

00581

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

Facultad de Química

Division de Estudios de Posgrado

CAMBIOS CONFORMACIONALES DE LA H^+ -ATPasa DE CLOROPLASTOS
EVIDENCIADOS POR MALEIMIDAS Y N,N-DIMETILFORMAMIDA.
CARACTERIZACION DE LA N,N-DIMETILFORMAMIDA COMO INHIBIDOR
DE LA FOTOFOSFORILACION.

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas
(Bioquímica) presenta CECILIA BEATRIZ PENA VALDIVIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	PAG.
SUMMARY	
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
Composicion de la ATP-sintetasa, H^+ -ATPasa o complejo CF_0 - CF_1	1
Estructura primaria y organizacion del factor de acoplamiento	2
Estequiometria del complejo CF_0 - CF_1	3
Estructura secundaria del factor de acoplamiento	4
Funcionalidad de las subunidades	6
Propiedades cataliticas de CF_1	9
a) proceso de activacion	9
b) efecto del gradiente de protones	12
Sitios de union de nucleotidos	14
Regulacion de la ATPasa	17
Efecto de bloqueadores	18
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y METODOS	23
1) Compuestos quimicos, reactivos y material biologico	23
2) Obtencion de plantas de chicharo	23
3) Obtencion de cloroplastos intactos	27
4) Cuantificacion de clorofila	30
5) Obtencion de cloroplastos lavados	31
6) Activacion por luz del complejo CF_0 - CF_1 (Mg^{+2} -ATPasa) unido a la membrana del tilacoide	31
7) Ensayo de actividad de la Mg^{+2} -ATPasa de CF_0 - CF_1 unido a la membrana del tilacoide	33
7.1) hidrolisis de ATP y cuantificacion del P_i liberado	34
7.2) hidrolisis de $[γ-^{32}P]ATP$ y cuantificacion del $^{32}P_i$ liberado	35
8) Determinacion de P_i por metodo colorimetrico (Fiske-Subbarow)	38
9) Reaccion de intercambio P_i -ATP	38

10) Evaluación de la fotofosforilación

39

Pag.

(10.1) evaluación potenciométrica de la fotofosforilación	40
(10.2) fotofosforilación de ADP con fosfato radioactivo (^{32}Pi)	41
11) Medición de la bomba de protones	43
12) Determinación de la velocidad del transporte de electrones acíclico, de H_2O a metilviologeno	44
12.1) Transporte de electrones basal	45
12.2) Transporte de electrones fosforilante	46
12.3) Transporte de electrones desacoplado	47
13) Ensayo de reacciones parciales no cíclicas de los fotosistemas I y II	48
RESULTADOS	50
1) ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA $\text{Mg}^{+2}\text{-ATPasa}$	50
2) CONDICIONES DE ENSAYO DE LA FOTOFOSFORILACION	54
3) EFECTO DE LAS MALEIMIDAS MONOFUNCIONALES Y BIFUNCIONALES EN LA ACTIVIDAD DE LA $\text{Mg}^{+2}\text{-ATPasa}$	59
4) INFLUENCIA DE ADENIN NUCLEOTIDOS, FOSFATO Y DESACOPLANTE EN LA INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA $\text{Mg}^{+2}\text{-ATPasa}$ DE CLOROPLASTOS POR MALEIMIDAS	80
5) MODIFICACION DE LA FOTOFOSFORILACION EN CLOROPLASTOS POR MALEIMIDAS MONOFUNCIONALES Y BIFUNCIONALES	89
6) EFECTO DE LA N,N-DIMETILFORMAMIDA (DMF) EN ALGUNAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS DE CLOROPLASTOS DE PLANTAS DE CHICHARO	103
DISCUSION Y CONCLUSIONES	129
Cinética de activación y desactivación del complejo $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ en cloroplastos	129
Modificación química del complejo $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ de cloroplastos con maleimidias y su efecto en la	

actividad de la Mg^{+2} -ATPasa y la ATP-sintetasa 131

Pag.

Influencia de substratos, productos y
desacoplante en la inhibición inducida por
maleimidas de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa 142

Efecto de la N,N-dimetilformamida en algunas
actividades fotosintéticas 150

BIBLIOGRAFIA 157

INDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla I. Compuestos ensayados	25
Tabla II. Tiempos óptimos para la inhibición de la hidrólisis y la síntesis de ATP por maleimidias monofuncionales y bifuncionales	65
Tabla III. Parámetros cinéticos para la inhibición o estimulación de la síntesis e hidrólisis de ATP por maleimidias monofuncionales y bifuncionales	68
Tabla IV. Efecto de adenin nucleótidos, fosfato y cloruro de amonio en la inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa por maleimidias	82
Tabla V. Reversibilidad de la inhibición de la fotofosforilación producida por la N,N-dimetilformamida	110
Tabla VI. Contenido aproximado de grupos sulfhidrilo por molécula del complejo CF_0-CF_1	133

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Fig. 1 Tiempo óptimo de activación, de ensayo y concentración óptima de sustrato para la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a tilacoides de cloroplastos de plantas de chícharo	51
Fig. 2 Condiciones de activación, ensayo y concentraciones óptimas de sustratos para la actividad de la ATP-sintetasa unida a membranas tilacoides de cloroplastos de plantas de chícharo	55
Fig. 3 Determinación de los tiempos óptimos de inhibición por maleimidas monofuncionales de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a membranas tilacoides de cloroplastos de plantas de chícharo	62
Fig. 4 Determinación del efecto de concentraciones variables de las maleimidas en las actividades de la Mg^{+2} -ATPasa y de la ATP-sintetasa unidas a membranas tilacoides de cloroplastos	66
Fig. 5 Determinación de los tiempos óptimos de inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a membranas tilacoides inducida por maleimidas bifuncionales	72
Fig. 6 Efecto de concentraciones variables de maleimidas bifuncionales en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa y de la ATP-sintetasa unidas a membranas tilacoides de cloroplastos de plantas de chícharo	75
Fig. 7 Inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa en función de la concentración de bismaleimidas y su relación con la distancia entre los centros reactivos de las bismaleimidas	78
Fig. 8 Inhibición de la fotofosforilación en cloroplastos por maleimidas monofuncionales en función del tiempo de síntesis del ATP	91
Fig. 9 Inhibición de la fotofosforilación en cloroplastos por bismaleimidas en función del tiempo de	

síntesis del ATP

- Fig. 10 Determinación de los tiempos óptimos de inhibición de la fotofosforilación en cloroplastos por maleimidias monofuncionales y bifuncionales 97
- Fig. 11 Efecto de la DMF en el consumo de H^+ , Mg^{+2} -ATPasa, síntesis de ATP y reacción de intercambio Pi-ATP 104
- Fig. 12 Modificación paralela del consumo de protones por membranas tilacoides en ausencia y en presencia de DMF 105
- Fig. 13 Efecto de la DMF en la reacción de Hill (cadena transportadora de electrones), de agua a metil viológeno 112
- Fig. 14 Efecto de la DMF, ADP, Pi y ATP en la cadena transportadora de electrones 116
- Fig. 15 Efecto del Pi y diferentes concentraciones de DMF en el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado 120
- Fig. 16 Efecto del ADP y diferentes concentraciones de DMF en la velocidad del transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado 123
- Fig. 17 Inhibición del transporte de electrone en los fotosistemas I y II por DMF 127

