

piridina. Estos dos estudios dieron resultados similares excepto para algunos aminoácidos como son merionina, tirosina y cisteína.

Aunque existe el acuerdo general de que CFI con función de ATP-asa contiene cinco subunidades, la estequiometría de las mismas es controvertida (67). Múltiples han sido los métodos utilizados para obtenerla, siendo tres los más importantes:

1. - Baird y Hammes (4), teniendo como antecedente el peso molecular referido por Weber y Osborn (78) ordenaron las subunidades, de acuerdo a su movilidad en gel de poliacrilamida-DSS contra el logaritmo del peso molecular en una curva patrón, determinando los valores del peso molecular de las mismas como sigue: para alfa de 59,000, beta 54,000, gamma 39,000, delta 20,000 y epsilon 13,500.

Los mismos autores realizaron pruebas, entre el CFI solubilizado y reactivos bifuncionales ( $F_2$ DNB, DMS, DTP,  $H_2O_2$  y CuP) no emplearon reactivos específicos para grupos existentes en los aminoácidos, encontrando lo siguiente:

- a) El  $F_2$ DNB es capaz de formar puentes de  $3 \text{ \AA}$  entre grupos amino y grupos fenoles de la tirosina.
- b) DMS y DTP forman puentes de  $11 \text{ \AA}$  entre grupos amino.
- c)  $H_2O_2$  y CuP facilitan la oxidación de grupos SH, formando puentes disulfuro.

El CFI fue aislado y precipitado con sulfato de amonio, activación con calor y reacciones de estre cruzamiento con los reactivos bifuncionales

mencionados. Los resultados de las reacciones fueron determinados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS y tinción con azul de comassie, y posteriormente graficados como se muestra en la figura # 12-a. Se encontraron compuestos proteicos llamados "agregados" los cuales estan formados al menos por dos subunidades, se les determinaron pesos moleculares encontrando valores más altos en cada caso y con cada reactivo (figura # 12 de la b a la f). Para conocer las subunidades que forman estos "agregados" Baird y Hammes (4) realizaron una electroforesis vertical y una horizontal con dodecilsulfato de sodio (DSS), logrando separar los puentes formados entre la subunidad y el reactivo, aclarando de ésta forma a que subunidad pertenece cada "agregado" (Figura # 13).

Los resultados obtenidos se agruparon en dos tablas una donde se anotan todas las subunidades, "agregados" y su constitución (tabla # 3) y otra donde se colocan subunidades y "agregados" en orden de peso molecular con todas sus combinaciones posibles (columna a de la tabla #4), descartando los "agregados" que no se encontraron con los reactivos (columna b de la tabla # 4).

Con los datos anteriores la estequiometría encontrada por los autores fue:  $2\alpha$ ,  $2\beta$ ,  $1\delta$ ,  $1\epsilon$  y  $2\zeta$  (figura #14). Proponiendo un modelo en el cual se colocan las subunidades de acuerdo a los resultados básicos encontrados. Las subunidades alfa y beta son las más pesadas y se encuentran en contacto con gamma, delta y epsilon, como lo demuestran las reacciones de entrecruzamiento, delta está alejada de gamma y

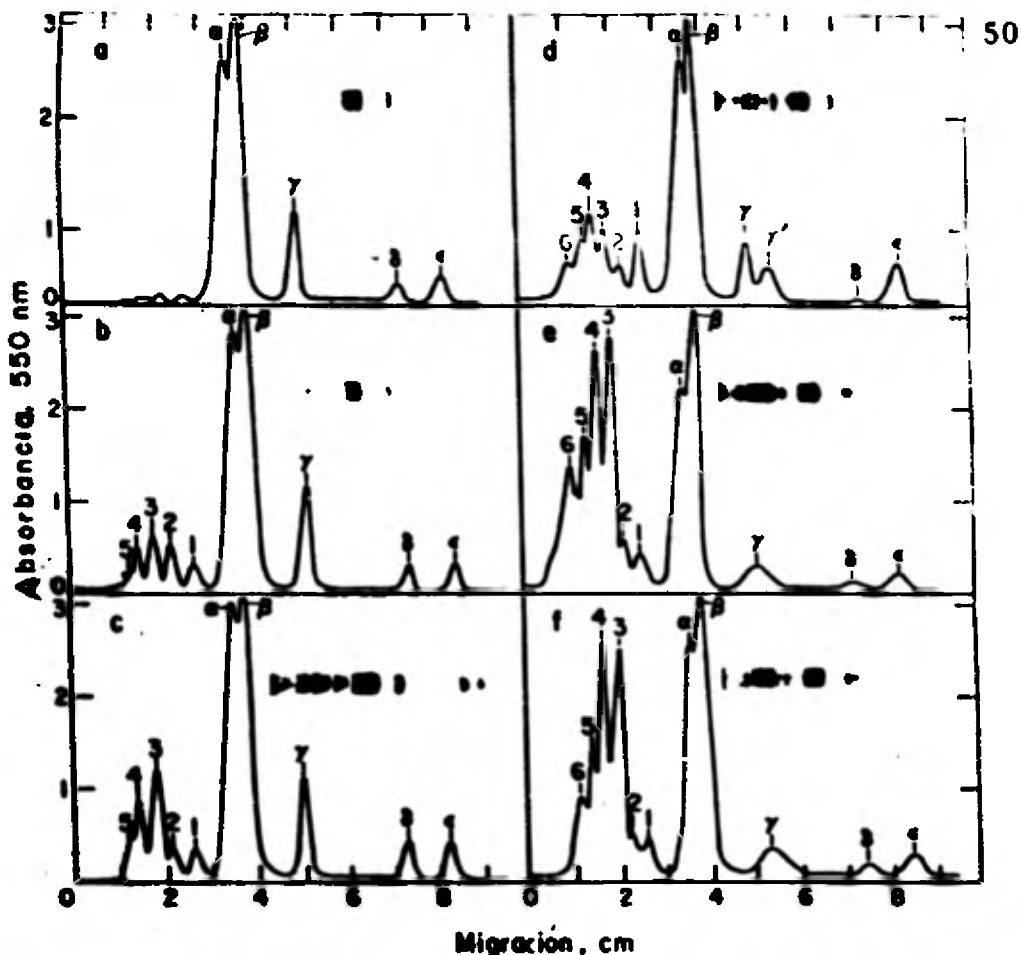


Figura #12.- Trazos espectrofotométricos en gel de poliacrilamida HES y tinción con azul de coomassie. Las fotografías ilustran;

- a).- GFI únicamente
- b).- GFI cruzado con H2O2
- c).- GFI con Ca<sup>2+</sup>
- d).- GFI con FZMB
- e).- GFI con HES
- f).- GFI con DCP

La concentración de la proteína fue de 50 a 100  $\mu$ g, las subunidades se nombraron como  $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$  respectivamente y las bandas de "agregados" fueron numeradas del 1 al 6 (4).

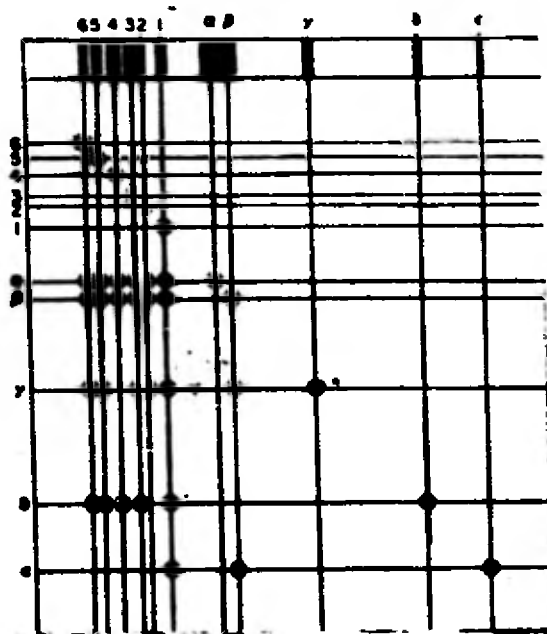


Figura #13.- Electroforesis vertical y horizontal en gel de EMS. Las distintas subunidades que forman los "agregados" son indicados según el reactivo utilizado, para ● se usa DTP, para ⊖ se usa  $\text{CaF}_2$  o  $\text{H}_2\text{O}_2$  y para ⊕ indica que la mancha fue vista en todos los enlaces cruzados (4).

Subunidades y "agregados"	Enlaces entrecruzados con;	
	DTP	CuP o H2O2
$\epsilon$ .....	$\epsilon$ .....	$\epsilon$
$\delta$ .....	$\delta$ .....	$\delta$
$\gamma$ .....	$\gamma$ .....	$\gamma$
$\beta$ .....	$\beta, \gamma, \epsilon$ .....	$\beta, \gamma, \epsilon$
$\alpha$ .....	$\alpha$ .....	$\alpha$
1 .....	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ .....	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$
2 .....	$\alpha, \beta, \gamma$ .....	$\alpha, \beta, \gamma$
3 .....	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ .....	$\alpha, \beta, \gamma$
4 .....	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ .....	$\alpha, \beta, \gamma$
5 .....	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ .....	$\alpha, \beta, \gamma$
6 .....	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$	

Tabla #3.- Agrupación de resultados obtenidos en las figuras — 12 y 13. En la primer columna estan las subunidades y "agregados" acendados respecto a su peso molecular de menor a mayor. En la segunda y tercera columna su constitución (4).

DTP, CuP y H2O2 fueron los reactivos utilizados para identificarlos.

Peso Molecular  
 $10^{-3}$

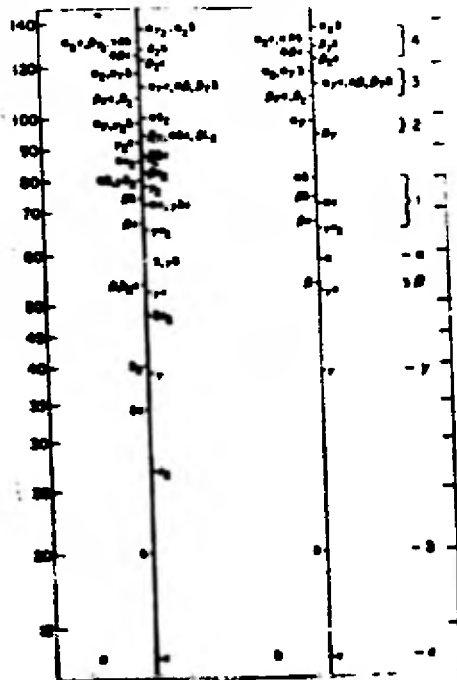


Tabla # 4.- Subunidades y "agregados" en orden de peso molecular. Columna g con todas sus combinaciones posibles, columna h - se descartan todas las combinaciones que no se presentaron en las curvas de entrecruzamiento de acuerdo a su peso detectado - (4).



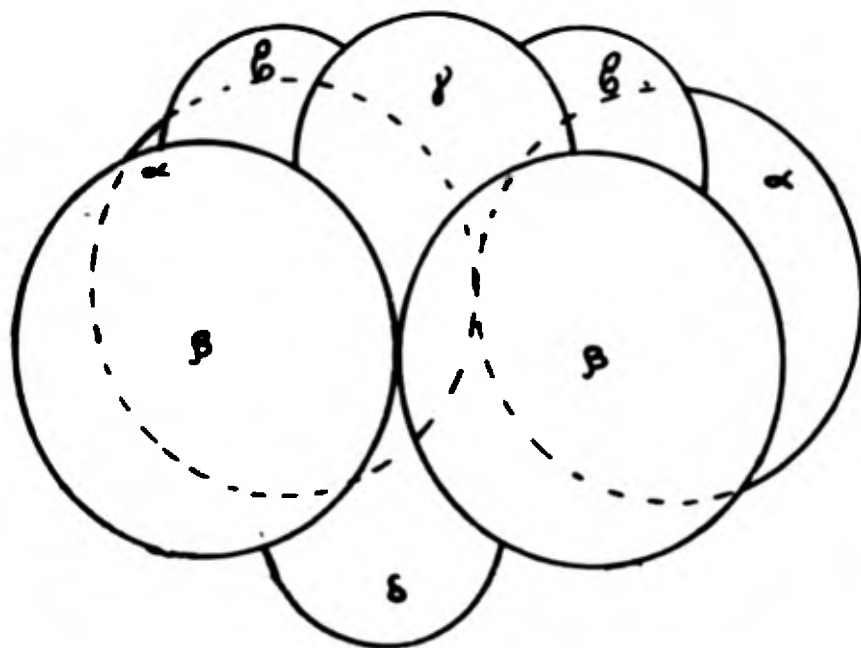


Figura #14.— Modelo propuesto para las subunidades del CFI.  
 Estereometría de  $2\alpha$ ,  $2\beta$ ,  $1\gamma$ ,  $1\delta$  y  $2\epsilon$  sugerida por Baird -  
 y Hansen (4).

epsilon por no encontrarse relación entre ellas y los reactivos, (no se encontró enlace epsilon epsilon) lo que indica que estan separadas, pero muy cerca de gamma por su reacción con ella.

2. - Nelson (50) utilizando la radioactividad relativa de las subunidades del CFI y después de electroforesis en gel de DSS concluye una estequiometría de  $2.1 \alpha$  ,  $2.0 \beta$  ,  $0.79 \gamma$  ,  $0.93 \delta$  y  $1.2 \epsilon$  .

3. - Binder (6) cuantificó la cantidad de colorante azul de comassie que se une a una cantidad conocida de subunidades purificadas del CFI, después de separarlas por electroforesis en gel de poliacrílammida-DSS, calculó la estequiometría en relación con la subunidad gamma y propone que tiene 1.0 subunidad/mol encontrando 2.1 para  $\alpha$  , 2.1  $\beta$  , 0.4  $\delta$  y 1.5  $\epsilon$  .

El contenido de grupos SH en el CFI y la disposición de sus subunidades está de acuerdo con una estequiometría 2, 2, 1, 1, 2, (33).

Farron y Racker (15) al realizar la activación del CFI con calor y otros reactivos, cuantificaron el número de grupos SH existentes en la enzima, tomando como antecedentes los siguientes:

- a) Urea adicionarse en concentración 8 M en dodecilsulfato de sodio al 10%, permite que las subunidades se separen y manifiesten sus grupos SH.
- b) El ditioneitol (DTT) al reaccionar con el CFI (rompe) reduce los puentes disulfuro.
- c) La iodoacetamida reacciona específicamente con los grupos SH.

Los autores emplearon una concentración de 3.7 mg de proteína/ml de solución amortiguadora, incubaron con calor, urea y DTT, precipitaron con sulfato de amonio y resuspendieron y pasaron por cromatografía. Al eluido obtenido le determinaron el número de grupos SH existentes mediante dos experimentos; en el primero titularon los grupos SH con ditio-nitrobenzoato. En el segundo identificaron los grupos SH por su unión con el reactivo monoespecífico marcado (iodoacetamida- $C^{14}$ ).

Los resultados se muestran en la tabla # 5. En el primer experimento; a). Durante la activación con urea se identificaron 8 grupos SH, b) al aplicar además DTT se identificaron 12 grupos SH. En el segundo experimento; a) Al CF1 sin activación se le identificaron 2 grupos SH, b) al activar con calor se detectaron 4 grupos, c) con calor y urea se encontraron 8 grupos, d) y con calor, urea y DTT se identificaron de 12 a 13 grupos SH/CF1.

Binder (6) en el mismo experimento para la determinación de aminoácidos encontró 13 grupos SH/mol de CF1.

McCarty (33) usando reactivos monofuncionales radioactivos (NEM- $C^{14}$ ) encontró 8 grupos SH en las subunidades alfa y beta, 3 en gamma y 1 en epsilon. Estos últimos resultados son los más aceptados actualmente.

Concluyendo, cuando se determina el peso molecular de las subunidades y se suman utilizando la estequiometría 2, 2, 1, 1, 2, se encuentra sólo una diferencia de 3% comparada con el peso molecular total del CF1 (33).

Los Drs. Cantley y Hammes trabajaron en la clasificación de los sitios

CPM	Reactivo adicio- nado durante la incubación.	Proteína µgr.	D.O. <sup>nt</sup>	CPM	µmoles de SH/330 µgr de proteína
Experimento 1	8 M de urea	320	0.108	—	8.15
(sin tratamiento)	8M de urea + 0.05M de DTT	300	0.151	—	12.2
<b>Experimento 2</b>					
a) Sin trata- miento.	0.01M de IA- C <sup>14</sup> durante u- na hora	388	—	452	2.02
	0.01M de IA- C <sup>14</sup> durante - dos horas	380	—	425	1.95
<b>b) Tratado con calor.</b>					
-63°C, 3 min.	0.01 M de IA- C <sup>14</sup>	166	—	340	3.5
-63°C, 3 min.	8M de urea + 0.01 de IA-C <sup>14</sup>	216	—	1104	8.9
-63°C, 3 min.	8M de urea + 0.05M de DTT+ 0.01M de IA-C <sup>14</sup>	197	—	1440	12.7 a 13.2.

Tabla # 5 .- Determinación del contenido de grupos SH mediante dos experimentos, variando el reactivo utilizado durante la incubación. En el primer experimento usaron la densidad óptica (D.O.) y en el segundo cuentas por millón (CPM) para determinar los resultados (15). IA-C<sup>14</sup> = Iodoacetamida, DTT= Ditiotritol.

de unión para nucleótidos en el CF1 de cloroplastos (10), midieron la distancia del sitio de unión de nucleótidos a la del sitio de unión del reactivo, para lo cual emplearon la técnica de la transferencia de energía fluorescente. Se tomaron en cuenta los siguientes antecedentes;

a) De acuerdo con Nelson (73), sometieron a la enzima a una digestión con tripsina, las subunidades que soportaron estas condiciones de digestión fueron alfa y beta, ambas presentaron una alta capacidad de actividad de ATPasa.

b) La actividad de ATPasa en el CF1 puede ser inhibida por la reacción con el NBS-Cl que bloquea grupos tirosina en la subunidad beta (14).

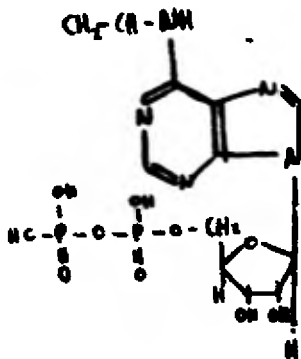
c) Cantley y Hammes (9) habían sugerido un sitio activo localizado en la subunidad beta para la hidrólisis de ATP en el CF1 activado por calor.

d) El CF1 solubilizado contiene dos sitios de unión catalíticos considerados como los reguladores alostéricos conformacionales para la ATPasa activada.

