

1ej
4

POSIBLES DIFERENCIAS EN LA MAGNITUD DEL COMPONENTE ELECTRICO
($\Delta\psi$) REQUERIDO PARA LA SINTESIS DE ATP Y EL RECAMBIO ATP-PI
EN CROMATOFOROS DE Rhodospseudomonas sphaeroides.

Tesis que para obtener el grado de Licenciada en Investigación
Biomédica Básica presenta María del Carmen López Segovia.

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Bioenergética
del Instituto de Fisiología Celular bajo la dirección del Dr.
Gabriel Drayfus Cortés.

UNAM

MÉXICO, D.F. 1966



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

" INDICE "

I) INTRODUCCION

I.1 LAS BACTERIAS FOTOSINTETICAS.

I.1.A. Generalidades.

1. Características de las cianobacterias.
2. Diferencias entre bacterias verdes y púrpuras.
3. Características de las bacterias púrpuras.

I.1.B. Tipo de preparación de membranas.

I.2 TRANSPORTE DE ELECTRONES EN BACTERIA FOTOSINTETICA.

I.2.A. Pigmentos fotosintéticos.

I.2.B. Transferencia de electrones.

1. El Complejo Centro de Reacción.
2. El Complejo Ubiquinona-Citocromo c Oxidoreductasa.

I.3 TRANSDUCCION DE ENERGIA EN BACTERIAS FOTOSINTETICAS.

I.3.A. La transducción de energía.

1. Hipótesis Química.
2. Hipótesis Químico-mecánica.
3. Hipótesis Conformational.

I.3.B. Iones y desacoplantes.

I.3.C. Gradiente eléctrico y osmótico en bacterias fotosintéticas.

I.3.D. Gradiente de H^+ y su relación con la síntesis de ATP.

I.4 LA ATP SINTETASA.

I.4.A. Localización.

I.4.B. Estructura.

I.4.C. Actividad.

I.4.D. Reacciones que cataliza la ATP sintetasa.

1. Reacciones totales.
2. Reacciones parciales.
3. Hidrólisis de PP_i dando lugar a síntesis de ATP.

I.5. OBJETIVOS DE LA TESIS

II) MATERIALES Y METODOS

- II.1. CRECIMIENTO DE BACTERIAS
 - II.1.A. Medio sólido.
 - II.1.B. Medio líquido.
- II.2. SIEMBRA DE BACTERIAS
- II.3. COSECHA DE BACTERIAS
- II.4. OBTENCION DE CROMATOFOROS
- II.5. DETERMINACION DE BACTERIOCICLOROFILA
- II.6. DETERMINACION DE PROTEINA
- II.7. PURIFICACION DE PCCP
- II.8. SINTESIS DE ATP MARCADO EN LA POSICION [γ - 32 P-ATP]
- II.9. CUANTIFICACION DE LA SINTESIS DE ATP, EL RECAMBIO ATP-PI Y LA HIDROLISIS DE ATP POR MEDIO ISOTOPICO
- II.10. MEDICION DEL POTENCIAL DE MEMBRANA ($\Delta\psi$) POR MEDIO DEL CAMBIO DEL CAROTENO

III) RESULTADOS Y DISCUSION

- III.1. CRECIMIENTO DE BACTERIAS Y ESPECTRO DE ABSORCION
- III.2. CARACTERIZACION DE LAS REACCIONES DE FOTOFOSFORILACION, RECAMBIO ATP-PI E HIDROLISIS DE ATP
 - III.2.A. Reacción de fotofosforilación.
 - III.2.B. Reacción de recambio ATP-PI.
 - III.2.C. Efecto del ADP en el recambio ATP-PI
 - III.2.D. Curvas temporales en el recambio ATP-PI y hidrólisis de ATP.
- III.3. CAMBIO DE ABSORBENCIA DEL CAROTENO
 - III.3.A. Curvas de inhibición por medio de la generación de potencial de difusión.
 - III.3.B. Efecto de tiempo de exposición a la luz sobre el cambio del caroteno.
 - III.3.C. Efecto de la concentración de ATP en la generación del $\Delta\psi$
- III.4. SENSIBILIDAD AL DESACOPLANTE PCCP
 - III.4.A. Sensibilidad del PCCP sobre las reacciones de fotofosforilación y recambio ATP-PI.
 - III.4.B. Sensibilidad del PCCP sobre el cambio del caroteno

IV) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

V) REFERENCIAS

ABREVIATURAS

Ac: acetato

ADP: adenosina 5' difosfato

7 Ac: 7-amino acridina

ANS: ácido anilino-naftaleno sulfónico

ATP: adenosina 5' trifosfato

BCL: Lactaricocitina

BF: bacteriofosfitina

BGG: albúmina de suero de bovino

°C: grados centígrados

CR: centro de reacción

Cit: citocromo

DCCB: dietilacetilcarbodimida

DNP: 2,4-dinitrofenol

D.O.: densidad óptica (absorbencia)

$\Delta\psi$: potencial eléctrico de membrana

$\Delta\mu$: potencial químico de membrana (gradiente transmembranal de

μH)

EDTA: ácido etilén diamino tetraacético

$\Delta\bar{\nu}$: fuerza protón mol. lit

FCCP: cloruro de fluorocarbonilfenilhidrazona

F₀: porción memb. anal. de la ATP sintetasa

F₁: porción soluble de la ATP sintetasa

H⁺: protón

K⁺: potasio

LEAO: N,N-óxido de dimetil-dodecilamina

m: pendiente de una recta ($y = ma + b$)

NES: Acido 2-(N-etilpiridil) etanosulfónico

Hg⁺⁺: mercurio

nm: nanómetros

OTCP: proteína que confiere sensibilidad a oligomicina

Oligo: oligomicina

PEP: fosfoenol piruvato

PM: piruvato cinasa

PM: peso molecular

PI: fosfato inorgánico

SDS: dodecil sulfato de sodio

TCA: Acido tricloroacético

Tris: tri-(hidroximetil) aminometano

T₄D: tetrafenilboro

UHDET: 3-(indolil-3-hidroxi)-4,7-dioxabenzotiazol

UQ: ubiquinona

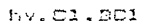
INTRODUCCION

Durante el desarrollo del Universo se observan continuas transformaciones de energía y los organismos vivientes no son la excepción. De esta forma, las células vivientes se dividen en dos grupos dependiendo en la forma en la cual obtienen su energía:

a) las células fotosintéticas utilizan la energía solar como principal fuente de energía que finalmente será convertida en energía metabólica.

b) por otra parte, las células heterotróficas aprovechan la energía contenida en moléculas orgánicas para sus diferentes procesos celulares.

Los organismos fotosintéticos son las plantas verdes y ciertas especies de bacterias llamadas verdes-púrpuras. Todos ellos son capaces de reducir CO_2 a carbohidratos en presencia de luz. La reacción más general que se puede plantear de la fotosíntesis propuesta originalmente en 1939 por van Niel (1) es la siguiente:



En donde H_2D es el donador de electrones y A el aceptor. En las plantas superiores el donador es el H_2O y el compuesto A es el CO_2 . En el caso de las bacterias fotosintéticas pueden ser varios compuestos inorgánicos como el H_2S y el hidrógeno molecular o bien sustratos orgánicos como el alcohol

laosprosilico.

Los organismos heterotróficos obtienen su energía de las moléculas orgánicas por medio de reacciones de oxidación-reducción, que en conjunto se conocen como respiración.

La fotosíntesis y la respiración son procesos de transducción de energía, de energía luminosa a química o a diferentes tipos de energía química. En todos los organismos, la molécula que almacena este tipo de energía es el adenosin-5'-trifosfato (ATP).

En la actualidad uno de los campos del estudio de la Bioenergética se centra en dilucidar los mecanismos de transducción de energía, por los cuales pueden producirse reacciones, como la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.

I LAS BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS.

I.1.A. GENERALIDADES.

Las bacterias fotosintéticas se dividen en tres grupos principales de acuerdo a su pigmentación y requerimientos de donadores de hidrógeno (2,3,4). (ver Tabla I.):

-Cianobacterias (o algas azul-verdes)

-Bacterias verdes

-Bacterias púrpuras

{ sulfurosas (Chromatiaceas)

{ no sulfurosas (Rhodospirillaceas)

En todos los grupos de bacterias fotosintéticas, el contenido de pigmento en la célula está regulado en función de la intensidad de la luz. En las bacterias verdes y púrpuras requieren condiciones de anaerobiosis estricta para la síntesis de sus pigmento fotosintéticos. En cambio las bacterias púrpuras no sulfurosas solo sintetizan sus pigmentos mientras existan condiciones de luz y la ausencia de oxígeno, pero pueden sobrevivir en la oscuridad y en presencia de oxígeno, ya que son aeróbicas facultativas (5).

I.1.A.1 Características de las cianobacterias.

Las cianobacterias realizan su fotosíntesis utilizando dos fotosistemas, (6) en tanto las bacterias verdes y púrpuras utilizan un solo fotosistema, como se verá más adelante.

Las cianobacterias llevan a cabo su fotosíntesis utilizando al H_2O como el donador de electrones y al oxígeno como el último

producto de la oxidación como se realiza en plantas verdes.

Sus pigmentos fotosintéticos son la clorofila a y las ficobilinas como pigmentos característicos.

I.1.A.2 Diferencias entre las bacterias verdes y púrpuras.

Las principales diferencias entre las bacterias verdes y púrpuras, son en cuanto a su movilidad y al empaquetamiento y localización de sus pigmentos:

i) Con la excepción de *Chloflexus*, todas las bacterias verdes carecen de motilidad, en cambio las bacterias púrpuras son flageladas, y responden a estímulos foto-y quimiotácticos del medio.

ii) Los pigmentos de las bacterias verdes están localizados en estructuras especiales llamadas vesículas de *Chlorobium*, que están firmemente unidas a la membrana citoplásmica formando así una unidad funcional (7,8). Las bacterias púrpuras tienen los pigmentos en unidades intracitoplásmicas de membrana que son una continuación de la membrana citoplásmica, y que estructuralmente son comparables a las de cianobacterias. En la Figura 1 se muestra la forma en que se representan estas invaginaciones de la membrana citoplásmica.

I.1.A.3 Características de las bacterias púrpuras.

Las bacterias púrpuras presentan como pigmentos fotosintéticos a la bacterioclorofila (BChl) a ó b y a un número variado de carotenos. Los pigmentos del fotometabolismo están

localizadas en invaginaciones de la membrana citoplásmica los cuales se les conoce como cromatóforos.

En 1907, Melnik clasificó a las bacterias púrpuras, desde un punto de vista ecológico en *Thiorhodaceae* y *Athiorhodaceae*. Ahora se sabe que la diferencia principal entre estos grupos, que actualmente se conocen como *Chromatiaceae* y *Rhodospirillaceae* esta dado por su habilidad o incapacidad para usar azufre como donador de electrones en condiciones fotosintéticas (4).

Esta incapacidad de las *Rhodospirillaceae* se debe a la carencia de la enzima que asimila al azufre, la adenosulfato reductasa, presente en las *Chromatiaceae* (9).

Las diferencias estructurales entre los dos grupos son que las siguientes: *Chromatiaceae* presentan glóbulos de azufre que ocupan casi todo el volumen celular además de depositos de donadores de electrones fotosintéticos para la fijación de CO_2 . Por otra parte, las *Rhodospirillaceae* presentan un sistema de membranas con invaginaciones de la membrana plasmática, que contiene al aparato fotosintético.

Además, casi todas las *Rhodospirillaceae* son anaeróbicas facultativas, es decir, son capaces de crecer anaeróbicamente en presencia de luz, o bien aeróbicamente en la oscuridad, desarrollando los componentes del transporte de electrones. En cambio, las *Chromatiaceae* son anaeróbicas obligadas.

Las bacterias púrpuras no sulfuradas viven en habitats naturales junto con bacterias quimioorganotróficas, las cuales son capaces de degradar macromoléculas (celulosa, lípidos neutros y proteínas) que las bacterias no sulfuradas no pueden. En cambio las bacterias púrpuras sulfuradas viven con las bacterias

verdaz, obteniendo sus sustratos de oxidaciones de los estanques en descomposición de residuos animales y vegetales (10).

I.1.6. TIPO DE PREPARACION DE MEMBRANAS.

En las bacterias fotosintéticas existen dos diferentes formas de preparación de membranas transductoras de energía, lo cual se simplifica la Figura 2.

El primer tipo de membrana es obtenida por el tratamiento de las bacterias con lisozima, para digerir la cápsula, dando lugar a la partícula llamada esferoplasto (Figura 2b). El otro tipo de preparación es obtenida por la ruptura mecánica de la bacteria completa por sonicación, o prensa de French, formandose las vesículas osmóticamente selladas llamadas cromatóforos. Estos cromatóforos a diferencia de los esferoplastos, al sellarse la polaridad de la membrana se invierte con respecto a la situación original. (Figura 2c)

La composición molecular de las preparaciones anteriores se pueda conocer mediante su espectro de absorción. Se ha observado que las bandas de absorción en el rojo cercano y región visible en cromatóforos crecidos anaeróbicamente son idénticas a las bandas de absorción de las bacterias en la misma condición. En cambio en los cromatóforos de bacterias crecidas aeróbicamente no se presentan estas bandas de absorción, proponiéndose la pérdida de estos componentes moleculares en estas condiciones.

Por otro lado, se ha demostrado que los cromatóforos son un tipo de membrana transductora de energía, capaz de llevar a cabo reacciones de fosforilación del ATP, dando lugar a la síntesis de

RTF al ser iluminados (11,12). Los cromatóforos aparecen en micrografías electrónicas como estructuras colapsadas en forma de disco con un diámetro de 100nm.

1.2. TRANSPORTE DE ELECTRONES EN BACTERIAS FOTOSINTETICAS

El estudio de la fotosíntesis en bacterias fotosintéticas ofrece un sistema experimental para el campo de las membranas transductoras de energía. Estas membranas contienen el aparato fotosintético del transporte de electrones que realiza las reacciones de oxidoreducción activadas con destellos de luz.

1.2.A. PIGMENTOS ANTENA

Los pigmentos antena están compuestos de carotenos y bacterioclorofilas y se encuentran asociados no covalentemente a proteínas en la membrana del cromatóforo de bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfuradas. Por lo tanto, la extracción de estos complejos pigmento-proteína requiere del uso de disolventes orgánicos o detergentes.

Los pigmentos antena absorben la energía radiante que es transferida al centro de reacción para iniciar el transporte cíclico de electrones.

1.2.B. TRANSFERENCIA DE ELECTRONES

El transporte de electrones en bacterias fotosintéticas no sulfuradas se lleva a cabo en dos grandes complejos que se encuentran embebidos en la membrana citoplásmica. Estos complejos son el Complejo Centro de Reacción (CCR) y el Complejo Ubiquinona-Citocromo o Oxidoreductasa, los cuales transfieren los electrones

en el orden respectivo.

I.D.E.1 El Complejo Centro de Reacción.

El primer evento fotoquímico de las bacterias fotosintéticas se realiza en un complejo proteína-bacterioclorofila comúnmente llamado centro de reacción. Este complejo ha sido aislado de varias bacterias fotosintéticas como Rhodospseudomonas sphaeroides 261 (13).

La caracterización tanto de sus componentes moleculares, como de su organización han sido de gran utilidad para el entendimiento del primer evento activado por luz. Los componentes moleculares del CR son los siguientes: 4 moléculas de bacterioclorofila (BC1), 2 moléculas de bacteriofeofitina (BF) (14,15,16), una molécula de caroteno, 2 ubiquinonas y una molécula de hierro no hémico.

El caroteno del CR se ha observado que no corresponde al tipo de caroteno abundante en la bacteria; por ejemplo en Rhp. sphaeroides C2,10 el cromatino es el caroteno del CR mientras que neocaroteno es el que se presenta en el pigmento antena (17).

Se han observado dos quinonas en el CR, en Rhp. sphaeroides se presenta el tipo de quinona UQ_{13} (18) ; en el caso de Rs. rubrum es la redoxinona (19). Una de las dos quinonas es denominada UQ_1 estando más fuertemente unida que la UQ_{11} al CR, esto ha sido sugerido por estudios de reconstitución (19,20). Ambas quinonas están localizadas cerca una de otra e interaccionando una de ellas con una molécula de Fe^{++} .

