



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Modificación Química en Membrana de Tilacoide
por el Reactivo Bifuncional Dimercapto Acetato
de Etilen Glicol.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C O

P R E S E N T A :

GRACIELA AGUILERA SUAREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

TESIS 1979
M.T. 9
FECHA _____
PROC. _____
S. _____



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

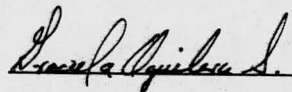
Presidente	Dra. Estela Sanchez de Jiménez
Vocal	Dr. Alejandro Blanco Labra
Secretario	Dr. Blas Lotina-Hensen
1 ^{er} Suplente	Dr. Mauro Cruz Morales
2 ^o Suplente	Dra. Silvia Tejeda Castañeda

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Departamento de Bioquímica
División de Estudios Superiores
Facultad de Química

Sustentante:

Graciela Aguilera Suárez



Asesor del tema:

Blas Lotina-Hensen



A mis padres

Agradecimientos:

Al Dr. Blas Lotina-Hennsen le agradezco profundamente su valiosa crítica y constante estímulo, los cuales hicieron posible la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Richard Dilley por sus fructíferas discusiones y aclaraciones de diversos problemas.

Al Dr. Alejandro Blanco por la orientación y estímulo que me brindó en repetidas ocasiones.

A la Dra. Estela Sanchez por la valiosa revisión hecha a esta tesis.

A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica, en especial al Q.F.B. Carlos Arias, en quienes siempre encontré ayuda tanto técnica como humana.

A mis padres Gerardo Aguilera y Graciela S. de Aguilera quienes a lo largo de mi vida me han brindado todo el apoyo y estímulo que necesité para mi desarrollo humano y profesional.

A mi compañero Miguel, a mis padres y a mis hermanos por haberme ayudado para la culminación de este trabajo.

CONTENIDO

	Página
ABREVIATURAS	3
I. INTRODUCCION	5
II. GENERALIDADES	11
1. Sistema de Pigmentos	14
2. Transporte de Electrones	19
3. Compuestos Generados en el Transporte de Electrones	26
4. Fijación de CO ₂	28
5. Organización Estructural de los Componentes Moleculares en la Membrana del Tilacoide	32
6. Mecanismo de la Síntesis de ATP	42
7. Inhibidores y Desacoplantes del Transporte de Electrones y de la Fotofosforilación	50
III: MATERIAL Y METODOS	55
1. Aislamiento de los Cloroplastos	56
2. Determinación de la Clorofila	58
3. Reacción de los Cloroplastos con el Reactivo Bifuncional DAEG	59
4. Medición del Transporte de Electrones (Reacción de Hill)	59
5. Determinación de la Síntesis de ATP	61
IV. RESULTADOS	63
V. DISCUSION	72

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ADP, ATP	Adenosín di y trifosfato
Asc	Ascorbato
BSA	Albúmina de suero bovino
BDHB	n-Butil-3,5-diyodo-4-hidroxi- benzoato
C ₅₅₀	Compuesto con una banda de absorción a 550 nm
CCP	Carbonilcianuro m-clorofenilhidra- zona
CF ₁ (o)	Factor de acoplamiento 1 (o) para los cloroplastos
Clo a (b)	Clorofila a (b)
Cit	Citocromo
DABS	ácido diazoniobencensulfónico
DAEG	Dimercapto acetato de etilén-glicol
DBMIB	2,5-Dibromo-3-metil-6-isopropil-p- benzoquinona
DCIP	2,6-Diclorofenolindofenol
DCMU	3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-dimetil- urea
DMQ	2,5-Dimetil-p-benzoquinona
DNA	Acido desoxirribonucleico
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
E°	Potencial de óxido-reducción a pH 7
FAD	Flavín adenín dinucleotido
FCCP	Carbonilcianuro p-trifluorometoxi- fenilhidrazona
Fd	Ferredoxina

HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico
MV	Metilviológeno
NADP (NADPH)	Nicotinamin adenin dinucleotido oxidado (reducido)
NEM	N-etilmaleimida
PD	Feniléndiamina
PS I (II)	Fotosistema I (II)
P ₆₈₀₋₆₉₀	Centro de reacción de PS II
P ₇₀₀	Centro de reacción de PS I
P ₄₃₀	Aceptor electrónico de PS I (pigmento con una banda de absorción a 430 nm)
PC	Plastocianina
Pi	Fósforo inorgánico
Pq	Plastoquinona
PMS	Fenazina metasulfato
ϕ	Aceptor de electrones primario
R	Ferredoxin-NADP-reductasa
RuDP--carboxilasa	Ribulosa-1,5-difosfatocarboxilasa (carboxidismutasa)
SRF	Sustancia reductora de la ferredoxina
TAPS	Acido tris-hidroximetilaminopropanosulfónico
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
X	Aceptor de electrones primario para PS I
Z	Donador de electrones primario para PS II

I INTRODUCCION

Los seres vivos, a diferencia de la materia inanimada, son complejos y presentan un alto grado de organización estructural que les permite llevar a cabo funciones específicas.

Para mantener ese estado de orden y funcionalidad los organismos extraen y transforman la energía del medio que los rodea.

La fuente de casi toda la energía biológica es la energía solar. Esta forma de energía es capturada y convertida en energía química por organismos fotosintéticos que incluyen a las plantas verdes y a otras formas de vida como algas y bacterias.

En la fotosíntesis, las reacciones químicas que dependen de la energía luminosa se encuentran localizadas en el sistema membranoso lamelar del cloroplasto, los productos de estas reacciones fotodependientes son el NADPH y el ATP, los cuales se utilizan en la síntesis de carbohidratos que se lleva a cabo en el estroma del cloroplasto.

Evidencias experimentales indican la participación de dos fotosistemas en la cadena de transporte de electrones; estos fotosistemas inducen el flujo de electrones al absorber luz visible a través de los pigmentos que los componen. Los electrones provenientes del agua, que es el donador primario en las plantas superiores, son transferidos de un acarreador a otro hasta reducir al NADP^+ , que es el aceptor final de la cadena. Acoplada al transporte de electrones se lleva a cabo la síntesis de ATP, catalizada por el CF_1 . Los acarreadores de electrones deben guardar una cierta distribución y secuencia en la membrana para llevar a cabo sus funciones (1), en cambio la enzima que cataliza la síntesis de ATP, se encuentra localizada en el exterior de la membrana, y no se sabe si interactúa con algún componente de la cadena transportadora de electrones; todos estos componentes membranales son fosfolípidos y proteínas que tienen grupos funcionales laterales como aminas, carboxilos, sulfhidrilos, oxhidrilos, etc., que no participan en la unión peptídica.

Para comprender el proceso de la fotosíntesis es importante conocer cual es el arreglo espacial de los elementos con actividades fotoquímicas y enzimáticas de la membrana de los tilacoides. Con este propósito se han usado (60) anticuerpos que reaccionan con los acarreadores de electrones y determinan si estos se encuentran en el exterior o en el interior de la membrana. También ha sido empleada la modificación química de algunos grupos funcionales de membrana; esta modificación puede ser una unión covalente o simplemente una perturbación sobre dichos grupos funcionales. Dilley (47) y Giaquinta (31) han usado el reactivo hidrofílico no penetrante DABS, en membranas de cloroplasto intactas y encontraron que éste se une en mayor proporción a fotosistema I que a fotosistema II, lo cual sugiere que la actividad de PS I se localiza en el exterior de la membrana, mientras que la mayoría de PS II se encuentra en el interior y no es accesible al DABS. Gould (59) encontró que el $HgCl_2$ (reactivo hidrofílico) inhibe de 50 a 60 veces más la fotofosforilación en el sitio de acoplamiento I (asociado a PS I) en comparación al sitio de acoplamiento II (asociado a PS II). Estos resultados sugieren que una porción del sitio de acoplamiento I se encuentra en una región hidrofílica mientras el sitio de acoplamiento II está en una región hidrófoba de la membrana.

Con el descubrimiento de que las membranas de los tilacoides son más sensibles a ciertos reactivos, cuando las reacciones se hacen en presencia de luz que cuando se hacen en la oscuridad, los estudios de modificación química se han encaminado a encontrar cual o cuales son los componentes que cambian su conformación estructural a verse afectados por la luz. McCarty y Fagan (2) han demostrado que la NEM, un reactivo que se une a los grupos sulfhidrilo de las proteínas, se une hasta un 90 % del factor de acoplamiento 1 (subunidad δ) provocando una mayor inhibición de la fotofosforilación, cuando la reacción se hace en la luz que cuando se hace en la oscuridad. Estos hechos sugieren que en presencia de luz ocurren cambios en la subunidad δ de CF_1 y que estos cambios están asocia-

- dos a la síntesis de ATP con exposición de grupos sulfhidri-
lo detectables por este reactivo. Andreo y Vallejos (57) usando
yodoacetato y reactivos para grupos sulfhidri- lo, también encontra-
ron una proporción mayor de inhibición de la fotofosforilación,
cuando hicieron la reacción en la luz que cuando la hicieron en
la oscuridad. Cantley y Gordon (61) han demostrado que los grupos
sulfhidri- lo de la subunidad γ de CF_1 , se exponen con activación
con calor de la enzima. Portis y Cols. (62) encontraron que la expo-
sición de grupos sulfhidri- lo en los tilacoides, aumenta cuando el
pH está en el intervalo de 7.1 a 8.0. La incorporación de reacti-
vos no penetrantes, marcados con tritio, en la subunidad γ de CF_1
es posible cuando se iluminan los cloroplastos (63).

A raíz de estos resultados se ha encontrado que el CF_1 contiene
12 residuos de cistina por mol, 8 de los cuales son grupos sulfhidri-
lo libres y 4 se encuentran involucrados en 2 puentes disulfuro.

Recientemente se ha difundido mucho el uso de reactivos entre-
cruzantes, es decir, reactivos que tienen 2 grupos funcionales que
se pueden unir a 2 sitios de una o dos moléculas proteicas, dando
como resultado una estructura rígida en la membrana lo cual le impi-
de llevar a cabo sus funciones. Novak y Siegenthaler (64) usaron el
imidoester bifuncional dicloruro de dimetil-3,3'-ditiobispropionimi-
dato para entrecruzar polipéptidos de la membrana del tilacoide.
Encontraron que dos polipéptidos de 25 y 22 kD del complejo cloro-
fila- proteína 1, se unían al reactivo, de esto ellos dedujeron que
los dos polipéptidos se encuentran cercanos entre sí en la membrana
del tilacoide. Vallejos y Cols. (65) encontraron una inhibición de
la síntesis e hidrólisis de ATP cuando usaron el reactivo bifuncio-
nal 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) en cloroplastos preiluminados,
atribuyendo esta inhibición a la oxidación de los grupos sulfhidri-
lo que se exponen en la luz.

El uso de reactivos bifuncionales para modificar la membrana
del tilacoide, en condiciones de transporte de electrones y sínte-
sis de ATP, cuando se exponen grupos sulfhidri- lo hacia el exterior
de la membrana, y las consecuencias en la funcionalidad de la mem-
brana, pueden ayudar a localizar las moléculas involucradas en los

cambios que sufre la membrana, así como en que función participan y cual es su posición con respecto a otras moléculas en la membrana.

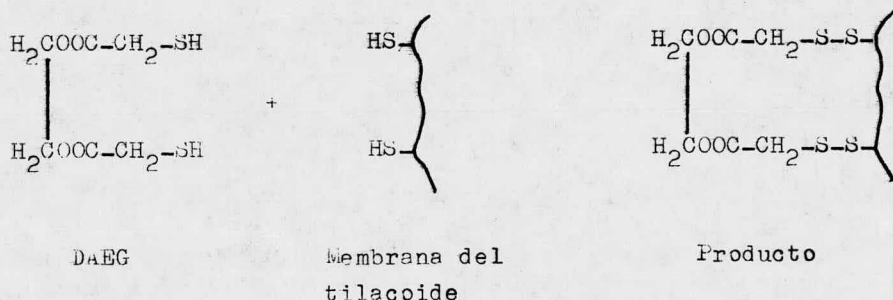
1. Objetivos

En el presente trabajo se pretende determinar si en la membrana del tilacoide existen componentes que participan en el transporte de electrones o en la fotofosforilación, que puedan ser entrecruzados por un reactivo bifuncional para grupos sulfhidrilo, en el momento en el que ocurre la mayor exposición de estos grupos en la membrana, observando las consecuencias de este entrecruzamiento, al medir posteriormente, en condiciones normales, el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Para ello se usará el reactivo dimercapto acetato de etilén-glicol que puede unirse a grupos SH de una o dos moléculas. El marcaje se hará en las siguientes condiciones:

- i. Los cloroplastos se encuentran en un medio apropiado para llevar a cabo el transporte de electrones y la síntesis de ATP y en presencia de luz.
- ii. Los cloroplastos se encuentran en el mismo medio que en i pero en la oscuridad.
- iii. Los cloroplastos están en el mismo medio que i pero el pH se cambia a valores de 7, 7.5, 8 y 8.5. En presencia de luz.
- iv. Los cloroplastos se tratan igual que en iii pero en la oscuridad.

La hipótesis es que si la reacción del DAGEG con los tilacoides se lleva a cabo en las condiciones i y iii, el reactivo se podrá unir a los grupos sulfhidrilo de dos moléculas que se encuentren cercanas

entre sí, mientras que en las condiciones ii y iv esto no podrá ocurrir por no encontrarse grupos SH accesibles en la membrana. La reacción sería la siguiente:



Al haber modificación química en la membrana del tilacoide podría ocurrir:

- a. que el reactivo se una a una parte de la cadena transportadora de electrones, impidiendo el transporte y como consecuencia la síntesis de ATP.
- b. que el sitio de acción del reactivo fuera en una etapa de la cadena en la que hay transferencia de energía (síntesis de ATP) impidiendo la síntesis de ATP y como consecuencia el transporte de electrones.
- c. El reactivo podría actuar como un desacoplante, impidiendo la síntesis de ATP y acelerando el transporte de electrones.

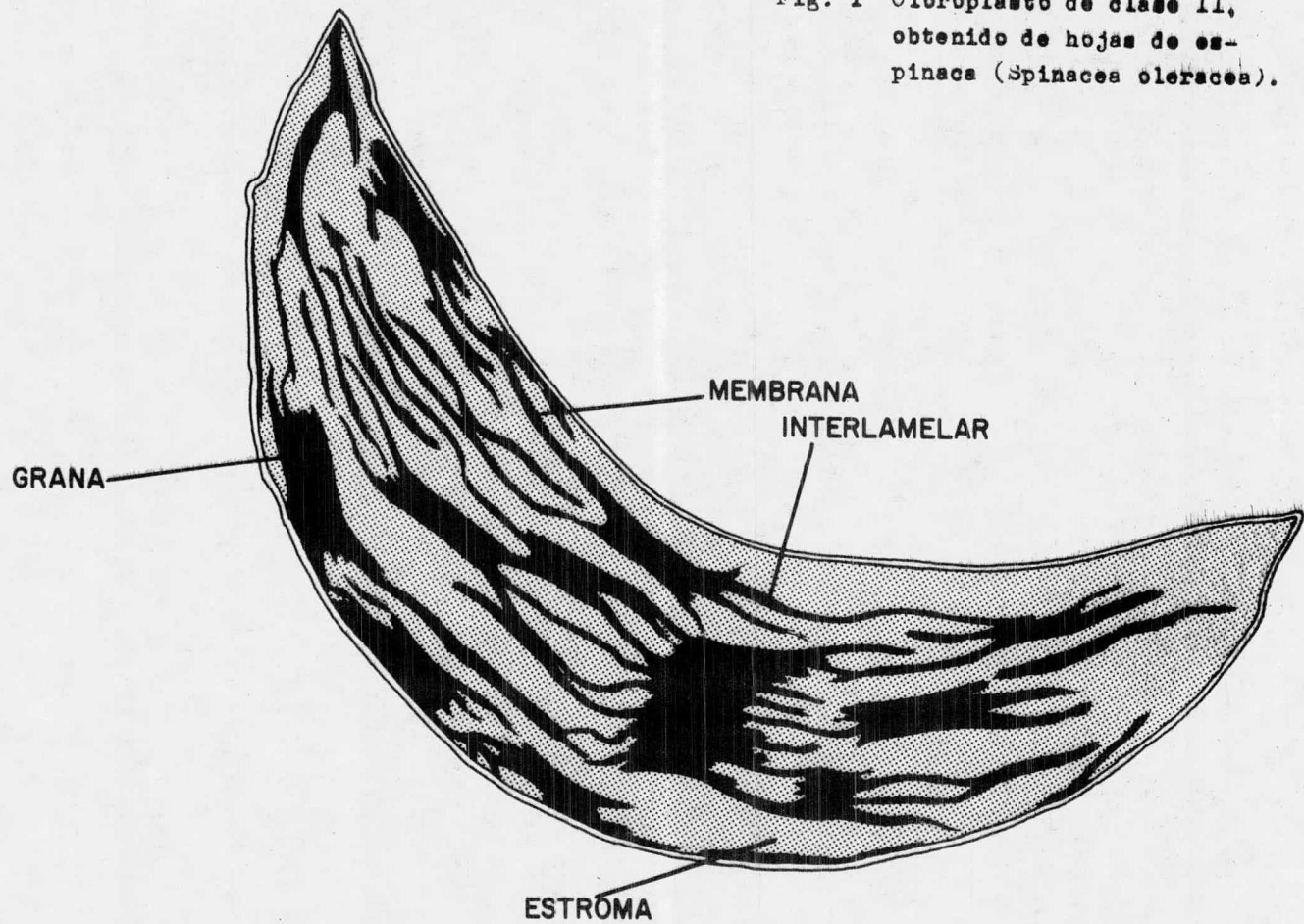
II GENERALIDADES

En las células fotosintéticas eucariotes las clorofilas se encuentran funcionalmente organizadas dentro de un sistema membranoso que se localiza en un organelo celular específico; el cloroplasto. El cloroplasto de una típica planta superior tiene forma de lente (Fig. 1) con un diámetro de 3 a 6 μ ; está constituido por una doble membrana externa, llamada envoltura, que rodea a una matriz acuosa, el estroma, en la cual se encuentra el sistema membranoso o lamelar. Numerosos estudios hechos con cloroplastos enteros (clase I), indican que la envoltura del cloroplasto actúa como una barrera selectiva al paso de metabolitos hacia dentro o hacia fuera del plástido. Algunos investigadores piensan que además esta membrana se encuentra involucrada en la formación del sistema lamelar (3).