En el trabajo de medición de distancias por transferencia de energía fluorescente, se emplearon nucleótidos fluorescentes análogos tales como  $\epsilon$ -ADP y el  $\epsilon$ -AMP-PNP (figura # 15) usados como donadores y NED-Tirosina y grupos amino como aceptores.

De acuerdo a la teoría de transferencia de energía desarrollada por

$\epsilon$ -ADP = 1, N<sup>6</sup> Etenc ADP



$\epsilon$ -AMP-PNP = 1, N<sup>6</sup> Eteno Adenilil imido difosfato

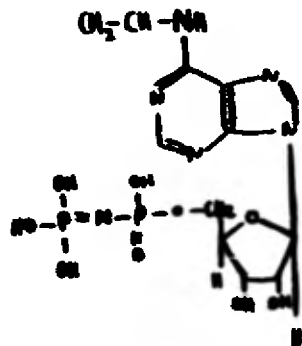


Figura # 15 .- Estructura de algunos análogos de nucleotí-  
dos (10 ).

Förster en 1959-1965 (18), en relación a la distancia del par donador aceptor, se concluyeron tres puntos:

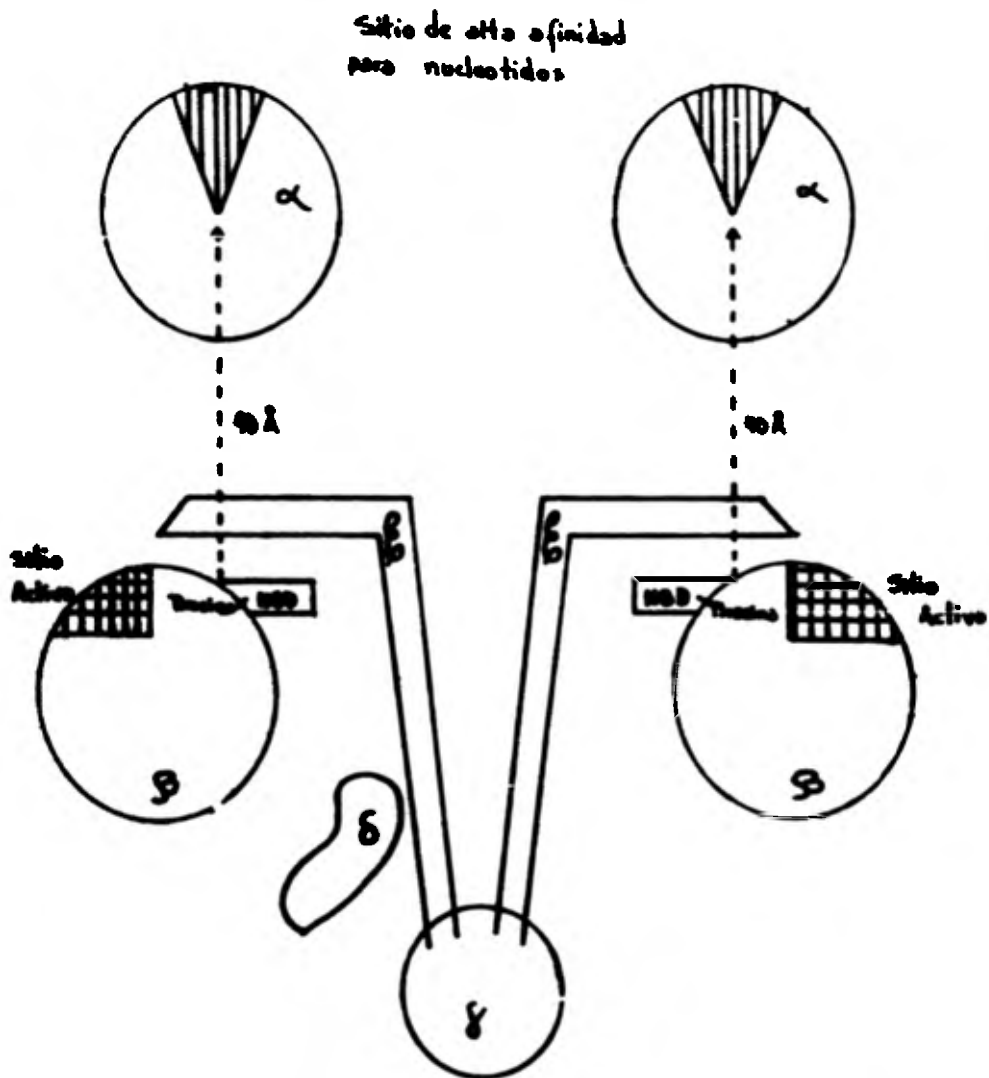
1. - El donador y el aceptor deben unirse específicamente en los sitios de unión.

2. - La pérdida de la fluorescencia en el donador debe ser debida a la energía transferida al aceptor y no a algún otro cambio del donador inducido por su acción con el aceptor.

3. - Sugieren un modelo para calcular la distancia entre los sitios de unión en caso de existir múltiples sitios para donadores y aceptores.

En la figura # 16 se propone un modelo para los sitios de unión a nucleótidos en el CF1. En las subunidades beta sólo se encontró un sitio de unión para la reacción con NBD-Cl siendo los grupos tirosina los que reaccionaron con él, ésta unión se encuentra colocada cerca del sitio activo de dicha subunidad. El sitio de alta afinidad para la unión a nucleótidos esta colocado tentativamente en la subunidad alfa a  $40 \text{ \AA}$  del sitio NBD-tir de la subunidad beta (11).

Estudios más recientes de Cantley y Hammes (11) reportan como localizaron sitios de unión a reactivos monofuncionales específicos y la medición de ellos a partir de los grupos SH-cisteína de la subunidad gamma. Utilizaron el CF1 aislado activado con calor y tres pares de juegos donador-aceptor, como se muestra en la tabla # 6. Primeramente inhibieron los grupos SH-cisteína (normalmente presentes en el CF1) mediante utilización de un reactivo monofuncional como es el NEM ( $\text{H}^3$ ) pues conocían su acción selectiva sobre estos grupos (35). Luego activaron el CF1 con calor y adicionaron reactivos mono



**Figura #16.**— Esquema del CF<sub>1</sub>, en modelo demuestra la distancia de los sitios de unión de HED-Tirosina al sitio de alta afinidad a nucleótidos. El sitio activo para la hidrólisis de ATP supuestamente está localizado en la subunidad  $\beta$  (9).



DONADOR	ACEPTOR
1.- NEM	Quercetina
2.- NEM	NED-tirosina
3.- $\epsilon$ ADP	DEPM

Tabla # 6 .- Reactivos monofuncionales específicos utiliza—  
dos como juegos donador-acceptor para medir distancias entre los  
sitios de unión (11) .

funcionales análogos al NEM como son NBPM y DDPM los cuales se unieron a otros grupos SH resultantes de la activación con el calor y localizados en la subunidad gamma mediante electroforesis con gel de poliacrilamida-DSS. Aplicando el método de energía fluorescente midieron las distancias de los grupos SH en la subunidad gamma a los sitios de unión de quercetina, NBD-tirosina y sitios de alta afinidad a nucleótidos ( $\epsilon$ -ADP) (11).

Concluyeron que existen dos sitios de unión en la subunidad beta para NBD-tirosina, dos en la subunidad alfa para la quercetina y dos para nucleótidos ( $\epsilon$ -ADP). Las distancias encontradas fueron 30 Å de NBPM a quercetina, 34-41 Å de NBPM a NBD-tirosina y 40 Å o más de NBPM a nucleótidos ( $\epsilon$ -ADP) (figura # 17).

Los datos obtenidos por reacciones de entrecruzamiento al combi- con los resultados de estudios sobre las distancias intersubunidades mediante la técnica de transferencia de energía fluorescente, orientan a la elaboración de un modelo de CF1 (4) (figura # 14).

Estudios recientes continúan la investigación de la estequiometría mediante técnicas más sofisticadas como son la microfotografía electrónica y el análisis de difracción de rayos X. Estos estudios podrán resolver las controversias acerca de la real estequiometría del CF1.

## II. - ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y SITIOS DE UNIÓN

La preparación del CF1 purificado tiene poca actividad de ATPasa, dicha actividad puede ser incrementada al tratar la enzima con ca-



lor, tripsina y compuestos tioles.

La preparación del purificado del CP1 fue realizada por Farron (16) mediante la secuencia siguiente:

1. - Los cloroplastos se obtuvieron de 3 Kg de hojas por el método de Jagendorf y Avron (28), el contenido de clorofila se ajustó a 3 mg

2. - Al extracto se añadió en 16 volúmenes de acetona enfriada a  $-10^{\circ}\text{C}$  y se obtuvo un precipitado.

3. - El precipitado se extendió en un plato de vidrio y se seco con una corriente de aire frío, después el residuo se extrajo con solución reguladora (tris-Cl 50mM a pH de 8, EDTA 2mM y ATP 4mM) y agitado durante 20 minutos a temperatura ambiente, centrifugación a 20,000 rpm durante 10 minutos.

4. - El sobrenadante era el extracto crudo de CP1 al cual se le añadió 12 gr. de sulfato de amonio por cada 100ml de sobrenadante a  $0^{\circ}\text{C}$  siendo guardado durante 24 hs en frío.

5. - Se centrifugó y desechó el precipitado, al sobrenadante se le añadió 13.8 gr de sulfato de amonio por cada 100ml, ocasionando precipitación de la enzima y colectandola por centrifugación.

La activación del extracto crudo de cloroplastos con calor, con compuestos tioles y tripsina fue realizada por Farron y Racker (15), observando incremento en la actividad de ATPasa determinada por la hidrólisis de ATP y su consecuente liberación de Pi.

1. - Utilizando una concentración protéica de 0.5 a 2.0 mg. /ml y diferentes temperaturas ( figura # 18), encontraron que la máxima

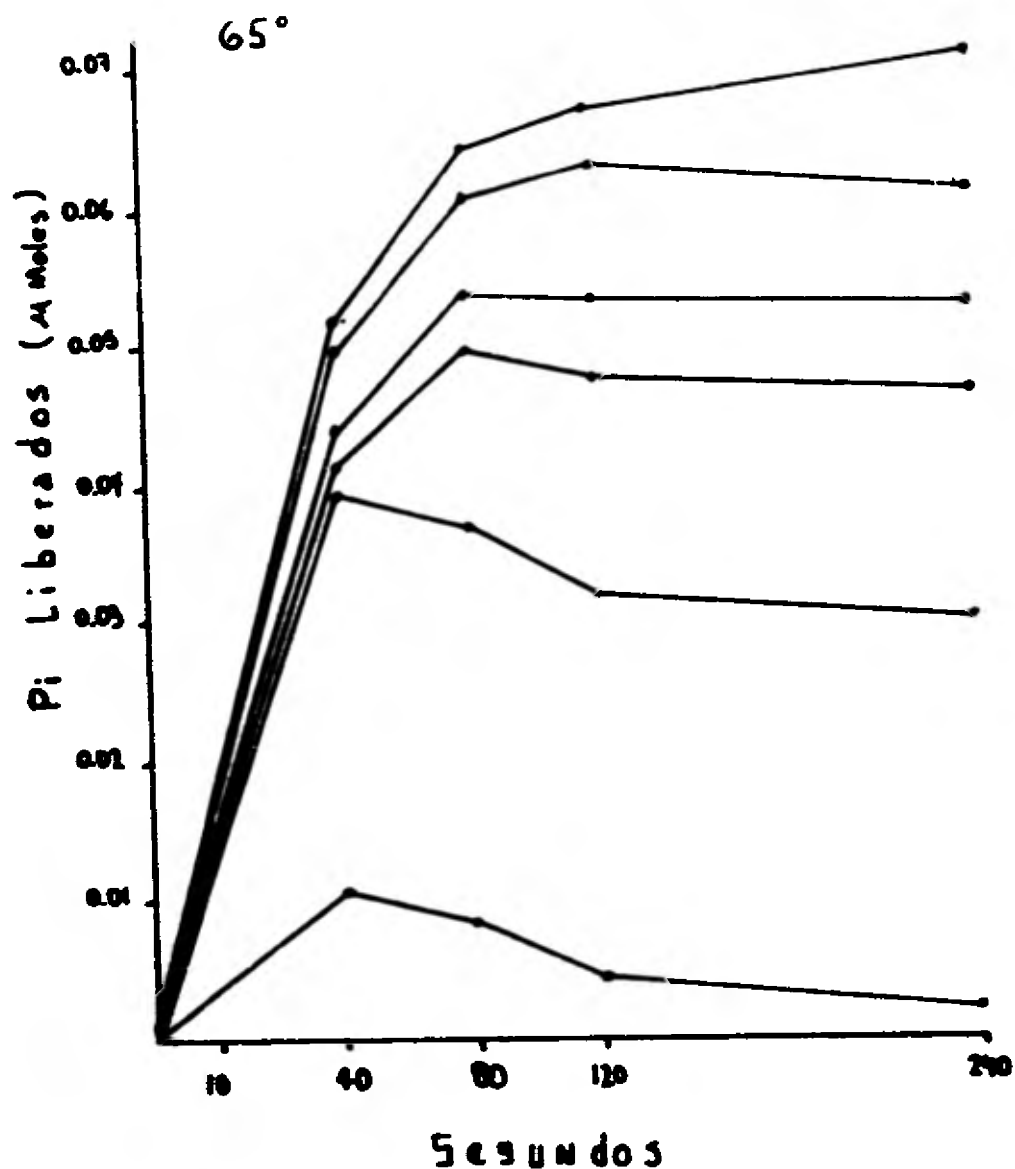


Figura #18.- Efecto de la temperatura ( 65°C ) sobre la actividad de la ATPasa ( liberación de Pi ) (15).

actividad de ATPasa era a 65°C, siendo necesaria la presencia de - ATP 1-4mM . El ATP fué adicionado de acuerdo a la temperatura de una manera directamente proporcional ya que tiene la función - de dar estabilidad a la enzima.

2. - Analizaron el efecto de los compuestos tioles (DTT) encontrando que con ellos la activación era más patente (figura #19). Al extracto crudo del CFI calentado a 60°C se le adiciona DTT 5mM , - observando que la actividad específica de la ATPasa se incrementó , y que por arriba de dicha temperatura la enzima se desnaturizó . Por lo tanto concluyeron que la energía de activación era mayor en ausencia de DTT ( 35 KCal / mol de enzima ) que en presencia de él ( 17 KCal / mol de enzima ).

3. - En éste experimento los autores utilizaron la activación del - CFI crudo con tripsina en proporción de 4:1 respectivamente, encontrando que la actividad de ATPasa incrementó notoriamente (100%) al compararla con el incremento ocasionado por el tratamiento - con iodoacetamida más calor (40 - 50 %).

En ausencia de altas concentraciones de dicarboxilato y bicarbonato la ATPasa activada dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  es inhibida por el  $\text{Mg}^{++}$  (75).

Un análisis más detallado de los requerimientos catiónicos revelaron que las bajas concentraciones de cationes divalentes aumentaban la actividad de ATPasa del CFI tratado con calor en el orden siguiente:  $\text{Mn}^{++} > \text{Mg}^{++} > \text{Ca}^{++} > \text{Co}^{++}$  . Concentraciones altas de ATP libre

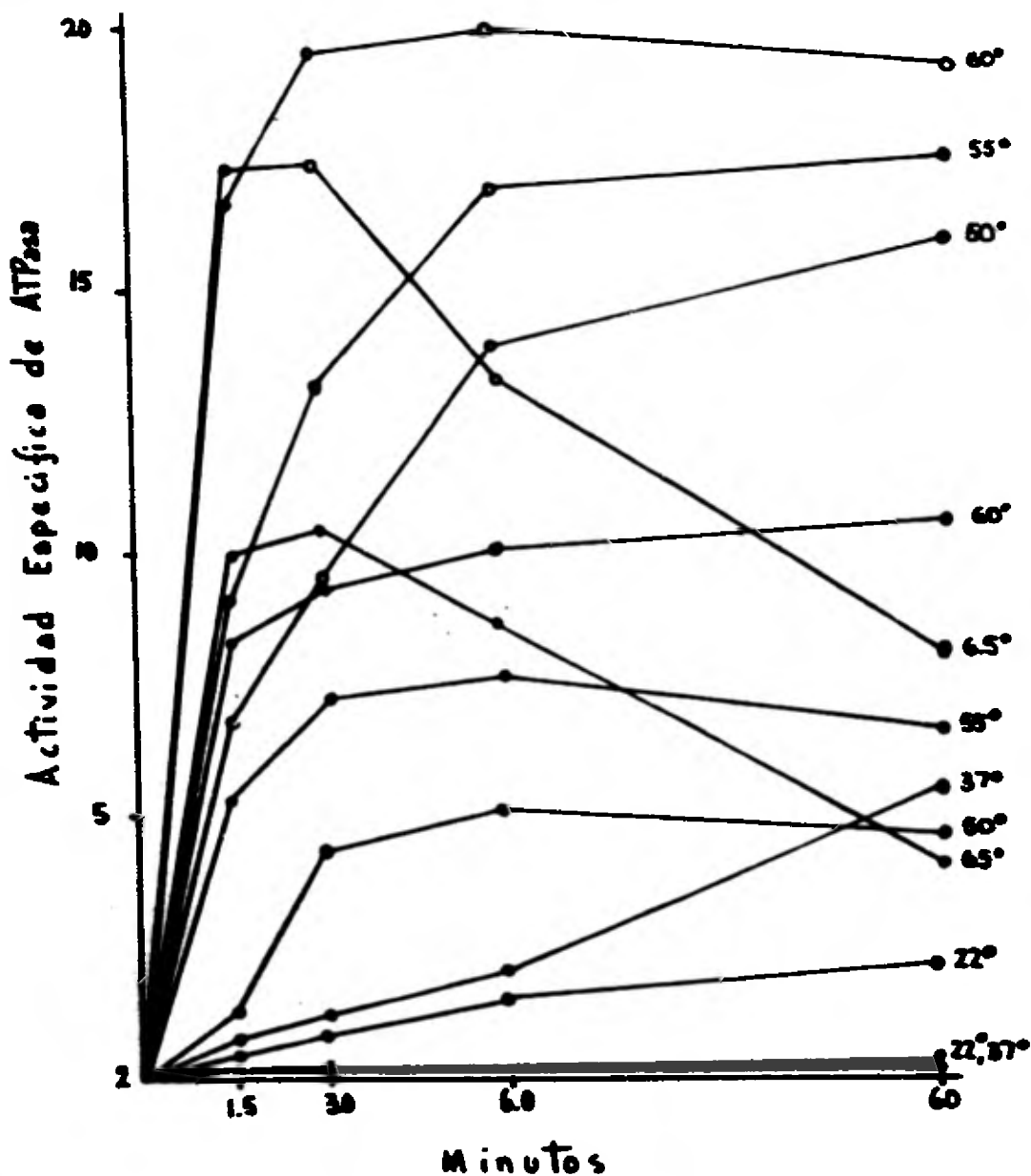


Figura #19.- Efecto de la temperatura más la presencia de — DTT en la activación de la ATPasa. (O) con ditiotretol, (●) sin ditiotretol (15).

o de cationes inhiben la actividad de ATPasa, el complejo  $ATP^{2-}$  catión es el sustrato real de la reacción. Los valores  $K_I$  para el catión libre fueron de 4, 20 y 7000  $\mu M$  para  $Mn^{++}$  respectivamente. El  $Ca^{++}$  soporta mayor actividad de ATPasa por ser un inhibidor pobre. La inhibición de la actividad de ATPasa por el  $Mg^{++}$  está parcialmente disminuída en presencia de dicarboxilatos y bicarbonatos, pues se observó aceleración de la actividad de ATPasa cuando estos reactivos estuvieron presentes -- (54).