1.2.B.2 El Complejo Ubiquinona-Citocromo c Oxidoreductasa.

Los electrones son transferidos del CR a un aceptor del complejo ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa, el cual tiene similitudes con el de la mitocondria.

Los componentes moleculares identificados en este proceso son los siguientes: una quinona, los citocromo b y c y una proteina de Fe/S tipo Rieske. Una porción de UQ_{10} , identificada como UQ_2 se ha observado que tiene una participación en el segmento b_{6-8} , por estudios de reconstitución, en donde las cinéticas reales del transporte de electrones son alteradas en condiciones de luz continua cuando se hace una extracción de UQ de los cromatóforos de Rhiz. capsulata *in vivo* (21).

El citocromo c₂ está localizado en la cara periplásmica de la membrana, habiendo sido demostrado por estudios inmunológicos en esferoplastos y en cromatóforos de Rhiz. rubrescens (22).

El complejo ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa presenta una proteina de Fe/S tipo Rieske, parecida a la del complejo III de mitocondria (23) que participa en el transporte de electrones de UQ_2 .

A continuación se describirá la cadena ciclica de electrones de Rhiz. sphaeroides.

El primer evento fotoquímico consiste en la absorción de un fotón por el centro de reacción, el cual utiliza la energía de la luz para llevar los electrones desde un donador positivo hasta un aceptor con un potencial redox mucho más negativo. A este sitio de absorción de energía luminosa se lo llama fotosistema. Este

primer evento en cromatóforos es similar al que ocurre en los centros de reacción de los fotosistemas I, II en las plantas verdes y en las cianobacterias.

En el CR, dos moléculas de bacterioclorofila que forman un dímero ($[BCl]_2$) funcionan como el primer donador. La excitación de $[BCl]_2$ provoca la pérdida de un electrón. Este electrón es transferido a un intermediario de vida media muy corta (I), pasando a su primer aceptor real, la ubiquinona (UQ_1). Se ha sugerido a la bacteriofiofina como el posible intermediario (24,25,26).

La transferencia del electrón desde el $[BCl]_2$ al intermediario de bacteriofiofina provoca un cambio de energía libre de 700mV. Por esta razón la primera reacción fotoquímica es prácticamente irreversible.

La UQ_1 transfiere su electrón a un segundo aceptor, el cual es una segunda ubiquinona (UQ_{11}); en esta transferencia esta involucrada una molécula de Fe no hémico de UQ_1 .

La UQ_{11} transfiere dos electrones, obteniendo el segundo electrón de otro evento fotoquímico con la previa reducción del dímero de $[BCl]_2$ por el citocromo c_2 , el cual lo recibe de la pora de quinonas.

La UQ_{11} transfiere dos electrones junto con dos protones que toma de la cara externa del cromatóforo al citocromo b del complejo ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa. El citocromo b toma protones (como UQ_{11}) y transfiere junto con sus electrones a la UQ_2 , que junto con una proteína de Fe/S tipo Rieske transportan los electrones al citocromo c_2 , el cual reduce al dímero de $[BCl]_2$ completando el ciclo del transporte de

electrones.

En la Figura 3 se esquematiza la cadena de electrones propuesta para Rhiz. sphaeroides, señalando sobre la ordenada los potenciales medios (E_m) y los sitios de acción de los inhibidores. La ortofenacetolina es un quelante del Fe^{++} que inhibe el transporte de electrones de UQ_1 a UQ_1 (27). La antimicina A es un inhibidor específico para la oxidación del citocromo b (28). Y el 5-metildesil 6-hidroxi-4,7-diclorobenzotiazol (UHDST) inhibe la transferencia de electrones de UQ_2 al citocromo c_2 , este inhibidor no está señalado en la figura.

I.3. TRANSDUCCION DE ENERGIA EN BACTERIAS FOTOSINTETICAS

I.3.A. LA TRANSDUCCION DE ENERGIA.

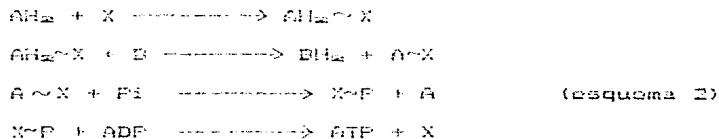
El fenómeno denominado transducción de energía contempla el estudio de los mecanismos encargados de convertir la energía química proveniente de la oxidación de sustratos a la energía luminosa en energía establecida para la síntesis de ATP.

Este fenómeno de transducción de energía ha sido observado por Frenkel (11) en cianobacterias, en donde al ser activado el transporte de electrones con luz esta acoplada a la síntesis de ATP. Por otro lado, Arnon en cloroplastos observó lo mismo (29).

Existen varias hipótesis para explicar la naturaleza del intermediario para la síntesis de ATP.

I.3.A.1 Hipótesis química.

La hipótesis química fue originalmente propuesta por Slater en 1953 (30). Esta hipótesis propone una unión covalente entre el acarreador de electrones y alguna otra molécula intermediaria (X); este complejo donaría los electrones al siguiente acarreador y en este paso se donaría la energía a ADP, este se rompería y donaría su energía a Pi, que a su vez la donaría al ADP, y se esquematiza a continuación:



Aunque la hipótesis del acoplamiento químico ha constituido la guía de muchos trabajos de investigación, tiene dos serias limitaciones. Una de ellas es que el mencionado intermediario químico de alta energía, necesario para el acoplamiento, no ha sido aún detectado después de 20 años de intensa búsqueda; la creencia de muchos investigadores por tanto, es que tal intermediario no existe. La segunda es que esta hipótesis no proporciona una explicación al hecho de que la membrana debe permanecer intacta e impermeable para que se lleve a cabo la síntesis de ATP.

1.3.A.2 Hipótesis Quimiósmotica.

Esta hipótesis propuesta por Peter Mitchell en 1961, propone que el intermediario de alta energía es la actividad electroquímica de un gradiente de protones generado y mantenido por la membrana cerrada que tiene el sistema del transporte de electrones (31,32,33).

Esta hipótesis cuenta con 5 postulados básicos:

- 1.- Las reacciones suceden en una membrana cerrada osmóticamente y que es prácticamente impermeable a protones.
- 2.- La cadena del transporte electrónico está formada por

equivalentes reductores, acarreadores de electrones y acarreadores de H⁺ están arreglados de manera secuencial tal, que a un acarreador de electrones le sigue un acarreador de H⁺ y así sucesivamente.

3.- Existen sistemas de transporte de solutos ligados a protones o a hidroxilos que tienen un papel en la estabilización osmótica o en el transporte de metabolitos.

4.- Este transporte de electrones forma un gradiente de protones llamada fuerza proton motriz ($\Delta \bar{\psi}$) compuesta de dos componentes: el componente químico (ΔpH) y el componente eléctrico ($\Delta \psi$) siguiendo la siguiente relación:

$$\Delta \bar{\psi} = \Delta \psi + \frac{RT}{F} (\Delta \text{pH}) \quad (\text{esquema 3})$$

Donde R = Constante de los gases; T = Temperatura absoluta; F = Constante de Faraday.

Esta fuerza protonmotriz es la fuerza para la síntesis de ATP, o sea el intermediario.

5.- El $\Delta \bar{\psi}$ formado es aprovechado por la enzima membranal (ATP sintetasa o ATPasa, según la dirección de la reacción para sintetizar ATP. Al consumirse el potencial electroquímico por la síntesis de ATP se estimula el transporte de electrones manteniendo el $\Delta \bar{\psi}$.

En base a la hipótesis quimiosmótica clásica se ha desarrollado hipótesis colaterales, como es el caso de la hipótesis quimiosmótica localizada. El autor de esta hipótesis es Williams (34,35,36) quien sostiene que los protones translocados por el transporte de electrones son los responsables para la

síntesis de ATP, pero plantas que ellos son retenidos dentro de la membrana estableciendo una actividad de protones localizados y existirían entre ellos una relación tanto espacial como funcional estrechas entre la cadena de electrones y la ATP sintetasa.

La hipótesis clásica propone una membrana quimiosmótica deslocalizada, con los protones en el espacio osmótico.

I.3.A.3 Hipótesis Conformational.

En donde la energía dada por el transporte de electrones se conserva en un cambio conformational de una proteína transportadora de electrones o en la molécula del factor acoplante (ATPasa/F₁). Dando lugar a un cambio tridimensional "energizado" que permitirá la síntesis de ATP. Esta hipótesis se le atribuye a Boyer (37).

Esta hipótesis no contradice a la hipótesis quimiosmótica, ya que la energía del transporte de electrones es empleada para realizar un cambio conformational para sintetizar ATP.

I.1.B. IONÓFOROS Y DESACOPLIANTES.

Los ionóforos son moléculas que tienen la propiedad de aumentar la permeabilidad específica a ciertos cationes en membranas biológicas y artificiales.

Existen dos tipos básicos de ionóforos: 1) Electroforéticos, que pasan un ión a través de la membrana. 2) Electroneutros, que intercambian un ión por H⁺.

La valinomicina, como ionóforo electroforético, es capaz de hacer permeable la membrana al K⁺, actuando en favor del gradiente químico y eléctrico. La valinomicina es un acarreador

adébil que se disuelve en la porción de hidrocarburos del fosfolípido (de baja constante dieléctrica), porque posee una parte exterior hidrofóbica, quedando el ión atrapado con los oxígenos de la parte central. De esta manera baja la energía de activación, necesaria para mantener al K^+ en un medio no polar. El efecto neto en membrana biológicas sería el modificar el $\Delta\psi$, pero no el ΔpH .

La nigericina, como ejemplo de ionóforo electroneutro, a ciertos pH posee una carga negativa debida a un carboxilo presente en el extremo de la molécula. La nigericina forma clatratos con iones monovalentes. A diferencia de la valinomicina, este tipo de ionóforo es capaz de intercambiar el ion transportado por K^+ . El resultado neto es modificar el ΔpH , pero no el $\Delta\psi$.

La gramicidina, cuyo resultado neto de transporte es muy semejante a la valinomicina, pero con la diferencia que tiene un rango más amplio de iones monovalentes, su mecanismo de acción es el de formar poros a través de la membrana.

Los protonóforos o desacoplantes, como el 2,4 dinitrofenol (DNP) y cianuro de fluorocarbonil hidrazona (FCCF) que por medio de la ionización de $-OH$ o $-NH-$ son capaces de volver permeable a la membrana a H^+ . El resultado neto es el de abolir al mismo tiempo el ΔpH y el $\Delta\psi$.

El desacoplamiento se logra por la adición de alguno de los aniones permeables arriba descritos. Siendo interesante recalcar que también se logra el desacoplamiento al añadir la combinación de nigericina y valinomicina en presencia de K^+ .

I.S.C. GRADIENTE ELECTRICO Y OSMOTICO EN BACTERIAS
FOTOSINTETICAS.

Baltscheffsky y von Stedingk fueron los primeros en observar un cambio de pH inducido por luz en cromatóforos de Re. rubrum (23).

La cuantificación del potencial electroquímico de protones ha sido importante para la hipótesis quimiosmética ya que una demostración de síntesis de ATP en ausencia de $\Delta\psi$, sería suficiente para descartarla.

El $\Delta\psi$ o componente eléctrico se puede calcular de las formas siguientes:

a) Determinando la concentración interna y externa de un ion que esta en equilibrio electroquímico a través de la membrana, calculandolo por medio de la ecuación de Nernst:

$$\Delta\psi = 0.059 \frac{RT}{F} \log_{10} \frac{[H^+]_{ext}}{[H^+]_{int}} \quad \text{(esquema 4)}$$

b) Generación de potenciales de difusión, generados por el gradiente de un ion para ser calibrado por un indicador espectroscópico de $\Delta\psi$.

c) Utilizando microelectrodos.

El ΔpH o componente químico es calculado por medio de la distribución de los colorantes y bases a través de la membrana, asumiendo que solo la especie no protonada es permeable. Existen varios tipos de colorantes: la Fluorocadidina (F-CAD) y tetrabrina (mide el apagamiento de la fluorescencia al acidificarse el interior), el azul de bromotimal o rojo de metilo (colorantes), aminas (radioactivas). Se han obtenido valores de 2.5 a 3 unidades de

pH más ácido en el interior (37, 38, 41).

Se ha observado que corrimientos del espectro de absorción de la bacterioclorofila (42) y carotenos (43, 44, 45) en cromatóforos de bacterias fotosintéticas, son inducidos tanto por la luz (por destello o con iluminación continua) (46) o por hidrólisis de ATP (o FDP) en la oscuridad, habiendo sido relacionado con la generación de un potencial de membrana.

La evidencia más convincente del cambio de absorción del caroteno como indicio de $\Delta\psi$, es la relación lineal entre el cambio del caroteno y cambios en potenciales transmembranales, inducidos en la oscuridad con gradientes iónicos de difusión. (45) Siendo este cambio una imagen en el espejo del inducido por luz.

La calibración de la señal del cambio del caroteno esta basada en que los cambios de absorbancia ($\Delta D.C.$) generados por el potencial de difusión con pulsos de K^+ en presencia de valinomicina o pulsos de H^+ en presencia de FCCP, los cuales dan respuestas similares (43, 47). La adición del K^+ se hace en concentraciones crecientes, generando una curva patron que debe ser lineal al graficarla como el logaritmo de la concentración de K^+ añadido, desconociendo la concentración interna preexistente en el medio.

Esta señal de calibración puede realizarse en Chlo. sphaeroides y Chlo. zosteriella mas no en Chlo. rubra debido a que la señal es muy pequeña.

Los valores obtenidos del cambio del caroteno en estado estacionario para cromatóforos de Chlo. sphaeroides son diferentes dependiendo

de la intensidad de luz durante su crecimiento.

I.S.D. GRADIENTE DE H⁺ Y SU RELACION CON LA SINTESIS DE ATP.

En cromatóforos de bacterias fotosintéticas, así como en otras membranas transductoras de energía la cadena de transporte de electrones está asociada a la síntesis de ATP. De acuerdo con la hipótesis quimiosmótica (30) estos dos procesos están unidos por el potencial transmembranal electroquímico de H⁺.

Lo anterior se puede comprobar de varias formas:

i) observando la disminución de los gradientes de ΔpH , durante la síntesis de ATP u durante la fosforilación post-iluminación, ii) síntesis de ATP en la oscuridad con gradientes de pH impuestos artificialmente, y iii) observar un movimiento de H⁺ durante la hidrólisis de ATP.

Se ha observado que la adición progresiva de Cosacoplantes en cromatóforos, provoca una disminución de la síntesis de ATP y una disminución en el $\Delta \bar{pH}$, también una reducción en la intensidad de luz o el añadir antimicina A produce el mismo fenómeno de inhibición de la síntesis de ATP (48).

La demostración por Jagendorf y Uribe (45) de la fosforilación en la oscuridad con gradientes de pH impuestos (fosforilación en baño ácido-base) en cloroplastos ha sido tomada como evidencia de que el ΔpH es capaz de llevar a cabo la síntesis de ATP. Por otra parte, en cromatóforos de bacterias fotosintéticas a las cuales se les impone un potencial de difusión con valinomicina y KCl para generar un potencial eléctrico, da lugar a síntesis de ATP sin pasar por el transporte de electrones. (50,51,52)

En contraste con los cloroplastos, los cromatóforos son capaces de sintetizar ATP al imponer un potencial eléctrico con un potencial de difusión y no hay fosforilación cuando se les impone un gradiente de pH. Esto sugiere que el componente eléctrico ($\Delta\psi$) juega un papel muy importante para la síntesis de ATP en cromatóforos y en los cloroplastos es el componente químico el importante (ΔpH).

En una serie de elegantes experimentos Saphon y colaboradores (53,54) midiendo el decaimiento en el cambio del caroteno como índice de $\Delta\psi$ y los cambios de pH como indicador de ΔpH , junto con la síntesis de ATP, demostraron que existe una correlación estrecha entre el decaimiento de $\Delta\psi$ inducido con valinomina + KCl con el decaimiento de la síntesis de ATP.