El estroma del cloroplasto, es la fase líquida en la cual se encuentran todas las enzimas del ciclo de Calvin así como ribosomas y DNA circular, los cuales tienen un papel importante en los mecanismos de autoregulación y replicación del cloroplasto (4). Usando técnicas de microscopía electrónica se ha encontrado que el sistema lamelar de los cloroplastos de plantas superiores, está formado por pequeños discos membranosos que se empaquetan uno encima del otro constituyendo pilas llamadas granos. Cada grano está compuesto por dos o más discos que se conocen como tilacoides; los tilacoides de un grano se unen a los de otro grano a través de la lamela del estroma. Se ha sugerido que la formación de los granos en el cloroplasto, es consecuencia de algún daño que se produce en el proceso de aislamiento o de la preparación que se hace cuando se observa en el microscopio electrónico (5). Aun desde este punto de vista la tendencia, real o inducida, que tienen las membranas del cloroplasto para organizarse en pilas es sin duda el resultado de que existan áreas específicas de especialización membranosa.

Además de clorofila y otros pigmentos, los tilacoides están compuestos de lípidos y proteínas en igual proporción aproximada-

Fig. 1 Cloroplasto de clase II,
obtenido de hojas de es-
pinaca (*Spinacea oleracea*).

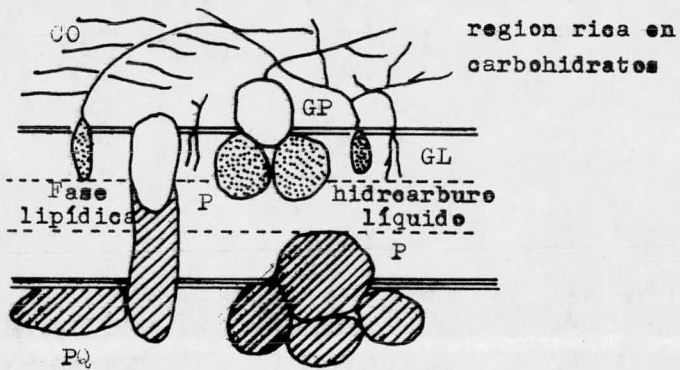


mente. Cerca del 80 % de los lípidos son sulfolípidos y galactolípidos (6). La figura 2 es un esquema hipotético, propuesto por Gitler (7),^① de una membrana de esta naturaleza. La membrana está constituida por tres fases adyacentes, dos acuosas separadas por una lipídica. En la fase lipídica parecen estar incorporadas las proteínas como lipoproteínas o proteolípidos responsables de la especificidad funcional. Existe además una fase adicional constituida por los carbohidratos, componentes que parecen estar exclusivamente dirigidos hacia la fase acuosa externa. La mayoría de la proteína parece ser interna. Hay cierta evidencia de que la fase lipídica es un continuo, aun cuando esto no se ha logrado establecer. Aparentemente las proteínas están inmersas en el lípido, sin embargo, los detalles moleculares son todavía muy vagos. Los elementos que constituyen la membrana tienen suficientes grados de libertad como para que en algunos casos se pueda considerar a la membrana como un líquido bidimensional en el cual pueden disolverse moléculas apolares.

1. Sistema de Pigmentos

En el sistema lamelar del cloroplasto (granos y lamela del estroma) se encuentra localizado todo el aparato fotosintético necesario para la conversión de la energía solar a energía química. Los pigmentos característicos de las células fotosintéticas pueden ser clasificados en tres grupos principales; clorofilas, carotenoides y ficobilinas (Tabla I); la función de estos pigmentos es suministrar a la planta un sistema eficiente de absorción de luz a través del espectro visible. Esta energía es entonces transferida a los centros de reacción donde se utiliza para las reacciones fotoquímicas. El conjunto de pigmentos involucrados en la absorción de luz y en la transferencia de energía, se conoce como pigmentos cosechadores de luz. En la figura 3 se mues-

FASE ACUOSA EXTERNA



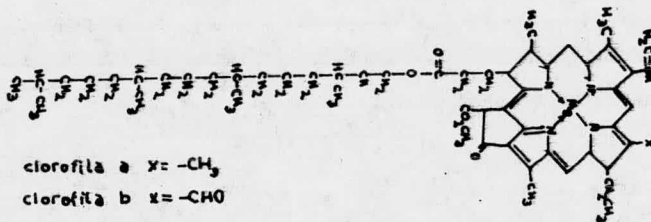
FASE ACUOSA INTERNA

Fig. 2 Diagrama hipotético de una membrana biológica, P, proteínas; GP, glicoproteínas; GL, glicolípidos; CO, carbohidrato.

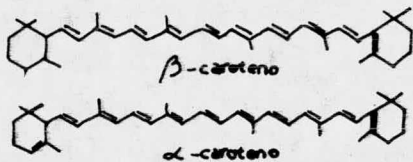
PIGMENTO	OCURRENCIA	FUNCION
i. Clorofilas		
clorofila a	Todas las plantas fotosintetizadoras (excepto bacterias).	Cosechadora de luz.
clorofila b	Plantas superiores y algas verdes.	Cosechadora de luz.
ii. Ficobilinas		
ficocianinas	En algas azul-verde y rojas.	Cosechadoras de luz.
aloficocianina	En algas rojas y azul-verde.	Cosechadora de luz.
ficoeritrina	En algas rojas principalmente y en algas azul-verde.	Cosechadora de luz.
iii. Carotenoides		
α y β -carotenos	α . En muchas hojas y ciertas algas, en algas rojas y un grupo de algas verdes (Siphonales). β . Principal caroteno de las demás plantas.	Principalmente como antioxidantes, cosechadores de luz en menor grado.
Xantofilas		
luteina	Principal carotenol de hojas verdes, algas verdes y rojas.	Sufren un ciclo de oxigenación-desoxigenación, cuya función se desconoce.
zeaxantina	Segundo mayor carotenol de las hojas.	
violaxantina		

Tabla I. Clasificación de los principales pigmentos fotosintéticos.

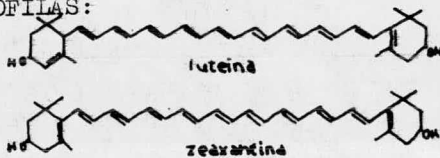
CLOROFILAS:



CAROTENOS:



XANTOFILAS:



FICOBILINAS:

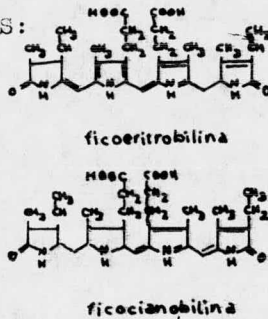


Fig. 3 Fórmula estructural de los pigmentos fotosintéticos.

tran las fórmulas estructurales de los pigmentos fotosintéticos

a) Clorofilas

Hay dos clases de clorofilas en las plantas superiores y las algas verdes; clorofila a y clorofila b. La clorofila a, es el pigmento mas numeroso y está presente en todos los organismos fotosintéticos que producen oxígeno molecular. Se han postulado varias formas de clorofila a: clo a₆₆₀, clo a₆₇₀, clo a₆₈₀, clo a₆₈₅, clo a₆₉₀, clo a₆₇₀. El subíndice indica la longitud de onda de máxima absorción. La clorofila b está presente en todas las plantas superiores y algas verdes. Su absorción en el rojo ocurre a 650 nm; se piensa que existen dos formas: clo b₆₄₀ y clo b₆₅₀.

b) Carotenoides

Son los pigmentos naranja y amarillo encontrados en casi todos los organismos fotosintéticos. Hay dos clases de carotenoides; carotenos, de los cuales el β -caroteno es el mas común, son hidrocarburos y absorben en la región azul del espectro, carotenoles, son alcoholes y son llamados comunmente xantofilas.

c) Ficobilinas

Están presentes en algas rojas y azul-verdes, son tetrapirroles de cadena abierta. Hay dos clases de ficobilinas; ficocianinas las cuales predominan en algas azul-verdes y absorben a 630 nm, y las ficoeritrinas que predominan en las algas rojas y absorben cerca a 640 nm.

Estudios espectrofotométricos de absorción reversible de luz y fluorescencia señalan que es muy posible que las reacciones fotoquímicas primarias tengan lugar en los llamados centros de reacción, los cuales son complejos moleculares que constan de un díme-

ro de moléculas de clorofila que interacciona con un pequeño número de moléculas de proteína y con moléculas que pueden ser oxidadas o reducidas. La relación de moléculas de clorofila a por centro de reacción es cerca de 200 en algas y plantas superiores (8).

2. Transporte de Electrones

La energía luminosa absorbida por los pigmentos fotosintéticos accesorios es transferida a las clorofilas $a_{680-690}$ y a_{700} que se encuentran en 2 centros de reacción específicos, vía otras moléculas de clorofila *a*. De esta manera la eficiencia de la transferencia de energía al centro de reacción, depende de la distribución de las moléculas de clorofila *a* en el sistema de pigmentos y del estado del centro de reacción.

El hecho de que existan 2 sistemas de pigmentos que absorben luz de diferente longitud de onda, implica que el transporte de electrones tiene lugar en dos principales etapas e involucra dos eventos fotoquímicos cada uno de los cuales actúa en un centro de reacción específico. La figura 4 indica un posible esquema de la transmisión de la energía a través de cada sistema de pigmentos (9).

La participación de dos eventos fotoquímicos hace posible que el flujo de electrones proceda contra un gradiente electroquímico de 1.2 Volts. La figura 5 muestra el el esquema "Z" de la cadena de transporte de electrones. En este esquema se señala la posible secuencia de los acarreadores de acuerdo a sus diferentes potenciales de óxido-reducción, así como los sitios que han sido postulados para la síntesis de ATP.

El proceso se inicia con la absorción de un fotón por el sistema de pigmentos II; la energía de excitación es transferida al centro de reacción en donde se encuentra la clorofila a_{680} , a esta unidad fotosintética se le llama P680. El P680 excitado transfiere un electrón al aceptor ϕ y subsecuentemente recupera un electrón

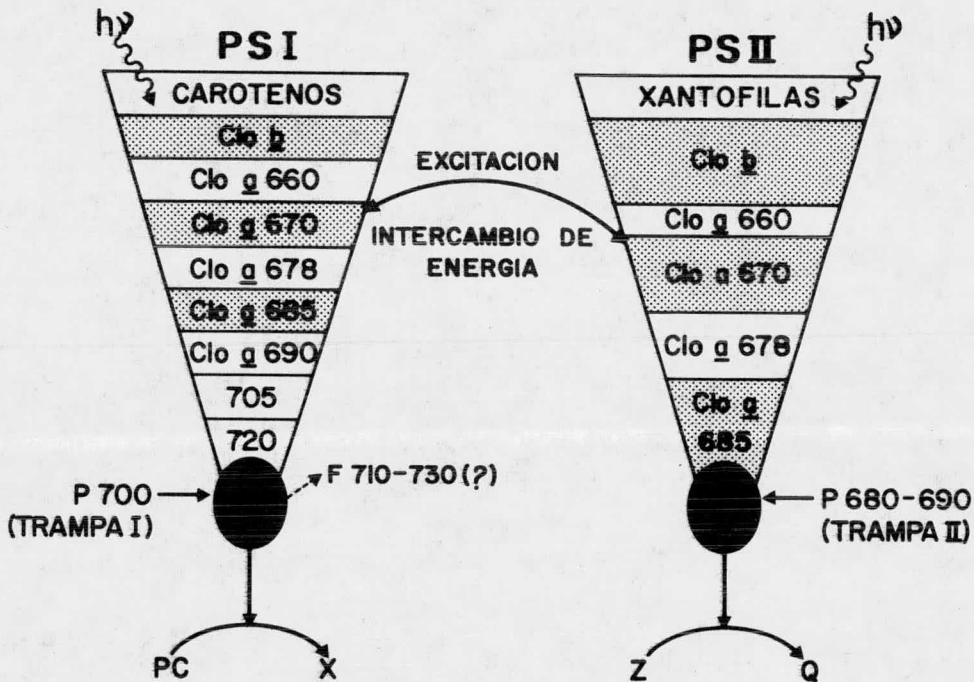


Fig. 4 Hipótesis de la distribución aproximada de los diferentes pigmentos en los dos fotosistemas de las plantas verdes. Los números que siguen a la clorofila, representan la absorción máxima aproximada en la porción roja del espectro.

del donador Z. Después de que Z ha cedido 4 electrones, los va a recuperar oxidando dos moléculas de agua. A partir de Q el electrón pasa a través de una serie de acarreadores, comenzando por un citocromo b_{559} de bajo potencial, de este a plastoquinona (Pq), a cit f, a plastocianina (PC). La plastocianina transfiere el electrón hasta el sistema de pigmentos I. La unidad fotosintética en este centro de reacción es llamada P700, la cual es excitada al llevarse a cabo el segundo evento fotoquímico de la cadena y transfiere un electrón al aceptor X. Finalmente el electrón pasa a través de la sustancia reductora de la ferredoxina a la ferredoxina (Fd), esta lo transfiere a la ferredoxin-NADP-reductasa y finalmente al nicotinamin adenin dinucleotido fosfato (NADP), el cual es reducido a NADPH.

Se cree que los acarreadores que catalizan el transporte de electrones son Cit b_{559} de bajo potencial, Pq , Cit f y PC, en ese orden (10). Böhm y Cramer (11) demostraron que hay un sitio de fosforilación entre Pq y Cit f. En la última parte de la cadena, el transporte de electrones traza un circuito cerrado utilizando solo PS I, el cual se conoce como transporte de electrones cíclico y a la formación de ATP que se acompaña, se le ha llamado fotofosforilación cíclica (12).