SUMMARY

In this research, 12 maleimides were used in order to try to detect the existence of different H^+ -ATPase conformations induced by light when chloroplasts were energized. Monofunctional maleimides were: 1-H-pyrrol-2,5-dione, ethylmaleimide, methylol-maleimide, phenylmaleimide and carboxihydroxyphenylmaleimide. Bifunctional maleimides used were: N-chlorometilmaleimide, N,N'-bismaleimide, N,N'-ethylenbismaleimide, N,N'-dihydroxyethylenbismaleimide, N,N'-trimethylenbismaleimide, N,N'-methyletherbismaleimide and N,N'-tetramethylenbismaleimide. Results showed the following: 1. The H^+ -ATPase conformation required for the ATP hydrolysis in the dark was induced by intact chloroplasts illumination, and it was sensible to inhibition when the -SH group(s) of the enzyme were blocked chemically or cross-linked by mono- and bifunctional maleimides; 2. Mg^{+2} -ATPase and ATP-synthase were inhibited by maleimides and bismaleimides; the degree of inhibition is dependent on the type of maleimide used; 3. The effect of some maleimides on photophosphorylation in freshly lyzed chloroplasts two-phased, first activating ATP synthesis and then inhibiting it; 4. The percent of Mg^{+2} -ATPase activity and ATP synthesis inhibition was in different degree; each maleimide and bismaleimide induced a specific and characteristic inhibition; 5. The data show that the H^+ -ATPase complex in illuminated chloroplasts uses one specific conformation for ATP synthesis, which is more sensible to inhibition with monofunctionals and bifunctional maleimides and another specific conformation for ATP hydrolysis, which is less sensible to inhibition by maleimides; 6. A correlation was found between the length of the reactive center

of the bismaleimides (between 5.5 Å to 9.2 Å) (which increases hydrophobicity) and their Mg^{+2} -ATPase inhibition increases; 7. ADP, ATP and phosphate protected the Mg^{+2} -ATPase to inhibition induced by maleimides. in some cases, the Mg^{+2} -ATPase was activated 100% and 140% by ATP γ phosphate, respectively; 8. The presence of the uncoupler NH_4Cl in the reaction medium of the maleimides induced reversion, protection or had no-effect on the Mg^{+2} -ATPase sensibility to inhibition by maleimides and bismaleimides. The results found with maleimides and bismaleimides indicate that there is evidence for detecting a specific conformation for Mg^{+2} -ATPase and for ATP synthase in the H^+ -ATPase complex bound to the thylakoid membrane in freshly lysed intact chloroplasts. Each conformation was inhibited to a different degree with the maleimides used in this research. Furthermore, each H^+ -ATPase conformation induced by light has specific characteristics for ATP synthase or ATP hydrolysis (time of illumination, type or concentration of maleimide used, etc.). In the second part of this research the effect of N,N-dimethylformamide on different photosynthesis activities was characterized on intact freshly lysed chloroplasts. N,N-dimethylformamide inhibits both ATP formation and the accompanying coupled electron flow in chloroplasts. In the presence of ammonia at uncoupling concentrations, the phosphorylating electron transport inhibition by N,N-dimethylformamide was partially reversed. Basal electron transport (- phosphate - ADP) was inhibited 78% by 7% (v/v) N,N-dimethylformamide; this effect was partially reversed by NH_4Cl . Basal electron transport inhibition by N,N-dimethylformamide was higher when electron flow occurred with limiting phosphate (below 1mM) concentrations, but it was reversed

by higher phosphate (6mM) concentrations, as well as by higher concentrations of N,N-dimethylformamide (12-15% v/v). When ADP concentration (0-1 mM) was varied, the basal electron transport inhibition by N,N-dimethylformamide was reversed as the concentration of the solvent increased. The Pi-ATP exchange reaction was inhibited by N,N-dimethylformamide in a similar manner as inhibition of ATP synthesis. Light induced proton uptake was not affected by N,N-dimethylformamide at concentrations which completely inhibited ATP formation, and it was not affected in ethylenediaminetetraacetate-treated chloroplasts which were partially devoid of coupling factor 1. However, Mg^{2+} -ATPase activity was partially inhibited to 32% by 32% of N,N-dimethylformamide, suggesting that CF_1 was not the main site for N,N-dimethylformamide in the inhibition of electron flow. Both photosystems I and II were also affected. The effect of N,N-dimethylformamide on thylakoids was reversed by washing of the chloroplasts. The overall results indicated that N,N-dimethylformamide acts as an inhibitor of electron transport, and also as an energy transfer inhibitor. This latter action of N,N-dimethylformamide was reversed by nucleotides (ADP, ATP) or phosphate.

