

172  
209



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVIDAD DE LA ENZIMA  $H^+$ -ATPasa DURANTE EL  
DESARROLLO ONTOGENICO DEL CLOROPLASTO DE  
MESOFILO DE MAIZ (*Zea mays* L.) VARIEDAD  
TUXPEÑO.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

DAVID REYES ORTIZ

DIRECTOR: CLAUDIA LERMA ORTIZ

MEXICO, D. F.

ENERO 1990

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Indice.....	1
Introducción.....	V
I	
1 MARCO TEORICO	
1.1 CLOROPLASTO.....	1
1.1.2 CLOROPLASTOS DE PLANTAS MONOCOTILEDONEAS.....	2
1.2.1 Membrana externa del cloroplasto.....	3
1.2.2 Estroma del cloroplasto.....	3
1.3 TILACOIDE.....	4
1.3.1 Membrana transdutora de energia del cloroplasto.....	5
1.3.1.1 Fase lipidica de la membrana tilacoide del cloroplasto.....	5
1.3.1.2 Fase proteica de la membrana tilacoide del cloroplasto.....	6
1.3.1.3 AminoAcidos y amidas libres del cloroplasto.....	7
1.4 COMPONENTES DE LA ENZIMA $H^+$ -ATPasa.....	
1.4.1 Enzima $H^+$ -ATPasa.....	7
1.4.1.1 Fosfolipidos asociados a la enzima $H^+$ -ATPasa.....	8
1.4.1.2 Proteolipidos de la enzima $H^+$ -ATPasa.....	8
1.4.1.3 Proteinas de la enzima $H^+$ -ATPasa.....	8
1.4.1.4 Bomba de iones $H^+$ manejada por el gradiente electroquimico ( $\Delta\mu H^+$ ).....	9
1.4.2 Fo de la enzima $H^+$ -ATPasa.....	9
1.4.3 Fi de la enzima $H^+$ -ATPasa.....	10
1.5 FUNCIONAMIENTO DE LA ENZIMA $H^+$ -ATPasa.....	12
1.5.1 Membrana transdutora de energia del cloroplasto.....	14
1.5.2 Nucleotidos estrechamente ligados a la enzima $H^+$ -ATPasa.....	18
1.5.3 Sustratos e inhibidores de la enzima $H^+$ -ATPasa.....	20
1.5.3.1 Sustratos e inhibidores trifosforilados de la enzima $H^+$ -ATPasa.....	21
1.5.3.2 Sustratos e inhibidores difosforilados de la enzima $H^+$ -ATPasa.....	21
1.5.4 Cambios conformacionales de la enzima $H^+$ -ATPasa.....	25
1.5.5 Teoria Quimiosmotica del transporte de iones $H^+$ .....	27
1.5.6 Sitio activo de la enzima $H^+$ -ATPasa.....	30
1.5.7 Mecanismo de la enzima $H^+$ -ATPasa para la sintesis e hidrolisis de ATP.....	34
1.5.7.1 Reacciones con seis subunidades de la enzima $H^+$ -ATPasa.....	38
1.5.7.2 Cambios de los componentes de los proteolipidos de la enzima $H^+$ -ATPasa.....	39
1.5.8 Bomba de iones $H^+$ manejada por el gradiente electroquimico ( $\Delta\mu H^+$ ).....	41
1.5.8.1 La bacteriorrodopsina como modelo para el transporte de iones $H^+$ a través de la membrana de bacterias halófitas.....	44
1.5.8.1.1 Mecanismo de reaccion de la bacteriorrodopsina.....	45
1.6 SIGNIFICADO BIOLOGICO DE LA SINTESIS DE ATP.....	47
1.7 MARCO REFERENCIAL.....	
1.7.1 ANTECEDENTES DE LA ACTIVIDAD ATPasa DE LA CFI DE CLOROPLASTOS DE MAIZ TRATADOS CON METANOL.....	48
1.8 BIOGENESIS DEL CLOROPLASTO DE MAIZ.....	51
1.8.1 Relacion de la distancia desde la base de la hoja y edad del cloroplasto de trigo etiolado.....	52

1.8.2	Rendimiento de la cosecha de las hojas de maíz para experimentar	53
1.8.3	Cantidad de células de mesófilo por sección en trigo etiolado	53
1.8.4	Magnitudes de los cloroplastos y sus características	54
1.8.5	Síntesis de proteínas, DNA y RNA en etioplastos de trigo	57
1.8.5.1	Aminoácidos y aminos	59
1.8.6	Desarrollo de fotosistemas	61
1.8.7	Lípidos	64
1.8.8	Tabla general de las características de los cloroplastos de mesófilo de maíz durante el desarrollo ontogénico	66
1.9	BIÓGENESIS DE LA ENZIMA $H^+$ -ATPasa	68
1.9.1	Desarrollo de la función de la enzima $H^+$ -ATPasa	71
II		
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1	HIPÓTESIS DE TRABAJO	74
2.2	OBJETIVOS	
2.2.1	Objetivo principal	74
2.2.2	Objetivos secundarios	74
III		
3	MATERIALES Y METODOS	
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	75
3.2	PREPARACION DE CLOROPLASTOS PARA ACTIVAR LA ATPasa	
3.2.1	Obtención de cloroplastos de mesófilo	75
3.3	TÉCNICAS ANALÍTICAS	
3.3.1	Determinación de la concentración de clorofila	
3.3.1.1	Fundamento de la determinación de la concentración de clorofila	77
3.3.1.2	Método para la determinación de la concentración de clorofila	77
3.3.2	Determinación de fosfato	
3.3.2.1	Fundamento para la determinación de fosfato	78
3.3.3	Determinación del fosfato producido durante la activación de la ATPasa	79
3.3.4	Efecto del metanol en la determinación de fosfato	79
3.3.5	Efecto del metanol en la hidrólisis de ATP	80
3.4	MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa	
3.4.1	Técnica de activación de la ATPasa tratada con metanol	
3.4.1.1	Fundamento de la activación de la ATPasa tratada con metanol	80
3.4.1.2	Método de activación de la ATPasa tratada con metanol	82
3.4.2	Determinación de la concentración de metanol para la activación de la ATPasa	82
3.4.3	Tiempo de activación de la ATPasa tratada con metanol	83
3.4.4	Cantidad de cloroplastos para activar la ATPasa	83
3.4.5	Medición de la actividad de la ATPasa tratada con metanol	84
3.5	MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA SÍNTESIS DE ATP	
3.5.1	Fundamento de la actividad de la síntesis de ATP	84

3.5.2	Método de medición de la actividad de síntesis de ATP.....	85
3.6	MEDICION DE LA VELOCIDAD DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES.	
3.6.1	Fundamento de la medición de velocidad de transporte de electrones (T.E.).....	86
3.6.2	Método de medición de la velocidad de transporte de electrones.	86
3.7	TECNICAS DE MICROSCOPIA PARA LA TOMA DE FOTOGRAFIAS.	
3.7.1	Técnica de preparación de cortes de hoja para observarlos con microscopio de campo claro.....	87
3.7.2	Técnica de preparación de cloroplastos para observarlos con microscopio electrónico.....	88
IV		
4	RESULTADOS.	
4.1	OBTENCION DE CLOROPLASTOS DE MESOFILO DE MAIZ.....	89
4.2	CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE FOSFATO.....	89
4.3	EFFECTO DEL METANOL EN LA DETERMINACION DE FOSFATO.....	90
4.4	EFFECTO DEL METANOL EN LA HIDROLISIS DE ATP.....	92
4.5	DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE METANOL PARA ACTIVAR LA ATPasa DE CLOROPLASTOS DE MAIZ.....	93
4.6	TIEMPO DE ACTIVACION DE LA ATPasa TRATADA CON METANOL.....	95
4.7	CANTIDAD DE CLOROPLASTOS PARA ACTIVAR LA ATPasa TRATADA CON METANOL.....	96
4.8	MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE CLOROPLASTOS DE MAIZ TRATADOS CON METANOL.....	97
4.9	MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA SINTESIS DE ATP.....	100
4.10	MEDICION DE LA VELOCIDAD DE TRANSPORTE DE ELECTRONES.....	101
4.11	ANATOMIA FOLIAR Y DEL CLOROPLASTO DE MESOFILO DE MAIZ.....	106
V		
5	DISCUSION.	
5.1	ACTIVIDAD DE LA ATPasa TRATADA CON METANOL.....	111
5.2	ACTIVIDAD DE SINTESIS DE ATP.....	113
5.3	VELOCIDAD DE TRANSPORTE DE ELECTRONES.....	114
5.4	CONSIDERACIONES PARA DETERMINAR EL POSIBLE SITIO DE ACOPLAMIENTO DEL TILACOIDE DEL CLOROPLASTO DE MESOFILO DE MAIZ.....	116

5.5	CONSIDERACIONES GENERALES DE LAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS DE LOS CLOROPLASTOS DE MESOFILO DE MAIZ EN CADA ESTADO DE DESARROLLO ONTOGENICO.....	119
5.6	ACTIVIDAD ATPasa Y SU MECANISMO DE ACCION.....	121
5.7	APORTACIONES.....	125
5.7	RECOMENDACIONES.....	126
VI		
6	CONCLUSIONES.....	128
	Abreviaturas.....	129
	Literatura consultada.....	131
	Resumen.....	135

## Introducción.

Con el paso del tiempo se incrementa y se diversifica el conocimiento en todos sus ambitos.

Se destinan cuantiosos recursos humanos y materiales para conocer los patrones que gobiernan los fenómenos naturales y la forma en que pueden usarse para utilidad del hombre.

Este trabajo es parte de un proyecto que se incorpora a las investigaciones que en los últimos años han buscado conocer el tipo de enzimas que participan en el proceso energético en cloroplastos, su caracterización, su papel y su tiempo de acción durante la biogénesis del cloroplasto.

Esta es una investigación básica que busca conocer los valores de la actividad de la enzima  $H^+$ -ATPasa durante el desarrollo ontogénico del cloroplasto y compararlos con los cambios de estructura y con los valores de actividad de otras funciones fotosintéticas.

Elegimos al maíz porque sus hojas contienen cloroplastos en diferentes etapas de desarrollo y están localizados en áreas bien definidas, lo que lo hace un modelo útil para investigar la biogénesis de los cloroplastos.

Podemos suponer que hay un desarrollo ontogénico anatómico y fisiológico gradual en el cloroplasto de maíz, pero ¿como se relacionan la estructura y las actividades fotosintéticas del cloroplasto durante su biogénesis?

# I

## 1 MARCO TEORICO.

### 1.1 CLOROPLASTO.

Es un organelo de la célula vegetal que contiene pigmentos fotosintéticos, principalmente clorofilas, con los que efectúa la fotosíntesis (1).

Su número es variable en las diferentes especies y cada una posee aparentemente un número definido. Se halla de uno a cientos por célula. Su forma varía de aplanada a esferoidal y rara vez estrellada. Su talla media es superior que la de las mitocondrias, es de 3000 a 10 000 nm de diámetro mayor y de 1000 a 2000 nm de diámetro menor. Su peso medio es de 60 picogramos (1, 3).

Tiene una membrana periférica de una o dos capas que limitan una zona llamada estroma. El estroma es el espacio interno limitado por la membrana del cloroplasto, y la cara externa de la membrana de los tilacoides y sus prolongaciones, las lamelas, y en él se halla el grana. Contiene una solución coloidal en la que se encuentran ribosomas, proteínas y sustancias relacionadas con la actividad fotosintética.

Los grana o cuerpos tilacoidales a diferencia de las mitocondrias están separados de la membrana externa y están formados por vesículas sobrepuestas, llamadas tilacoides, que se unen entre sí por prolongaciones de los tilacoides, las lamelas.

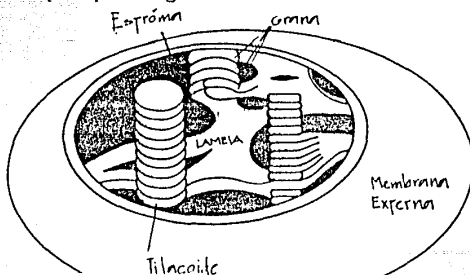


Figura 1.1 Dibujo esquemático del cloroplasto modificado del dado por Bidwell (1979) (1).



Los tilacoides poseen un lumen que contiene agua, iones, aminoácidos libres y algunas proteínas de bajo peso molecular. En la membrana del tilacoide se hallan las proteínas que llevan a cabo la actividad fotosintética (ver fig.1.1).

Los cloroplastos se pueden dividir por sí mismos y se hallan en células somáticas y gaméticas. No se ha demostrado que se formen por síntesis "de novo" (1) aunque en etapas tempranas aumenta el número de ribosomas. Posee un genoma con DNA que codifica de 100 a 1000 productos génicos para la síntesis de sus propios componentes estructurales (2).

En los cloroplastos se lleva a cabo el proceso de la fotosíntesis en el cual los pigmentos fotosintéticos cosechan la luz, que se acumula como energía en un potencial de oxido-reducción que luego es utilizado para la fotofosforilación y reducción de compuestos. Dando como resultado la reducción de bióxido de carbono a triosa fosfato, que el cloroplasto exporta rápidamente al citosol (2).

La morfogénesis del cloroplasto se realiza al mismo tiempo que el desarrollo celular debido a que los genomas del cloroplasto y del núcleo celular participan paralelamente en la codificación de la mayoría de sus proteínas.

#### 1.1.2 CLOROPLASTOS DE PLANTAS MONOCOTILEDÓNEAS.

En las hojas jóvenes de plantas monocotiledóneas se presenta un gradiente de desarrollo lineal secuencial de células desde el meristemo intercalar, con células jóvenes en la base a viejas en la punta, que es paralelo al desarrollo del cloroplasto. Durante su desarrollo el cloroplasto cambia de forma, incrementa su volumen de 5 a 10 veces, se desarrollan tridimensionalmente sus tilacoides y aumenta el número de los mismos. Se incrementa la cantidad de clorofila a y b del complejo cosechador de luz (L.H.C., light harvesting complex), el número y talla de gránulos de almidón, la cantidad y variedad de proteínas y lípidos. Se sintetizan subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de  $F_1$ , aumentan los pliegues de los

tilacoides sobre el borde de las perforaciones (Brangeon y Mustardy, 1979). Lo que resulta en un complejo tilacoidal en espiral presente en las monocotiledóneas (Paolillo, 1970) (2).

Las angiospermas y plantas C<sub>4</sub> tienen cloroplastos con granas apiladas y sin apilar. En plantas monocotiledóneas se denominan cloroplastos de mesófilo y de vaina respectivamente.

En el maíz se sabe que el número de plastidios por hoja es aproximadamente de  $248 \times 10^6$ , que tiene una concentración de clorofila por plastidio de 44 a  $870 \times 10^{-6} \text{g}$ , con un volumen promedio de los plastidios de  $5\ 000$  a  $28\ 000 \text{nm}^3$ , un volumen del tejido acuoso de  $37$  a  $49 \text{nm}^3$  y un peso promedio de los plastidios de  $40$  a  $53 \text{mg}$  (4).

#### 1.2.1 Membrana externa del cloroplasto.

Es una membrana periférica frágil con un grosor de  $0.7 \text{nm}$ . Permite el paso de algunas sustancias como agua, iones, compuestos orgánicos de bajo peso molecular y carbohidratos (formados en el estroma). Forma una barrera que evita la salida de adenosin difosfato (ADP) y fosfato ( $\text{P}^{\text{O}}_4^{\text{-}}$ ) los que son transportados hacia el otro lado de la membrana junto con el adenosin trifosfato (ATP) mediante un mecanismo de transporte de adenin nucleótidos (3).

#### 1.2.2 Estroma del cloroplasto.

Es el espacio que se halla entre el exterior del cuerpo tilacoidal y la membrana externa del cloroplasto. Contiene una solución coloidal en la que se hallan iones, amidas y aminoácidos libres, carbohidratos y proteínas entre las que se hallan las enzimas que llevan a cabo la fotofosforilación (3).

Contiene plastoglobulos osmiófilos unidos a los tilacoides, son de forma esférica, de número variable, de talla de  $30$  a  $100 \text{nm}$ , de densidad óptica uniforme y densidad menor a uno. El tamaño y

numero depende de la edad y del estado fisiológico de la planta. Son ricos en lípidos y se piensa que sirven como depósitos de lípidos del cloroplasto (21).

### 1.3.1 TILACOIDES.

Los tilacoides (del griego thylakos « bolsa ») son estructuras con forma de sacos membranosos aplanados o vesiculados que se apilan uno sobre otro y forman granas o cuerpos tilacoidales que están unidos entre sí por laminillas intergranales o lamelas.

Se forman a partir de la membrana interna del cloroplasto, la que se pliega para formar los tilacoides que durante la morfogénesis del cloroplasto aumentan en número y talla.

Las membranas de los tilacoides y de las laminillas intergranales contienen los pigmentos fotosintéticos del cloroplasto y efectúan las reacciones primarias dependientes de luz (3).

La membrana única del tilacoide de maíz está formada por varias subcapas. Dos de estas, una exterior y una interior tienen un grosor de 450nm y contienen fosfolípidos. Los tilacoides y las lamelas del grana tienen las mismas características descritas para el tilacoide individual (25).

Se han hallado mutantes letales de maíz que no forman una membrana tilacoide característica (25).

Con el uso de la técnica de criofractura se halló que los tilacoides de mesófilo y de vaina son similares y que la unión de granas en cloroplastos de mesófilo se deben a que tienen una estructura diferente de la del cloroplasto de vaina y por tanto la unión en granas no es una adhesión simple. También se encontró que ambos cloroplastos poseen el mismo número de partículas (que suponen que son tetrámeros del fotosistema II, PSII), pero que en el cloroplasto

de vaina tienen una talla 60% menor comparada con los cloroplastos de mesófilo (26).

### 1.3.1 Membrana transdutora de energía del cloroplasto.

De acuerdo con Singer las membranas son un mosaico bilípido fluido (Anderson, 1975; Stehlin y Arntzen, 1979; Hiller y Goodchild, 1981) (5). La membrana está formada por una bicapa que tiene cabezas bipolares entre dos interfases acuosas. En el modelo de mosaico fluido hay una alta proporción de proteínas que flotan en un mar de lípidos (29). Tiene proteínas periféricas (extrínsecas) o integrales (intrínsecas) dentro de las que se halla la  $H^+$ -ATPasa, la que se encarga en conjunto con la cadena redox de la conversión de la energía luminosa en energía química. Algunas otras proteínas integrales también atraviesan la membrana de lado a lado y permiten el transporte de proteínas (5).

La membrana tilacoide tiende a tener una diferente composición de lípidos y proteínas dependiendo de su estado de desarrollo) y mantiene sus propiedades de permeabilidad, que toda bicapa lipídica tiene, a pesar de la heterogeneidad presente de las membranas naturales y artificiales (como liposomas y cromatóforos). Sin embargo el transporte catalizado de proteínas puede ser único, no sólo en un organelo, sino también en un tejido individual (5). Heldt, 1970, 1975 y Gammler (1974) demostraron que el tilacoide de maíz no muestra difusión pasiva de algunos aminoácidos (4).

Para obtener mayor información de la membrana transdutora de energía remitirse al punto 1.4.1 (pág. 14).

#### 1.3.1.1 Fase lipídica de la membrana tilacoide del cloroplasto.

La membrana tilacoide contiene aproximadamente 40% de galactolípido, 40% de pigmentos fotosintéticos, 10% de fosfolípidos y 4% de sulfolípidos. La cantidad y composición de los lípidos varía durante el desarrollo del cloroplasto (5).

### 1.3.1.2 Fase proteica de la membrana tilacoide del cloroplasto.

La membrana tilacoide contiene proteínas extrínsecas e intrínsecas (dentro de las cuales destaca la H<sup>+</sup>-ATPasa, la que se describirá con más detalle en el punto 1.3.3) y otras que transportan algunas sustancias a través de la membrana.

El tilacoide del cloroplasto de maíz contiene una relación porcentual de aminoácidos totales en la hoja (%): cloroplasto (%) de : Asparagina 32:30, aspartato 15:9.5, serina 10.5:20, ácido glutámico 10:4, alanina 10:18, glicina 10:9, treonina 2:2, ornitina 2:0.7, histidina 1.5:2.5, ácido aminobutírico 1.05:0.7, valina 1:1.6, isoleucina 0.2:0.9, leucina 0.6:0.9 y glutamina 0.6:1 (4).

La amida y asparagina son el aminoácido y amina más abundantes en el cloroplasto y la hoja de maíz. La serina y alanina tienen una relativa alta proporción en cloroplastos (19 y 18%) y en hojas de maíz (11 y 10%). El ácido aspártico, glutámico y ornitina en contraste tienen una relativa baja proporción en el cloroplasto (9.4 y 0.7%) y en la hoja (15.1 y 2.2%). La glutamina fue el menor componente en cloroplasto (0.9%) y en hoja (0.7%) (4).

### 1.3.1.3 Aminoácidos y amidas libres del cloroplasto.

Las concentraciones de aminoácidos libres en los plastidios de maíz "in vivo" son similares a las del tejido de hoja (4). Los

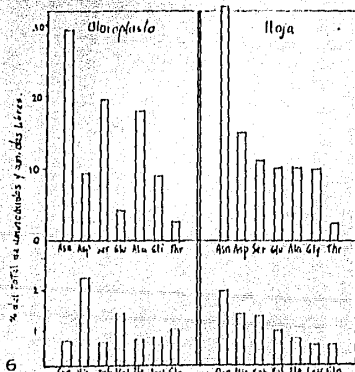


Figura 1.2 Representación de la cantidad porcentual de aminoácidos libres y amidas en tilacoides de maíz en hoja y cloroplastos aislados según Chapman y Leech (1979) (4).

proplastidios de maíz contienen las más grandes concentraciones de aminoácidos y amidas libres y se desarrollan muy rápido en estructura de membrana interna y volumen (4).

#### 1.4 COMPONENTES DE LA $H^+$ -ATPasa.

##### 1.4.1 ENZIMA $H^+$ -ATPasa.

Debido a que la mayoría de las investigaciones de la  $H^+$ -ATPasa se realizan en bacterias y mitocondrias se cuenta con poca información sobre cloroplastos. De aquí en adelante se describirán algunas características de la  $H^+$ -ATPasa de bacterias y mitocondrias que podrían tener similitud con la  $H^+$ -ATPasa de la membrana del cloroplasto.

La  $H^+$ -ATPasa es un complejo lipoproteico de estructura cuaternaria hexagonal que transfiere iones  $H^+$  a través de la región hidrofóbica de la membrana transductora de energía en forma dependiente de la hidrólisis y síntesis de ATP, el que genera o utiliza un gradiente electroquímico de protones ( $\Delta\mu H^+$ ) (6).

Se considera a la enzima  $H^+$ -ATPasa de mitocondria (llamada complejo  $F_1-F_0$  o sus partes  $F_0$  y  $F_1$ ) como la unidad estructural más pequeña capaz de efectuar la transformación de la energía, y al complejo  $EF_1-F_0$  (la E significa de *E. coli*) como uno de los más simples, el último con un peso molecular (P.M.) de 440,800 daltons (d) medido por el método de refracción de rayos X (Paradies *et al.* 1981). El complejo  $F_1-F_0$  muestra una protuberancia ( $F'$ ) de 9nm de diámetro, contiene las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y esta unida por un tallo, llamado  $F_0$ , con las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  unidas a la membrana (7).

La ATPasa del cloroplasto tiene una mayor talla y P.M. que la propia de mitocondria (6) y también sintetiza ATP, pero la orientación de la CF: (la C significa cloroplasto) y la cadena de transporte de electrones (C.T.E.) puede considerarse que es su inversa, que los sustratos globales de las reacciones totales son diferentes ( $H_2O$  y  $CO_2$ ) y que hay variación de algunas proteínas

acarreadoras de electrones.

#### 1.4.1.1 Fosfolípidos asociados a la enzima $H^+$ -ATPasa.

La concentración de fosfolípidos de la  $H^+$ -ATPasa de mitocondria es de 4 a 15% en peso.

#### 1.4.1.2 Proteolípidos de la enzima $H^+$ -ATPasa.

En la mitocondria los proteolípidos de la enzima  $H^+$ -ATPasa son altamente hidrofóbicos, se hallan por abajo de  $F_1$  y la proteína que confiere sensibilidad a oligomicina (OSCP, oligomycin sensitive conferring protein) permanecen en la membrana al separar la  $F_1$ , contienen de 3 a 4 proteínas hidrofóbicas insolubles en agua y unidas a OSCP hacen sensible a la  $H^+$ -ATPasa a oligomicina y DCCD (Beechy y Casttoll, 1973; Tzagalof *et al.*, 1973; Capaldi *et al.*, 1973). En mitocondria los proteolípidos más OSCP disminuyen la energía de activación para la transferencia de protones y facilitan el paso de iones  $H^+$  a la bicapa o su salida hacia la superficie exterior (6).

#### 1.4.1.3 Proteínas de la enzima $H^+$ -ATPasa

Se ha determinado que la enzima  $H^+$ -ATPasa contiene proteínas en el complejo  $F_1$  y  $F_0$ .

La  $F_1$  es el componente proteico de mayor P.M. de la  $H^+$ -ATPasa. Cuenta con 5 subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). Se encuentra que la  $F_0$  tiene tres subunidades (I, II y III). También se hallan otras proteínas de menor P.M., algunas unidas a lípidos a las que se le han asociado la función de transportar iones  $H^+$  a través de la membrana. De las últimas en mitocondria son sensibles a oligomicina y dicitoclocarboxil carbodiimida (DCCD) y en cloroplastos sólo es sensible a DCCD. Estas subunidades se describirán con detalle más adelante. No se conoce bien la composición de  $F_0$  ni el mecanismo para transportar a los protones a través de la membrana. Kozlov y Skulachev describen un posible

mecanismo, a modo de bomba de iones, para bacterias halófitas utilizando la bacteriorrodopsina (descrita en el punto 1.4.8)(6).

En general la enzima  $H^+$ -ATPasa de cloroplastos tiene un P.M. de 360,500 a 460,500 con subunidades de P.M.variable y una proteína que transloca iones  $H^+$  (7).

1.4.1.4 Bomba de iones  $H^+$  manejada por el gradiente electroquímico ( $\Delta\mu H^+$ ).

No se ha encontrado una hipótesis de aceptación general para explicar el transporte de iones en la enzima  $H^+$ -ATPasa pero suponen que es un transporte mediado que Kozlov y Skulachev han ejemplificado con la bacteriorrodopsina de bacterias halofíticas (Drachev et al., 1974; Oesterhelt, 1972; Oesterhelt y Stoochenius, 1971, 1973; Drachev et al., 1974; Kayoshin y Skulachev, 1974) (6).

Para mayor información sobre el mecanismo de funcionamiento de la bacteriorrodopsina remitirse al punto 1.4.8 (pág.41).

#### 1.4.2 $F_0$ de la enzima $H^+$ -ATPasa.

El complejo  $F_0$  se halla en la base de la  $F_1$  de bacterias, tiene un grosor de 6 nm el que es suficiente para penetrar la membrana. La  $T_{F_0}$  (la T significa de la bacteria termófila P53) y  $E_{F_0}$  (la E significa de E. coli) tienen tres subunidades hidrofóbicas llamadas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  con pesos moleculares de 24,000, 19,000 y 8,000 respectivamente (Negrin, Foster y Fillingame, 1980) (8), que en cloroplastos de espinaca se denominan subunidades I, II y III (30), mientras que en  $F_0$  de mitocondria hay más de tres subunidades. En E. coli se determinaron las secuencias de los aminoácidos de las subunidades a partir de un gene hospedero del operon UNC. En particular se determinó la secuencia de la



subunidad de *E. coli*, de mitocondria, cloroplasto y bacteria termófila P53 (Sebal y Wachter, 1980).

Se cree que la  $F_0$  esta formada por varias subunidades pero no se conoce su estequiometría. La subunidad c se ha llamado proteína de unión de DCCD, la que se une a un residuo de ácido aspártico o ácido glutámico de la subunidad c e inhibe a la ATPasa y al transporte de iones  $H^+$  dentro de  $F_0$  (Yoshida et al., 1977a; Negrin et al., 1980) (7).

#### 1.4.3 $F_1$ de la enzima $H^+$ -ATPasa.

Penefsky et al., 1960 aislaron de subpartículas mitocondriales una enzima de membrana que llamaron factor de acoplamiento  $F_1$  (7). El factor  $F_1$  es una proteína soluble en agua que forma parte de la enzima  $H^+$ -ATPasa (6).

Se ha estudiado a la  $F_1$  por los métodos de difracción de luz de rayos X de ángulo estrecho y ultracentrifugación (7). Su estequiometría se ha estudiado por el método de titulación de grupos SH en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , con el uso de aurovertina (inhibidor en 7), agentes de unión cruzada, agentes químicos y por el análisis de incorporación de aminoácidos con marca radioactiva  $^{14}C$  (7).

La  $F_1$  de *E. coli* y de mitocondria mide alrededor de 9 nm de diámetro y forma una protuberancia que se une a  $F_0$  mediante un tallo (7). La  $F_1$  de mitocondria aislada tiene un P.M. determinado por el método de difracción de rayos X de ángulo estrecho de  $320,000 \pm 5,000$  d, el P.M. determinado por el método de difracción de luz de  $330,000 \pm 5,000$  d y el P.M. determinado por el método de equilibrio de sedimentación de  $32,500 \pm 1,000$  d (7). En general el P.M. va de 32,000 a 400,000 d (Senior, 1973; Kagawa et al., 1979) (9). En mitocondria el coeficiente de sedimentación  $S_{20w}^0$  es de  $13.2 \pm 0.5$ , su coeficiente de difusión  $D_{20w}^0$  ( $\times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) de  $3.75 \pm 0.05$ , radio (nm) de 5.82, radio de giro (nm) de 4.25, radio axial de 1.5 a 2.0 nm, y volumen ( $\times 10^2 \text{ nm}^3$ ) de 7.01 (7).

En la ATPasa de mitocondria aislada con el método Horstman y Racke, 1970 se halló que contiene 5 tipos de subunidades. De acuerdo a Knowles y Penefsky los pesos moleculares de las subunidades de F<sub>1</sub> son 54,000 ( $\alpha$ ), 51,000 ( $\beta$ ), 33,000 ( $\gamma$ ), 16,000 ( $\delta$ ), y 11,000 d ( $\epsilon$ ) (6). O de 54,000 ( $\alpha$ ), 50,000 ( $\beta$ ), 33,000 ( $\gamma$ ), 17,500 ( $\delta$ ) y 7,500 d ( $\epsilon$ ) (7) (ver la figura 1.3).

La ATPasa de cloroplasto es muy similar a la F<sub>1</sub> mitocondrial, tiene un P.M. de 365,000 a 456,000 d. Los P.M. de las subunidades de la CF<sub>1</sub> son de 59,000 ( $\alpha$ ), 56,000 ( $\beta$ ), 37,000 ( $\gamma$ ), 17,500 ( $\delta$ ), 13,000 ( $\epsilon$ ). El P.M.  $\alpha$  y  $\beta$  es de 182,500 (aproximadamente el 63% del P.M. de la CF<sub>1</sub>) lo que indica que hay más de una molécula de  $\alpha$  y  $\beta$  (7).

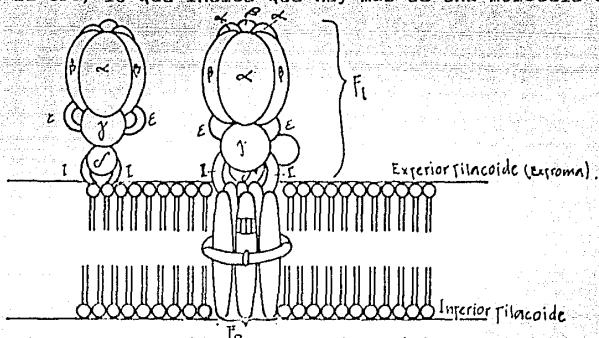


Figura 1.3 Representación esquemática del complejo F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> modificado de los datos por Kanazawa y Futai (1981) (para  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) (7) y Nelson et al. (1980) (para I, II, III,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) (30).

La CF<sub>1</sub> del cloroplasto es más fácil de estudiar que la F<sub>1</sub> de mitocondria a pesar de su alto peso molecular, su estructura compleja y a la tendencia de agregación de la CF<sub>1</sub> aislada (6).

Spitsber y Haworth (1977), Wakabashi et al. (1977) y Amzel et al. (1982) hallaron que la F<sub>1</sub> de mitocondria tiene dos mitades equivalentes, cada una formada por tres regiones de aproximadamente igual talla (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ) (7).

La estequiometría más aceptada para  $F_1$  de mitocondria es: de  $\alpha_3\beta_3\delta_2$  [Knowles, 1972 (1972), Knowles y Penefsky, 1972a,b (7)] (ver la figura 1.3). También se han propuesto las siguientes:  $\alpha_2\beta_2\delta_2$  o  $\alpha_3\beta_3\delta_2$  [Nelson, 1973 (7)]. De  $\alpha_3\beta_3$  (Each y Allison, 1979; Merchant *et al.*, 1983). De  $\alpha_2\beta_2\gamma_1-2$  (Baird y Hammes, 1976; Nelson, 1976; Verschor, Van der Suis y Slater, 1977) (7).

Se han propuesto arreglos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  alternantes y que tienen simetría axial (Tood y Douglas, 1981) o sin ella (Baird y Hammes, 1976, 1977; Enns y Criddle, 1977) y que las subunidades restantes no tienen simetría axial perfecta. Smith y Paradise creen que  $\delta$  está en la porción tallo de de la  $F_0$  y que se une a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  a través de una terminación amino de  $\alpha$  (Dunn, Hepel y Fullner, 1980) (7).