Para comprender mejor como se efectúa el transporte de electrones descrito, es importante conocer un poco más detalladamente cada uno de los componentes de la cadena. Describiremos primero los componentes de la cadena transportadora de electrones que pertenecen a PS I:

a) $NADP^+$

Es el aceptor electrónico final de la cadena red-ox. Tanto el $NADP^+$ como distintos tipos de aceptores electrónicos artificiales tales como $Fe(CN)_6^{3-}$, MV y quinonas, pueden ser fácilmente reducidos por el sistema lamelar intacto aislado. Esto sugiere que

los aceptores de PS I son reducidos en el lado externo de la membrana del tilacoide. Así el NADPH formado en la fase luminosa es aprovechado por las enzimas del ciclo de Calvin durante la fase oscura de la fotosíntesis, ya que estas enzimas se encuentran en el estroma del cloroplasto.

b) Fd-NADP-reductasa

Es una flavoproteína que contiene FAD. La enzima es específica para sus donadores electrónicos Fd o NADPH pero no es específica para sus aceptores que pueden ser colorantes tales como ferricianuro, DCIP, Cit f, PC, NADP^+ y Fd. Las principales evidencias de la posición de Fd-NADP-reductasa en la cadena son las siguientes: i. Su requerimiento para la reducción de NADP^+ (13). ii. La velocidad de su fotoreducción por cloroplastos aislados es linealmente dependiente de la cantidad de Fd reducida por el NADP^+ . iii. La reacción de Hill en cloroplastos de clase II, es completamente inhibida por la adición de un anticuerpo contra la flavoproteína. Se ha sugerido, en base a este dato, que la enzima está localizada en la cara externa de la membrana. iv. Se ha encontrado que la enzima forma un complejo 1:1 con la Fd (14).

c) Ferredoxina

Es una proteína con hierro y azufre de bajo potencial redox; $E^\circ = -0.42 \text{ V}$. Su posición en la cadena se explica por los siguientes factores: i. Se requiere su adición para la reducción del NADP^+ , en preparaciones que no la contienen. ii. Es reducida en cloroplastos aislados que se les ha extraído la Fd-NADP-reductasa y funciona también en presencia de un exceso de anticuerpos contra la Fd-NADP-reductasa, los cuales inhiben completamente la reducción de NADP^+ .

d) Sustancia Reductora de la Ferredoxina (SRF)

Es una sustancia de bajo potencial, cerca de -0.55 V, se localiza entre PS I y Fd. Cuando a los cloroplastos se les extrae la SRF disminuye su capacidad para reducir al NADP^+ en presencia de cantidades óptimas de Fd y de la Fd-NADP-reductasa (15). La adición de SRF restituye esta actividad.

e) P700

Está constituido por un grupo de moléculas de clorofila situadas en un medio ambiente especial, el cual es responsable del cambio del pico de absorción a 700 nm. Constituye cerca del 0.25 % de la clorofila total en las plantas superiores y se detecta por la disminución de la absorbancia a 700 nm, cuando se oxida. Tiene un potencial $E^\circ = +0.43$ V, es oxidado por la luz que afecta a PS I y reducido por la luz que afecta a PS II. Cuando se excita por un flash muy intenso de corta duración, es la reacción que se observa más rápido en PS I. Por lo tanto se supone generalmente que ocupa la posición de donador electrónico primario para PS I.

f) Plastocianina (PC)

Es una proteína que contiene dos átomos de cobre por molécula. Hay dos moléculas de plastocianina por cada cien moléculas de clorofila. La plastocianina oxidada presenta tres bandas de absorción en las regiones del visible e infrarrojo; la banda principal se encuentra a 597 nm y existen otras bandas menores a 460 y 770 nm. La plastocianina tiene un potencial $E^\circ = +0.37$ V entre pH de 5.4 y 9.9 y es fácilmente fotoreducida por cloroplastos aislados. La mayoría de los investigadores concuerdan en que el sitio de acción de la plastocianina en la cadena es el que se encuentra indicado en la figura 5.

g) Citocromo f

El Cit f es una proteína de naturaleza acídica que tiene un grupo prostético hemo. Tiene un potencial $E^{\circ} = + 0.365 \text{ V}$ en un intervalo de pH de 6 a 7. El citocromo f reducido tiene una banda de absorción a 554 nm y otra a 421 nm. La relación molar de clo/Cit f por grupo hemo, en el cloroplasto es cerca de 400. Fué el primer componente que se localizó claramente entre los dos fotosistemas, precediendo a la plastocianina. Estudios con inhibidores indican que se encuentra localizado mas allá del sitio de acción de DCMU DBMIB (17).

a continuación se describirán los componentes de la cadena transportadora de electrones que pertenecen a PS II:

h) Plastoquinona (Pq)

Es una quinona de naturaleza lipídica. En la cadena se encuentra localizada entre los dos fotosistemas, tiene un cambio de absor-bancia a 252 nm que se debe a su reducción, cuando se iluminan los cloroplastos con un flash que excita a PS II. El flujo elec-trónico desde la plastoquinona reducida hasta el P700 oxidado ori-gina un incremento en la absorbancia a 703 nm. Hay de 5 a 10 molé-culas de plastoquinona por cada 100 moléculas de clorofila. Su lo-calización exacta está basada principalmente en los datos de Böhme y Cramer (11); quienes mostraron que DBMIB, un análogo de la Pq, inhibe la oxidación de Cit b₅₅₉ por PS I pero no su reducción por PS II.

i) Citocromos b

Haciendo un análisis de los citocromos presentes en los clo-roplastos, se ha encontrado que hay otros tres citocromos que ac-túan en el transporte de electrones fotosintético, pero su posi-ción no está claramente definida todavía. Estos son: i. Un cito-cromo con una banda de absorción a 559 nm (Cit b₅₅₉) y que tiene un potencial alto $E^{\circ} = + 0.37 \text{ V}$ y otro menor $E^{\circ} = + 0.06 \text{ V}$. El

FCCP convierte al citocromo de mayor potencial, el cual es el de mayor abundancia natural, en el de menor potencial. Cuando está en la forma de bajo potencial se comporta como si estuviera colocado entre los dos fotosistemas (Fig. 5), pero en su estado natural su posición es incierta, podría estar formando un ciclo alrededor de PS II. ii. Citocromo b_{563} , es el citocromo de potencial mas bajo en el material fotosintético $E^\circ = -0.18$ V. Su función es incierta y se piensa que puede estar involucrado en el flujo electrónico cíclico alrededor de PS I.

j) Compuesto Q (Q) y Citocromo C_{550} (Cit C_{550})

Se han asociado cambios en la fluorescencia de la clorofila con el estado de oxidación o de reducción del aceptor primario de electrones de PS II llamado Q . Q tiene un potencial de $E^\circ = -0.035$ V, se reduce por excitación de PS II y se oxida por excitación de PS I. Su oxidación pero no su reducción es inhibida por DCMU. Evidencias recientes (18), indican una posible identidad entre Q y un compuesto C_{550} , el cual muestra un cambio de absorción a 550 nm.

3. Compuestos Generados en el Transporte de Electrones

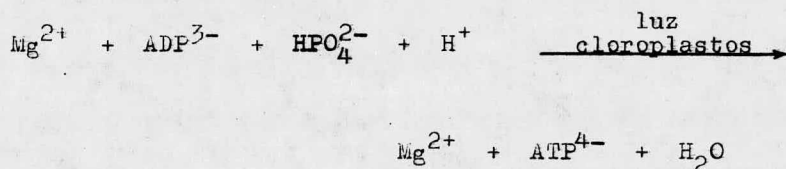
a) Oxígeno

La evolución de oxígeno no está aun muy bien aclarada. Un componente Z, desconocido, es el donador primario de electrones. Z está ligado a la oxidación del agua a través de uno o varios pasos. La naturaleza de Z y de los otros componentes involucrados no se conoce; se sabe que algunos iones que participan son Mn^{2+} , Cl^- y $NaHCO_3$, los cuales están de alguna manera relacionados con la producción de oxígeno molecular proveniente de la oxidación del agua. También se encuentra implícita una proteína (enzima), pero

no ha podido ser aislada ni purificada.

b) ATP

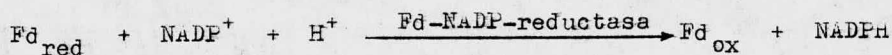
Los sitios de formación de ATP se muestran en la figura 5. La reacción de fosforilación que se lleva a cabo, a pH 8.0, es la siguiente:



Los mecanismos que se han postulado para la formación de ATP se expondrán en la sección 6 de este capítulo.

c) NADPH

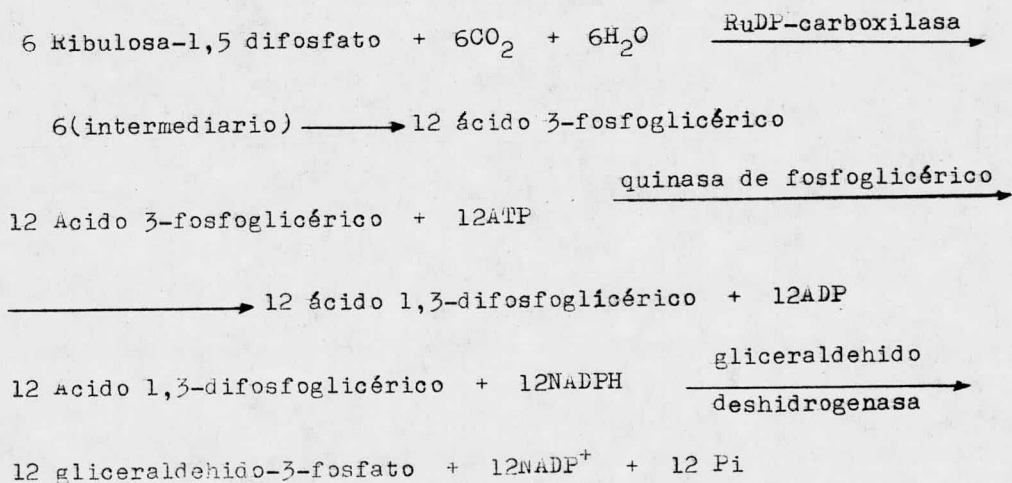
Como se vió anteriormente el último paso de la cadena de transporte de electrones es la reducción del NADP^+ por la ferredoxina y en la cual participa la ferredoxin-NADP-reductasa. La reacción es la siguiente:

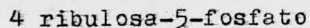
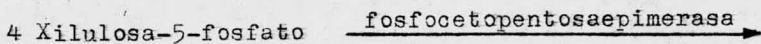
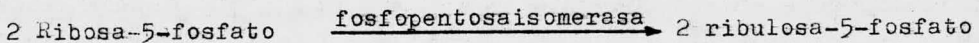
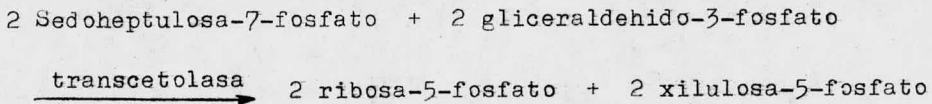
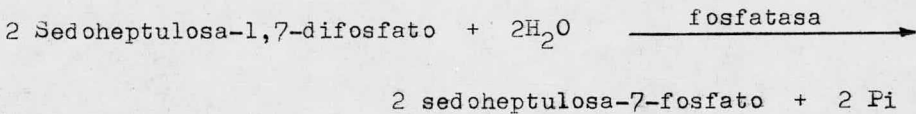
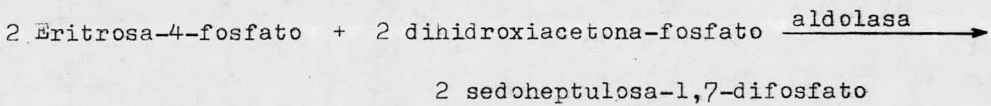
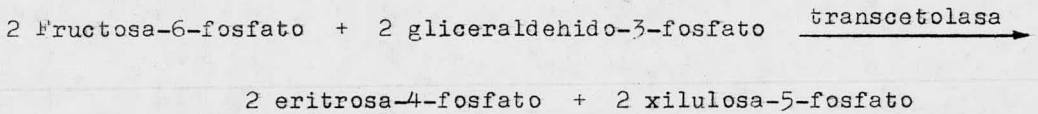
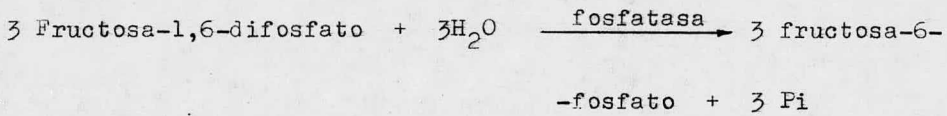
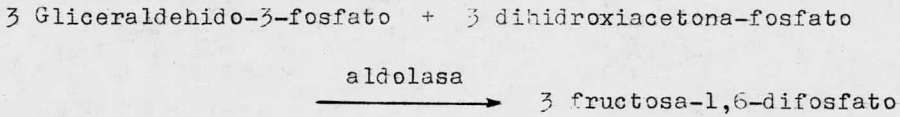
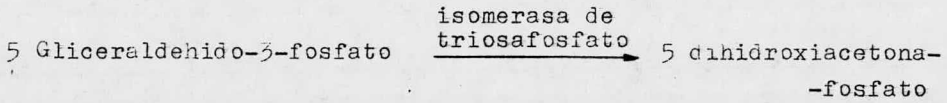


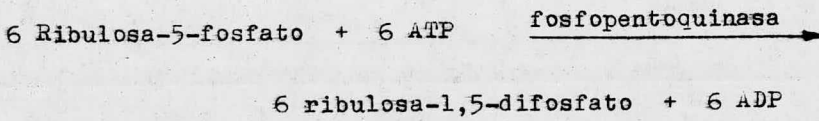
4. Fijación de CO_2

La eficiencia con que se llevan a cabo la formación de ATP y la reducción de NADP^+ , es un factor importante en el proceso de fijación de CO_2 . La fijación de CO_2 es el primer paso del ciclo de Calvin que como se ha mencionado se lleva a cabo en el estroma del cloroplasto y representa la llamada "fase oscura" de la fotosíntesis.

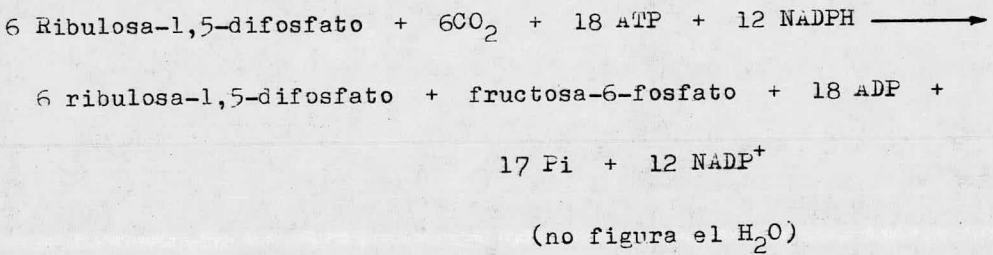
La primera etapa de la reducción del bióxido de carbono consiste en la reacción de CO_2 con un azúcar de 5 átomos de carbono, la ribulosa 1,5-difosfato, para formar el ácido 3-fosfoglicérico. La enzima que cataliza esta reacción es la RuDP-carboxilasa o carboxidismutasa. A continuación ocurre una serie de reacciones que finalmente, darán lugar a una molécula de 6 átomos de carbono, utilizan al ATP como fuente de energía y al NADPH como agente reductor. La secuencia de reacciones que se llevan a cabo en la fase oscura es la siguiente:



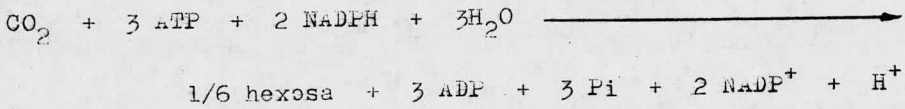




TOTAL:



o, despues de la hidrólisis del fosfato de hexosa, esquematicamente,



La figura 6 es una representación esquemática de la vía seguida por el carbono en la fotosíntesis (19).