El cambio de $\Delta\psi$ es paralelo a una disminución en el ΔpH sugiriendo que hay un movimiento de H^+ . El decaimiento en $\Delta\psi$ es acelerado por el añadir de ADP + Pi; esta inhibición es revertida por antibióticos que inhiben fosforilación (aurovertina y oligomicina) y por la nigericina que abate el $\Delta\psi$. La aceleración del decaimiento de $\Delta\psi$ producido por ADP + Pi es inhibida un 40% por antimicina A, que bloquea el segundo sitio de toma de protones. Estos datos indican fuertemente que el $\Delta\psi$ y ΔpH están ligados de manera íntima a la síntesis de ATP en cromatóforos de Rhp. sphaeroides.

De acuerdo a la hipótesis del acoplamiento quimiosmótico, la reacción de síntesis de ATP está acoplada a las reacciones -redox del transporte de electrones de la cadena únicamente via la circulación de protones a través de la membrana. El flujo de

protones por la ATP sintetasa esta relacionada por dos ecuaciones. La primera, el flujo de protones en el sentido hidrolítico y el segundo la fosforilación por la energía del gradiente de protones, ambas teniendo relación con la afinidad por el ATP

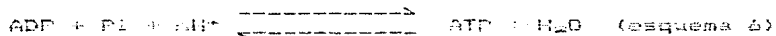
$$\Delta p = - \Delta G_p = - (\Delta G_p' + RT \ln \frac{[ATP]}{[ADP][P_i]}) \quad (\text{esquema 5})$$

El conocer el potencial de fosforilación en relación con la fuerza protonmotriz, es un índice de los valores de la estequiometría H^+/ATP (translocación de protones por molécula de ATP e hidrolizado). El valor de H^+/ATP aún no está claro, aunque haciendo la estequiometría de los $KCal\ mol^{-1}$ ($11KCal\ mol^{-1}$) estimadas para la síntesis de ATP y el $\Delta \psi_m$ ($150-170mV$) son dos protones por ATP sintetizado (55).

1.4. LA ATP SINTETASA.

La ATP sintetasa es una enzima que se encuentra en membranas transductoras de energía, como por ejemplo las mitocondrias, cloroplastos, y en bacterias aeróbicas y fotosintéticas. Su estructura es similar en cada una de este tipo de membranas y diferente de la ATPasa de Na^+/K^+ de membrana plasmática de eucariotes y de la ATPasa- Ca^{++} en el retículo sarcoplásmico.

La ATP sintetasa o factor de acoplamiento es la enzima clave en el proceso de fosforilación ligado al transporte electrónico y cataliza la siguiente reacción general:



Originalmente, los factores de acoplamiento fueron definidos como factores proteicos que estaban involucrados en la síntesis de ATP pero no catalizan reacciones de oxidación-reducción (OR).

Las bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfuradas poseen la característica de sintetizar ATP tanto tanto mediante una cadena fotosintética o respiratoria. Se ha demostrado, en experimentos de reconstitución cruzada, la potencialidad para las dos funciones por parte de los factores de acoplamiento provenientes de bacterias crecidas en ambas condiciones (97,98)

1.4.A. LOCALIZACION.

Ya en 1954, Low y Afoliano (59) reportaron en cromatóforos de Res. nidarum una serie de partículas en forma de nuez de 12m en tamaño, muy parecida a las ya descritas por Fernandez-Moran en partículas submitocondriales (60).

En micrografías en tinción negativa de cromatóforos de Rhp. sphaeroides se presentan unas estructuras en la superficie externa de la membrana (61) que se identifican como la ATP sintetasa.

Más recientemente se han preparado anticuerpos específicos en contra del factor de acoplamiento de Rhp. capsulata con los que han realizado estudios de localización de esta enzima. Se ha visto que este anticuerpo se aglutina en cromatóforos y no en esferoplastos o en células completas, comprobando que la enzima mira hacia el citoplasma, mientras que en el cromatóforo se localiza hacia el exterior (62).

1.4.2. ESTRUCTURA.

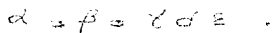
El complejo ATP sintetasa está compuesto por dos segmentos, uno embebido en la membrana que se denomina F₀ y otro soluble llamado F₁.

El método usado para solubilizar la porción hidrofílica (F₁) del factor de acoplamiento es análogo al usado en mitocondrias y cloroplastos. El método general varía desde incubaciones (10 min) con baja fuerza iónica o sonicación (1-2 min) en presencia de EDTA 1mM, según la estabilidad del complejo proteína membrana en las diferentes especies. La concentración de la proteína extraída debe ser protegida por concentraciones milimolares de ATP (63).

En bacterias fotosintéticas la extracción de la F_1 no modifica ni el transporte de electrones ni la conservación del gradiente electroquímico de protones. Esto contrasta con el desacoplamiento generalizado que ocurre en cloroplastos al extraer la F_1 .

La fracción soluble tiene un peso molecular que varía entre 280,000 y 380,000 daltones, pudiéndose distinguir en 3 subunidades: α , β , γ , δ y ϵ cuyos pesos moleculares son 54,000 d., 50,000 d., 32,000 d., 13,000 d. y 7,500 d. respectivamente (64), según su migración en gel de poliacrilamida SDS (65).

La zootopografía de las subunidades del sector F_1 ha sido muy debatida, proponiéndose la siguiente:



El segmento F_0 es hidrofóbico y parece ser el responsable de la conducción de protones a través de la ATPasa. Tiene un peso molecular de 92,000 daltones, pudiéndose distinguir tres subunidades: a, b y c según se ha propuesto en *E. coli*. Una de las subunidades de la F_0 es un proteolípido al cual se une covalentemente el inhibidor de la transferencia de energía, la diciclohexilcarbodiimida (DCCD). El cual explica el papel conductor de protones de la subunidad hidrofóbica F_0 y por lo tanto la inhibición de la síntesis o la hidrólisis del factor de acoplamiento, que de manera acoplada a dichas actividades transloca protones.

Las otras dos subunidades de la ATPasa son una proteína similar a la "proteína que confiere sensibilidad a oligomicina" de mitocondria (66) y una subunidad que une F_0 con F_1 .

I.4.C. ACTIVIDAD.

Los factores de acoplamiento de las bacterias fotosintéticas tienen, en general, una alta actividad hidrolítica de ATP en la oscuridad tanto cuando están unidas a las membranas como cuando están en forma soluble luego de su extracción.

El sustrato de la actividad hidrolítica de la enzima unida a membrana es Mg-ATP preferentemente a Ca-ATP que también puede ser usado como sustrato, no siendo tan eficiente. Cuando se solubiliza la porción F₁, la enzima pasa a ser preferentemente Ca-ATP, y transformándose nuevamente en Mg-dependiente al ser reconstituido en membranas depletadas de F₁ (sonicación con EDTA). Paralelamente con la reconstitución de la síntesis de ATP se restaura la actividad de recambio ATP-Pi (67).

Hay una proteína importante en la regulación de la catálisis de esta enzima, el inhibidor natural descrito en 1965 por Pullman y Morroy en mitocondrias de corazón de res (68). Tiene un peso molecular de 10,000 d. aproximadamente, se ha postulado que la proteína inhibidor se une a una forma transitoria de la F₁ en la subunidad β (69).

Este inhibidor regula tanto la hidrólisis como la síntesis de ATP, observándose un retardo en el inicio de la fosforilación oxidativa atribuido a una movilización de la proteína inhibidora en mitocondrias (70,71).

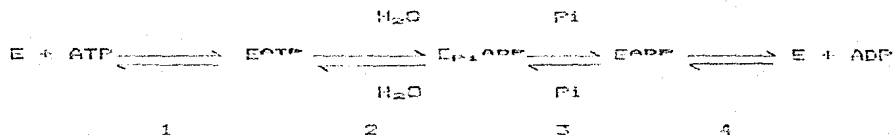
Esta proteína ha sido aislada en cloroplastos (72) y de la bacteria Escherichia coli (73) atribuyendo a la subunidad δ la

propiedad de proteína inhibidora (74).

Como un intento de conocer la subunidad(es) que participan y forman el sitio de catálisis, se ha aislado la subunidad β al tratar a los cromatóforos con LiCl , pudiéndose después reconstituir las reacciones de fosforilación y actividad hidrolítica de la ATPasa (75).

I.4.D. REACCIONES QUE CATALIZA LA ATP SINTETASA.

La enzima ATP sintetasa realiza las siguientes reacciones:



(esquema 7)

I.4.D.2 Reacciones totales.

a) Reacción de hidrólisis de ATP:

En los factores de acoplamiento hasta ahora estudiados de bacteria fotosintética se ha observado la actividad de ATPasa en preparaciones solubles como en acopladas, simplificada en el esquema anterior, precedo de 1 a 4.

En preparaciones membranales la actividad ATPásica es dependiente de Mg^{++} , siendo sensible a inhibidores de transferencia de energía (oligomicina y aurovertina). Se ha observado un incremento de la actividad hidrolítica en presencia de desacoplantes y al digerir la ATPasa de *E. coli* y cloroplastos con tripsina, atribuyéndole este aumento en actividad a la destrucción de un péptido inhibidor (72). En preparaciones

solubles (P_i) la actividad ATPasica se convierte en Ca dependiente y no hay sensibilidad a oligomicina.

b) Reacción de síntesis de ATP.

I.4.D.2 Reacciones parciales.

a) Recambio de ATP- P_i : de 1 a 4 y de 4 a 1; habiendo sido observada por primera vez en cromatoforos por Norio, colaboradores. Siendo sensible a desacoplantes (76). Esta reacción se realiza tanto en la luz como en la obscuridad, cuando el medio contiene ATP, ADP, P_i y Hg^{+2} . El recambio ATP- P_i , se efectúa gracias a la hidrólisis de ATP para después dar lugar a la síntesis; esto se postula ya que con un sistema regenerador de ATP no hay recambio ATP- P_i .

b) Recambio ADP-ATP: entre 2 y 3; descrita por Norio y col (77). Esta reacción no es sensible a desacoplantes (76).

I.4.D.3 Hidrólisis de PPI dando lugar a síntesis de ATP.

La bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum tiene la propiedad de formar pirofosfato (PPI) acoplado al transporte de electrones inducido por luz (78).

Se ha demostrado que el PPI puede servir como donador de energía en la obscuridad para la síntesis de ATP en presencia de ADP y P_i ; siendo este fenómeno inhibido por desacoplantes y oligomicina y no por inhibidores del transporte de electrones como antimicina A y NOBNO (79,80). Teniendo una estequiometria de 9-12 PPI hidrolizados por ATP formado (79).

1.5 OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo de este trabajo es el de medir los valores de $\Delta\psi$ para las reacciones de síntesis de ATP y el recambio ATP-Pi, para averiguar si la magnitud del $\Delta\psi$ es la misma para ambas reacciones. Considerando que el recambio es la hidrólisis de ATP que después permite la incorporación de un Pi a un ATP sintetizado, y la síntesis es la fosforilación del ADP. Tomando a los cromatóforos de Ehp. sphaeroides como modelo de trabajo de membranas transductoras de energía.

Para abordar el problema se ha llevado a cabo las siguientes estrategias:

- a) Conocer las condiciones experimentales de ambas reacciones.
- b) La comparación de ambas reacciones con su sensibilidad al desacoplante FCCF.
- c) Conocer el $\Delta\psi$ de la síntesis de ATP en la luz y del recambio ATP-Pi en la oscuridad.

Se eligió el recambio del caroteno para conocer los valores de $\Delta\psi$, ya que tiene la ventaja experimental que es un marcador intrínseco del potencial de membrana que permite tener un sistema más sencillo y limpio.

II) MATERIALES Y METODOS

II.1. CRECIMIENTO DE BACTERIAS

La bacteria fotosintética Rhodospseudomonas sphaeroides, cepa silvestre ATN 2.4.1. se crecieron dos tipos de medio teniendo un requerimiento en biotina, ácido nicotínico y tiamina.

II.1.A. Medio sólido.

Este es el medio en el cual se crecen las bacterias, para verificar el grado de contaminación y su crecimiento.

Contiene lo siguiente:

Extracto de carne	0.3%
Peptona de gelatina	0.2%
Agar Bacteriológico	2%

Se esterilizó en la autoclave durante 15min en frascos rosca 15-20ml, las bacterias se sembraron por punción, y su crecimiento tomó de 2 a 4 días. Una vez crecidas en medio sólido se transfirieron a medio líquido donde se expandió el cultivo.

II.1.B. Medio líquido.

Este es el medio formulado por Cohen-Bazire y colaboradores (81) y modificado por el propuesto por Hutner (82) es el siguiente:

MEDIO N.S.C. (rubrum, sphaeroides, capsulata)

Soluciones stock.

1.- Base concentrada. 500 ml

Ac. Nitrilotriacético	$N(CH_2COOH)_3$	5.0g	
Sulfato de Magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7.2g	
Cloruro de Calcio	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	2.18g	pH 6.8
Molibdato de Amonio	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0.012g	
Sulfato Ferroso	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.049g	
Metales " 41 "		25ml	

Los Metales " 44 " contienen, para 1l de agua.

EDTA	2.5g	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.0g	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	11.0g	
$MnSO_4$	1.54g	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.37g	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.392g	
$Co(NO_2)_2 \cdot 6H_2O$	0.249g	
$Na_2B_4O_7 \cdot 8H_2O$	0.177g	
2.- KH_2PO_4	136.9g/1l	pH 6.8
3.- Ac. Succinico	100g/1l	pH 6.8
4.- $(NH_4)_2SO_4$	100g/1l	
5.- Ac. Glutámico	25g/250ml	pH 6.8
6.- Ac. Aspártico	5g/250ml	pH 6.8
7.- NaCl	50g/1l	

Para hacer el medio se toma el volumen siguiente de cada stock para 1l:

1.- Base concentrada	20ml
2.- KH_2PO_4	20ml
3.- Ac. Succinico	20ml
4.- $(NH_4)_2SO_4$	5ml

5.- Ac. glutámico	2ml
6.- Ac. Aspártico	2ml
7.- NaCl	10ml

se añade 1g de caseína hidrolizada o extracto de carne, un g de ac. nicotínico, tiamina y d-biotina. Se ajusta el pH a 6.8. Esterilizar. Botellas 1l / 30min y botellas más grandes / 1h.

II.2. SIEMBRA DE BACTERIAS

Los cultivos líquidos se iniciaron a partir de un "tubo punción" al cual se le agregó medio líquido. Una vez que este cultivo hubo crecido, se le utilizó como inóculo para sembrar en un volumen de 100ml, este volumen se transfirió en botellas de 1l, esta a su vez se transferirían cuando ya hubiesen estado crecidas en botellas de 9l; dejándolas un día en obscuridad para permitir que el crecimiento aeróbico de estos microorganismos consuman el O₂ del medio, y después dar paso al crecimiento en la luz al exponerlas a focos con filamento de tungsteno de 45 watts. Los frascos se colocaron entre dos focos a una distancia de 45cm.

Condiciones de crecimiento: Cuarto de temperatura constante de 30°C. Los frascos de 9l se crecen 3 días: un día en la obscuridad y 2 a la luz para después proseguir a la cosecha.

II.3. COSECHA DE BACTERIAS

Las bacterias se cosecharon en fase de crecimiento logarítmico tardío, al medir la densidad óptica del cultivo a

diversos intervalos de tiempo en un fotocolorimetro.

Se conservan las bacterias a 7°C, se centrifugan a 6,000rpm (5,500 G) durante 10 min en botellas de 250ml o bien en botellas de 500ml a 4000rpm durante 10 min. Se resuspenden las bacterias en TrisHCl 10mM pH 8.0 y se centrifugan, repitiendo este proceso hasta que se quite el mal olor.

Para poder congelar a las bacterias a -70°C la última lavada se adiciona Tricina 50mM pH 7.4, glicerol 10%, MgCl₂ 10mM y sacarosa 100mM, centrifugando en el rotor SS-34 a 12,000rpm (17,000 G) durante 20 min.