Se sabe que en mitocondria la subunidad  $\alpha$  tiene un sitio de unión de nucleótidos estrechamente ligados ( $K_d=0.1-20 \mu M$ ) y la unión de ATP al sitio cambia su conformación (Dunn, 1980). La subunidad  $\beta$  tiene un sitio de poca afinidad a nucleótidos estrechamente ligados (Ohta *et al.*, 1977a). La subunidad  $\gamma$  no une nucleótidos y es un puente para el canal de iones  $H^+$  (Yoshida *et al.*, 1977a). Y en cloroplasto la subunidad  $\epsilon$  es inhibitoria de la actividad ATPasa (Sternweis y Smith, 1980) (7).

### 1.5 FUNCIONAMIENTO DE LA ENZIMA $H^+$ -ATPasa.

En general el cloroplasto captura energía en forma de luz, principalmente con las clorofilas, las que transfieren la energía contenida en el fotón para liberar un electrón del átomo de magnesio de la clorofila P 680, el que es transferido por una cadena de proteínas transportadoras de electrones, hacia la proteína  $NADP^+$ , las que están involucradas con procesos de transformación de energía en los que se genera un  $\Delta\mu H^+$  para la síntesis de ATP, a partir de  $ADP^+$  y  $PO_4^{2-}$  (8). Estas proteínas

también están involucradas en la reducción de  $\text{NADP}^+$  que se usa para la fijación de  $\text{CO}_2$  (fotofosforilación) (9).

La  $\text{CF}_1$  acopla la energía en membranas transductoras de energía y es responsable de la formación de ATP en membranas biológicas que contienen un aparato fotosintético (6).

La  $\text{CF}_1$  se activa con luz en las células vegetales y en condiciones experimentales la  $\text{CF}_1$  puede sintetizar o hidrolizar ATP. Con tratamiento de tioles y calor se producen diferentes conformaciones de la enzima (8, 37) que resultan en la activación de la hidrólisis de ATP. En presencia de luz se reduce la tioredoxina (una proteína soluble de P.M. 12,000) y esta actúa a su vez reduciendo grupos disulfuro y activando la ATPasa. En la obscuridad no se reduce la tioredoxina y tienen poco efecto en los grupos tioles, se abate el pH y se reoxida la tioredoxina con agentes oxidantes como el glutation oxidado (Wolosiok y Buchanan, 1977) el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Egnens *et al.*, 1975; Heldt *et al.*, 1977; Rosa, 1980),  $\text{NaN}_2$  y  $\text{KFe}(\text{CN})_6$  por lo que los tioles tienen un papel importante en la regulación "in vivo" de la actividad de  $\text{CF}_0\text{-F}_1$  (37).

Tratándola con Ditioneitrítol (DTE) se activa mucho como  $\text{Ca}^{2+}$ ATPasa y  $\text{Mg}^{2+}$ ATPasa. Usando metanol y octaglicósidos se presentan grandes rangos de actividad ATPasa y si se activa con calor y luego con metanol se comporta como  $\text{Mg}^{2+}$ ATPasa sin  $\epsilon$  (8).

En condiciones experimentales la  $\text{Mg}^{2+}$ ATPasa está mucho más activa en comparación con la  $\text{Ca}^{2+}$ ATPasa, lo que sugiere que con calor y sin  $\epsilon$  se presentan estados de activación similares y que la activación con calor afecta a la subunidad  $\epsilon$ . (8).

También el metanol afecta la especificidad de  $\text{CF}_1$  para cationes divalentes y estimula la  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa especialmente cuando esta se activa con calor o tripsina. Y si se lava con metanol la  $\text{CF}_1$  ligada a D.E.A.E. celulosa se activa a la enzima por la remoción de la subunidad  $\epsilon$ , lo que sugiere que la activación puede deberse a su ausencia (8).

En la CF<sub>1</sub> soluble tratada con metanol son más activados e hidrolizados los compuestos Ca<sup>++</sup>ATP que el Mg<sup>++</sup>ATP y si se adicionan aniones o ácidos orgánicos, en particular SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> se mejora la actividad ATPasa con Mg<sub>2</sub><sup>2+</sup> ligada a membrana (8).

Las subunidades individuales aisladas no presentan actividad ATPasa pero con las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  sí se presenta (Futai, 1977) y con las subunidades  $\delta$  y  $\epsilon$  de mitocondria en unión a la membrana junto con F<sub>0</sub> también presentan actividad ATPasa (Yoshida et al., 1977a; Dumm y Futai, 1980)(9).

También se ha discutido si el ADP ligado al sitio catalítico es el aceptor primario de fosfato exógeno. Tiefert y Moudranakis (1979), creían que se ligaba al AMP de F<sub>1</sub> (6) y Kozlov y Skulachev (1977) demostraron que el aceptor primario es el ADP que se halla en los alrededores del sitio activo de F<sub>1</sub> y no el ADP estrechamente ligado a la enzima (6).

### 1.5.1 Membrana transdutora de energía del cloroplasto.

La membrana es una estructura con baja conductividad de protones que contiene los sistemas de formación y uso del gradiente electroquímico de protones ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) que asegura el acoplamiento a la producción de trabajo útil (6).

En la membrana se halla una cadena de transporte de electrones (C.T.E.) formada por una serie de proteínas acarreadoras de electrones en dos fotosistemas. En el fotosistema I (PSI) se halla la clorofila P 700 (P significa pigmento y el número la longitud de onda de máxima absorbancia expresada en nanómetros) que está rodeada por un complejo antena y un centro de reacción (C.R.) que juntos forman el complejo cosechador de luz (L.H.C., light harvesting complex) que se halla en la superficie interna de la membrana (5).

El complejo antena y las clorofilas asociadas a la captura de

luz difusa canalizan la energía captada a su centro de reacción específico, que absorbe cerca de 50 cuanto luminosos por segundo. Por ejemplo el L.H.C. de bacterias contiene tres subunidades idénticas, cada una con 7 moléculas clorofílicas (9) y el L.H.C. de cloroplastos contiene varios cientos de moléculas de clorofila y otros pigmentos ligados a proteínas (31).

El centro de reacción transfiere electrones rápida y directamente entre componentes adyacentes (por un sobrelapado de los orbitales electrónicos y bandas de transferencia de carga) y produce reacciones rápidas aun en condiciones criogénicas (9).

El proceso de transferencia de electrones se inicia cuando el primer fotón es absorbido por el L.H.C. y la energía de excitación se comunica del complejo antena a la clorofila P 680. En el P 680 la energía de la luz altera la distribución de los electrones y permite que un electrón sea transferido. El electrón parece atravesar la membrana hasta un aceptor de electrones situado en la superficie externa. El proceso se repite con otro fotón y las dos moléculas de P 680 son reducidas después por dos electrones procedentes del agua, con la ayuda de una enzima que contiene manganeso, en el complejo llamado Z (ver la figura 1.4). El átomo de oxígeno de la molécula es liberado fuera del cloroplasto y los dos protones pasan a la solución interior de la membrana tilacoide. Los dos electrones que cruzan la membrana son captados por la plastoquinona (PQ) que es un transferidor de hidrógeno. Los dos electrones con los dos protones extraídos del exterior reducen a la PQ a PQH<sub>2</sub> que retorna a la superficie interna donde la PQH<sub>2</sub> libera los dos protones al interior y transfiere los electrones al citocromo *f*. Luego la plastocianina (con cobre) los recibe y los transfiere a un sistema fotoquímicamente activo, el P 700, que también tiene un L.H.C.

Se absorbe luz por medio del L.H.C. de P 700 y se trasladan los dos electrones recibidos a la superficie externa de la membrana, donde son captados por una ferroproteína sulfurada y los

electrones siguen por la superficie externa donde son captados por la ferredoxina (Fd) y de ésta van a un flavin adenin dinucleotido (FAD) con protones. El FAD toma dos protones del medio externo formando  $FADH_2$  y finalmente el nicotin adenin difosfato ( $NADP^+$ ) toma los electrones y un protón del  $FADH_2$  y forma el nicotin adenin difosfato reducido ( $NADPH$ ). Cuando se ha completado el paso de dos electrones por la cadena, tres protones han quedado fuera de la membrana y cuatro han aparecido en el interior (31).

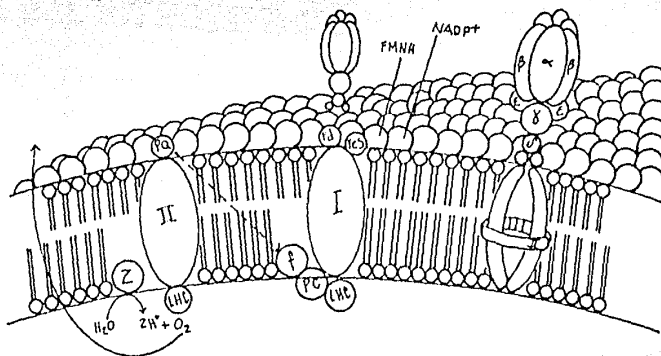


Figura 1.4. Esquema modificado de la membrana transductora de energía del cloroplasto propuesta por Hincle y McCarty (31). La representación de la  $H^+$ -ATPasa se modificó del esquema dado por Kazawa y Futai (1981) (para  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) (7) y Nelson *et al.* (1980) (para I, II, III,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) (30). Nelson *et al.* (30).

En el cloroplasto el transporte de iones  $H^+$  es unidireccional y la fuerza que los impulsan a través de la membrana puede darse por gradientes de concentración, de potencial eléctrico, de energía metabólica o sus combinaciones (5).

Se ha discutido si hay un  $\Delta\mu H^+$  transmembranal suficiente para que el transporte de iones  $H^+$  se pueda dar a través de la bicapa del tilacoide y se ha calculado que se requiere una relación de

iones  $H^+$  externo: interno de: 3,000: 1, una diferencia de 3.5 unidades de pH, una diferencia de potencial eléctrico de 0.235 Volts o 7.3 Kcal de energía libre. Mitchell encuentra que sólo se presenta una diferencia de una unidad de pH y una diferencia de potencial eléctrico de 0.15 Volts y afirma que estos dos valores son suficientes para el transporte de los iones  $H^+$  (3).

Para mayor información sobre este punto remitirse al punto 1.4.8 (pág. 41).

Así en la membrana del tilacoide el ion  $H^+$  exterior sufre un transporte unidireccional al interior por una bomba de iones manejada por la C.T.E. y luego un transporte unidireccional del ion al exterior manejado por el complejo  $CF_1-F_0$ .

Junto al transporte de iones  $H^+$  se da el transporte de otros iones como  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  y  $PO_4$  en la membrana externa y en el tilacoide del cloroplasto. Mientras que el transporte catalizado de proteínas como el ADP, el ATP y el NADPH se da en membranas específicas como la exterior del cloroplasto y la interior de la mitocondria.

El flujo de estas especies químicas puede darse por untransporte, cotransporte, antitransporte o por bombas específicas y participan en menor grado en la formación del gradiente de iones  $H^+$  durante el funcionamiento del cloroplasto.

También se halla que algunas especies sin carga cruzan la bicapa, como por ejemplo el  $O_2$ ,  $CO_2$ , ácidos grasos y bases de bajo peso molecular como el ácido acético y el amonio(9).

En condiciones fisiológicas el cloroplasto forma un gradiente electroquímico de iones  $H^+$  utilizado para la síntesis de ATP y la reducción de carbono a carbohidratos.

Se ha sometido al cloroplasto a condiciones experimentales para el estudio de su funcionamiento.



El cloroplasto intacto (Tipo I) contiene integra su membrana externa y puede sintetizar ATP al energizarlo con luz o hidrolizar al mismo en su ausencia y ambas actividades pueden ser inhibidas por la subunidad  $c$ .

El cloroplasto sin membrana externa integra (Tipo II) se ha utilizado para conocer el funcionamiento de la C.T.E. y las actividades de síntesis e hidrólisis de ATP utilizando diferentes condiciones de reacción y muchos agentes químicos que estimulan o inhiben las actividades fotosintéticas. Es notorio que sólo cuando la CF<sub>1</sub> está acoplada a la membrana se puede sintetizar ATP y que si no lo está sólo puede darse la actividad de hidrólisis de ATP (6).

También ha sido muy estudiado el cloroplasto con el uso de canales específicos para iones, producidos por agentes naturales (como los antibióticos) y artificiales (como valiomicina, gramicidina, nigericina, X-537A, A-23187, nonesina y diancina) (5).

### 1.5.2 Nucleótidos estrechamente ligados a la enzima $H^+$ -ATPasa.

La CF<sub>1</sub> contiene nucleótidos de ADP y ATP estrechamente ligados que no se cambian con los del medio a menos que se energice al tilacoide con luz o se cambie el pH (10). También se liberan los nucleótidos energizando la membrana cuando ésta produce ATP, con metanol [que libera irreversiblemente ADP (8, 10, 22)], con tripsina o filtración con gel en presencia de EDTA (7).

Harris y Slater (1975) mostraron que en tilacoides expuestos a la luz la cantidad total de nucleótidos ligados a CF<sub>1</sub> permanece constante (6), no se intercambian con nucleótidos añadidos (7) o si se intercambian y es estimulado por energización de la membrana con luz [Anthon y Jagendorf, 1984 (10)], pero con luz el rango de intercambio del nucleótido con el medio se incrementa (6).

Los nucleótidos estrechamente ligados no se pierden durante la extracción de cloroplastos. Tampoco se pierden adicionando al medio ADP o PR(NH)P (5'-adenilil- $\beta$ ,  $\gamma$  imidodifosfato) activo.

Slater et al. (1975) mostraron que el número de nucleótidos ligados hallados en F<sub>1</sub> varía dependiendo del método de separación y purificación de la enzima (6) Slater et al. (1973, 1975) encuentran que el radio molar de F<sub>1</sub>:ATP:ADP fue de 1:3:2. Abrams et al. (1973) hallan un radio molar de F<sub>1</sub>:ATP:ADP de 1:1:1. En maíz se halló que la relación CF<sub>1</sub>:ATP:ADP fue de 1:2:1 (10).

También se halló que la F<sub>1</sub> tiene de 2 a 3 moles de nucleótidos estrechamente ligados (Harrin, 1978), con una K<sub>m</sub> aparente de  $10^{-10}$  M (Slater et al., 1979)(7).

Se demostró que adicionando ATP y ADP en cantidades catalíticas se restituyen los nucleótidos estrechamente ligados [Skulachev, 1962 (6)] y se eleva su capacidad de ligamiento por iluminación comparado con su ligamiento en oscuridad.

Si se adiciona ADP en exceso se inhibe la actividad ATPasa en la oscuridad, se supone que el ADP inhibe por ligado al sitio catalítico [Magnusson y McCarty (1976)] y que es un regulador que interviene en la síntesis de ATP o su hidrólisis por un "cambio ligado" (10) que en F<sub>1</sub> no permite la síntesis de ATP [Garret y Penefsky, 1975; Leingraber y Senior, 1976a,b (7)].

La liberación de nucleótidos de sus sitios de alta y baja afinidad se da en dos rangos de velocidad: la rápida, con tiempo medio mucho menor a un minuto, y la lenta, con un tiempo medio de un minuto. La liberación de nucleótidos está muy asociada a las condiciones de activación de la ATPasa ya que cuando el ADP ligado al sitio catalítico la actividad ATPasa crece y si se adiciona Mg<sup>2+</sup> se inhibe (10).

La liberación de nucleótidos se acelera agregando Mg<sup>2+</sup> y SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> en tilacoides pretratados con metanol (10) o con ATP añadido al medio de reacción (7). Agregando ADP y Pi marcado en presencia de dimetil sulfóxido a más de 30% se forma ATP marcado por efecto de un cambio de conformación de F<sub>1</sub> que es más afín al Pi (Feldman y Sigman, 1982, 1983)(7).

### 1.5.3 Sustratos o inhibidores de la enzima $H^+$ -ATPasa.

Se consideran a los sustratos e inhibidores como agentes oxidantes o reductores durante el proceso de conversión de la energía del ATP y pueden tener varios efectos sobre la enzima  $H^+$ -ATPasa: a) un cambio de afinidad del sustrato de  $F_1$  por el efecto de un inhibidor protéico influido por el  $\Delta\mu H^+$ , b) un cambio en la conductividad del protón por efecto de inhibición de la C.T.E. en la membrana acoplada, c) por cambios en la organización del complejo  $F_1$ - $F_0$  durante la activación de la ATPasa en respuesta a un cambio en la conformación nativa de las proteínas vecinas (Dolgov et al., 1975) (6) y suponen que hay un sitio de unión de nucleótidos diferente para cada sustrato (7).

Entre los sustratos e inhibidores del complejo  $H^+$ -ATPasa se hallan los compuestos trifosforilados, los difosforilados y otros compuestos que cambian la estructura de la  $H^+$ -ATPasa o exponen grupos de la misma para activarla o inhibirla.

El uso de análogos de nucleótidos de adenina producen cambios en las constantes de ionización, de Michaelis-Menten y de la velocidad máxima de la  $H^+$ -ATPasa. La actividad de síntesis o hidrólisis de la  $H^+$ -ATPasa varía dependiendo del sitio en el que actúen los nucleótidos, de la estructura del mismo y del papel que desempeñe durante las reacciones.

Se piensa que son necesarias al menos tres cargas negativas en el nucleótido inhibidor para poderse unir al sitio catalítico de  $F_1$  y cuando el nucleótido inhibidor tiene dos cargas negativas no se puede unir al sitio catalítico de  $F_1$  (6).

Se han empleado diferentes sustratos e inhibidores con el fin de conocer el mecanismo de acción del sitio activo de la  $H^+$ -ATPasa y se ha observado que generalmente disminuyen la actividad ATPasa.

En la tabla 1.1 se muestran los principales sustratos e inhibidores.

### 1.5.3.1 Sustratos e inhibidores trifosforilados de la enzima $H^+$ -ATPasa.

Son todos aquellos sustratos que tienen tres radicales fosfato dentro de su fórmula. El  $Mg^{2+}$ -ATP es considerado el sustrato que se utiliza para el funcionamiento de la  $H^+$ -ATPasa (Akemenko *et al.*, 1972; Selvin *et al.*, 1977). El  $Mg^{2+}$ -ATP se une al sitio catalítico [Hilborn y Hammes, 1973 (7); Kozlov y Skulachev, 1977 (6)]. El  $Mg^{2+}$  es afín a  $F_1$  a bajas concentraciones de ATP [Adolfson y Mondrianakis, 1973 (7)] y a partir de un análisis de enzima-metal-sustrato deducen que el  $Mg^{2+}$ -ATP ( $K_m=0.4$  mM) es el sustrato de la reacción ATPasa y al mismo tiempo es un factor regulador de la misma (7).

Se sabe que los sustratos trifosforilados más conocidos, que se han utilizado para la activación de la ATPasa, tienen cadenas hidrocarrbonadas de ribosa que pueden no ser hidrolizadas por  $F_1$  porque varía la estructura del carbohidrato y la base nucleótido de adenina y tienen efecto sobre la velocidad máxima y la  $K_m$  de la  $F_1$ . Se sabe que la afinidad por los análogos de ATP hace que disminuya la actividad en el orden siguiente: ATP-TTP-GTP-UTP-CTP (Pederson, 1975). El rango está determinado por el estado de hidrólisis de nucleótidos y su unión a  $F_1$  (Kozlov y Konenks, 1975) (6).

En la tabla 1.1 se muestran los sustratos trifosforilados más comunes.

### 1.5.3.2 Sustratos e inhibidores difosforilados de la enzima $H^+$ -ATPasa.

Es conocido que el ADP es el inhibidor difosforilado que presenta el cloroplasto, que su ligamiento al sitio activo de la  $CF_1$  inhibe la actividad ATPasa y que es un regulador de la síntesis e hidrólisis de ATP por un "cambio ligado" [Magnusson y McCarty (1976)] (10). Anthon (1984) supone que el ADP no es un

intermediario catalítico porque la cantidad de ADP ligada a  $CF_1$  es pequeña comparada con el cambio que sufre la enzima y por no ser el sustrato para la hidrólisis de ATP. Kozlov y Skulachev (1977) le asignan un papel de intermediario en el sitio activo de la  $CF_1$  (6).

El uso de análogos difosforilados sólo reducen la actividad ATPasa y se cree que son afines al sitio catalítico por poseer tres cargas negativas.

En la tabla 1.1 se muestran los sustratos difosforilados más comunes.

A continuación se presenta una tabla con los inhibidores más usados para conocer el mecanismo de reacción de la ATPasa.

Tabla 1.1. Inhibidores de la enzima  $H^+$ -ATPasa.

Inhibidor	Conc.	Lugar de Acción.					Efecto
		$F_1$ en- tubulo.	$F_1$ fase octano/ agua.	$F_1$ li- ligada	Sitio activo $\alpha$ $\beta$		
AMP	-	$F_1$	-	-	-	-	-
AMP-PNP	-	$F_1$	-	$F_1$	-	-	-
ADP	0.03, 0.4 <sup>a</sup> , 0.5, 500 mM	$F_1$	$F_1$	$F_1$	$\alpha$	$\beta$	-
Ac. mesitileno car							
bencilico (MC)	$10^{-3}$ M	-	$F_1$	$F_1$	$\alpha$	-	-
ADP-MC	$10^{-3}$	-	$F_1$	$F_1$	$\alpha$	$\beta$	Agente fosforilante,
ADP-(Anhidrido de ácido mesitileno carboxílico).							reacciona en solución acuosa con grupos NH <sub>2</sub> y SH. Inhibe ATPasa. Inhi- be $\Delta p$ en sol. octano-agua. Se protege con MgATP y no afecta actividad $F_1$ en sitio catalítico.
ADP-MC, CPP-							
MC, $\Sigma$ ATP-MC	-	$F_1$	no	no	$\alpha$	-	Inhibe ATPasa, el ATP protege inhibición.
Nucleótidos trifosfato-							
trifosfato-MC 10 <sup>-3</sup> M	$10^{-3}$	$F_1$	-	-	-	$\beta$	-
GTP	-	$F_1$	-	$F_1$	$\alpha$	-	Inhibe como ATP-MP.

continua tabla 1.1:

Inhibidor	Conc.	L u g a r d o A c c i ó n .					Efectos
		F1 so- luble.	F1 fase octano/ agua.	F1 li- gada	Sitio activo		
					$\alpha$	$\beta$	
						R. I R. II	
ATP-MC,CATP-MC,GTP- MC,GTP-MC	-	F1	-	F1	-	$\beta$	Dos cargas negativas no se une a $\beta$ .
Adenosil tetrafos- fato	Ki= .15	F1	-	-	-	-	Inhibe la ATPasa.
Anticuerpos-F1		F1	-	F1	-	-	-
Oligomicina(5)	-	-	-	F1	-	-	Inhibe ATPasa y ATP sintetasa mitocondrial
DCCD (Diciclo carboxil carbo diimido(7)	-	-	-	F1	2-Sitios( $\beta$ )		Inhibe ATPasa (Beaumont 1970; Esch. et. al. 1981).
Efrapentina	-	-	-	EF1	1 sitio		(Satre et. al. 1979).
Carbotimida	-	-	-	CF1	2 sitios( $\beta$ )		(Sooskan,Selman,1980).
Butanol	-	F1,CF1	-	F1(II)-	-	-	Inhibe ATPasa y ATP sintetasa (Cross & Kohol broner, 1978).
PCMBip-cloromercuril benzoato)	$5 \times 10^5$	no	F1	F1	$\alpha$	-	Indirecto rompe estruc- tura de $H^+$ -ATPasa permitiendo entrada de in- hidores en $\beta$ (CMCD). No induce acubilizaci- ón de F1 de mil. y part. submil. monos- labiles por frio.
DNP(2-4 Nitrofenol fenol)	-	F1	-	F1	-	$-\beta$	No compete con inhibi- ción Mg-ADP. Mitchell y Moyla(1970,1970,1971) dicen que $\beta$ y la aurovertina disminuyen la afinidad por ADP. No disminuye la Km(app) (Akimoko et. al. 1971; Conte y Hammes, 1973).
Aurovertina	-	F1	-	F1	-	$\beta^c$	Evita penetración

continúa tabla 1.1:

L u g a r d e A c c i ó n.

Inhibidor	Conc.	Fi so- luble.	Fi fase octano/ agua.	Fi li- ligada	Sitio activo $\alpha$ $\beta$ R. I R. II	Efectos
						<p>y eleva energía de activación de la ATP sintetasa. Se une en región II y evita la formación de complejo improductivo de ATP (Webb, 1963). Se une poco a región I. Extraída de hongos <i>Calcarisporium orbicula</i>. Se une a Fi(3:1). Inhibe ATPasa. y ATP sintetasa (Ebel &amp; Lear- dy, 1975b; Issartel, et al. 1983). Unida a Fi es fluorescente y no es afectada por nucleótidos y Mg<sup>2+</sup>.</p>
Inhibidor proteico natural	-	Fi	-	Fi	- - -	<p>De 11 000 daltons in-lube no competitivamente con respecto a ATP. Adicionando ATP facilita inhibición de Fi. La respiración energiza la membrana y remueve el inhibidor. Inhibe Fi soluble con ATP y otros análogos de ATP (Kozlov, 1977) y no aumenta la afinidad del inhibidor. Es afin cuando <math>\alpha</math> y <math>\beta</math> están cerca y al energizar y alejarlos disminuye afinidad. Cuando se hidroliza ATP en <math>\beta</math> se carga negativamente el sitio y aumenta afinidad al inhibidor a <math>\alpha</math> ocupado por ATP y cargado positivamente.</p>
						<p><math>\alpha</math>: Kozlov, 1977. b: <i>Micobacterium phlei</i>. c: Verechoor, Vander Sluis &amp; Sluter, 1977.</p>

Tabla 1.1. Lista de los sustratos e inhibidores de la enzima H<sup>+</sup>-ATPasa. (citadas).

#### 1.5.4 Cambios conformacionales de la enzima $H^+$ -ATPasa.

Se ha encontrado que durante la actividad de la enzima  $H^+$ -ATPasa hay cambios conformacionales que se han asociado a su función catalítica (6).

Los cambios conformacionales pueden deberse a cambios en el ambiente de  $F_1$  y a cambios en la estructura cuaternaria de  $F_1$  (Ferguson et al., 1976; Kozlov et al., 1975; Rosing et al., 1975; Penefsky y Warner, 1965; Warshaw et al., 1968; Farron y Racker, 1970). Suponen que con la translocación de nucleótidos se dan cambios conformacionales de  $F_1$  (6).

Si se añade ATP al medio de reacción se considera que hay cambios conformacionales debidos a ligandos ADP de  $F_1$ . Al iluminar se energiza y hay cambios de conformación de la membrana y de los ligandos de unión (7).

Ryrie y Jagendorf (1971, 1972) mostraron que los átomos de  $H^+$  de  $CF_1$  hacen un intercambio con tritio en un medio iluminado dando un cambio de conformación, de  $CF_1$ , dependiente de luz.

Mc Carty y Fagan (1973) mostraron que al iluminar tilacoides en presencia de N-etilmaleimida producen una modificación química en la subunidad  $\gamma$  de  $CF_1$  e inhibe la síntesis de ATP. Esto sugiere que hay grupos SH de la subunidad que se relacionan con la actividad catalítica al ser expuestos a la luz (6, 7). Monroy et al. (1984), descubren los grupos SH y proponen un mecanismo de reacción para éstos (28).

Con el uso de 4-vinil piridina se halló cuatro grupos cisténil ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  y  $S_4$ ) en la subunidad  $\gamma$ . Los grupos  $S_3$  y  $S_4$  reaccionan con sus grupos  $COOH^+$  terminales, los que pueden reaccionar con N-etilmaleimidias e inhibirse irreversiblemente a la síntesis e hidrólisis de ATP. Al unirse a los grupos SH desacoplan la fosforilación porque incrementan la permeabilidad de los protones que se transportan a través de la enzima  $H^+$ -ATPasa. Si la distancia entre  $S_3$  y  $S_4$  pasa de 270 a 100 nm se disminuye la actividad ATPasa. Los grupos  $S_1$  y  $S_2$  no son accesibles a las maleimidias de la  $CF_1$ ; oxidada, están unidos, se separan con ditiotreitól (DTT) y luz y estimulan la actividad ATPasa (28).



Hay evidencia de que la subunidad  $\alpha$  está involucrada en el cambio conformacional de  $\beta$  inducida por la unión de nucleótidos. El cambio conformacional de  $F_1$  es inducido por la unión de nucleótidos y fosfato (Matsuoka et al., 1981) (7).

También se han utilizado diferentes compuestos para cambiar la conformación de  $F_1$  y estudiar el mecanismo de acción de la  $H^+$ -ATPasa.

Ryrie y Jagendorf (1972) observaron cambios conformacionales inducidos por luz con la unión de 20 veces más de hidrógeno marcado en  $F_1$ . Las conformaciones observadas se pueden eliminar con desacoplantes pero no con inhibidores de la fotofosforilación (florizina dio 9) y disminuye adicionando ADP y fosfato (6).

Con el uso del inhibidor alquilado ácido p-N(dicloroetil)amino renilacético (Kozlov et al., 1975; Yugozhinsky, 1973) y  $Mg^{2+}$  sobre  $F_1$  produce un cambio irreversible que no disminuye la afinidad por ATP pero que impide la inhibición por ADP (Kozlov et al., 1975). Se piensa que se une a la región II (6). El 2-DNP es el inhibidor alquilado y actúa reversiblemente en la unión ATPasa en presencia de  $Mg^{2+}$ ATP.

También suponen que el metanol (8, 10) y otros alcoholes (22) producen cambios conformacionales similares a los producidos por iluminación y que activan a la ATPasa.

La unión del inhibidor aurovertina actúa sobre la subunidad  $\beta$  de la  $F_1$  aumentando la fluorescencia de la aurovertina al aumentar la concentración de ADP y disminuyendo con la caída de concentración de ATP. Si se bloquea la subunidad  $\beta$  con DCCD y se añade aurovertina cambia poco la fluorescencia, lo que indica que la  $H^+$ -ATPasa sufre un cambio conformacional en la subunidad  $\beta$  inducida por la unión de nucleótidos. El cambio conformacional en  $F_1$  es inducido por la unión de nucleótidos y fosfato (Matsuoka et al., 1981).

1.5.5 Teoría Quimiosmótica del transporte de iones  $H^+$  (Mitchell, 1972).

La teoría establece que las cadenas de transporte de electrones de bacterias, mitocondrias y cloroplastos están acopladas a la síntesis de ATP por un potencial electroquímico de protones ( $\Delta\mu H^+$ ) a través de la membrana Transdutora de energía (7).

Postulados de la teoría quimiosmótica.

1) La membrana transdutora de energía tiene bombas primarias de protones que se acoplan al transporte de electrones exérgico o reacciones primarias para el movimiento transmembranal de protones.

2) La membrana tiene bombas de protones secundarias que se acoplan al movimiento de protones para la síntesis endérgica de ATP.

3) La membrana tiene una permeabilidad finita de protones.

4) La membrana tiene translocadores de aniones y cationes (11).

Mitchell (1972) hipotetiza que el  $\Delta\mu H^+$  se forma durante la hidrólisis de ATP sin intermediarios de alta energía. Glagolev y Skulachev (1974) lo corroboran. Suponen que  $F_1$  participa directamente en la generación del  $\Delta\mu H^+$ . Un posible esquema de Mitchell (1973, 1974) para el funcionamiento de la  $H^+$ -ATPasa durante la síntesis de ATP, describe la translocación de nucleótidos de adenina entre la matriz mitocondrial y el Arca exterior de la membrana interna, a través de los sistemas de proteolipidos.

Los protones son transportados y acumulados fuera de la membrana interna mediante la C.T.E. y luego son nuevamente transportados de regreso al interior a través del sitio catalítico de  $F_1$  a la matriz mitocondrial. El ADP y el fosfato están ionizados y tienen dos cargas negativas más que el ATP. En el mecanismo propuesto pueden diferir los translocadores de adenin nucleótidos y fosfato que pueden efectuar el antiport o simport

eléctrico de  $ATP^{n}/(ADP + Pi)^{n-2}$  entre la matriz y el sitio activo de F<sub>1</sub> y contribuir al potencial de membrana de mitocondria (Klingender, et al., 1969; Skulachev, 1971) (6).

Los eventos se equiparan a un circuito eléctrico en donde se mide un potencial electroquímico,  $\Delta\mu_{H^+}$ , una corriente,  $J_{H^+}$ , y una conductancia,  $C_{MH^+}$  de protones (5).

El modelo hipotetizado se describe para la mitocondria en el siguiente esquema.

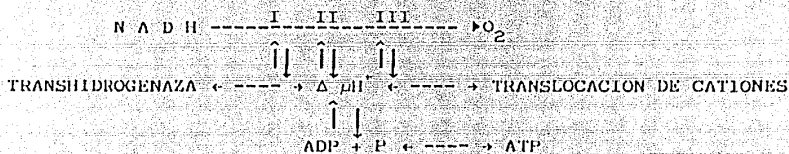


Figura 1.5. Modelo hipotético del mecanismo de funcionamiento de la H<sup>+</sup>-ATPasa en mitocondria (5).

También suponen que hay una bomba que maneja los protones y otra que maneja los cationes y la que esquematizan de esta manera.



Figura 1.6. Representación de las bombas que manejan protones y cationes (5).

Y se aplica para la membrana mitocondrial según la figura siguiente.

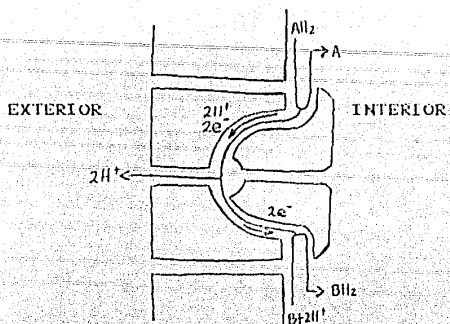


Figura 1.7. Modelo hipotético de la translocación vectorial de grupos (5).

Westerhoff, *et al.* (1984) postulan que las fases acuosas de la membrana no son uniformes y que no hay un transporte libre de los protones a través de la membrana y sugieren el siguiente postulado adicional.