Los valores de  $K_m$  para el ATP a  $37^\circ C$  y pH de 8 en presencia de exceso de  $Ca^{++}$  variaron en un intervalo de 0.8 a 1.3 mM. Hochman y colab (27) encontraron una  $K_m$  para el complejo ATP- $Ca^{++}$  de 2.5 mM, los valores de  $V_{max}$  variaron con las diferentes condiciones de activación y de ensayo en el intervalo de 35 a 45  $\mu mol$  de Pi formado /min/mg de CF1 a  $37^\circ C$ . El ATP es el sustrato específico de la ATPasa, aunque el GTP es hidrolizado a buena velocidad (75). El ADP es un inhibidor alostérico de la -- ATPasa dependiente de  $Ca^{++}$  del CF1 (54).

Después de la activación, el CF1 no cataliza el intercambio ADP-ATP - (75), sin embargo, puede llegar a catalizarlo si se adiciona más ADP (49) para formar ATP y su AMP correspondiente, este proceso de transfosforilación se lleva a cabo muy lentamente. Cantley y Hammes (9) reportaron una velocidad de formación de AMP para el CF1 de 15 pmoles /min. / mg de CF1.

Las propiedades de los sitios de unión a nucleótidos en el CF1 han recib-



do una considerable atención, siendo estudiados por una variedad de métodos diferentes (Tabla #7). Aunque algunos autores no coinciden en los mismos aspectos es claro que el factor de acoplamiento (CF1) en tilacoides de espinacas es similar al de otras membranas (67) pues contienen varios sitios de unión a nucleótidos (9, 73).

Aproximadamente 2 moles de ATP unidos a un mol de CF1 fueron encontrados en los primeros experimentos. Después de la incubación del CF1 con ADP-(C14) por dos horas y pasando la mezcla a través de una columna de Sephadex, Moudrianakis y Tiefert (49) detectaron de 1.5 a 2 moles de nucleótido (C14) unido al CF1, con una constante de disociación de 2 a 35  $\mu$ M.

Usando una técnica de diálisis forzada Cantley y Hammes (9) encontraron que el CF1 contiene dos sitios idénticos para la unión con ADP, adenilimidodifosfato (AMP-PNP) y 1, N6-eteno-ADP ( $\epsilon$ -ADP), con una constante de disociación de 1.35 a 1.8  $\mu$ M. Otros sitios de unión a el adenilimidodifosfato fueron expuestos por la activación con calor de la ATPasa por lo que concluyeron que éste reactivo es un inhibidor competitivo de dicha enzima. En presencia de  $MgCl_2$  - 5 mM, VanderMeulen y Govindjee (76) detectaron dos sitios de unión para 1, N6-eteno-ADP con una constante de disociación de 0.5 a 2  $\mu$ M.

Girault y Galmiche (21) también encontraron dos sitios para el  $\epsilon$ -ADP, con una constante de disociación de 1.25 a 2.5  $\mu$ M. Los resultados obtenidos por Cantley y Hammes acerca de los sitios de alta afinidad parecen ser equivalentes a los sitios encontrados por el grupo de Moudrianakis

Autores	Condiciones	Método	Uniones sitio/CFL	Número de Constante disociación
Roy, Madrin 1971	10 mM tris- $\text{SO}_4$ (pH 8) 1 mg/ml de CFL (DFT activado); 2 hs de incubación.	Filtración en gel, remoción de nucleótidos no unidos.	ADP 2	2, 35
Eisfert 1977	Como el anterior	Como el anterior	ADP 2 AMP-PNP 2 FPI 1.25	2.4, 38 5.5, 35 7.3, 21
Cantley y Hanes 1975	50 mM tris-HCl (pH 8.0) 2 mM $\text{MgCl}_2$ , 0.1 M $\text{MgCl}_2$ 2-10 mg/ml de CFL, 3% sales ) cubo através de dos ej lentes de Sphéron 8— 25 para remover nucleó tidos intercambiables.	Equilibrio (titulación fug sales )	ADP 3   AMP-PNP 2 (-ADP 2	1.8 (2 sitios); curva de 100 (1 - sitios). 1.4 1.8
Girault, Guj 1977	20 mM de solución regu- ladora de trisina, 20 - mM $\text{MgCl}_2$ (pH 8.4); CFL (preparado en presencia de ATP) 0.19 mg/ml.	Equilibrio (titulación )	(-ADP 2.5 (-ADP 2.5	1, ? 1, ?
Vanderhoeven Gevinkjes — 1977	30 mM de trisina, 5 mM $\text{MgCl}_2$ (pH 8); CFL (10— 1.4-1.5 mg/ml.	Equilibrio (Polarización de fluorescencia de (-ADP)	(-ADP 2	0.5, 2.0

Tabla # 7 .- Diversos Métodos para el estudio de las propiedades de los sitios de unión a nucleótidos en el CFL purificado (33).

aunque con resultados diferentes, esta discrepancia puede ser explicada por las variaciones en las condiciones de ensayo y métodos empleados.

Tiefert y colab.(73) señalaron que algunas conversiones de ADP a ATP y AMP son llevadas a cabo y que la unión al ADP no debería ser tratada como un proceso en equilibrio. Sin embargo, esta objeción puede no ser aplicada a la unión AMP-PNP preconizada por Cantley y Hammes (9), ellos encontraron que los sitios de unión a ADP y AMP-PNP eran muy similares.

Girault y Galmiche mencionan que los sitios de unión a nucleótidos en el CF1 detectados por filtración con gel son menores que los encontrados por diálisis, esto puede deberse a que algunos ADP son perdidos durante el proceso de filtración. La presencia de nucleótidos unidos en el CF1 complica la medición de sitios de unión por que algunos de los sitios pueden estar de hecho intercambiados.

Recientemente se encontró que la velocidad de unión del formicín trifosfato (un análogo fluorescente del ATP) al CF1 preparado solo con cuatro subunidades, se incrementa cuarenta veces o más por la activación de la ATPasa-Ca<sup>++</sup> en presencia de ditiotreitól. Este incremento en la velocidad de unión con respecto a la actividad de la ATPasa es incierto. Sin embargo, esta característica del sitio de unión a nucleótidos se requiere para explicar las funciones fisiológicas de los sitios múltiples.

Es riesgoso extrapolar los resultados de interacción de nucleótidos con el CF1 aislado y el que está unido a la membrana, pues las propiedades

de la enzima aislada probablemente son muy diferentes a cuando está unida, por ejemplo, se han obtenido mayores velocidades de hidrólisis de ATP con la enzima unida a la membrana en presencia de altas concentraciones de  $Mg^{++}$ , que en presencia de  $Ca^{++}$ . La sensibilidad de la actividad de la ATPasa para adenilimidodifosfato es mucho menor con el CF1 aislado.

El CF1 aislado también une  $Mn^{++}$  en cerca de cinco sitios y están caracterizados por una constante de disociación de 9 a 53  $\mu M$ . La alta afinidad de estos sitios para con el  $Mn^{++}$ , los cuales aparentemente unen  $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$  rápidamente, está probablemente involucrada en la inhibición de la actividad de ATPasa por los cationes libres.

## PROPIEDADES DEL CFI UNIDO A LA MEMBRANA.

El CFI es sólo una parte del aparato enzimático el cuál acopla el flujo de protones del interior del tilacoide hacia el exterior, para la síntesis del ATP. En vista de sus capacidades para unir nucleótidos e hidrolizar ATP es muy probable que el CFI sea la enzima responsable de la síntesis del ATP. Además del CFI otros factores hidrofóbicos son requeridos para estabilizar la unión del mismo a la membrana del tilacoide así como para permitir el flujo de  $H^+$  a través de la membrana. Al CFI junto con esos factores membranales se le denomina complejo ATPasa, los componentes hidrofóbicos son llamados  $F_0$ , así que al conjunto de le ha denominado CFI- $F_0$  (figura #20). La letra "o" fue tomada de la oligomicina ya que ésta fue originalmente aislada como un factor, el cual confiere sensibilidad a la actividad de la ATPasa con el CFI aislado.

### L - EL COMPLEJO ATPasa Y SUS ACTIVIDADES.

La forma activa del complejo ATPasa ha sido aislada de una variedad de membranas acopladas incluyendo las de los cloroplastos. Carmeli y Racker (8) usaron el tratamiento con colato en presencia de sulfato de amonio para solubilizar proteínas de la membrana tilacoidea, el extracto de colato contiene poca clorofila y citocromos, pero es rico en actividad de ATPasa y lípidos,

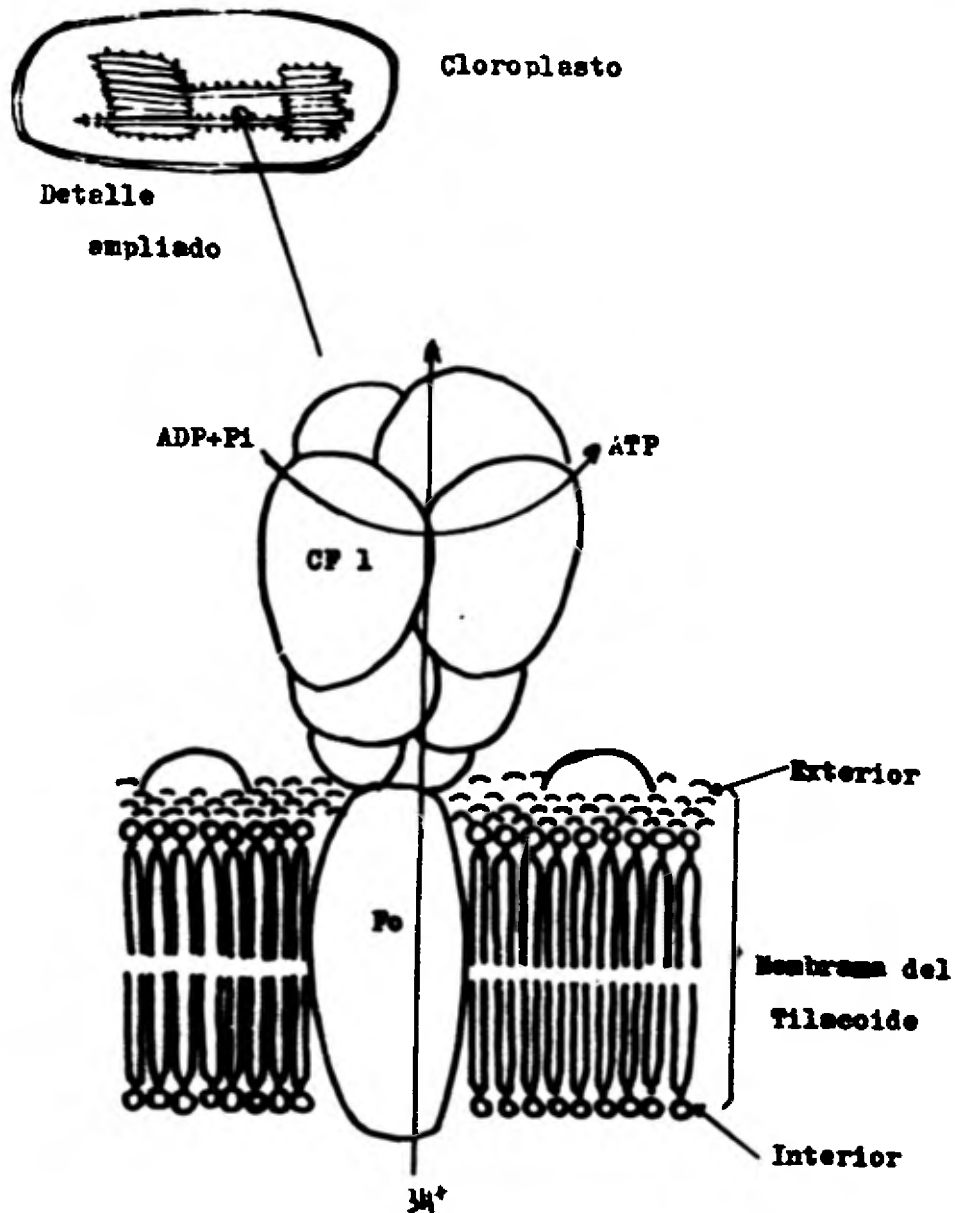


Figura # 20.- Esquema del CF1 unido a la membrana tilacoide en cloroplastos de espinaacas. Unión del CF1 al F<sub>o</sub> (26).

aunque tiene menor actividad de intercambio ATP-Pi<sup>32</sup> cuando el colato es extraído por diálisis.

Winget y cols<sup>(80)</sup> obtuvieron un complejo purificado y demostraron que las vesículas que contiene el complejo catalizan la síntesis de ATP mediado por un gradiente electroquímico de protones, esta preparación está formada por ocho diferentes cadenas de polipéptidos adicionadas a las subunidades del CF1. Más recientemente otros autores modificaron la purificación del complejo incluyendo un octilglucósido en el medio de extracción con colato y la fase de precipitación con sulfato de amonio fue depurada, utilizando el gradiente de densidad de sacarosa los fosfolípidos fueron centrifugados en presencia de triton X-100, obteniendo dos fracciones que catalizaron a velocidades mayores de intercambio ATP-Pi<sup>32</sup>, cuando se incorporaron dentro de las vesículas de fosfolípidos, estas fracciones mostraron sólo de tres a cuatro cadenas de polipéptidos adicionados a las subunidades.

Las funciones de los componentes hidrofóbicos del complejo están siendo estudiadas. Se ha demostrado que al desplazar parcialmente el CF1 de la membrana con EDTA aumenta la permeabilidad de los protones en forma específica (38), la permeabilidad normal de los protones puede ser restaurada por readición del CF1 a la membrana o con dicitclohexilcarboimida (55). El DCCD inhibe la actividad de ATPasa de todos los factores de acoplamiento unidos a la membrana y tiene poco o ningún efecto en la ATPasa -

del CF1 aislado, también inhibe la síntesis de ATP.

El desplazamiento del CF1 puede exponer un canal para protones en la membrana, la reacción de un componente (s) de ésta con DCCD bloquearía el canal. Si un componente del canal de protones estuviera presente en la parte  $F_0$  del complejo, se esperaría que  $F_0$  contuviera una proteína reactiva al DCCD, la captación de protones dependiente de la luz puede disminuir por esta proteína; en efecto, la obtención de vesículas mediante centrifugación usando el gradiente de densidad del ficol demostró que la captación de protones fue menor cuando el DCCD estuvo presente. Así estas proteínas hidrofóbicas que tienen un peso molecular de 8,000 se comportan como si fueran el protón ionóforo del complejo ATPasa, esta proteína también estuvo presente en la preparación de ATPasa de Pick y Racker. Uno de los componentes hidrofóbicos del complejo perteneciente a la membrana, funciona como canal de protones, los otros componentes están involucrados en la unión de la enzima a la membrana.

Se ha encontrado que la iluminación del cloroplasto aumenta la formación de ATP a partir de ADP y  $P_i$ , muy poca o nula actividad de ATPasa se detecta en la oscuridad. Sin embargo, la iluminación del tilacoide en presencia de compuestos sulfhidrilo aumenta importantemente la actividad de ATPasa pero no inhibe la totofosforilación (89). Una vez iniciada la hidrólisis de ATP esta



continúa aún en la oscuridad por varios minutos, aunque el mecanismo de activación no ha sido dilucidado está probablemente involucrado en la energía dependiente de los cambios conformacionales del CF1, estos cambios resultarían en la exposición de una unión disulfuro por reducción de compuestos sulfhidrilo, así como la dislocación de una subunidad inhibitoria.

El desacoplamiento de la fotofosforilación inhibe la activación de la ATPasa (39) e induce cambios conformacionales, la activación pueden ir relacionados con cambios en los sitios de unión a nucleótidos y propiedades del CF1 unido a la membrana. El CF1 aislado e iluminado en presencia de DTT actúa como una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  (39), la habilidad del CF1 unido para hidrolizar el ATP dependiente de  $\text{Mg}^{++}$  después de la activación disminuye en la oscuridad, mientras que la actividad de la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  es estable después de un período de oscuridad. La hidrólisis de ATP puede ser restaurada por un breve período de iluminación en ausencia de compuestos SH, en estas condiciones el CF1 puede asumir un estado activo o conformacional después de catalizar la hidrólisis de ATP.

Existen indicaciones de que la ATPasa- $\text{Mg}^{++}$  activada por la luz y compuestos SH son una expresión de la fotofosforilación operando a la inversa. Durante la hidrólisis se encuentra acoplada la translocación interna de protones como resultado de la disipación del gradiente protónico (12)

Los desacoplantes estimulan la actividad de ATPasa en los tilacoides previamente activados, altas concentraciones de estos desacoplantes reducen importantemente el gradiente inhibitorio de la ATPasa, ya que el mantenimiento de la forma activada del CFI requiere energía. La actividad de intercambio de ATP-Pi<sup>32</sup> se efectúa en forma directamente proporcional a la actividad de ATPasa, sin embargo, la ATPasa y el intercambio ATP-Pi<sup>32</sup> son sensibles a los inhibidores de la fotofosforilación como son el DCCD y el suero anti-CFI (39).