II.4. OBTENCION DE CROMATOFOROS

Esta preparación se realiza de acuerdo al método descrito por Baccarini-Melandri y col. (63) el cual consiste en lo siguiente:

- resuspender las bacterias en buffer de TrisHCl 10mM pH 7.5 en una proporción 1/10 (Bact./Buffer), añadiendo una pizca de DMSO y de MgSO₄.
- para romper las células se sonicán en lotes de 15ml durante 2 min en un Sonicador N-5-E pucado al máximo y para evitar el calentamiento de la muestra se refrigera en un baño de hielo.
- el sonicado se centrifuga a 15,000rpm (20,000 G) rotor SS-34 durante 20 min para remover las células que no se rompieron.
- el sobrenadante se centrifuga a 40,000rpm en el rotor 60Ti o 50Ti durante 1 h (100,000 G) obteniendose un precipitado de cromatóforos.
- el precipitado se lava en TrisHCl 10mM pH 7.5 se resedimenta a

la misma velocidad.

- el precipitado se resuspende en el buffer TrisHCl 10mM pH 7.5 y glicerol 20%.

- se le determina proteína (Biuret) y BCl (acetona/metanol), se hacen alícuotas de 300 μ l que se almacenan en tubos eppendorf en el Revco a -70°C .

II.5. DETERMINACION DE BACTERIOCLOROFILA

La concentración de bacterioclorofila fue determinada como la descrita por Clayton (83) :se tomó una alícuota de la preparación de cromatóforos (15 μ l) en 3ml de una mezcla de acetona-metanol (7/2, v/v) , se agita vigorosamente, y se centrifuga en una centrifuga clinica a 3,500rpm durante 10 min. El sobrenadante (la fase orgánica) se lee espectrofotométricamente a 770nm, contra un blanco de acetona-metanol. El cálculo se hizo asumiendo un coeficiente de extinción molar de $75\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y considerando un PM de 1000.

II.6. DETERMINACION DE PROTEINA

Método de Biuret (84).

El precipitado de acetona-metanol para la determinación de BCl, se resuspende en 0.2ml de deoxicolato de Na 1%, se le añade 0.8ml de agua y 2ml de Biuret (sulfato cáprico, tartrato de NaK y NaOH) se agita y después de 15 min se lee a 540nm. Simultáneamente se hace una curva patrón con Albúmina bovina.

II.7. PURIFICACION DE Zn .

La purificación del fósforo se hizo con una modificación del método reportado por Boyer y Bryan (85) de la siguiente manera:

- tomar Zn , (generalmente 5mCi , $200\%1$) y llevarlo a 1.5ml de H_2O destilada.
- añadir 1ml de molibdato de amonio/ H_2SO_4 (1 vol. MoNH_3 6.6% y 1 vol. H_2SO_4 7.5N) 1:1
- añadir 0.5ml de acetona y agitar.
- añadir 1ml de acetato de butilo, agitar $90''$, para lavar se toma la fase orgánica, repitiendo el proceso.
- se toman los 1ml de acetato de butilo y se le añade: 1ml (NH_4Cl 1N + NH_4OH 5N), si el color sigue amarillo se añade 10^{-7} l de NH_4OH fumante (65.5ml de NH_4OH 5N para 100ml)
- se agita vigorosamente.
- se elimina fase orgánica.
- a la fase acuosa se le añade 0.2ml (MgCl_2 5.5%, NH_4Cl 10%, NH_4OH).
- añadir $6\%1$ Pi 500mM.
- se coloca en hielo durante 2 h.
- se centrifuga en la centrifuga clinica para eliminar el sobrenadante.
- se añade 1ml de H_2O al precipitado, formandose una suspensión; se añade 10^{-7} l HCl hasta disolverlo.

II.8. SINTESIS DE ATP MARCADO EN LA POSICION (ATP³²P)

Se hizo por el método descrito por Glynn (86).

En 10ml: 5ml de TrisHCl 0.1M pH 8.1 + 0.6ml MgCl₂ 100mM + 2.42mg de cisteína (disuelta en 1ml de agua) + 0.5ml de ATP 100mM + 0.2mg de 3-fosfoglicerato (disuelto en 1ml de agua) + NADH 0.5mg (disuelto en 1ml de agua) + 0.2ml ECTA-K 50mM + el ³²P (BaCl) + 0.1ml de gliceraldehido 3P deshidrogenasa 10 ul (200-γg) y 3P gliceraloquinasa 140 γg, se afora a 10ml.

- se incuba la mezcla a 22°C durante 1h.

- se añaden 5 vol. de etanol (50ml) y lavar el frasco o tubo de reacción con 10ml de Et-OH 17% (v/v).

- liofilizar o evaporar a 0-5ml a 40°C.

- se filtra la solución en un papel Whatman no.1

- se pasa el contenido del filtrado por una columna con resina AB18. La columna se lava con a) 40ml de NH₄Cl 20mM en HCl 0.02N para quitar las trazas de AMP, AEP, Pi, b) 40ml de agua que elimina NH₄⁺, c) 0.25N HCl que eluye el ATP. Los primeros 14ml se colectan en hielo, añadiendo Tris para dar un pH final de 7.4. El rendimiento de elusión es de 85-92%. La columna se lava con 20ml de 1N HCl y agua hasta que el eluido tenga pH 5.0.

- para estimar la radioactividad se hace con líquido de centelleo Bray. Coeficiente de extinción solar del ATP 15.4 ± 10% a pH 7.0.

II.9. CUANTIFICACION DE LA SINTESIS DE ATP, EL RECONCIBO ATP-PI Y LA HIDROLISIS DE ATP POR EL METODO ISOTOPICO.

Los experimentos de recambio ATP-Pi e hidrólisis de ATP se midieron en las mismas condiciones: en la obscuridad, a 37°C y un volumen final de 0.8ml en un medio que contiene Sacarosa 240mM, Tris-DAC 10mM pH 8.0, MgCl₂ 5mM, ATP 2mM, ADP 0.05mM pH 7.4 y H₂PO₄ 2mM pH 7.4. Los experimentos de fotofosforilación se efectuaron en un volumen final de 0.8ml en el siguiente medio: Sacarosa 240mM, Tris-DAC 10mM pH 8.0, MgCl₂ 5mM, ADP 2mM pH 7.4 y H₂PO₄ 2mM pH 7.4 a 37 °C. Usando PEP para los ensayos de recaptura de fosfato (recambio ATP-Pi y síntesis de ATP) (5 ± 10⁶ cpm) o ³²P-PEP para la estimación de la hidrólisis (15 ± 10⁶ cpm por cada tubo).

Las reacciones se paran añadiendo 0.2ml de TCA al 30%, las muestras se centrifugan durante 10 min, se toma el sobrenadante (0.7ml) y se añade 0.2ml de acetona, 1ml de agua, 1ml de molibdato de amonio al 3.3% y 3.0M H₂SO₄. Las muestras se extrajeron 3 veces con acetato de butilo en el caso de recambio y fotofosforilación, tomando una alícuota de 0.4ml de la fase acuosa y en el caso de la hidrólisis de la fase orgánica de la primera extracción colocándolas en un papel filtro de 2.5 x 8 cm, se deja secando a temperatura ambiente, se cuenta en líquido de centelleo Bray.

II.10. MEDICION DEL POTENCIAL DE MEMBRANA ($\Delta\psi$) POR MEDIO DEL CAMBIO DEL CAROTENO

El cambio de absorbencia se midió en un Espectrofotómetro de Doble rayo DM-20 Amisco, con iluminación lateral constante de una

lámpara de cuarzo-iodo de 100 vatios dirigido al centro de la cubeta de 1 o 3ml en un medio con Sacarosa 240mM, Tris-HCl pH 8.0, $MgCl_2$ 2mM a 37°C. La iluminación lateral tiene un filtro de agua, y después un filtro rojo que permite pasar de 600nm en adelante. El fotomultiplicador es ensacado para no ver la luz de estimulación lateral con un filtro verde-azul (filtro de vidrio Corning 9782) que corta entre 400-500nm.

Las longitudes de onda recogidas fueron 540-600nm (43) las cuales corresponden a un isobéctico (punto de referencia) y una longitud de onda que corresponde a la que varía en la región de los carotenos.

III) RESULTADOS Y DISCUSION

III.1. CRECIMIENTO DE BACTERIAS Y ESPECTRO DE ABSORCION.

Para la realización de este proyecto fue necesaria la obtención de membranas transductoras de energía (cromatóforos) de la bacteria fotosintética Rhe. sphaeroides. Para esto se crecieron las bacterias en un medio rico en nutrientes y metales (descrito en "Materiales y Métodos"). En la Figura 4, se presenta la curva de crecimiento, medida en unidades Klett (unidades de absorbencia). En donde se observa que de las 24h a las 48h de crecimiento las bacterias se encuentran en la fase logarítmica tardía. Es en esta fase, cuando la velocidad de crecimiento de la población que se ha ido elevando gradualmente, empieza a disminuir debido a la presencia de un número mayor de bacterias, de desechos acumulados y de otros factores que reducen el crecimiento de la población, hasta que eventualmente, cesa su crecimiento y se llega a la fase estacionaria. Por esta razón las bacterias se cosecharon en esta fase.

Las bacterias fotosintéticas presentan un espectro de absorción característico, la región de los carotenos se encuentra entre 400-500nm, la BChl en 575nm, y los complejos antena entre los 700-870nm. Se observó este mismo patrón de absorción en los cromatóforos obtenidos de Rhe. sphaeroides, el cual se muestra en la Figura 5. Con esta observación se puede suponer que los cromatóforos contienen sus componentes moleculares como el de la bacteria completa, mostrando las mismas propiedades.

III.2. CARACTERIZACION DE LAS REACCIONES DE FOTOFOSFORILACION, RECAMBIO ATP-PI E HIDROLISIS DE ATP.

Las reacciones de fotofosforilación y recambio ATP-PI e hidrólisis de ATP fueron caracterizadas para poder determinar las condiciones óptimas para cada una de ellas. La reacción de fotofosforilación se llevó a cabo en presencia de ADP, Pi y Hg^{2+} , en un medio isotónico (Salina 0.9% NaCl) amortiguado con Trisoma Base a un pH de 8.0. La reacción se llevó a cabo en presencia de luz como sustrato del transporte de electrones. La fuente luminosa estaba acoplada al espectrofotómetro de doble haz, lo que permite determinar al mismo tiempo la magnitud del cambio de absorbencia.

La reacción de recambio se llevó a cabo en las mismas condiciones que la de fotofosforilación, excepto que esta se realizó en la oscuridad y en presencia de ATP. El ATP es hidrolizado por la ATPasa generando un potencial electroquímico, el cual da lugar a la incorporación de ^{32}P una molécula de ATP.

La reacción de hidrólisis de ATP se llevó a cabo en las mismas condiciones que el recambio ATP-PI, es decir el medio de reacción contenía AT ^{32}P -Y, ADP y Pi de esta forma se determina la liberación del fosfato marcado.

La actividad tanto de síntesis de ATP como hidrolítica en cromatóforos es óptima a un pH de 8.0 (61,74,87), por esta razón decidimos llevar a cabo las reacciones a este pH.

En la Figura 3 se muestra la dependencia de las tres reacciones a la concentración de $CaCl_2$, para los tres casos el incremento en la actividad es lineal. Lo que quiere decir

que las reacciones son proporcionales a la concentración de bacterioclorofila.

Baltscheffsky y Baltscheffsky (25) midieron la velocidad de fosforilación inducida por luz, observando que la velocidad está en función lineal a la concentración del extracto de cromatóforos de Rh. rubrum, lo que concuerda con nuestros resultados.

Por otra parte observamos como tanto la reacción de fotofosforilación (Figura 6a) como la de recambio ATP-Pi medida en la oscuridad (Figura 6b) son sensibles en un 100% al desacoplante FCCP (17M), sin embargo la hidrólisis de ATP (Figura 6c) fue estimulada por lo menos en un 50% con dicho desacoplante.

Estos resultados indican que las tres reacciones dependen del potencial, dos de ellas dependen del gradiente para que se lleven a cabo, siendo la síntesis de ATP y el recambio ATP-Pi. Por otro lado la hidrólisis es estimulada al liberar la presión que ofrece el gradiente en el sentido opuesto.

III.2.A. Reacción de fotofosforilación.

La fuente energética para que ocurra el transporte electrónico y por lo tanto la generación del gradiente electroquímico es la luz. De tal forma que la reacción de síntesis de ATP deberá ser proporcional al tiempo de iluminación, estos resultados se muestran en la Figura 7. Se puede observar que la síntesis de ATP aumenta linealmente en función del tiempo de iluminación de los cromatóforos. Los resultados también indican que ni la fuente luminosa ni la velocidad de síntesis son limitantes en nuestras condiciones experimentales.

III.2.B. Reacción de intercambio ATP-Pi.

La reacción de intercambio ATP-Pi implica la incorporación de un ^{32}P en ATP dependiendo de la energía proveniente del gradiente electroquímico. Dado que esta reacción se lleva a cabo en la oscuridad para la generación del potencial depende de la hidrólisis de ATP (ver esquema 7). De tal forma que la reacción de intercambio deberá depender de la concentración de ATP presente en el medio. En la Figura 3 se muestra tal dependencia. La velocidad se incrementa aproximadamente tres veces cuando la concentración de ATP es de 2mM (Figura 3, círculos vacíos) a diferencia de cuando esta es de 1mM (Figura 3, círculos llenos).

Un hecho interesante es el que se refiere al retardo observado para la reacción de intercambio ATP-Pi (Figura 3), dicho retardo podría deberse a la necesidad de un valor mínimo de la fuerza protonmotriz para que la reversa de la reacción de hidrólisis ocurra (ver esquema 7). Se puede observar que a partir de los 5 minutos la reacción es lineal.

III.2.C. Efecto del ADP en el intercambio ATP-Pi.

La presencia del ADP en el medio de reacción es indispensable para que se lleve a cabo la reacción de intercambio ATP-Pi tanto en partículas submitocondriales como en proteoliposomas (39,70).

La Figura 3A muestra el efecto del ADP sobre las reacciones tanto de intercambio ATP-Pi como de hidrólisis de ATP. El medio de reacción no tiene ADP de tal forma que al transcurrir la hidrólisis, el ADP se acumula y el intercambio ATP-Pi aparece

(círculos llenos). Sin embargo, la velocidad de hidrólisis es lineal en función del tiempo (triángulos llenos). La concentración necesaria de ADP para la reacción de recambio ATP-Pi se inicia es de 12 M a los 5 min. Por otro lado con un sistema regenerador de ATP se puede observar que la hidrólisis se estimula al máximo y el recambio ATP-Pi se inhibe (Figura 9A, símbolos vacíos), esto se debe a la remoción del ADP en el medio.

III.2.D. Curso temporal en las reacciones de recambio ATP-Pi e hidrólisis de ATP.

El curso temporal de ambas reacciones se estudia teniendo ADP presente en el medio (Figura 9B). Se debe hacer notar que la reacción de hidrólisis presenta una fase de retardo probablemente debida a la presencia del ADP, lo que contrasta con la Figura 9A. Por otra parte, la reacción de recambio ATP-Pi se estimula en un 50% por la presencia de ADP como acumulado como el preexistente. Ambas reacciones se modifican en presencia de FCCP, la hidrólisis se estimula (50%) y el recambio ATP-Pi se inhibe casi en su totalidad.

La reacción de recambio ATP-Pi (Figura 9, círculos) también presenta una fase de retardo durante aproximadamente los cinco primeros minutos, como se había notado previamente (Figura 8).

La relación hidrólisis/recambio es 2.3 en estas condiciones, lo que indica un buen índice de acoplamiento. El medio de reacción contiene lo siguiente: 2mM de ATP (tomado del valor máximo de recambio según la Figura 8), 0.05mM (50 μ M) de ADP la cual es la mínima concentración de ADP requerida para

iniciar la reacción de recambio ATP-Pi según el experimento de la Figura 9, y 2mM de Pi como el ATP.

Con los datos anteriores del recambio ATP-Pi, se puede concluir que esta reacción realizada en la oscuridad, requiere de la presencia de ATP y ADP presente en el medio. La hidrólisis de ATP genera la fuerza electrostática necesaria para realizar el recambio ATP-Pi. Otro requerimiento para que se lleve a cabo el recambio ATP-Pi es la presencia de una concentración 7M de ADP.

III.3. CAMBIO DE ABSORBENCIA DEL CAROTENO.

III.3.a. Curva de calibración por medio de la generación de un potencial de difusión.