En un organelo intacto la bomba de protones (manejada por un potencial redox o por luz) no actúa con otras bombas primarias en el mismo espacio (o dominio) para bombear protones, pero si comparten esos dominios con bombas secundarias de protones que son manejadas por la  $H^+$ -ATPasa (ligamiento de la bomba de protones y  $F_1$ ).

Este postulado adicional implica una población de unidades de acoplamiento sobre la membrana, con bombas primarias y secundarias (entre zonas bilípidicas, sin ellas) independientes que no tienen el mismo potencial electroquímico e impiden el paso libre de protones. La bomba primaria inhibe a la secundaria y viceversa. Se piensa que el  $\Delta\mu H^+$  es un control alométrico de la bomba primaria sobre la secundaria y que el  $\Delta\mu H^+$  local actúa como un sustrato de energía libre y como un interruptor de la bomba secundaria.

Y proponen un segundo postulado adicional en el que sugieren que el  $\Delta\mu H^+$  de la fase de membrana sin bombas es un promedio de tiempo y espacio de los potenciales de una fase homogénea. Esto no se aplica a las unidades de acoplamiento que tienen un  $\Delta\mu H^+$  local y que sintetizan ATP.

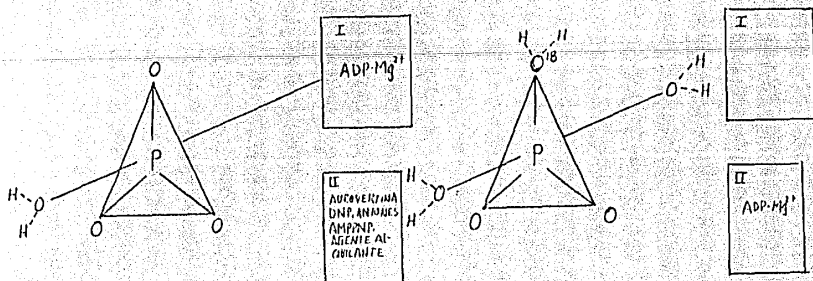
La suma de los protones transportados por las fases de membrana y por las unidades de acoplamiento dan el rango de síntesis de ATP del organelo y la cantidad de protones transportados depende de la cantidad de unidades de acoplamiento y de la regulación de las bombas por el  $\Delta\mu H^+$  (11).

#### 1.54.6 Sitio activo de la enzima $H^+$ -ATPasa.

Hipótesis de Korman sobre el mecanismo de reacción de la  $H^+$ -ATPasa (6).

Al hidrolizarse ésteres y anhídridos del ácido fosfórico se protona el fosforil oxígeno, no se conoce que grupo aminoácido funcional causa la protonación en el sitio activo de la  $H^+$ -ATPasa (6).

El mecanismo de reacción del desplazamiento nucleofílico en el ácido fosfórico incluye un intermediario pentacovalente que tiene forma de bipiramide (Berry, 1960; Hudson, 1965). Es una estructura con tres enlaces de fosfato en un plano (sustitutos ecuatoriales) y dos enlaces axiales (sustitutos axiales) (ver la figura 1.8).



I y II: Sitios activos I y II de la subunidad  $\beta$  del modelo de funcionamiento de la  $H^+$ -ATPasa propuesto por Kozlov y Skulachev. Entre del cuadro se enlistan los inhibidores de la actividad ATPasa.

Figura 1.8. Intermediario pentacovalente del ácido fosfórico en forma de bipirámide.

La conversión de la pirámide en productos de reacción se da cuando uno o dos sustitutos axiales son removidos. Los sustitutos axiales unidos a fosfato son rotos fácilmente. Cuando hay 4 de los 5 sustitutos en el átomo de fosfato de un intermediario se produce una pseudorotación. Esto es, que dos sustitutos de la posición ecuatorial cambian de posición con dos sustitutos de la posición axial.

Korman et al. (1971, 1973, 1974) aplicaron éste principio a la hidrólisis de ATP en la ATPasa mitocondrial.

Según Korman la reacción ATPasa se inicia con la acción del agua sobre el fosfato y protonado del ATP y forma una bipirámide.

Hay dos caminos para formar el intermediario pentacovalente:

1) El agua puede ser removida de la posición axial formando ATP-H<sub>2</sub>O y luego revertirse a su estado original.

2) Si se remueve el residuo difosfodenosina (-O-ADP) de la posición axial se forma ADP + P<sub>i</sub> y el intermediario pentacovalente puede rotar formando una bipirámide con nuevas moléculas de agua en la posición axial. La remoción de agua de la nueva bipirámide se acompaña de la formación de ATP. El rango de pseudorotación en el sitio activo de la H<sup>+</sup>-ATPasa es proporcional al agua que desaparece de la bipirámide. La pseudorotación en el sitio activo de F<sub>1</sub> puede ser usada para reducir la energía de activación de la reacción de síntesis de ATP.

Los cambios de posición de sustitutos del fosfato por una pseudorotación están acompañados de cambios conformacionales del sitio activo de la H<sup>+</sup>-ATPasa.

Postulan dos regiones en el sitio activo de la H<sup>+</sup>-ATPasa (en

F<sub>1</sub>) responsables de la unión del residuo fosfoadenosina (-O-ADP), que se da una pseudorotación como resultado de la translocación del residuo fosfoadenosina de una región a otra (ver figura 1.8), y que cada área del sitio activo tendrá diferente afinidad por el residuo fosfoadenosina. La región de unión del residuo fosfoadenosina en la posición ecuatorial (ver figura 1.8), región II) es firme, es específica y tiene afinidad por éste.

El ADP en el sitio activo de F<sub>1</sub> inhibe la catálisis mientras que la unión con ATP en el mismo da lugar a un complejo productivo enzima-sustrato. La unión de ADP en la región II de F<sub>1</sub> induce un intermediario incapaz de producir ADP y P<sub>O</sub><sub>4</sub> (ver figura 1.8). El complejo enzima-sustrato se presenta cuando el ATP se une a la región II.

La pseudorotación de las dos regiones en el sitio catalítico pueden reducir la energía de activación en la síntesis de ATP. El rango de fosforilación de ADP se puede elevar al remover rápidamente el agua de la posición axial de la bipirámide (ver figura 1.8).

Si hay bajo rango de remoción de agua de la posición axial de la bipirámide I se limita el proceso de síntesis de ATP. El rango de hidrólisis de ATP puede limitarse por la translocación de Mg<sup>2+</sup>-ATP del agua al sitio activo de F<sub>1</sub>. Es probable que la aurovertina se una a la región I y II y evite que se forme un complejo improductivo de ATP en la enzima y se incremente la reacción de la ATPasa (Webb, 1963).

Concluyendo se piensa que hay dos regiones en el sitio activo de F<sub>1</sub> mitocondrial que interaccionan con difosfoadenosina (-O-ADP). La adsorción en el sitio activo permite la formación de un complejo enzima-sustrato productivo en la región I o un complejo improductivo en la región II. La unión de ADP en la región II da un complejo enzima-inhibidor. El mecanismo de inhibición con ADP se explica por una sobrecarga de ADP en comparación con el ATP-O-ADP. En una región polar se une el

fosfato  $\beta$  del ATP (en la región II) y el fosfato  $\gamma$  de los nucleótidos trifosfato ocupa la región I. Las cargas del residuo de fosfato, del ADP y de los residuos  $\gamma$  de los nucleótidos trifosfato hacen imposible la unión simultánea de ADP y ATP en el sitio activo de F<sub>1</sub>.

El Mg<sup>2+</sup>ADP en el sitio activo de F<sub>1</sub> causa la inhibición de la actividad ATPasa (Kozlov *et al.*, 1975, 1977). La absorción de ADP en un sitio diferente al sitio activo no afecta la hidrólisis de ATP de F<sub>1</sub>. Hammes y Hilborn (1973) demostraron que el ADP es adsorbido fuera del sitio catalítico en forma libre y en forma de sal de magnesio. Suponen que hay una regulación alostérica de la actividad ATPasa. No se ha probado experimentalmente (1977).

Suponen que la adsorción de ADP y PO<sub>4</sub><sup>n-</sup> fuera del sitio catalítico es el primer paso de la reacción ATP sintetasa y que la translocación de ADP y PO<sub>4</sub><sup>n-</sup> del exterior al sitio catalítico forma el ATP.

Otros creen que hay dos sitios de unión para nucleótidos, uno de alta afinidad ( $K_d \approx 10^{-7}$  M), y otro de baja afinidad ( $K_d \approx 10^{-5}$  M). Dentro del sitio de alta afinidad un sitio catalítico de alta afinidad ( $K_a$  de 20 a 70  $\mu$ M o menos) y un sitio catalítico de baja afinidad ( $K_a$  de 0.2 mM). Los sitios de unión de nucleótidos disocian nucleótidos en dos rangos: uno rápido de tiempo medio mucho menor a un minuto, y uno lento de tiempo medio de aproximadamente un minuto y se asume que hay un sitio de intercambio por un par de subunidades  $\alpha, \beta$ . El sitio catalítico de alta afinidad hidroliza ATP, GTP o ITP y tiene mucha afinidad por el ATP. La unión del nucleótido al sitio regulador (de unión de nucleótidos) estimula la hidrólisis en el sitio catalítico (7).

Algunos autores encuentran, basados en la dependencia de pH de la  $K_m$  de la actividad ATPasa en presencia de Mg<sup>2+</sup>-ATP y en la  $K_i$  para Mg<sup>2+</sup>-ADP, que hay un grupo carboxil en el sitio activo que participa en la unión del complejo nucleótido-Mg (Metelsky, 1974).



Pedersen, *et al.* (1974), Adolfsen y Mondrianakis (1973) encuentran que la afinidad del complejo metal-ATP a la enzima depende del radio del ion de un metal divalente, más que de la polarización de los campos magnéticos del metal (6).

Los complejos  $Mg^{2+}$ -ATP,  $Mn^{2+}$ -ATP,  $Fe^{2+}$ -ATP y  $Co^{2+}$ -ATP son muy hidrolizados por  $F_1$ , con  $Ca^{2+}$ -ATP es menor por tener un radio mayor (Pedersen 1975). Esto se espera si el grupo carboxilo está ligado a un metal divalente en el sitio catalítico.

Se halló que un mol de  $F_1$  contiene un mol de sitios de alta afinidad a fosfato (Penefsky, 1977; Kasahara y Penefsky, 1978). La unión a  $F_1$  requiere de cationes divalentes y es inhibida por ADP y AMPNP (7).

### 1.5.7. Mecanismo de la enzima $H^+$ -ATPasa para la síntesis e hidrólisis de ATP (Kozlov y Skulachev, 1977).

Como se vió en la hipótesis de Korman (punto 1.4.6, página 30) se piensa que hay dos sitios activos en la  $F_1$  del cloroplasto: el sitio activo no catalítico ( $\alpha$ ) y el sitio activo catalítico ( $\beta$ ). El sitio  $\beta$  tiene dos regiones; la región I (RI) y la región II (RII) o sitio catalítico II (c.II) (ver figura 1.9).

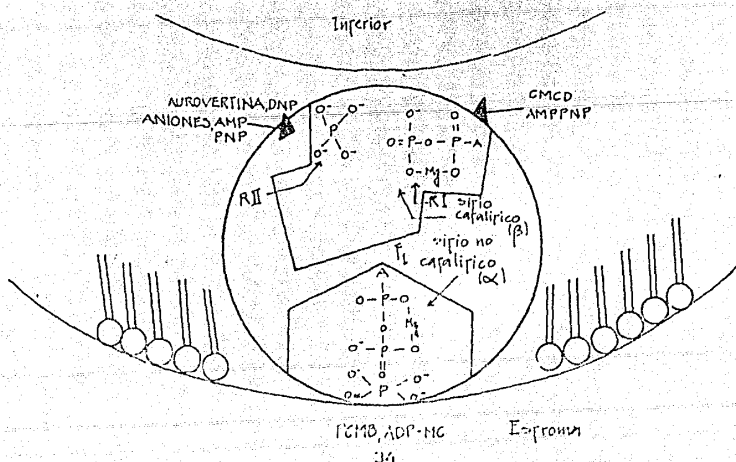


Figura 1.9. Esquema del sitio de unión o activo de la  $F_1$  para cloroplasto modificada de la de mitocondria dada por Kozlov y Skulachev (6). Contiene dos sitios activos el catalítico ( $\beta$ ) y el no catalítico ( $\alpha$ ) El catalítico con dos regiones, la RI y la RII de frente a los fosfolípidos de la membrana externa y el no catalítico frente a la fase acuosa del estroma. Este esquema es la representación condensada del que se representa en la figura 1.10, pág. 37).

Se piensa que los sustratos fosforilados son translocados entre dos o más sitios de unión de nucleótidos situados a diferentes distancias. Kozlov (1975) sugiere que hay una translocación de ATP, ADP y fosfato en  $F_1$  entre dos sitios activos de unión (6). El sitio activo catalítico está inmerso en la membrana de cara a los fosfolípidos (en el sitio activo o  $\beta$ ). El sitio activo no catalítico ( $\alpha$ ) está frente a la fase acuosa. En uno de los estados conformacionales de la  $F_1$  se hallan como se describió arriba y el antiport ATP/(ADP +  $P_0$ ) entre los dos sitios activos tiene un carácter electrogénico.

Se observa que el efecto de diferentes sustratos o inhibidores puede explicarse con este mecanismo (ver inhibidores, punto 1.4.3.2, página 21).

Se ha involucrado al sitio activo catalítico con la hidrólisis de ATP y al sitio no catalítico ( $\alpha$ ) a la unión de ADP (Kozlov y Konosenko, 1975; Pedersen et al., 1974).

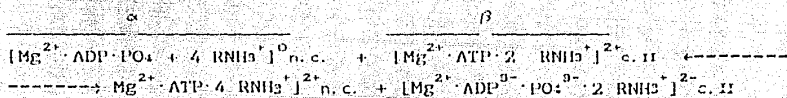
El mecanismo de la actividad ATPasa para cloroplasto, modificado del dado para mitocondria por Kozlov y Skulachev (6), se inicia con la expulsión del  $ATP-Mg$  del sitio activo no catalítico ( $\alpha$ ) [ver figura 1.10, (A)]. En el sitio activo no catalítico ( $\alpha$ ), ya sin ATP, se unen ADP, fosfato y  $Mg^{2+}$  procedentes del estroma del cloroplasto (los que tienen 4 cargas negativas netas) a 4 grupos ligando  $RNH_2^+$  del sitio activo  $\alpha$  (el que tiene ahora cuatro cargas positivas), por efecto de un potencial electrogénico, que depende del potencial de membrana. La carga neta del complejo es cero [fig. 1.10 (B)].

En el sitio catalítico se une  $Mg^{2+}$ -ATP (con 2 cargas negativas) a 2 grupos ligando  $RNH_2^+$ . La carga neta del complejo es cero.

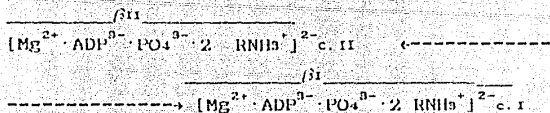
La unión del ADP-Pi-Mg se puede resumir con la siguiente ecuación [ver fig. 1.10, (B)]:



Después los sitios activos  $\alpha$  y  $\beta$  giran quedando frente a frente (fig. 1.10, (C)) y se translocan entre ellos sus complejos [ver fig. 1.10, (D)]:

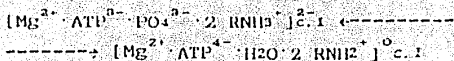


La reacción continúa con la translocación del ADP de la región II a la región I en el sitio catalítico, según la reacción [ver fig. 1.10, (D)]:



c. I = Región I del sitio catalítico; c. II = Región II del sitio cat.

Luego se forma un intermediario pentacovalente ATP-H<sub>2</sub>O que se forma con 2H<sup>+</sup> de un ligando NH<sub>3</sub><sup>+</sup> y un oxígeno del radical fosfato en la región I de  $\beta$ , según la reacción [ver fig. 1.10, (E)]:



Se estabilizan los fosfatos de  $\beta$  y  $\gamma$  del ATP-H<sub>2</sub>O al remover el difosfonucleótido (O-ADP) que pasa de la posición axial a la ecuatorial del intermediario pentacovalente, según la reacción:

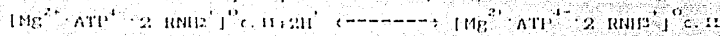


y se libera el agua del ATP-H<sub>2</sub>O [ver fig. 1.10, (E)]:



Se continua con una rotación de los sitios activos  $\alpha$  y  $\beta$  hacia lados opuestos y se da una disminución del gradiente del campo eléctrico transmembranal [Fig. 1.10, (F)]. El complejo (positivo) es translocado en dirección del compartimento negativo del estroma y el complejo sin carga en dirección opuesta.

En el sitio activo catalítico los grupos  $RNH_2^{2+}$  son protonados por iones  $H^+$  que se transportan desde el interior, por el canal sensitivo a DCCD o por protonáforos, según la reacción:



compuesto que es electroneutro y se mueve hacia la región hidrofóbica y está listo para iniciar un nuevo ciclo.

El  $[Mg^{2+} \cdot ATP^{4-} \cdot 4 RNH_3^{+}]^{2+}$  n.c. se dirige hacia el estroma y la F1 se protege liberando al ATP:



El siguiente ciclo en la síntesis de ATP se inicia con la incorporación de ADP, fosfato y  $Mg^{2+}$  [ver la figura 1.10, (A)].

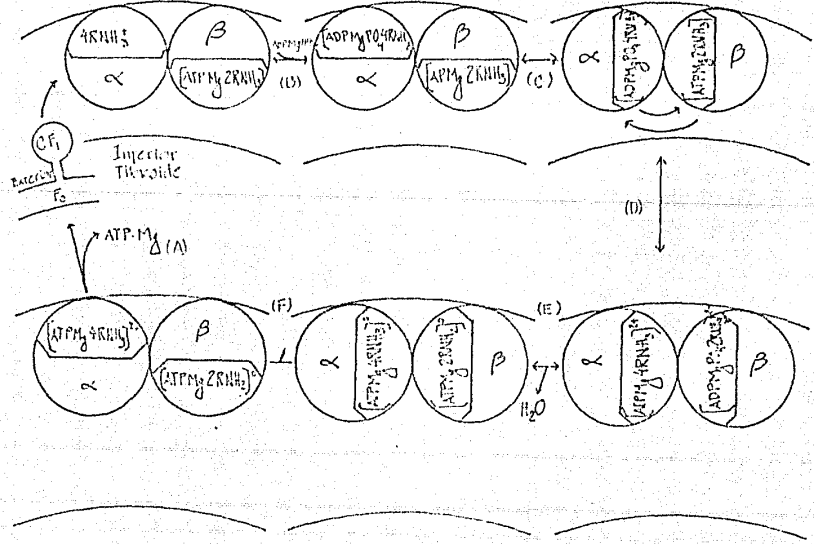


Figura 1.10. Mecanismo de la reacción  $H^+$ -ATPasa en la síntesis de ATP utilizando 2 subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ). Modificado del de mitocondria dado por Kozlov y Skulachev (1977) (6).

La hidrólisis de ATP puede revertir las reacciones con la diferencia que en la región II de  $\beta$ , que estabiliza al ATP durante la síntesis no participa directamente en la hidrólisis, incluso se puede hidrolizar al ATP sin el sitio no catalítico.

#### 1.5.7.1 Reacciones con seis subunidades de la enzima $H^+$ -ATPasa.

Las reacciones para las 6 subunidades se dan en paralelo (ver figura 1.11). En la etapa 1 la absorción de ADP y fosfato en  $\alpha$  puede ser simultánea a la formación de ATP en  $\beta$ .

En la etapa 2 hay rotación simultánea de  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta_2$ .

El aceptor del fosfato añadido es el ADP del medio y no el estrechamente ligado a  $CF_1$ . Con carencia de fosfato el ADP forma un complejo positivo con los ligandos  $RNH_3^+$  del sitio no catalítico ( $\alpha$ ). Al energizar el tilacoide el complejo  $ADP \cdot 4RNH_3$  con carga positiva en ( $\alpha$ ) es expulsado y se desplaza hacia la fase acuosa con carga negativa y se libera con más rapidez el ADP estrechamente ligado al sitio  $\alpha$ , que la translocación de fosfato del sitio  $\beta$  al sitio no catalítico ( $\alpha$ ).

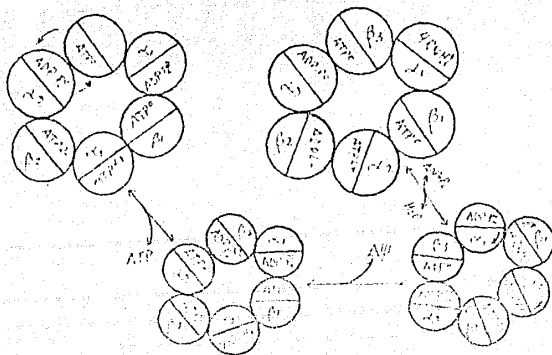


Figura 1.11. Mecanismo de la reacción  $H^+$ -ATPasa con 6 subunidades para  $CF_1$ . Según el modelo de mitocondria dado por Kozlov y Skulachev (1977) (6).

1.5.7.2. Cambios de los componentes de los proteolipidos de la enzima  $H^+$ -ATPasa.

Los cambios conformacionales de la  $CF_1$  incluyen la rotación de los sitios activos  $\alpha$  y  $\beta$  y por cambios de la posición de los componentes hidrofóbicos de los proteolipidos de la  $CF_1$ .

La fase acuosa del estroma se relaciona con la membrana de dos formas.

En una, los componentes hidrofóbicos están sobre las subunidades de la  $CF_1$  y las hidrofílicas dentro de los glúcidos de la  $CF_1$ ; conformación que hace afin a la  $CF_1$  y a los lípidos y la tiende a sumergir en la membrana [ver figura 1.12, (A)].

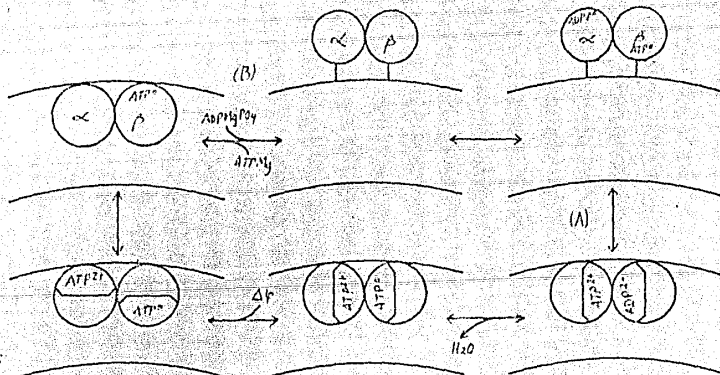


Figura 1.12. Esquema tentativo que representa la inmersión de la  $CF_1$  en la membrana del tilacoide. Modificado para cloroplasto del dado para mitocondria de Kozlov y Skulachev (1977) (6).

En la otra, se invierten los proteolipidos hidrofóbicos e hidrofílicos y la  $CF_1$  es sacada de la membrana formando una

producción [Fig. 1.12, (B)]. La transición de la CF<sub>1</sub> en inmersión o producción puede ser afectada por el potencial eléctrico ( $\Delta\psi$ ), el cambio de pH ( $\Delta\text{pH}$ ), la concentración de ATP, ADP y fosfato.

La generación del  $\Delta\text{pH}$  por la H<sup>+</sup>-ATPasa transfiere carga del lumen tilacoidal a la membrana y de ahí a la fase acuosa del estroma. Redwood, et al. (1973) demostraron la formación de canales iónicos (poros) que no seleccionan iones en bacterias. Estodienko, et al. (1976) describieron la conductancia de protones inducida en F<sub>1</sub> y en los casos mencionados no se demostró la generación de un  $\Delta\text{pH}$  debido a la hidrólisis de ATP. Es posible una abertura como anillo de proteína en la bicapa como poro permeable a iones. La conductancia de iones H<sup>+</sup> en F<sub>1</sub> puede ser resultado de la transferencia de nucleótidos ligados protonados entre el sitio catalítico y el no catalítico.

Existen (6) dos ideas acerca de la transferencia de protones por la H<sup>+</sup>-ATPasa:

- 1) Que los proteolipidos disminuyen la energía de activación para la transferencia de protones.
- 2) Y que los proteolipidos facilitan la transferencia de iones H<sup>+</sup> a la bicapa a cierta profundidad. El caso extremo es que se transporten protones a través de toda la membrana y F<sub>1</sub> este fuera de la acción del campo eléctrico transmembranal (que es contrario al sistema propuesto por Westerhoff, et al. (1984), (ver página 29)).

En un esquema modificado, para el transporte de iones H<sup>+</sup> por la CF<sub>1</sub> durante la actividad ATPasa, para el cloroplasto a partir del dato para mitocondria por Kozlov y Skulachev (1977) (6) la membrana está cubierta de lado a lado por CF<sub>1</sub> cargada positivamente con iones Mg<sup>2+</sup> ligados (ADP<sup>3-</sup>·O<sup>3-</sup>·4Mg<sup>2+</sup>) moviéndose del sitio catalítico al no catalítico. La hidrólisis de ATP en el sitio catalítico forma aniones ADP<sup>3-</sup> y fosfato (ADP<sup>3-</sup> y O<sup>3-</sup>). El ADP y el fosfato pasan al sitio no catalítico y son liberados en el estroma mientras que tres iones H<sup>+</sup> son liberados en el interior del tilacoide.

Eso implica que los proteolipidos y la proteína sensible (Fig. 1.13, A) a DCCD forman un canal penetrado por iones  $H^+$  o los acarrean. El DCCD tapa el protonóforo impidiendo el intercambio de los iones  $H^+$  entre el sitio catalítico y el interior disminuyendo la síntesis de ATP acoplada a fotosíntesis y a la hidrólisis del mismo por efecto de los desacopladores (ver la figura 1.13).

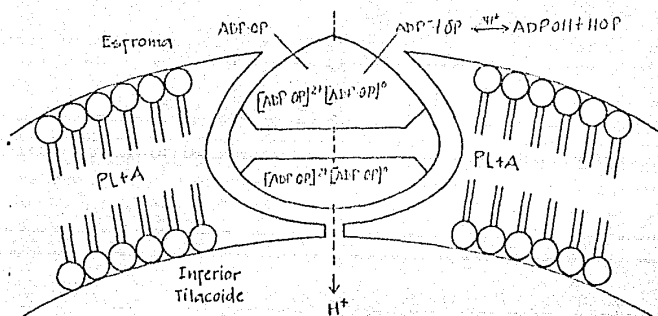


Figura 1.13. Esquema modificado para cloroplasto, del de mitocondria dado por Kozlov y Skulachev (1977) (6), para el funcionamiento de la  $H^+$ -ATPasa en la membrana acoplada. PL=proteolipidos, A=proteína sensible a DCCD (ver explicación en el texto).

El modelo expuesto se basa en los principios de Mitchell sobre la formación de ATP y del  $\Delta\mu H^+$ , en los principios de Boyer sobre la energía generada por el T.E., la que usa la  $CF_1$ , en los estudios de la afinidad de la  $CF_1$  por sus sustratos y productos, en los principios de Korman sobre un intermediario pentacovalente  $ATP-H_2O$  y la teoría de la pseudorotación en la síntesis de ATP.

### 1.9.3 Bomba de Iones manejada por el gradiente electroquímico de protones ( $\Delta\mu H^+$ ).

Mitchell postula que la C.T.E y el complejo  $H^+$ -ATPasa de mitocondrias, bacterias y cloroplastos generan un gradiente



electroquímico de protones. La actividad de la  $H^+$ -ATPasa impone un transporte de iones  $H^+$  a través de la enzima, que también pueden penetrar natural o artificialmente a la mitocondria, bacteria o cloroplasto y que son transportados en direcciones opuestas por medio del factor OSCP en mitocondria y bacteria y de la proteína sensible a DCCD en el cloroplasto (6).

El flujo de especies cargadas genera un potencial eléctrico transmembranal que puede medirse con un voltímetro. También se ha estudiado con un sistema modelo formado por dos electrodos inmersos en una solución electrolítica de composición idéntica, separada por una membrana artificial (Drachev, et al., 1974). La modificación del flujo de protones transmembranal induce cambios en el  $\Delta pH$  y en la actividad de la  $H^+$ -ATPasa (6).

Para la síntesis de una molécula de ATP se requiere el flujo de protones a través de la  $H^+$ -ATPasa a favor del gradiente. El coeficiente de Hill de la concentración de protones en la síntesis de ATP mide la cantidad de iones  $H^+$  transferidos para la formación de una molécula de ATP. Para el cloroplasto es de  $H^+/ATP=3$  (Alexandre, Reynafe y Lehninger, 1978) (7).

Se ha objetado que sea el  $\Delta pH$  suficiente para generar el gradiente de energía necesario para la síntesis de ATP (7.3 Kcal/molécula) que requeriría de 3 000  $H^+/1 H^+$  entre membrana y una diferencia de pH transmembranal de 3.5 unidades, o un potencial de membrana de 0.235 volts. Cuando se halla sólo una diferencia de pH de una unidad y un potencial de membrana de 0.15 volts que Mitchel supone que es suficiente para obtener la energía para la síntesis de ATP (3).

Se ha postulado por Westerhoff y colaboradores un modelo en el que proponen que en el cloroplasto intacto se hallan unidades de acoplamiento, con bombas primarias y secundarias de protones en un mismo espacio o dominio de la membrana. Donde las bombas secundarias son manejadas por la  $H^+$ -ATPasa (ver punto 1.4.5, Pág.20). Otra consideración que se hace en este trabajo

sobre el transporte de especies cargadas a través de la membrana del cloroplasto, es el flujo de ATP, ADP, fosfato, y  $Mg^{2+}$  mediante adenin nucleotido transferasas.

El ADP y el fosfato tienen 3 cargas negativas cada uno, mientras que el ATP posee 4 cargas negativas. Estos compuestos están ligados a iones magnesio que neutralizan parte de su carga.

Durante la síntesis de ATP en el cloroplasto, el conteo de cargas negativas parece favorecer gradientes de carga negativa en ambas fases acuosas de la membrana debidas al transporte de ATP, ADP, fosfato y magnesio y no un gradiente de carga positivo que plantea Mitchell como el intermediario de alta energía para la síntesis de ATP.

En la figura 1.14 se esquematiza el transporte de compuestos de adenin nucleotidos, fosfato y magnesio del cloroplasto y se hace el conteo de la contribución de carga con que cada especie química participa durante la síntesis de cuatro ATP, con los iones  $H^+$  y nucleotidos necesarios para la síntesis del ATP.

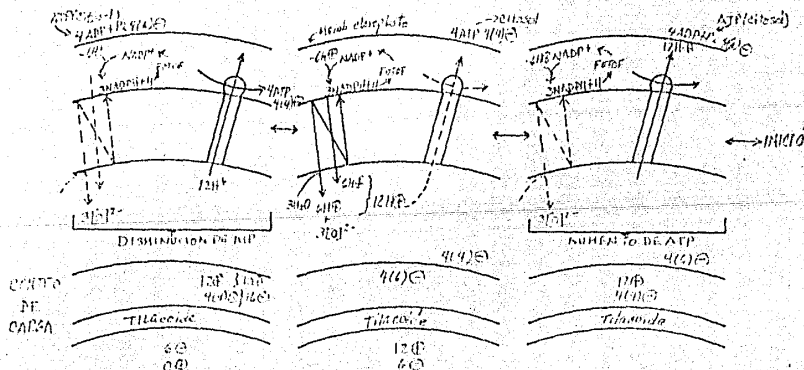


Figura 1.14. Esquema que describe el transporte de especies químicas con carga a través de la membrana del cloroplasto y el conteo de las mismas durante la síntesis de ATP en el cloroplasto.

El mecanismo del  $\Delta\psi$  para la síntesis de ATP todavía no es bien conocido y se han propuesto modelos que responden a algunos hechos

experimentales. Boyer y sus colaboradores han obtenido resultados que apoyan a un mecanismo de unión-intercambio de nucleótidos y flujo de iones  $H^+$  transmembranal con los que Kalayar *et al.* (1977), Gresser, *et al.* (1982) han propuesto un modelo para explicar la síntesis de ATP, que se cree que es más completo que los propuestos por Rosing *et al.* (1977), Sakamoto y Tonomura (1982) y el de Grabmeyer y Penefsky (1981b) (3).

Por su parte Kozlov y Skulachev proponen un mecanismo para explicar el funcionamiento de la  $H^+$ -ATPasa. Se apoyan en los datos de Boyer de la unión-intercambio de nucleótidos y de un intermediario pentacovalente propuesto por Korman que involucra cambios conformacionales en la  $F_1$  bacteriana pero no pueden concluir con precisión como son transportados los protones por la  $H^+$ -ATPasa. Proponen un posible camino para el paso de iones a través de la membrana basándose en un modelo de bomba de protones que se halla en la proteína bacteriorrodopsina [similar al pigmento fotosensible rodopsina del ojo de los animales (3)] de las bacterias halófitas y después lo comparan con el posible camino que podría seguir en la  $H^+$ -ATPasa (6).

#### 1.5.3.1 La bacteriorrodopsina como modelo para el transporte de iones $H^+$ a través de la membrana de bacterias halófitas.

La bacteriorrodopsina tiene un P.M. de 270,000 d, se halla inmersa en la membrana bacteriana y no tiene asociación con otras proteínas. Contiene el retinal que es un polipeptido con 75% de proteínas  $\alpha$  hélice en 7 líneas por molécula de bacteriorrodopsina orientadas perpendicularmente a la membrana. Cada línea tiene 450 nm de largo (talla suficiente para cruzar la región hidrofóbica), y forma complejos con 3 moléculas proteicas o 21 proteínas  $\alpha$  hélice (ver figura 1.15).