## II.- CAMBIOS CONFORMACIONALES Y SITIOS DE UNIÓN A NUCLEOTIDOS.

El flujo de electrones de la cadena transportadora del cloroplasto se encuentra acoplada para que el transporte de protones cruce la membrana tilacoidea. En estado estático la velocidad del flujo de electrones es igual a la velocidad del flujo de protones internos (65). La velocidad del flujo de electrones es dependiente del pH interno, pH externo y magnitud de  $\Delta$  pH.

Un estudio para averiguar la relación entre cambios conformacionales y la velocidad del flujo de electrones (59) reportó:

El CFI al ser iluminado presenta cambios conformacionales permitiendo la salida de protones, dichos cambios son sensibles al pH del medio, la magnitud de  $\Delta$  pH y las bajas concentraciones de ATP y ADP. A un pH ácido (7.0 ó menor) la velocidad del

flujo de electrones es baja y el CF1 no presenta alteraciones en su conformación, mientras a un pH alcalino (8.0 ó mayor) los cambios conformacionales se llevan a cabo a un valor de  $\Delta$  pH de 2.8-2.9 con un incremento en la velocidad del flujo de protones. Para compensar el incremento en la velocidad del flujo de protones la velocidad del flujo de electrones debe aumentar, por ello, el CF1 debe considerarse como translocador de protones.

Puesto que los cambios conformacionales (relacionados con el flujo de electrones) requieren energía es lógico pensar que la fosforilación está afectada. Se encontró en el mismo estudio que la velocidad de fosforilación fue reducida, a un pH ácido, inhibiendo la síntesis de ATP.

Concluyendo, la relación entre la velocidad del flujo de electrones y la inhibición de la fosforilación a la luz, sugiere que el cambio conformacional del factor de acoplamiento controla la velocidad del flujo de electrones.

La prueba definitiva de que cambios conformacionales suceden en el CF1 cuando el gradiente de protones atraviesa la membrana, fue provista por un experimento efectuado por Kyrie y Jagendorf (66). El CF1 aislado iluminado en presencia de  $H_2^3O$  contuvo 100 moles de  $H^3$  por mol de CF1, mientras que en la oscuridad los tilacoides incubados con  $H_2^3O$  no contenían ningún  $H^3$  en la oscuridad. Existen grupos en el CF1 intercambiadores de  $H^+$  que al ser

expuestos en un medio iluminado se intercambian con el  $H^3$ , esos grupos retornan a su estado original cuando el CF1 es colocado en la oscuridad. El intercambio de  $H^+$  se efectúa rápidamente, es sensible a desacoplantes y puede ser extraído el  $H^+$  en la oscuridad por la formación de un gradiente artificial de pH a través de la membrana, la presencia de ADP y Pi redujo el intercambio de  $H^+$  a la mitad. Concluyendo, ADP y Pi pueden alterar la estructura del CF1.

El efecto de adenin-nucleótidos en el transporte del ión hidrógeno fue un estudio que realizaron McCarty y Colab. (36), refiriendo - que 1 a 10 M de ATP estimulan la captación de  $H^+$  (figura # 21) en cloroplastos iluminados y con valores de pH en los que la fosforilación se puede llevar a cabo. El efecto del pH sobre la estimulación de la captación de  $H^+$  por ATP se muestra en la figura # 22, en la que el máximo de estimulación fue a un pH de 8: con 6.5 de pH no se observó efecto del ATP. El estímulo de la captación de  $H^+$  fue inhibido por el suero anti-CF1 y reducido por inhibidores de la transferencia de energía como son el florizina y el Dio-19 (inhibidor de la captación  $H^+$ ) (tabla # 8).

La síntesis de ATP después de la iluminación también aumentó - por la presencia de ATP. La captación de  $H^+$  se incrementó con ADP en presencia de arsenato y  $Mg Cl_2$  debido a una estimulación del flujo de electrones. Resumiendo, el aumento en la captación

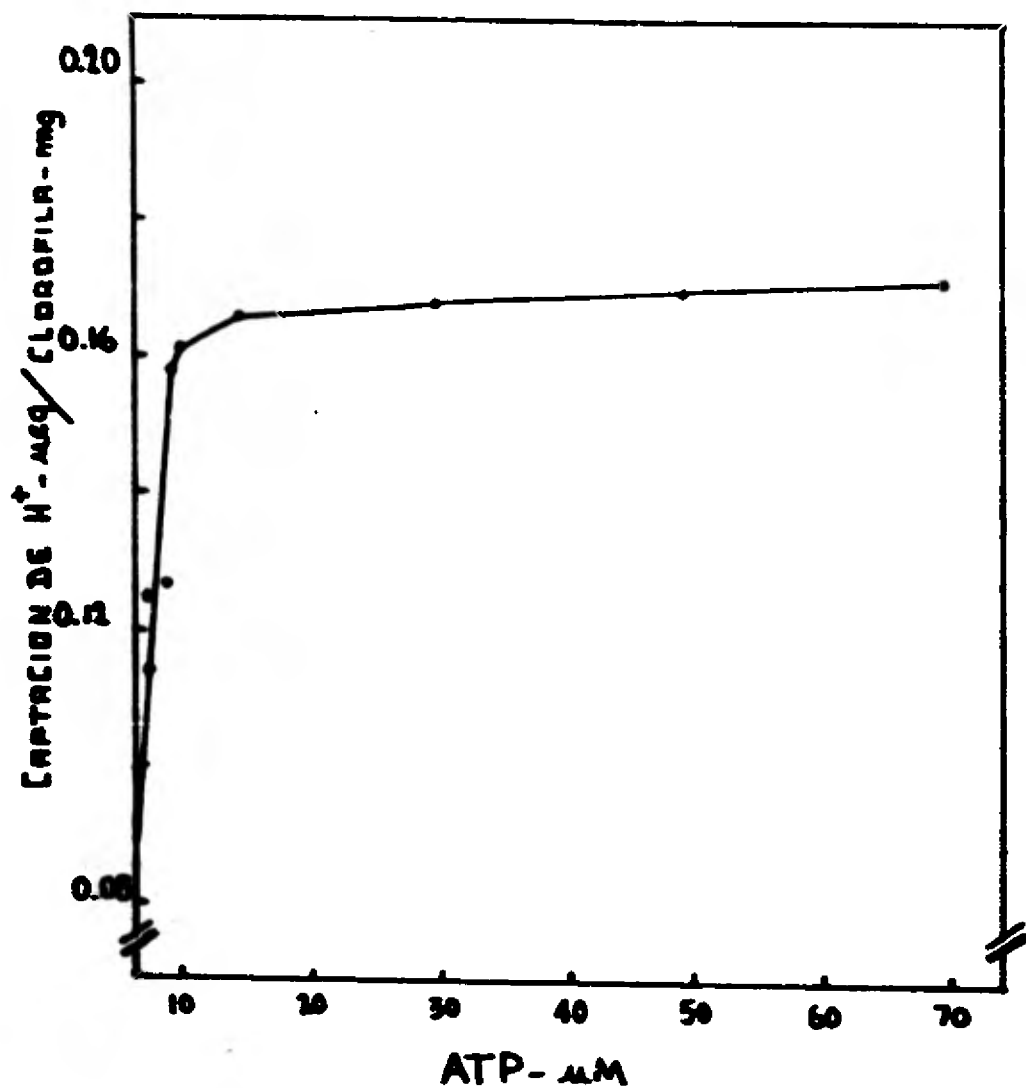


Figura #21 .- Efecto de la concentración de ATP en la captación de  $H^+$  (36).

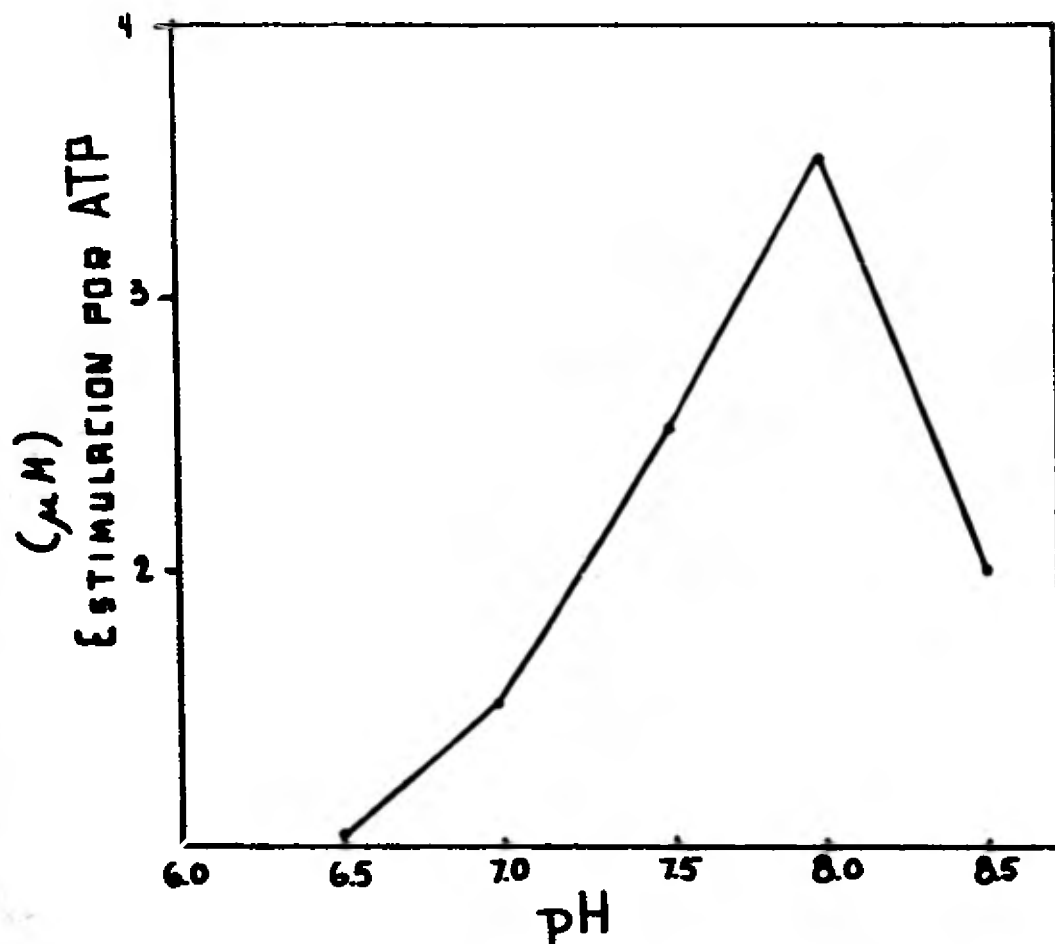


Figura # 22.- Efecto del pH en la estimulación de la captación de  $K^+$  por el ATP (36).

Experi- mento	Inhibidor ó Desacoplante	Captación de H <sup>+</sup>		Estimulación por ATP (%)
		-ATP	+ATP	
(µeq/mg de clorofila )				
I	Ninguno	0.090	0.239	166
	Florisin (1mM)	0.167	0.277	66
	Dio-9 (5 µg/ml)	0.294	0.291	50
II	Ninguno	0.194	0.310	60
	Etilamina (2mM)	0.079	0.122	54
	CCP (10 µM)	0.122	0.187	53

Tabla # 8 .- Efectos de los inhibidores de transferencia de energía y desacoplantes en la estimulación de la captación de H<sup>+</sup> (35).

de  $H^+$  y síntesis de ATP altera la conformación del CF1 en el sitio de unión a nucleótidos (ADP o ATP).

El tratamiento de cloroplastos con NEM (1 mM) en presencia de la luz dió como resultado una inhibición parcial permanente de la fosforilación (figura #23), además inhibió el flujo de electrones no cíclico acoplado a la fosforilación (37). Esta inhibición puede evitarse con el uso de desacoplantes del tipo de cianuro de carbono, m-clorofenilhidraxina y el cloruro de amonio. El ADP y el ATP (10-50 M) protegen parcialmente la inhibición producida por el NEM. Aunque el NEM no afecta la captación de iones  $H^+$  sí inhibe la estimulación de la captación que ocasiona el ATP. Los cambios conformacionales inducidos por la luz permiten la exposición de grupos SH en una o varias de las subunidades de la enzima y son utilizados para la actividad enzimática del CF1, la reacción de dichos grupos con el NEM explicaría la inhibición de la fosforilación (37, 35).

Durante el estudio de la influencia de adenin-nucleótidos en la inhibición de la fosforilación por NEM (43) se indicó que dicha inhibición parcial no puede ser restaurada totalmente por una exposición infinita a la luz (figura #24) o por el aumento en la concentración del sustrato de la fosforilación (ADP) (figura #25). A bajas concentraciones de ADP se logra una disminución de la inhibición, la inhibición con GTP fué independiente de la concentración de este nucleótido (figura # 26). El ADP y el ATP -



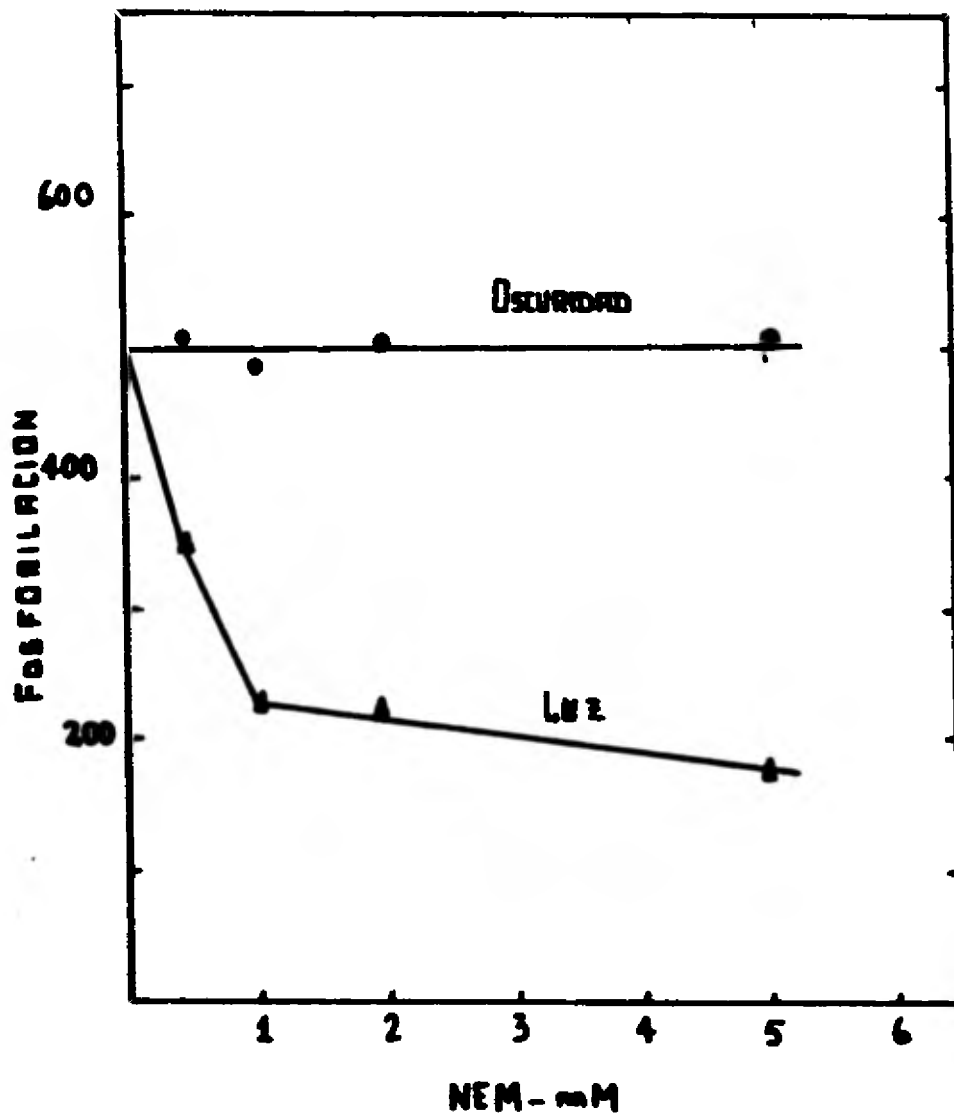


Figura # 23 .- Efecto de la concentración de NEM en la inhibición de la fosforilación ( 37 ).

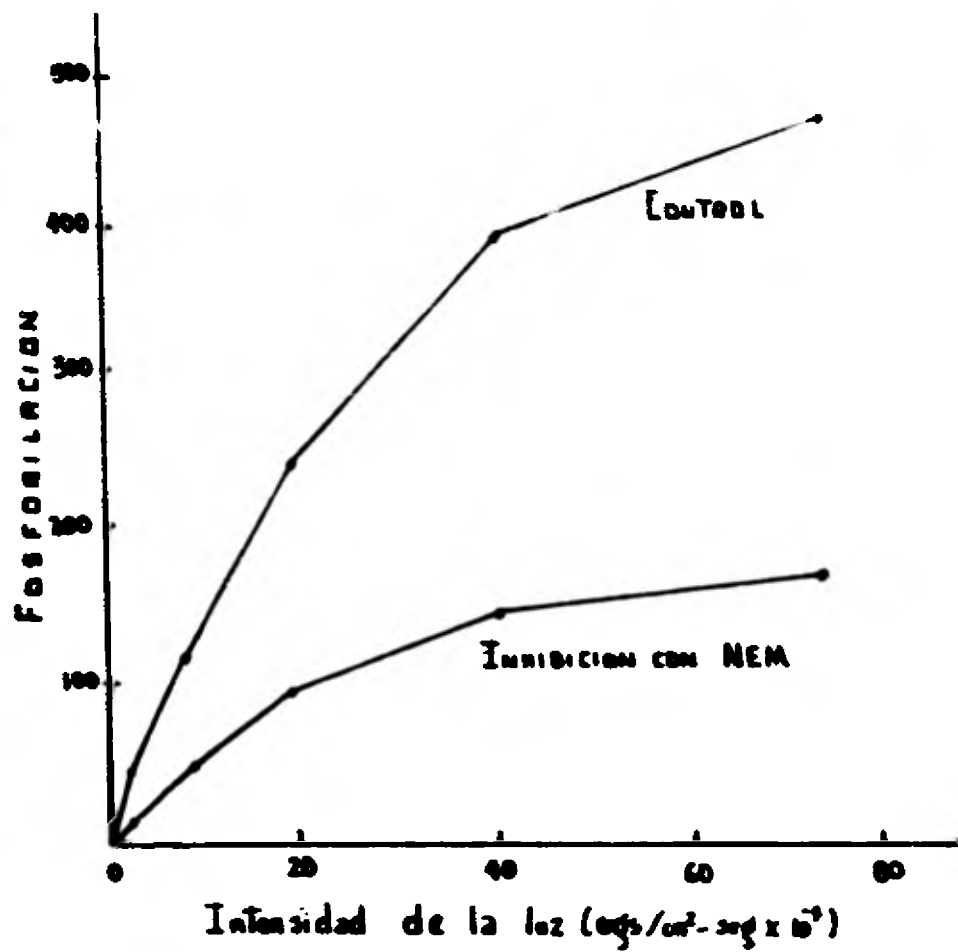


Figura # 24 .-- Efecto de la intensidad de la luz sobre la fosforilación inhibida con NEM (43).