El cambio de absorbencia del caroteno (Δ D.O.), descrito por Jackson y Crofts (43) como la generación de un potencial de membrana durante la iluminación fue utilizado como indicador de $\Delta\psi$. La señal del cambio del caroteno, puede ser calibrada por la generación de un potencial de difusión, siendo esta señal una imagen en espejo a la inducida por luz. Esta calibración es necesaria para poder transformar los valores de Δ D.O. a unidades de potencial de membrana ($\Delta\psi$).

La curva de calibración se realizó como la descrita por Jackson y Crofts (43) en las siguientes condiciones: el cambio de absorbencia se determinó en 525-480nm (ver "Materiales y Métodos"), generando un potencial de difusión con valinomicina (0.2 γ g) y concentraciones crecientes de KCl en un volumen de 907l (para evitar cambios en la absorbencia debidos a la dilución), en un medio que contenía HEC 20mM pH 6.8 y Cloruro de Colina

C.111.

En la Figura 10a, el potencial de difusión muestra que el cambio de absorbancia ($\Delta D.O.$) es lineal en función de la concentración de K^+ externo añadido, expresado como logaritmo de su concentración.

Para obtener la curva de calibración en unidades de potencial de membrana (mV) fue necesario conocer la concentración interna de K^+ de los cromatóforos. Esta concentración se obtuvo del mismo potencial de difusión (Figura 10a), continuando la recta hasta el valor de cero absorbancia en donde las concentraciones interna y externa de K^+ son las mismas, el valor encontrado fue de 1711.

El valor interno de K^+ fue necesario para aplicarla en la ecuación de Nernst (ver esquema 4) en donde se obtienen los valores de potencial de membrana que corresponden a un determinado $\Delta D.O.$, mostrándose en la Figura 10b.

III.3.B. Efecto del tiempo de exposición a la luz sobre el cambio del caroteno.

La luz produce un cambio del caroteno ($\Delta D.O.$), que se traduce como la generación de un potencial de membrana (ΔE). De esta manera tiempos variables de exposición a la luz producirán incrementos en el cambio de absorbancia proporcionales al tiempo de exposición.

La Figura 11a (círculos) muestra la forma en la que incrementa el $\Delta D.O.$ al aumentar el tiempo de exposición a la luz en un medio que contiene Sacarosa 240mM, Tris Clc 10mM pH 8.0

y MgCl_2 2mM, llegando a la saturación al minuto de exposición a la luz.

En la misma figura (triangulos) se observa el mismo fenómeno anterior, la diferencia que se observa es un máximo en Δ D.O. menor, esto es debido a que el experimento se realizó en condiciones de síntesis de ATP, es decir el medio contenía además ADP 2mM y Pi 2mM, esto se deba probablemente a que el potencial generado por la luz es parcialmente consumido al sintetizarse ATP.

En la Figura 11b se representa el experimento anterior en unidades de potencial de membrana (mV). El $\Delta\psi$ en condiciones saturantes de luz fue de 100mV y en un medio adecuado para la síntesis el valor máximo fue de 46mV.

III.3.C. Cambio del caroteno inducido por ATP.

El cambio del caroteno también es inducido al añadir ATP o PPI a los carotenóforos (91). Proponiéndose a ambos compuestos como donadores de energía, de tal forma al hidrólizarse el ATP el flujo de electrones procederá en sentido inverso resultando en un cambio del estado estacionario de oxidación de los acarreadores de electrones, incluyendo citocromos. Por otro lado este cambio de absorberencia que observa Saltchaffsky en la región de los carotenos es inhibida por oligomicina cuando se añade ATP y no cuando se añade PPI.

En la Figura 12 se muestra el cambio del caroteno inducido por ATP que nosotros observamos, que es probablemente debido a la hidrólisis de ATP, esto se demuestra en los siguientes experimentos:

a) En la Figura 12a se observa un cambio de absorberencia cuando

se le añade 200 γ M de ATP a los cromatóforos, el cual es abatido al agregar el desacoplante FCCP.

b) Teniendo como antecedente que la oligomicina es un inhibidor de la ATPasa que impide la hidrólisis de ATP acoplada y por lo tanto la generación de un gradiente electroquímico que provoque un cambio del caroteno, se incubaron a los cromatóforos (10 γ g) durante 15 min a 37°C con oligomicina, posteriormente se añadió 200 γ M de ATP y no se observó ningún cambio de absorbencia (Figura 12b).

c) Al agregar oligomicina en cromatóforos inducidos con ATP, se observa una inhibición paulatina en la absorbencia de los cromatóforos (Figura 12c). Observándose que al añadir otra vez ATP (200 γ M en 10 γ l) hay un cambio de absorbencia debido a un factor de dilución como se muestra después.

Los resultados de Baltscheffsky y nuestros experimentos indican que el cambio del caroteno inducido por ATP, es debido al funcionamiento de la ATPasa en sentido hidrolítico y acoplado, por lo tanto formando un gradiente electroquímico de membrana, el cual puede ser abatido por FCCP y prevenido por oligomicina.

Por otro lado se intentó medir el cambio del caroteno en condiciones de vacuolización (ATP, ADP, Pi y $MgCl_2$), y se encontró que el cambio es tan pequeño que se encuentra dentro del ruido del experimento, lo que hizo difícil su determinación.

III.3.C. Efecto de la Concentración de ATP en la generación del $\Delta\psi$.

En la Figura 13 se muestra una curva de concentración de ATP

y su efecto sobre el cambio del caroteno expresado tanto como $\Delta\psi$ y $\Delta D.C.$. Se observó un incremento de ambos valores al aumentar la concentración de ATP hasta llegar a la saturación. Este estado de saturación es debido quizás a un equilibrio entre la velocidad de bombeo de H^+ de la ATPasa, con las diversas fugas cuando se forma el gradiente. Esto es un experimento representativo de los 3 que se hicieron.

En la Tabla II, se muestran otros valores de $\Delta\psi$ obtenidos en cromatóforos de bacterias fotosintéticas, en donde podemos observar que los valores de $\Delta\psi$ en la luz están en el rango de 75-300mV, y en la oscuridad de 10mV, más de 10 veces de diferencia.

III.4. SENSIBILIDAD AL DESACOPLANTE FCCP.

Las reacciones de síntesis de ATP y recambio ATP-Pi, dependen de la generación de un potencial electroquímico, su sensibilidad a los desacoplantes podría dar indicio sobre la naturaleza de ambas reacciones. Por ello, se determinó la sensibilidad del desacoplante FCCP de ambas reacciones, así como sobre el el cambio del caroteno inducido por luz y por ATP.

III.4.A. Sensibilidad al FCCP sobre las reacciones de fotofosforilación y el recambio ATP-Pi.

En la Figura 14 se muestra la sensibilidad al FCCP de las reacciones de fotofosforilación y recambio ATP-Pi graficando en las abscisas el logaritmo de la concentración de FCCP y en las

ordenadas la actividad expresada en forma porcentual. Con círculos llenos se representa la reacción de fotofosforilación, los círculos vacíos representan al recambio ATP-Pi, las dos reacciones presentan una misma pendiente.

Con lo anterior se observó que la sensibilidad al FCCP de las dos reacciones es la misma, con un 50% de inhibición (I_{50}) de 4nM de FCCP. El 100% de actividad en la fotofosforilación es de 500nmoles de ATP $mg\text{ECI}^{-1} 10\text{min}^{-1}$ y en el recambio ATP-Pi es de 75nmoles de ATP $mg\text{ECI}^{-1} 10\text{min}^{-1}$.

III.4.E. Sensibilidad del FCCP sobre el cambio del caroteno.

La sensibilidad al FCCP en el cambio del caroteno por luz y por ATP se muestra en la Figura 14, observándose lo siguiente:

a) El Δ D.O. inducido por luz es diez veces mayor que el inducido por ATP, tomando en cuenta que el cambio del caroteno sin añadirle FCCP en el inducido por luz es igual que cuando se añade 1nM de FCCP; y en el caso del control del cambio del caroteno inducido por ATP (407nM) es de 0.018 solo un poco superior al equivalente titulado con 10pM de FCCP.

b) El cambio del caroteno inducido por ATP, es más sensible al FCCP ya que con una concentración de FCCP de 10nM se abate la señal en su totalidad. En contraste con la señal inducida por luz que se abate con concentraciones de FCCP entre $1-10^7$ nM.

c) La I_{50} para el FCCP del cambio del caroteno inducido por luz es de 500nM y para el inducido por ATP es de 200pM.

Los resultados de la sensibilidad al FCCP de las reacciones de fotofosforilación y el recambio ATP-Pi muestran una inhibición similar al dosaceplanta, en contraste con la sensibilidad al FCCP

sobre el cambio del caroteno inducido por luz que es 10 veces mayor que el inducido por ATP y como consecuencia la sensibilidad al FCCF es casi una unidad de diferencia.

Hasta aquí podemos pensar que los fenómenos del cambio del caroteno inducidos por ATP y por la luz y las reacciones de síntesis de ATP, recambio ATP-Pi e hidrólisis de ATP, se pueden dividir en dos. La primera se refiere a los experimentos realizados en la luz, la síntesis de ATP y su respectivo cambio del caroteno ya que ambos requieren de un potencial de membrana. La segunda se refiere a los fenómenos realizados en la obscuridad, la hidrólisis de ATP y el cambio del caroteno inducido por esta reacción, la cual forma un gradiente de protones. Además la reacción de recambio ATP-Pi que es independiente de la hidrólisis.

En la Tabla III se simplifican los datos relevantes de este trabajo. Mostrándose la lista de actividades de las reacciones de fotofosforilación, recambio ATP-Pi e hidrólisis de ATP y los valores de potencial de membrana correspondientes. En donde se observa que la fotofosforilación es 4 veces mayor que el recambio ATP-Pi; y por otro lado hay una diferencia de 40 veces en el potencial eléctrico ($\Delta\psi$).

La diferencia en la magnitud del potencial eléctrico en la luz y en la obscuridad podría deberse a la capacidad a la capacidad de bombear protones. En condiciones de luz el potencial electroquímico se forma gracias a la cadena de transporte de

electrones. En contraste con los fermentos realizados en la oscuridad, en donde el potencial formado esta dado por la actividad hidrolitica de la ATPasa; pudiendo ser este el paso limitante. En favor a esta pensamiento este el dato de Salcedo (92) en cromatoforos de Es. rubrum en donde mide que la actividad hidrolitica de la ATPasa es muy pobre para poder sintetizar pirofosfato.

El potencial de membrana generado por la luz en condiciones de sintesis de ATP es menor que en ausencia de ADP y Pi. Este hecho correlaciona con los experimentos realizados por Saphon y colaboradores (93,94), quienes midieron un decremento en la sintesis de ATP al abatir paulatinamente el potencial electrico con valinomicina y KCl observandolo por medio del cambio del caroteno.

El potencial de membrana generado en la oscuridad en condiciones de recambio ATP-Pi no es detectable probablemente debido a que los protones bombeados por la ATPasa sean utilizados por la misma enzima para recambiar ATP, consumiendo el pequeño potencial formado.

Otro dato contrastante, es el hecho de que la sensibilidad al FCCP sobre las reacciones de fotofosforilación y recambio ATP-Pi sean iguales y la sensibilidad del cambio del caroteno por luz y por ATP sean tan diferentes. Podiendo implicar que ambas reacciones tienen un mismo requerimiento del potencial electroquimico, ya que el desecopianti abate tanto el $\Delta\psi$ como el $\Delta\mu$. Por otra lado el cambio del caroteno es más sensible al FCCP por ATP debido probablemente a que el potencial es pequeño.

IV) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1) Las reacciones de fotofosforilación y recambio ATP-Pi dependen de igual manera del potencial electroquímico de membrana, ya que se abaten sus actividades por medio del desacoplante FCCP.

La hidrólisis por el contrario, es estimulada con FCCP en un 50%.

2) La reacción de recambio ATP-Pi depende de la concentración de ATP y de ADP en el medio.

3) El potencial de membrana por luz (100mV) es mayor que en condiciones de síntesis de ATP (44mV).

4) El potencial de membrana en la obscuridad en condiciones de recambio ATP-Pi no es detectable a comparación de los 10mV en condiciones de hidrólisis de ATP.

En el estudio de un organismo, como el de una molécula, los científicos han tratado de explicarse los mecanismos por los cuales ocurren los procesos, así como los factores que los regulan.

El problema de conocer cual es el mecanismo de transferencia de energía y los factores que lo regulan, está dado a varios niveles. Un primer nivel podría ser como la impermeabilidad a protones de una membrana es capaz de acoplar el transporte de electrones con la síntesis de ATP. ¿Cómo un gradiente de protones puede regular la síntesis de ATP? ¿realmente la regula? ¿o regula ciertos pasos de la síntesis de ATP? ¿los demás son regulados por otros factores, como la concentración de sustratos? Es debido a

la magnitud del $\Delta\psi$, μ^+ que varia el número de protones que se trasladan para llevar a cabo la síntesis de ATP en las diferentes condiciones en la que viven las bacterias ?

Otro nivel más específico sería cómo a nivel molecular de la ATPasa se sintetiza el ATP ? Conocer el papel que desempeña cada subunidad.

Con todo lo anterior se puede dilucidar que son muchas las preguntas sin contestar y muchos los factores que no se pueden manejar al mismo tiempo, por lo que se investiga por partes.

Ilustras perspectivas son el conocer como el componente eléctrico ($\Delta\psi$) regula los procesos de síntesis de ATP y recambio ATP-ADP, los cuales se realizan en la misma enzima en condiciones diferentes. Y debido a que el $\Delta\psi$, μ^+ está formado también por el componente químico (ΔpH), por lo que sería conveniente analizar el proceso de estas reacciones con este componente.

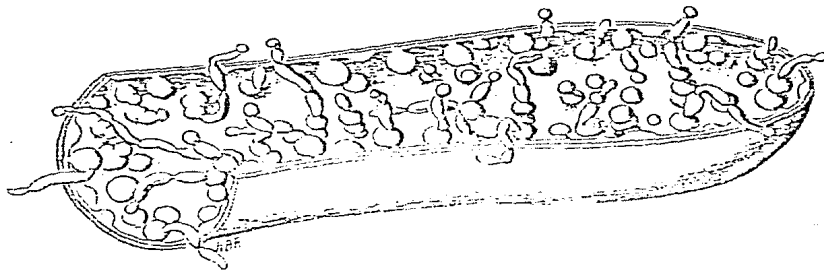
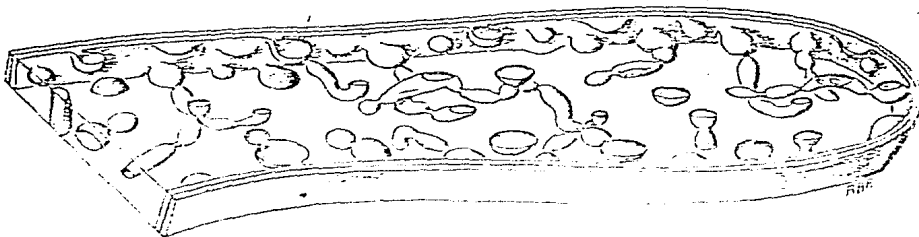


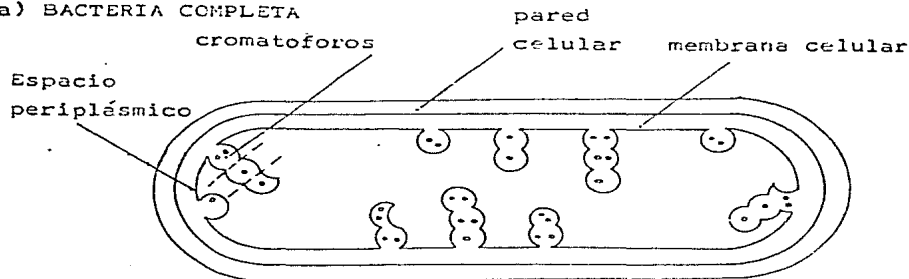
Figura 1: Representación gráfica de una micrografía estereoelectrónica en secciones.

De la Bacteria Fotosintética, edit: Clayton, R.K. y Sistrom, W.R.,
plenum, Nueva York, pag 35.