Las líneas se sitúan en dos centros concéntricos, el exterior con 12 líneas y el interior con 9 líneas y dentro una cavidad

libre de proteínas. El retinal se fija paralelamente a la superficie de la membrana y perpendicularmente a las líneas de las proteínas  $\alpha$  hélice. La proteína se une a la retinal mediante la base de Schiff que es la zona con los grupos aldehído del retinal y del grupo  $\epsilon$  amino de los residuos Lisil de la bacteriorrodopsina.

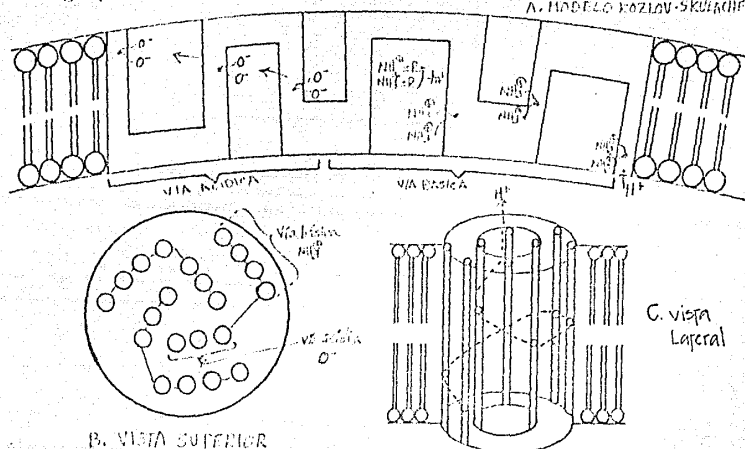


Figura 1.15. Modelo de la transferencia de iones  $H^+$  a través de la bacteriorrodopsina de bacterias halófilas. En A la representación dada por Kozlov y Skulachev 1977) (6), en B vista superior de la vía de los protones; y en C en una vista lateral tridimensional.

Al iluminarla se provoca un flujo de protones del citoplasma al exterior. Se demostró que la absorción de protones está vinculada a un cambio de conformación del retinal que disocia al ion  $H^+$  de la base de Schiff, la que se protona en la oscuridad (Oesterhelt, 1971, 1973; Lewis *et al.*, 1971; Mendelson, 1976) (6).

#### 1.5.8.4.1. Mecanismo de reacción de la bacteriorrodopsina.

Stoeckenius sugiere que la vía de absorción de los protones se da del citoplasma (con grupos  $\alpha$ -hidroxilo), al retinal (sobre la

superficie membranal y unido a las proteínas  $\alpha$  hélice por la base de Schiff) y de ahí al exterior (con grupos básicos).

En la oscuridad los grupos básicos ( $-\text{NH}_3^+$  de lisinas de la bacteriorrodopsina) son protonados y la base de Schiff (con iones  $\text{COO}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  cercanos a la vía con grupos básicos) también está protonada.

Con la absorción de fotones el retinal se isomeriza y disminuye mucho su afinidad por iones  $\text{H}^+$  (ver la figura 1.15). Un ion  $\text{H}^+$  es separado de la base de Schiff y lo transfiere a la vía ácida formada por un grupo carboxil de la bacteriorrodopsina o por grupos fosfato (de fosfolípidos) y sulfato (de sulfocarbhidratos) del complejo bacteriorrodopsina. Los grupos ácidos son desprotonados a pH neutro, enviando su protón al exterior, y se reducen con el protón de la base de Schiff.

Las proteínas de las  $\alpha$  hélices contienen grupos funcionales para conducir iones  $\text{H}^+$ . Las líneas exteriores con grupos ácidos y las interiores con grupos básicos. El contacto entre acarreadores de una misma vía (ácida o básica) puede darse por movimientos de rotación de las proteínas  $\alpha$  hélice a lo largo de su lado axial o por movimientos del grupo acarreador de protones en la línea flexible de los residuos hidroxycarboxilo. Para el paso de los protones de la vía ácida (anillo exterior) a la básica (anillo interior) se requiere luz para provocar el cambio conformacional de las proteínas de las  $\alpha$  hélice, del retinal, cuando está protonado.

La bacteriorrodopsina mantiene la conducción de protones durante la noche y el  $\Delta\text{pH}^+$  generado por la proteína disminuye. Se evita la fuga de los protones si las líneas de las proteínas de las  $\alpha$  hélice tienen una posición desfavorable para conducir los iones  $\text{H}^+$  en la oscuridad. (el retinal no se isomeriza y no expulsa iones  $\text{H}^+$ , pero se permite la protonación de grupos ácidos o básicos) y se revierte al iluminar [Oesterkelt y Stoockenius, 1971; Lehninger, 1981 (3)].

### Razgos de similitud entre la bacteriorrodopsina y la $H^+$ -ATPasa:

1) En ambos casos los productos de reacción disminuyen la afinidad por iones  $H^+$  (las bases de Schiff en luz y oscuridad en la bacteriorrodopsina y el agua y  $ADP+Pi+H_2O$  en la  $H^+$ -ATPasa).

2) En ambas se da la translocación de grupos proteolíticos o un sustrato de la reacción proteolítica (movimiento de las bases de Schiff debido al cambio conformacional dependiente de luz del retinal y la translocación de nucleótidos entre los sitios catalítico y no catalítico de la  $H^+$ -ATPasa).

3) En ambas, las bombas de iones  $H^+$  transportan a los protones a través de la membrana. En la bacteriorrodopsina los sistemas de grupos ácidos y básicos de las bases de Schiff flexibles pueden jugar un papel de inhibición mientras que en la  $H^+$ -ATPasa este patrón puede ser el que juegan los proteolipidos sensibles a oligomicina y DCCD en mitocondria y a DCCD en el cloroplasto.

### 1.6 SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA SÍNTESIS DE ATP.

Se sabe que la máxima eficiencia de conversión de energía luminosa a energía química almacenada, en condiciones ideales es de 13.3% del total de energía radiante incidente. Restando a ésta la energía utilizada en la fotorrespiración y considerando el coeficiente de absorción y los campos cuánticos la eficacia se reduce a 5.6% en energía almacenada (Mitchell, *et al.*, 1977; Radmer y Kook, 1977; Boardman, 1977; Bolton, 1978). De los cultivos más eficientes en la conversión de la energía luminosa a química se tiene al de la caña de azúcar y al jacinto de agua que pueden tener de 2 a 3% de eficiencia por año, en la agricultura y en los bosques en general se tiene una eficiencia de 1% (9).

Los sistemas vivos, desde el punto de vista termodinámico, tienden hacia la máxima entropía y los lleva a su mayor grado de "desorden", el que se representa en el sistema bioenergético por el

CO<sub>2</sub> y el agua, que son dos compuestos de mínima energía libre, que son precisamente los sustratos que utiliza el sistema bioenergético (el cloroplasto) para reducir la tendencia hacia el "desorden" almacenando energía química disponible para los procesos que ocurren en los seres vivos.

Mediante el mecanismo bioquímico de la síntesis de ATP en la mitocondria, la bacteria y el cloroplasto se almacena energía química de enlace que las plantas y animales utilizan en las rutas metabólicas para su mantenimiento, crecimiento y reproducción, garantizando la permanencia de la vida.

## 1.7 MARCO REFERENCIAL.

### 1.7.1 ANTECEDENTES DE LA ACTIVIDAD ATPasa DE LA CF<sub>1</sub> DE CLOROPLASTOS DE MAÍZ TRATADOS CON METANOL.

Aquí se consideran algunos resultados experimentales que sentaron las bases para el tratamiento de la H<sup>+</sup>-ATPasa con alcoholes.

Entre los estudios iniciales Lin, et al. ( Zhang y Lin, 1986 ) y Lenaz, et al. estudiaron la actividad ATPasa y encontraron que durante su activación se presentaban cambios conformacionales de la F<sub>1</sub> de mitocondria cuando se trataba con n-propanol (22).

Por otro lado se halló que el butanol (6) y metanol (10) no inducen la solubilización de la F<sub>1</sub>.

En un estudio más completo se trató la H<sup>+</sup>-ATPasa, de mitocondria de corazón de cerdo, con alcoholes como el metanol, etanol, n-propanol, isopropanol y terbutanol y se observó que se producía la activación de la F<sub>1</sub> ligada a la membrana pero no de la enzima en mitocondria intacta.

Con excepción del metanol todos los alcoholes activaron y luego inhibieron los cambios conformacionales de la enzima y la

actividad ATPasa disminuyó al aumentar la cadena y ramificación de los alcoholes (22).

En el mismo estudio al añadir 5, 10 y 20% de diferentes alcoholes a la enzima todos estos a excepción del metanol no afectaron significativamente la conformación  $\alpha$  helice de la F<sub>1</sub> de la mitocondria lo que indicó que la F<sub>0</sub> contribuye a la estabilidad de la F<sub>1</sub>.

Con n-propanol, isopropanol y terbutanol la conformación de la  $\alpha$  helice alcanzó un máximo con 5% y disminuyó con 10% del alcohol, mientras que con metanol el cambio de conformación fue mayor al aumentar su porcentaje. En la conformación de las láminas  $\beta$  de la F<sub>1</sub> se presentó un mínimo usando 5% del alcohol y aumentaron poco al incrementar el porcentaje del mismo (22). Lo que indicó que la conformación  $\alpha$  helice de la enzima aumenta y la conformación  $\beta$  disminuye al aumentar la actividad ATPasa.

Dentro de los estudios de la H<sup>+</sup>-ATPasa de cloroplasto se ha trabajado con espinaca a la que se ha estudiado en diferentes condiciones.

Tratando a la H<sup>+</sup>-ATPasa de espinaca con 33% de metanol se halló:

1) Que se produce una hidrólisis 50 veces mayor que la actividad basal de la actividad ATPasa de la enzima tratada con luz [400  $\mu$ Mol PO<sub>4</sub>/mg clif.hr a 37°C por 2min (43)](6, 10). Esto puede ser el resultado de cambios en la conformación de la  $\alpha$  helice (22), los que son diferentes de la activación con luz (8).

2) Que se impide la translocación de iones H<sup>+</sup> inducida por la luz sobre la C.T.E. o por una transición ácido base en el tilacoide intacto.(10).

3) Que con el uso de metanol y Mg<sup>2+</sup>-ATP no se da un



intercambio de nucleótidos en el sitio activo de la CF: (10) se liberan sin especificidad nucleótidos estrechamente ligados a la enzima, lo que suponen es provocado por una desnaturalización de la CF: (6, (10). Los nucleótidos no son rápidamente desalojados y se impide un ligamiento posterior de los mismos (10).

No se halló correlación entre la pérdida de nucleótidos estrechamente ligados y el incremento de la actividad ATPasa, la que se dió más rápido que la liberación de ADP ligado. Con el uso de  $Mg^{2+}$ -ATP se ha observado que se libera con más rapidez ADP estrechamente ligado que con  $Mg^{2+}$  y ATP por separado (10).

Con la adición de ADP no se contribuye a la pérdida de nucleótidos estrechamente ligados y con el uso de análogos de ATP tampoco se halló correlación con la pérdida de ADP estrechamente ligado. Lo que parece indicar que los nucleótidos no están relacionados con los cambios conformacionales de la CF: (10).

4) Con el uso de metanol y de  $Mg^{2+}$ -ATP se ha tenido mayor activación que con  $Ca^{2+}$ -ATP en CF: ligada a membrana mientras que en la CF: aislada sucedió lo contrario y con la adición de  $Mg^{2+}$  libre se inhibió ambos nucleótidos. Con el uso de ATP se da una activación ATPasa irreversible rápida y suponen que inhibe el sitio activo de la CF: durante la síntesis de ATP (10). Después de eliminar el metanol se pierde el 90% de esta actividad ATPasa (10) y otros estudios demuestran que la actividad ATPasa es del doble que la control (tratada con luz) lo que puede indicar que la hidrólisis de ATP no requiere de la liberación de ADP estrechamente ligado (8).

5) Con la adición de aniones como  $SO_3^{2-}$  o  $HCO_3^-$  aumenta la actividad ATPasa, en presencia o no de la subunidad  $\epsilon$  y la actividad fue mayor usando Mg-ATP que Ca-ATP, donde la última se activó primero con calor y sin  $\epsilon$  para tener una actividad igual (parece que  $\epsilon$  es afectada por calor) y donde el metanol parece reducir la inhibición por  $Ca^{2+}$  en la CF: soluble (8, 43).

## 1.8 -- BIOGENESIS DEL CLOROPLASTO DE MAIZ.

Se considera que el desarrollo ontogénico del cloroplasto es paralelo al desarrollo celular ya que los genomas del cloroplasto y del núcleo celular codifican la mayoría de las proteínas del cloroplasto (1).

El cloroplasto se desarrolla de un proplastidio pequeño (1  $\mu$ m), indiferenciado (Whits, 1959; Kliney y Schiff, 1972; Robertson y Leech, 1974; Leech, et al., 1978), tiene una etapa temprana de diferenciación y pocas membranas internas (20).

Se han encontrado plastoglobulos osmiófilos en el estroma del cloroplasto, cerca de la membrana interna, y se ha demostrado que varían en número, talla, forma, composición y función durante el desarrollo del cloroplasto. Se les atribuye la función de almacenadores de lípidos y han hallado una relación entre su contenido y el desarrollo de la fracción laminar de la membrana del cloroplasto. El exceso de lípidos laminares se almacenan en estos plastoglobulos. En etapas tempranas del plastidio tienen poca talla y número y aumentan con el desarrollo del plasto después de formarse el complejo tilacoidal (21). En condiciones de estrés hídrico en maiz los plastoglobulos aparecen cuando los cloroplastos de vaina tienden a disminuir su contenido de almidón y a romper sus membranas externas (39).

Debido a la escasa información sobre las características del crecimiento del maiz cuando sea necesario nos apoyaremos en datos de algunas plantas diferentes, las que nos darán una información aproximada de la medición, pero que podría no aplicarse al maiz.

De aquí en adelante se utilizará las frases estado o región de desarrollo seguidas de los números romanos I, II, III los que representan tres estados de desarrollo de los cloroplastos de maiz. El I corresponde a los proplastidios que se extraen de los dos primeros centímetros medidos desde la base. El II de los

cloroplastos intermedios que se extraen de los 2 a los 4 cm y el III de los cloroplastos maduros que se extraen de los 4 a los 6 cm.

1.8.1 Relación de la distancia desde la base de la hoja y edad del cloroplasto en trigo etiolado.

En las hojas de maíz las células están en un arreglo lineal, con células jóvenes en la base y viejas en la punta. El tamaño de los plastidios de maíz aislados es similar al que éstos presentan en la hoja intacta (19).

En trigo etiolado se ha observado que las células envejecen de la base a la punta como en el caso del maíz. En 0 cm células jóvenes y en 6 cm células de 6 días de edad (ver figura 1.16) (30).

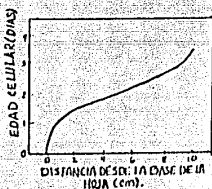


Figura 1.16. Gráfica que relaciona la edad celular y la distancia a la base de la hoja en trigo etiolado de 7 días de edad (30).

Se han encontrado diferentes estados de diferenciación de los cloroplastos de la base a la punta de las hojas de maíz (18). También se ha mostrado que el plastidio de la hoja de maíz por encima de 3 centímetros, contados a partir de su base, presentan una diferenciación del grana y después de los 4 centímetros tienen una división sincrónica que se ha asociado con la producción de oxígeno (19).

### 1.8.2 Rendimiento de la cosecha de las hojas de maíz para experimentar.

La tabla siguiente describe el rendimiento de la cosecha de hojas de maíz en peso fresco y húmedo de tres estados de desarrollo de los cloroplastos de la hoja de maíz (I, II y III) con su concentración correspondiente de clorofila.

Estado de desarrollo.	Dist. a la base	Clorofila total ( $\mu\text{g}$ )	Peso fresco (mg).	Peso seco (mg).	Peso fresco/Peso seco.
I	0-2cm	7.5	41.8	3.1	13.4
II	2-4cm	8.9	49.3	2.8	17.7*
III	4-6cm	18.4	57.8	3.5	15.8

\* = Relación mayor por el incremento de talla celular sin aumento del sistema fotosintético.

Tabla 1.2. Peso húmedo, peso seco y concentración de clorofila para tres secciones de hoja de maíz de \_\_\_ días de edad con cloroplastos en tres estados de desarrollo (18).

### 1.8.3 Cantidad de células de mesófilo por sección en trigo etiolado.

En el trigo etiolado de 7 días se halló que de la base a la punta (región I a III) disminuyó: el número de células total por sección (de 830 células/sección a los 0 cm a 30 células por sección de los 2 a los 9 cm) y la cantidad de células de mesófilo por sección (de 40 células a los 0cm a 12 células a los 9 cm) (38). Y por el contrario aumentó el porcentaje de células de mesófilo respecto al total de células por sección de 44% en células jóvenes a 54% en células viejas. La relación células del mesófilo: epidermis disminuyó: de 0.2-0.3 cm (0.83) a 8.0-8.1 cm (0.27). La relación células de mesófilo: vasculares aumentó: de 0.2-0.3 cm (0.70) a 4.0-4.1 cm (1.11) y luego disminuyó hasta la relación inicial [de 6.0-6.1 cm (0.72) y de 8.0-8.1 cm (0.78)] (ver tabla 1.3) (38).

Distancia des de la base(cm).	#cel. de mesófi lo/sección.		#clorop./sección (x10 <sup>3</sup> ).	#clorop./célula mesófilo.
	(x10 <sup>4</sup> ).			
2	2.85		1.97	69±4
4	2.62		2.36	90±5
6	2.62		2.86	109±7
8	2.62		3.49	133±6
10	2.62		3.54	135±7

Tabla 1.3. Representación del número de células de mesófilo, cantidad de cloroplastos por sección y la cantidad de cloroplastos por célula de mesófilo en hojas de trigo etiolado (38).

#### 1.8.4 Magnitudes de los cloroplastos y sus características.

A continuación se presenta la tabla 1.4 que concentra la mayoría de los datos reportados para el crecimiento del maíz, y los que se pueden calcular a partir de éstos; con los que se pueden determinar las características medias de los plastidios de maíz en tres estados de desarrollo. Posteriormente se presenta la figura 1.17 que esquematiza los datos representados en la tabla 1.4.

Estado de desarrollo.	(#g).		(#g).		Plp. mesófil.		Plp. vaina	
	clp. mesófil		clp. vaina		Plp. mesófil.		Plp. vaina	
	#granos/ plastidio <sup>3</sup>		#granos/ plastidio		#tilac./ grana <sup>2,3,4</sup>		#tilac./ grana.	
	A	B	A	B	A <sup>1</sup>	B <sup>2</sup>	A <sup>3</sup>	B <sup>2</sup>
I	0.2	4.5	-	-	2	3	-	-
II	4.5	16.0	-	-	2	3 <sup>2</sup>	-	-
III	24.0	24.0	10	5	5	8	3.7	2.6 5.5

continuación de tabla 1.4:

Estado de desarrollo	#plastidios/ sección <sup>5,1</sup>	Vol. /plas ( $\mu$ m <sup>3</sup> ) <sup>3,1</sup>	Vol. (v) acuo ( $\mu$ m <sup>3</sup> ) <sup>3</sup>	* $\eta$	
				(1.g)	
				#lamelas/ grana.	largo de grana(mm) <sup>5,1</sup>
A	B	A	B		
I	3.6	5.0	37	0.24 7.4 175 275	
II	63.0	5.0	43	1.00 5.9 225 475	
III	64.0	0.0	46	0.20 29.0 350 500	

continuación de tabla 1.4:

Estado de desarrollo.	(LL).		(Lg/#g)/ (LL/#l) <sup>7</sup>	Ancho de lá- coida(nm)	Área lá- coida(nm) <sup>2</sup> *2	
	Largo de lamela(nm)				Área	
	A	B			A	B
I	125	225	2	125	50678	83 026
II	100	350	0.5	125	39703	136 300
III	100	400	1.2	125	103133	143 020

Citas: 1= (4), 2= (10), 3= (10), 4= (20), 5= (23), 6= (25), 7= (26).

\*1= Cálculos realizados a partir de las microfotografías dadas por Leech y Rumaby (1971) (23). Se partió de los siguientes datos:

Estado de desarrollo	Longitud de grana(nm)		λ/na	Longitud de grana(nm)		Longitud de lamela(nm)		λ/na	Longitud de lamela(nm)	
	A	B		A	B	A	B		A	B
I	0.7	1.1	40 000	175	275	0.5	0.9	40 000	125	225
II	0.9	1.9	40 000	225	475	0.4	1.4	40 000	100	350
III	0.7	1.0	20 000	350	500	0.2	0.8	20 000	100	400

\*2= Calculada con la fórmula de la elipse:  $4\pi/2 \cdot \frac{1}{2} \cdot b^2/a^2$ .

\*3= Calculada a partir de la fórmula:  $(Lg/\#g)/(LL/\#l)$ .

A= Límite inferior. B= Límite superior.

Lg=largo de grana; #g=# de granas; LL=largo de lamelas; #l=# lamelas.

Tabla 1.4. Resume la mayor parte de las características de los cloroplastos de maíz.

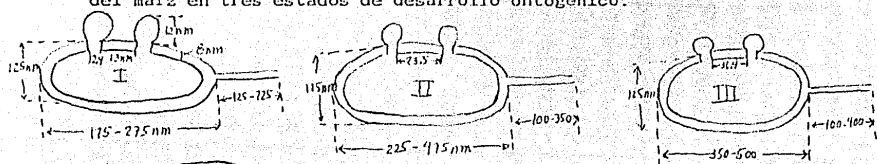
A continuación se da una tabla con las tallas de los etioplastos de maíz.

Estado de desarrollo	Clp. de manótilo				Largo/ ancho	Clp. vaina				Largo/ ancho
	Largo(nm)	Ancho(nm)		Largo(nm)		Ancho(nm)		Largo(nm)	Ancho(nm)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
I	1.0	2.0	1.5	2.0	1.3	1.4	-	-	-	-
II	2.0	4.2	2.0	3.2	1.4	1.3	4.6	4.7	1.0	2.4
III	4.2	5.0	3.2	-	1.3	1.4	4.7	4.4	2.4	2.3

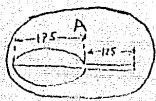
A= Límite inferior. B= Límite superior.

Tabla 1.5. Representación de las tallas de los etioclóroplastos de maíz según Mackender (32).

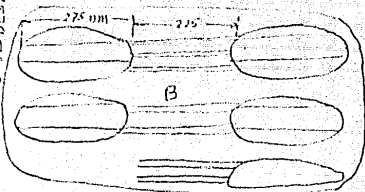
Con la información de las tablas se realizan ahora los esquemas que consideran las características promedio que presentan los cloroplastos de mesófilo y de vaina de las células fotosintéticas del maíz en tres estados de desarrollo ontogénico.



ESTADO DE DESARROLLO I

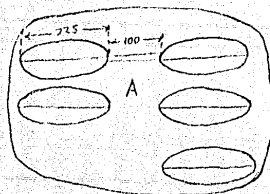


1 grana  
2 tilacoide



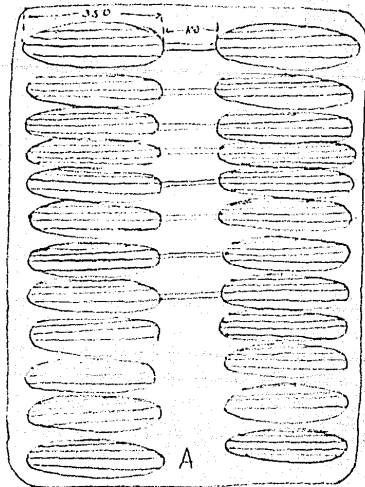
4.5 grana  
3 lamelas  
7 tilacoide

ESTADO DE DESARROLLO II

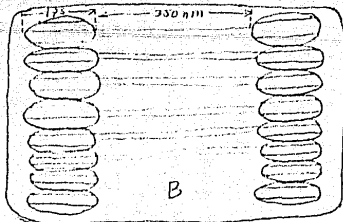


4.5 grana  
3 lamela  
2 tilacoide

ESTADO DE DESARROLLO III



24 grana  
6 lamelas  
3 tilacoide



16 grana  
6 lamelas  
3 tilacoide

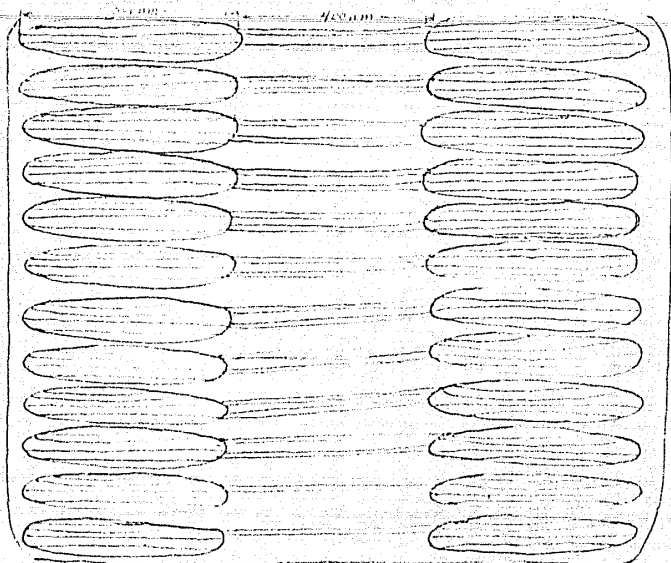


Figura 1.17. Representación esquemática de la mayoría de las características de los cloroplastos de maíz en tres estados de desarrollo ontogénico representados en la tabla 1.4 (tallas promedio, número promedio de tilacoides, número de granas y número de lamelas).

#### 1.8.5 Síntesis de proteínas, DNA y RNA en etioplastos de trigo.

Para tener una idea aproximada de las características sobre la síntesis de proteínas de los ribosomas, de la producción de DNA y RNA se da la la siguiente información ejemplificando con trigo etiolado.

Se midió la cantidad de ribosomas (ver figura 1.18) y la expresión génica de las células de trigo etiolado después de 7 días de iluminación, 36 horas después de ocurrida la última división celular y se halló cambios significativos en el número de ribosomas y del contenido celular. En las células del mesófilo aumentó: a) La ribulosa bifosfato carboxilasa (RuBisCo) 20 veces de las 15 a las 60 horas después de iluminar el cloroplasto (80 pg), b) la cantidad de clorofila (9 pg), c) los ribosomas 70s ( $14 \times 10^5$ /hr) y 80s (máximos de las 48 a las 60 hr), d) el DNA (40 a



60 pg/célula), e) el RNA, RNA 70S (el RNA 80S disminuyó), y f) la cantidad de proteínas por célula (ver la tabla 1.6 y la figuras 1.18, 1.19) (38).

Distancia des de la base(mm)	Citoplasma.				Cloroplasto.			
	Unidades de RNA cito plasmático/cél. (pg)				Unidades de RNA del cloro plasto/cél. de mesófil. (pg)			
	25a		10a		23a		16a	
	A	A	A	B	A	B	A	B
(0-5)-(15-20)	41	49	22	27	2.5	19	1.8	12
(20-25)-(40-45)	51	62	28	36	24	54	18	86
(40-45)-(60-65)	62	64	86	91	54	69	86	45

A= Límite inferior. B= Límite superior.

Tabla 1.6. Representación de los valores de la producción de RNA citoplasmático y del cloroplasto de etioclóroplastos de trigo según Dean y Leech (1982) (38).

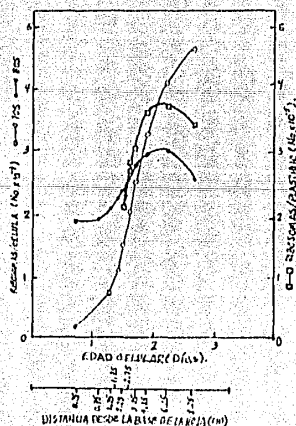


Figura 1.18. Gráfica de la cantidad de ribosomas por célula en función de la edad del cloroplasto de mesófilo de trigo etiolado (38).

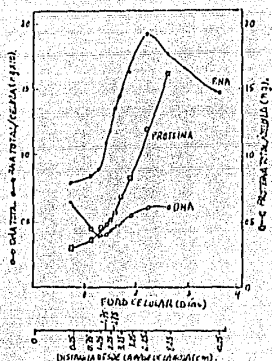


Figura 1.19. Representación de la cantidad de proteínas, de DNA y de RNA que producen los etiocloroplastos de mesófilo de trigo en función de la edad (38).

#### 1.8.5.1 Aminoácidos y amidas.

De los aminoácidos que se hallan en el cloroplasto en desarrollo se ha mostrado que se da una disminución de los aminoácidos libres (de 30%, excepto asparagina, aspartato, ornitina, ácido  $\alpha$  aminobutírico, lisina y la fenil alanina) y de las amidas, lo que puede indicar una disminución de su concentración molar o ser un efecto del aumento de la talla del plastidio. Del estado de desarrollo II (2-4cm) al III (4-6cm) la concentración molar de aminoácidos por plastidio es constante aunque aumenta mucho el volumen del cloroplasto (14). Estos contenidos de amidas y aminoácidos libres se presentan por igual en las hojas embrionarias y en las restantes (4) y su concentración es suficiente para la inhibición de los enzimas que las pueden sintetizar (8).

La amida y la asparagina fueron los compuestos más abundantes en los cloroplastos de maíz aislados y del tejido de la hoja intacta. De las amidas y aminoácidos libres más elevados destacan la serina, la alanina (19 y 10% en cloroplastos aislados y 11 y

10% en tejido intacto), seguidos de asparagina, aspartato, glutamato y glicina.

De los que tuvieron una relativa baja proporción se cita al ácido aspártico y glutamina (9.4 y 0.7% respectivamente en cloroplastos aislados y 15.1 y 2.2% en tejido intacto). La más baja fue la glutamina (0.7% en cloroplastos aislados y 2.2% en tejido intacto). Sólo la glutamina, en tejido intacto, disminuyó 10 veces del estado de desarrollo I al III (4) (ver tabla 1.7).

De lo que se deduce que la concentración de aminoácidos libres y amidas de los plastidios y tejido intacto son similares. Estos pudieron ser aislados con el cloroplasto gracias a que la membrana es una barrera para la difusión pasiva de los aminoácidos libres y amidas, lo que ya había adelantado Gimmler *et al.* (1974) y Holdt *et al.* (1975) para algunos aminoácidos (4). Es necesario determinar el papel que juegan los aminoácidos dentro de la actividad fotosintética.

La tabla siguiente muestra la concentración de aminoácidos y amidas en cloroplastos y tejido intacto de maíz.

Aminoácido o amida	Plastido (mM)	Hoja (mM)	Aminoácido o amida	Plastido (mM)	Hoja (mM)
Asparagina	15.05	4.77	Ac. α aminobu		
Aspartato	5.20	2.20	Útrico	0.95	0.19
Serina	10.60	1.57	Valina	0.89	0.16
Ac. glutámico	2.77	1.47	Istina	0.29	0.12
Alanina	9.90	1.46	Isoleucina	0.45	0.12
Glicina	4.70	1.42	Tirosina	0.96	0.11
Treonina	1.97	0.85	Leucina	0.48	0.10
Ornitina	0.98	0.32	Glutamina	0.51	0.10
Histidina	1.20	0.22	Fenil alanina	0.14	0.08

Tabla 1.7. Cantidad de aminoácidos y amidas en cloroplastos aislados y tejido intacto de maíz según Chapman y Leech (1979) (4).

### 1.8.6 Desarrollo de fotosistemas.

Se sabe que hay dos fotosistemas, el PSI y el PSII, cada uno asociado a un C.R. que contiene en orden de importancia los siguientes pigmentos fotosensibles: clorofilas a y b, carotenos y xantofilas. Ambos fotosistemas transportan electrones a través de varios acarreadores que se hallan en la membrana, cuando están completamente constituidos. El PSI transfiere electrones, desde sus C.R., de las moléculas de clorofila, (transporte cíclico) y los recupera de los provenientes de PSII. El PSII transporta electrones de forma similar pero los obtiene de una molécula de agua disociada por el complejo Z en  $2H^+$ , media molécula de oxígeno (con la que se mide su actividad de T.E.) y 2 electrones (durante el transporte no cíclico).

Se han empleado diferentes métodos para evaluar la actividad de los fotosistemas. Entre otros están las mediciones de espectrofotometría de absorción de luz visible y fluorescente (que mide la absorbancia de las clorofilas, de los aceptores de electrones, cuando forman soluciones ópticamente densas y de los compuestos fluorescentes ligados a la C.T.E.), la producción de oxígeno (para el PSII), el grado de polarización y el uso de diferentes isótopos y compuestos con marcas radioactivas.

Se calcula que en maíz maduro la eficiencia de la transferencia de energía de la clorofila es del 100% y que la de los carotenoides es del 50% en cloroplastos de mesófilo y de vaina. Durante el T.E. cíclico y no cíclico en el cloroplasto activado, hay 10 veces más cambios conformacionales en los cloroplastos de mesófilo (el grado de polarización de la clorofila es de 4% y el porcentaje de fluorescencia del doble del de vaina) que en los de vaina (el grado de polarización de la clorofila es de 6% y el porcentaje de fluorescencia es de la mitad del de mesófilo) lo que indica que ya está constituida la C.T.E. (33).

Se ha encontrado que durante el desarrollo del cloroplasto de maíz (19), cebada (24) y frijol (24, 35) el PSI se completa antes que el PSII, ya que en el estado de desarrollo I se presenta actividad de T.E. en PSI pero no en PSII del mismo estado (19) (La ausencia de T.E. en PSII se determinó por la falta de producción de  $O_2$ , al igual que en nuestros experimentos). Falta todavía determinar si ya están conformados el PSII y el complejo Z o si la falta de producción de  $O_2$  sólo se debe a la falta de conformación del último. No se ha confirmado con seguridad si el aceptor final de estos electrones (el  $NADP^+$ ) está, en esta etapa, ya está unido en la superficie externa del tilacoide para reducirse con los electrones transportados por la C.T.E. Oelze-Karow y Buttler creen que la C.T.E. se completa con la unión de  $NADP^+$  (40).