RESUMEN

En este trabajo, se utilizó un grupo de doce maleimidias para detectar la existencia de conformaciones diferentes de la H^+ -ATPasa inducidas por luz cuando los cloroplastos son energizados. Se incluyeron cinco maleimidias monofuncionales: 1-H-pirrol-2,5-diona, etilmaleimida, metilolmaleimida, fenilmaleimida y carboxihidroxifenilmaleimida; y siete bifuncionales: clorometilmaleimida, N,N'-bismaleimida, N,N'-etilenbismaleimida, N,N'-dihidroxietilenbismaleimida, N,N'-trimetilenbismaleimida, N,N'-metileterbismaleimida y N,N'-tetrametilenbismaleimida. Los resultados mostraron lo siguiente: 1. La conformación del complejo H^+ -ATPasa promovido por luz en cloroplastos intactos y requerido para hidrolizar el ATP en la obscuridad, fue sensible a inhibición cuando los grupos -SH de la enzima fueron bloqueados químicamente o entrecruzados por las maleimidias monofuncionales y bifuncionales, 2. La Mg^{+2} -ATPasa y la ATP-sintetasa fueron inhibidas por maleimidias y bismaleimidias; el grado de inhibición es dependiente del tipo de maleimida usado, 3. Algunas de ellas produjeron efectos bifásicos en la actividad fosforilante del complejo H^+ -ATPasa unido a membrana, 4. El grado de inhibición en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa y en la síntesis de ATP fue variable; cada maleimida o bismaleimida indujo una inhibición específica y característica, 5. Asimismo, se observó que el complejo H^+ -ATPasa de cloroplastos iluminados adquiere una conformación para la síntesis del ATP que es más sensible a la inhibición por maleimidias (monofuncionales y bifuncionales), que la conformación requerida para la hidrólisis del ATP, 6. Se encontró una relación entre las distancias de los centros

reactivos de las maleimidas bifuncionales (entre 5.5 A y 9.2 A) (que presentan hidrofobicidad creciente) y su incremento en el efecto inhibitorio en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa, 7. El ADP, el ATP y el fosfato protegieron a la Mg^{+2} -ATPasa de la inhibición inducida por maleimidas, en algunos casos, la Mg^{+2} -ATPasa fue activada 100% y 140% por ATP y fosfato, respectivamente, 8. La presencia de un desacoplante (NH_4Cl) en el medio de marcaje, produjo incremento, reversión o no modificó la sensibilidad a la inhibición de la Mg^{+2} -ATPasa inducida por las maleimidas. Los resultados encontrados en el estudio con maleimidas y dismaleimidas aportan evidencias que apoyan la existencia de conformaciones específicas para la Mg^{+2} -ATPasa y para la ATP-sintetasa del complejo H^+ -ATPasa unido a membranas tilacoides en cloroplastos intactos lisados durante el ensayo. Las conformaciones diferentes de la enzima son inducidas por la luz durante la energización de la membrana del tilacoide en los cloroplastos intactos, y pueden participar de forma independiente en la fotofosforilación (en la luz) y en la hidrólisis del ATP (en la obscuridad). En la segunda parte de este trabajo, se caracterizó el efecto de la N,N'-dimetilformamida en algunas actividades fotosintéticas del cloroplasto. La N,N'-dimetilformamida inhibió tanto la formación de ATP como el flujo de electrones acoplado en cloroplastos. La inhibición del transporte de electrones fosforilante fue revertido por la presencia de cloruro de amonio a concentraciones desacoplantes. El transporte de electrones basal (- fosfato, - ADP) fue inhibido 78% por 7% (v/v) de N,N'-dimetilformamida; este efecto fue revertido parcialmente por NH_4Cl . La inhibición del transporte de electrones basal por la N,N'-dimetilformamida fue mayor con

concentraciones limitantes de fosfato (menores de 1 mM), pero fue revertido por concentraciones mayores de fosfato (6 mM) y de N,N-dimetilformamida (12-15%, v/v). La inhibición del transporte de electrones basal fue revertida cuando se incrementaron simultáneamente las concentraciones del solvente y de ADP (0-1 mM). La reacción de intercambio Pi-ATP fue inhibida por N,N-dimetilformamida en forma semejante a la inhibición de la síntesis de ATP. El consumo de protones inducido por luz no se afectó por la N,N-dimetilformamida a las concentraciones que inhibieron completamente la síntesis de ATP, y no se afectó en los cloroplastos parcialmente depletados de factor de acoplamiento 1 y tratados con ácido etilendiaminotetraacético. Sin embargo, la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa fue inhibida parcialmente, 32% por 32% de N,N-dimetilformamida, sugiriendo que CF_1 no fue el sitio principal de la inhibición del flujo de electrones por la N,N-dimetilformamida. Los fotosistemas I y II también fueron afectados. El efecto de la N,N-dimetilformamida en tilacoides fue revertido por lavado de los cloroplastos. Los resultados indican que la N,N-dimetilformamida actúa como un inhibidor del transporte de electrones y también como un inhibidor de la transferencia de energía. Este último efecto fue revertido por nucleótidos (ADP, ATP) o fosfato.

COMPOSICION DE LA ATPsintetasa, H^+ -ATPasa O COMPLEJO CF_0 - CF_1 .

En plantas superiores, la ATPsintetasa esta presente principalmente en la lamela estromal (Faludi-Danielet al, 1983). La enzima esta formada por dos segmentos: el "factor de acoplamiento" δ CF_0 localizado en la parte externa de los tilacoides y del CF_1 o segmento hidrofílico inmerso en la membrana. El factor CF_1 esta a su vez compuesto de cinco subunidades de diferentes pesos moleculares α , β , γ , δ y ϵ . El segmento CF_0 no ha sido aislado como una entidad completa pero se ha propuesto que consta de cuatro polipeptidos diferentes; tres de los cuales han sido purificados (Alt et al, 1983) y son las subunidades denominadas I, II, y III. La cuarta subunidad fue detectada hace algunos años por Fick y Racker (1979) y su existencia se confirmo recientemente utilizando el mapeo de genes del cromosoma de cloroplasto de chicharo (Cozens et al, 1986). De los nueve polipeptidos que se sabe constituyen el complejo CF_0 - CF_1 , seis son codificados en el DNA del cloroplasto. Los genes del cloroplasto que codifican para las subunidades α , β , ϵ , I y III son fotogenes (de Heij et al, 1984; Rodermel y Bogorad, 1985); mientras que los genes para las subunidades γ , δ y II estan localizados probablemente en el nucleo (Westhoff et al, 1981).

ESTRUCTURA PRIMARIA Y ORGANIZACION DEL FACTOR DE

ACOPLAMIENTO.

Si se compara la secuencia de aminoácidos de las subunidades α y β estas revelan un alto grado de homología, especialmente en sitios que pueden estar involucrados en la unión de los nucleótidos (Hove et al. 1985). Parece haber cuatro regiones donde la homología es particularmente importante ya que se observa, no solamente entre los polipeptidos α y β de los cloroplastos sino también en las proteínas equivalentes de mitocondrias y bacterias (Baroel. 1987). Así mismo las subunidades β de F_1 de diferentes organismos presentan una alta homología (Nelson y Dixon, 1984) y generalmente son de peso molecular menor que el correspondiente a las subunidades α (Merchant y Selman, 1983).