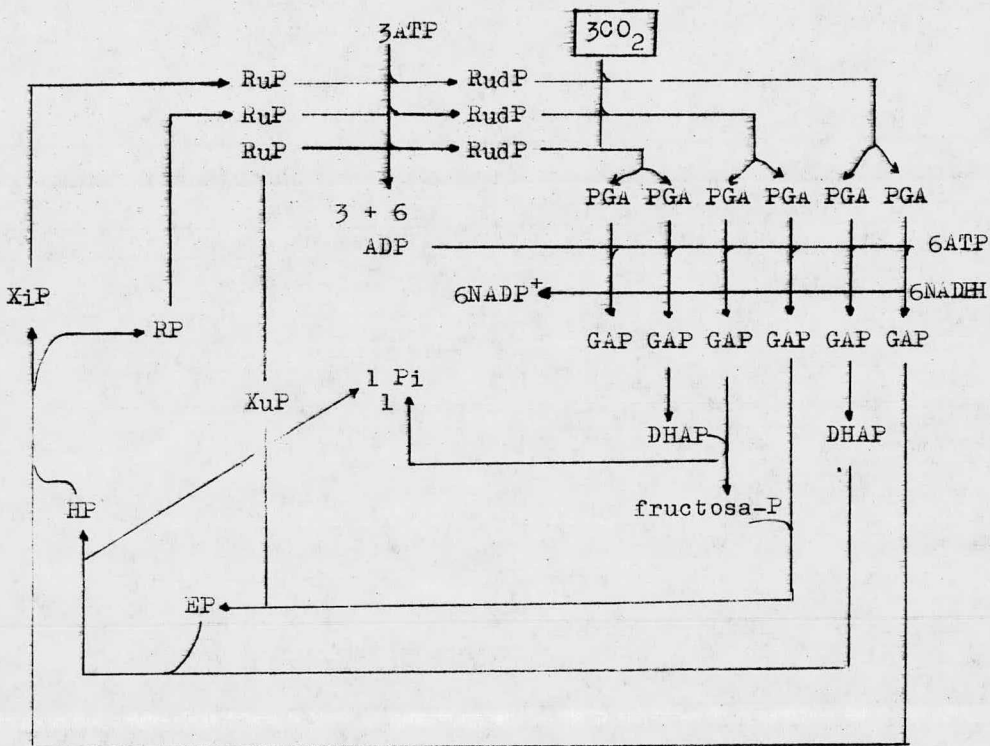


Fig. 6 Representación esquemática de la vía seguida por el carbono en la fotosíntesis. RuP; ribulosa fosfato, RuDP; ribulosa difosfato, PGA; ácido fosfoglicérico, GAP; gliceraldehído fosfato, DHAP; dihidroxiacetona fosfato, XuD; xilulosa fosfato, EP; eritrosa fosfato, HP; sedoheptulosa fosfato, RP; ribosa fosfato, Pi; fósforo inorgánico.

5. Organización Estructural de los Componentes

Moleculares en la Membrana del Tilacoides

Se han hecho muchos intentos para encontrar la relación entre la estructura y la función de las membranas de los tilacoides del cloroplasto, sin embargo, para comprender bien la función de estas membranas primero se debe poder definir su estructura molecular.

Desde el punto de vista del modelo lipoproteico postulado por Singer (20), las membranas del cloroplasto deben ser vistas como bicapas lipídicas en las cuales las proteínas intrínsecas están embebidas y las proteínas extrínsecas están pegadas. Las proteínas intrínsecas penetran en la membrana gracias a que interactúan con algunos de los lípidos que se encuentran en ella y por lo tanto son una parte continua de la misma membrana. Por el contrario las proteínas extrínsecas están debilmente unidas a la membrana y no tienen interacción alguna con los lípidos. Según sea su fluidez, los lípidos también se pueden dividir en dos clases; lípidos fijos no fluidos (21), que consisten de capas monomoleculares asociadas estrechamente con la superficie externa de las proteínas intrínsecas, y lípidos fluidos los cuales forman la matriz lipídica de la bicapa y son libres para moverse lateralmente en la membrana, dándole así un carácter fluido. Esta organización permite los cambios en la conformación y distribución de los complejos moleculares los cuales son esenciales para la estructura y función de la membrana del cloroplasto.

a) Proteínas Extrínsecas de los Tilacoides del Cloroplasto

Las proteínas extrínsecas se encuentran debilmente unidas a la membrana y son liberadas por tratamientos relativamente suaves sin contenido de lípidos, son solubles en amortiguadores acuosos neutros.

i. Factor de Acoplamiento

La superficie externa de los tilacoides del cloroplasto, la cual está en contacto con el estroma, contiene mas proteínas extrínsecas que la superficie interna. La proteína extrínseca principal de la superficie externa es el factor de acoplamiento de la fotofosforilación CF_1 (22). Con el método de tinción negativa (23), se ha observado que el CF_1 forma partículas que son polígonos de 5 a 6 lados, de 100 Å de diámetro y es removido de la membrana con EDTA. El factor de acoplamiento permanece unido a la membrana en un medio salino de baja concentración, independientemente de la osmolaridad del medio, lo cual indica que la union puede estar mediada por cationes divalentes.

Se ha determinado (24) que hay un mol de CF_1 por 860 moléculas de clorofila. El CF_1 purificado, extraído de cloroplastos de espinaca, contiene 5 diferentes subunidades ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$ y ϵ) con pesos moleculares de 59000, 56000, 37000, 175000 y 13000 (25). El CF_1 tiene actividad de ATPasa dependiente de Ca^{2+} y se ha sugerido que sufre cambios conformacionales en la luz (2). El papel que juega en la fotofosforilación así como su inhibición se tratarán mas adelante.

ii. RuDP-carboxilasa

La RuDP-carboxilasa, enzima responsable de la fijación de CO_2 , se encuentra en el estroma del cloroplasto, aunque parte de ella se encuentra unida a las membranas aisladas. Con tinción negativa se ha encontrado que tiene estructura cuboidea y se puede remover de la membrana lavando con agua.

b) Acarreadores del Transporte de Electrones

Los componentes del sistema de transporte de electrones son

proteínas que se encuentran extendidas en la membrana del tilacoide de diferente manera, hacen posible la captura de protones inducida por la luz y la generación de un potencial a través de la membrana del tilacoide. Trebst (1) ha recopilado datos resumiendo una serie de evidencias que indican que los acarreadores del transporte de electrones tienen un arreglo asimétrico a través de la membrana, y que ocurre un flujo vectorial de protones desde el estroma hacia el interior del tilacoide, durante el flujo electrónico. Se ha demostrado, con el uso de técnicas inmunológicas, que los aceptores electrónicos de fotosistema I, Fd, Fd-NADP-reductasa y SRF, se encuentran localizados en la superficie externa de la membrana. Por el contrario, los donadores electrónicos de PS I; Cit f y plastocianina, se encuentran probablemente localizados en la superficie interna del tilacoide (26). Ni el Cit f ni la plastocianina son accesibles a anticuerpos, cuando se usan membranas de tilacoides sin estroma. La mayoría de las evidencias apoyan el hecho de que existe una distribución vectorial de los componentes de PS I, excepto en el caso de la plastocianina para la cual existen ciertas dudas.

Los donadores de fotosistema II se encuentran localizados en el interior de la membrana y los aceptores electrónicos de PS II en el exterior (27), figura 7. Harth (28) demostró que la evolución de oxígeno es controlada por el pH interno de los tilacoides, lo cual sugiere otra vez que la reacción de disociación del agua ocurre en la superficie interna de la membrana del tilacoide. No obstante, se han hecho estudios con anticuerpos, proteasas y pruebas químicas que sugieren que parte de la reacción de disociación del agua queda accesible a la superficie externa de la membrana especialmente en presencia de la luz.

Calvin (29) y Kabinowitch (30), sugieren que uno de los principales propósitos de las membranas del cloroplasto debe ser separar el poder oxidante del poder reductor. La distribución vectorial de los componentes de los fotosistemas que se ha propuesto es una buena hipótesis, es evidente que algunos componentes de ambos fotosistemas se encuentren localizados externamente y otros internamente y

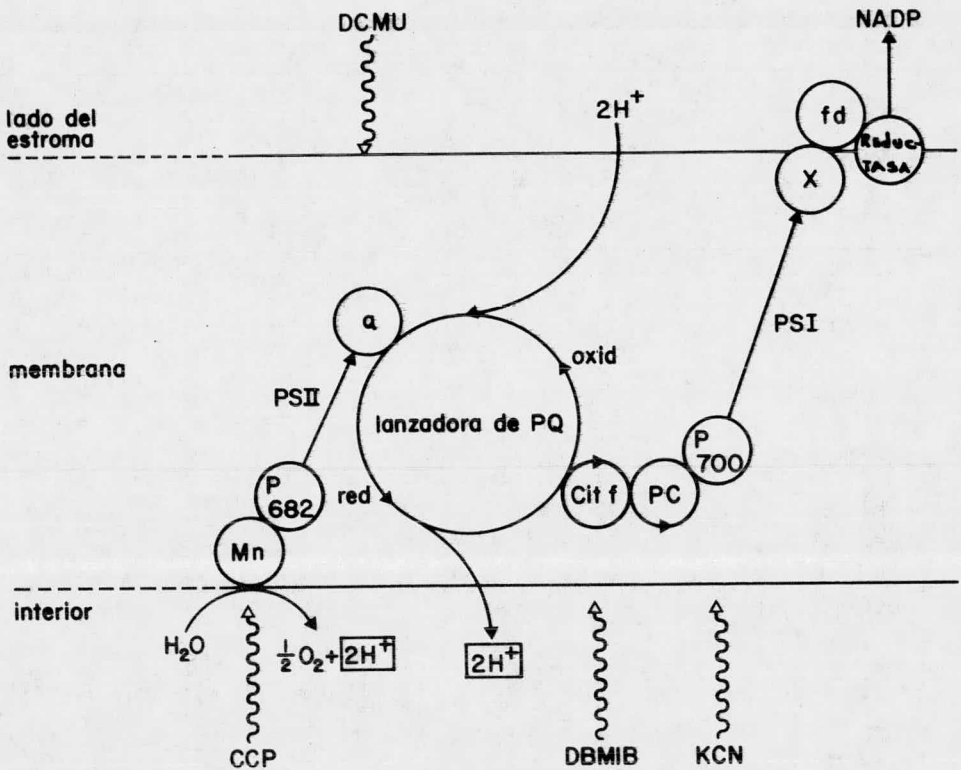


Fig. 7 Distribución vectorial de los componentes de la cadena de transporte de electrones fotosintético, a través de la membrana del tilacoide. Las flechas curvadas indican el sitio de acción de algunos inhibidores de la cadena de T.e.

de alguna forma los complejos supramoleculares de cada fotosistema están organizados para que su posición a través de la membrana sea la correcta, desde un punto de vista funcional, aunque no estática ya que varios de estos complejos deben sufrir cambios conformacionales inducidos por la luz, dentro de la membrana. Dilley y cols, (31) usando el reactivo no penetrante p-diazoniobencénsulfonato, encontraron datos, que sugieren que el sitio del donador electrónico de fotosistema II se orienta hacia el exterior de la membrana en presencia de luz, ya que en la luz el reactivo se incorpora a la membrana de los tilacoides e inhibe el transporte de electrones. El factor de acoplamiento también sufre cambios conformacionales inducidos por la luz, los cuales son detectados por agentes químicos que se unen a alguna de sus subunidades, así como también por la captación de agua tritiada que ocurre en presencia de la luz, (2). Estos estudios demuestran la naturaleza dinámica de la membrana del tilacoide.

c) Proteínas Intrínsecas de los Tilacoides del Cloroplasto

Las proteínas intrínsecas penetran en la membrana e interactúan directamente con algunos de los lípidos de ella. Para ser extraídas de la membrana se necesitan agentes que rompan enlaces hidrofóbicos y cuando se solubilizan se encuentran normalmente asociadas con algunos lípidos de la membrana.

i. Complejos Clorofila-Proteína

Existen dos grandes complejos clorofila-proteína en la membrana del tilacoide; un complejo asociado a una fracción subcloroplástica enriquecida de fotosistema I (complejo I), y otro complejo asociado a una fracción subcloroplástica enriquecida de fotosistema II (complejo 2). Algunos estudios (32) mostraron que el complejo 1, el cual tiene un alto contenido de clorofila a (clorofila a/clorofila b = 12), contiene el 28 % de las proteínas de la membrana del cloroplasto, mientras que el complejo 2, el cual tiene un contenido relativa-

mente alto de clorofila b (clo a/clo b = 1), es mas grande ya que contiene el 50 % de las proteínas de la membrana. La parte proteica de estos complejos es distinta para cada uno de ellos, ambos tienen una alta proporción de residuos no polares (aprox. 64 %), ambos complejos contienen algunos carbohidratos y algunos carotenoides. El complejo 1 tiene un peso molecular de cerca de 110 000 Daltons y contiene 14 moléculas de clorofila a. Se ha encontrado que preparaciones del complejo 1 tambien contienen P700. El complejo 2 tiene un peso molecular de cerca de 32 000 Daltons y contiene una molécula de clorofila a una molécula de clorofila b. El complejo 2 no contiene el centro de reacción de fotosistema II.

Cuando las membranas del cloroplasto se tratan para quitarles el factor de acoplamiento, la carboxidismutasa, los lípidos y los pigmentos, se obtiene una mezcla de por lo menos 20 polipéptidos con tamaños desde 100 000 hasta 10 000 Daltons. Se ha encontrado (33) que los polipéptidos que se encuentran en el intervalo de 60 000 a 50 000 Daltons (llamados polipeptidos del grupo 1), se encuentran asociados a fracciones subcloroplásticas enriquecidas de fotosistema I, mientras que las fracciones enriquecidas de fotosistema II contienen tres principales polipéptidos (llamados IIa, IIb, y IIc), entre los cuales se incluye un polipéptido de 25 000 Daltons.

Anderson y Levine (34) demostraron que dos de los polipéptidos del grupo I se derivan del complejo clorofila-proteína 1, mientras que los polipéptidos IIb y IIc forman parte del complejo clorofila-proteína 2.

La presencia de grandes cantidades de CF_1 , sugiere que varios polipéptidos intrínsecos corresponden al complejo ATPasa. Es útil recordar que la contribución al contenido proteico de la membrana por parte de los componentes de la cadena de transporte de electrones es muy pobre, ya que hay de 1 a 2 moléculas de acarreador por cada 400 moléculas de clorofila.

Se conoce muy poco a cerca de la posible orientación que puedan tener en la membrana los complejos clorofila-proteína. El complejo 1

con una masa de cerca de 110 000 Daltons, puede dar lugar a una proteína globular con dimensiones de $50 \times 50 \times 80 \text{ \AA}$, que serían suficientes para que abarcara transversalmente a la membrana. Aunque la masa aparente del complejo 2 es solamente de 32 000 Daltons, este podría presentarse en forma de agregados que se expandirían a través de la membrana.

d) Localización de las Moléculas de Clorofila

Una característica propia de los tilacoides del cloroplasto es su alto contenido de moléculas lipídicas especializadas; las clorofilas, carotenoides y quinonas no se encuentran involucradas en la formación de la bicapa pero tienen un papel funcional en la membrana. Las clorofilas constituyen el 20 % de toda la masa lipídica, son moléculas anfipáticas (Fig. 8a). El anillo tetrapirrólico tiene un área de marcada polaridad en los grupos carbonilo del anillo V y en el residuo de ácido propiónico del anillo IV, por lo cual el lado por el que se une a la cadena fitólica, es hidrofílico; el Mg^{2+} también tiene propiedades hidrofílicas. El fitol, el cual es un alcohol C-20 derivado de cuatro unidades isoprenoides, solo tiene un doble enlace y se encuentra lejos del extremo terminal de la cadena, por lo que es más rígido que el conjunto de ácidos grasos que componen la membrana. La clorofila b es ligeramente más polar ya que tiene un grupo formilo en lugar de un metilo en el anillo II,

El estado físico de la clorofila in vivo es diferente que el que tiene en solventes orgánicos (35). El hecho de que, in vivo, el espectro de absorción de la clorofila sea más complejo que cuando está en solución, sugiere que la molécula tiene interacciones con otras moléculas de clorofila (dado el estado de agregación de los anillos tetrapirrólicos), con proteínas y con lípidos.