También se ha demostrado que durante el desarrollo ontogénico el complejo cosechador de luz (L.H.C.) tiene un incremento en el número promedio de moléculas cosechadoras de luz con respecto al número de centros de reacción (19).

En cloroplastos de cebada mutante y pepino germinado (carentes de clorofila b) se halló que carecen de dos polipéptidos de P.M. 21,500 a 24,500, los que sí se hallaron en cebada silvestre y pepino adulto y que indica que hay un proceso de formación de las clorofilas para alcanzar la actividad normal del cloroplasto maduro (35).

En el frijol etiolado suponen que hay una modificación de la clorofila y cambios en su orientación (dentro del C.R.) en relación al tilacoide. También se halló que el T.E. no cíclico se presentó cuando los carotenoides transfirieron energía después de que se reorientó y reconstruyó la clorofila de los fotosistemas (34).

En maíz se halló que hay un cambio significativo del radio de las clorofilas (radio de clorofila a/b). Radio que se incrementa (aumenta concentración de clorofila  $\alpha$ ) en cloroplastos de plantas

crecidas en un régimen de luz diurna (Bredbeer, et al., 1974) y por el contrario disminuye (aumenta la concentración de clorofila  $\beta$ ) en etioplastos (19).

La tabla siguiente describe la concentración de clorofila por sección y por plastidio durante el desarrollo del cloroplasto de maíz.

Estado de desarrollo.	Distancia a la base (cm)	Concentración de clf. x secc.		Concentración de clf. x plastidio
		$\mu\text{g.}^{-1}$	$\mu\text{g.}^{-2}$	( $\text{ng} \times 10^{-6}$ ) <sup>-1</sup>
I	0-2	1.6	7.5	44
II	2-4	4.1	8.1	62
III	4-6	11.0	18.4	170

Tabla 1.8. Concentración de clorofila en cloroplastos y plastidios de maíz [1=(4), 2=(10)].

Lo anterior provoca variaciones en la actividad fotosintética de los cloroplastos de maíz en diferentes estados de desarrollo (Leech, 1976) (5), en general aumenta la eficiencia para cosechar luz (19, 24, 33) (aunque la capacidad de T.E., por unidad de clorofila, para el PSI y PSII, de cloroplastos de plantas crecidas en un régimen de luz diurna, disminuye durante el desarrollo a pesar del aumento de la concentración de la clorofila  $a$ ). Lo anterior disminuye el punto de saturación a la luz (que en coco, por el contrario, se incrementó al aumentar la concentración de la clorofila) y es consistente con lo hallado en coco y algodón (Racker y Hardwick, 1972; Dickman, 1971) (19).

También se ha hallado que durante el T.E. cíclico (estado de desarrollo I, sólo con PSI) se produce una separación de cargas en el PSI en maíz (35) y en cebada (24) dando una carga neta negativa en el exterior del tilacoide y se reducen las proteínas ferrosulfuradas ( $\text{FeS}_2$  y  $\text{FeS}_3$ ) y el NADP<sup>+</sup>. Proceso que requiere al menos de cuatro componentes del PSI, los que están involucrados

con algunas enzimas (Gasonov y French, 1973; Brown, 1977; Ikegami, 1976; Satoh y Butler, 1978 y Mullet, et al., 1980) (35).

#### 1.8.7 Lípidos.

Se encontró que en el estado de desarrollo I y II el complemento lipídico y su estructura son una etapa temprana del desarrollo del cloroplasto (18).

Se ha observado que en el desarrollo del tejido de maíz es paralelo al incremento de la concentración de galactolípidos, los que parecen ser los más abundantes durante su desarrollo y hay discrepancia de si la fosfatidil colina (PC) es constante durante el desarrollo (20) o si aumenta (18).

Los GL que se incrementan del estado de desarrollo I al III son: El monogalactosil diglicerido (MGDG), de 4 (18) a 6 veces (20), el digalactosil diglicerido (DGDG), tres veces. Se halló una relación de MGDG:DGDG de 1:1 en el estado de desarrollo I y de 2:1 en el estado de desarrollo III. (18). El fosfatidil glicerol (PG) se ha relacionado con la proliferación de la membrana (18) y se ha asociado con fosfolípidos al incrementarse la clorofila (20).

Los sulfolípidos (SL) se triplican, aumentan el PG (18), los glicolípidos (GL) (20), los lípidos acílicos, el ácido linoléico (18) y los fosfolípidos (20).

Entre los lípidos que disminuyen se hallan: la fosfatidil colina (PC) y el fosfatidil etanol amina (PE) [medido en porcentaje de lípidos totales (18) o por unidad de clorofila (20)]. El ácido A<sup>18</sup> hexadecanoico no se halló en algas azul-verdes por lo que se sugiere que no es esencial para la actividad fotosintética (Leech et al., 1971) (18).

El papel particular de los lípidos de la membrana tilacoidal no es bien conocido pero parece estar correlacionado con el desarrollo de cloroplastos (ver tabla 1.10).

En etiocoroplastos de maíz se han encontrado algunas características similares a las plantas crecidas en luz y otras que son diferentes.

Entre las comunes se ha encontrado que los GL y PG, tienen una proporción similar (18, 32).

Entre las características que los hacen diferir se ha encontrado que en los etioplastos varía la concentración de lípidos acíclicos como en plastidios crecidos en luz.

En los trabajos realizados con etioplastos se ha observado que tienen un gran desarrollo en talla y complejidad antes de ser sometidos a la luz (ver tabla 1.5, página 55) y que la biogénesis de la membrana de coco etiolado y crecido en luz es diferente (5).

Durante el desarrollo de los etiocloroplastos de maíz se ha hallado poca semejanza en el tipo y cantidad entre los diferentes lípidos de la membrana tilacoide. La tabla siguiente describe algunas de las relaciones molares entre dos lípidos (ácidos grasos) durante el desarrollo en plastidios aislados y en cloroplastos de tejido intacto de plantas etioladas de maíz.

Estado de desarrollo	<u>Plastidio aislado</u>		<u>Tejido intacto</u>	
	<u>Relación molar</u>		<u>Relación molar</u>	
	MGDG:DCDG	GL:PL	MGDG:DCDG	GL:PL
I	0.7	0.5	0.4	0.8
II	1.1	2.8	0.9	0.8
III	1.2	4.5	1.1	1.4

Tabla 1.9. Representa la relación molar de dos de los ácidos grasos más abundantes en el etiocloroplasto de maíz durante el desarrollo según Mackender (1978) (32).

En la tabla 1.9 se observa en ambos etiocloroplastos que del estado de desarrollo I al III: Los DCDG disminuyen mientras que los MGDG aumentan hasta una concentración similar. Y que los PL disminuyen mientras los GL aumentan de 4 a 5 veces en plastidios aislados y de 1 a 2 veces en tejido intacto. La diferencia entre los lípidos puede deberse a que durante el aclimamiento de los plastidios se da contaminación con otras membranas.



1.8.3 Tabla general de las características de los cloroplastos de mesófito de maíz durante el desarrollo ontogénico.

Compo nentes.	Estado de desarrollo I	Estado de desarrollo II	Estado de desarrollo III
Cloroplastos.	Proplastidios de 1.5-2.5µm largo, 0.5-2µm ancho(10) o 2.3µm largo (20). 1-2 granas(10), con 2.5(10) o 2-5 lí-luc-granas(20). Con algunos cuerpos prolamelares ausentes en otros organelos(20).	Talla doble de I. cuerpos prolamelares pequeños, 3.2 o 4-6(10) o 2-8 tilac/grana(20). A los 4 cm hay división sincrónica e incrementa producción O <sub>2</sub> (10).	Con mayor talla y complejidad. Clp. mesófito con granas, clp. de vaina agranal. Cuerpo prolamelar pequeño, medio 4µm, corto 2µm(10), 0.5(10) o 5.0(20) mesófilo y 2.2(10) o 3(20) vaina tilacoidal/grana Clp. vaina elongado, con puntas y granas delgadas(10).
Granolita	Proplastidios, con clf a,b(10), clf. tot. 7.5µg. Peso fresco seco. 11. 0mg, peso seco 3. 0mg. Relación peso 13. 4. Relación clf. a/b similar a II y III(10).	Clf. tot. 7.5µg. Peso fresco seco. 43. 0mg. peso seco 2. 0mg. Relación peso 17. 7. Radio clf. a/b similar a I, III(10).	Clf. tot. 20. 3µg. Peso fresco 57. 0mg, peso seco 4. 4mg. Relación peso 13. 3. Radio clf. a/b similar a I y II (10).
Función del cloro-plasto.	No consume CO <sub>2</sub> o no se detecta y hay resistencia a su entrada. Produce poco O <sub>2</sub> en tanto hay resistencia a su difusión. Lo que indica que el CCL es mayor que los CR(10).	Consumo poco CO <sub>2</sub> Racker, 1972). Abajo hem hay T. E. pero no fija CO <sub>2</sub> . Arriba hem produce O <sub>2</sub> unidad clf. Sube clf. b lo que indica que disminuye unidad fotosintética y aumenta la tasa foto-sintética(10).	Aumenta prod. O <sub>2</sub> correlacionada con consumo de CO <sub>2</sub> (Chapman, 1970(10)).
Lípidos	Proplastidios con alta proporción de lípidos en relación a clf (20). Con 25-30% PC en tilacoides, lípidos similares a etioplastos MODO, DODO, SL, sulfati dil. colina, PE, PGO(10). Relación MODO:DODO:SL: P. PC alto, en lame-la 2%(20).	MODO contienen 90 mol% de lípidos y no requiere luz para su síntesis.	Siempre mayor I menos PC, PE (bajari). Sube ac. linoleico en todo lípi-do individual(10). MODO 90 mol% de lípidos sintetizados aun sin luz(12). Relación MODO:DODO:SL: P. Un P. 3 moléculas cl f(20). Ac. palmítico cis en PC, PE y SL. Ac. Δ3(10) xadecanoico en PGO(10). PC en tilacoides 5% de lípidos(20).

continúa tabla 1.10:

Componentes.	Estado de desarrollo I	Estado de desarrollo II	Estado de desarrollo III
Plastoglicobulos.	Presentes contienen lípidos que varían con el desarrollo(22).	Presentes(22)	Presentes con lípidos y al destruirse cloroplastos con carotenoides primarios y secundarios.

continúa tabla 1.10:

Componentes Etiocloroplastos.

Cloroplastos	Diferente patrón de desarrollo de la membrana fotosintética(18). Aumenta talla 2.5 veces de I a III. Aumenta cuerpo prolamelar y lamelas(92). Iguales a cloroplastos de mesófilo de I y diferentes de los de III (92).
Clorofila	Protoclorofila aumentó con la edad(92). Ratio clorofila a/b baja al desarrollarse el etiocloroplasto(aumenta clf. $\beta$ )(19).
Función del cloroplasto.	Confirman que la producción de O <sub>2</sub> en frijol baja al iluminarse indicando aumento del CCL en relación con ChRacker y Butler,1976; Hemingsen y Boardman,1972) (19).
Lípidos	Composición similar a proplastidios(92). Lípidos no plastídicos constantes(92). Porca lípidos antes de 4hs, luego se duplican(Rougman y Boardman,1972). Hay la diferencia de los cloroplastos. No cambia con contracción de ácidos grasos de lípidos acilicos con cloroplastos en los que varían(18). Ac. linoléico el más abundante en todas la etapas(92). Varían MUDD DDD y PDC(similar a clícharo)(18). MUDD, DDD, PG, PI aumentan con la edad (92). OL de avena, etiolada, menor que en maíz. PE bajan con la edad en cloroplastos, en avena aumentan y son similares a cloroplastos de avena de 4hs. SL aumentan en avena no(18). No cambia concentración de ácidos grasos de lípidos acilicos ni en cloroplastos(18). Ac. $\Delta^3$ hexadecanoico en merla (Loomis-Leech et al., 1973) y en etioplastos(Leech et al., 1971) y ausente en membrana del cloroplasto(Mackender y Leech,1974; Nickol y James,1968).
Plastoglicobulos.	Con lipocutinonas y carotenoides primarios y secundarios. Aumentan en número(92). Presentes en avena(36).

Tabla 1.10. Tabla comparativa de las características generales de los cloroplastos de maíz durante el desarrollo ontogénico.

## 1.8. BIOGENESIS DE LA $H^+$ -ATPasa.

La  $H^+$ -ATPasa como parte del tilacoide y de la célula vegetal tiene un desarrollo paralelo a esta, y simultáneamente se sintetizan sus componentes. En la mitocondria, (la citocromo oxidasa), esta formada por dos tipos de polipeptidos, unos muy hidrofóbicos sintetizados en la mitocondria y otros menos hidrofóbicos formados en el citoplasma, como los lípidos catalíticos de la  $F_1$  (Tzagoloff y Meayler, 1972; Schatz y Mabon, 1974) (6). Cabe esperarse que en el cloroplasto se aplique el principio que se da para la mitocondria.

El cloroplasto puede codificar de 100 a 1,000 productos génicos (1) y sintetizan sus propios polipeptidos (Margenthaler y Mendiola, 1976; Ellis, 1977) (30).

Se halló que un gene de *E. coli* (Dawne, Gibson and Cox, 1979; Kazawa et al., 1980) codifica para  $F_1$ - $F_0$  y lo llamaron UNC OPERON (Kazawa et al. proponen llamarlo PAP OPERON).

Del análisis del gene se obtuvo la secuencia de aminoácidos para cada subunidad de  $F_0$  y  $F_1$  (Gay y Walker, 1981; Kazawa et al., 1981a,b, 1982; Mabuchi et al., 1981). También se analizó la secuencia de aminoácidos del gene mutante UNC de *E. coli* con deficiencia de tinción (Kazawa, Saito y Futai, 1978; Kazawa et al., 1980 (7) y de los genes UNC de la mitocondria, cloroplasto y bacteria termófila T-53 (Sebald y Wachter, 1980), encontrando secuencias similares.

Horack y Hill (1971) usaron inhibidores para comprobar que la  $C_F1$  del tilacoide es sintetizada por ribonomas del citoplasma y del cloroplasto (36).

Ellis (1977), Mendiola-Margenthaler, et al. (1976), Bouthyette y Jagendorf (1978) afirman que las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$  se producen en el cloroplasto de espinaca, Gray (comunicación personal) encuentra que la subunidad III de  $C_F0$  también se produce

en cloroplasto y que las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  se producen fuera de éste (Ellis, 1977; Mendiola-Morgenthaler *et al.*, 1976. Bouthyette y Jagendorf, 1978).

Nelson *et al.* (1980) hallaron que las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  de CF<sub>1</sub> y las subunidades I y III se sintetizan en cloroplastos de espinaca. Grebamier *et al.* (1978) creen que parte de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  sintetizadas en cloroplasto no se unen a la CF<sub>0</sub> y Nelson encuentra que las subunidades  $\gamma$  (de CF<sub>1</sub>) y II (de CF<sub>0</sub>) se producen en citoplasma (30).

Nelson *et al.* también suponen que las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  se ensamblan en CF<sub>1</sub> y que la  $\epsilon$  inhibe la síntesis de ATP (Nelson y Racker, 1972; Youmis *et al.*, 1977; Nelson y Karny, 1976) (30).

En etioplastos de avena y de Hordeum se halló CF<sub>1</sub> sobre las lamelas pero no sobre los tilacoides prolamelares y se observó que al enverdecer hay un aumento de la distancia entre las CF<sub>1</sub> de las lamelas (ver tabla 1.11) (36).

Tiempo de iluminación (min).	Avena	Hordeum
0.0	13.0	15.5
0.5	13.1	16.2
1.0	14.7	20.0
2.0	16.3	21.7
4.0	23.5	23.7
8.0	30.5	33.6
16.0	32.6	30.5
72.0	36.4	48.5

Tabla 1.11. Representa las distancias entre las CF<sub>1</sub> de las lamelas de etiocloroplastos de Avena sativa y Hordeum con diferentes tiempos de iluminación.

Wellburn *et al.* (1977), por el contrario encontraron, en avena a las CF<sub>1</sub> concentradas en los cuerpos prolamelares; los que tienen las lamelas interrumpidas o vesiculadas rodeando al cuerpo

prolamelar. También parece que en su interior se encuentran ribosomas, los que se han extraído con 0.6M de EDTA y se han reducido con ribonucleasas (36). Esto parece indicar que las CFi primero se sintetizan sobre las lamelas y luego sobre los tilacoides y que parecen tener un número definido porque al aumentar de talla las lamelas y los tilacoides sólo aumenta la distancia entre las CFi.

En maíz se han determinado algunas de las magnitudes de sus células fotosintéticas de sus cloroplastos y de sus cuerpos tilacoidales (ver punto 1.7, página 54) y a continuación se anotan algunas características descritas para la CFi y otras calculadas a partir de esos datos.

Estado de desarrollo	Talla F0		Talla F1		Dist. /CFi en tiloc. 1, *5	Area CFi (nm) <sup>2</sup> *1	Area CFi (ll(nm) <sup>2</sup> )	Area tot. CFien tilac. (nm) <sup>2</sup> 4*	
	*2		*2					A	B
	Lgo.	An.	Lgo.	An.					
I	8	12.4	12	10	19	346.8	169.00	39	785.7
II	8	12.4	12	10	29.5	346.8	552.25	26	469.7
III	8	12.4	12	10	36.4	346.8	1324.90	86	755.5

continúa tabla 1.12:

Estado de desarrollo	Area tot. sin CFi (nm) <sup>2</sup>		Area por lml (nm) <sup>2</sup>		Area tot. lml (nm) <sup>2</sup>		#CFi/lll. (Area totCF /Area CFi)		#CFi/lamela (Area tot.lml /Area CFi.lml)							
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B						
	I	19	892	27	942	1	000	1	800	240	13	248	114.7	161.6	80	9
II	19	824	45	438	800	2	000	800	16	520	76.9	262.0	96	5	299	
III	95	946	49	817	800	3	200	6560	79	600	250.2	274.9	1912	14	720	

continúa tabla 1.12:

Estado de desarrollo	# CFi por grana		# CFi por plastidio.		# CFi por sección (2 cm).		
	A	B	A	B	A	B	
I	229.4	483.9	46.9	2	174.9	1	652.4x10 <sup>6</sup>
II	152.6	838.4	686.7	13	414.4	4	5410 <sup>10</sup>
III	1251.0	1	374.5	30	034.0	37	980.0
							102.0x10 <sup>10</sup>
							211.10x10 <sup>10</sup>

1=(24).

\*1=Calculada con la fórmula de la elipse  $A=(4\pi/\sqrt{2}) \cdot b \cdot (\sqrt{a^2 + b^2})$ .

\*2=Calculo realizado a partir del complejo F1-FO de mitocondria de higado de rata (7).

\*3=Calculado a partir de  $U_g/\#g/U_L/\#L$  (ver pag 69).

Abreviaturas: tilac.=tilacoide(s), lml.=lamela(s), Lgo.=largo.

An.=Ancho. A=valor mínimo. B=valor máximo. Lg.= largo de granas. #g=# de granas. Ll.= largo de lamelas. #l=# de lamelas.

Tabla 1.12. Características particulares del complejo CF<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> de maiz (ver tabla 1.4 y figura 1.17, páginas 54 y 56).

### 1.0.1 Desarrollo de la función de la H<sup>+</sup>-ATPasa.

Se han enverdecido etiocloroplastos de frijol, avena, Hordeum, y chícharo con luz blanca y luz roja lejana (la que actúa sobre el fitocromo) consiguiendo un desarrollo más lento en el tiempo de maduración de los plastidios, los que tomaremos como ejemplo del posible camino que sigue el desarrollo ontogénico de las funciones del cloroplasto, las que podrian no ser iguales al maiz (36, 41 y 42).

Con luz roja lejana continua y luz roja lejana intermitente y luego continua se formaron tilacoides agranales en frijol (41) y en chícharo [aumentó el número de tilacoides y después el número de granas, las que no fueron necesarias para presentarse la fotosíntesis y la fotofosforilación (42)] y se presentó un desarrollo ontogénico equivalente al que se dió con luz blanca (41).

Durante la maduración del etiocloroplasto se pudo observar:

- Que con luz roja lejana el etiocloroplasto de frijol madura 10 veces más lentamente que con luz blanca, que sus actividades fotosintéticas son máximas a 1/3 (con luz roja lejana) y a 1/10 (con luz blanca) y luego decae la actividad a la mitad del tiempo de maduración (con luz roja lejana y blanca).

- Que primero el PSI presentó actividad de transporte de electrones y luego el PSII. El aumento en la producción de oxígeno [que requirió de tilacoide pero no de grana en frijol (41) y en chicharo (42)] se dió cuando entró en función el PSII y se presentó un incremento de la concentración de clorofila [cuando el frijol contenía aproximadamente el 50% de la clorofila total del cloroplasto maduro (41)].

Se piensa que los fotosistemas se completan con la unión de  $\text{NADP}^+$  (4). Se halló que hay una fotoreducción del  $\text{NADP}^+$  en tejido intacto y plastidios aislados (Bradbeer, et al., 1969) y en cebada etiolada (Hung, et al., 1970), la que ocurrió antes de la fotofosforilación cíclica y cuando se presentó la acíclica se notó una disminución de los radios ATP-NADPH. Lo que puede indicar que durante el aislamiento se inactiva la fotoreducción del  $\text{NADP}^+$  o se daña al PSII (que es más frágil que el PSI) a nivel del complejo Z (en el manejo del agua) por efecto de los amortiguadores del medio de aislamiento de los plastidios (Yashita y Buttler, 1968), por agentes caotrópicos (Lozier et al., 1971), por calor (Kato y Pietro, 1962; Yamashita y Buttler, 1968), por la edad o por la falta de un componente soluble necesario para la reducción del  $\text{NADP}^+$  (41).

- Que cuando se iluminó con luz intermitente a los etiocloroplastos de chicharo, todas las actividades fotosintéticas fueron al menos del doble que las iluminadas con luz intermitente y luego continua y que al aumentar la intensidad luminosa sobre ambos fotosistemas o sólo sobre el PSI se tuvo una respuesta similar. No se ha respondido porque al iluminar con luz de baja intensidad hay un alto requerimiento cuántico ya que los etiocloroplastos agranales no parecen ser deficientes en T.E., no parece desactivarse a las clorofilas y no se manifiesta deficiencia cuántica.

Se piensa que con la acción de los dos fotosistemas se hace una distribución de la carga cuántica para alcanzar la máxima

velocidad de T.E. y que la entrada en función del PSII ayuda a distribuir la carga al mismo tiempo que podría regular el T.E. y darse una disminución de la talla fotosintética por la falta de un par o un grupo de unidades que interactúan durante el T.E. (42).

- Que hay fotofosforilación cíclica (sólo con PSI) y después no cíclica (con PSI y PSII) (41 y 42), que en etiocloroplastos de frijol en obscuridad se incrementó rápidamente al iluminarlos y luego decayó bruscamente (41).

Con el uso de DCMU y CCCP para inhibir la fotosíntesis y fotofosforilación, el primero sólo tuvo efecto cuando entró en función el PSII (parece que inhibe la fotorrespiración) y con el CCCP se inhibió a las funciones durante el desarrollo y sólo el plastidio maduro presentó resistencia al inhibidor en la fotosíntesis (41).

- Que se presentó actividad ATPasa en Hordeum y avena cuando fueron iluminados con luz blanca (Gregory y Brandbeer, 1975), con el doble de actividad en tilacoide que de lamela (medido por la producción de fosfato/10<sup>11</sup> plastidios·hr el que fue más confiable que el medido por mg cif·hr), aunque tuvieron igual número de CF<sub>1</sub> pero mayor número de tilacoides. Después la actividad ATPasa decayó en etioplastos pero no en cloroplastos crecidos en un régimen de luz diurna. Hallaron también que hay CF<sub>1</sub> en todas las etapas de desarrollo independientemente del estímulo de la luz, la que provoca el aumento de la talla de las lamelas y los tilacoides, el aumento de la distancia entre las CF<sub>1</sub> y la formación de granas (36).



## II

### 2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

#### 2.1 HIPOTESIS DE TRABAJO.

"Si hay un desarrollo lineal secuencial anatómico y fisiológico durante la ontogenia del cloroplasto de mesófilo de maíz (Zea mays L.) var. Tuxpeño, entonces la actividad de la enzima ATPasa será diferente para cada estado de desarrollo".

#### 2.2 OBJETIVOS.

##### 2.2.1 Objetivo principal.

Conocer la actividad ATPasa durante el desarrollo ontogénico del cloroplasto de mesófilo de maíz (Zea mays L.) var. Tuxpeño.

##### 2.2.2 Objetivos secundarios.

a) Conocer la actividad de la enzima ATPasa, tratada con metanol, del cloroplasto de mesófilo de maíz en tres estados de desarrollo ontogénico.

b) Conocer la actividad de síntesis de ATP del cloroplasto de mesófilo de maíz en tres estados de desarrollo ontogénico.

c) Conocer la velocidad de transporte de electrones del cloroplasto de mesófilo de maíz en tres estados de desarrollo ontogénico.

d) Conocer las características anatómicas de la hoja, del parenquima clorofílico y de los cloroplastos de maíz en tres estados de desarrollo ontogénico.

e) Comparar la actividad de la enzima ATPasa, tratada con metanol, con las actividades de ATPasa tratada con luz y bomba de protones de plantas desarrolladas en regímenes de luz diurna y en plantas etioladas.

### III

#### 3 MATERIALES Y METODOS.

##### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se sembraron 64 semillas de maíz var. Tuxpeño (cortesía del Dr. Edmeades del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT), a dos cm de profundidad, en una charola de 27x27x13 cm, dentro de una mezcla de tierra de 7 cm de profundidad, preparada con una parte de tierra de hoja por una de tierra negra y se regaron con agua corriente cada tercer día.

Las plantas crecieron dentro de un laboratorio a una temperatura mínima diaria de 10 a 14°C, una máxima de 25 a 30°C y un fotoperiodo de 12 hr.

Se cosecharon la segunda y tercera hojas de plántulas de aproximadamente 15 días de edad. Se cortaron las hojas cada dos centímetros de la base a la punta. Al primer corte se le denominó región I, que correspondió al estado de desarrollo ontogénico I del cloroplasto (proplastidio), al segundo corte, región II, que correspondió al estado de desarrollo ontogénico II (cloroplasto intermedio), y al tercer corte, región III, que correspondió al estado de desarrollo ontogénico III (cloroplasto maduro) y las regiones combinadas, que correspondieron a los tres estados de desarrollo ontogénico combinados.

De cada 30gr de hojas cosechadas por charola se obtuvo aproximadamente 10gr de cada región.

##### 3.2 PREPARACION DE CLOROPLASTOS PARA ACTIVAR LA $H^+$ -ATPasa.

###### 3.2.1 Obtención de cloroplastos de mesófilo.

Las hojas cosechadas se lavaron con agua corriente y luego con agua bidestilada.

Cada sección de hoja se cortó finamente (1 a 2 mm) y se dejaron caer los cortes en 40 ml de medio de aislamiento a 4°C.

Se probaron tres medios de aislamiento y resuspensión: A, B y C, para conocer con cual se obtenían cloroplastos acoplados con H<sup>+</sup>-ATPasa activa.

Reactivo	Medios de aislamiento.		
	A	B	C
Sacarosa	-	0.5M	-
Sorbitol o manitol	0.33M	-	-
Tris-KOH pH7.8	0.05M	-	-
Tricina KOH pH7.8	-	0.02M	0.03M
MgCl <sub>2</sub>	0.005M	0.005M	0.003M
KCl	-	0.010M	-
NaCl	-	-	0.3M
Acido Etilendiamino tetrácetico (EDTA)	-	-	0.0005M
Albumina de suero bovino desengrasada (BSA)	0.1%	0.2%	-
Polivinil pirrolidona (PVP)	-	0.1%	-
Mercaptoetanol	0.1mM	-	-

Reactivo	Medios de resuspensión.		
	A	B	C
Igual al aislamiento	Igual	Igual excep to PVP	Igual

Tabla 3.1 Medios de aislamiento y resuspensión probados para cloroplastos de maíz.

El proceso se realizó a 4°C. Se molieron las secciones cortadas, aproximadamente 5 segundos en una licuadora Waring Comercial Blendor de dos velocidades, a velocidad máxima. Se filtró el homogeneizado a través de 8 capas de gasa en tubos de centrifuga. Se centrifugó a 2 140xg por 10 min a 4°C en una centrifuga Sorvall

SS-3 Automática. Se descartó el sobrenadante, se adicionó medio de resuspensión a la pastilla y se resuspendió la preparación de los cloroplastos por medio de un pincel.

### 3.3 TECNICAS ANALITICAS.

#### 3.3.1 Determinación de la concentración de clorofila.

##### 3.3.1.1 Fundamento para la determinación de la concentración de clorofila.

El cloroplasto presenta dos tipos de clorofila, la a y la b. Cada tipo de clorofila presenta un espectro de absorción diferente (Verno, 1966) y el cálculo de concentración de clorofila se hace en el punto isoabsortivo, donde se interceptan los dos espectros (Arnon, 1949). El valor del coeficiente específico de absorción de este punto es de 34.5 a una longitud de onda de 652 nm, por lo que la concentración de clorofila en mg/ml en la dilución es de:

$$C(\text{mg/ml}) = D.O. 652\text{nm}/34.5$$

##### 3.3.1.2. Método para la determinación de la concentración de clorofila.

Se toma una alícuota de 0.05 ml de la muestra y se lleva a 10ml con acetona acuosa al 80%. Se filtra el extracto a través de papel filtro Watman # 1 y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 652 nm.

La concentración de clorofila total en la muestra es de:

$$C(\text{mg/ml}) = D.O. 652\text{nm}(5.793)$$

La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Beckman Modelo 35. El factor (5.793) es una constante para las condiciones experimentales que se establecen.

### 3.3.2 Determinación de fosfato.

#### 3.3.2.1 Fundamento para la determinación de fosfato.

Para determinar la concentración de fosfato de una muestra problema con espectrofotometría se requiere que el fosfato este unido a uno o más compuestos que le confieran una coloración que se pueda registrar.

Mediante la formación de un complejo de fosfato y heptamolibdato reducido en un medio ácido con  $\text{FeSO}_4$ , se desarrolla una coloración azul en proporción directa a la concentración de fosfato en la muestra y se puede medir su absorbancia con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.

Para calcular la concentración de fosfato en una muestra nos basamos en el valor de la tangente de una curva estandar de fosfato.

Con el valor de la curva estandar de fosfato, el valor de absorbancia de cada muestra problema y la fórmula:

$$\text{Abs. } 660 \text{ nm} = (m) (\text{concentración de fosfato})$$

podemos conocer la concentración de fosfato de cada muestra problema:

$$\text{Concentración de fosfato } (\mu\text{M}) = \text{Abs } 660 \text{ nm}/m$$

donde  $m$  es el valor de la pendiente de la curva estándar de fosfato.

En una reacción de activación de la ATPasa se libera una molécula de fosfato por cada molécula de ATP hidrolizada.

Para conocer la concentración de fosfato de una muestra se desarrolla la coloración y se lee su absorbancia con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.

La cantidad de fosfato de una muestra, en la que se activó la ATPasa, depende de la cantidad de cloroplastos y del tiempo de activación y se calcula con la siguiente igualdad:

$$\text{Producción de fosfato } \left( \frac{\mu\text{Mol PO}_4}{\text{mg cif. hr}} \right) = \frac{\text{Abs } 660\text{nm}}{m} \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{\text{cif}} \cdot 60\text{min}$$

Donde m=Pendiente de la curva estandar y t=Tiempo de activación.

### 3.3.3 Determinación del fosfato producido durante la activación de la ATPasa. (Sumner, 1944).

Después de centrifugar las muestras de la ATPasa activada se descarto la pastilla y se llevó al sobrenadante a 3.2 ml con agua bidestilada. Se le añadió 0.5 ml de heptamolibdato de amonio al 6.6% (P/V) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7.5 N [0.8% (P/V) NH<sub>4</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>14</sub> en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.9 N] y se agitó. Después se adicionó 0.4 ml de FeSO<sub>4</sub> al 1% (P/V) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.001 N [0.1% (P/V) FeSO<sub>4</sub> en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.001 N] y se agitó de nuevo. Al mismo tiempo se hizo una curva estandar de fosfato con 0, 0.2 y 0.5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se dejó desarrollar 10min el color para las muestras de activación de la ATPasa y las de la curva estandar y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro Beckman Modelo 35.

### 3.3.4 Efecto del metanol en la determinación de fosfato.

Esta prueba se hizo para conocer el efecto del metanol en la determinación de fosfato por el método de Sumner (1944). Se probaron concentraciones crecientes de metanol (0, 20, 40, 60 y 75%) y de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0, 0.4, 0.6 y 0.8 mM). Se adicionó el metanol y el KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en un ml de medio de reacción que contenía medio de activación de ATPasa (descrito en el punto 3.4.1.2). Se paró la reacción con la adición de 0.3 ml de TCA al 30% a 4°C y se llevó la muestra a 3.2 ml con agua bidestilada. La determinación de fosfato se hizo de acuerdo al método de Sumner (1944) (descrito en el punto 3.3.3).

### 3.3.5 Efecto del metanol en la hidrólisis de ATP.

Esta prueba se hizo para conocer el efecto del metanol en la hidrólisis de ATP sin la muestra biológica.

Se adicionaron concentraciones crecientes de metanol (0, 15, 30, 45, 60 y 80%) a dos concentraciones de ATP (0.3 y 0.5 M) en un ml de medio de reacción y se dejó reaccionar un minuto. Se paró la reacción con la adición de 0.3 ml de TCA al 30% a 4°C y se llevó la muestra a 3.2 ml con agua bidestilada. La determinación de fosfato se hizo de acuerdo al método de Sumner (descrito en el punto 3.3.3).