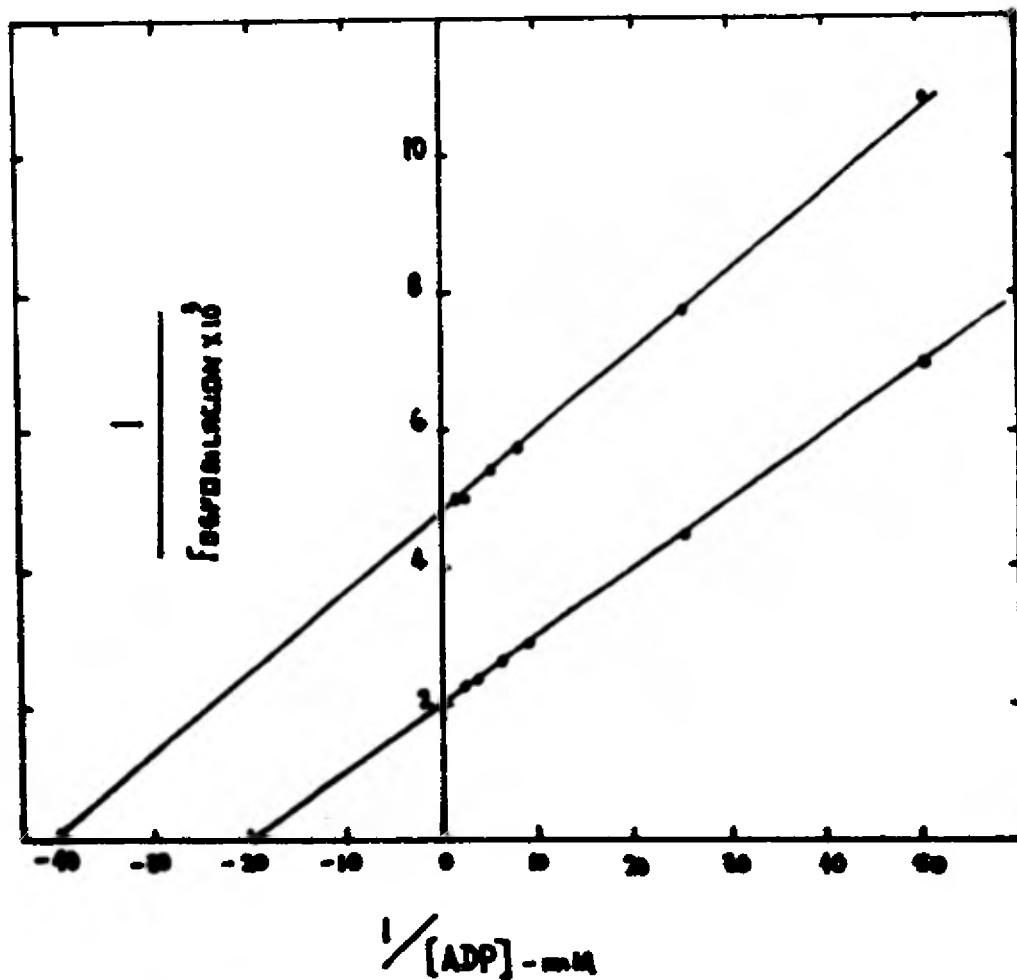


Figura # 25 -- Efecto de la concentración de ADP sobre la fosforilación inhibida con NEM (43).

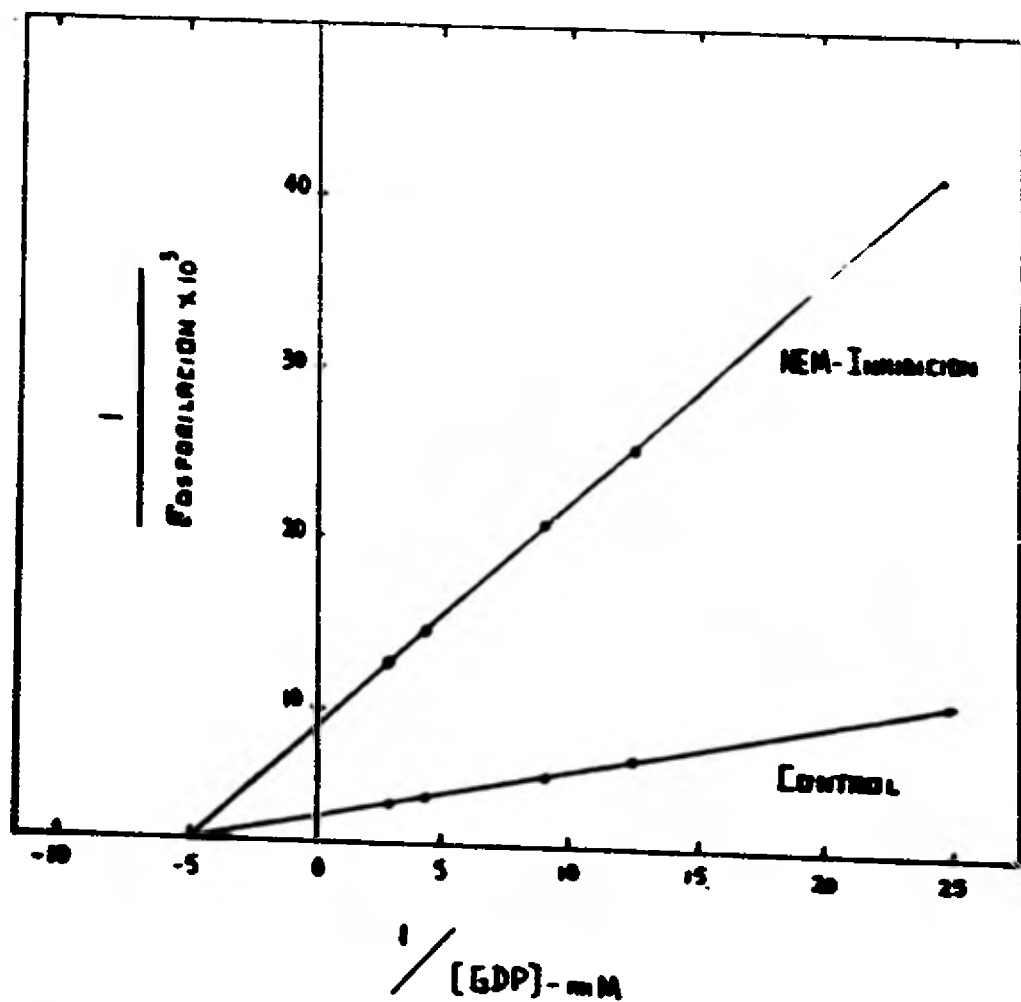


Figura # 26 -- Efecto de la concentración de GTP sobre la fosforilación inhibida con NEM (43).

(10 a 30 M) evitaron parcialmente el desarrollo de la inhibición ocasionada por el NEM, estos nucleótidos fueron efectivos sólo en presencia de Pi o arsenatos ( 1 mM ) (figura # 27).

Los reactivos bifuncionales específicos para grupos SH (O-iodoso benzoato y Bis-dinitropiridina) forman puentes disulfuro de entrecruzamiento, encontrando que inhiben la fosforilación dependiente de la luz (1, 2, 74).

El estudio del O-iodo benzoato (1) reveló que éste reactivo es formador de enlaces intrapéptidos (puentes disulfuro), porque hubo desaparición de 3 a 4 grupos SH cuando se usó o sea, de los 8 grupos presentes normalmente se bloquearon 4: dos correspondientes a la subunidad gamma y dos a la beta. La secuencia de la reacción fue; en la oscuridad reaccionaron dos grupos, cuando se activo con calor los otros dos. Al medirse la actividad de la ATPasa se observó que existe un efecto de inhibición con el bloqueo de los grupos. No hubo ningún efecto sobre la ATPasa-Ca<sup>++</sup> cuando se bloquearon sólo dos grupos (en la oscuridad). En la tabla # 9 se muestra el efecto del O-iodosobenzoato sobre los grupos SH y sobre la actividad de la ATPasa mediante dos experimentos; en el primero el CP1 fue activado con calor en presencia de O-IB mostrando una disminución de 4 grupos SH con respecto a la enzima activada con calor pero sin el reactivo bifuncional suponiendo que estos grupos reaccionan con él, también existió una inhibición del 39% de la actividad del ATPasa-Ca<sup>++</sup>.

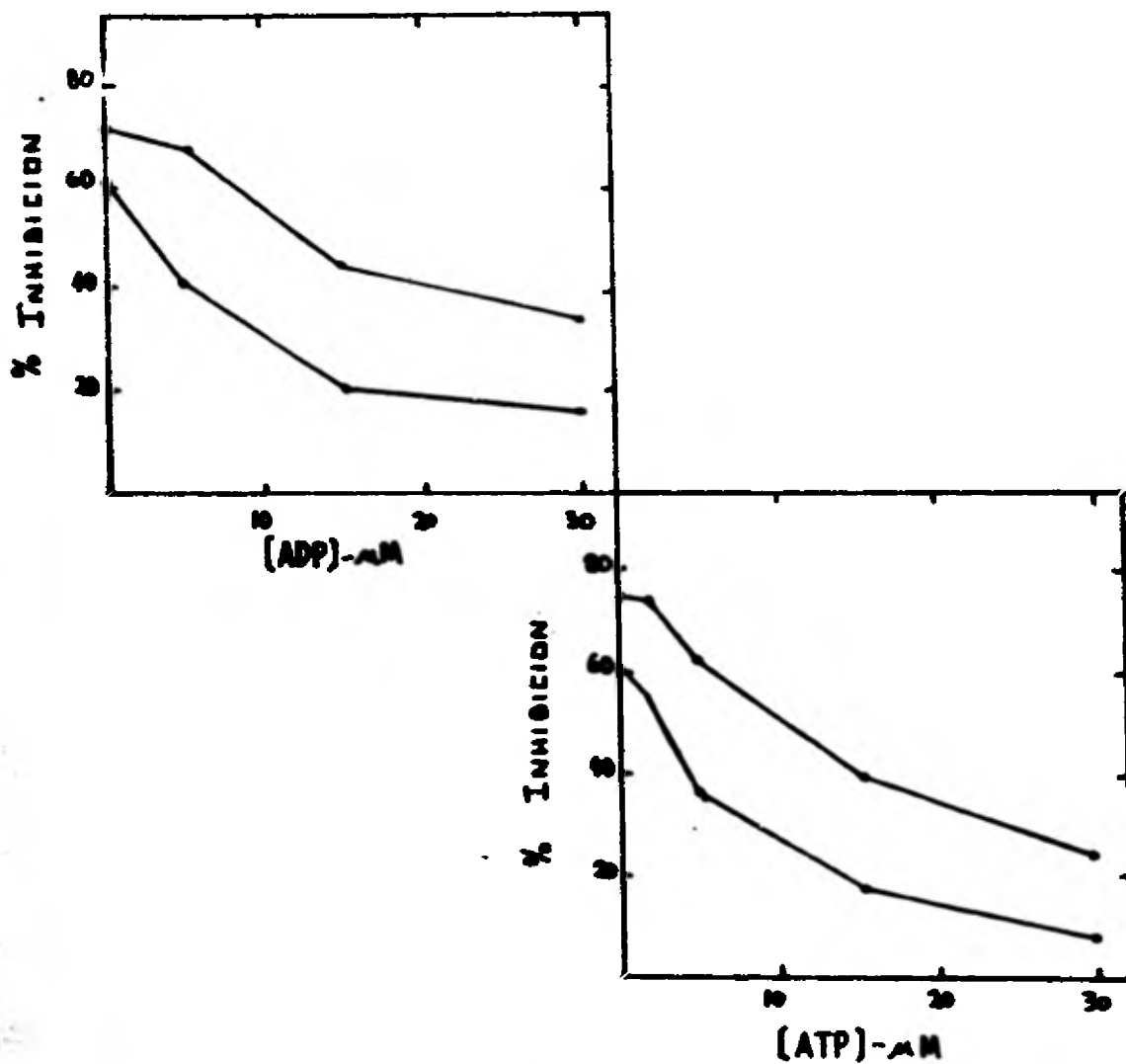


Figura # 27 -- Protección de la fosforilación con ADP o ATP de la inhibición ocasionada por NEM (43).

---

Expt.	Tratamiento del CFl	ATPasa-Ca ( $\mu\text{molPi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	Grupos Sulfhidrilo ( $\mu\text{mol/mol de CFl}$ )	
			A	B
1.-	CFl activado con calor	19.4	..... 7.6	..... 7.8
	CFl activado con calor en presencia de O-IB	12 ( 38% )	3.8	..... 4.3
2.-	CFl-NEM activado con -- calor	20	..... 3.9	..... --
	CFl-NEM activado con -- calor en presencia de -- O-IB	12.8 ( 36% )	2.2	..... --

---

Tabla # 9 .- Efecto del O-Iodocobenzato sobre los grupos SH y --  
sobre la actividad de ATPasa del CFl. Los reactivos utilizados --  
fueron NEM 1mg /ml, O-IB 5 mM . Los grupos sulfhidrilo libres --  
fueron determinados por dos metodos, A Espectrofotometricamente, -  
B Radioquimicamente . El (%) indica el porciento de inhibición -  
( 1 ).

En el segundo, la enzima activada con calor más NEM mostró desaparición de 4 grupos SH sin variación de la actividad de ATPasa y al adicionarle el reactivo (O-IB) desaparición de dos grupos -- más, así como inhibición de la actividad de ATPasa.

Se encontró que los grupos SH accesibles al reactivo se localizan en las subunidades beta y gamma ya que en estos lugares se formaron puentes disulfuro, ello fue detectado por marcación con -- NEM-H<sup>3</sup> y electroforesis con dodecilsulfato de sodio.

El O-IB es uno de los agentes oxidantes más selectivos de grupos SH (74), encontrándosele que evita la síntesis e hidrólisis de -- ATP, además incrementa el transporte de electrones. Los desacoplantes y el ADP + Pi y arsenatos previenen el efecto inhibitorio de la fotofosforilación ocasionado por el O-IB (tabla # 10) - y al mismo tiempo incrementan el transporte de electrones. La reversión de la inhibición se llevó a cabo por una segunda preiluminación en presencia de DTT. El estudio del Bis-dinitropridina en la inhibición de la fosforilación (2) nos indica que el DTNP inhibe la fosforilación en los cloroplastos cuando fueron preiluminados a la luz con el reactivo (figura # 28), la máxima inhibición de cerca del 50% se obtuvo en presencia de pirocianina, MgCl<sub>2</sub> y 0.3 moles de DTNP/mg de clorofila. El DTT y el ADP + Pi - (o arsenatos) y los desacoplantes evitan la inhibición cuando son expuestos a una iluminación previa; floridizina, Dio-19 y dicitrina



Expt.	Adiciones en la fase de pre-iluminación	Fotofosforilación Cíclica ( $\mu$ moles ATP/ mg de clorofila/h)	
		Controles	Cloroplastos tratados con O-IB.
1.-	Ninguna	..... 395	..... 188 (52%)
	20 $\mu$ M ADP	..... 390	..... 275 (29%)
	80 $\mu$ M ADP + 2mM Pi	..... 393	..... 373 ( 9%)
	20 $\mu$ M ATP	..... 394	..... 299 (24%)
	20 $\mu$ M ATP + 2mM Pi	..... 387	..... 390 ( 0%)
	2 mM Pi	..... 393	..... 196 (50%)
2.-	Ninguna	..... 420	..... 250 (40%)
	5mM NH <sub>4</sub> Cl	..... 417	..... 420 ( 0%)
	2 $\mu$ M FCCP	..... 372	..... 355 ( 9%)
	200 $\mu$ M Dicarbim B	..... 358	..... 201 (44%)
	Dio-9 ( 5 $\mu$ g/ml )	..... 346	..... 213 (38%)

Tabla # 10.- Prevención de la inhibición del O-Iodobenzato — por adenin-nucleótidos y desacoplantes. La cantidad utilizada del reactivo ( O-IB ) fue de 2 mM. (74) .