Weier y Benson (36) elaboraron un modelo molecular detallado para las membranas del cloroplasto en el cual la estructura de bi-

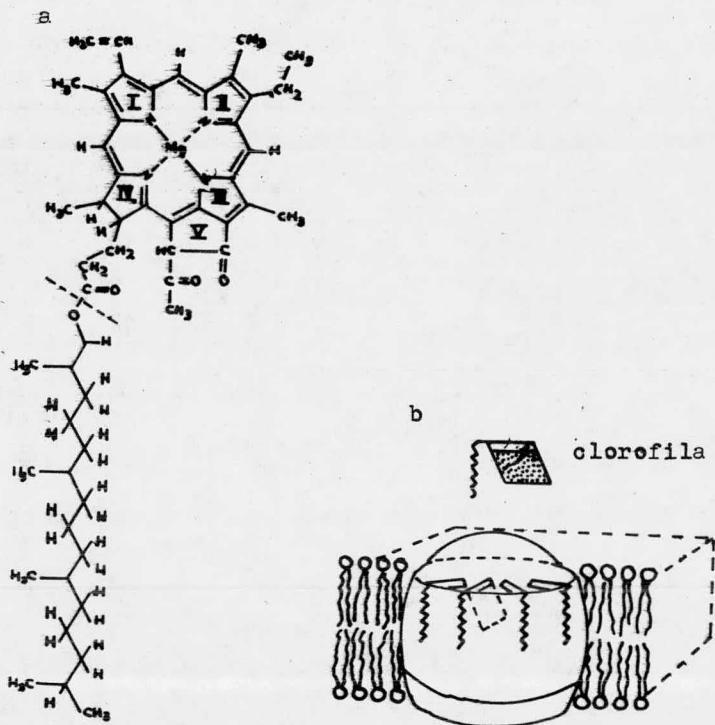


Fig. 8 a. Molécula de clorofila a. b. Sección esquemática de una membrana de cloroplasto, indicando la extensión de una proteína intrínseca de la membrana, con las regiones hidrofílicas localizadas en la superficie y la porción hidrofóbica (sombreada) embebida en la región no polar de la bicapa lipídica.

capa está formada únicamente por lipoproteínas, con los extremos fitólicos en la región hidrófoba de las lipoproteínas. En la membrana real este modelo deja abierta la posibilidad, de que las cadenas fitólicas se encuentren intercaladas exclusivamente dentro de la región hidrofóbica de las proteínas intrínsecas. El lado hidrofílico del anillo tetrapirrólico, adyacente al grupo fitólico, se encontraría expuesto hacia el exterior de la membrana e interactuando con el segmento hidrofílico de las proteínas intrínsecas, y la porción más hidrofóbica del anillo estaría en el interior de la membrana en la región hidrofóbica de las proteínas intrínsecas. Un esquema de este modelo es el de la figura 8b (37).

Briantais y cols. (38) sugieren que los anillos tetrapirrólicos de los complejos clorofila-proteína de ambos fotosistemas, están localizados en lados opuestos de la membrana, con fotosistema I en la superficie externa. Sin embargo esto se encuentra en controversia. Tampoco se conoce la localización de las clorofilas del centro de reacción de los dos fotosistemas.

e) Distribución de los Lípidos

Los lípidos constituyen casi la mitad de la masa de las membranas de los cloroplastos de espinaca. Los lípidos de los tilacoides del cloroplasto son una mezcla diversa y compleja, algunos de los cuales son exclusivos de los cloroplastos como los galactolípidos y los sulfolípidos. Los principales componentes del tejido fotosintético son los glicolípidos neutros; monogalactosil diacilglicerol y digalactosil diacilglicerol, y los dos lípidos aniónicos; fosfatidilglicerol y sulfoquinovosil diacilglicerol (39). En la tabla II se encuentra la composición lipídica de los tilacoides.

Las membranas del cloroplasto tienen un alto contenido de grupos acilo poli-insaturados y un bajo contenido de colesterol u otros esteroides.

Los galactolípidos neutros son los mejores candidatos para la

LÍPIDO	% En peso de los lípidos totales	Moles de lípido/ 100, mol de cloro- fila
Monogalactosil diacilglicerol	26.8	150
Digalactosil diacilglicerol	13.4	63
Sulfolípidos	4.1	21
Fosfolípidos	9.1	51
Clorofila a	20.8	70
Clorofila b		30
Carotenoides	2.8	22
Plastoquinonas, vitamina K, to- coferol	3.3	22
Esteroles	2.2	
Lípidos no iden- tificados	17.1	

Tabla II. Composición lipídica de las membranas de tilacoides de espinaca.

bicapa fluida, ya que tienen cabezas polares sin carga y sus grupos acilo presentan el grado de insaturación mas alto de todas las clases de lípidos. La galactolipasa libera grandes cantidades de galactolípidos sin inhibir el transporte de electrones. Esto indica que los galactolípidos no forman parte integral de los fotosistemas.

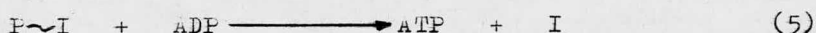
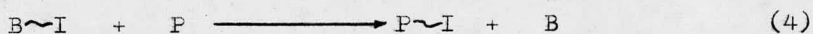
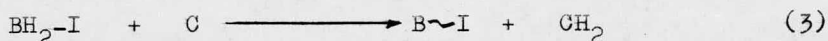
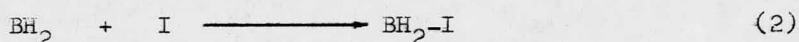
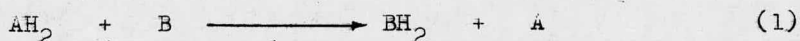
Si los galactolípidos constituyen gran parte de la matriz fluida de la membrana se puede pensar que los fosfolípidos y los sulfolípidos actúen como lípidos de frontera. Se ha sugerido que estos lípidos tienen una asociación específica con los exteriores hidrofílicos de los dos complejos clorofila-proteína, en la superficie de la membrana. Probablemente el complejo 1 tenga principalmente lípidos anfotéricos y el complejo 2 lípidos aniónicos. Las moléculas de plastoquinona, que actúan como una reserva de equivalentes red-ox entre los dos fotosistemas, quedarían en ambos lados de la bicapa lo que les permitiría interactuar con los dos fotosistemas y bombear protones a través de la membrana. Como se verá mas adelante, los protones son captados desde el exterior de la membrana del tilacoide durante la reducción de la plastoquinona por PS II, y son liberados en el interior del tilacoide durante la oxidación de la plastohidroquinona. Se ha demostrado que alguna parte de la plastoquinona se encuentra en el exterior de la membrana, ya que un anticuerpo para la plastoquinona inhibió parcialmente el transporte de electrones fotosintético (40).

6. Mecanismo de la Síntesis de ATP

Para conocer los mecanismos por los cuales la energía que se libera en el transporte de electrones es conservada y utilizada en la síntesis de ATP, se han desarrollado tres principales hipótesis; la hipótesis del intermediario químico, la hipótesis quimiosmótica, y la hipótesis mecanoquímica o conformacional.

a) Hipótesis del Intermediario Químico

Esta hipótesis fué formulada por Slater en los años cincuenta (ver revisión ref. 41), y se puede resumir en las cinco ecuaciones siguientes:



A, B y C son acarreadores de electrones y la energía es liberada en el transporte de electrones de A a C. El paso esencial de este mecanismo es, que la forma reducida de B (BH_2) forme un complejo reversible con algun otro componente (una enzima) I, siendo este complejo $\text{BH}_2\text{-I}$, el que ceda electrones a C. Una vez que $\text{BH}_2\text{-I}$ ha perdido sus electrones, el enlace entre B oxidado e I tiene un alto contenido energético. Este enlace de alta energía se usa para la fosforilación de ADP, que puede ocurrir de manera secuencial, como se muestra arriba, o tal vez en una reacción concertada. Esta hipótesis explica el acoplamiento que existe entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP, ya que para que sea posible una segunda secuencia de reacciones 1 y 2, se requiere que B e I se encuentren libres. En

tanto que el complejo B-I sea estable en el cloroplasto, no puede proseguir el flujo de electrones hasta que no se añadan ADP y P_i , ocurra la fosforilación y B e I quedan libres nuevamente.

Aunque este mecanismo de fosforilación es lógico, no se ha encontrado en cloroplastos ninguna evidencia de que exista un enlace de alta energía entre un acarreador de electrones y una "enzima acoplante", tampoco toma en cuenta, el hecho experimentalmente observado, de que debe existir una membrana intacta y topológicamente organizada para que se lleve a cabo la fosforilación de ADP.

b) Hipótesis Quimiosmótica

Esta hipótesis es la mas popular por ser la que mayor número de evidencias presenta. Fué formulada por Peter Mitchell en 1961 (42), está basada en cuatro postulados fundamentales que corresponden a cuatro sistemas funcionales y estructurales específicos.

- i. La enzima que interviene en la síntesis de ATP es una ATPasa reversible que se localiza en la membrana del tilacoide y que transfiere protones, con una relación definida de protón transferido por fosfato incorporado ($\rightarrow H^+/P_i$).
- ii. La cadena de transporte de electrones es un sistema que transfiere protones de un lado a otro de la membrana, con una estequiometría de 1 protón transferido por 2 electrones transportados ($\rightarrow H^+/2e^-$) y se encuentra organizado vectorialmente en la membrana de tal manera que la transferencia de protones se hace en el mismo sentido que la que hace la ATPasa en la hidrólisis de ATP.
- iii. Existen sistemas portadores de solutos que actúan para la estabilización osmótica de la membrana transportando metabolitos.
- iv. Los sistemas i-iii se encuentran en una membrana aislante, topológicamente cerrada llamada membrana de acoplamiento, que es una barrera osmótica no acuosa de baja permeabilidad a solutos en general y a los iones H^+ y OH^- en particular.

El sistema fotoredox al transferir protones, genera una diferencia de potencial protónico a través de la membrana. Esta diferencia de potencial Δp está dada por la suma de la diferencia de potencial eléctrico $\Delta \psi$ y una diferencia de potencial químico $-Z\Delta pH$ siendo Z un factor que depende de la temperatura y ΔpH es la diferencia de pH a través de la membrana;

$$\Delta p = \Delta \psi - Z \Delta pH$$

el valor de Z a 25°C es de 60 mV.

En los cloroplastos, la diferencia de potencial protónico se genera en la luz, cuando está funcionando la cadena de transporte de electrones, cuando termina la reacción luminosa, los protones que se han acumulado en el interior del tilacoide salen a través de la ATPasa y en presencia de ADP y P_i se lleva a cabo la síntesis de ATP. Cuando el acoplamiento es óptimo, es decir, cuando toda la corriente de protones generada por el sistema fotoredox pasa a través de la ATPasa reversible, ocurre un acople estequiométrico entre oxidoreducción y fosforilación, y el cociente $P_i/2e^-$ resultante de todo el proceso, se encuentra dado por el cociente $\rightarrow H^+/2e^-$ del sistema fotoredox dividido por el cociente $\rightarrow H^+/P_i$ de la ATPasa;

$$P_i/2e^- = \frac{\rightarrow H^+/2e^-}{\rightarrow H^+/P_i}$$

La figura 9 muestra el posible arreglo de la cadena fotoredox en la membrana del tilacoide y un mecanismo propuesto para la transferencia de protones por la plastoquinona.

El complejo ATPasa de los cloroplastos, mitocondrias y bacterias tiene un peso molecular de 500 000 y se ha demostrado (43) que se puede disociar en dos principales componentes; el factor de acoplamiento CF_1 de naturaleza hidrofílica y un complejo lipoproteico

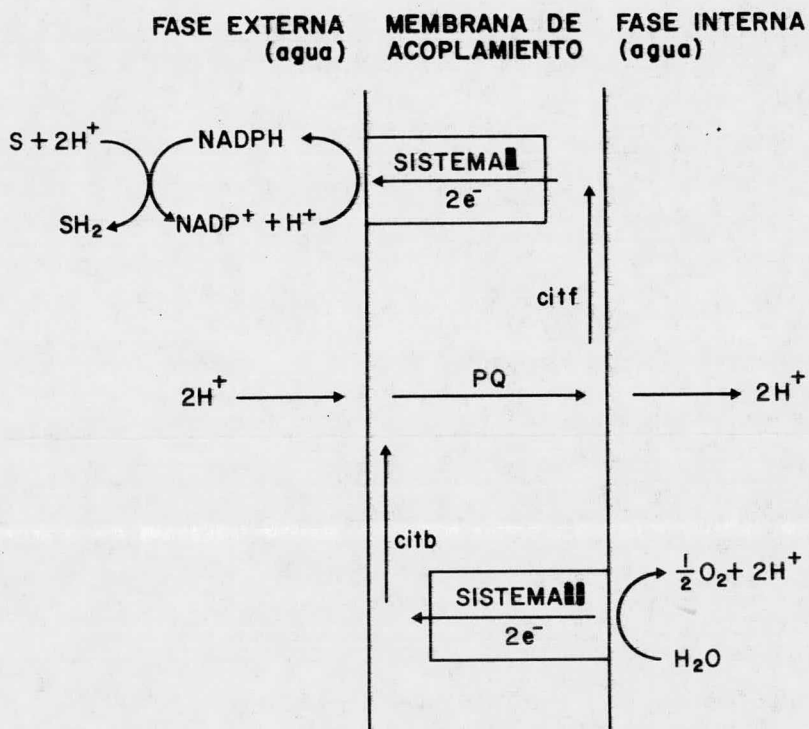
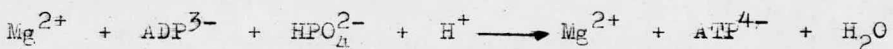


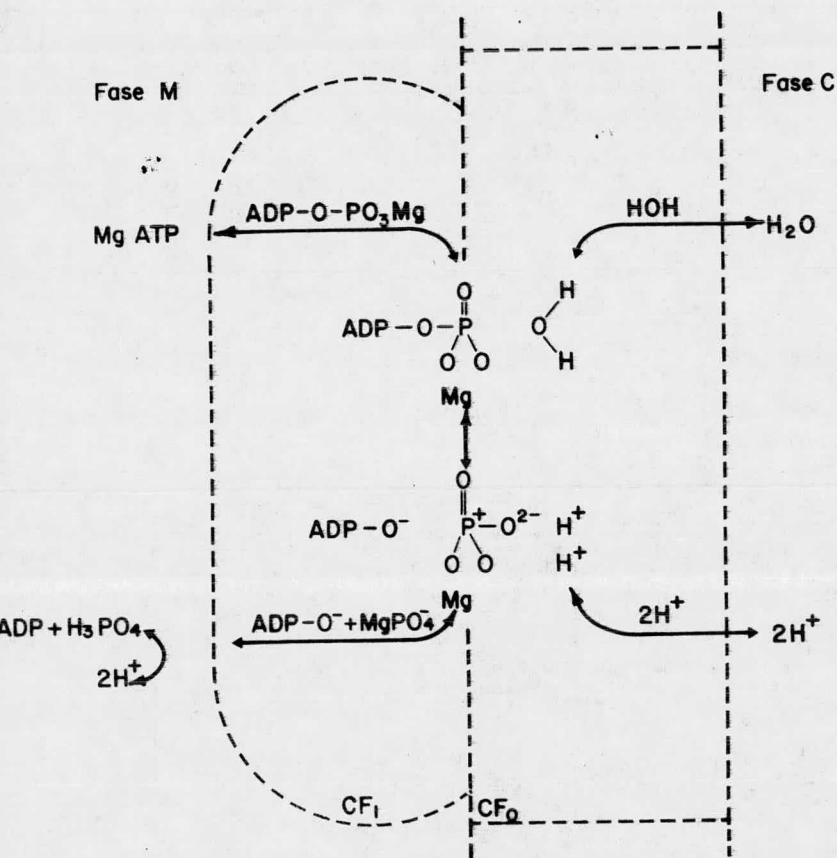
Fig. 9 Esquema del posible arreglo de la cadena foto-redox en la membrana del tilacoide y el mecanismo propuesto para la transferencia de protones por la plastoquinona.

hidrofóbico llamado CF₀ que forma parte integrante de la membrana. El CF₁ aislado tiene propiedades enzimáticas en condiciones apropiadas, en tanto que CF₀ no presenta actividad de ATPasa. Se ha encontrado (44) que CF₀ tiene una vía que conduce protones a través de la membrana y que se bloquea con inhibidores específicos de la ATPasa; oligomicina y dicitclohexilcarbodiimida. La figura 10 es un esquema del mecanismo de fosforilación de ADP. La característica fundamental de este esquema es que la entrada de 2H⁺ a través de la región conductora de protones de CF₀; debe estar acoplada a la transferencia reversible del grupo O²⁻ del ADPO⁻ + MgPO₄⁻ que ocurre en el lado M del centro activo de la región de CF₁; esto se debe a que los iones H⁺ atacan a la molécula de MgPO₄⁻ desde el lado C, mientras que el ADPO⁻ ataca el complejo transicional MgPO₄⁻-MgPO₃⁺ en el lado C del centro activo con una transferencia de H₂O a este mismo lado. El proceso se completa con la transferencia de MgATP desde el centro activo en CF₁ hasta la fase M. La reacción de deshidratación completa, cuando el pH en la fase M es alrededor de 8 y la concentración de Mg es baja, es:



de tal manera que en el proceso de la figura 10, por cada ATP sintetizado deben desaparecer 2H⁺ de la fase C pero solamente aparecer un H⁺ en la fase M, para estas condiciones particulares.