### 3.4 Medición de la actividad de la ATPasa.

3.4.1 Técnica de activación de la ATPasa tratada con metanol. (Anthon, G.E. Jagendorf, A.T., 1983).

3.4.1.1 Fundamento de la activación de la ATPasa tratada con metanol (Anthon, 1983).

Se ha reportado recientemente que los solventes orgánicos elevan la actividad de la ATPasa de CF<sub>1</sub> solubilizada (Trinfert, 1981; Selma-Reiner, *et al.*, 1981; Sakurai, *et al.*, 1982). En particular el metanol eleva la actividad de la ATPasa en la CF<sub>1</sub> de cloroplastos de espinaca en un factor de 50 (Sakurai, 1981) (43).

Anthon y Jagendorf (1983) encontraron que activando la ATPasa en membranas de tilacoides de espinaca se tenía de 40 a 50 veces más actividad (400  $\mu$ Mol PO<sub>4</sub>/mg clf.hr con un óptimo de 33% de metanol y 2 min de activación (43). Con más tiempo (3 min) disminuyó la activación, probablemente por desnaturalización de la enzima. Con concentraciones mayores a 35% de metanol, parece que la H<sup>+</sup>-ATPasa se desnaturaliza en pocos segundos (43).

El metanol según Anthon y Jagendorf (1983) no activa a la enzima por un cambio en la K<sub>m</sub>, sino por un incremento de la

velocidad máxima, de aproximadamente 15  $\mu\text{Mol/mg clif.hr}$  sin metanol a 600  $\mu\text{Mol/mg clif.hr}$  con 35% de metanol. La activación con metanol es reversible en cloroplastos de espinaca. Por lo que el metanol no causa una activación o inactivación permanente de la CF<sub>1</sub> ligada a tilacoides y no causa solubilización y pérdida de la enzima durante el tratamiento experimental (43).

A continuación se anotan algunos cuidados que se pueden tomar en cuenta para obtener una buena actividad ATPasa.

- Utilizar medios de aislamiento y resuspensión previamente probados (12-15).

- Aislar a los cloroplastos a una temperatura cercana a los 4°C (12-15) y evitar temperaturas cercanas a 0°C o menores (17).

- Aislar en un rango de pH de 7.0-8.0 (17) ya que aislando a pHs bajos (pH6) los cloroplastos de chícharo, espinaca y frijol sufren daños: a) cambios en la composición y estructura del cloroplasto; en frijol se pierde de 40-50% de sus lípidos no clorofílicos. b) se pierde las propiedades osmóticas en el cloroplasto de frijol y espinaca. c) se pierde la actividad fotorreductora del ferrocianuro, DCPIP y de la síntesis de ATP (16).

- Aislar en oscuridad a los cloroplastos empleando agentes químicos que absorban ácidos grasos que degradan al cloroplasto. Debido a que en la oscuridad las galactolipasas producen ácidos grasos libres, ya que los que se acumulan en la membrana del cloroplasto viejo y lo hacen estallar; desacoplando e inhibiendo el T.E.. También se les ha asociado a productos de degradación de clorofila en cloroplastos iluminados y se piensa que producen fotoinhibición (17).

Se recomienda el uso de albúmina de suero bovino desengrasada (BSA, 50 mg/ml clif), celulosa polietilenoimida, Biomeash SM<sub>2</sub>, Ficoll 400 (4%, 1/V) y ovalalbomina (17).



- Utilizar sustancias que mantengan al cloroplasto activo como el clorhidrato de colina y el aminoalcohol (17).

- Mantener en lo posible una baja concentración de clorofila y en obscuridad, que aunque no afecta la estabilidad del cloroplasto puede aumentarla por la baja producción de ácidos grasos.

#### 3.4.1.2 Método de activación de la ATPasa tratada con metanol.

Se montó un dispositivo con una cámara de reacción, un baño de temperatura a 18°C y un agitador. La cámara se mantuvo en obscuridad.

En cada ensayo se adicionó un ml de medio de reacción que contenía medio de activación de ATPasa con las siguientes concentraciones finales: 0.5 M sacarosa, 25 mM NaCl, 25 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM Tricina-KOH pH 8.0, además 5 mM ATP y 20% de metanol (diferente cantidad al reportado por Anthon et al. de 33% en espinaca). Se disparó la reacción con la adición de cloroplastos de cada región y de las regiones combinadas, equivalentes a 25 µg de clorofila y se activó por 4 min. Se paró la reacción con la adición de 0.3 ml de TCA al 30% a 4°C. Se centrifugó a 500 xg por 20 min a 4°C en una centrifuga Internacional 2K. La determinación de fosfato se hizo como se describió en el punto 3.3.3.

#### 3.4.2 Determinación de la concentración de metanol para la activación de la ATPasa.

Esta prueba se hizo para conocer la concentración de metanol que diera la mayor activación de la ATPasa del cloroplasto de maíz.

Se adicionó un ml de medio de reacción que contenía medio de reacción de ATPasa (descrito en el punto 3.4.1.2), 5 mM ATP, cloroplastos de las regiones combinadas equivalentes a 10 µg de clorofila y concentraciones crecientes de metanol (0, 15, 30, 45

60 y 80%). Se paró la reacción y se determinó el fosfato liberado al medio por la reacción como se describió en el punto 3.4.1.2.

Se hizo otra prueba con cloroplastos equivalentes a 40  $\mu\text{g}$  y concentraciones de metanol de 0, 15, 20, 25, 30 y 45% en las mismas condiciones.

#### 3.4.3 Tiempo de activación de la ATPasa tratada con metanol.

Esta prueba se hizo para conocer el tiempo que diera la mayor activación de la ATPasa del cloroplasto de maíz.

Se adicionó un ml de medio de reacción que contenía medio de activación de ATPasa (descrito en el punto 3.4.1.2), 5 mM ATP, cloroplastos de todas las regiones, equivalentes a 25  $\mu\text{g}$  de clorofila y 20% de metanol. Se probaron tiempos de activación de 0, 1, 2, 3 y 4 minutos. El fosfato liberado al medio de reacción se midió como se describió en el punto 3.4.1.2.

#### 3.4.4 Cantidad de cloroplastos para activar la ATPasa.

Esta prueba se hizo para conocer la cantidad de cloroplastos que diera la mayor activación de dicha ATPasa.

Se adicionó un ml de medio de reacción que contenía medio de activación de ATPasa (descrito en el punto 3.4.1.2), 5 mM ATP y 20% de metanol. Se activó por 4 min y se probó cantidades crecientes de cloroplastos equivalentes a 0, 10, 25, 40, 50 y 75  $\mu\text{g}$  de clorofila. El fosfato liberado por la reacción se midió como se menciona en el punto 3.4.1.2.

(Se hizo otra prueba con cloroplastos equivalentes a 0, 15, 25, 35 y 50  $\mu\text{g}$  de clorofila en las mismas condiciones).

### 3.4.5 Medición de la actividad de la ATPasa tratada con metanol.

Esta prueba se hizo para conocer los valores de actividad de cloroplastos de los estados de desarrollo ontogénico I, II y III (regiones de la hoja I, II y III respectivamente) y de los tres estados combinados (regiones combinadas).

Se adicionó un ml de medio de reacción que contenía medio de activación de ATPasa (descrito en el punto 3.4.1.2), 5 mM ATP, 20% de metanol y cloroplastos de cada región de la hoja y regiones combinadas, equivalentes a 25  $\mu$ g de clorofila y se activó por 4 min. Se paró la reacción y se determinó el fosfato liberado al medio por la reacción como se describió en el punto 3.4.1.2.

## 3.5 MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE SINTESIS DE ATP.

### 3.5.1 Fundamento de la medición de la actividad de síntesis de ATP.

El ADP y ATP son ácidos relativamente fuertes y disocian 3 y 4 protones, respectivamente, de sus grupos fosfato (Lehninger, 1975). El último protón que pierde el ADP es el menos ácido del fosfato  $\beta$  con pK<sub>a</sub> de 6.26 a 25°C (Alberty, 1951 Smith, 1956). El pK<sub>a</sub> correspondiente del complejo ADP-Mg es de 5.13 (Nishimura, 1962). En el ATP el último protón donado es el del fosfato terminal con un pK<sub>a</sub> de 6.48 a 25°C (Alberty, 1951 1956). El pK<sub>a</sub> para el complejo ATP-Mg es de 4.97 (Nishimura, 1962d). Las constantes de disociación ácida del fosfato son  $7.1 \times 10^{-3}$ ,  $6.3 \times 10^{-8}$  y  $4.4 \times 10^{-13}$  (Snayder, 1971). Los valores de disociación de los complejos ATP-K<sup>+</sup> y RuDP<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son altos por lo que la formación de estos complejos en solución es relativamente baja (Shikama, 1973).

Conociendo los pK<sub>a</sub> podemos calcular la carga neta para el ATP, ADP y fosfato y sus complejos metálicos en función del pH (Alberty, 1951).

Se sabe que durante la síntesis de ATP, se consume un número de protones  $\text{H}^+$ , el cual depende de la carga neta que presenten el ATP, ADP y fosfato, así como los complejos de estas especies químicas con los iones divalentes (Smith, 1956 Von, 1956). Si sabemos que la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  en nuestras condiciones experimentales oscila entre 5 y 15mM, la del  $\text{K}^+$  entre 0.1 y 0.25M y el pH en el rango que queremos experimentar está entre 6.5 y 8.5 entonces podemos determinar el valor de  $\text{H}^+$ .

En los resultados de Alberty (1968) para  $\text{pMg}=2$ ,  $\text{H}^+$  fue de 0.6 para pH 7, 0.8 para pH 7.5 y 0.95 para pH 8. Además para pH 8,  $\text{H}^+=1$  en un rango de  $\text{pMg}^{2+}$  de 2 a 7.

Nishimura y Chance (1962) observaron que el número de protones consumidos por ATP sintetizado era aproximadamente igual para el caso de complejos metálicos, en un medio de fuerza iónica de 0.2 y pH mayor a 7.

Basados en lo anterior Nishimura y Chance diseñaron un método donde la fotofosforilación se mide indirectamente calculando la variación de la concentración de protones en el medio por unidad de tiempo.

### 3.5.2 Método de medición de la actividad de síntesis de ATP.

Se utilizó un dispositivo con un monitor de pH a 20°C (Cornig Modelo 12) conectado a un electrodo de alta sensibilidad (Thomas AIT Co Ph la 0-75°C) y a una graficadora (Honeywell). Al lado de la cámara se colocó una lámpara de proyector Kodak de  $I=400\text{W/m}^2$  y un filtro de agua con  $\text{CuSO}_4$  al 2%.

Se usó medio de reacción que contenía las siguientes concentraciones finales: 100mM KCl, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM Tricina-KOH pH7.6, además 5mM Metil Viológeno (M.V.). El volumen de reacción fue de 3 ml, se ajustó a pH 8.0 en la escala normal del potenciómetro de pH en oscuridad. Se adicionaron cloroplastos

equivalentes a 50  $\mu\text{g}$  de clorofila por ml y se reajustó a pH 8.0 en la escala expandida del potenciómetro de pH con soluciones diluidas de KOH y HCl.

Se encendió el graficador, se iluminó la cámara de reacción y se registró el cambio de pH en la escala expandida de 2 a 3 minutos.

### 3.6 MEDICION DE LA VELOCIDAD DE TRANSPORTE DE ELECTRONES.

#### 3.6.1 Fundamento de la medición de la velocidad del transporte de electrones (T.E.).

Se midió la cantidad de oxígeno en la cámara de reacción con un monitor YSI Modelo 53, que se conectó a dos electrodos de Clark (Yellow Springs Instruments, 1973). Un electrodo, de platino, funciona como cátodo, donde el oxígeno es reducido por la reacción:



El otro electrodo, de plata, funciona como ánodo, donde ocurre la reacción:



Los electrodos están cubiertos por una membrana permeable al oxígeno (Callowick, 1972) y es impermeable al metil viológeno (M.V.). El monitor tiene como electrólito base al KCl. El flujo de corriente resultante de las celdas electrolíticas es proporcional a la concentración de oxígeno en la muestra.

#### 3.6.2 Método de medición de la velocidad de transporte de electrones.

Se utilizó un dispositivo que consta de un monitor de oxígeno

YSI Modelo 53 con electrodos del sistema de Clark, con una cámara de transporte de electrones conectada a un baño de temperatura a 30°C, con agitación. La cámara se iluminó con una lámpara de proyector Kodak con luz de  $I=400 \text{ W/m}^2$ . El monitor de oxígeno se conectó a una graficadora LKB Bromma 2210 la que registró las variaciones de corriente a 100 mV corriendo el papel en mm/min.

Se calentó el baño de temperatura a 30°C, se encendió el monitor de oxígeno y la graficadora. Se calibró el monitor de oxígeno a 50% de saturación de oxígeno con agua bidestilada. Se lavó la cámara y el electrodo con agua bidestilada. Se adicionó medio de reacción el que contenía las siguientes concentraciones finales: 0.1 M sacarosa, 40 mM Tricina-NaOH pH8, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.6 mM  $\text{KFe(CN)}_6$  y cloroplastos equivalentes a 50  $\mu\text{g}$  de clorofila. El volumen de reacción fue de 3 ml. Se introdujo el portaelectrodos y se giró para eliminar las burbujas de aire.

Se inició el registro de oxígeno iluminando la cámara de transporte. Después de 2 minutos se desacopló a los cloroplastos con 6  $\mu\text{M}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se marcó la adición en la gráfica.

Cuando se midió el transporte de electrones durante la síntesis de ATP se añadió 1.2mM ADP y  $\text{KHz}_2\text{P}_4$ , ambos a pH8, se marcó la adición en la gráfica y después de 2 minutos se desacopló con la adición de 6  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

### 3.7 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA PARA LA TOMA DE MICROGRAFÍAS.

3.7.1 Técnica de preparación de cortes de hoja para observarlos con microscopio de campo claro (Parra, G., 1985).

Se cortó, transversalmente con navaja, aproximadamente un milímetro de cada región de la hoja y se sumergieron los cortes por 2 horas en una solución fijadora que contenía 3% glutaraldehído, 0.1M amortiguador de fosfatos pH 7.2 a 4°C. Se

sacaron los cortes y se lavaron 5 veces por 15 minutos, sumergiéndolos en un medio de lavado que contenía: 0.25mM sacarosa, 0.1M amortiguador de fosfatos pH 7.2 a pH 7.4 y se les dejó sumergidos por 12 horas a 4°C.

Se sacaron los cortes y se postfijaron dos horas en una solución que contenía: 2% OsO<sub>4</sub> y 0.1M amortiguador de fosfatos pH 7.2 a 4°C. Luego se lavaron los cortes como se mencionó antes, se deshidrataron sumergiéndolos por 10 minutos en etanol, pasándolos de 30 a 100% (V/V), de 10% en 10% y luego por 15 minutos en propileno al 100%.

Después se incluyeron los cortes por 24 horas en una solución de OP:Epon (1:1) dentro de un desecador, y ya secos se introdujeron en cápsulas de Epon al 100% y se dejó polimerizar la resina por 6 horas a 60°C en una estufa.

Después se hicieron cortes finos de las inclusiones con un microtomo Reichert UM03 y se tiñieron las preparaciones con la técnica para hematoxilina-eosina.

Finalmente se fotografiaron los cortes con un microscopio de campo claro Lunz Leitz.

### 3.7.2 Técnica de preparación de cloroplastos aislados para observarlos con microscopio electrónico (Parra, G., 1995).

Se fijaron y lavaron pequeñas alícuotas de las muestras de cloroplastos aislados de cada región de la hoja como se describió en el punto 3.7.1.

Se postfijaron las alícuotas con el amortiguador de fosfatos a pH 7.4, se sacaron las muestras y se lavaron como se describió en el punto 3.7.1. Después se deshidrataron cubriéndolas, por 10 minutos, con etanol, pasándolas de 30 a 100% (V/V) de 10% en 10% y luego, con una solución que contenía propileno:etanol (1:1) y éxido de propileno al 100%. Después se incluyeron como se describió en el punto 3.7.1.

Se tiñeron las muestras, por 30 minutos a temperatura

ambiente, con una solución al 2% de acetato de uranio con pH de 4 a 5 y luego, por 10 minutos, en una solución al 2% de citrato de plomo.

Finalmente se fotografiaron las preparaciones que se observaron en un microscopio electrónico JEOL/100B a 50KV y 50 $\mu$  de ajuste en el condensador.

#### IV

#### 4 RESULTADOS.

##### 4.1 OBTENCION DE CLOROPLASTOS DE MESOFILO DE MAIZ.

Se probaron tres medios de aislamiento y resuspensión de cloroplastos. El grado de acoplamiento de los cloroplastos se evaluó con la actividad de la bomba de protones.

Los resultados muestran que con el medio de aislamiento y resuspensión B se obtuvieron cloroplastos de mesófilo de maíz tipo II acoplados y activos el tiempo suficiente para realizar las pruebas experimentales (de 4 a 5 horas).

El medio de aislamiento B contenía las siguientes concentraciones finales: 0.5M sacarosa, 20mM Tricina-KOH pH 7.8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.2% BSA y 0.1% PVP.

El medio de resuspensión contenía las siguientes concentraciones finales: 0.5 M sacarosa, 20 mM Tricina-KOH pH 7.8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl y 0.2% BSA.

##### 4.2 CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE FOSFATO.

Se hizo una curva estandar para la determinación de fosfato. El medio de reacción contenía medio de activación de ATPasa (descrito en el punto 3.4.1.2) y concentraciones crecientes de fosfato (0.0 a 1.0 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

La tabla y figura 4.1 muestran los valores de absorbancia para cada concentración de fosfato adicionada.



Concentración de fosfato adicionada (mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).	Absorbancia (660nm)
0.0	0.000
0.2	0.083
0.4	0.251
0.6	0.352
0.8	0.429
1.0	0.548

Tabla 4.1 Curva estandar para la determinación de fosfato.

Se adiciónó de 0.0 a 1.0mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Las condiciones de reacción son las descritas en la figura 4.1.

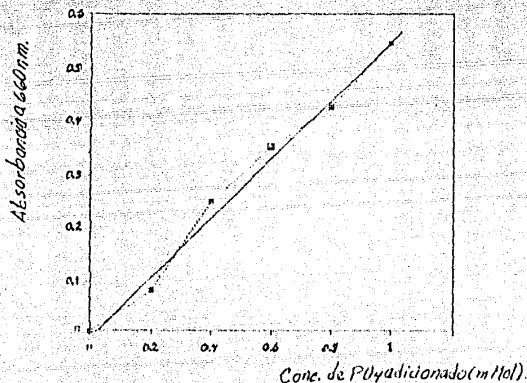


Figura 4.1 Curva estandar para la determinación de fosfato.

Se adiciónó de 0.0 a 1.0mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en un medio de reacción que contenía medio de activación de ATPasa (descrito en el punto 3.3.4). Se paró la reacción y se determinó el fosfato como se describió en el punto 3.4.1.2.

La tasa de variación (pendiente de la curva) fue de  $m=0.553$ . Con el valor de la pendiente encontrada se calculó la cantidad de fosfato en los ensayos de activación de ATPasa.

#### 4.3 EFECTO DEL METANOL EN LA DETERMINACION DE FOSFATO.

Se probaron concentraciones crecientes de metanol (de 0 a 75%)

y de fosfato (de 0 a 0.8mMol).

La tabla y figura 4.2 muestran los valores de absorbancia para diferentes cantidades de fosfato y metanol adicionadas.

Metanol (%)	Concentración de fosfato(mM $KH_2PO_4$ )	Absorbancia (660nm).
20	0.0	0.000
40	0.0	0.000
60	0.0	0.000
75	0.0	0.000
20	0.4	0.343
40	0.4	0.350
60	0.4	0.404
75	0.4	0.418
20	0.6	0.503
40	0.6	0.490
60	0.6	0.551
75	0.6	0.578
20	0.8	0.605
40	0.8	0.613
60	0.8	0.654
75	0.8	0.707

Tabla 4.2 Efecto del metanol en la determinación de fosfato.

Se adicionó concentraciones crecientes de fosfato (0 a 0.8 mM  $KH_2PO_4$ ) y de metanol (0 a 75%). Las condiciones de ensayo son las descritas en la figura 4.2.

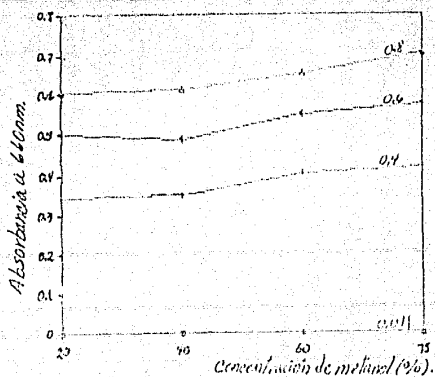


Figura 4.2 Efecto del metanol en la determinación de fosfato.

Se adicionaron concentraciones crecientes de metanol (0 a 75%) y de fosfato (0 a 0.8 mM  $KH_2PO_4$ ) en un mililitro de medio de reacción que contenía medio de activación de ATPasa (descrito en el punto 3.4.1.2). Se paró la reacción y se determinó el fosfato como se describió en el punto 3.4.1.2.

Se observa que entre 20 y 40% de metanol final en el volumen para determinar Pi hay poca diferencia de absorbancia debida a fosfato. Arriba de 40% de metanol hay una pequeña variación de la absorbancia. En el rango de 20 a 40% de metanol los valores de absorbancia debidos a fosfato no son alteradas por el metanol. En el caso de la determinación de fosfato, la concentración final de metanol en el volumen final para ésta determinación, nunca excedió al 25%.

#### 4.4 EFECTO DEL METANOL EN LA HIDROLISI DE ATP.

Se probaron concentraciones crecientes de metanol con dos concentraciones de ATP.

La tabla y figura 4.3 muestran la cantidad de fosfato hidrolizado del ATP en ausencia de muestra biológica.

Metanol (%).	Concentración de ATP (M).	Fosfato hidrolizado ( $\mu$ Mol Pi/hr).
00	0.3	0.0
15	0.3	0.0
30	0.3	0.0
45	0.3	0.0
60	0.3	3.3
80	0.3	0.0
00	0.5	0.0
15	0.5	0.0
30	0.5	0.0
45	0.5	0.0
60	0.5	0.0
80	0.5	0.0

Tabla 4.3. Efecto del metanol en la hidrólisis de ATP.

Se adicionaron concentraciones crecientes de metanol (0 a 80%)

en un medio de reacción con dos concentraciones de ATP (0.3 y 0.5M). Las condiciones de ensayo son las descritas en la figura 4.3.

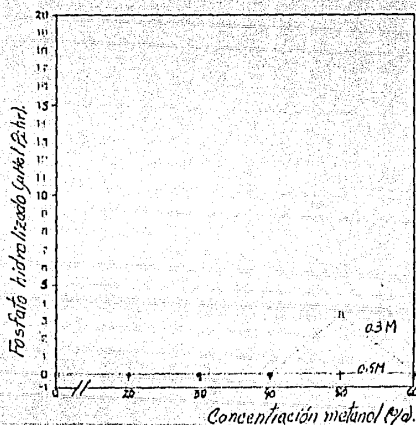


Figura 4.3 Efecto del metanol en la hidrólisis de ATP.

Se adicionaron concentraciones crecientes de metanol (0 a 80%) en un mililitro de medio de reacción con dos concentraciones de ATP (0.3 y 0.5 M), se dejó reaccionar un minuto. Se paró la reacción y se determinó el fosfato como se describió en el punto 3.4.1.2.

Los resultados muestran que no hubo hidrólisis de ATP al adicionar concentraciones crecientes de metanol.

#### 4.5 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE METANOL PARA ACTIVAR LA ATPasa DE CLOROPLASTOS DE MAIZ.

Se probaron concentraciones crecientes de metanol, de 0 a 80% (tabla y figura 4.4A) y de 0 a 45% (tabla y figura 4.4B).

La tabla y figura 4.4 muestran la producción de fosfato para cada concentración de metanol.

A. Metanol Prod. de $\text{PO}_4$ ( $\mu\text{Mol PO}_4$ )		B. Metanol Prod. de $\text{PO}_4$ ( $\mu\text{Mol PO}_4$ )	
(%)	/mg clif.hr)	(%)	/mg clif.hr)
00	36	00	4.9
15	54	15	13.5
30	03	20	20.2
45	30	25	12.4
60	18	30	3.4
80	21	45	10.1

Tabla 4.4 Determinación de la concentración de metanol para activar la ATPasa.

Se adicionaron concentraciones crecientes de metanol, en A de 0 a 80% y en B de 0 a 45%. Las condiciones de reacción son las descritas en la figura 4.4.

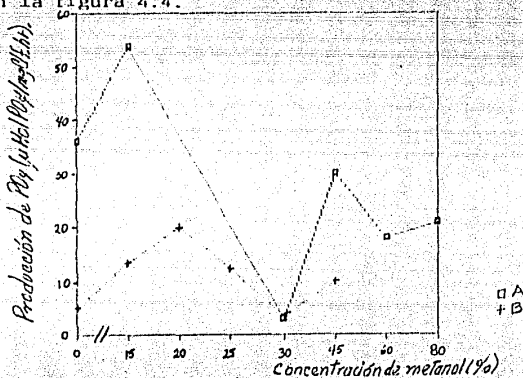


Figura 4.4. Determinación de la concentración de metanol para activar la ATPasa.

Se adicionaron concentraciones crecientes de metanol, en A de 0 a 80% y en B de 0 a 45%, en un mililitro de medio de reacción que contenía medio de activación de ATPasa (descrito en el punto 3.4.1.2), 5 mM ATP y cloroplastos de mesófilo de maíz equivalentes a 10  $\mu\text{g}$  de clorofila en A y de 40  $\mu\text{g}$  de clorofila en B. Se paró la reacción y se determinó el fosfato liberado al medio por la reacción como se describió en el punto 3.4.1.2.

Se observa en la tabla y figura 4.4A que hay un pico de mayor producción de fosfato con 15% de metanol. Se observa en la tabla y figura 4.4B que hay un pico de mayor producción con 20% de

metanol. que los valores de producción de fosfato son de alrededor de un tercio de los de A y que las curvas son similares.

La cantidad de 20% de metanol para activar la ATPasa esta dentro del intervalo que no afecta las lecturas de absorbancia debidas a fosfato (ver tabla y figura 4.2).

Por lo considerado se eligió 20% de metanol para activar la ATPasa de cloroplastos de mesófilo de maíz.

#### 4.6 TIEMPO DE ACTIVACION DE LA ATPasa TRATADA CON METANOL.

Se probaron diferentes tiempos de activación para la ATPasa (0 a 4 minutos). La tabla y figura 4.5 muestran la producción de fosfato para cada tiempo de activación.

Tiempo (min).	Producción de fosfato ( $\mu$ Mol $PO_4$ /mg clif.hr).	Tiempo (min).	Producción de fosfato ( $\mu$ ol $PO_4$ /mg clif.hr).
0.0	0.0	2.0	40.8
0.5	24.0	2.5	43.2
1.0	38.4	3.0	37.6
1.5	43.2	4.0	54.6

Tabla 4.5 Tiempo de activación de la ATPasa.

Se usaron diferentes tiempos de activación (0 a 4 minutos). Las condiciones de reacción son las descritas en la figura 4.5.

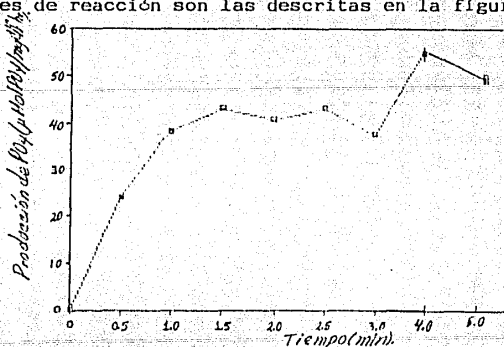


Figura 4.5 Tiempo de activación de la ATPasa.

Se usaron diferentes tiempos de activación (0 a 4 minutos). Un

mililitro de medio de reacción contenía medio de activación de ATPasa (descrito en el punto 3.4.1.2), 5 mM ATP, 20% metanol y cloroplastos equivalentes a 25  $\mu\text{g}$  de clorofila. Se tomaron alícuotas de la muestra de reacción cada medio minuto. Se paró la reacción y se determinó el fosfato liberado al medio como se describió en el punto 3.4.1.2.

Se observa que con 4 minutos se obtuvo la mayor activación de ATPasa de cloroplastos de mesófilo de maíz, aunque la activación ya no varió marcadamente a partir de los 1.5 min de incubación.

#### 4.7 CANTIDAD DE CLOROPLASTOS PARA ACTIVAR LA ATPasa TRATADA CON METANOL.

Se probaron cantidades crecientes de cloroplastos equivalentes de 0 a 75  $\mu\text{g}$  de clorofila (tabla 4.6A) y de 0 a 50  $\mu\text{g}$  de clorofila (tabla 4.6B).

La tabla 4.6 muestra la producción de fosfato para cada cantidad de cloroplastos.

A. Cantidad de clorofila ( $\mu\text{g}$ ).	Prod. de fosfato ( $\mu\text{Mol Pi/mg}$ cif. hr).	B. Cantidad de clorofila ( $\mu\text{g}$ ).	Prod. de fosfato ( $\mu\text{Mol Pi/mg}$ cif. hr).
00	00.0	00	0.0
10	03.0	05	113.4
25	33.0	15	78.6
40	30.2	25	118.1
50	39.0	35	112.2
75	88.5	50	90.6

Tabla 4.6 Cantidad de cloroplastos para activar la ATPasa.

Se activó la ATPasa con la adición de cantidades crecientes de cloroplastos. Las condiciones de reacción son las descritas en el punto 3.4.1.2, adicionando cantidades crecientes de cloroplastos.

En la tabla 4.6B se observa que hay una mayor activación de la ATPasa con cloroplastos equivalentes a 25  $\mu\text{g}$  de clorofila. Se observa que con cloroplastos equivalentes a 15  $\mu\text{g}$  de clorofila hay mucha producción de fosfato y puede ser considerado un dato con margen de error por el pequeño volumen de clorofila que se utilizó.

Bajo estas consideraciones se eligió utilizar los cloroplastos equivalentes a 25  $\mu\text{g}$  de clorofila para activar la ATPasa de cloroplastos de mesófilo de maíz.

#### 4.8 MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE CLOROPLASTOS DE MAIZ TRATADA CON METANOL.

Se midió la cantidad de ATP hidrolizado por la ATPasa, tratada con metanol, de cloroplastos en tres estados de desarrollo ontogénico (regiones de la hoja I, II y III) y de cloroplastos de los tres estados de desarrollo combinados (regiones de la hoja I, II y III combinadas).

La tabla y figura 4.7 muestran los valores de la media y de la moda de la producción de fosfato en todos los ensayos (fig.4.7A) y para tres ensayos representativos (fig.4.7B).

Tabla 4.7A.

Estado de desarrollo	Valores de la media.			Valores de la moda		
	No. de eventos	Prod.de $\text{PO}_4$ ( $\mu\text{Mol PO}_4/\text{mg}$ cif.hr).	%Des viac.	No. de eventos	Prod.de $\text{PO}_4$ ( $\mu\text{Mol PO}_4/\text{mg}$ cif.hr).	%Des viac.
Estado I	17	37.0	117	9	24.9	39.0
Estado II	18	17.6	120	10	17.7	48.0
Estado III	17	24.5	88	9	25.9	47.3
Estados combinados.	23	22.1	97	13	24.4	49.0



Tabla 4.7B.

Estado de desarrollo	Valores de la media.			Valores de la moda		
	No. de eventos	Prod.de PO <sub>4</sub> (μMolPO <sub>4</sub> /mg viac. c/f.hr).	%Des	No. de eventos	Prod.de PO <sub>4</sub> (μMol PO <sub>4</sub> /mg viac. c/f.hr).	%Des
Región I	6	28.2	60	4	29.2	32
Región II	6	88.6	74	4	12.8	17
Región III	6	41.0	56	5	49.2	30

Tabla 4.7 Medición de la actividad ATPasa tratada con metanol. Se muestra la actividad de la ATPasa. En A de todos los ensayos y en B de tres ensayos representativos. Las condiciones de ensayo son las descritas en la figura 4.7.

Figura 4.7A.

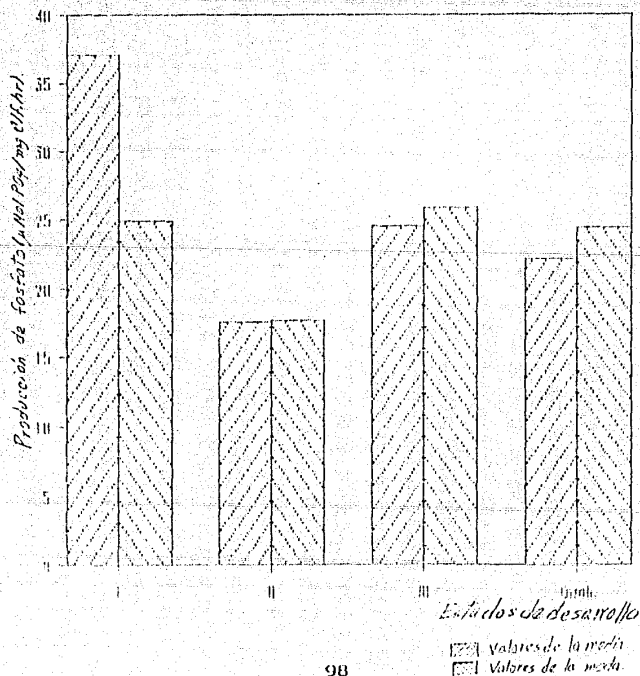


Figura 4.7B.