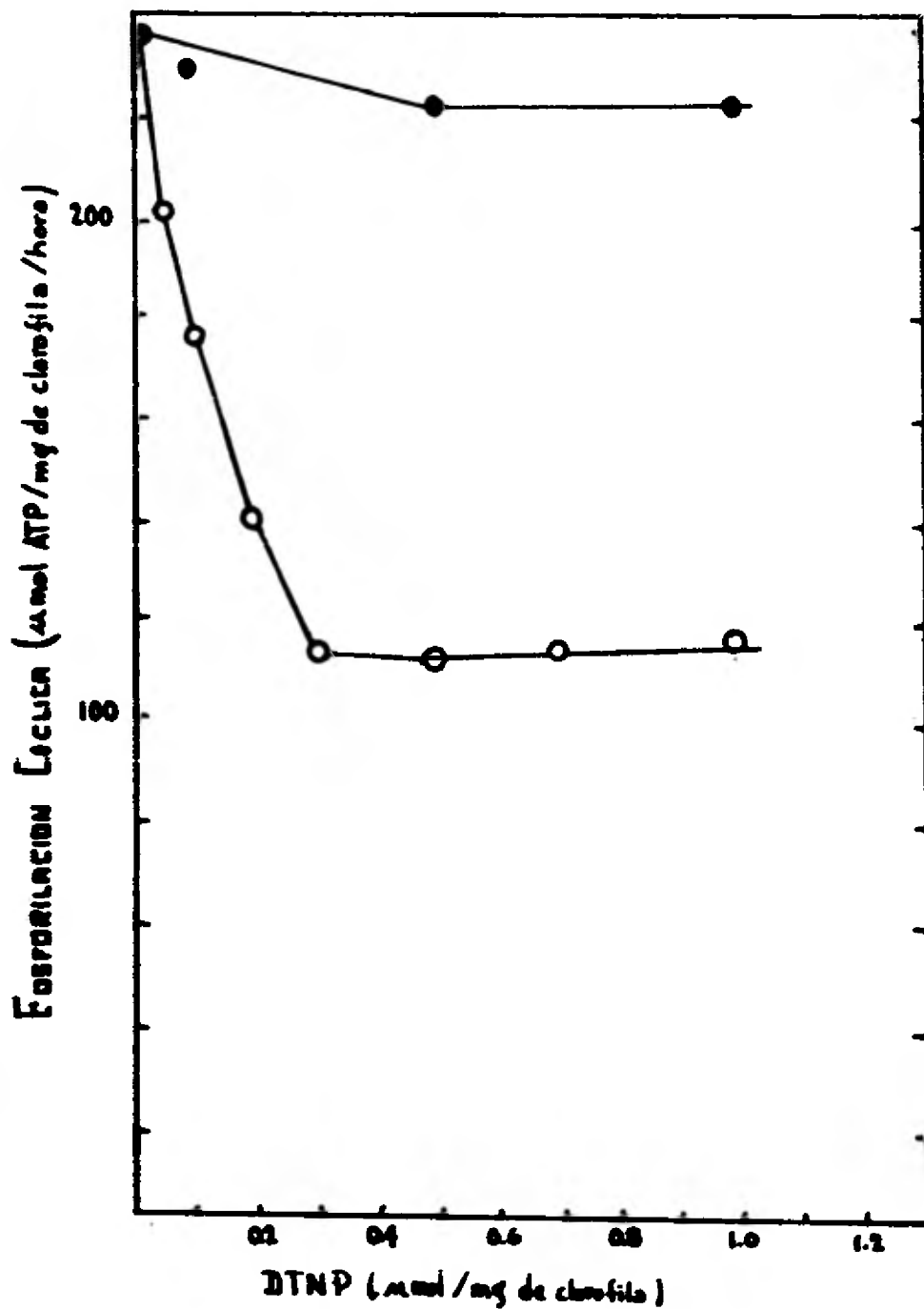


Figura # 26.- Efecto del DTNP en la fotofosforilación cíclica en cloroplastos pretratados a la luz y en la oscuridad.

(○) Luz . (●) oscuridad. ( 2 ) .

B no fueron efectivos (tablas # 11 y 12). La baja concentración de ADP y ATP protege parcialmente dicha inhibición, otros nucleótidos no fueron eficaces. El DTNP inhibe la velocidad de acoplamiento del transporte de electrones al nivel basal, pero no tiene efecto en su desacoplamiento, la estimulación de la captación de protones y la inhibición del transporte de electrones por ATP fue evitada por el DTNP. La actividad de ATPasa estimulada por tripsina y DTT fue inhibida por el DTNP previa incubación con luz. La reversión de la inhibición de la fosforilación por DTNP se obtuvo por una segunda prefluminación en presencia de grupos SH, mayor cantidad de DTNP reaccionó con cloroplastos en la luz que en la oscuridad y dos moles de tiona fueron formados por mol de DTNP desaparecido.

Estos resultados sugieren que la inhibición del DTNP está relacionada con la oxidación de los grupos tioles vecinales por el reactivo, cuando estos grupos son expuestos al ocurrir un cambio conformacional inducido por la luz.

La cantidad de ditioles vecinales reaccionantes en la luz con O-IB fue mayor que cuando se efectuó con DTNP (74). La conclusión obvia es que el cambio conformacional inducido por la luz en la membrana del tilacoide expone SH vecinales pertenecientes a otras proteínas de la membrana. Esta observación está de acuerdo con los hallazgos de McCarty y Fagan (35) en los que hubo

Condiciones de pretratamiento	Fotofosforilación cíclica	
	(μmol ATP / mg de clorofila / h)	
Ocuridad .....		173
Ocuridad + DNP .....		163
Ocuridad + DNP, DTT adicionado antes .		176
Luz .....		164
Luz + DNP .....		75
Luz + DNP, DTT adicionado antes .....		151

Tabla #11 -- Inhibición de la fotofosforilación dependiente de la luz por el DNP. El tiempo de exposición a la luz y en la oscuridad fue de 1 minuto, la cantidad de DNP fue de 0.5 μmol/mg de clorofila y la de DTT fue de 0.5 mL. (2) .

Adiciones durante la preiluminación	Fotofosforilación cíclica	
	( mol ATP/mg de clorofila/h )	( mol ATP/mg de clorofila/h )
	( 0 )	( 0.5 )
Ninguna	313	139 (56%)
2mM ADP; 2mM Pi	300	290 (3%)
2mM ADP; 2 mM de arsenato	314	292 (7%)
2mM Pi	304	148 (51%)
2mM de arsenato	321	187 (42%)
2mM ADP	327	260 (20%)
2mM ATP	313	229 (27%)
5mM NH <sub>4</sub> Cl	313	318 (0%)
2 <sub>μ</sub> M FCCP	323	327 (0%)
Dic-9 (5 <sub>μ</sub> g/ml)	303	156 (48%)
1mM Floridzin	240	110 (54%)
200 <sub>μ</sub> M Discarbine B	303	140 (54%)

Tabla #12.- Efecto protector de la inhibición de la fotofosforilación con DNP por adenin-nucleótidos, desacoplantes e inhibidores (2) . (%) indica el porciento de inhibición.

unión de NEM a otras proteínas del cloroplasto.

En resumen, se sugiere que la oxidación dependiente de la luz de algunos tioles vecinales por dos diferentes reactivos, produce un estado conformacional tal, que previene la síntesis e hidrólisis de ATP. Es improbable que esos ditiolos estén relacionados con el (los) sitio (s) catalítico (s) del CF1, ya que ellos son requeridos para completar la actividad enzimática (74).

En experimentos recientes una maleimida bifuncional que contiene enlace disulfuro, fue sintetizada, esta maleimida (ditiobis-N-etilmaleimida-DTEM-) al igual que otras bifuncionales (o-fenilene-bismaleimida-OFEM-) es 500 veces más efectiva como inhibidores de la fosforilación que las monofuncionales (NEM) (48).

Cuando los tilacoides están en un estado energético (a la luz) el CF1 sufre cambios conformacionales, estos permiten al DTEM entrar al sitio accesible en la oscuridad, así como al sitio expuesto por la luz perteneciente a la subunidad gamma. Esta interacción permite al tilacoide facilitar el escape de protones y de desacoplar la fosforilación. Este desacoplamiento puede ser revertido por el uso de compuestos tioles (ditiotretol, beta mercaptoetanol). La adición de DTT 50 mM restaura la captación de protones y revierte parcialmente la fosforilación (figura # 29), este tiol separa la unión disulfuro producida por el DTEM, permitiendo al CF1 tomar una conformación tal que evite la fuga de protones.

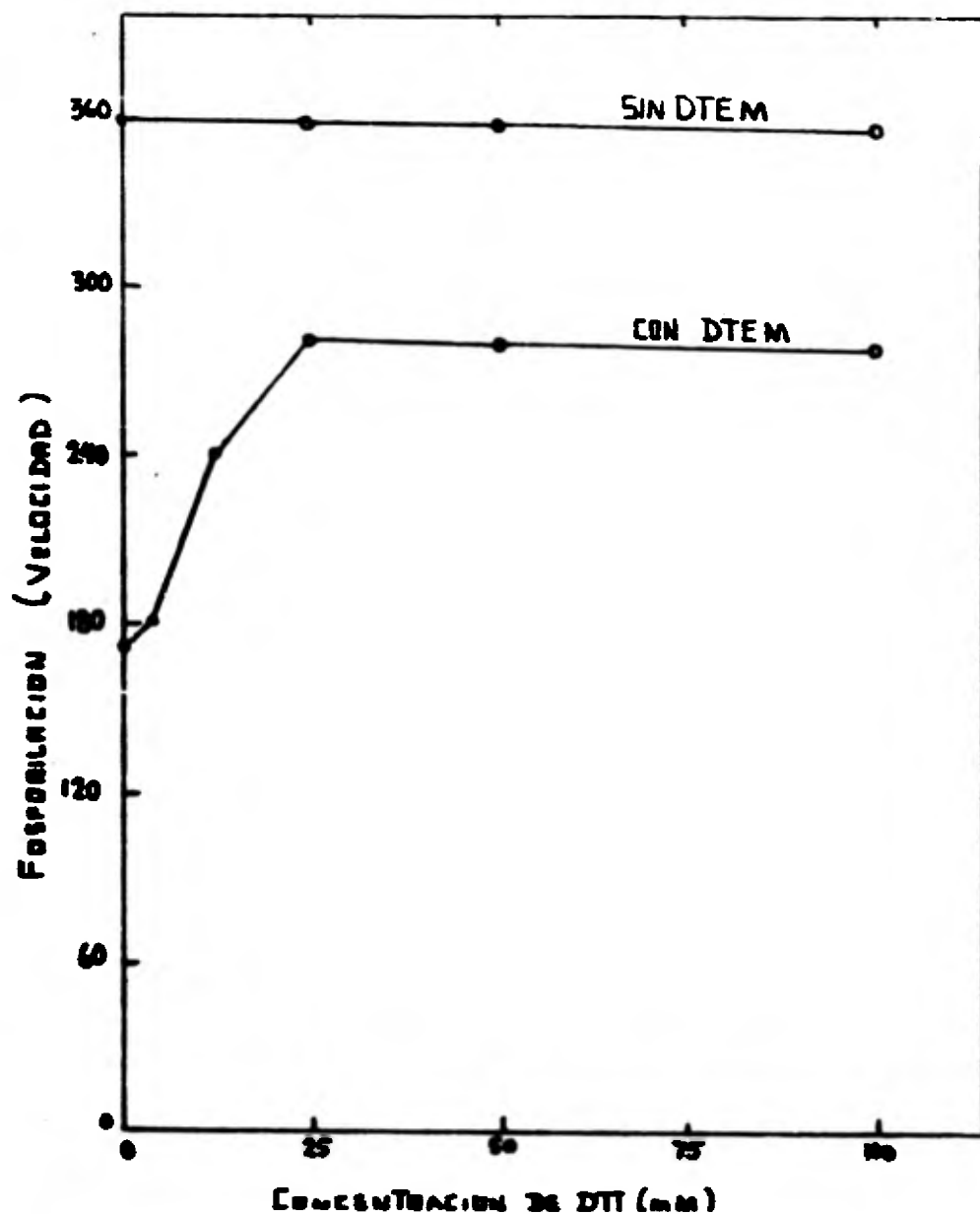


Figura # 29 .- Concentración de ditiotreitól requerida para la reversión de la inhibición de la fosforilación producida por el DTEM (48) .

Una interpretación de lo anterior es mostrada en la figura # 30. Durante el estudio se trató de mostrar que el DTEM une grupos SH en la subunidad gamma del CF1 y que el enlace puede ser bloqueado por altas concentraciones de tioles. Estos resultados sugieren que las uniones son la causa del aumento de la permeabilidad a protones en los tilacoides expuestos a la luz y tratados con maleimidas bifuncionales.

El O-Fenilbebismaleimida (OFEM), debido a su bifuncionalidad, ha sido estudiado como desacoplante e inhibidor de la transferencia de energía (79). El mecanismo como desacoplante es similar al mencionado para el DTEM. La inhibición de la transferencia de energía se efectúa a concentraciones de 100 nM.

El tratamiento previo del tilacoide con el NEM no afecta la inhibición de la fosforilación por el OFEM, mientras que, desacoplantes, ATP + Pi previenen el desarrollo de dicha inhibición.

El hecho de que uniones SH-reactivas bifuncionales modifique la permeabilidad de la membrana a los protones, sugiere un papel para la subunidad gamma, el de transmitir la energía del pH diferencial al sitio activo del CF1 que esta presente en la subunidad alfa o beta.

El enlace de OFEM con la subunidad gamma modifica su estructura de tal forma que permite el escape de protones de el interior del tilacoide a través del complejo ATPasa, impidiendo la síntesis de ATP.



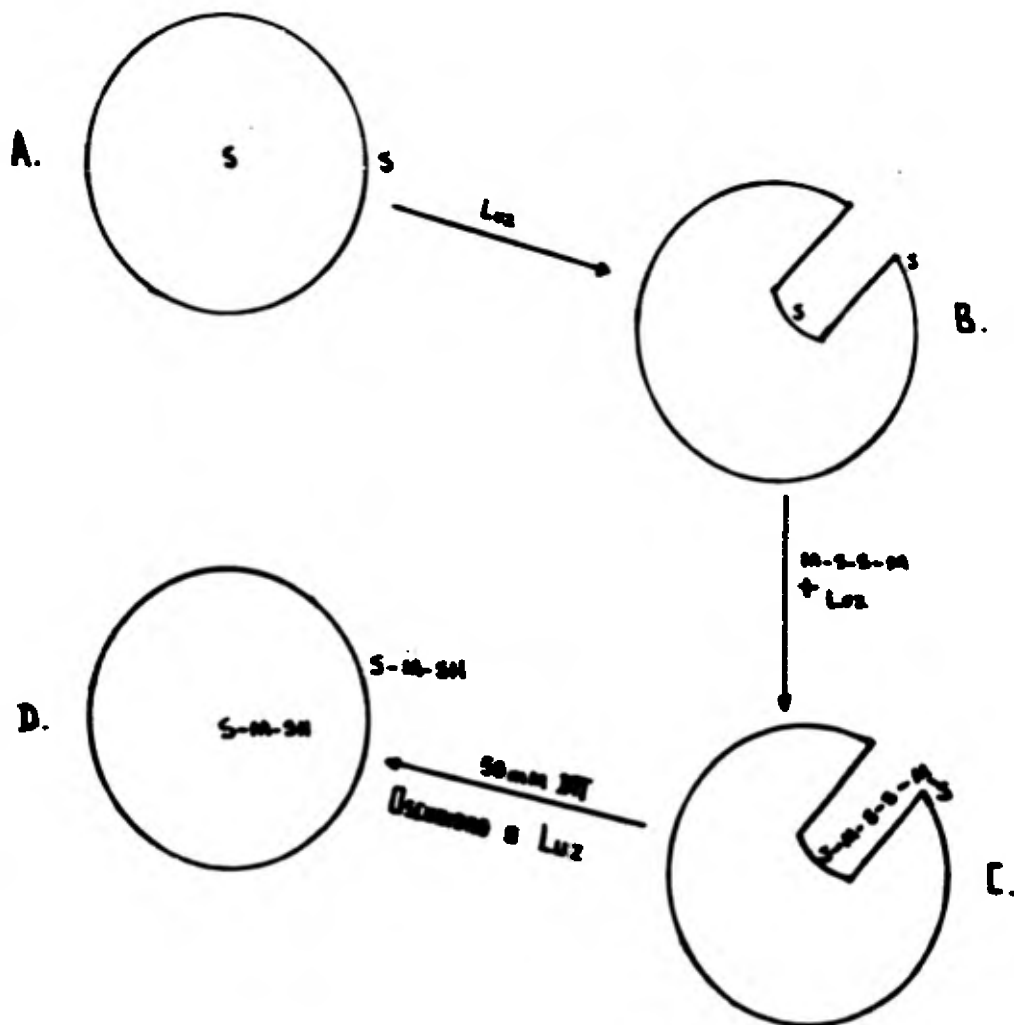


Figura # 30 .- Una interpretación de la inhibición de la fosforilación ocasionada por el DTI y de su reversión. A.- representa - la subunidad gamma del CPD conteniendo dos sitios reactivos para selenidas uno expuesto y otro oculto ( S ). B.-La subunidad gamma en un estado energizado. C.- subunidad unida con el DTI (K-S-S-K) D.- la subunidad gamma despues de que el DTI es desunido por el tiol ( DTI ) ( 48 ).

Una de las más recientes pruebas acerca de la inhibición de la fosforilación, revalora y resume la forma de acción de los reactivos mono y bifuncionales (47). La subunidad gamma del CF1 - contiene dos grupos SH, uno es accesible para actuar en la oscuridad, el otro sólo es expuesto en presencia de la luz. Las modificaciones del grupo accesible a la oscuridad no inhiben la síntesis de ATP, en cambio la interacción del grupo expuesto por la luz causa un tipo de transferencia de energía inhibitoria para la fosforilación. Sin embargo, cuando esos grupos SH son unidos por enlaces disulfuro o reactivos ocurre un desacoplamiento.

Vallejo, Andrew y McCarthy al revaluar al OIB lo reportan como desacoplante cuando los tilacoides son previamente iluminados - (47) (figura # 31-A). El desacoplar la fosforilación del flujo de electrones ocasiona que el transporte de electrones no fosforilante disminuya marcadamente la eficiencia de la fosforilación.

El DTNP fue considerado como desacoplante e inhibidor de la transferencia de energía (47), a bajas concentraciones de reactivo y en presencia de luz se produce el desacoplamiento (figura # 31-B), a altas concentraciones se induce una inhibición de la transferencia de energía (figura # 31-C).