La determinación de la estructura primaria del complejo CF_1 se inició con el análisis de la secuencia del DNA de los genes que codifican para las diferentes subunidades en las siguientes especies. Las subunidades α , β y ϵ fueron secuenciadas en tabaco (Iino et al. 1983; Iino y Sugura, 1984; Shimozaki et al. 1983), las subunidades β y ϵ en maíz (Krebbers et al. 1982); las subunidades β y ϵ en espinaca (Zurawski, et al. 1982); las subunidades β y ϵ en cebada (Zurawski y Clegg, 1984). Los genes de las subunidades α , β y ϵ de chícharo, están ya localizados por lo que probablemente dentro de poco tiempo serán secuenciados (Huttly y Gray, 1984).

Se han determinado los perfiles de hidropatía de los polipéptidos de las subunidades I, III y IV de CF_0 obtenidos a

partir de la secuenciación de los genes respectivos (Cozen y Waiho, 1982). Se propone que las tres subunidades de CF_1 codificadas en el cloroplasto son proteínas membranales integrales. La subunidad I posee un segmento hidrofóbico anclado en la membrana y otro hidrofílico que se proyecta hacia el estroma formando un tallo. Se cree que CF_1 se une a CF_0 por interacción con ese tallo. La naturaleza altamente hidrofóbica de la subunidad III se relaciona con su papel propuesto en la formación del canal de protones. La subunidad IV es una proteína hidrofóbica y presenta 5 α -hélices transmembranales, una de ellas probablemente interaccione con la subunidad III para formar el canal (Hudson y Mason, 1988).

ESTEQUIOMETRIA DEL COMPLEJO CF_0 - CF_1 .

Determinaciones recientes del peso molecular del complejo CF_1 dan un valor de 400 KD, en vez de 325 KD que hasta hace algunos años había sido reportado para CF_1 de espinacas (Moroney et al, 1983) y de *Clamydomonas reinhardtii* (Merchant et al, 1983). Estos resultados son consistentes con una estequiometria de α , β , y δ a la cual está de acuerdo con el análisis utilizando $[^{14}C]CF_1$ uniformemente marcado (Merchant et al, 1983; Süss y Manteuffel, 1983). Por otro lado Serzbon et al (1984) proponen que la verdadera estequiometria es de tres subunidades δ por CF_1 , y las bajas estequiometrias de δ reportadas hasta ahora podrían deberse a que la subunidad δ se pierde fácilmente durante la purificación de CF_1 (Moase y Green, 1981; Finel et al, 1984).

Con microscopia electronica y tincion negativa de la CF₁ se ha observado con una simetria de seis secciones (Moase y Green, 1981; Aley et al, 1983) o una de tres cuando las subunidades α se han unido a anticuerpos monoclonales especificos anti α (Tiedge et al, 1984). Todos estos resultados estan de acuerdo con una estequiometria $\alpha_3 \beta_3$.

Por otro lado, la estequiometria relativa de las subunidades de CF₁ aun es materia de debate pero frecuentemente se asume que seis copias de la subunidad III constituyen un canal de forma hexagonal a traves de la membrana y que la subunidad II ayuda a mantener esta organizacion estructural. Los papeles de las subunidades I y IV no son claros pero puede ser que funcionen haciendo mas fuerte la asociacion de la CF₁ con el canal conductor de protones formado por el hexamero de las subunidades III (Barber, 1987).

ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL FACTOR DE ACOPLAMIENTO.

La estructura secundaria de cada subunidad del complejo F₁ de *Escherichia coli* ha sido inferida de la secuencia de aminoacidos. La organizacion de las cadenas peptidicas en la membrana tambien ha sido propuesta a partir de la hidropatia calculada con la secuencia de aminoacidos (Hoppe y Sebald, 1984; Walker et al, 1984). Comparaciones de las secuencias de aminoacidos en F₁ de *Escherichia coli* y CF₁ de organismos fotosinteticos permiten la

predicción de arreglos de las cadenas peptídicas para estos organismos. En tabaco las subunidades α y β poseen una secuencia de sesenta y seis residuos aminoácidos iguales (Weno y Sugita, 1984) que participan de una manera semejante en la unión de nucleótidos en otras enzimas que los unen para su actividad (Tanazawa et al. 1982). El porcentaje de homología de aminoácidos de las diferentes subunidades β hasta ahora secuenciadas es de cerca de 90% (Shinozaki et al. 1983) y corresponde con la conservación de la estructura secundaria entre los diferentes organismos.

La organización de las subunidades se ha investigado por entrecruzamiento químico (Rott y Nelson, 1984) y por la accesibilidad a anticuerpos específicos (Klein-Hitpass y Eerzborn, 1984). Se ha propuesto que las subunidades α y β están arregladas alternativamente y forman un hexámero estabilizado por la succinamida γ que constituye el centro del complejo (Barber, 1987). A su vez las subunidades I y II del CF_n están en contacto con δ y ϵ sugiriendo su papel en la unión de CF_1 a CF_n .

Se han utilizado algunos métodos físicos para estudiar la organización general del complejo CF_1 por ejemplo el dichroísmo circular ha proporcionado información acerca de los cambios conformacionales, en CF_1 de espinacas, que se deben a la unión de sustrato (Younish et al. 1983). Empleando sondas fluorescentes se han (Pick y Finel, 1983) marcado sitios específicos de CF_1 , incluyendo los siguientes: (i) tres sitios de unión de nucleótidos, cada uno con distintas características, localizados

si los polipeptidos β (Cerione et al, 1983); (2) un puente disulfuro, unico, en el polipeptido γ (Snyder y Hammes, 1984); (3) un grupo sulfhidrilo muy reactivo, unico, en el polipeptido γ (Cerione et al, 1983); (4) un grupo sulfhidrilo en el polipeptido γ que puede marcarse solo cuando los tilacoides son incubados en la luz y en la presencia de reactivos sulfhidrilo (Cerione et al, 1983; Snyder y Hammes, 1984); (5) un grupo sulfhidrilo, unico, en el polipeptido ϵ (Federsen y Carafoli: 1987), (6) una tirosina especifica en cada uno de los polipeptidos β (Snyder y Hammes, 1985). Las mediciones de transferencia de energia fluorescente han servido para establecer en forma general un mapa estructural del CF₁ de cloroplastos; se ha establecido que esta molecula es intrincadamente asimetrica, con los sitios de union de nucleotidos lejos de la superficie de la membrana, que una region regulatoria esta localizada entre los sitios de union de los nucleotidos y la membrana (McCarty y Hammes, 1987).