Las evidencias experimentales que apoyan la hipótesis quimiosmótica se pueden resumir de la siguiente manera: Jagendorf (45) ha demostrado que la conductancia de los iones H⁺ y OH⁻ en las membranas del tilacoide es casi un millón de veces menor que la de un medio acuoso, lo que le permite actuar como una barrera osmótica no acuosa para estos iones. El sistema de fotofosforilación no cíclica, esquematizado en la figura 9, es apoyado por distintos autores (45,



g. 10 Esquema que representa un posible mecanismo de la translocación de grupos O^{2-} para el sistema reversible de la ATPasa del cloroplasto, provocado por el paso de protones. La dirección de las flechas (largas) corresponde a la fosforilación de ADP provocada por el paso de protones.

46, 47). Witt (48) encontró que la membrana del tilacoide se carga por efectos fotoeléctricos que se atribuyen tanto a PS I como a PSII y que, seguida a este proceso fotoeléctrico, ocurre una liberación de protones en el sitio del donador electrónico, y una captura en el sitio del aceptor electrónico en la membrana. En tilacoides de cloroplasto de espinaca se ha observado que la velocidad de transferencia de protones a través de la membrana, es suficiente para explicar la velocidad con que se lleva a cabo la síntesis de ATP (27). En condiciones de saturación con luz se encontró un cociente $\rightarrow H^+/Pi$ igual a 2, lo cual está de acuerdo con los valores de Δp , ΔpH y $\Delta \psi$ que se han medido por diferentes métodos (49). La reversibilidad de la ATPasa ha sido demostrada por Jagendorf (45). Una transición ácido-base puede inducir la formación de ATP en la oscuridad, sin necesidad de transporte de electrones (58). Si se ponen los cloroplastos a pH 4.0, se esperan 20 seg. y a continuación se aumenta el pH a 8 y se añaden ADP, Pi y Mg^{2+} , ocurre la síntesis de ATP aun cuando los cloroplastos estén en la oscuridad.

c) Hipótesis Mecanoquímica o Conformacional

Esta hipótesis fué postulada por Boyer (50), propone que el transporte de electrones puede llevar a que **haya** protones dentro de la membrana hidrofóbica, donde se combinarán con el agua que se libera al sintetizarse el ATP a partir de ADP y Pi, formando iones hidronio, los cuales serán expulsados de la membrana. El efecto neto sería el facilitar la reacción de deshidratación en las regiones hidrofóbicas de la membrana. Dilley (51) ha encontrado que existe una concentración local de protones y Straub (52) menciona evidencias de que el factor de acoplamiento CF_1 por sí mismo debe de estar reducido y protonado para que la síntesis de ATP ocurra. Es fácil imaginar que tales distribuciones de carga en la membrana producirán cambios en los estados conformacionales de las proteínas

intrínsecas de la membrana. Así, esta hipótesis coloca al estado energizado de la membrana transductora, como el intermediario entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP. La condición energética se debe a la disposición de diferentes densidades de protones o electrones dentro de la membrana, mas bien que de ambos lados de ella.

7. Inhibidores y Desacoplantes del Transporte de Electrones Fotosintético y de la Fotofosforilación

Los inhibidores del transporte de electrones son sustancias o tratamientos que, sin importar su naturaleza, inhiben el transporte de electrones. Se piensa que actúan directamente sobre alguna etapa de óxido-reducción en la cadena, bloqueándola, interrumpiendo así el flujo de electrones e impidiendo que haya fosforilación.

Los desacoplantes de la fotofosforilación son compuestos que impiden la síntesis de ATP y aceleran el transporte de electrones, evitando el acople de estos dos procesos. Según las 3 hipótesis mencionadas arriba, los desacoplantes actuarían de distinta manera:

- i. Hipótesis del intermediario químico. Un desacoplante sería aquel compuesto que pudiera causar la hidrólisis de uno o mas de los intermediarios de alta energía, liberando al acarreador y al intermediario sin haberse producido la reacción de fosforilación.
- ii. Hipótesis quimiosmótica. Los desacoplantes serían aquellos compuestos que aumentarían la permeabilidad de la membrana a protones, lo que disiparía el gradiente protónico a través de la membrana y por lo tanto la energía para la síntesis de ATP.
- iii. Hipótesis Mecanoquímica o Conformacional. Los desacoplantes

serían aquellos compuestos capaces de remover los protones de las regiones lipofílicas de la membrana, descargando de esta manera el estado de alta energía.

La figura 11 representa el esquema "Z" del transporte de electrones fotosintético, en el cual se han indicado con números las regiones y los sitios específicos que son sensibles a los inhibidores de electrones.

Región 1. Se localizan los inhibidores que actúan en el lado de la oxidación del agua por PS II, son los siguientes:

- i. Hidroxilamina en concentraciones de 1 a 10 mM.
- ii. Amoníaco y metilamina en concentraciones de 30 mM y 150 mM respectivamente y a valores de pH mayores de 8.0.
- iii. Tris en concentraciones de 0.8 M y 50 mM con valores de pH de 8.0 y 8.8 respectivamente.
- iv. Carbonilcianuro y m-clorofenilhidrazona en concentraciones menores de 10 M.
- v. Tratamientos inhibitorios e inhibidores miscelaneos tales como calentamiento de los cloroplastos a 40-50°C, radiación con luz UV, exposición a medios con valores de pH extremos (abajo de 4 o arriba de 9), concentraciones altas de KCl y de 8-hidroxiquinolina.

Región 2. Se localizan los inhibidores que bloquean la salida de electrones de PS II.

- i. Fenilureas. 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) y su análogo 4-clorofenil, en una proporción DCMU/clo menor o igual a 1/100.
- ii. Inhibidores herbicidas. 1,10-Fenantrolina (o-fenantrolina) y sus derivados 4,7-dimetil y 5-metil.
- iii. Miscelaneos. Oxido de 2-heptil-4-hidroxiquinolina y su derivado 2-nonil, antimicina.

Sitio 3. Se localizan los antagonistas específicos para la plastoquinona.

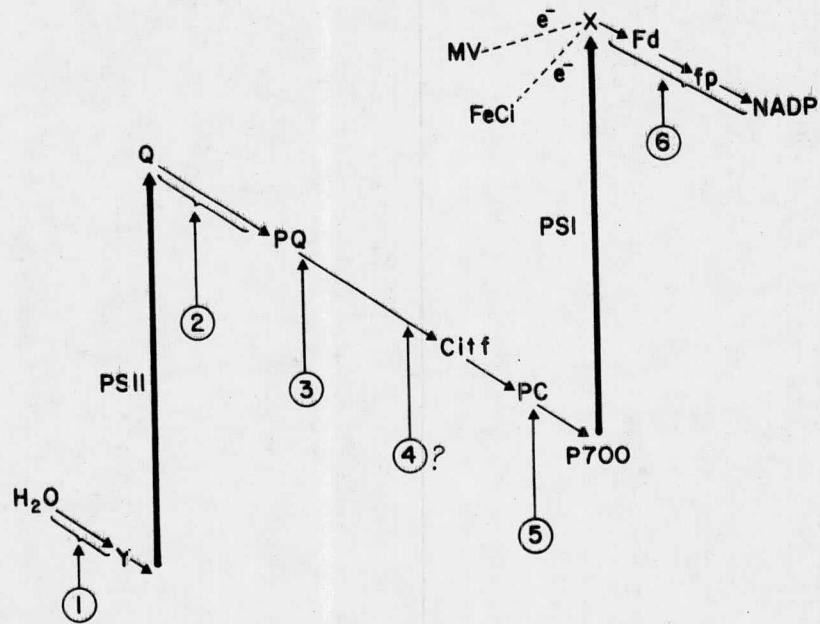


Fig. 11 Esquema "Z" simplificado del transporte de electrones fotosintético, que señala los sitios de inhibición (flechas numeradas).

- i. Dibromotimoquinona (DBMIB) en concentraciones mayores a 2 M
- ii. Isoprenilbenzoquinonas, helvetica y bovinona.

Sitio 4. En este sitio actúan los inhibidores de la transferencia de electrones entre plastoquinona y Cit f.

- i. 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida en concentración de 0.5 mM.

Sitio 5. Actúan los inhibidores de la plastocianina.

- i. Poliacetatos. La histona y la poli-L-lisina inhiben a la plastocianina en concentraciones de 10 g/ml.
- ii. Cloruro mercúrico. La incubación de cloroplastos con HgCl_2 con $\text{Hg}/\text{clo} = 1$, durante 30 min a 0°C , inhibe a la plastocianina.
- iii. KCN 20-30 mM a pH 7.8.
- iv. Anfotericina B. Es un agente complejante esteroide que remueve a la plastocianina de la membrana cuando está en una concentración de 0.5 mM.

Región 6.

- i. Disalicidenpropanodiamina, es un agente quelante de metales que inhibe las reacciones dependientes de la ferredoxina en una concentración de 1-2 mM.
- ii. Pirofosfato, inhibe la reacción de Hill en concentraciones mayores a 10 mM.
- iii. Fosfoadeninadifosforibosa, inhibe a la ferredoxin-NADP-reductasa y se produce por la degradación de NADP^+

Los siguientes compuestos actúan como desacoplantes de la fotofosforilación:

Compuesto	Concentracion necesaria para que actúe como un deseoplante
BDHB (n-butil-3,5- diyodo-4-hidroxi- benzoato)	10^{-2} mM
Atebrina (quinacrina)	3×10^{-2} mM
Clorpromasina	3×10^{-2} mM
Gramicidina S	4×10^{-3} mM
Octilguanidina	10^{-4} M
Carbonilcianuro de p-trifluorometoxi- fenilhidrasona (FOCF)	2×10^{-3} mM
Tiofosfato	4×10^{-4} M
Cloruro de amonio (NH_4Cl)	2 mM

III MATERIAL Y METODOS

1. Aislamiento de los Cloroplastos

Los cloroplastos de clase II (sin doble membrana externa), se aislaron de hojas de espinaca (Spinacea oleracea L.) de acuerdo con el método de McCarty y Racker (53) que consiste en lo siguiente: a 50 g de hojas de espinaca previamente lavadas con agua y guardadas en el refrigerador, dentro de una bolsa de plástico, durante toda la noche para eliminar el almidón, se les quitó la vena central y se cortaron en cuadros de 1 X 1 cm, se homogeneizaron en una licuadora marca "Oster" (cuyo vaso había sido enfriado previamente en el congelador por 30 minutos) con 200 ml del medio de aislamiento compuesto de KCl 20 mM, sacarosa 200 mM, $MgCl_2$ 5mM, TAPS (pH 8.0) 20 mM, 0.1 % de albúmina sérica bovina desgrasada y ascorbato 5 mM, durante 10 segundos a velocidad máxima. Posteriormente se filtró el homogenado a través de 4 capas de gasa, colocadas en un embudo de vidrio; el filtrado se centrifugó a 500 X g durante 2 minutos en una centrifuga MSE modelo LR-6, para eliminar células enteras, núcleos y pared celular. Se desechó el sedimento, el sobrenadante se centrifugó a 2 000 X g durante 8 minutos, en la misma centrifuga que se usó en el paso anterior, a continuación se desechó el sobrenadante, el sedimento, compuesto de un paquete de cloroplastos se lavó dos veces con la solución amortiguadora de resuspensión compuesta por TAPS 20 mM (pH 8.0), sacarosa 100 mM, KCl 20 mM y $MgCl_2$ 5 mM. En cada lavada se centrifugó igual que en el paso anterior. Una vez lavados los cloroplastos, se resuspendieron en 3 ml de la solución de resuspensión mencionada arriba. La suspensión de cloroplastos se guardó en un tubo de vidrio envuelto en papel de aluminio, con el propósito de evitar la oxidación de algunos componentes fotooxidables. Todo el proceso de aislamiento se llevó a cabo a 4°C y a un pH de 8.0 para prevenir la inactivación por galactolipasas y fosfolipasa D

La figura 12 es un esquema de este proceso de aislamiento.

2. Determinación de la Concentración de Clorofila

La concentración de clorofila en los cloroplastos se determinó de acuerdo con el método de Strain y cols. (54) que consiste en lo siguiente: se colocan en dos tubos de centrifuga clínica 5 ml de acetona al 80 %, en cada uno de ellos, a uno de estos tubos se le agregan 20 μ l de la suspensión de cloroplastos, se tapa y se incuba en la oscuridad durante 10 minutos, para permitir la extracción de la clorofila sin que esta sea oxidada por la luz. Posteriormente se centrifuga durante 5 minutos en la centrifuga clínica a máxima velocidad, ya que lo único que interesa es la clorofila disuelta en la acetona. La estimación de la concentración de clorofila se hace midiendo la absorción de luz del sobrenadante a 649 y 665 nm contra un blanco de acetona al 80 % al cual no se le agregaron cloroplastos en un espectrofotómetro Carl Zeiss M4 QIII 45309 y se calculan los valores mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{clo a } (\mu\text{g/ml}) = 11.63 (A_{665}) - 2.39 (A_{649})$$

$$\text{clo b } (\mu\text{g/ml}) = 20.11 (A_{649}) - 5.18 (A_{665})$$

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

A = absorbancia

3. Reacción de los Cloroplastos con el Reactivo Bifuncional DAEG

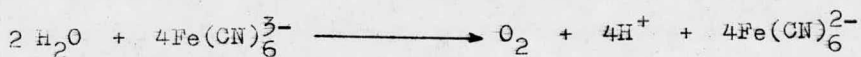
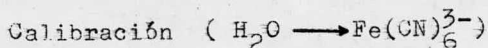
Para llevar a cabo la reacción de los cloroplastos con el reactivo bifuncional DAEG se hizo lo siguiente: se tomó una alícuota de la suspensión de cloroplastos que tuviera 1 mg de clorofila y se puso en 7 ml de un medio que contenía HEPES 20 mM, sacarosa 200 mM, KCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, MV 0.5 mM y, para distintos ensayos, se usaron concentraciones de DAEG de 2, 4, 6, 8 ó 10 mM, el cual se dispersó con homogeneizador marca Virtix. El pH se ajustó en un potenciómetro Sargent-Welch modelo LSX con un electrodo Sargent-Welch modelo S-30072-15, a distintos valores según el ensayo; 7.0, 7.5, 8.0 ó 8.5 con KOH 2N. Cada medio de reacción, con un pH y una concentración de DAEG determinados, se incubó durante 6 minutos a 19°C, en la luz ó en la oscuridad. Después de transcurrido este tiempo se paró la reacción agregando 8 ml del medio de aislamiento. La razón por la cual se usa el medio de aislamiento para parar la reacción del DAEG con los cloroplastos es que el medio contiene albúmina en cantidad suficiente como para que reaccione con el DAEG que no participó en la reacción con los cloroplastos. Posteriormente se centrifugó a 2 000 X g durante 8 minutos, se lavaron los cloroplastos con el medio de aislamiento, se volvió a centrifugar a 2 000 X g y finalmente los cloroplastos se resuspendieron en 1 ml del medio de aislamiento.

4. Medición del Transporte de Electrones (Reacción de Hill)

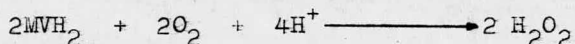
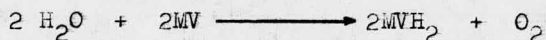
El transporte de electrones se determinó midiendo la concentración de oxígeno debida a la **fotoólisis** del agua en un medio que conte-

nía: HEPES 20 mM (pH 8.0), sacarosa 100 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, 0.1 % de albúmina bovina, MV 0.5 mM y 20 µg/ml de clorofila en un volumen final de 2 ml. Para calibrar el aparato se usó 10 l de Fe(CN)₆³⁻ 0.05 M en lugar de MV. El oxígeno se detectó con un electrodo tipo Clark que consiste de un cátodo de platino y un ánodo de plata, ambos inmersos en una solución saturada de KCl y separados del medio por una membrana de teflón, la cual solo permite el paso de oxígeno pero no el de los iones presentes en la solución. La medición de la concentración de oxígeno por electrodos se basa en la voltimetría y la polarografía. El oxígeno es electroreducible y su reducción da lugar a una corriente que se traduce en una onda la que se puede registrar. El voltaje aplicado normalmente se mantiene constante, y los cambios en la corriente (relacionada con la concentración de oxígeno reducido) se se registran en un graficador. El registro de la cantidad de oxígeno producido o consumido se llevó a cabo con un oxímetro de fabricación especial que trabaja con un electrodo tipo Clark conectado a un registrador Beckman 10" con escala linear-log. Como fuente de iluminación se empleó un proyector Sawyers 550 A con una lámpara de 500 W, la cual suministra luz a saturación. El haz de luz se hizo pasar a través de una lente de Isawa (que es un matraz balón de 500 ml con una solución diluida de CuSO₄) que sirve como filtro, elimina el calor y además concentra el rayo de luz.