Entre las maleinimid bifuncionales, el DTEM y el OFEM actúan - como reactivos desacoplantes (47) (figura # 32-A), este efecto es causado por la unión con los grupos SH de la subunidad gamma favoreciendo la formación de una hendidura por donde se efectúa la

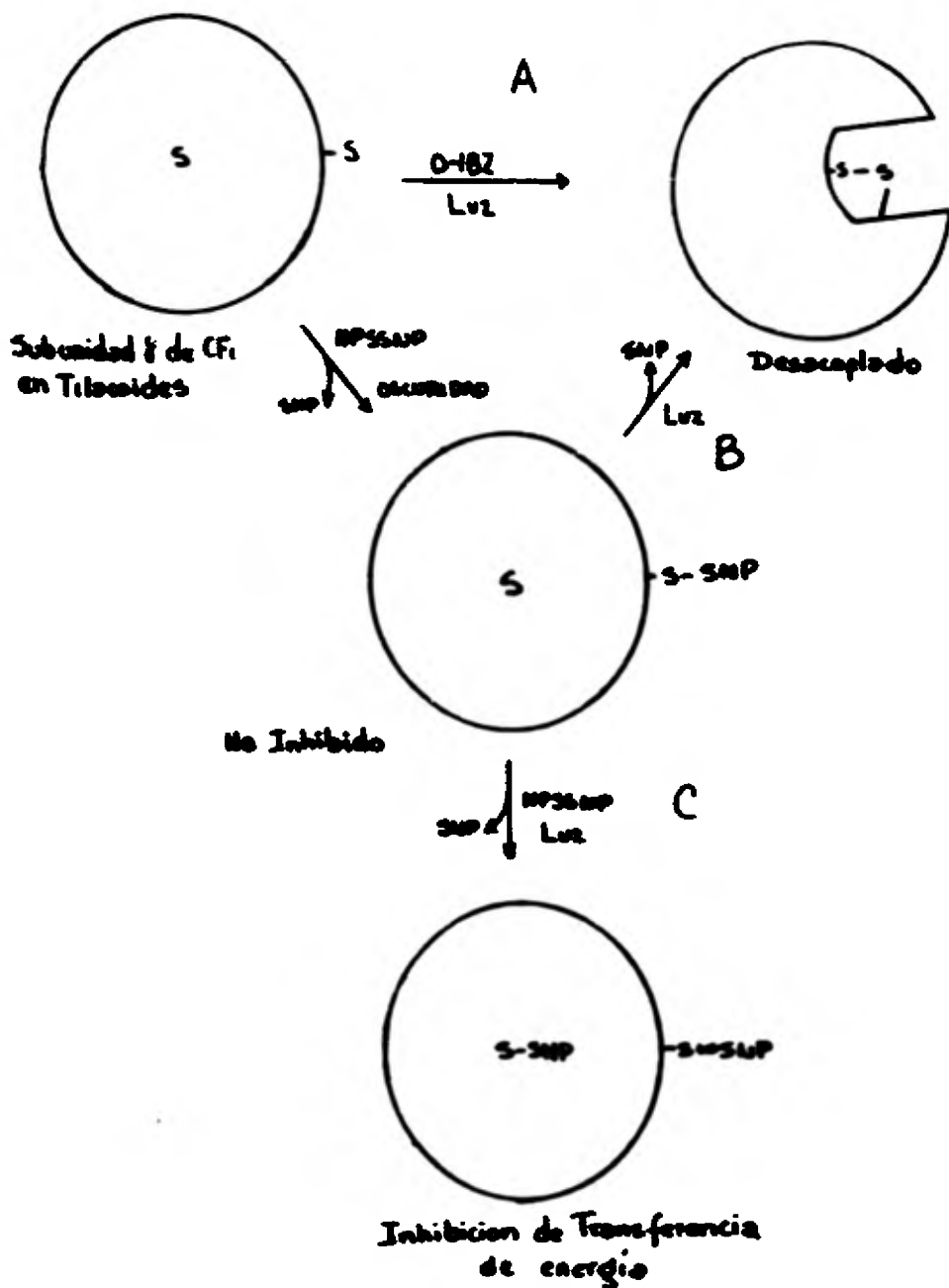


Figura 11 -- Un modelo para la inhibición de la fosforilación-- por O-Iodosobenzato y Ditiobisantropiridina. NPSSMP= ditiobisantropiridina (47) .

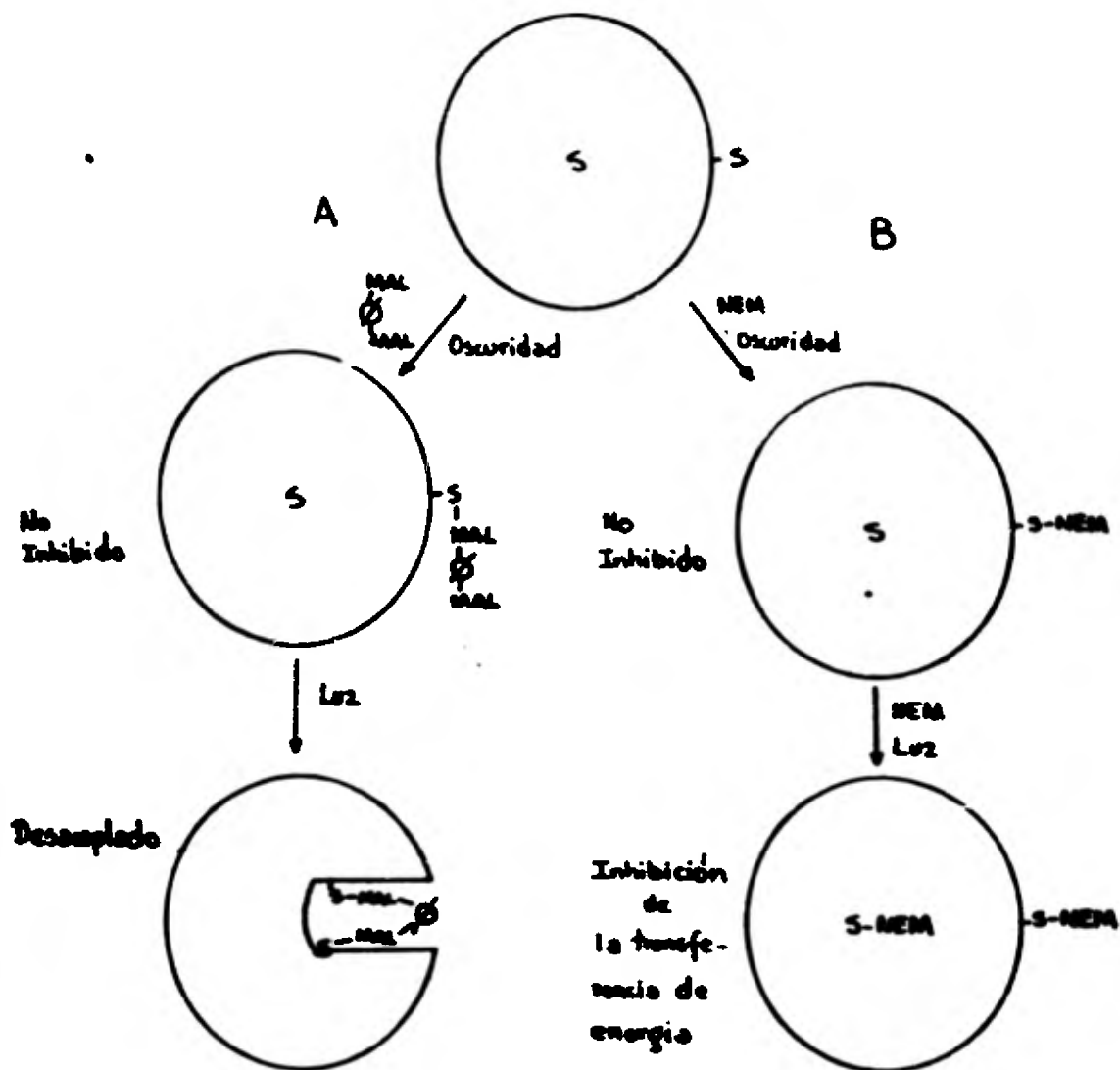


Figura # 32 .- Un modelo para la inhibición de la fosforilación - por malonidas. Mal-φ-Mal  $\leftrightarrow$  DPEM y/o OPEM . MEM- N-etilmaloni- do ( reactivo reconstitucional) (47).

fuga de protones y en esa forma desacoplar la fosforilación de el flujo de electrones. El OFBM actúa también como inhibidor de la transferencia de energía a concentraciones mayores de  $20 \mu\text{M}$  (47).

El NEM, maleimida monofuncional inhibidora de la transferencia de energía (37), mostró reaccionar con el grupo.SH de la subunidad gamma expuesto por la luz y de esta forma ocasionar la inhibición (figura # 32-B). Una propiedad importante de este reactivo es que al reaccionar con el tilacoide en la oscuridad, evita el desacoplamiento que ocasionan reactivos como O-IB, DTNP y DTEM (79).

Se han efectuado múltiples estudios para determinar la existencia y localización de sitio (s) de unión para nucleótidos en el CFI. Así Harris y Slater (22) demostraron que la iluminación promueve intercambio (sensible a ser desacoplado) entre el medio y los nucleótidos unidos y que la mayoría de dichos nucleótidos intercambiables están asociados con el CFI en un sitio que parece localizarse en la subunidad alfa o beta. Los nucleótidos ADP y ATP se intercambian igualmente con ese sitio a una constante de disociación de  $2-5 \mu\text{M}$ . Los tilacoides iluminados en ausencia de ADP o ATP conservan la capacidad de unir nucleótidos en la oscuridad, aún después de que el gradiente de protones decae (42). Posiblemente el intercambio de nucleótidos (dependiente de energía) sea

un reflejo del cambio conformacional del CF1, dando como resultado la exposición del sitio de unión a nucleótidos.

Uno de los estudios más importantes confirmó que existen sitios de unión a nucleótidos en el CF1 (41). El CF1 purificado fue iluminado brevemente en presencia de ATP ( $C^{14}$ ), observando que sostuvo al nucleótido radioactivo firmemente unido; la unión estimulada por la luz, al parecer, fue el resultado de cambios conformacionales (dependientes de energía), dichos cambios fueron revertidos en la oscuridad e hicieron inaccesible el sitio de unión a nucleótidos. El ADP constituyó el 90% del nucleótido unido, su presencia en la enzima sugiere que este sitio de unión tiene una actividad catalítica haciendo que el ATP sea hidrolizado durante la iluminación. El tratamiento con calor del CF1 produjo desplazamiento del nucleótido unido y expuso sitios de unión adicionales, uno de estos sitios caracterizado por una constante de disociación de  $7 \mu M$ , parece corresponder al sitio catalítico de la ATPasa y ser también el sitio del CF1 expuesto por la iluminación. La digestión prolongada del CF1 ocasionó actividad en la ATPasa, así como una pérdida total de las subunidades pequeñas de la enzima (gamma, delta y epsilon), la mayor parte del ADP unido al CF1 se mantuvo en su sitio después del tratamiento con tripsina; por electroforesis se confirmó que los componentes mayores del CF1 (alfa y beta) conteniendo al

ADP, estaban presentes, sugiriendo que alguna de estas subunidades contiene el (los) sitio(s) de unión a nucleótidos.

Sin embargo, algunos resultados indican que el sitio intercambiador de nucleótidos no es un sitio catalítico para la fosforilación (72). El ADP unido es fosforilado más lentamente que el ADP libre del medio, la velocidad de intercambio de nucleótidos es 50 a 100 veces más lenta que la fosforilación. El GDP es fosforilado por el cloroplasto, pero el intercambio es muy pobre, comparado con la fosforilación del ADP, esto nos revela que el proceso responde de diferente manera a nucleótidos análogos modificados en la base adenina.

Algunos autores consideran que no es posible relacionar el sitio intercambiador de nucleótidos con el sitio de unión de los mismos, sin embargo, han observado que el sitio intercambiador tiene cierto parecido al sitio que participa en la estimulación de la captación de protones (35) y en la protección del CF1 a reactivos modificantes.

Los ácidos, el calor y la urea, disocian a los nucleótidos que están unidos a sitios intercambiables del CF1. Cuando los ácidos (pH menor de 2) son utilizados para disociar nucleótidos, el ADP y ATP son liberados con una relación de 1:3. El calor o la urea causan la liberación de ADP exclusivamente (40). Los ácidos conservan unido al ATP o causan su formación a partir de  $ADP + P_i$ .

### III. - FUNCIONES DE LAS SUBUNIDADES DEL FACTOR DE ACOPLAMIENTO.

Diferentes métodos han sido utilizados para dilucidar las funciones de las subunidades del CFI en forma individual, estos incluyen, - pruebas inmunológicas, análisis de resolución y reconstrucción y estudios de inhibición.

Un estudio utilizando pruebas inmunológicas fue realizado por Nelson (52) quien usando suero anti-CFI observó que anticuerpos para las subunidades alfa y gamma inhiben la fosforilación. El suero anti-alfa previno la estimulación de la captación de protones por el ATP. La actividad de ATPasa del CFI soluble fue resistente a cada antisuero utilizado individualmente, pero sensible al suero anti-alfa y anti-gamma juntos.

La digestión prolongada del CFI con tripsina (14) produce una preparación de ATPasa activa, la cual, bajo condiciones disociantes - da una precipitación lineal con suero anti-alfa y anti-beta, pero no con suero de las tres subunidades pequeñas. Las subunidades -- gamma, delta y epsilon fueron digeridas por la tripsina, pero la posibilidad de que fragmentos de dichas subunidades se asocien con las subunidades alfa y beta y así se dificulte su exclusión.

La actividad de la ATPasa es sensible a ser inhibida por el NBD - (14), este reactivo es unido en la subunidad beta del CFI en un sitio cercano al residuo de tirosina. Se ha demostrado que el NBD produce cambios conformacionales importantes que probablemente -



participen en la inhibición de la actividad de ATPasa.

Los cromatóforos de algunas bacterias al ser tratados con LiCl y en presencia de ATP producen la extracción del componente beta de su factor de acoplamiento, así como la disminución de la síntesis e hidrólisis de ATP. La adición de la subunidad beta purificada restaura ambas actividades (58).

Funciones de la subunidad alfa. - Durante el estudio para la localización del sitio de unión a nucleótidos mediante la medición de la transferencia de energía fluorescente usando donadores y aceptores, se concluyó que un sitio de alta afinidad para nucleótidos está localizado en la subunidad alfa del CF1 a 40 Å de la subunidad beta (11) (figura # 16). Por lo anterior se deduce que en esta subunidad es donde se localiza el sitio de unión para nucleótidos.

Funciones de la subunidad beta. - La digestión prolongada del CF1 con tripsina ocasionó una destrucción de las subunidades gamma, delta y epsilon, pero no así de alfa y beta produciendo en ellas una activación de la actividad de ATPasa (41). La actividad de ATPasa puede ser inhibida por bloqueadores de los grupos tirosina de la subunidad beta (14). Se concluye que en esta subunidad se localiza el sitio activo para la hidrólisis y síntesis de ATP (11) (figura #16).

Funciones de la subunidad gamma .- El suero anti-gamma es un potente inhibidor de la fosforilación (73). Las maleimidas monofuncionales inhiben la fosforilación por una reacción específica con la subunidad gamma (37). Las maleimidas bifuncionales DTEM y OFEM unen dos grupos SH en el componente gamma modificando la estructura de la enzima, produciendo aumento de la permeabilidad de la membrana a los protones y así desacoplar la fosforilación (48 , 47). Sin embargo, altas concentraciones de compuestos SH restauran parcialmente la fosforilación y la captación de protones ocasionados por estos reactivos.

En vista de los anteriores resultados se puede concluir que la subunidad gamma interviene en la fosforilación, transmitiendo protones al sitio activo de la síntesis de ATP.

El hecho de que el componente gamma ( junto con delta y epsilon ) sea requerido para bloquear el canal de protones formado por  $F_0$  en las vesículas de fosfolípidos de algunas bacterias termofílicas , está de acuerdo con este concepto ( 85).

Funciones de la subunidad delta .- Esta subunidad participa en la unión del CFI al  $F_0$ , la enzima que carece de este componente está separada de la membrana y su fosforilación desacoplada. La adición de la subunidad purificada al CFI ( el cual carece de esta subunidad ) demostró que la actividad de acoplamiento fue restaurada, - debido a que dicha subunidad facilita la unión del CFI a la membra-

na transformando a la enzima inactiva en un factor de acoplamiento activo. Es importante señalar que la subunidad delta adicionada se encontraba en estado de desnaturalización y que durante la adición pudo haberse renaturalizado; este proceso probablemente fue facilitado por el CFI carente o por la membrana del tilacoide, sirviendo ambos como mediadores de dicho proceso. Tomando en cuenta que la subunidad delta efectúa la conexión entre CFI y la membrana, los protones serán canalizados a través de esta subunidad durante la transducción de energía (53).

Funciones de la subunidad epsilon. - Este componente es considerado como inhibidor de la actividad de ATPasa del CFI (51).

Se ha demostrado que ésta es la única que conserva su actividad *in situ*. Es disociada junto con delta cuando la enzima es calentada en presencia de digitonina. En vista de estos hallazgos y de la sensibilidad de epsilon para con la tripsina y el calor, el mecanismo de la activación de la ATPasa ocasionado por estos factores se puede comprobar. Existen indicios de que la subunidad epsilon interactúa con gamma, aunque la activación de la ATPasa con ticoles no parece causar disociación de la subunidad o activación permanente.

Es importante hacer notar que el inhibidor de la ATPasa mitocondrial no es el componente epsilon. Una función ya demostrada para epsilon en el factor de acoplamiento de *E. coli* es la unión del F1 a la membrana.

Estudios basados en pruebas de entrecruzamiento (4) concluyen que alfa y beta son los componentes más pesados del CF1 y se encuentran en contacto con gamma (que es el centro de la molécula), delta y epsilon. Delta y epsilon están en sitios opuestos de la enzima, delta está alejada de gamma y muy cerca de la membrana, no existe unión epsilon-epsilon pero sí epsilon-gamma (figura # 14).

#### IV. MECANISMO DE LA SINTESIS DE ATP

Se acepta generalmente que la síntesis de ATP en cloroplastos, bacterias y mitocondrias es un proceso conducido por el flujo de protones a través del complejo ATPasa; los estudios para esclarecer el mecanismo de este acoplamiento han ocasionado la formulación de múltiples hipótesis.

El mecanismo formulado por Mitchell (46) indica que los protones son conducidos a través del canal  $F_0$  hacia el sitio activo del  $F_1$ . El  $P_i$  en estado específico de protonación es atacado por dos protones resultando la formación de agua y un fósforo central cargado positivamente. El ataque nucleofílico de este fósforo por el ADP produce ATP. Se asume que dos protones son trasladados por cada ATP formado o hidrolizado, sin embargo, otros autores indican que el complejo ATPasa necesita tres protones para cada ATP (34).

Boyer y Slater (68) propusieron un mecanismo en el cual se producen cambios conformacionales en el factor de acoplamiento-ATPasa, sugiriendo que el intercambio de  $O^{18}$  entre agua y  $P_i$  que acompaña

a la hidrólisis de ATP en la mitocondria no es apto a ser desacoplado. Si este intercambio es relacionado a la hidrólisis y corrige de ATP unido, estos resultados indicarían que la formación de fosfato anhidro unido al ATP no es una fase que requiera gran energía en la fosforilación oxidativa. La liberación del ATP formado, más que su síntesis, es la fase que requiere más energía. Los cambios conformacionales en el F1 unido de algún modo a la translocación de protones proporcionan la energía necesaria para la disociación del ATP unido.