FUNCIONALIDAD DE LAS SUBUNIDADES.

Se han señalado algunas propiedades funcionales de las diferentes subunidades del complejo CF₁-CF₀. Por ejemplo, las subunidades α y β fijan nucleotidos (Deno y Sugiura, 1984; Kanazawa et al, 1982) y se piensa que β posee los sitios cataliticos. Se han identificado algunos residuos especificos de esta subunidad y los sitios donde se une el DCCD en bacterias termoflicas, PS₂ en *E. coli* y en mitocnondrias corresponden respectivamente a los acidos glutamicos 204 y 215 de la subunidad

β del III: en espinacas (Hoshida y Allison, 1983). La sonda de fotoafinidad 5'-azido ATP, que se une a tres aminoácidos de la subunidad β de mitocondrias (Holleman et al, 1983) correspondientes a la leucina 317, la isoleucina 321 y la tirosina 328 de las subunidades homólogas en espinaca, localizadas en una zona de la cadena peptídica de la subunidad β denominada "doblez Rossman", la cual es esencial para la actividad catalítica (Kanazawa et al, 1983a). En organismos fotosintéticos la utilización de los análogos de nucleótidos con fotoafinidad marca las subunidades α y β o β únicamente dependiendo de la conformación "syn" o "anti" de la sonda (Czarnecki et al, 1982; Czarnecki et al, 1983; Abbott et al, 1984). La conformación "anti" se requiere para que los nucleótidos sean un buen sustrato (Czarnecki, 1984).

Recientemente Frasch y colaboradores (1989) obtuvieron preparaciones de subunidad β de CF₁ de cloroplastos que catalizan la hidrólisis de ATP dependiente de Mg⁺² a velocidades comparables a otras preparaciones de CF₁, deficientes de alguna subunidad.

Se ha demostrado que la subunidad γ es necesaria para que el complejo α - β reconstituido de *E. Coli* (Kanazawa et al, 1983 b) y de *S. Bacterium PS3* (Kagawa et al, 1984) desarrolle actividad de ATPasa, sin embargo en organismos fotosintéticos dicha reconstitución a partir de subunidades aisladas no se ha logrado, *in situ* la subunidad γ forma el centro del complejo α - β y regula su actividad por inducción de cambios conformacionales. La subunidad γ en cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum* es necesaria

para la fotofosforilación (Mehnersvill) y Gromet-Elhanan, 1983). La subunidad γ del CF₁ de espinacas contiene un puente disulfuro S₁-S₂ y dos residuos sulfhidrilo S₃-S₄ (Nalin y McCarty, 1984; Moroney et al, 1984; Ketcham et al. 1984), los cuales pueden oxidarse para formar un puente disulfuro o pueden entrecruzarse con algunos compuestos químicos, induciendo una salida de protones a través de la membrana del cloroplasto, indicando que la subunidad γ funciona como una "compuerta" de protones. El grupo sulfhidrilo S₃ es esencial para la actividad de ATP sintetasa y es el único grupo SH conservado en todas las subunidades γ de diferentes organismos. La reducción del puente disulfuro S₁-S₂ induce la actividad de ATPasa en cloroplasto y no se encuentra en la subunidad γ de *E. Coli* ni de mitocondrias.

Durante mucho tiempo se propuso que la subunidad δ actuaba como el sitio de unión F₁ y F_o. Esta proposición ha sido denegada por algunos autores como Berzbon et al (1984) y Patrie y McCarty (1984). Quienes sugieren que la subunidad δ parece ser principalmente necesaria para prevenir la salida inespecífica de protones a través de CF_o y no se requiere para la fotofosforilación.

La subunidad ϵ es un inhibidor de la actividad ATPasa, adicionada al CF₁ aislado (Finel et al, 1984; Richter et al, 1984), el cual sin ella posee una actividad de ATPasa dependiente de Ca²⁺ sin embargo esta preparación no se reasocia a tilacoides depletados de CF₁ a menos que se le adicione la subunidad ϵ (Richter et al, 1984) la cual, no se requiere directamente en

... de la membrana, pero su presencia previene, igual que la subunidad δ la salida inespecifica de protones a través de CF₁.

PROPIEDADES CATALITICAS DE CF₁.

a) Proceso de activacion.

CF₁ es una ATPasa latente y para que manifieste su funcion catalitica debe ser activada. La activacion in situ de la enzima unida a membrana ocurre por energizacion de la membrana. La activacion de CF₁ aislado-latente se puede realizar por tratamientos con tripsina (Vambutas y Racker, 1965), calor (Farron, 1970; Farron y Racker, 1970), ditritreitol (DTT) (McCarty y Racker, 1968), detergentes (Pick y Bassilian, 1982), o alcoholes (Anton y Jagendorf, 1986).

En presencia de MgCl₂ la actividad hidrolitica de la F₁ ATPasa mitocondrial soluble es activada por concentraciones mayores de 10mM de F₁ (Penefsky, 1974). La activacion tambien ha sido observada cuando parte del agua del medio de incubacion es reemplazada por un solvente organico como el dimetilsulfoxido, etilenglicol, dimetilformamida, etc. (de Meis, 1987; Sakamoto y Ionomura, 1983; Tuena de Gomez-Fuyou et al, 1984). Resultados similares se obtuvieron en diferentes laboratorios utilizando dinein 1 adenosina trifosfatasa de esperma de erizo de mar (Evans y Gibbons, 1986), pirofosfatasa de bacterias fotosinteticas *Rhodospirillum rubrum* (de Meis et al, 1985) y Ca²⁺-ATPasa de reticulo sarcoplasmico (de Meis et al, 1980).

El metanol y el DII son otros dos activadores de la ATPasa unida a membrana y la activación es reversible (Anthon y Jagendorf, 1983). Es muy probable que la activación sea el resultado de un cambio en la estructura de la proteína y dependerá del método empleado para activar si la estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria sea la afectada, por lo que no puede plantearse un mecanismo común involucrado en el proceso de activación.