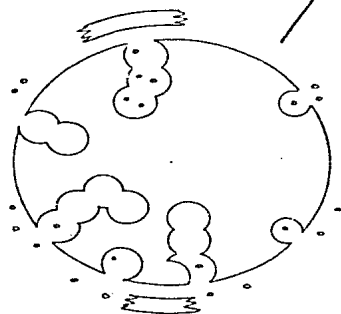
TABLA I: DESCRIPCION GENERAL DE LOS TRES GRUPOS DE BACTERIAS FOTOSINTETICAS.

Microorganismo	Bacterias verdes Sulfurosas	Bacterias purpuras Sulfurosas	No Sulfurosas
Clasificación Antigua	Chlorobacteriaceae	Thiorodaceae	Athiorodaceae
Clasificación Nueva	Chlorobiaceae	Chromatiaceae	Rhodospirillaceae
Generos Representativos	<u>Chlorobium</u> <u>Chloropseudomonas</u>	<u>Chromatium</u> <u>Thiospirillum</u>	<u>Rhodospirillum</u> <u>Rhodopseudomonas</u>
Pigmentos	Bacterioclorofila c ó d Carotenos monocíclicos		Bacterioclorofila a ó b Carotenos acíclicos
Fuente de poder reductor	H ₂ S, S, S ₂ O ₃ ó H ₂	H ₂ S, S, S ₂ O ₃ y compuestos orgánicos	Compuestos orgánicos H ₂ en pocas especies
Relación con el oxígeno	Anaeróbicos obligados	Anaeróbicos obligados	Aerobios facultativos
Crecimiento en la obscuridad	Ninguno	Ninguno	Si, cuando son aeróbicos
Tipo de crecimiento en la naturaleza	Masivo	Masivo	No masivo

a) BACTERIA COMPLETA

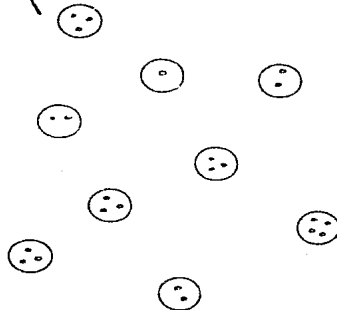


digestion con
lisozima



b) ESFEROPLASTO

ruptura mecánica
(sonicación)



c) CROMATOFOROS

Figura 2: Esquema general de las bacterias fotosintéticas.

a) Célula completa, b) Esferoplastos, obtenidos por tratamiento con lisozima que digiere la pared celular, c) Cromatoforos, obtenidos por medio de ruptura mecánica (sonicación) En círculos pequeños están representadas las proteínas periplásmicas como el citocromo bc_1 , que como se ve se queda incluido en el interior del cromatóforo.

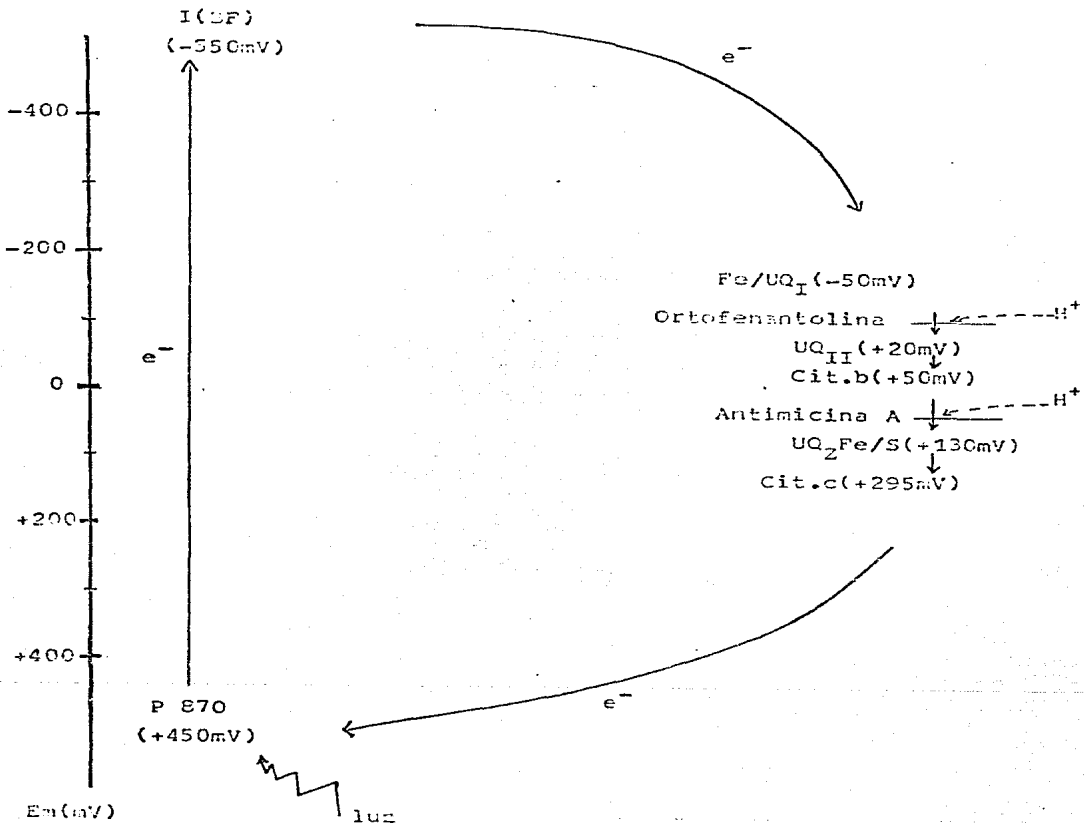


Figura 3: Esquema del transporte de electrones ciclico inducido en la luz y en ausencia de luz, de Rhp. sphaeroides.

Se muestran los sitios de inhibición de la ortofenantolina y antimicina A, así como los sitios de toma de protones. Entre paréntesis se indican los potenciales medios de oxidación-reducción.

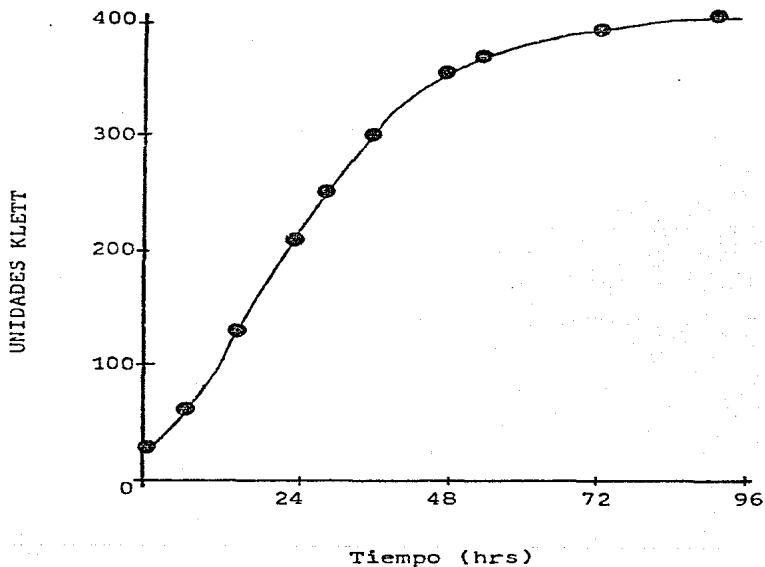


Figura 4: Curva de crecimiento de Rhodospirillum rubrum.

Medida en unidades Klett (unidades de absorbencia) en el medio R.S.C. en condiciones anaeróbicas en presencia de luz a 30°C, en un matraz nefelométrico de 250ml.

O.D = 0,1

CAROTENOS

BCI

720

850

480

500

450

575

400 nm

900 nm

Figura 5: Espectro de Absorción de los cromatóforos de Rhaz. sphaeroides. En el rango de absorción de 400-900nm.

a)

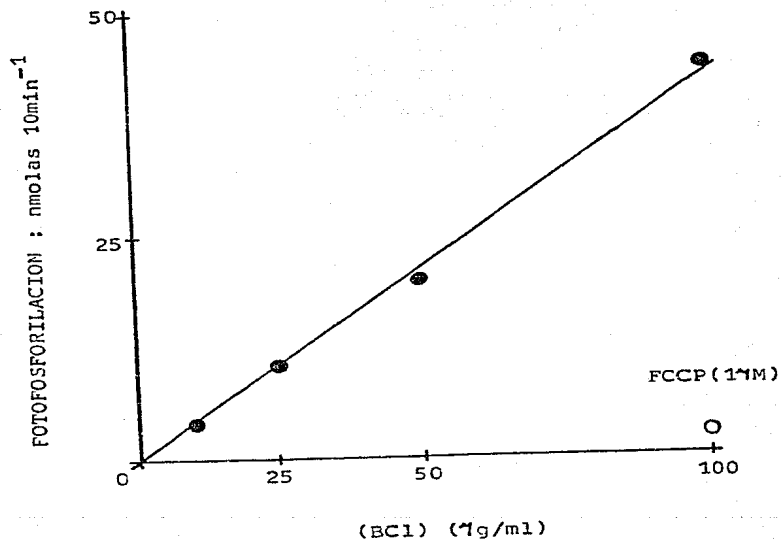


Figura 6a: Dependencia de la concentración de bacterioclorofila sobre la reacción de fotofosforilación.

Medio: Sacarosa 240mM, Tris DPC 10mM pH 8.0, MgCl₂ 5mM, ADP 2mM pH 7.4 y Na₂PO₄.

Mismas condiciones + 17M FCCP (O).

b)

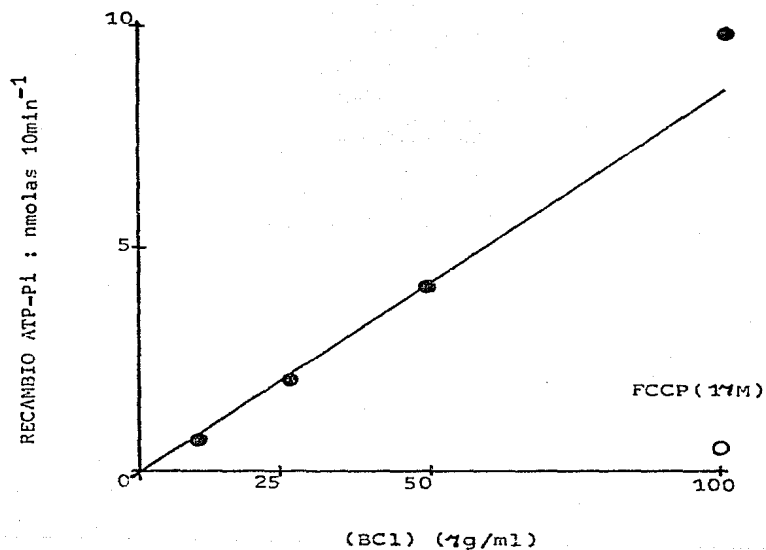


Figura 6b: Dependencia de la concentración de bacteriosclerofila sobre la reacción de recambio ATP-Pi.

Medio: Sacarosa 240mM, Tris DAc 10mM pH 8.0, ATP 2mM, ADP 0.05mM pH 7.4 y H₂PO₄ pH 7.4.

Mismas condiciones + 17M FCCP (O).

c)

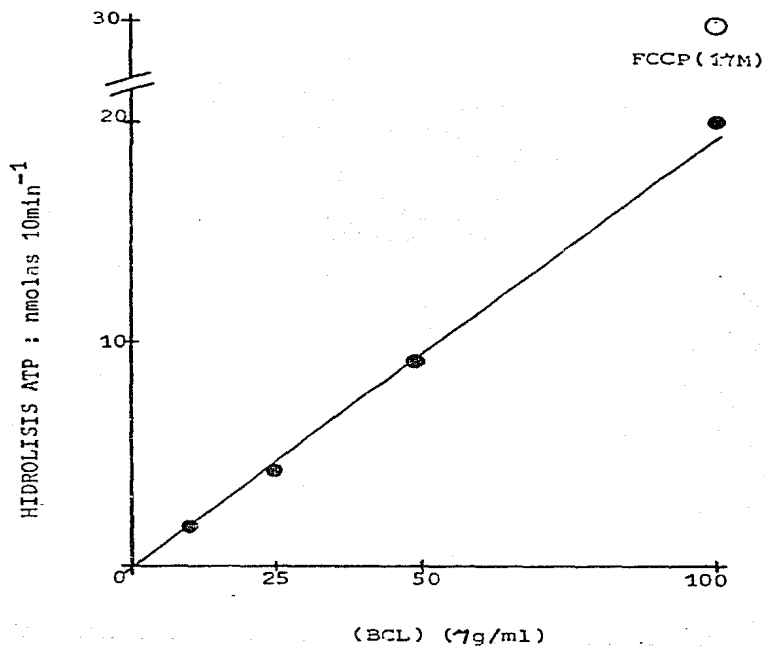


Figura 6c: Dependencia de la concentración de bacterioclorofila sobre la reacción de hidrólisis de ATP.

Medio: Sacarosa 240mM, Tris GAc 10mM pH 8.0, Mg₂Cl 5mM, ATP 2mM, ADP 0.05mM pH 7.6 y H₂PO₄ pH 7.4.

Mismas condiciones + 17M FCCP (○).

POTOFOSFORILACION : nmolas ATP mgBCl^{-1}

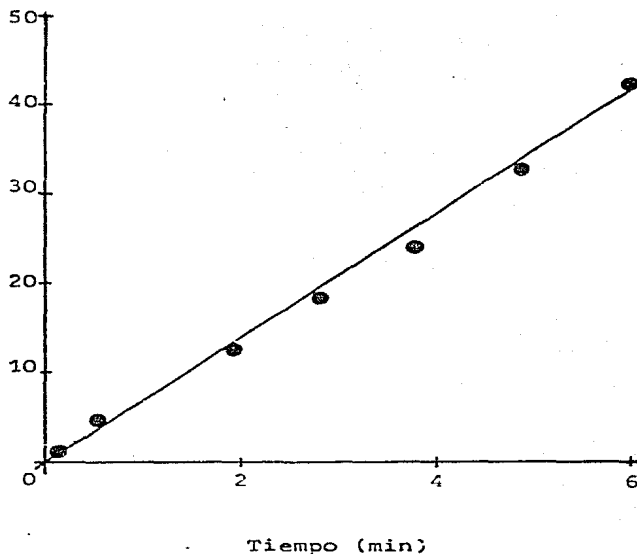


Figura 7: Síntesis de ATP en función del tiempo de exposición a la luz.

Medio: Sacarosa 240mM, Tris DAc 10mM pH 8.0, Mg_2Cl 2mM, ADP 2mM pH 7.4, H_2PO_4 2mM y 50 $\gamma\text{g/ml}$ de BCl.

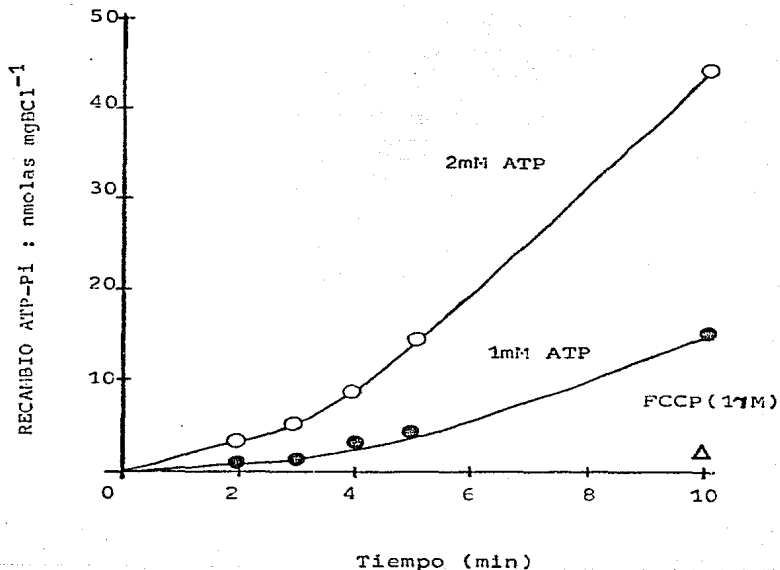


Figura 8: Efecto de la concentración de ATP sobre la reacción de recambio ATP-PI.

Medio: Sacarosa 240mM, Tris OAc 10mM pH 8.0, Mg₂Cl 2mM, ADP 0.005mM pH 7.4, H₂PO₄ 2mM pH 7.4, ATP 1mM (●) o 2mM (○) en 10 γ g/ml de BCl.