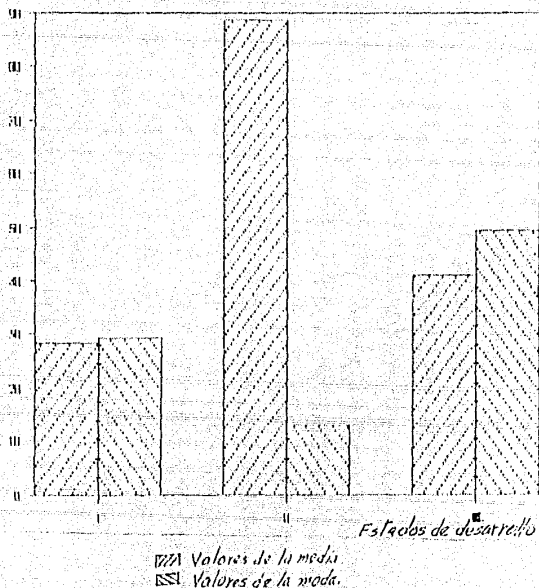


Figura 4.7 Medición de la actividad ATPasa. En un mililitro de medio de reacción se contenía medio de activación de ATPasa (descrito en el punto 3.4.1.2), 5 mM ATP, 20% metanol, cloroplastos de mesófilo de maíz de cada región de la hoja y de las regiones combinadas equivalentes a 25  $\mu$ g de clorofila y un tiempo de activación de 4 minutos. Se paró la reacción y se determinó el fosfato liberado al medio como se describió en el punto 3.4.1.2. En A se muestran los valores de la media y de la moda de todos los ensayos. En B se muestran los valores de la media y de la moda de tres ensayos representativos.

Los resultados muestran que hay diferente actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa en los cloroplastos de mesófilo de maíz de tres estados de desarrollo ontogénico y de los tres estados combinados.

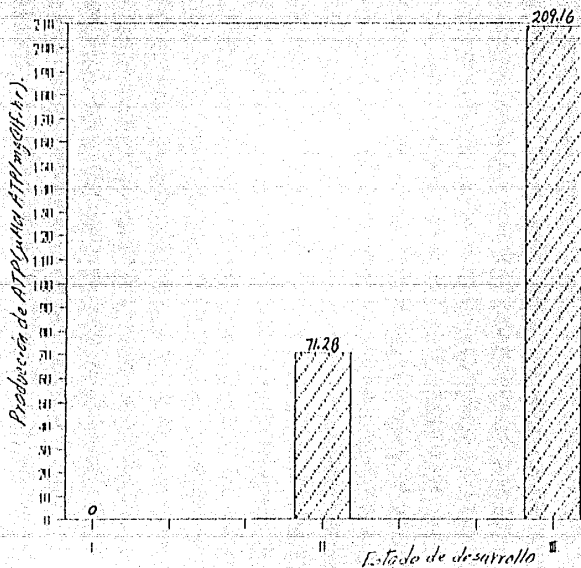
#### 4.9 MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE SINTESIS DE ATP.

Se midió la síntesis de ATP de maíz de tres estados de desarrollo ontogénico.

La tabla y figura 4.8 muestran los valores medios de producción de ATP en  $\mu\text{Mol}$  de ATP/mg clif.hr.

	Producción de ATP ( $\mu\text{Mol}$ ATP/mg clif.hr).		
	Región I	Región II	Región III
Valor de la media	0	71.285	209.16
% Desviación	0	12	27

Tabla 4.8 Medición de la actividad de la síntesis de ATP.  
Las condiciones de ensayo son las descritas en la figura 4.8.



#### Figura 4.8 Medición de la actividad de la síntesis de ATP.

El medio de reacción en agitación y a 20°C, contenía un medio con las siguientes concentraciones finales: 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Tricina-KOH pH 7.6, 1 mM ADP 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, cloroplastos equivalentes a 50 µg de clorofila, 5 mM M.V. como aceptor de electrones y 0.01 N HCl para calcular los nanoequivalentes de protones en la síntesis de ATP. El volumen final de reacción fue de 3 mililitros y se ajustó a pH 8.0. La reacción se inició al iluminar con una lámpara de proyector Kodak de 1=400 W/m<sup>2</sup>. La producción de ATP se calculó a partir de las gráficas en las que se registró los cambios de pH de la mezcla de reacción. El proceso se hizo de acuerdo al método de Nishimura y Chance, 1962 (descrito en el punto 3.5.2). El cambio de pH se midió con un potenciómetro de pH Corning Modelo 12 conectado a un electrodo de alta sensibilidad (Tromas AMT Co Ph la 0-75°C) y a una graficadora Honeywell. Los valores calculados de ATP son los valores medios de la síntesis de ATP.

Los valores obtenidos muestran que la producción de ATP aumenta del estado de desarrollo ontogénico I al II y del II al III.

#### 4.10 MEDICION DE LA VELOCIDAD DE TRANSPORTE DE ELECTRONES (T.E.).

Se midió la velocidad del T.E. basal, en presencia de ADP y PO<sub>4</sub> (fosforilante) y en presencia de NH<sub>4</sub>Cl (desacoplado) de cloroplastos en tres estados de desarrollo ontogénico (regiones de la hoja I, II y III), y el transporte de electrones basal y desacoplado de cloroplastos de los tres estados combinados (regiones I, II y III combinadas).

La tabla y figura 4.9 muestran en A. los valores de la media de la producción de oxígeno de cloroplastos en tres estados de desarrollo ontogénico (regiones de la hoja I, II y III), y cloroplastos de los tres estados combinados (regiones de la hoja I, II y III combinadas).

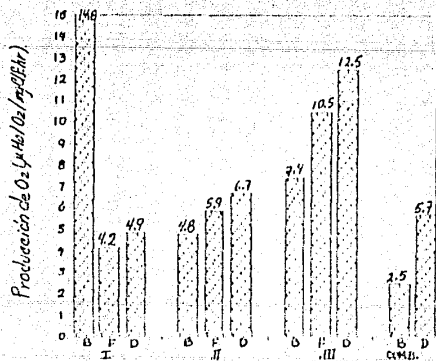
En la tabla y figura 4.10 se muestran los valores de producción de oxígeno en un ensayo representativo para cloroplastos en tres estados de desarrollo ontogénico (regiones de la hoja I, II y III) y de los tres estados combinados (regiones de la hoja I, II y III combinadas).

Estado de desarrollo	T.E.	No. de eventos	Valores de la media:	
			Prod. de O <sub>2</sub> (µMol O <sub>2</sub> /mg clif.hr).	%Desviación.
Estado I	Basal	12	14.8	62
	Fosforilante	5	4.2	51
	Desacoplado	13	4.9	57
Estado II	Basal	16	4.8	40
	Fosforilante	6	5.9	31
	Desacoplado	15	6.7	45
Estado III	Basal	12	7.4	69
	Fosforilante	8	10.5	52
	Desacoplado	15	12.5	47
Estados combinados	Basal	5	2.5	29
	Desacoplado	3	5.7	26

Tabla 4.9 Medición de la velocidad de transporte de electrones (T.E.).

Se midió la velocidad del transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado. Las condiciones de reacción son las descritas en la figura 4.9.

Figura 4.9A



I, II, III, COMB. = Estados de desarrollo I, II, III y combinados.  
 B - 7.5 Basal F - 7.5 Fosforilante  
 D - 7.5 Desacoplado

Figura 4.9B

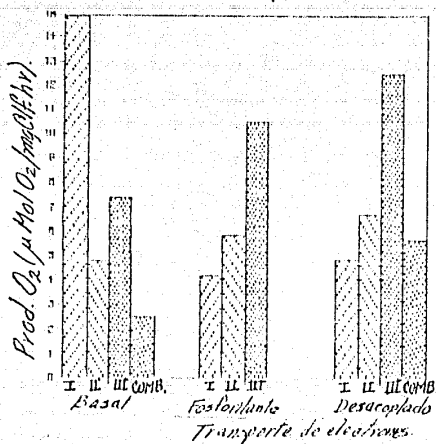


Figura 4.9 Medición de la velocidad de transporte de electrones (T.E.).

El medio de reacción contenía las siguientes concentraciones finales: 0.1 M sacarosa, 40 mM Tricina-NaOH pH 8, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.6 mM  $\text{KFe}(\text{CN})_6$ , cloroplastos equivalentes a 50  $\mu\text{g}$  de clorofila. El volumen final de reacción fue de 3 mililitros y se ajustó un pH de 8.0. Cuando se midió la velocidad de T.E. fosforilante se usó 1.2 mM ADP y 7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Se desacopló con 0.1 mM  $\text{NH}_2\text{Cl}$ . El registro del T.E. se inició iluminando con una  $I=400 \text{ W/m}^2$ . La producción de oxígeno se midió con un monitor YSI Modelo 53 conectado a dos electrodos de Clark y se registró con un graficador LKB Bromma 2210. En A. se muestra los valores de la media de la producción de oxígeno para cloroplastos en tres estados de desarrollo ontogénico (regiones de la hoja I, II y III) y de cloroplastos de los tres estados combinados (regiones de la hoja I, II y III combinadas). En B se compara la producción de oxígeno del T.E. basal, fosforilante y desacoplado.

La tabla y figura 4.10 corresponden a un ensayo representativo.

Estado de desarrollo	T.E.	No. de eventos	Prod. de O <sub>2</sub> ( $\mu$ Mol O <sub>2</sub> /mg clif.hr.)
Estado I	Basal	1	5.0
	Desacoplado	1	10.8
Estado II	Basal	1	6.4
	Desacoplado	1	13.2
Estado III	Basal	1	3.2
	Desacoplado	1	6.7

Tabla 4.10. Medición de la velocidad de transporte de electrones de un ensayo representativo.

Las condiciones de reacción son las descritas en la figura 4.9.

Figura 4.10A

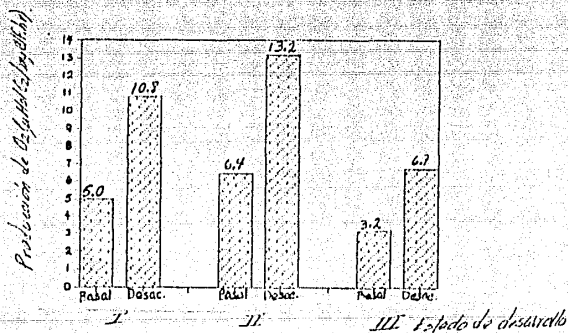


Figura 4.10B

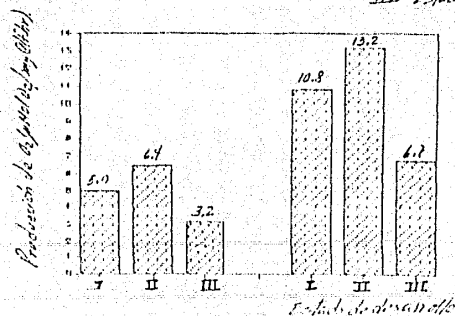


Figura 4.10. Medición de la velocidad de T.E. de un ensayo representativo.

En A. se muestra la velocidad de T.E. de cloroplastos de mesófilo de maíz en tres estados de desarrollo ontogénico y de los tres estados combinados.

En B. se comparan las mediciones de la velocidad de T.E. basal y desacoplado.

Las condiciones de reacción son las descritas en la figura 4.9.

En el estado de desarrollo ontogénico I (figura 4.9A, región I) el valor de la media de la producción de oxígeno para la velocidad de T.E. basal, fosforilante y desacoplado son similares.

En el estado II (figura 4.9A, región II) y el estado III (figura 4.9A, región III) muestran que la velocidad de T.E. aumenta de basal a fosforilante y a desacoplado, y que la actividad de T.E. del estado III es mayor que el del estado II.

En la velocidad de T.E. de los estados combinados (figura 4.9A, regiones I, II y III) se ve que el T.E. desacoplado es del doble del basal y menor que la del T.E. de los estados por separado.

En la figura 4.9B se observa que la velocidad de T.E. basal de los estados I y II son iguales, en el estado III es mayor y el de los estados combinados es el de menor actividad de T.E. En el T.E. fosforilante la actividad de T.E. crece de los estados I al II y al III y el de los estados combinados apenas es mayor que el del estado I.

En la tabla y figura 4.10 en A. y B. se observa que para todos los estados de desarrollo ontogénico a velocidad del T.E. desacoplado es del doble del T.E. fosforilante y que la velocidad del T.E. de los estados de desarrollo disminuyen del estado II al I, al III y a los estados combinados.



#### 4.11 ANATOMIA FOLIAR Y DEL CLOROPLASTO DE MESÓFILO DE MAÍZ.

Durante la biogénesis del cloroplasto y hoja de maíz se observa (ver durante la explicación las figuras que corresponden a cada estado de desarrollo):

a) A nivel foliar que de los estados de desarrollo I al III se hace más compleja la anatomía Kranz: Aumenta el número de haces vasculares, el número, talla y grosor de la lámina media, de los vasos de conducción del xilema y del floema y el número, talla y grosor de la pared celular de las células del colénquima. Aumenta el número y talla de las células del parénquima de reserva y aerénquima y la talla, número y grosor de la lámina media de células epidérmicas.

b) A nivel de parénquima fotosintético de los estados de desarrollo I al III aumenta el número, talla y grosor de la lámina media de las células fotosintéticas de mesófilo y vaina, el arreglo de las células fotosintéticas se parece cada vez más a la anatomía Kranz característica.

c) A nivel celular de los estados de desarrollo I al III aumenta la talla celular y el grosor de la lámina media. Aumenta el tamaño del núcleo y la densidad del citoplasma. Aumenta el número y talla de los cloroplastos de mesófilo y vaina. Los cloroplastos tienden a localizarse en la vecindad de la membrana celular.

d) A nivel ultraestructural de los estados de desarrollo I al III aumenta el tamaño y la definición de la membrana externa del cloroplasto. En cloroplastos de mesófilo se observa aumento de la talla y número de los cloroplastos, el número y talla de las granas. Aumenta la talla y definición de las membranas tilacoidales, las que tienen una forma ovalada. Aumenta la longitud y definición de las lamelas y el número y talla de los plastoglóbulos.

En el estado de desarrollo I se observan mitocondrias aparentemente asociadas al cloroplasto de mesófilo, no se observan tilacoides individuales, ni tilacoides con lamelas vesiculadas, ni tampoco se observan cuerpos prolamelares.

En los cloroplastos de vaina se observa que en los estados de desarrollo I al III que aumentan de talla, el número y definición de los tilacoides, los que son alargados, curvos y casi no forman granas, aumenta el número y grosor de las lamelas y el número y talla de los granulos de almidón. No se observan cuerpos prolamelares, ni tilacoides vesiculados.

A continuación se presentan algunas de las fotografías y de las microfotografías más representativas de la anatomía de la hoja y de los cloroplastos de mesófilo de maíz durante el desarrollo ontogénico.

Estado de desarrollo I.

A

B



1.3um

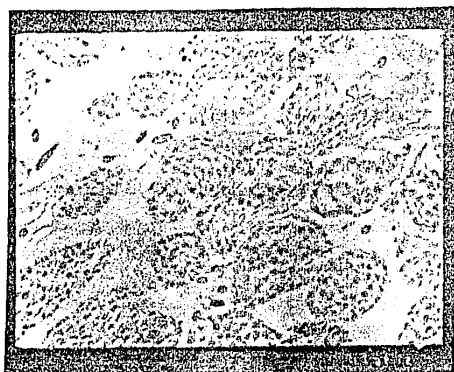
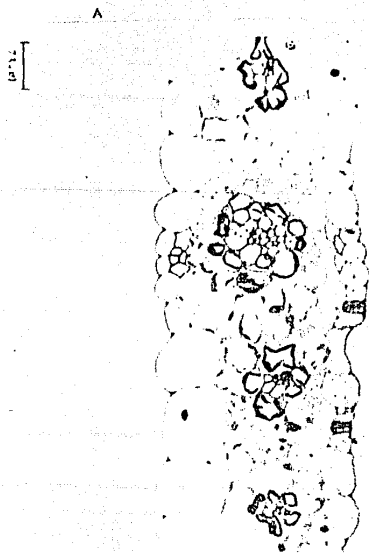


Figura 4.11A. Anatomía foliar del cloroplasto de mesófilo de maíz, de 15 días de edad, en el estado de desarrollo I (proplastidio). Las técnicas de preparación se hicieron como se describió en el punto 3.7.2 (página 88). En A corte transversal de hoja entre los 0 y 2 cm. En B corte transversal de hoja mostrando los cloroplastos de mesófilo y de vaina. En C micrografía electrónica de los cloroplastos de mesófilo (fotos por cortesía del Dr. Alfonso Caravés, U.N.A.M.).

Estado de desarrollo II.



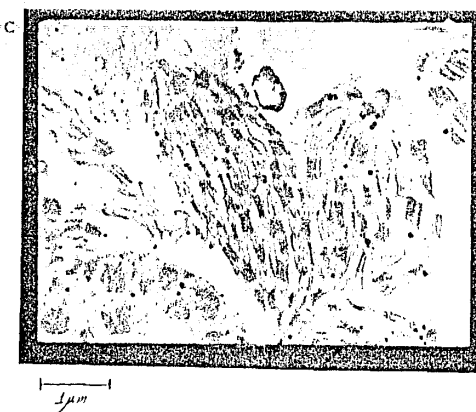
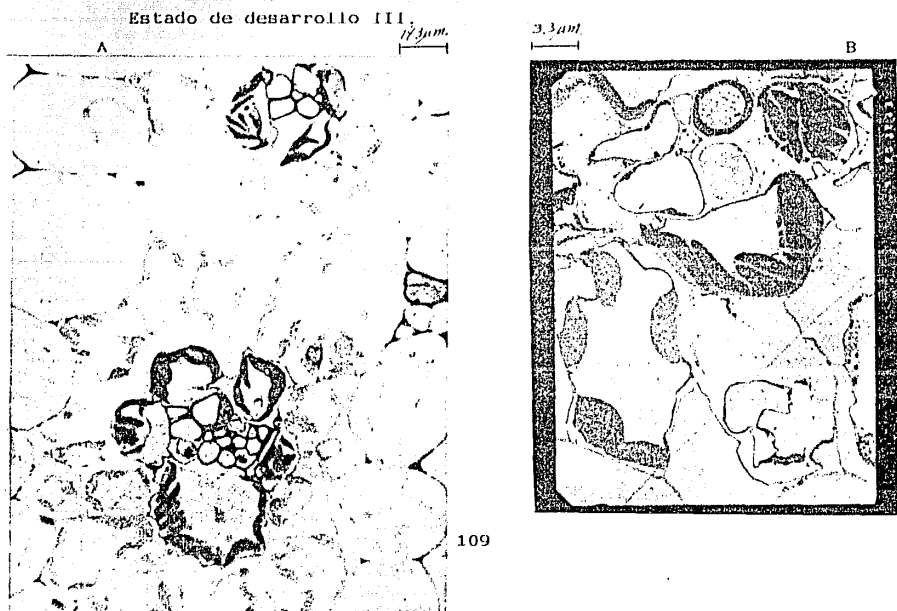


Figura 4.11B. Anatomía foliar y del cloroplasto de mesófilo de maíz en el estado de desarrollo II (cloroplasto intermedio). Las preparaciones se hicieron como se describió en la figura 4.11A. En A corte transversal de hoja entre los 2 y 4 cm desde la base. En B corte transversal mostrando cloroplastos de mesófilo y vaina. En C micrografía electrónica de los cloroplastos de mesófilo.



C



Figura 4.11C. Anatomía foliar y del cloroplasto de mesófilo en el estado de desarrollo III (cloroplasto maduro). Las preparaciones se hicieron como se describió en la figura 4.11A. En A corte transversal de hoja entre 4 y 6 cm desde la base. En B corte transversal mostrando cloroplastos de mesófilo y de vaina. En C micrografía electrónica de los cloroplastos de mesófilo (x 15,000 aumentos).

v

## 5 DISCUSION DE RESULTADOS.

### 5.1 ACTIVIDAD DE LA $H^+$ -ATPasa TRATADA CON METANOL.

Se demostró que con el medio de aislamiento denominado B, con el medio de activación de ATPasa usado, una concentración de clorofila de 25  $\mu\text{g/ml}$ , 20% de metanol y 4 minutos de activación se pudo conseguir la mayor actividad ATPasa de los cloroplastos de mesófilo de maíz.

En los experimentos se utilizaron cantidades iguales de clorofila. Se observó que en el estado de desarrollo I hay pocos plastidios y hay una menor concentración de clorofila a y b comparada con el cloroplasto maduro (18, 24), por lo que suponemos que se adicionaron mayores cantidades de plastidios (aunque tenían pocos tilacoides) durante la activación de la ATPasa y por consiguiente mayor cantidad de las CF: que ya se hallan presentes en el proplastidio (aunque no están aun completamente constituidas) (36). Se puede mejorar la medición refiriendo la actividad por  $10^0$  plastidios o por el número de electrones que son acarreados por la C.T.E. (36).

En las microfotografías de los cortes de hoja se observa que el número y talla de las células fotosintéticas, la talla del cloroplasto, el número de tilacoides y el número de lamelas aumenta del estado de desarrollo I al III, lo que hace suponer que habría aumento de las actividades fotosintéticas debido a la maduración del cloroplasto.

En el estado de desarrollo I se observa que hay mitocondrias, que posiblemente están asociadas a los proplastidios y podrían estar proporcionando la energía necesaria para sintetizar componentes del cloroplasto. Es de interés conocer cuál es la actividad respiratoria de la célula fotosintética y la cantidad de energía (ATP y compuestos reducidos) producida durante cada estado de desarrollo.

Con el uso de metanol en la activación de la ATPasa se producen cambios en la solvólisis del agua, la que forma con el metanol una mezcla azeotrópica, cambiando el poder de solvatación del agua y modifica las fuerzas que actúan sobre las proteínas hidrofóbicas e hidrofílicas que constituyen la  $H^+$ -ATPasa.

La cantidad de actividad de la ATPasa en cloroplastos tratados con metanol depende de los cambios de la estructura cuaternaria de las proteínas de la  $H^+$ -ATPasa. Cambios que son producidos por una polarización y resultan en una estructura estable de la enzima (con una mínima energía para funcionar) y permite la mayor actividad de catálisis enzimática.

Con concentraciones mayores a 33% de metanol se inhibe la actividad ATPasa, posiblemente por desnaturalización de la  $H^+$ -ATPasa (Anthon y Jagendorf, 1984) (10).

La actividad ATPasa de cloroplastos tratados con metanol no requiere al tilacoide intacto, ni a la  $CF_1$  unida a la  $CF_0$  y se piensa que el tratamiento no separa a la  $CF_1$  de la  $CF_0$  (43).

Las reacciones se desarrollaron en la oscuridad y se descartó que haya actividad ATPasa generada por luz (10). La producción de fosfato no fue alterada por efecto del metanol en la determinación de fosfato (ver fig.4.2, pág.91) ni por efecto del metanol sobre el ATP estrechamente ligado [con 20 a 35% de metanol no se libera ADP y ATP estrechamente ligados y no se afecta al ATP endógeno y exógeno (ver fig.4.4, pág.94)] (10), y con 20% de metanol no se desnaturaliza la enzima (Anthon y Jagendorf, 1983) (43).

Los resultados muestran que hay actividad ATPasa durante toda la biogénesis del cloroplasto de mesófilo (ver fig.4.7, págs.98, 99). Los valores de la media de la actividad ATPasa (con mucha desviación) son similares a los de la moda (con menor desviación).

El pico de mayor actividad ATPasa se alcanzó con 20% de metanol (ver fig.4.4, pág.94) y fue menor ( $\times 10$ ) que la reportada para

espinaca [de 400  $\mu$ Mol  $PO_4$ /mg clf.hr (43)] y (x10) que los obtenidos con cloroplastos mesófilo de maíz tratados con luz (de 412.5  $\mu$ Mol  $PO_4$ /mg clf.hr, Aguilar, A.R. comunicación personal).

El hecho de que la actividad ATPasa de maíz sea máxima con 20% de metanol puede indicar que la estructura que adquiere es diferente de la que tiene la espinaca con 33% y que la del mismo cloroplasto tratado con luz.

En el estado de desarrollo I la actividad ATPasa (ver fig.4.7, págs.98,99) de los cloroplastos tratados con metanol es similar a la de los estados de desarrollo III y combinados y es menor en el estado II. La actividad ATPasa indica que ya funciona el sitio activo para la hidrólisis de ATP.

Es de interés bloquear al canal  $CF_0$ , con DCCD, en los cloroplastos del estado de desarrollo I e impedir el paso de los protones del lumen tilacoidal para conocer si hay un acoplamiento del tilacoide a nivel del complejo  $CF_1-F_0$ . Si con el DCCD cambia la velocidad de T.E. se demostraría la unión laxa o el desacople de  $CF_1-F_0$  y si no cambia que hay una fuga de protones por el desacople de la bicapa lipídica.

En el estado de desarrollo II la actividad ATPasa disminuye y puede mostrar una diferente estructura de la  $H^+$ -ATPasa o un acoplamiento de la  $CF_1-F_0$ . La ATPasa tratada con luz requiere del tilacoide acoplado y al tratarla con metanol sólo de la  $CF_1$ . Se halla por dos métodos que la actividad ATPasa disminuye en este estado de desarrollo y puede deberse a que la enzima esta acoplada y tiene una estructura diferente.

## 5.2 ACTIVIDAD DE SINTESIS DE ATP.

Nuestros resultados muestran (ver fig.4.8, pág.100) que la síntesis de ATP del cloroplasto de mesófilo de maíz aumenta de los estados de desarrollo I al III.

En nuestros experimentos se utilizaron cloroplastos tipo II (con tilacoide intacto), no influyen procesos de regulación que se



presentan en cloroplasto intacto (poder reductor y sistema antiport de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  con el citosol) y se espera que afecten otros (índice estequiométrico de clorofilas o radio de clorofilas a/b y recambio de ADP-ATP estrechamente ligados a la  $\text{H}^+$ -ATPasa).

La ausencia de síntesis de ATP en el estado de desarrollo I puede deberse a:

a) Una baja actividad de T.E. que lleva a una baja bomba de protones y a un incipiente  $\Delta\mu\text{H}^+$ .

b) Desacople del tilacoide a nivel de:

- Bicapa lipídica: Por una unión laxa de lípidos, de lípidos-proteínas o por falta de una o varias porciones de las proteínas constituyentes de la membrana del tilacoide.

- La falta de la  $\text{CF}_1$ , por la unión laxa de la  $\text{CF}_1\text{-F}_0$  o por la falta de alguna(s) subunidad(es) de la enzima.

c) Que la  $\text{CF}_1$  no adquiere una estructura activa para la síntesis de ATP.

Si hay actividad ATPasa en el estado de desarrollo I se puede esperar que la enzima tuviera actividad de síntesis de ATP, la que fue muy pequeña (medida con el T.E. fosforilante, fig. 4.9 pág. 102-103) o no se registró (fig. 4.8, pág. 100). Esto podría deberse a que el tilacoide está desacoplado o si los protones se desvían hacia el estroma y no entran al tilacoide, estando desacoplada la  $\text{CF}_1\text{-F}_0$ , y no se forma un  $\Delta\mu\text{H}^+$ .

En los estados de desarrollo II y III se presenta y aumenta la síntesis de ATP, lo que indica que el tilacoide está acoplado, que el sitio activo es funcional para la síntesis y que la enzima tiene una estructura que favorece la actividad.

### 5.3 VELOCIDAD DE TRANSPORTE DE ELECTRONES.

Al madurar el cloroplasto de maíz se ha reportado que la velocidad de T.E. aumenta de los estados de desarrollo I al III

(19, 24, 33), que se incrementa la actividad de bomba de protones (Aguilar, A.R., comunicación personal) y la actividad de síntesis de ATP.

En el estado de desarrollo (ver fig.4.9, págs. 102, 103) hubo variación significativa entre la velocidad de T.E. basal y fosforilante. Se considera que estas velocidades son la del T.E. desacoplado y que el tilacoide esta desacoplado.

En el estado de desarrollo II la velocidad de T.E. basal es igual a la del desacoplado del estado I. Las velocidades de T.E. fosforilante y desacoplado aumentan de los estados de desarrollo II al III y son mayores que las del T.E. basal del estado de desarrollo respectivo y mayores que las del estado de desarrollo I.

Se considera que en el estado de desarrollo II la velocidad de T.E. se incrementa porque se acopla el tilacoide y aumenta la bomba de protones (mayor  $\Delta\mu H^+$ ). Lo que se refleja en un T.E. fosforilante más rápido.

En el estado de desarrollo III la velocidad de T.E. basal fosforilante y desacoplado es mayor que la del estado II e indican el acoplamiento del tilacoide y la función y regulación máximas.

La velocidad de T.E. de los estados de desarrollo combinados es menor que la de los estados de desarrollo individuales por lo que no se puede considerar como una actividad de T.E. representativa del T.E. basal, fosforilante y desacoplado de los estados de desarrollo individuales.

Es de interés conocer con detalle la forma en que influye la carga neta negativa que se forma en el estroma cuando sólo funciona el PSI (24, 35). la carga neta negativa debida al transporte de nucleótidos a través de la membrana del cloroplasto (figura 1.14, página 43), la desactivación de la ATPasa por la falta de modulación de tioles sobre la  $H^+$ -ATPasa y la desactivación del pH en cloroplastos en oscuridad con M.V. (37).

5.4 CONSIDERACIONES PARA DETERMINAR EL POSIBLE SITIO DE DESACOPAMIENTO DEL TILACOIDE DEL CLOROPLASTO DE MESOFILO DE MAIZ.

Se considera el posible sitio de desacoplamiento que presenta el cloroplasto del estado de desarrollo 1.

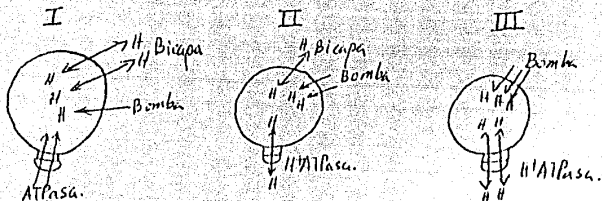
La siguiente tabla compara las actividades fotosintéticas del cloroplasto de mesófilo de maíz halladas en este trabajo y se plantean dos posibles modelos del desacople del mismo.

TRATAMIENTO	MODELO DE DESA COUPLE DE H <sup>+</sup> -ATPasa						MODELO DE DESACOPLE DE BICAPA.						
	LUZ			METANOL			LUZ			METANOL			
<b>ESTADO DE DESARROLLO</b>		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<b>ENTRADA DE</b>	Bomba H <sup>+</sup>	+	++	+++	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>PROTONES.</b>	Bicapa lipídica	-	-	-	.	.	.	++	+	-	.	.	.
	ATPasa FO	++	NO	NO	.	.	.	NO	NO	NO	.	.	.
	F1	-	NO	NO	.	.	.	NO	NO	NO	.	.	.
	F1-FO	-	+	++	.	.	.	++	+	++	.	.	.
<b>SALIDA DE</b>	Bicapa	-	-	-	.	.	.	++	+	-	.	.	.
<b>PROTONES.</b>	ATPasa FO	++	++	-	.	.	.	-	-	-	.	.	.
	F1	-	-	-	.	.	.	-	-	-	.	.	.
	F1-FO	-	-	-	.	.	.	- <sup>(1)</sup>	-	-	.	.	.
<b>SINTESIS</b>													
<b>DE ATP.</b>		-	+	++	.	.	.	-	+	++	.	.	.
<b>ATPasa</b>	FO	-	-	NO	-	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	F1	++	++	NO	++	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	F1-FO	-	-	++	-	+	++	++	+	++	++	+	++
<b>TRANSPORTE</b>	Basal	+	+	++	.	.	.	+	+++	++	.	.	.
<b>DE ELECTRONES</b>	Fosforilante	-	-	++	.	.	.	-	+	++	.	.	.
	Desacoplado	-	-	++	.	.	.	-	+	++	.	.	.

Tabla 5.1 Se comparan las posibles actividades fotosintéticas en base a un modelo de desacople de tilacoide en la H<sup>+</sup>-ATPasa y un modelo de desacople en la bicapa lipídica (+=actividad sencilla; ++=actividad doble; +++=actividad triple; NO=no medido; -- no hay o no aumenta; (1)=no se sabe con certeza hasta no experimentar con DCCD; . = no se registro.

Fig. 5.1A Modelo de desacoplamiento en bicapa lipídica.  
Estado de desarrollo ontogénico.

Entrada-salida neta de  $H^+$ .



Funciones fotosintéticas.

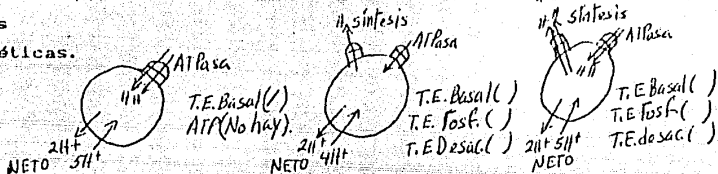
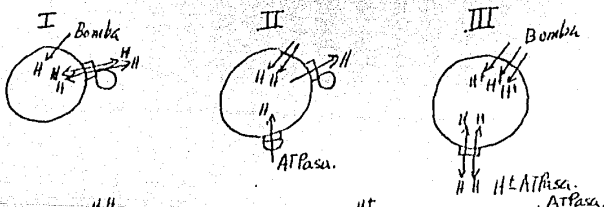


Fig. 5.1B, Modelo de desacoplamiento en la  $H^+$ -ATPasa.  
Estado de desarrollo.

Entrada-salida neta de  $H^+$ .



Funciones fotosintéticas.

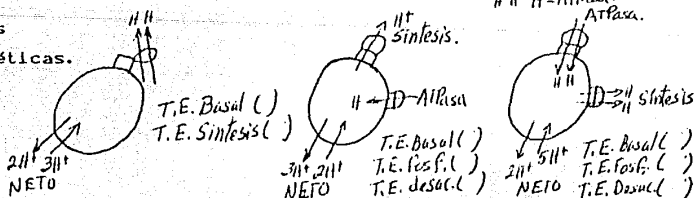


Figura 5.1 Modelos de dos posibles sitios de desacoplamiento del tilacoide de cloroplastos de mesófilo de maíz en el estado de desarrollo I. A modelo de desacople en bicapa lipídica, B modelo de desacople en la  $H^+$ -ATPasa.