Como se mencionó, la subunidad ϵ es considerada un inhibidor intrínseco de la actividad ATPasa en CF_1 soluble. Los tratamientos físicos que inducen la actividad ATPasa (Anthon y Jagendorf, 1983; 1984) liberan la subunidad ϵ de la enzima. El tratamiento con calor (Fratie y McCarty, 1984), o con etanol (Richter et al, 1984) desplazan a la subunidad ϵ sin cambiar el estado de oxidación de los puentes disulfuro presentes en las otras subunidades de CF_1 . Los tratamientos químicos que inducen la actividad ATPasa en CF_1 soluble no liberan la subunidad ϵ únicamente modifican el estado redox de los puentes disulfuro presentes en las subunidades. Esa activación por "tiolos" correlaciona con la reducción del puente disulfuro ($S_1 - S_2$) en la subunidad γ y la activación proteolítica con la hidrólisis parcial de la subunidad α (Nalin y McCarty, 1984; Ketchum et al, 1984).

Los tratamientos de activación de CF_1 con tripsina, calor o DII manifiestan una actividad de ATPasa dependiente de Ca^{+2} en condiciones normales de ensayo (Vambutas y Racker, 1965), a

diferencia de la activación con el detergente neutro octilglucosido, el cual genera una ATPasa dependiente de Mg^{+2} (Fici y Bassilian, 1982). La especificidad al cation Ca^{+2} o Mg^{+2} también puede cambiarse por la adición de malato a pH 6 o de bicarbonato a pH 8 (Hochman y Carmeli, 1981b; Nelson et al, 1972) y por otros ácidos débiles. La especificidad al ion Mg^{+2} o Ca^{+2} depende de una compleja interacción con el ATP, ya que el sustrato real de la enzima es el complejo ATP-ión metálico y no el ATP libre. Por el contrario el ATP libre y los iones metálicos libres a concentraciones elevadas actúan como inhibidores competitivos. Los iones (Mg^{+2} , Ca^{+2}) que forman el sustrato más activo son a su vez los inhibidores más potentes en su forma libre. El mejor sustrato es el ATP- Mg^{+2} , aunque otros nucleótidos con el anillo purínico como el GTP y el ITP también son hidrolizables, sin embargo, las pirimidinas como el UTP y el CTP no son hidrolizadas (Vambutas y Raker, 1965). La comparación en la especificidad de los sustratos para ATPasa y ATP-sintetasa dan resultados semejantes (Frank y Strotmann, 1981).

Durante la activación de la ATPasa del complejo CF_1 - CF_0 unido a membrana existen dos fenómenos; primero, la formación de un potencial protonmotriz ($\Delta \bar{\mu}H$) a través de la membrana y segundo, la inducción de un cambio conformacional en el segmento CF_1 de la ATPasa exponiendo el residuo S_3 y haciendo accesible el puente disulfuro S_1 - S_2 a la ruptura por reducción de dicho puente. A la inversa los grupos tiol S_1 , S_2 se protegen de los agentes oxidantes en presencia del $\Delta \bar{\mu}H$ y se exponen cuando el $\Delta \bar{\mu}H$ se cancela (Shahak, 1985). Estos dos procesos que llevan a la activación de

la ATPasa membranaral son reminiscentes de la accion dual del calor y agentes reductores disulfuro empleados para activar la ATPasa de CF₁ aislado (Walton y McCarty, 1984). En cloroplastos el agente reductor disulfuro natural es una tioredoxina (Mills y Mitchell, 1984). Graber et al, (1984) y Mills y Mitchell, (1984) proponen que la activacion de la ATPasa es causada por la protonacion y desprotonacion de residuos sulfhidrilo de la ATPasa. Con CF₁-CF₀ reconstituido en liposomas las actividades ATPasa y AIF-sintetasa dependen de la naturaleza de los fosfolipidos usados (Fick, 1982). En bacterias fotosinteticas la activacion de la ATPasa parece presentar diferentes mecanismos. El punto comun es que con la activacion de la enzima se produce tambien una activacion de la hidrolisis de AIF en la oscuridad como para la sintesis de ATP dependiente de luz (Vallejos et al, 1983).

b) Efecto del gradiente de protones.

Es claro que la sintesis de AIF esta acoplada al flujo de protones de adentro hacia afuera del tilacoide y que depende del valor del $\Delta \mu H^+$ a traves de la membrana.

Se ha reportado una estequiometria de 3 para la relacion H^+ a AIF durante la sintesis de ATP en cloroplastos (Davenport y McCarty, 1984) y con CF₁-CF₀ reconstituido en liposomas (Dewey y Hammes, 1981). Sin embargo, se han encontrado relaciones entre 2 y 8 en liposomas reconstituidos con ATPasas de mitocondria, de levadura y con bacteriorrodopsina (Van der Bend et al, 1984), y estas parecen depender de la naturaleza de los lipidos usados. Lemaire et al (1984) encontraron una relacion H^+ /ATP de entre 2 y 4 durante la induccion por flashes de la actividad ATP-sintetasa

en cloroplastos de cianobacterias y que parece ser dependiente del estado de energización del cloroplasto.

Hangerter y Good (1984) y Flores y Ort (1984) indican que no todos los protones que se translocan debido al funcionamiento de los fotosistemas en el tilacoide tienen la misma eficiencia para la síntesis de ATP, ya que, el fotosistema I es más eficiente y se complementan cuando los dos fotosistemas trabajan en serie. Sin embargo Davenport y McCarty (1984) no encuentran ninguna diferencia entre los protones generados por la excitación de los dos fotosistemas. No obstante muchos resultados experimentales se han interpretado por la existencia de ciertos dominios en los tilacoides donde los protones no están equilibrados con el resto de la fase acuosa (Dilley y Schreiber, 1984; Laszlo et al, 1984; Hong y Jung, 1983; Junge et al, 1984; Schreiber, 1984a, b).

Como se ha mencionado el complejo ATP-sintetasa de mitocondrias, cloroplastos y bacterias cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i usando la energía del gradiente proton-electroquímico derivado del transporte de electrones. El mecanismo por el cual esas enzimas usan la energía derivada del gradiente no se conoce.

Boyer y colaboradores (Boyer et al 1973, 1977, 1982) observaron que la F_1 soluble cataliza un intercambio entre el oxígeno del agua y el oxígeno del fosfato. Estos estudios y otros en CF_1 particulada indican que la energía del gradiente de protones no es necesaria para la síntesis de ATP en el sitio

catalítico de la enzima. El NO, que este sirve para incrementar la actividad de la enzima por F₁ y permitir la disociación de AIF fuertemente unido a la enzima y que ha sido formado espontáneamente.