Las reacciones que se llevaron a cabo en el medio de reacción fueron las siguientes:



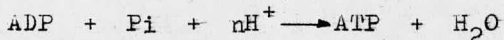
Transporte de electrones no-cíclico desde H₂O hasta MV



Para medir la reacción de Hill en condiciones fosforilantes, únicamente se añadió 1 mM de ADP y 3 mM de KH_2PO_4 (concentraciones finales).

5. Determinación de la Síntesis de ATP

El método se basa en el reportado por Dilley (55) y consiste en medir los pequeños cambios de pH que ocurren al disminuir la concentración de iones H^+ cuando la siguiente reacción se lleva a cabo en el rango de pH fisiológico:



en la cual n ($n = \rightarrow\text{H}^+ / \rightarrow\text{Pi}$) se calcula teóricamente y la capacidad de amortiguamiento (H^+ añadido / ΔpH) se determina experimentalmente por titulación. En el intervalo de pH de 7 a 9, la reacción mencionada arriba se puede expresar como sigue:



La relación entre el número de H^+ desaparecidos y el número de ATPs formados es igual a n . Nishimura y cols. (56) han calculado teóricamente el valor de n , encontrando que es igual a la unidad cuando la reacción se hace a pH 8.0. El registro de los cambios de pH se hizo con un potenciómetro Sargent-Welch modelo LSX (con un electrodo Sargent-Welch modelo S-30072-15) conectado a un registrador Hesth Schlumberger unido a un amplificador Heath. La iluminación empleada fué igual a la usada para medir el transporte de electrones. La mezcla de reacción tenía los siguientes componentes en un volumen total de 7 ml: KCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, ADP 1 mM, KH_2PO_4 3 mM, MV 0.5 mM y de 20 a 30 g de clorofila/ml. El pH se llevó a 8.0 con KOH 0.1 N, la calibración del aparato se hizo con HCl 0.001 N.

Todos los reactivos empleados, excepto el DAEG, fueron adquiridos de SIGMA Chemical Company. El reactivo bifuncional DAEG, nos fué donado por EVANS CHEMICALS, INC.

IV RESULTADOS

Para saber cual es el estado funcional de los cloroplastos despues de que han sido aislados y de que han sufrido el tratamiento necesario para la reacción con el DAEG, se midieron el transporte de electrones y la síntesis de ATP en el medio apropiado. Los resultados (Tabla III) se comparan con los reportados en la literatura (66).

	Síntesis de ATP (μ mol de ATP/h/mg de clorofila)	Transporte de electrones (μ eq e^- /h/mg de clorofila)
Datos reportados en la literatura.	70 - 150	172 - 425
Cloroplastos despues de aislarlos.	100 - 135	150 - 410
Cloroplastos con el mismo tratamiento que los marcados pero sin agregarles DAEG.	100 - 125	130 - 336

Tabla III. Estado funcional de los cloroplastos despues de los procesos de aislamiento y reacción con el DAEG.

1. Efecto del DAEG en la síntesis de ATP

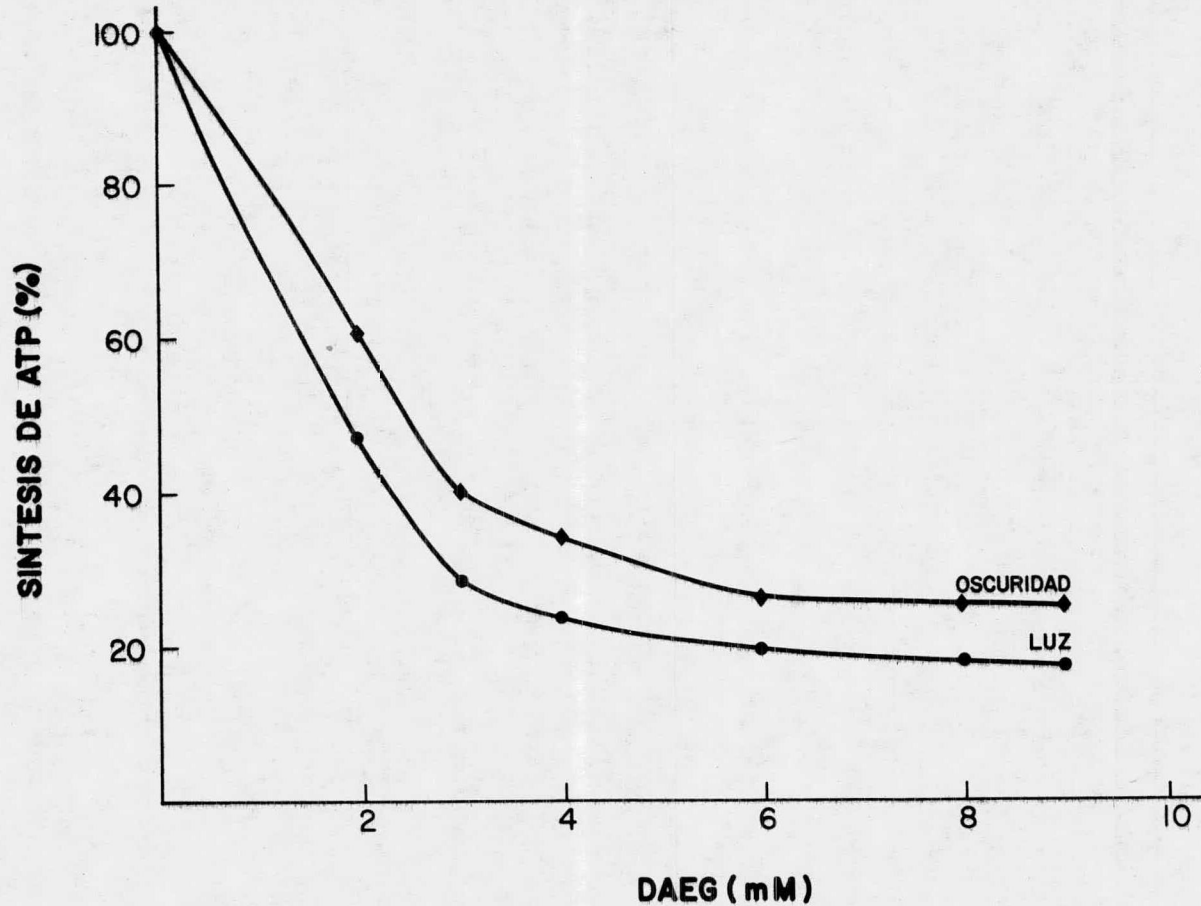
En la gráfica 1 observamos el efecto del DAEG en los cloroplastos de espinaca incubados a pH 8.0 (pH óptimo de la fotofosforilación) con diferentes concentraciones del reactivo bifuncional. El reactivo inhibe la formación de ATP hasta un 80 % del valor control (135 mol de ATP/h/mg clorofila) cuando la concentración de DAEG es de 6 mM, a mayores concentraciones del reactivo no se logra mayor inhibición. En la misma gráfica observamos que cuando la reacción se hace en la oscuridad, la inhibición de la síntesis de ATP es menor en todas las concentraciones del reactivo bifuncional usadas.

2. Efecto del DAEG en el Transporte de Electrones

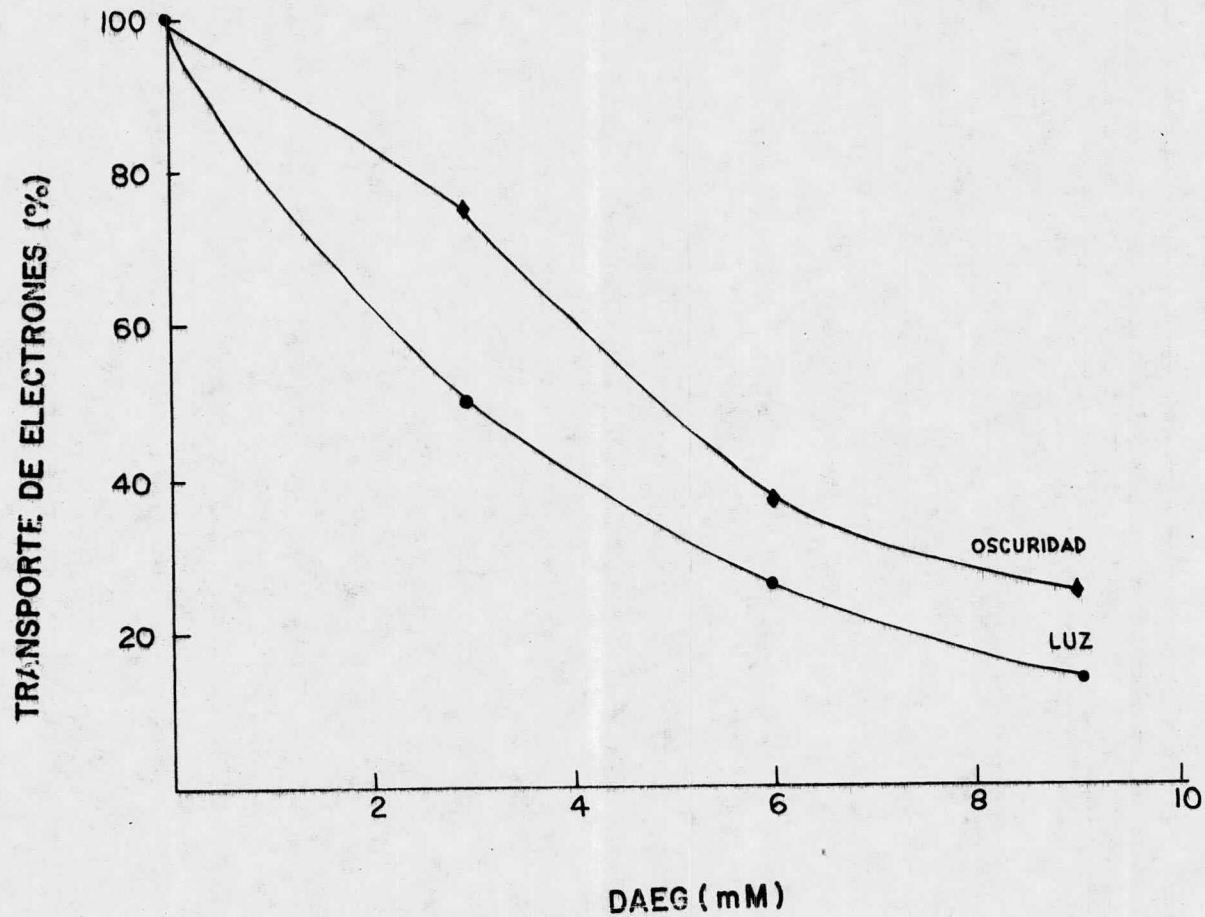
La gráfica 2 muestra el efecto del DAEG a diferentes concentraciones, sobre el transporte de electrones. El DAEG inhibe el transporte de electrones un 70 % del valor control (336 eq e⁻/h/mg clorofila) cuando se usa una concentración de 6 mM. Como en el caso de la inhibición de la síntesis de ATP, también el efecto inhibitorio del DAEG es mayor en la luz que en la oscuridad.

3. Efecto del DAEG en la síntesis de ATP a Distintos Valores de pH

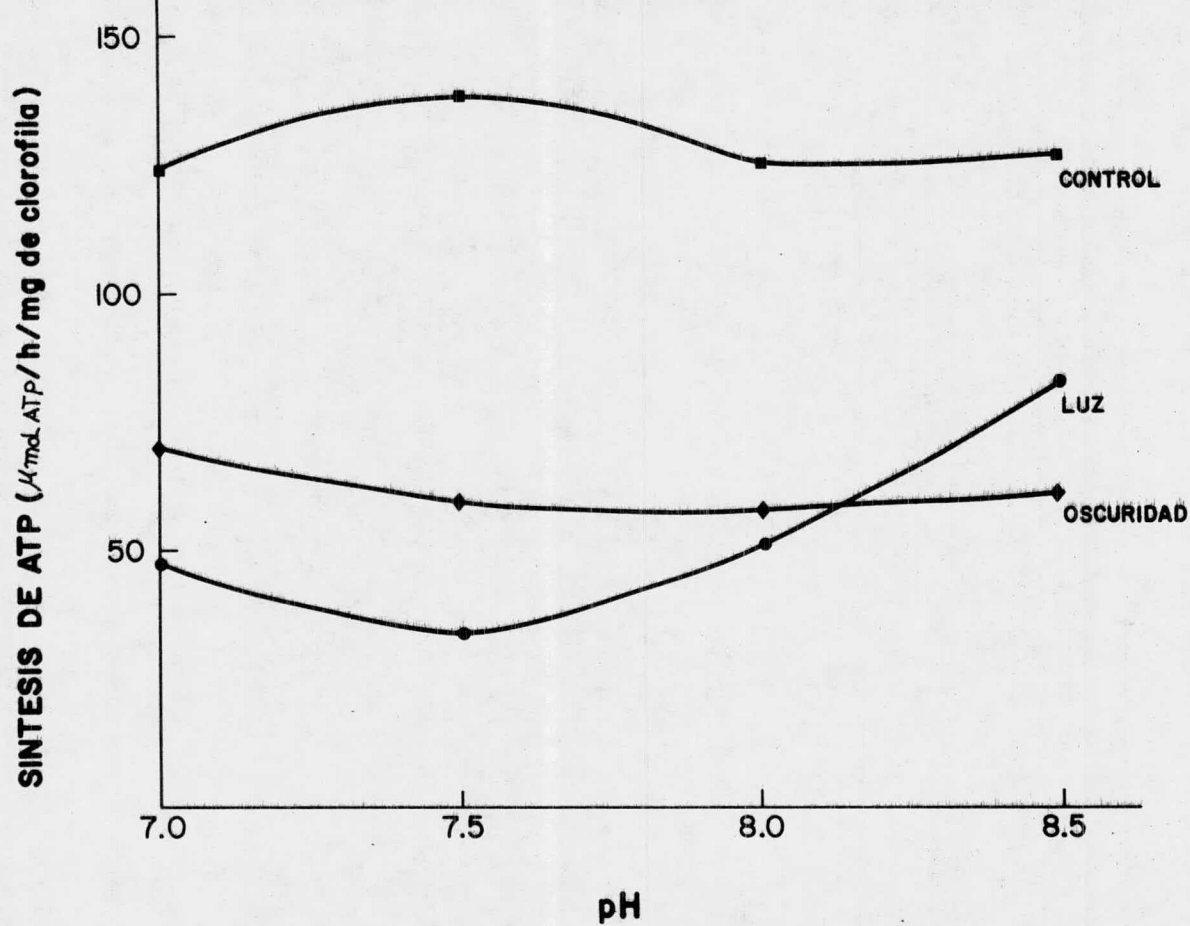
La gráfica 3 muestra el efecto del reactivo bifuncional sobre la síntesis de ATP cuando la incubación se hizo a diferentes valores de pH, y posteriormente el ensayo de la síntesis de ATP se hizo



Gráfica 1. Efecto del DAEG en la síntesis de ATP. Control (130 μ mol ATP/h/mg clp), ●—● experimento en la luz, ◆—◆ experimento en la oscuridad.



Gráfica 2. Efecto del DAEG en el Transporte de Electrones. Control ($336.84 \mu\text{eq e}^-/\text{h}/\text{mg clo}$), ●● experimento en la luz, ◆◆ experimento en la oscuridad.



Gráfica 3. Efecto del DAEG en la síntesis de ATP a distintos valores de pH. —■— control, ●— experimento en la luz, ◆— experimento en la oscuridad.