Slater (68) encontró que se requiere primeramente un gasto de energía en la oxidación y fosforilación fotosintética para la disociación del ATP del complejo ATPasa, ello fue basado en los hallazgos de que el factor de acoplamiento contiene nucleótidos unidos y que el intercambio de la unión a nucleótidos es dependiente de energía.

Se sugiere que una fosfoenzima intermedia puede estar participando en el mecanismo de la translocación de protones a la ATPasa (62). La unión de  $Mg^{++}$  al CFI produce cambios conformacionales los cuales ocasionan la formación de un intermediario fosforilado. La translocación de protones a través de la membrana disminuye el gradiente de protones desplazando al  $Mg^{++}$  unido; el ATP es formado y el factor de acoplamiento se encuentra en condiciones de volver a unir  $Mg^{++}$ .

## CONCLUSIONES

El factor de acoplamiento de cloroplastos (CFI) purificado y separado, tiene un peso molecular de 325,000, por electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS se encontró que contiene cinco subunidades de nominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  de acuerdo con su decreciente peso molecular. Los estudios con microscopía electrónica han demostrado que el CFI solubilizado tiene forma esférica y un diámetro de  $90 \text{ \AA}$  aproximadamente.

Para determinar la real estequiometría del CFI se han utilizado múltiples métodos. Por reacciones de entrecruzamientos químicos se dejó la estequiometría más aceptada en la actualidad que es  $2\alpha$ ,  $2\beta$ ,  $1\gamma$ ,  $1\delta$  y  $2\epsilon$ , durante este estudio se identificaron "agregados" formados por uniones covalentes entre subunidades, los cuales fueron separados e identificados con respecto a su composición. Los reactivos químicos utilizados fueron básicamente del tipo bifuncional ( $F_2$ DNB, DMS, DTP).

La determinación de grupos SH en el CFI purificado y sin activación indica que contiene 2 grupos, activado con calor 4, desnaturalizado con urea 8 y al romper los enlaces disulfuro con DTT se localizaron de 12-13 grupos SH/mol de CFI. La identificación de estos grupos por subunidades revela, 4 en  $\alpha$ , 4  $\beta$ , 3  $\gamma$  y 1 en  $\epsilon$ , no se encontraron grupos SH en delta. De los 12 grupos, 8 se encuentran libres y 4 participan en la formación de dos puentes disulfuro, uno en la

subunidad beta y otro en gamma.

Con la técnica de transferencia de energía fluorescente se identificaron los sitios para la unión a nucleótidos (ADP y ATP) y sus análogos ( $\epsilon$ -ADP,  $\epsilon$ -AMP-PNP), encontrando que los de alta afinidad a estos grupos se localizan en la subunidad alfa, los sitios para unir nucleótidos de baja afinidad en beta, en esta última subunidad también se determinó un sitio activo para la hidrólisis y síntesis de ATP. Utilizando el mismo método se demostraron las distancias entre sitios específicos de las subunidades; a partir de gamma (NBPM-Cis) y empleando reactivos monofuncionales (NBPM y DDPM) específicos para grupos SH, encontraron que del sitio de alta afinidad a nucleótidos en alfa ( $\epsilon$ -ADP) al sitio NBD-Tir de la subunidad beta existen 40 Å, de gamma (NBPM-Cis) a alfa ( $\epsilon$ -ADP) más de 40 Å, de gamma (NBPM-Cis) a beta (NBD-Tir) de 34-41 Å.

El CFI purificado tiene una actividad latente de ATPasa que puede ser manifestada por el tratamiento con calor, tripsina e incubación con compuestos tioles, la subsecuente remoción de los tioles con columna de sefadex resulta en la inhibición de la actividad de ATPasa sin restauración de la actividad de acoplamiento. La actividad fue determinada por la hidrólisis de ATP y su consecuente liberación de Pi. La digestión de la enzima con tripsina determinó que es en la subunidad alfa o beta donde se localiza la actividad de ATPasa.

Las bajas concentraciones de cationes divalentes aumentan la activi

dad de ATPasa del CFI tratado con calor, altas concentraciones de ATP o de cationes inhiben esa actividad.

El aparato enzimático de la membrana del cloroplasto (CFI-F<sub>0</sub>) tiene como objetivo acoplar el flujo de protones del interior al exterior del tilacoide para la síntesis de ATP. Uno de los componentes hidrofóbicos del complejo enzimático perteneciente a la membrana (F<sub>0</sub>) funciona como canal de protones, los otros elementos participan en la unión de la enzima a la membrana. El EDTA es utilizado para separar el CFI de la membrana dejando libre el canal de protones, el DCCD bloquea dicho canal, además de inhibir la actividad de ATPasa en el CFI unido, no tiene efecto en el CFI aislado.

La iluminación del cloroplasto cataliza la formación de ATP, y en presencia de compuestos sulfhídrico aumenta la actividad de ATPasa no inhibiendo la fotofosforilación. El desacoplamiento de la fotofosforilación inhibe la actividad de la ATPasa e induce cambios conformacionales.

NEM o Iodoacetamida (IA) inhiben la activación del CFI por calor - pero no por tripsina, la actividad catalítica de la enzima no fue afectada por la presencia de IA. La actividad de acoplamiento no fue inhibida por el NEM o IA. Estos hallazgos sugieren que los grupos SH pueden interactuar con IA, participando en el proceso de activación con el calor pero no en la actividad catalítica. Se concluye que la conversión de ATPasa latente a activa representa un cambio con-



formacional vía intercambio de sulfuros y que la actividad de acoplamiento y la activación de la ATPasa son dos procesos independientes. Los cambios conformacionales son sensibles al pH del medio, concentración de ADP y ATP y a la magnitud de  $\Delta$  pH, estos cambios controlan la velocidad del flujo de electrones. Debido a que los cambios requieren energía es lógico pensar que la fosforilación se encuentre afectada. El aumento en la captación de  $H^+$  y la síntesis de ATP alteran la conformación del CFI en el sitio de unión a nucleótidos. El NEM ocasiona una inhibición parcial permanente de la fosforilación debido a su interacción con grupos SH de la subunidad gamma expuestos por la luz (son utilizados para la actividad enzimática). - Esta inhibición puede evitarse con el uso de desacoplantes y bajas - concentraciones de ADP o ATP. La oxidación por la luz de algunos tioles vecinales del CFI ocasionada por reactivos como O-IB y DTNP produce cambios conformacionales que evitan la síntesis e hidrólisis de ATP, ello puede ser revertido por una segunda pre-iluminación en presencia de compuestos tioles.

La unión de maleimidas bifuncionales (DTEM ó OFEM) a los grupos SH del CFI expuestos por la luz produce formación de unión disulfuro y cambios conformacionales que facilitan la salida de protones y desacoplan la fosforilación, este desacoplamiento puede evitarse con el uso de compuestos tioles ya que rompen la unión disulfuro y restauran la configuración normal del CFI.

Los sitios de unión a nucleótidos fueron detectados cuando la iluminación produjo unión de nucleótidos al CF1, específicamente en la subunidad alfa. Estos sitios parecen actuar como interruptores conformacionales alostéricos para la actividad de ATPasa- $\text{Ca}^{++}$ . La unión estimulada por la luz fue resultado de cambios conformacionales que pudo ser revertida en la oscuridad, haciendo inaccesibles los sitios de unión a nucleótidos.

Las funciones de las subunidades del CF1 son: alfa para unir nucleótidos, beta hidrolizar y sintetizar ATP, gamma intervenir en la fosforilación transmitiendo protones, delta uniendo al CF1 a la membrana y epsilon inhibir la actividad de ATPasa.

Se concluye que la síntesis de ATP en cloroplastos es un proceso llevado a cabo por el flujo de protones a través del complejo ATPasa. Actualmente se realizan estudio con otros métodos entre los que se cuentan la microfotografía electrónica, análisis de difracción de Rayos X, y espero que los datos aquí recopilados estén de acuerdo con los de resultados que en el futuro sean obtenidos.

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

1. - Andreo, C.S., Ravizzini, R.A., Vallejos, R.H.; *Biochim. Biophys. Acta* 547:370-379 (1979).
2. - Andreo, C.S., Vallejos, R.H.; *Biochim. Biophys. Acta* 423; 590-601 (1976).
3. - Avron, M.; *Biochim. Biophys. Acta* 77:699-702 (1963).
4. - Baird, B.A., Hammes, G.G.; *J. Biol. Chem.*; 25, 22:6953-6962(1976).
5. - Berg, H.C., Diamond, J. M., Marfey, P. S.; *Science*; 150:64(1965).
6. - Binder, A., Jagendorf, A. T.; *J. Biol. Chem.*; 253:3094-3100 (1978).
7. - Brooks, B. R., Klamerth, O. L.; *Eur. J. Biochem.*; 5:178 (1966).
8. - Carmell, C., Racker, E.; *J. Biol. Chem.*; 248:8287 (1973).
9. - Cantley, L. C., Hammes, G. G.; *Biochemistry*; 14:2968-2975 (1975).
10. - Cantley, L. C., Hammes, G. G.; *Biochemistry*; 1-8 (1976).
11. - Cantley, L. C., Hammes, G. G.; *Biochemistry*; 9-14 (1976).
12. - Carmell, C.; *FEBS. Lett.* 7:297-300 (1970).
13. - Davies, G. E., Stark, G. R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 66:651 (1970)
14. - Deters, D. W., Racker, E., Nelson, N., Nelson, H.; *J. Biol. Chem.*; 250: 1041-1047(1975).
15. - Farron, F., Racker, E.; *Biochemistry*; 9:3829-3836 (1970).
16. - Farron, F.; *Biochemistry*; 9:3832-3828 (1970).
17. - Fasold, H.; *Biochemistry*; 342:288 (1965).
18. - Förster, T.; *Discuss. Faraday Soc.*; 27:7 (1959).
19. - Garber, M.P., Steponkis, P.L.; *J. Cell. Biol.*; 63:24-34(1974).

20. - Giese, A. ;Fisiología Celular, Edit. Interamericana, Cap. 19 (1975).
21. - Girault, G. , Galmiche, J. M. ;Biochemistry;77:501-510 (1977).
22. - Harris, D. A. , Slater, E. C. ;Biochim. Biophys, Acta 387:335-348(1975).
23. - Hatman, F. C. , Wold, F. ;Biochemistry;6:2439(1967).
24. - Herzig, D. J. , Rees, A. W. , Day, R. A. ;Biopolymers;2:349 (1964).
25. - Hill, R. , Bendall, F. ;Nature, London;186:136 (1960).
26. - Hinkle, P. C. , MacCarty, R. E. ;Como Fabrica ATP la Célula, Investigación y Ciencia, Depto. de Bioquímica Facultad de Medicina. U N A M, México, D. F. (1970).
27. - Hochman, Y. , Carmell, L. A. ; FEBS. Lett. 61:255-259 (1976).
28. - Jagendorf, A. T. , Avron, M. ;J. Biol. Chem. ;231:277 (1958).
29. - Jagendorf, A. T. , Smith, J. B. ;Plant. Physiol. ;37:135-141 (1962).
30. - Lehninger, A. L. ;Bioenergetics, 2nd. ed. , W.A. Benjamin, Inc. Cap. 6, New York, (1975).
31. - Lein, S. , Racker, E. ;Methods Enzymology; 23:547-555 (1971).
32. - Lein, S. , Berzborn, R. J. , Racker, E. ;J. Biol. Chem. ;246:3520-3524(1972).
33. - MacCarty, R. E. ;Annual Review Plant Physiology. ;30:79-104 (1979).
34. -MacCarty, R. E. ;Curr. Top. Bioenerg. ; 7:245-278 (1978).
35. - MacCarty, R. E. , Fagan, J. ;Biochemistry;12:1503-1507 (1973).
36. - MacCarty, R. E. , Fuhrman, J.S. , Tsuchiya, Y. ;Proc. Natl. Acad. Sci. - USA. ; 68, 10:2522-2526(1971).
37. - MacCarty, R. E. , Pittman, P. R. , Tsuchiya, Y. ;J. Biol. Chem. ;247:3048-3051 (1972).

38. - MacCarty, R. E., Racker, E. ; J. Biol. Chem. ; J. Biol. Chem. ;242:3435-3439(1967).
39. - MacCarty, R. E., Racker, E. ; J. Biol. Chem. ;243:129-137(1968).
40. - Magnusson, R. P., MacCarty, R. E. ; J. Bio. Chem. ;251:6874-6877(1976).
41. - Magnusson, R. P., MacCarty, R. E. ; Blochim. Biophys. Research Communications. ; 70, 4:1283-1290(1976).
42. - Magnusson, R. P., MacCarty, R. E. ; J. Biol. Chem. ;251:7417-7422(1976).
43. - Magnusson, R. P., MacCarty, R. E. ; J. Biol. Chem. ;250:2593-2598(1975).
44. - Marfey, P. S., Nowak, H., Uzie, I. M., Yohannis, D. A. ; J. Biol. Chem. ; --240:3264 (1965).
45. - Mitchell, P. ; Nature;191:144-148(1961).
46. - Mitchell, P. ; FEBS. Lett. 43:189-194(1974).
47. - Moroney, J. V., Andreo, C. S., Vallejos, R. H., MacCarty, R. E. ; J. Biol. Chem. ;255, 14:6670-6674(1980).
48. - Moroney, J. V., MacCarty, R. E. ; J. Biol. Chem. ;254, 18:8951-8955(1979)
49. - Moudrianakis, E. N., Tiefert, M. A. ; J. Biol. Chem. ;251:7796-7801 (1976).
50. - Nelson, N., Deters, D. W., Nelson, H., Racker, E. ; J. Biol. Chem. ; 248:2049-2055 (1973).
51. - Nelson, N., Nelson, H., Racker, E. ; J. Biol. Chem. ;247:7657-7662-(1972).
52. - Nelson, N., Eytan, E., Notsani, B. E. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. ;74:2575-2578 (1977).
53. - Nelson, N., Karny, O. ; FEBS. Lett. 1, 70:249-253(1976).
54. - Nelson, N., Nelson, H., Racker, E. ; J. Biol. Chem. ;247:6506-6510(1972).

55. - O'Keefe, D. P., Dilley, R. A. ; *Biochim. Biophys. Acta* 461:48-60(1977).
56. - Ozawa, H. ; *J. Biol. Chem. (Tokyo)*;62:419 (1967).
57. - Ozawa, H. ; *J. Biol. Chem. (Tokyo)*;62:531(1967).
58. - Philosoph, S., Binder, A., Gromet-Elhanan, Z. ; *J. Biol. Chem*;252:8747-8752 (1977).
59. - Portis, A. R. Jr., Magnusson, R. P., MacCarty, R. E. ; *Biochem. Biophys. Res. Commun*;64:877-884 (1975).
60. - Posorake, L., Jagendorf, A. T. ; *Arch. Biochem. Biophys*;177:276-283 (1976).
61. - Kabinowitch, and Gavindkee, ; *Photosynthesis, Edit. Willey Cap. 17, -- ppl07, New York (1969).*
62. - Racker, E. ; *Ann. Rev. Biochem.* ;46:1006-1014(1977).
63. - R. Andreu, J. M., Warth, R., Muñoz, E. ; *FEBS. Lett.* 86:1-5 (1978).
64. - Racker, E., Hauska, G. A., Lein, S., Berzborn, R. J., Nelson, N. ; *Proc. Int. Congr. Photosynth. 2nd. Stresa. pp. 1097-1113(1971).*
65. - Rumberg, B., Reinwald, E., Schröder, H., Siggel, U. ; *Prog. in Photosynthesis Research. Vol. III:1374-1382 (1969).*
66. - Ryre, I. J., Jagendorf, A. T. ; *J. Biol. Chem.* ; 247:4453-4459(1972).
67. - Senior, A. E., ; *The Mitochondrial ATPase, In. Membranes Proteins Energy Transduction. Ed. Capaldi, R. A., Dekk, M. . (en impresión).*
68. - Slater, E. C. ; *Ann. Rev. Biochem.* ;46:1015-1026(1977).
69. - Singer, S. J., Nicholson, L. G. ; *Paabs. Rev.* ;2, 3-4:699-510 (1973)
70. - Smiley, R. A., Arnold, C. ; *J. Org. Chem.* ,25:257(1960).

71. - Strayer, L. ;Biochemistry, W.H. Freeman and Co., Cap. 19, San -  
Francisco (1975).
72. - Strotmann, H., Bickel-Sandkötter, S. ;Biochim. Biophys. Acta 400:126 -  
135 (1977)
73. - Tiefert, M. A., Roy, H., Moudrianakis, E. N. ;Biochemistry;16:2396-  
2404(1977).
74. - Vallejos, R. H., Andreo, C. S. ; FEBS. Lett. 61:95-99 (1976).
75. - Vambutas, V. K., Racker, E. ;J. Biol. Chem. ;240:2660-2067(1965).
76. - Vander-Meulen, D. L., Govindkee;Eur. J. Biochem;78:585-598(1977).
77. - Ville, Claude, Biología, Edit. Interamericana Cap. 7 México, D. F.  
(1979)
78. - Weber, K., Osborn, N. ;J. Biol. Chem. ;244:4406-4412(1969).
79. - Weiss. M. A., MacCarty, R. E. ; J. Biol. Chem. ;252. 22:8001-8012(1977).
80. - Winget, G. D., Kanner, N., Racker, E. ; Biochim. Biophys. Acta
81. - Witt, H. T. ;Quant. Rev. Biophys, ;4:365(1971).
82. - Wold, F. ;J. Biol. Chem. ;236:106(1961).
83. - Wold, F. ;Methods Enzimology;25:623-651(1972).
84. - Wolf, B., Lessaw-Reichman, M. E. ;Eur. J. Biochem. ;13:519(1970)
85. - Yoshida, M., Giamoto, H., Sone, N., Hirata, H., Kagawa, Y. ;Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA. ;74:936-940(1977).
86. - Younis, H., Winget, G. D., Becker, E. ;J. Biol. Chem. ;252:1814-1818(1977)
87. - Zahn, H. ;Abstr. 6th, Int. Congr. Biochem (1964).
88. - Zahn, H. Meisenhofer, J. ;Makromol. Chem. ;26:126(1958).