Misma condición + 17M de FCCP (Δ).

A los 10min se obtuvo una actividad de (●) de 15 nmolas mgBCI⁻¹ y (○) de 43 nmolas mgBCI⁻¹.

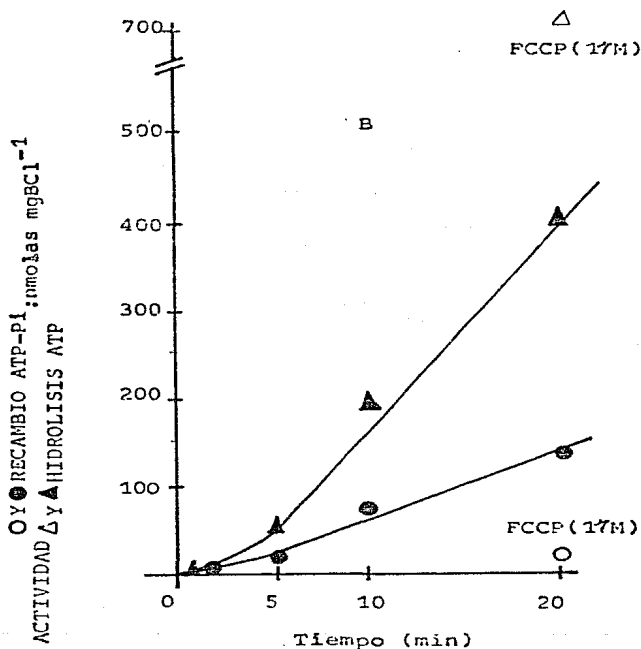


Figura 9B: Curso temporal de las reacciones de recambio ATP-Pi e hidrólisis de ATP.

Medio Sacarosa 240mM, Tris Clor 10mM pH 8.0, Mg₂Cl 5mM, ATP 2mM, ADP 0.05mM y H₂PO₄ pH 7.4 en 10 % g/ml de BCl.

Con (●) se representa la reacción de recambio ATP-Pi y (O) + 17M de FCCP.

Con (▲) se representa la hidrólisis y (Δ) + 17M de FCCP.

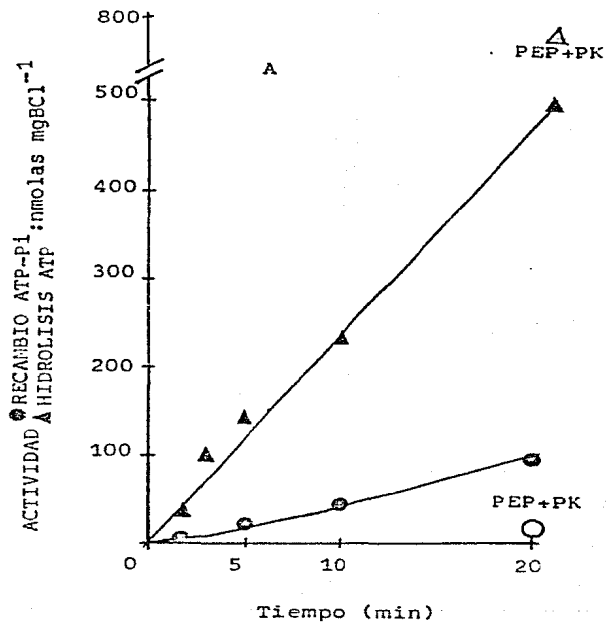


Figura 9A: Efecto del ADP sobre la reacción de recambio ATP-Pi.
 Medio: no contiene inicialmente ADP, Sacarosa 240mM, Tris GAG
 10mM pH 8.0, Mg₂ 2mM, H₂PO₄ 2mM pH 7.4, ATP 2mM, en 10⁷g/ml de
 BCl.
 Mismas condiciones: PEP y PK (símbolos vacíos)
 A los 40 min se obtuvo una actividad (●) de 300nmolas mgBCI⁻¹ y
 de (▲) 1,140nmolas mgBCI⁻¹.

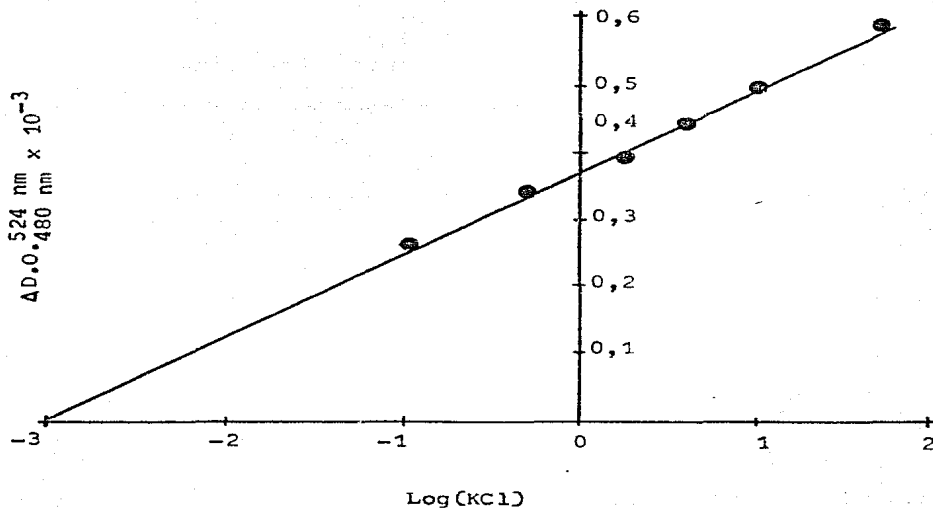


Figura 10a: Gradiente de difusión con valinomicina + KCl:
Magnitud del gradiente vs Δ D.O..

Medios: valinomicina (0.2%) y diferentes concentraciones de KCl en una suspensión de cromatóforos (10 g/ml BCl) en MES 20mM pH 6.4 y Cloruro de Colina 0.1M.

Midiendo el cambio del espectro a 524-480nm.

$\Delta D_{0.524 \text{ nm}} \times 10^{-3}$
 $\Delta D_{0.480 \text{ nm}}$

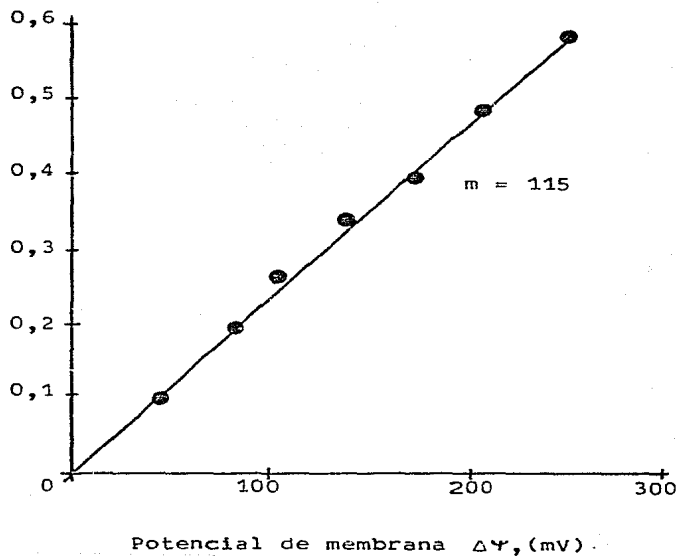


Figura 10b. Curva de calibración del potencial de membrana.

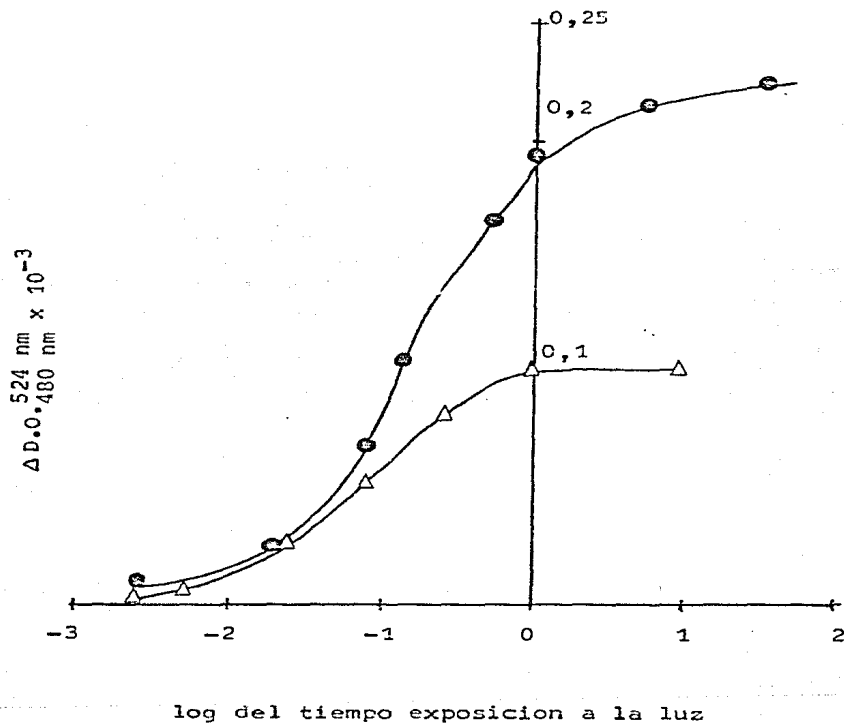


Figura 11a: Efecto del tiempo de exposición a la luz sobre el cambio del caroteno.

Medio: Sacarosa 240mM, Tris GAG 10mM pH 8.0 y Mg_2Cl 2mM en (●), y en (Δ) el medio anterior + ADP 2mM pH 7.4 y H_2PO_4 pH 7.4.

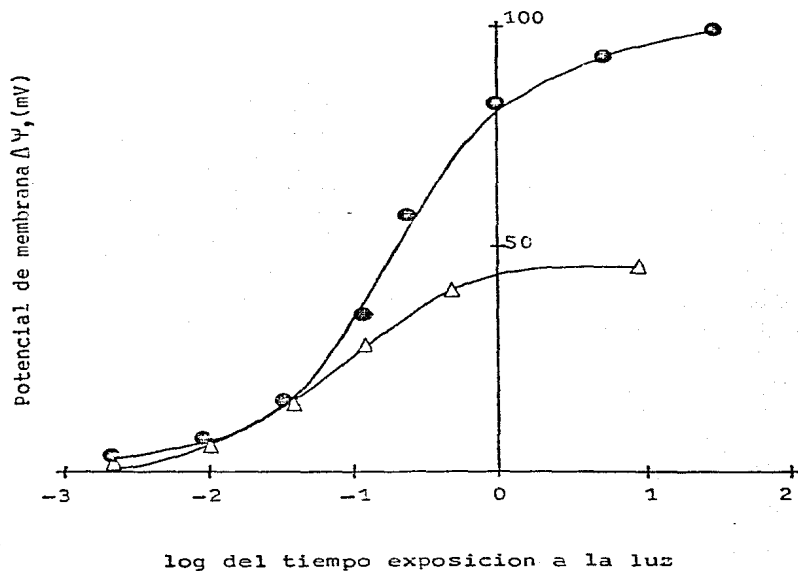
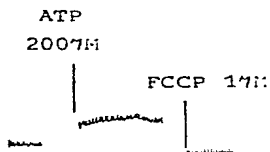


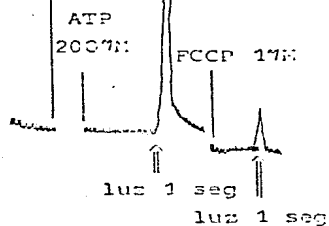
Figura 11b: Efecto del tiempo de exposición a la luz sobre el potencial de membrana.

a)



b)

Oligo 57g
incub. 15 min a
37°C



100 seg/pulg

CG=0,01

c)



100 seg/pulg

CG=0,001

Figura 12: Estimulación del cambio del caroteno por la hidrólisis de ATP en la oscuridad.

- a) Inducción del cambio del caroteno al añadir ATP (200 μ M), abatido por FCCP (17 μ M).
- b) Inhibición del cambio del caroteno por oligomicina (57g), al preincubarlos durante 15min a 37°C y su efecto con la luz.
- c) Inhibición paulatina del cambio del caroteno inducido por la hidrólisis de ATP al añadir oligomicina (57g).

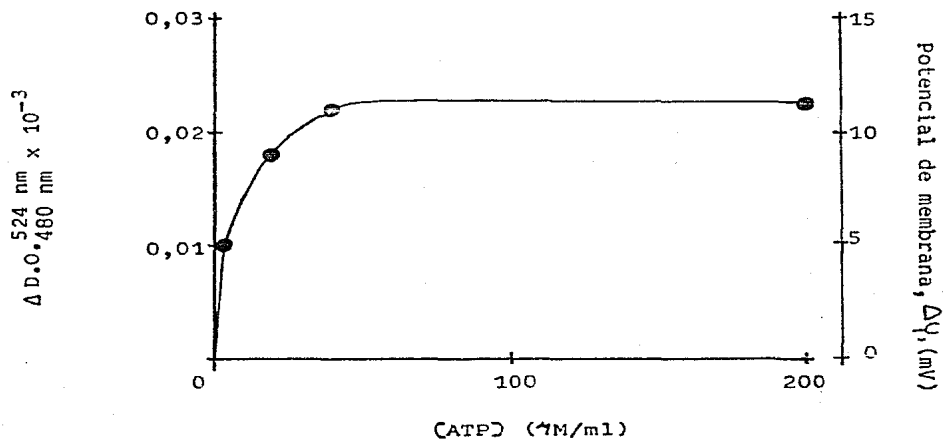


Figura 13: Generación de un potencial de membrana por la hidrólisis de ATP en la oscuridad.

Medio: Sacarosa 240mM, Tris GAc 10mM pH 8.0, Mg_2Cl 2mM y 10% de BCl.

TABLA II: VALORES DE $\Delta\psi$ MEDIDOS ESPECTROFOTOMETRICAMENTE EN CROMATOFOROS

Sistema	Medido en	Pruebas usadas	Condiciones del ensayo	$\Delta\psi$ mV	Referencia
<u>Rdp.capsulata</u>	luz	Caroteno	pH 7.8, 50mM K_2SO_4	180	(39)
	luz	Caroteno	pH 8.0, 5mM $MgCl_2$, 25mM NaCl $3 \cdot 10^{-6}$ M T B ₁	140	(93)
<u>R. rubrum</u>	luz	ANS	pH 8.0, 4mM $MgCl_2$	109	(94)
	luz	Caroteno	pH 6.4, 100mM Cl-colina	190	(43)
	luz	Caroteno	pH 7.4, 5mM $MgSO_4$, 100mM NaCl	195	(95)
<u>Rdp.sphaeroides</u>	luz	Caroteno	pH 7.5, 5mM $Mg-Ac$	300	(96)
	luz	Caroteno	pH 8.5, 2mM $MgCl_2$, 50mM KCl 1mM EDTA, 0.2mM Na-succinato	178	(97)
	obscuridad	Caroteno	pH 8.5, 2mM $MgCl_2$, 50mM KCl 1mM EDTA, 0.2mM Na-succinato	10	(97)
	luz	Caroteno	pH 8.0, 5mM $MgCl_2$, 2mM Pi 2mM ADP	44	Este trabajo
	obscuridad	Caroteno	pH 8.0, 5mM $MgCl_2$, 2mM ATP 0.05mM ADP, 2mM Pi	N.O.	Este trabajo
	luz	Caroteno	pH 8.0, 5mM $MgCl_2$	100	Este trabajo
	obscuridad	Caroteno	pH 8.0, 5mM $MgCl_2$, 2mM ATP	10	Este trabajo

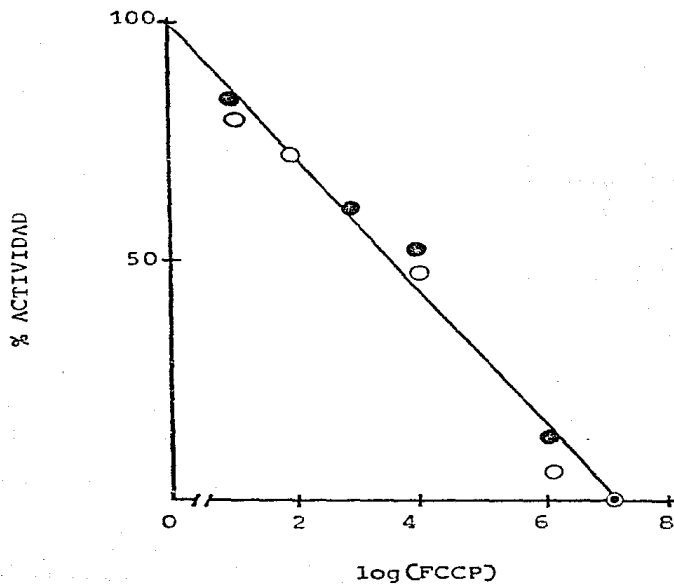


Figura 14: Inhibición de las reacciones de fotofosforilación y el intercambio ATP-ADP por el desacoplante FCCP. Representado en % de actividad, en (●) la fotofosforilación y con (○) el intercambio ATP-ADP.