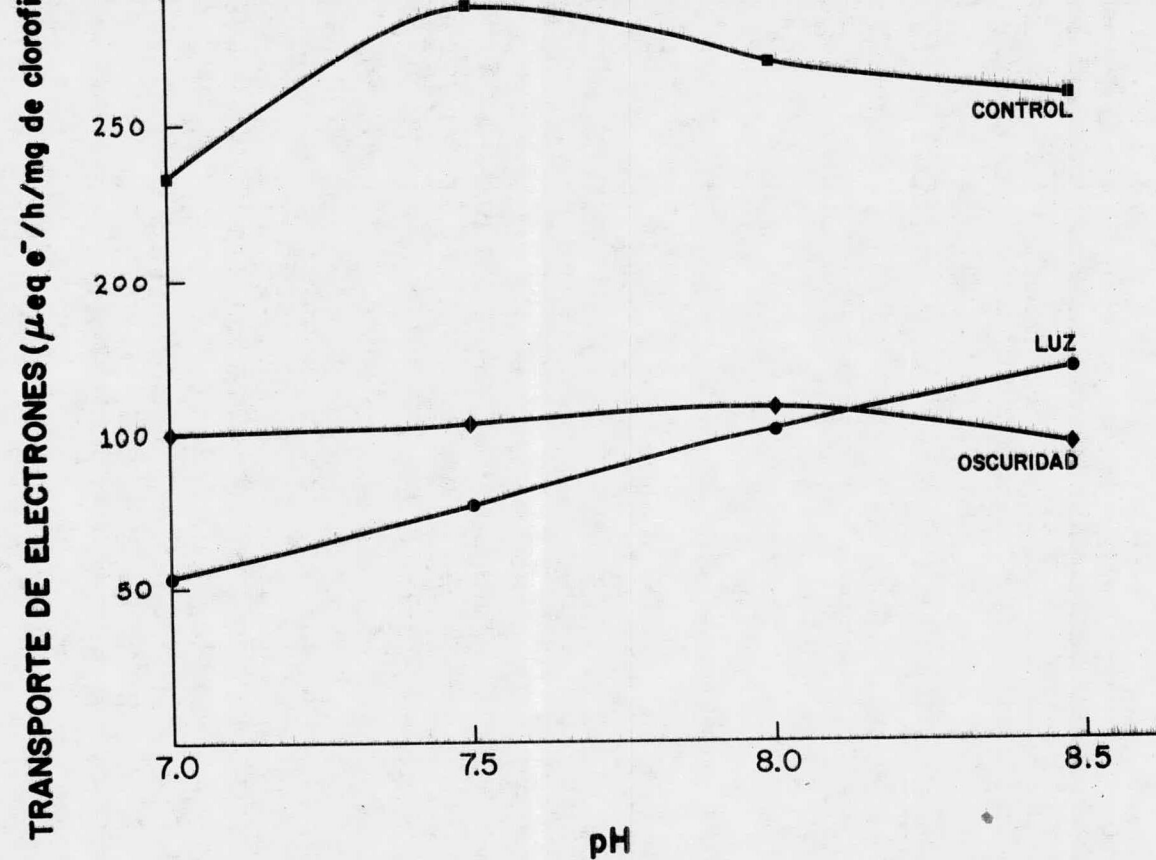
a pH 8.0. Los datos indican que la mayor inhibición del reactivo entrecruzante se obtuvo a pH 7.5. Es de hacerse notar que por encima de pH 8.0, la inhibición en la oscuridad es mayor comparada con la de la luz.

4. Efecto del DAEG en el Transporte de Electrones a Distintos Valores de pH.

La gráfica 4 muestra los resultados que se obtuvieron sobre el transporte de electrones al marcar los cloroplastos con el reactivo bifuncional a distintos valores de pH. Podemos observar que el reactivo bifuncional DAEG, inhibe el transporte de electrones a cualquier valor de pH, encontrándose más pronunciada esta inhibición en el intervalo de pH de 7.0 a 7.5. El efecto es parecido al encontrado en la inhibición de la síntesis de ATP.

5. Efecto de un desacoplante (NH_4Cl) sobre la inhibición del Transporte de Electrones Producida por el DAEG

Con el propósito de saber si el reactivo bifuncional inhibe un sitio de la cadena en el que se lleva a cabo la transferencia de energía para la síntesis de ATP o bien si el sitio de acción es en cualquiera otra parte de la cadena, se llevó a cabo el transporte de electrones en presencia de un desacoplante NH_4Cl , el cual es capaz de revertir el efecto inhibitorio de cualquier reactivo cuando este se encuentra actuando sobre algún sitio de transferencia de energía en la cadena. La Tabla IV contiene los resultados obtenidos.



Gráfica 4. Efecto del DAEG en el Transporte de Electrones a distintos valores de pH. \square Control, \bullet experimento en la luz, \blacklozenge experimento en la oscuridad.

Condición	Iluminación	sin NH_4Cl	con 0.5 M de NH_4Cl
		($\mu\text{eq e}^-/\text{h}/\text{mg clor}$)	($\mu\text{eq e}^-/\text{h}/\text{mg clor}$)
Control (sin DABG)		336.84	821.05
Con 3 mM de DABG	Luz	189.47	194.37
Con 3 mM de DABG	Osc	253.41	260.32
Con 6 mM de DABG	Luz	94.73	105.26
Con 6 mM de DABG	Osc	126.31	137.89
Con 9 mM de DABG	Luz	57.89	63.24
Con 9 mM de DABG	Osc	105.41	115.78

Tabla IV. Efecto de un desacoplante (NH_4Cl) sobre la inhibición del Transporte de Electrones producida por el DABG.

V DISCUSSION

De los resultados anteriores se pueden hacer las siguientes conclusiones:

- i. En todos los experimentos (excepto los que se llevaron a pH 8.5) el efecto inhibitorio del DAEG sobre el transporte de electrones y la síntesis de ATP, es mayor en la luz que en la oscuridad. Por esta razón podemos suponer que el reactivo bifuncional actúa principalmente en los grupos sulfhidrilo que se encuentran libres en el exterior de la membrana en condiciones de transporte de electrones y de síntesis de ATP. El hecho de que exista un cierto porcentaje de inhibición en la oscuridad, sugiere que el DAEG se une a grupos SH que se encuentran normalmente expuestos en la membrana y que pertenecen a moléculas proteicas que también tienen una participación en las funciones del cloroplasto.
- ii. El reactivo bifuncional inhibe la síntesis de ATP (80 % de inhibición con respecto a la actividad control) a una concentración de 6 mM; a esta misma concentración también se encuentra inhibido el transporte de electrones (71.9 % de inhibición con respecto a la actividad control). Por lo tanto el DAEG no actúa como un desacoplante de la fotofosforilación los cuales, como se mencionó antes, inhiben la síntesis de ATP y aceleran el transporte de electrones.
- iii. Como se había mencionado anteriormente, los cambios de pH también inducen la aparición de grupos SH libres en el exterior de la membrana de los tilacoides. Las gráficas 3 y 4 muestran que la reacción del DAEG (6 mM) con los cloroplastos es claramente dependiente del pH, encontrándose una mayor inhibición a pH 7.5 lo cual está de acuerdo con la literatura (62) que dice que el intervalo donde es mayor la exposición de grupos SH es de 7.1 a 7.9. El hecho de que en la oscuridad la inhibición de la síntesis de ATP y el trans-

porte de electrones sea practicamente constante al variar el pH, nos indica nuevamente que el DABG no se une a grupos SH que se exponen en el estado funcional del cloroplasto. A un pH de 8.5 la inhibición de ambas funciones es menor en la luz que en la oscuridad. Esto puede deberse a que el pK de los grupos SH que se encuentran libres en la luz, sea mayor a 8.0 y por lo tanto se encuentren formando puentes disulfuro entre sí.

- iv. Los resultados encontrados con el desacoplante NH_4Cl (Tabla IV), indican que el DABG no actúa exclusivamente sobre uno de los sitios de transferencia de energía, es decir, entre Cit f y plastocianina (PS II) o entre Cit b_6 y el aceptor primario de fotosistema I (ver Fig. 5), porque de ser así el NH_4Cl debería revertir la inhibición en el transporte de electrones lo cual no ocurre.

Por todos estos hechos experimentales pensamos que el DABG se une principalmente a los grupos SH que se encuentran libres en presencia de luz y en condiciones de transporte de electrones y de síntesis de ATP. Estos grupos SH pueden corresponder a moléculas proteicas que intervienen en las funciones del cloroplasto, pudiendo ser acarreadores del transporte de electrones que se encuentren cercanos entre sí y cuyos grupos sulfhidrilo queden entrecruzados por el DABG al momento de quedar libres en la superficie de la membrana del tilacoide. El resultado del entrecruzamiento impide que, posteriormente, en condiciones normales se lleve a cabo el transporte de electrones y la síntesis de ATP; probablemente porque no se le permita a la membrana sufrir cambios conformacionales o simplemente por estar modificando químicamente grupos reactivos de ciertas moléculas.

Para determinar el sitio de acción del reactivo bifuncional, los experimentos que se podrían hacer serían: medir el transporte de electrones por separado en PS I y PS II, usando para este fin inhibidores y aceptores artificiales. Sabiendo a que fotosistema corresponde

la o las moléculas marcadas, obtener fracciones enriquecidas con este fotosistema y hacer estudios de absorción de luz a diferentes longitudes de onda, comparando los resultados con los datos que se tienen para cada componente de dicho fotosistema en condiciones normales.

Para determinar si las moléculas que sufren la modificación química, han experimentado previamente cambios conformacionales, se podrían hacer, en las moléculas aisladas, estudios de dicroísmo en infrarrojo, lo cual muestra la dependencia de la absorción en infrarrojo respecto de la orientación de la muestra.

Estos experimentos podrían indicar cuales son las moléculas proteicas de la cadena de transporte de electrones o de la fotofosforilación que participan en los cambios que sufre la superficie de la membrana de los tilacoides al llevar a cabo estas funciones.

REFERENCIAS

1. Trebst, A., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25, 423 (1974).
2. Mc Carty, R.E. y Fagan, J., *Biochemistry*, 12, 1503 (1973).
3. Menke, W., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 13, 27 (1962).
4. Kirk, J.T., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 21, 11 (1970).
5. Punnett, T., *Brookhaven Symp. Biol.*, 19, 375 (1966).
6. Benson, A., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 15, 1 (1964).
7. Gitler, C., et. al., *Los Perfiles de la Bioquímica en México*, Dirección General de Publicaciones, U N A M, México, D.F. 1974.
8. Duysens, L., *Brookhaven Symp. Biol.*, 19 (1966).
9. Govindjee y Govindjee, R., *Scientific American*, 231, 6 (1974).
10. Regitz, G. y Oettmeier, W., *Proc. Int. Congr. Photosynthesis 2nd.*, Forti, G. et. al. eds., 499 (1972).
11. Böhme, H. y Cramer, W.A., *FEBS lett.*, 15, 349 (1964).
12. Böhme, H. y Cramer, W.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 283, 302 (1972).
13. Davenport, H.E., *Nature, London*, 199, 151 (1963).
14. Shin, M., *Methods in Enzimology*, 23, 440 (1971).
15. Trebst, A., *Proc. I-t. Congr. Photosynthesis, 2nd* (G. Forti et.al. eds.), Junk, The Hague, 399 (1972).
16. Duysens, L. y Amesz, J., *Biochim. Biophys. Acta*, 234, 381 (1962).
17. Böhme, H. y Cramer, W.A., *Biochemistry*, 11, 1155 (1972).
18. Buttler, W., *FEBS lett.*, 20, 333 (1971).
19. Lehninger, A. *Bioenergetics, 2nd. ed.*, W.A. Benjamin, Inc. Menlo Park. California 1973.
20. Singer, S.J. *Structure and Function of Biological Membranes*,

Rothfield, L.I., ed., 145-222, Academic Press
New York (1971).

21. Jost, P.C., Griffith, O.H., Capaldi, R.A. y Vanderkooi, G.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 70, 480 (1973).
22. McCarty, R.E. y Racker, E., Brookhaven Symp. Biol., 19, 202
(1966).
23. Murakami, S., Comparative Biochemistry and Biophysics of
Photosynthesis, Shibata, K., Takamiya, A.,
Jagendorf, A.T. y Fuller, R.C., eds, 82,
University of Tokyo, Press Tokyo (1968).
24. Strotmann, H., Hesse, H. y Edelman, K., Biochim. Biophys.
Acta, 314, 202 (1973).
25. Lien, S., Berzborn, R.J. y Racker, E., J. Biol. Chem. 250,
3520 (1972).
26. Racker, E., Hauska, G.A., Lien, S., Berzborn, R.J. y Nelson,
N., Proc. 2nd Int. Congr. Photosynthesis Research,
Forti, G., Avron, M. y Melandri, A., eds, 2, 1097
Dr. W. Junk, N.V. The Hague (1972).
27. Junge, W. y Ausländer, W., Biochim. Biophys. Acta 333, 59
(1974).
28. Harth, E., Reimer, S. y Trebst, A., FEBS Lett. 42, 165 (1974).
29. Calvin, M., Rev. Mod. Physics 31, 147 (1959).
30. Rabinowitch, E.I., Discuss. Faraday Soc. 27, 161 (1959).
31. Giaquinta, R.T., Dilley, R.A. y Anderson, B., **Biochem. Biophys.**
Res. Commun., 52, 1410 (1973).
32. Thornber, J.P., Gregory, R.P., Smith, C.A. y Leggett-Bailey,
J., Biochemistry, 6, 391 (1967).
33. Levine, R., Burton, W. y Duram, H., Nature, 237, 176 (1972).

34. Anderson, J. y Levine, R., *Biochim. Biophys. Acta*, 357, 118 (1974).
35. Rabinowitch, E., *Photosynthesis and Related Processes*, 1, 382 (1945) y 2, 1714 (1956) Interscience New York.
36. Weier, T.E. y Benson, A., *Am. J. Bot.*, 54, 389 (1967).
37. Anderson, J., *Nature*, 253, 536 (1975).
38. Briantais, J., Vernet, C. y Moya, I., *Biochim. Biophys. Acta*, 325, 530 (1973).
39. Benson, A., *Adv. Lipid Res.*, 1, 387 (1963).
40. Radunz, A. y Schmid, G., *Naturforsch.*, 28, 36 (1973).
41. Slater, E., *Quart. Rev. Biophys.*, 4, 35, (1971).
42. Mitchell, P., *Nature (London)*, 191, 144 (1961).
43. Racker, E., *Essays Biochem.*, 6, 1, (1970).
44. Mitchell, P. y Moyle, J., *Biochem. Soc. Spec. Publ.* 4, 91 (1974).
45. Jagendorf, A., *Bioenergetics of Photosynthesis*, Govindjee ed. 413, Academic Press, New York (1975).
46. Carmeli, C., Lifshitz, Y. Gepshtein, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 376, 249 (1975).
47. Dilley, R. y Giaquinta, R., *Curr. Top. Membr. Transp.*, 2, (1976).
48. Witt, H., *Q. Rev. Biophys.*, 4, 365 (1971).
49. Walker, D. y Crofts, A., *Annu. Rev. Biochem.*, 39, 389 (1970).
50. Boyer, P., *Oxidases and Related Systems*, T.E. King, H.S. Mason y M. Morrison eds, II, 994, Willey, New York.



51. Dilley, R., *Prog. Photosynthesis Res.*, 3, 1354 (1968).
52. Lynn, W. S., y Straub, K.D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 63, 540 (1969).
53. McCarty, R. y Racker, E., *J. Biol. Chem.* 242, 3435 (1967).
54. Strain, H.H., Cope, B. y Svec, W., *Methods in Enzymology*, 23, 452 (1970).
55. Dilley, R., *Methods in Enzymology*, 4, 68 (1970).
56. Nishimura, M. y Chance, B., *Methods in Enzymology*, 34, 641 (1970).
57. Andreo, C. y Vallejos, R., *B.B.A.*, 423, 590 (1975).
58. Jagendorf, T.A., *Fed. Proc.*, 26, 1361 (1967).
59. Gould, M.J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 64, 673 (1975).
60. Koenig, F., Menke, W., Craubner, H. Schmid, G. y Radunz, A., *Naturforsch.*, 276, 1225 (1972).
61. Cantley, C. y Hammes, G., *Biochemmistry*, 15, 1 (1976).
62. Portis, A., Magnusson, R. y McCarty, R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 64, 3 (1975).
63. Prochaska, L. y Dilley, R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1977).
64. Novak, I. y Siegenthaler, P., *Plant Physiol.* 62, 368 (1978).
65. Vallejos, R. y Andreo, C., *FEBS LETTERS*, 61, 1 (1976).
66. Avron, M. y Shavit, M., *BBA*, 102, 317 (1965).



Impresiones Lupita

MEDICINA No. 25
FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD
CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.
TEL. 548-49-79