Recientemente se ha demostrado que en F₁ soluble y en ausencia de gradiente se sintetiza ATP a partir de ADF y F₁ del medio cuando parte del agua de este ha sido reemplazada por diferentes solventes orgánicos (Gomez-Puyou et al 1986, Sakamoto 1984, Yoshida 1983). Por otro lado se observó que la actividad AIFase de F₁ se inhibe en presencia de concentraciones de solvente orgánico que estimulan al máximo la síntesis de ATP (de Meis, 1985).

SITIOS DE UNIÓN DE NUCLEOTIDOS.

Los nucleótidos unidos a CF₁ aislado han sido investigados por un gran número de grupos (Banai et al, 1978; Bruist y Hammes, 1981; Girault y Galmiche, 1977; Shoshan et al, 1978; Van der Meulen y Govindjee, 1977). El número de nucleótidos incorporados por molécula de CF₁ así como las características de la unión parecen depender ampliamente del nucleótido suplementado al medio y de la ausencia o presencia de iones metálicos (Banai et al, 1978; Girault et al, 1982). Se han observado tres sitios de unión de nucleótidos con características distintas en CF₁ aislado: uno donde hay un ADF por molécula de enzima que permanece unido a esta aun después de diálisis prolongada o filtración en gel, Bruist y

Hammes (1981) demostró que este sitio particular de unión de nucleótidos "sitio 1" e indican que no es idéntico al sitio catalítico, ya que en la enzima activada con calor la velocidad de intercambio del ADP es 100 veces menor que la velocidad de hidrólisis de ATP. Los mismos autores (1982) reportaron que en la presencia de Ca^{+2} el CF_1 activado por calor se inactiva por la unión de ADP al sitio 1, pero no por ATP. En la presencia de Mg^{+2} se une un ATP a otro sitio (sitio 2) del cual no es removido por diálisis, filtración en gel o durante el recambio catalítico de la enzima en presencia de Ca^{+2} -ATP (Bruist y Hammes, 1981). Por la técnica de diálisis forzada, se detecta la unión reversible de ADP y ATP a un tercer sitio (sitio 3) con K_d de $4 \mu\text{M}$ para CF_1 aislado o de $2 \mu\text{M}$ para el complejo CF_0 - CF_1 reconstituido en liposomas (Bruist y Hammes, 1982; Cerione y Hammes, 1982) existen más de uno de estos sitios por enzima (Girault et al, 1988), y se cree que este es el sitio catalítico.

El contenido intrínseco de ADP reportado para CF_1 purificado, aun después del tratamiento para remover el ADP residual, es de 0.5 a 1 ADP por CF_1 (Girault et al, 1982). CF_1 - CF_0 contiene por lo menos 1 ADP y 1 ATP por mol (Cerione y Hammes, 1981). Filamentos iluminados en presencia de ^{14}C ADP unen 0.85 (Schumann, 1984) a 1.3 moles de nucleótido radioactivo (Rickel-Sandkotter, 1983) por mol de CF_1 bajo condiciones de estado estacionario de la actividad enzimática. Sin embargo además de ese nucleótido radioactivo, nucleótidos no intercambiables y no radioactivos deben estar presentes.

Recientemente Girault y colaboradores (1988) caracterizaron seis sitios de union de nucleotidos en CF₁ aislado, e indican la presencia de dos sitios de alta afinidad para ADP o ATP ($K_d=1-5 \mu M$) un sitio con ADP endogeno no intercambiable, y tres sitios de baja afinidad que unen ADP o ATP con una constante de disociacion $K_d = 15-20 \mu M$, la estabilidad de los nucleotidos en los sitios de baja afinidad se incrementa por la activacion de CF₁ por calor, y la remocion de las subunidades σ o ϵ no afecta ni el numero ni los parametros de union de los sitios.

CF₁ contiene dos categorias de sitios de union de nucleotidos: los denominados "de union fuerte" con K_d de 10^{-7} o menor y los de "union debil" con una K_d mayor. Con el CF₁ unido a membrana las afinidades por los nucleotidos se modifican por la interaccion de la enzima con la membrana del tilacoide, por energizacion luminosa y por la fuerza proton motriz resultante; en esta forma uno de los denominados sitio "de union fuerte" en CF₁ aislado puede trasformarse en uno "de union debil" cuando CF₁ este unido a membrana (Galmiche et al, 1985). La activacion de la ATPsintetasa en tilacoides tiene como caracteristica la de intercambiar sus nucleotidos unidos con los nucleotidos libres del medio (Harris y Slater, 1975; Strotmann et al, 1979).

Parte de los nucleotidos unidos en la ATPasa de cloroplastos son intercambiables, mientras que otra parte no. Con concentraciones altas de ADP en el medio y en la luz aproximadamente 35% del total de moleculas de la enzima contienen ADP unido debilmente y 65% ADP unido fuertemente; y prácticamente

ninguna molécula de enzima está libre de ADP (Schumann, 1984).

REGULACION DE LA ATPasa.

Se sabe que para que la fotofosforilación tenga lugar deben establecerse valores críticos de ΔpH y $\Delta \psi$; según Graber y Schlodder (1981), la fotofosforilación como una función del ΔpH está limitada por la fracción de moléculas de ATPasa activas cuando el potencial de fosfato es bajo. Pero cuando el potencial de fosfato es alto, la hidrólisis de ATP sucederá a bajos ΔpH antes que la síntesis de ATP tome lugar con el incremento en el ΔpH . Sin embargo, la regulación del proceso global parece incluir otros controles cinéticos en adición al control termodinámico y a la activación de la enzima.

La fotofosforilación por la enzima CF_1 en cloroplastos rotos (tilacoides intactos) sucede casi linealmente con el tiempo hasta que la mayor parte del ADP es convertido a ATP. La velocidad de hidrólisis de ATP en cloroplastos rotos iluminados es más lenta que la velocidad de hidrólisis en la oscuridad cuando la ATPasa se activa previamente con luz, aun en la presencia de D11 más arsenato, o fosfoenol piruvato (PEP)/piruvato cinasa que elimina la resíntesis de ATP (Sherman y Wimmer, 1982). Bajo condiciones fosforilantes, la afinidad aparente para el ATP es menor, por un orden de magnitud, que la afinidad por el ADP. En el cambio a hidrólisis neta (oscuridad) en membranas, la afinidad para el ATP se incrementa dramáticamente (Franek y Strotmann, 1981). Estos

resultados podrían indicar que existen dos conformaciones activas diferentes de la enzima: una es específica para la unión de ADP y cataliza preferencialmente la formación neta de ATP, y otra es especializada para unir ATP y catalizar su hidrólisis (Frank y Strotmann, 1981).