La tabla siguiente resume los patrones de las actividades fotosintéticas de los modelos planteados.

	MODELO DE DESA COPLAMIENTO EN BICAPA			MODELO DE DESACOPLIAMEN TO EN LA H <sup>+</sup> -ATPasa.		
	Disminuye	Igual	Aumenta	Disminuye	Igual	Aumenta
ENTRADA DE PROTONES	II	I,III			I,II	III
T. E. BASAL		I,II	III		I,II	III
T. E. FOSFORILANTE			I-III			I-III
T. E. DESACOPLADO			I-III			I-III
SINTESIS DE ATP			I-III			I-III

Tabla 5.2. Resume los patrones de las actividades fotosintéticas de dos modelos de desacople de cloroplastos de mesófilo de maíz en el estado de desarrollo I.

El modelo de desacople de bicapa lipídica indica que en el estado de desarrollo II entran menos protones en el tilacoide, lo que implicaría que en el estado de desarrollo II hubiera menor actividad de bomba de protones, menor velocidad de T.E., menor actividad ATPasa (si los protones pasaran por CF<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>) y no permitiría actividad de síntesis de ATP.

El modelo de desacoplamiento en la H<sup>+</sup>-ATPasa indica que en los estados de desarrollo I y II entra la misma cantidad de protones al tilacoide, lo que implicaría en el estado de desarrollo II igual bomba de protones, igual T.E., igual actividad ATPasa (si los protones pasaran por CF<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>), y no permitiría síntesis de ATP.

Es de interés particular probar la actividad de T.E. en el estado de desarrollo I con DCCD para ayudar a aclarar la disyuntiva.

---

5.5 CONSIDERACIONES GENERALES DE LAS ACTIVIDADES FOTOSINTÉTICAS DE LOS CLOROPLASTOS DE MESÓFILO DE MAÍZ EN CADA ESTADO DE DESARROLLO ONTOGENICO.

En general no se ha observado división de los cloroplastos aunque se presenta división celular. Se observa aumento de la complejidad anatómica a niveles foliar, celular y ultraestructural que es paralela al aumento de la complejidad fisiológica foliar, celular y de los cloroplastos de mesófilo de maíz.

Hay estudios previos que describen los cambios anatómicos (4, 18, 19, 20, 23, 25, 26, 32), el aumento del número de ribosomas 70s y 80s y de sus contenidos de DNA, RNA y Rubisco (38), los cambios de calidad y cantidad de lípidos (5, 18, 20, 32), de las amidas y aminoácidos libres (4, 8, 14), de la cantidad y calidad de los plastoglóbulos (21). De la síntesis de dos proteínas de 21 500 a 24 500 daltons en el PSII de pepino y cebada (35), de la reestructuración de las clorofilas en el frijol (34), cambios de la orientación de las mismas en maíz (33), su aumento durante el desarrollo (24, 34) y la supuesta terminación de la C.T.E. con la unión del NADP<sup>+</sup> (40).

Cambios continuos que pueden relacionarse con una mayor complejidad de las actividades fotosintéticas mostradas en este trabajo.

Nelson, N y Nelson, H. (1980) hallaron en espinaca que la H<sup>+</sup>-ATPasa de los proplastidios unió posteriormente las subunidades δ (de la CF<sub>1</sub>) y II (de la CF<sub>0</sub>) provenientes del citoplasma con las que la enzima completó su constitución (30). Hecho que puede indicar que se da un acoplamiento en la CF<sub>1</sub>-Fo y un cambio estructural de la enzima.

Basados en estos datos podemos suponer que la H<sup>+</sup>-ATPasa no se halla completamente constituida en el proplastidio por la posible falta de las subunidades δ y II, por lo que el tilacoide en el

estado de desarrollo I no esta acoplado a nivel de la  $CF_1-CF_0$  y la C.T.E. no se halla completamente constituida y regulada.

Características que explicarían el desacople del T.E. basal, la baja bomba de protones, la ausencia de síntesis de ATP y apoyarían el modelo de desacople en la  $H^+$ -ATPasa analizado antes (pág. 116).

La actividad ATPasa y su mecanismo de acción se discutirá particularmente.

Durante el estado de desarrollo I se observa que el T.E. basal alcanza el mismo nivel que el desacoplado, lo que indica que hay un desacople del tilacoide (figura 4.9, páginas 102-103). Dicho desacople explica la baja actividad de bomba de protones y no permite la formación de un  $\Delta\mu H^+$  suficiente para la síntesis de ATP (figura 4.8, pág. 100).

La actividad ATPasa en el estado de desarrollo I indica que la enzima puede adquirir una conformación activa pero que la estructura de la  $CF_1-F_0$  no permitió la síntesis de ATP y no hubo un  $\Delta\mu H^+$  que lo favoreciera

En el estado de desarrollo II la catálisis de la ATPasa activada con metanol o con luz es menor que en otros estados, mientras que la actividad de síntesis de ATP aparece. Ya que la actividad ATPasa del cloroplasto tratado con metanol no requiere del tilacoide intacto y no esta influida por el T.E., ni por bomba de protones, ni por  $\Delta\mu H^+$  (mientras que en cloroplastos tratados con luz sí influyen estos factores).

En este estado de desarrollo parecen integrarse las subunidades ó y II faltantes en el estado de desarrollo I, las que acoplan la  $CF_1-F_0$  y cambian la estructura de la  $H^+$ -ATPasa, con lo que se favorece la síntesis de ATP en el cloroplasto intacto (que tiene un  $\Delta\mu H^+$  suficiente para la función). Parece que la nueva estructura determina la magnitud de la actividad ATPasa y en este estado la disminuye.

En el estado de desarrollo III del cloroplasto, ya se hallan completamente constituidas y acopladas la  $H^+$ -ATPasa y la C.T.E.. La talla del cloroplasto y de sus componentes son las características del estado maduro y no se espera que aumente el número de CF1 por tilacoide, sino su distribución en el mismo.

Ya hay un acoplamiento y regulación entre fotosistemas, el  $\Delta\mu H^+$  y la  $H^+$ -ATPasa, que ya esta completamente constituida y aumenta la velocidad de T.E. basal, fosforilante y desacoplada, la bomba de protones y la síntesis de ATP.

La actividad ATPasa tratada con luz o metanol aumenta con respecto al estado de desarrollo II y es similar a la del estado I. No parece que el  $\Delta\mu H^+$  (que ha aumentado) influya en la actividad ATPasa, ya que si lo hiciera la actividad disminuiría del estado de desarrollo II al III. La actividad hallada en el estado de desarrollo I sólo es posible si la enzima tiene una estructura que lo permita y es posible que los protones que cruzan la enzima se desvíen hacia el estroma antes de entrar al tilacoide.

Estas características explicarían el aumento de las actividades fotosintéticas y su regulación en los diferentes estados de desarrollo del cloroplasto. Y se considera que son paralelas al desarrollo de la planta a nivel de organismo, de sistemas, de tejidos y de células.

#### 5.6 ACTIVIDAD ATPasa Y SU MECANISMO DE ACCION.

Se debe aclarar que la actividad ATPasa no se presenta en condiciones fisiológicas, que es una actividad inducida en la enzima por condiciones experimentales y que con su medición se busca conocer el mecanismo de acción de la  $H^+$ -ATPasa en condiciones naturales.



Es notoria la falta de información sobre las actividades fotosintéticas de etiocloroplastos y cloroplastos de maíz durante su ontogenia y los datos reportados para otras plantas (resumidos en la tabla 1.10, páginas 66-67) pueden no ser aplicables a los cloroplastos de maíz.

No se halló en la literatura consultada datos directos de la actividad ATPasa en maíz y los datos reportados para espinaca tratados con metanol (43) no se parecen a las actividades ATPasa halladas en este trabajo.

Tratando de resumir y correlacionar los datos disponibles se tratará de dar una explicación del mecanismo de acción de la  $H^+$ -ATPasa.

Kozlov y Skulachev (1977) (6) proponen un mecanismo para el funcionamiento de la  $H^+$ -ATPasa. Este mecanismo es semejante a los propuestos por Rosing et al., 1982, Boyer, 1979 y Grubmeyer et al., 1982 (7) pero son vagos y no explican el proceso en el tilacoide.

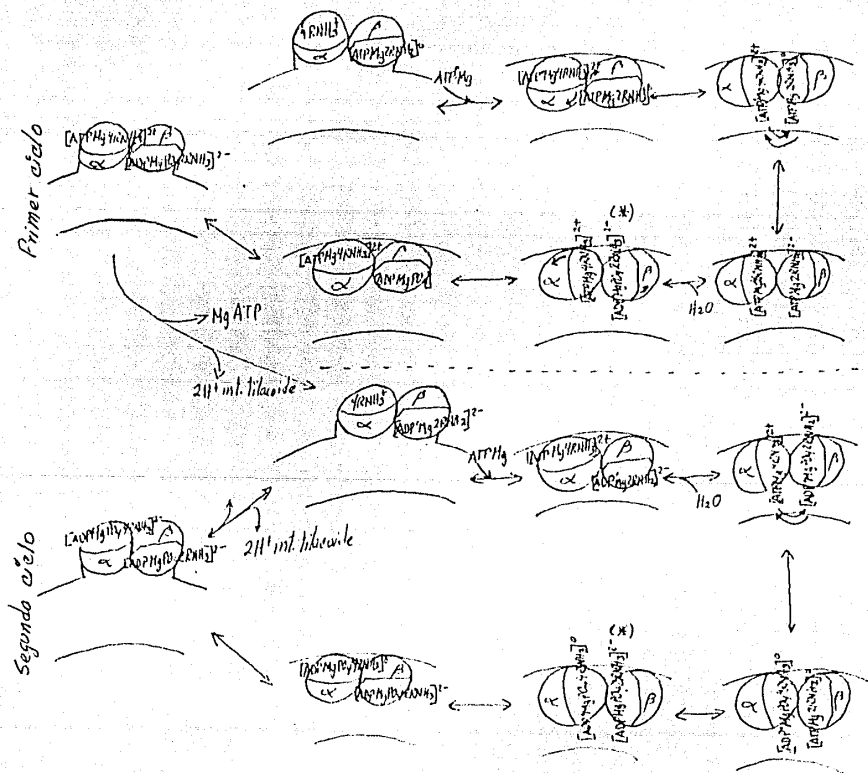
Según Kozlov en la subunidad  $\alpha$  de la  $H^+$ -ATPasa se intercambian adenin nucleótidos gracias a un sitio que tiene afinidad por los nucleótidos. La velocidad del intercambio y la dirección de las reacciones subsecuentes depende del tipo de nucleótido, de la cantidad relativa de los nucleótidos (relación ATP/ADP+PO<sub>4</sub>) y del grado de organización del tilacoide.

Kozlov cree que después de unirse un nucleótido en la subunidad  $\alpha$  de la  $H^+$ -ATPasa se producen cambios en la estructura de la enzima (como los encontrados con diferentes inhibidores, tabla 1.1, páginas 22-24). Propone que estos cambios de estructura son debidos a la luz (en condiciones fisiológicas) o a agentes químicos (como el metanol) y que son explicados con la hipótesis Korman, mediante un intermediario pentacovalente que cambia su estereoestructura (punto 1.4.6, pág. 30).

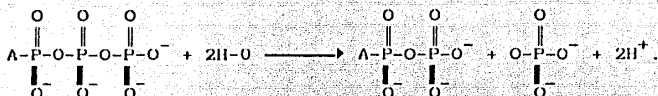
Propone que en la subunidad  $\beta$  hay dos sitios activos (el

catalítico y el no catalítico) y que el sitio catalítico tiene dos regiones (la I y la II) (fig. 1.9, pág. 34) las que son requeridas, según el modelo, para realizar la síntesis de ATP, y solo se requiere de alguna de las dos para realizar la actividad de hidrólisis de ATP.

A continuación se modifica para cloroplasto, en su actividad ATPasa, el esquema dado para la síntesis de ATP en mitocondria por Kozlov y Skulachev (fig. 1.10, páginas 37-38) (6).



La reacción que se lleva a cabo es:



Según Hinkle y McCarty (31) el número de iones  $\text{H}^+$  que cruzan la membrana es de tres por molécula de ATP formado o hidrolizado, dato que no corresponde a la reacción propuesta y que no se ha podido explicar.

Figura 5.2. Esquema de la reacción ATPasa modificado del dado por Kozlov y Skulachev para la síntesis de ATP en mitocondria (6).

Ya que se halló una alta relativa actividad ATPasa en el estado de desarrollo I se considera que la  $\text{H}^+$ -ATPasa tiene el sitio activo funcional y la estructura necesaria para hidrolizar ATP, pero no para sintetizarlo.

Si en el estado de desarrollo II se unen al tilacoide las subunidades  $\zeta$  y II (acoplado al complejo  $\text{CF}_1\text{-PC}$  y cambiando la estructura de la  $\text{H}^+$ -ATPasa), se integran dos proteínas de 21 500 a 24,500 daltons, se incrementa el número de moléculas de clorofila a y b, se reorientan las mismas con respecto al tilacoide, se reorganiza la carga neta del estroma (negativa en el estado de desarrollo I), se regula la actividad de tioles (que desactivan la actividad ATPasa) y se incrementa el  $\Delta\mu\text{H}^+$  interno, entonces se explica que se incrementen las actividades de T.E., de bomba de protones, de síntesis de ATP y que cambie la actividad ATPasa. Condiciones que se terminan de regular en el estado de desarrollo III.

## 5.7 APORTACIONES.

- Se describe un medio de aislamiento y uno de resuspensión con los que se pueden aislar cloroplastos de mesófilo de maíz variedad Tuxpeño acoplados y con  $H^+$ -ATPasa activa.

- Se describe un medio de activación de ATPasa, uno de síntesis de ATP y otro de T.E. que se pueden usar para las mediciones respectivas.

- Se describen las características particulares de las tallas medias mínimas y máximas para los cloroplastos de maíz en tres estados de desarrollo ontogénico.

- Se determinó el tiempo de activación, la concentración de cloroplastos y la concentración de metanol adecuados para activar la ATPasa de cloroplastos de mesófilo de maíz.

- Se contribuyó al conocimiento de la actividad ATPasa, de T.E. y síntesis de ATP durante el desarrollo del cloroplasto de mesófilo de maíz, los que actualmente non escanan.

- Se propone un modelo que explica el funcionamiento de la actividad de la  $H^+$ -ATPasa (en la síntesis e hidrólisis de ATP) para el cloroplasto de mesófilo de maíz.

- Se propone un modelo que analiza la distribución de carga debida al transporte de adenin nucleótidos a través de la membrana del cloroplasto.

- Se propone dos modelos para evaluar el sitio de desacople del tilacoide del cloroplasto de mesófilo de maíz.

- Conocer la relación ATP/ADP+PO<sub>4</sub> del cloroplasto de mesófilo de maíz durante el desarrollo ontogénico.
  - Comparar las actividades fotosintéticas de este trabajo con las que se realicen en otras variedades de maíz.
  - Medir las concentraciones de clorofila y metanol y el tiempo de activación de la ATPasa tratada con metanol para cada estado de desarrollo ontogénico del cloroplasto de mesófilo de maíz.
  - Determinar las subunidades que se hallan presentes en la H<sup>+</sup>-ATPasa del cloroplasto de mesófilo de maíz en cada estado de desarrollo ontogénico.
  - Determinar las actividades fotosintéticas en tejido intacto de secciones de hoja en cada estado de desarrollo de la hoja de maíz.
  - Determinar la actividad ATPasa tratada con luz en cloroplasto intacto, y en cloroplasto tipo II con el uso de tioles.
  - Determinar el efecto de la modulación de tioles sobre la actividad ATPasa y la desactivación del pH (37).
  - Determinar la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa tratada con luz y metanol de:
    - a) Actividad ATPasa-ATP sintetasa con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>.
    - b) Actividad ATPasa aumentando la concentración de ATP.
  - Determinar la actividad ATPasa tratada con luz cuando se desacopla al complejo cosechador de luz, a uno o ambos fotosistemas o al NADP<sup>+</sup>.
- Determinar la actividad ATPasa en presencia de un compuesto que regenere al ATP (ATP fosfotransferasas).

## VI

### 6 CONCLUSIONES.

- Se halló que las hojas de maíz Tuxpeño de 15 días de edad son útiles para estudiar el desarrollo ontogénico del cloroplasto de mesófilo de maíz en su anatomía y sus actividades fotosintéticas (particularmente en la actividad ATPasa).

- Se demostró que hay un desarrollo anatómico secuencial del tejido, del parénquima clorofílico y de los cloroplastos de la base a la punta de la hoja.

- Se demostró que la enzima  $H^+$ -ATPasa tiene actividad hidrolítica en todos los estados de desarrollo del cloroplasto y es probable que la actividad se registre desde las primeras etapas gracias a que en el tilacoide y las lamelas se halla presente un número definitivo de  $CF_1$ . Durante la ontogenia las  $CF_1$  se dispersan por el aumento de la talla del tilacoide y las lamelas y su número se incrementa como consecuencia de la formación de nuevos tilacoides y lamelas que sintetiza el cloroplasto de mesófilo durante su desarrollo ontogénico.

- Se considera probable que las subunidades  $\delta$  y II se unen a la  $H^+$ -ATPasa del cloroplasto del estado de desarrollo II, cambiando su estructura y acoplando al complejo  $CF_1$ - $F_0$ . Con lo que se promueve un desarrollo secuencial de las actividades fotosintéticas del T.E. basal, fosforilante y desacoplado, de síntesis de ATP y de actividad ATPasa.

En general las actividades fotosintéticas aumentaron durante la ontogenia y sus valores son consistentes con los valores de actividad encontrados para bomba de protones y actividad ATPasa tratada con luz en cloroplastos de mesófilo de maíz y con los reportes sobre el desarrollo (36, 40) de la  $H^+$ -ATPasa y C.T.E. en la variedad de maíz Kelvedon Glory y de otros vegetales.

## Abreviaturas.

- $\alpha$  = Subunidad de la enzima  $H^+$ -ATPasa.  
ADP = Adenin difosfato.  
AMP = Adenin monofosfato.  
ATP = Adenosin trifosfato.  
 $\beta$  = Subunidad de la enzima  $H^+$ -ATPasa.  
B.S.A. = Albumina de suero bovino desengrasada.  
Cfo = La parte de la  $H^+$ -ATPasa inmersa en el tilacoide del cloroplasto.  
Cfi = La parte de la  $H^+$ -ATPasa que sale del tilacoide del cloroplasto.  
Cfi-Fo = Las dos partes que forman la  $H^+$ -ATPasa del cloroplasto.  
C.R. = Centro de reacción del tilacoide del cloroplasto.  
C.T.E. = Cadena de transporte de electrones.  
 $\delta$  = Subunidad de la enzima  $H^+$ -ATPasa.  
 $\Delta\mu H^+$  = Gradiente electroquímico de protones.  
d = daltons.  
DCCD = Diciclohexil carbodiimida.  
D.E.A.E. = Dietilaminoetil celulosa.  
D.T.E. = Ditiotreititol.  
 $\epsilon$  = Subunidad de la enzima  $H^+$ -ATPasa.  
EDTA = Acido etilen diamino tetracético.  
Efo = La parte Fo de la bacteria E. coli.  
Efi = La parte Fi de la bacteria E. coli.  
Efi-Fo = Las partes Fi y Fo de la bacteria E. coli.  
Fo = La parte de la  $H^+$ -ATPasa inmersa en la membrana interna de la mitocondria.  
Fi = La parte de la  $H^+$ -ATPasa que sale de la membrana interna de la mitocondria.  
Fi-Fo = Las dos partes que forman la enzima  $H^+$ -ATPasa de la mitocondria.  
FADP<sup>+</sup> = Flavin adenin dinucleótido reducido.  
Fd = Ferredoxina.  
 $\gamma$  = Subunidad de la enzima  $H^+$ -ATPasa.

GTP= Guanin trifosfato.  
L.H.C. = Complejo cosechador de luz.  
MF<sub>i</sub> = La F<sub>i</sub> de la Micobacterium phei.  
M.V. = Metil viológeno.  
NADH<sup>+</sup> = Nicotin adenin difosfato reducido.  
PC = Plastocianina.  
P.M. = Peso molecular.  
PQ = Plastoquinona.  
PSI = P680 = Fotonistema I o pigmento 680.  
PSII = P680 = Fotonistema II o pigmento 700.  
PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, Pi<sup>3-</sup>, OI<sup>3-</sup> = Radical fosfato libre.  
T.C.A. = Acido tricloracético.  
T.E. = Transporte de electrones.  
TF<sub>i</sub> = La F<sub>i</sub> de la bacteria termófila T-53.  
Tricina = N-tris(hidroximetil metil glicina).  
TTP = Tiamin trifosfato.



Literatura consultada.

- (1) Bidwell, R.G. 1979. FISILOGIA VEGETAL A.G.T. Editor México.
- (2) Leech, R.M. 1984. CHLOROPLAST BIOGENESIS. N.R. Baker & J. Barber. Elsevier Science Publishers. Topics in Photosynthesis. Vol. 5.
- (3) Lehninger, A.L. 1981. BIOQUIMICA. Omega. México.
- (4) Chapman, D.L. Leech, R.M. (1979). CHANGES IN POOL SIZE OF FREE AMINOACIDS AND AMIDES IN LEAVES AND PLASTIDS OF Zea mays DURING LEAF DEVELOPMENT. Plant Physiology Vol 63, 567-572.
- (5) Capit. I y II Chemiosmotic Energy Transduction.
- (6) Kozlov, I.A. Skulachev, V.P. (1977). II ADENOSINE TRIPHOSPHATASE AND MEMBRANE ENERGY COUPLING. Biochemica et Biophysica Acta 463, 29-89.
- (7) Capitulo F<sub>1</sub> ATPasa.
- (8) Anthon, G.E. Jagendorf, A.T. (1986). MULTIPLE EVIDENCY FOR EFFECTS ON THE FACTOR F<sub>1</sub> ACTIVATION OF CLOROPLAST COUPLING. Biochemica et Biophysica Acta , 92-98.
- (9) Bolton, J.R. Hall, D.O. (1979). PHOTOCHEMICAL CONVERSION AND STORAGE OF SOLAR ENERGY. Ann. Rev. Energy 4:353-401.
- (10) Anthon, G.E. Jagendorf, A.T. (1984). METHANOL-INDUCED RELEASE OF TIGHTLY BOUND ADENINE NUCLEOTIDES FROM THYLAKOID ASSOCIATED CF<sub>1</sub>. Biochemica et Biophysica Acta 766, 354-362.
- (11) Westerhoff, H.V. Melandri, A. Venturoli, G. Azzone, G.F. Kell, D.B. (1984). MOSAIC PROTONIC COUPLING HYPOTESIS FOR FREE ENERGY TRANSDUCTION. Elsevier Sci. Pub. Vol 165 No. 1. Febr 1987. January.
- (12) Miller, K.R. Miller, G. McIntyre, K.R. ORGANIZATION OF THE PHOTOSYNTHETIC MEMBRANE IN MAIZE MESOPHYLL AND BUNDLE SHEAT CHLOROPLASTS. (1977). Biochemica et Biophysica Acta 459, 145-156.

- (13) Woo, K.C. Anderson, J.M. Bardman, N.D. Downton, W.J. Osmond, C.B. and Thorne, S.W. (1970). DEFICIENT PHOTOSYSTEM II IN AGRANAL BUNDLE SHEAT CHLOROPLASTS OF C<sub>4</sub> PLANTS. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67:18-25.
- (14) Machold, Hoyer-Hansen. POLYPEPTIDE COMPOSITION OF THYLAKOIDS FROM VIRIDIS AND Xantha mutants IN BARLEY. (1976) Carlsberg Res. Commun. Nal. 41 No. 6: 359-366.
- (15) Menke, W. Radunz, A. Schmid, G.H. Koenig, F. and Rolf-Dieter, H. INTERMOLECULAR INTERACTIONS OF POLYPEPTIDS AND LIPIDS IN THE THYLAKOID MEMBRANE.
- (16) McCarty, R.E. Jagendorf, A.T. (1965) CHLOROPLAST DAMAGE DUE TO ENZYMATIC HIDROLISIS OF ENDOGENEOUS LIPIDS. Plant Physiology 40, 725-735.
- (17) Morris, P. Nash, G.V. Hall, D.O. (1982). THE STABILITY OF ELECTRON TRANSPORT "in vitro" CHLOROPLAST MEMBRANES. Photoynthesis Research 3, 227-240.
- (18) Leech, M.G. Rumsby, M.G. and Thomson, W.W. (1973). PLASTID DIFFERENTIATION ACYLILIPID AND CHANGES IN DEVELOPING GREEN MAIZE LEAVES. Plant Physiology 52, 240-245.
- (19) Backer, N.R. Leech, R. (1977). DEVELOPMENT OF PHOTOSYSTEM I AND PHOTOSYSTEM II ACTIVITIES IN LEAVES OF LIGHT-GROWN MAIZE (Zea mays) Plant Physiology 60, 640-644.
- (20) Leese, B. M. Leech, R.M. (1976). SECUENCIAL CHANGES IN THE LIPIDS OF DEVELOPING PLASTIDS ISOLATED GREEN MAIZE LEAVES. Plant Physiology 57, 789-794.
- (21) Lichtenthaler, H.K. (1968). LOS PLASTOGLOBULOS Y LA ESTRUCTURA FINA DE LOS PLASTOS. Endeavour 27, 144-149.
- (22) Yau-jun Go. Ying, Zhang, et al. (1987). EFFECTS OF SOME ALCOHOL ON THE CONFORMATION OF MITOCHONDRIAL H<sup>+</sup>-ATPase COMPLEX AND F<sub>1</sub> ATPase FROM PIG HEART. Biochemica et Biophysica Acta 844, 11-15.
- (23) Leech, R.M. Rumsby, M.G. Thomson, W.W. Crosby, W. Wood, P. (1971). LIPID CHANGES DURING PLASTID DIFFERENTIATION IN DEVELOPMENT MAIZ LEAVES. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Congress of Photosynthesis Research. Stresa Italy. June 24-29.

- (24) Danneels, P. Lannoye, R. (1986). VARIATIONS DE LA FLUORESCENCE ET LA DENSITE DE CHARGE DES MEMBRANES DE THYLACOIDES d' ORGE AU COURS DU VERDISSEMENT. *Photosynthetica* 20 (1) 956-960.
- (25) Hodge, A.J. McLean, J.D. and Mercer T.V. (1955). ULTRESTRUCTURE OF LAMELLAE AND GRANA IN CHLOROPLAST OF Zea mays L. *J. Biophysica and Biochem. Cytol.* Vol 6.
- (26) Miller, K.R. Miller, G.J. and McIntyre, K.L. (1977). ORGANIZATION OF THE PHOTOSYNTHETIC MEMBRANE IN MAIZE MESOPHYLL AND BUNDLE SHEAT CHLOROPLASTS. *Biochemica et Biophysica Acta* 459, 145-156.
- (27) Ku, M.S. Monson, R.K. Littlejohn, R.O. Nakamoto, M. Fisher, D.B. and Edwards, G.E.. (1983). PHOTOSYNTHETIC CHARACTERISTICS OF C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> INTERMEDIATE FLAVERIA SPECIES. *Plant Physiology* 71, 944-948.
- (28) Monrroy, J.V. Fullner, C.S. McCarty, R.E. (1984). CHARACTERIZATION OF CYSTEINYL COINTAINING PEPTIDES OF THE  $\gamma$  SUBUNIT OF COUPLING FACTOR 1. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 259 No. 11 pp 7281-7285.
- (29) Lodish, H.F. Rothman, J.F. (1979). LA FORMACION DE MEMBRANAS CELULARES. *Investigación y Ciencia* No. 30. marzo.
- (30) Nelson, N. Nelson, H. Schatz, G. (1980). BIOSYNTHESIS AND ASSEMBLY OF THE PROTON TRANSLOCATIN ADENOSINE TRIPHOSPHATASE COMPLEX FROM CHLOROPLAST. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 77.No. 3 pp 1361-1364, march.
- (31) Hinkle, P.C. McCarty, R.E. (1978). COMO FABRICAN ATP LAS CELULAS. *Investigación y Ciencia* No. 20, mayo.
- (32) Mackender, R.O. (1978). ETIOPLAST DEVELOPMENT IN DARK GROWN LEAVES OF Zea mays L. *Plant Physiology* 62, 499-505.
- (33) Bakri, B.M. (1973). PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF MESOPHYLL AND BUNDLE SHEAT CHLOROPLASTS OF MAIZE. *Plant Physiology* 52, 257-262.

- (34) Buttler, W.L. (1985). DEVELOPMENT OF PHOTOSYNTHETIC SYSTEMS 1 AND 2 IN GREENING LEAF. *Biochemica et Biophysica Acta* 102, 1-8.
- (35) Mullet, J.E. Burke, J.J. and Arntzenich, A. (1980). DEVELOPMENTAL STUDY OF PHOTOSYSTEM I PERIPHERAL CHLOROPHYLL PROTEINS. *Plant Physiology* 65, 823-827.
- (36) Wellborn, A.R. (1977). DISTRIBUTION OF CHLOROPLAST COUPLING FACTOR (F<sub>i</sub>) PARTICLES ON PLASTID MEMBRANES DURING DEVELOPMENT. *Planta* 135, 191-198.
- (37) Mills, J.D. Mitchell, P. (1982). MODULATION OF COUPLING FACTOR ATPase ACTIVITY IN INTACT CHLOROPLASTS REVERSAL THIOL MODULATION IN THE DARK. *Biochem. et Biophysica Acta* 679, 75-83.
- (38) Dean, C. Leech, R.M. (1982). GENOME EXPRESSION DURING NORMAL LEAF DEVELOPMENT. *Plant Physiology* 69, 904-910.
- (39) Gilles, K.L. Beardsell, M.F. and Cohen, D. (1974). CELLULAR AND ULTRAELECTRICAL CHANGES IN MESOPHYLL AND BUNDLE SHEAT CELLS IN MAYZE IN RESPONSE TO WATER STRESS. *Plant Physiology* 54, 208-212.
- (40) Oelse-Karow, H. and Buttler, L. (1971). THE DEVELOPMENT OF PHOTOPHOSPHORYLATION AND PHOTOSYNTHESIS IN GREENING BEAN LEAVES. *Plant Physiology* 48, 621-625.
- (41) Armond, P.A. Arntz, C.D. Briantais, J.M. Vernotte, C. (1976). DIFFERENTIATION OF CHLOROPLAST LAMELLAE (LIGHT HARVESTING EFFICIENCY AND GRANA DEVELOPMENT). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 175, 54-63.
- (42) Anthon, G.E. Jagendorf, A.T. (1983). EFFECT OF METANOL ON SPINACH THYLACOID ATPase. *Biochemica et Biophysica Acta* 723, 358-365. Elsevier.

## Resumen.

Con el tiempo se incrementa y diversifica el conocimiento en todos sus ambitos. Este trabajo forma parte de uno de los proyectos que en los últimos años han buscado conocer a las enzimas que participan en el proceso bioenergético que se efectua en el cloroplasto.

Se empleo al maíz porque sus hojas contienen cloroplastos en diferentes etapas de desarrollo y están localizados en áreas bien definidas.

¿Pero como se relacionan la estructura y las actividades fotosintéticas del cloroplasto de mesófilo de maíz?

Nuestra hipótesis de trabajo fue que "ni hay un desarrollo lineal secuencial, anatómico y fisiológico durante la ontogenia del cloroplasto de mesófilo de maíz, entonces la actividad de la enzima  $H^+$ -ATPasa será diferente para cada estado de desarrollo"

Partimos con el objetivo principal de conocer la actividad ATPasa durante el desarrollo del cloroplasto de mesófilo y en forma secundaria de conocer las actividades fotosintéticas de la síntesis de ATP, el transporte de electrones (basal, fosforilante y desacoplado) y comparar las actividades halladas con la anatomía del cloroplasto durante el desarrollo y las actividades fotosintéticas disponibles en la literatura.

Basados en la información disponible se concentraron los datos que dan un panorama del cloroplasto maduro y en desarrollo, en sus actividades fotosintéticas y en su anatomía. Debido a la escasez de datos para cloroplastos modificamos algunos esquemas e hicimos algunos calculos a partir de datos de bacterias y mitocondrias y los proponemos para su posible aplicación al cloroplasto de mesófilo de maíz.

Los resultados indican que varía la actividad ATPasa de los cloroplastos al tratarlos con metanol, que la actividad tiene un patrón de comportamiento similar, pero 10 veces menor, que los reportados al tratarlos con luz.

Es muy notorio que la actividad ATPasa decae en la etapa intermedia de desarrollo del cloroplasto, parece indicar que el tilacoide está desacoplado a nivel de la  $H^+$ -ATPasa en las etapas más tempranas y que en las etapas intermedias se producen muchos cambios cualitativos y cuantitativos en la estructura, orientación, composición y constitución de la C.T.E. y la  $H^+$ -ATPasa que disminuye la actividad ATPasa e incrementa las actividades de T.E. y de síntesis de ATP. Las que se incrementan y parecen regularse en el estado maduro.

La anatomía del cloroplasto indica claramente que aumenta en talla general y en sus componentes, que aumentan el número de tilacoides, de granas y lamelas.

Los resultados encontrados pueden ser explicados, junto a otros reportados antes, por el modelo que postularon Kozlov y Skulachev en 1977 sobre el mecanismo de acción de la  $H^+$ -ATPasa y que aquí modificamos para el cloroplasto en su actividad de hidrólisis y de síntesis de ATP.

Concluimos que las hojas de maíz Tuxpeño de 15 días de edad son útiles para estudiar el desarrollo de la actividad ATPasa del cloroplasto, que hay un desarrollo anatómico y fisiológico continuo y que los resultados son consistentes con lo hallado en la variedad de maíz Kelvedon Glory y en otros vegetales.

Al final también se dan algunas recomendaciones que de ser llevadas a la práctica pueden aportar un granito de arena a la bioenergética.