A.D. 0.524 nm x 10⁻³
0.480 nm

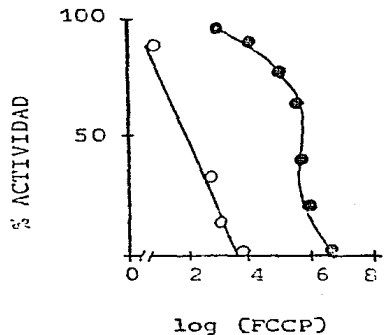
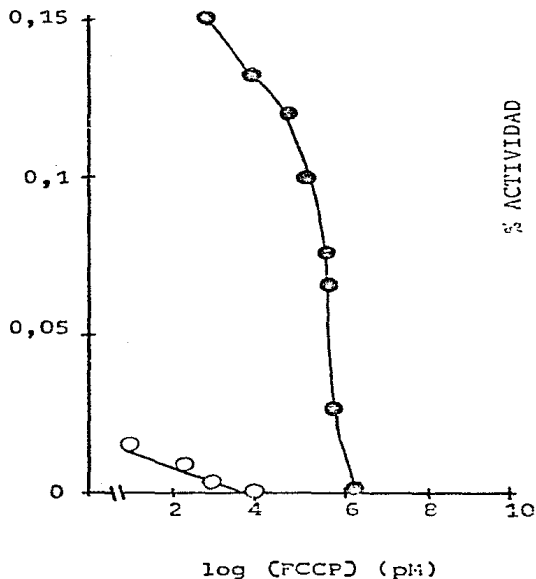


Figura 13: Sensibilidad al FCCP del cambio del caroteno inducido por luz y por la hidrólisis de ATP.

Medio: Sacarosa 240mM, Tris Cl₂ 10mM pH 8.0, Mg₂Cl 2mM y 10 μ BCl. y 10⁻⁷M de ATP.

En el recuadro se muestra el decaimiento de la señal del caroteno en% de actividad por FCCP.

TABLA III: ACTIVIDADES DE LAS TRES REACCIONES, CON SUS VALORES DE $\Delta\psi$

Reacción	Velocidad ^a	$\Delta\psi$ en mV
Fotofosforilación	300	44
Recambio ATP-Pi	75	N.O.
Hidrólisis de ATP	165	10
Illuminación continua ^b		100

^a La actividad de las reacciones en $\text{nmolas mgBCL}^{-1} 10 \text{ min}^{-1}$.

^b Las condiciones fueron en presencia de Sacarosa 240mM, Tris OAc 10mM pH 8.0 y Mg_2Cl 2mM, en iluminación continua.

IV) REFERENCIAS

- 1.- van Niel, C.B. (1935), Photosynthesis of Bacteria, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 3:133-150.
- 2.- van Niel, C.B. Rhodobacterium en el Manual de Bergery de Determinación Bacteriológica, Séptima Edición, edit. Reed, R.D.
- 3.- Murray, E.G.D. y Smith, H.R. (1957), Williams y Wilkins, Baltimore pag.35-47.
- 4.- Frenning, N. y Trüper, H.G., (1974) Manual Bergery de Determinación Bacteriológica, Séptima Edición, edit. Buchanan, R.E. y Gibbons, W.E. Williams y Wilkins, Baltimore pag. 24-27.
- 5.- Cohen-Baziano, G. (1963), La Bacteria Fotosintética, edit. M. Gest, A. San Pietro, y L.F. Vernon, pag.67-110.
- 6.- Avron, H. (1967), Curr. Top. Bioenerg. 2:1-19.
- 7.- Cohen-Baziano, G., Frenning, N. y Kunisawa, R. (1963), J. Cell Biol. 22:207-225.
- 8.- Feller, G.F., Magent, H.A. y Fuller, R.C. (1971), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68:2278-2282.
- 9.- Trüper, H.G. y Park, H.D. Jr. (1970), Arch. Mikrobiol. 73:125-142.
- 10.- Kaiser, F. (1934), Rev. Esol. Biol. vol T III:109-472.
- 11.- Frankel, A. (1931), J. Am. Chem. Soc. 75:3335-3339.
- 12.- Frankel, A. (1932), J. Biol. Chem. 22:623.
- 13.- Clayton, R.K. Wang, R.T. (1971), En Methods of Enzymology, edit. San Pietro, A. Academic Press, Nueva York.
- 14.- Hausorall, D. (1972), Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 31:365.
- 15.- Reed, D.W. y Peters, G.A. (1972), J. Biol. Chem. 247:7148-7152.
- 16.- Streley, S.C., Parson, H.W., Hausorall, D.C. y Clayton, R.K. (1973), Biochim. Biophys. Acta 305:397-407.
- 17.- Cogdell, R.J., Parson, H.W. y Kerr, M.A. (1976), Biochim. Biophys. Acta 450:63-70.
- 18.- Shamura, H.Y., Isaacson, R.A. y Fahn, G. (1975), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3491-3495.

- 17.- Crozzi, M., Bodmer, S. y Buchofen, R. (1960), En La Primera Conferencia Europea de Bioenergética, Editorial Patron, Bologna, pag. 33.
- 18.- Blackenship, R.E. y Parson, W.W. (1977), Biochim. Biophys. Acta 515:427-444.
- 19.- Baccarini-Molanderi, A. y Molanderi, A. (1977), FEBS Lett. 90:137-139.
- 20.- Frinds, R.C., Baccarini-Molanderi, A., Hauska, G., Molanderi, B.A. y Crozzi, M. (1978), Biochim. Biophys. Acta 567:212-227.
- 21.- Tompaugh, D.L. y Edwards, C.A. (1977), S. Biol. Chem. 254:877-879.
- 22.- Leach, P.A. (1966), Biochemistry 5:592-600.
- 23.- Clayton, R.K. y Straley, G.D. (1972) Biophys. J. 12:1221.
- 24.- Fajer, J., Bruns, D.C., Davis, N.S., Forman, A. y Spaulding, L.D. (1970), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67:4758-4760.
- 25.- Clayton, R.K., Sealed, E.D. y Fleming, H. (1972), Biophys. J. 12:64-77.
- 26.- Dutton, P.L. y Wilson, D.F. (1974), Biochim. Biophys. Acta 346.
- 27.- Arvora, D.I., Allen, H.D. y Whalley, P.R. (1954), Nature 174:374-376.
- 28.- Slater, E.C. (1955) Nature 172:975.
- 29.- Mitchell, P. (1961), Nature 191:144-146.
- 30.- Mitchell, P. (1966), Glyc. Res. Dodain. U.K.
- 31.- Mitchell, P. (1967), Natural Fuel. Cells and Solar Cells, Fed. Proc. 26:1370-1379.
- 32.- Williams, R.J.P. (1961), J. Theor. Biol. 1:1.
- 33.- Williams, R.J.P. (1974), FEBS Lett. 53:123.
- 34.- Williams, R.J.P. (1970), FEBS Lett. 55:9.
- 35.- Boyer, P.D. (1965), En Oxidación y Sistemas Redox, edit. King, T.E., Nasson, H.C. y Horrisson, M. 2:974, Wiley, Nueva York.
- 36.- Zaltschafsk, Z. y van Stedingh, L.V. (1966), en Currents in Photosynthesis, edit. Thomas, S.D. y Goodhear, J.C. 253-261 Ad. Denker, Rotterdam.

- 38.- Casadio, R., Faccarini-Molanderi, A., Molanderi, P.A. (1974), Eur. J. Biochem. 47:121-123.
- 39.- Leizer, H. y Gromet-Elihanan, Z. (1977), Arch. Biochem. Biophys. 178:79-89.
- 40.- Leizer, H. y Gromet-Elihanan, Z. (1975), J. Biol. Chem. 250:84-87.
- 41.- Duxson, L.H.H. (1957), Research in Photosynthesis, edit. Saffron, H., Brown, A.H. et al., Interscience, Nueva York. 134-173.
- 42.- Jackson, J.B. y Crofts, A.R. (1969), FEBS Lett. 4:188-189.
- 43.- Crofts, A.R. y Jackson, J.B. (1971), en El Transporte de electrones y la Conservación de la energía, edit. Tager, J.M., Papa, S., Cuagliaricello, E. y Slater, E.C., Adriatica, Bari 383-400.
- 44.- Jackson, J.B. y Crofts, A.R. (1971), Eur. J. Biochem. 18:120-130.
- 45.- Baltscheffsky, H. (1967), Biochem. Biophys. Res. Commun. 28:270-276.
- 46.- Matsuda, K., Masamoto, K., Itsh, S. y Nishimura, M. (1979), Biochim. Biophys. Acta 547:71-80.
- 47.- Faccarini-Molanderi, A., Casadio, R. y Molanderi, P.A. (1977), Eur. J. Biochem. 78:337-402.
- 48.- Jagendorf, A.T. y Uribe, E. (1966), Fotofosforilación y la Hipótesis Quimiosmótica, Simposio Copenhague en Biol. 10:215-211.
- 49.- Leizer, H. y Gromet-Elihanan, Z. (1974), FEBS Lett. 43:267-270.
- 50.- Leizer, H. y Gromet-Elihanan, Z. (1974), Proceedings of the Third International Congress on Photosynthesis, edit. Avron, H. Elsevier, Amsterdam. 741-740.
- 51.- Gromet-Elihanan, Z. (1977), Trends in Biochem. Sci. 2:274-277.
- 52.- Gaphon, S., Jackson, J.B., Lorke, V. y Witt, H.T. (1975), Biochim. Biophys. Acta 408:59-61.
- 53.- Gaphon, S., Jackson, J.B. y Witt, H.T. (1975), Biochim. Biophys. Acta 408:47-52.
- 54.- Mitchell, P. (1964), Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 41:445-502.

- 56.- Racker, E. (1970), *Int. Membranes de la Mitochondria y Cloroplasto*, edit. Racker, E. van Nostrand Reinhold, Nueva York pag. 121-171.
- 57.- Melandri, B.A., Baccarini-Melandri, G., San Pietro, A. y Gest, H. (1971), *Science* 174:514.
- 58.- Baccarini-Melandri, G. y Melandri, B.A. (1972), *FEBS Lett.* 21:131.
- 59.- Lee, H. y Orsellius, (1961), *Exp. Cell. Res.* 35:431.
- 60.- Fernandez-Molina, W. (1962), *Circulation* 26:1039.
- 61.- Reed, D.H. y Raveed, D. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 292:79.
- 62.- Prince, R.C., Baccarini-Melandri, G., Hauska, G.A., Melandri, B.A. y Crofts, A.R. (1975), *Biochim. Biophys. Acta* 387:212.
- 63.- Baccarini-Melandri, G., Gest, H. y San Pietro, A. (1970), *J. Biol. Chem.* 245:1224.
- 64.- Melandri, B.A., Baccarini-Melandri, G., Gest, H. y San Pietro, A. (1971), *Trasducción de Energía en la Respiración y en la Fotosíntesis*, edit. Quaglianella, E., Papa, S. y Rossi, S.S., Ediciones Edilrice Eari, Italia, pag. 573.
- 65.- Johannsson, B.E. y Baltchoffsky, H. (1975), *FEBS Lett.* 50:221.
- 66.- Kagawa, N., Sano, H., Hirata, H. y Yoshida, H. (1979), *Trends Biochem. Sci.* 4:31-33.
- 67.- Johannsson, B.E., Baltchoffsky, H., Baltchoffsky, J., Baccarini-Melandri, G. y Melandri, B.A. (1973), *Eur. J. Biochem.* 30:133.
- 68.- Fullam, M.E. y Kenney, G.C. (1963), *J. Biol. Chem.* 238:3742-3749.
- 69.- Klein, S., Sabro, M., Dianzani, A.C. y Vignais, P.V. (1981) *Biochemistry*, 20:1337-1344.
- 70.- Harris, D.A. y Crofts, A.R. (1978), *Biochim. Biophys. Acta* 502:87-102.
- 71.- Gomez Puyou, M.T., Müller, U., Dreyfus, G., Ayala, G. y Gomez-Puyou, A. (1973), *J. Biol. Chem.* 248:13490-13494.
- 72.- Nelson, H., Nelson, H. y Racker, E. (1972), *J. Biol. Chem.* 247:7457-7462.
- 73.- Salt, J.D. y Sternella, R.C. (1977), *Biochemistry* 16:304-311.

- 74.- Drayfus, G. y Satre, M. (1964) Arch. Biochim. Biophys. 107:212-217.
- 75.- Gromet-Elkhanan, Z., Philosoph, G. y Khanaschilidze, D. (1961), Biochim. Biophys. Acta 101:324-327.
- 76.- Horio, T., Nishikawa, K., Katsunata, H. y Yamashita, J. (1965), Biochim. Biophys. Acta 94:371-382.
- 77.- Horio, T., Nishikawa, K. y Yamashita, J. (1969), J. Biochem. 55:327.
- 78.- Baltscheffsky, H., von Bidding, L.V., Heldt, H.W. y Klingenberg, H. (1968), Science 163:1120.
- 79.- Keister, D.L. y Minton, N.J. (1971), Arch. Biochem. Biophys. 147:330.
- 80.- Keister, D.L., Minton, N.J. (1971), Biochem. Biophys. Res. Commun. 42:732.
- 81.- Cohen-Salim, S., Sigism, W.D., Stainer, R.V. (1957), J. Cell Comp. Physiol. 49:29.
- 82.- Haines, D.H. (1960), J. Gen. Microbiol. 4:286-293.
- 83.- Clayton, R.K. (1963), Biochim. Biophys. Acta 75:312.
- 84.- Itzhaki, R.F. y Gill, D.M. (1964), Anal. Biochem. 9:401-410.
- 85.- Boyer, P.D. y Bryan, D.M. (1967), Methods of Enzymology 10:60-71.
- 86.- Glynn, I.M. y Chappel, J.B. (1964), Biochem. J. 90:147.
- 87.- Hachman, A. y Carmeli, S., (1973) Photosynthetica 7:238-245.
- 88.- Baltscheffsky, H. y Baltscheffsky, M. (1960), Acta Chemica Scandinavica 14:237-238.
- 89.- Drayfus, G. (1965), J. Biol. Chem. 240:12112-12117.
- 90.- Kayalar, C., Koding, J. y Boyer, P.D., (1977), J. Biol. Chem. 252:2486-2491.
- 91.- Baltscheffsky, H. (1967), Nature 216:241-243.
- 92.- Tesis maestra de Ruben Salcedo.
- 93.- Sacadot, R., Venturini, S. y Melandri, B.A. (1981) Photobiochem. Photobiophys. 2:245-253.
- 94.- Lohse, H. y Gromet-Elkhanan, Z. (1977), Arch. Biochem. Biophys. 170:72-80.

- 95.- Matsumura, M., Ishikawa, T. y Nishimura, M. (1990), *Biochim. Biophys. Acta* 100:133-144.
- 96.- Ferguson, S. J., Jones, O. T. D., Kell, D. R. y Gergely, M. G. (1970), *Biochem. J.* 100:75-80.
- 97.- Melandri, D. A. y Casadio, R., *MEMBRANA (ATP sintasoma): Estructura, función, biogénesis del complejo FO1 en membranas acopladas.* Edita: Papa, G., Alferdenf, K., Srinivasan, y Pachter, G. 1984, Prensa ICCU.