Algunas otras evidencias que permiten llegar a la misma conclusión, se mencionan a continuación. Por ejemplo, en cloroplastos modificados covalentemente por glutaraldehído se observó inhibición diferencial de la síntesis de ATP y del intercambio $F_1:ATP$ "disparado" con luz (Bar-Zvi y Shavit, 1983). Snosnan y Shavit (1979) reportan inhibición diferencial producida por anticuerpos a CF_1 en la síntesis e hidrólisis del ATP en membranas de cloroplastos. Estudios respecto al intercambio F_1-H_2O en cloroplastos han mostrado que la inhibición de la hidrólisis de ATP por luz no es producida por un cambio en las constantes de velocidad involucradas en la hidrólisis y la disociación del producto, y puede ser explicada asumiendo cambios en la proporción de dos especies enzimáticas activas (Shermann y Wimmer, 1982).

EFEECTO DE BLOQUEADORES DE GRUPOS SH.

La activación de la ATPasa dependiente de energía está relacionada, probablemente, a un cambio conformacional de la enzima. La ocurrencia de dichos cambios conformacionales se ha demostrado por incorporación de agua tritiada en CF_1 (Ryrie y Jagendorf, 1972), también el cambio conformacional ha sido

monitoreado por otros métodos por ejemplo, por la liberación de azoanilínicos (Schlodner y Witt, 1981; Strotmann y Bichel-Sandkotter, 1977), la fluorescencia de isotiocianato de eosina covalentemente unido (Wagner y Junge, 1982) y la incorporación de N-etilmaleimida (NEM) en CF_1 (McCarty y Fagan, 1972). El reactivo para grupos sulfhidrilo NEM y su analogo fluorescente N-(1-anilino-naftil-4)maleimida (Nalin et al, 1983) se unen a las subunidades γ y δ . Por energización de las membranas un grupo -SH adicional se modifica en γ , y ésta reacción se previene por desacoplantes, así como por ADP y Pi (McCarty y Fagan, 1972; Weiss y McCarty, 1977). La maleimida bifuncional *o*-phenilendimaleimida (OPDM) entrecruza los grupos -SH de γ ; el accesible en la oscuridad y el accesible en la luz, incrementando la permeabilidad a protones de la ATPasa unida a membrana (Weiss y McCarty, 1977). Por lo que se cree que el grupo -SH que se expone por energización de la membrana juega un papel esencial en la salida de protones a través del complejo CF_0CF_1 (Weiss y McCarty, 1977).

Experimentos previos con bismaleimidias que tienen diferente longitud entre los dobles enlaces electrofilicos reactivos (centros reactivos), mostraron que estos compuestos inhiben la fotofosforilacion en diferente grado.

Debido a que las bismaleimidias son moléculas flexibles, pueden alcanzar diferentes conformaciones y por lo tanto podrian reaccionar con grupos -SH a distancias menores de las de los límites de su conformacion completamente extendida.

Durante la fosforilación, se postula que el sitio catalítico de F_1 sufre una transición hidrofóbico-hidrofílica (Federsen y Carafoli 1987) y es de esperar que los grupos -SH, esenciales y no esenciales para la síntesis e hidrólisis del ATP, localizados en las distintas subunidades del complejo H^+ -ATPasa puedan encontrarse en ambientes con diferente hidrofobicidad o hidrofiliidad por lo que, dependiendo del microambiente en el que se localicen dichos grupos -SH serán o no accesibles a maleimidas con diferentes coeficientes de reparto.

OBJETIVOS

La primera parte de este trabajo se fundamentó en el siguiente planteamiento: dado que los cambios conformacionales que suceden en la H^+ -ATPasa de cloroplastos por energización de la membrana, exponen grupos funcionales (-SH), es probable que el estado redox de esos grupos, en las diferentes subunidades de la enzima correlacionen con la actividad enzimática.

El primer objetivo pretende dilucidar si el cambio conformacional que adquiere el complejo H^+ -ATPasa para la síntesis de ATP es igual o diferente al que requiere para la hidrólisis.

Para responder a este objetivo se utilizó un grupo de doce maleimidas, monofuncionales y bifuncionales, que poseen una gama amplia de coeficientes de reparto y diferentes distancias entre

los centros reactivos, entre 0.54 y 0.59, de las difuncionales, y se evaluó su efecto en las actividades ATPasa y AIF-sintetasa generadas por energización, con luz, de cloroplastos de plantas.

La enzimología *in vitro* usualmente se efectúa en medios acuosos, frecuentemente bajo la consideración de que el agua representa el solvente real *in vivo*. Sin embargo se ha sugerido que el microambiente de las enzimas unidas a membranas, como la H^+ -ATPasa, y complejos multienzimáticos podría ser menos polar que el de un medio totalmente acuoso (Masters, 1981; Cooley y Wolosiuk, 1985). A la fecha no es claro el papel de las modificaciones en el microambiente en la regulación enzimática. El uso de solventes orgánicos para la estabilización de enzimas o para la modificación de la actividad catalítica ha contribuido al entendimiento del efecto de la polaridad del medio en las enzimas. En el campo de la bioenergética el uso de los disolventes orgánicos ha sido una herramienta valiosa para el estudio y entendimiento de la estructura y propiedades del complejo H^+ -ATPasa (F_0-F_1).

En el transcurso de nuestra investigación con maleimidas se observó que algunas de ellas son poco solubles en agua por lo que se seleccionaron algunos solventes orgánicos como: N,N-dimetilformamida (DMF), acetato de etilo, tetrahidrofurano, dimetoxietano e isopropanol, para solubilizarlas y adicionarlas a los medios de ensayo; al realizar los controles pertinentes, sin maleimidas, de algunas actividades fotosintéticas en presencia de estos solventes, observamos que la dimetilformamida producía efectos dramáticos en dichas actividades del cloroplasto. Por lo

que el siguiente objetivo de este trabajo fue, caracterizar el efecto de la dimetilformamida sobre algunas reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis en cloroplastos.

(1) COMPUESTOS QUÍMICOS, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO.

Los materiales empleados en este trabajo fueron obtenidos de las fuentes abajo indicadas: semillas de chicharo (Productora Nacional de Semillas), $^{32}\text{P}[\text{Pi}]\text{Pi}$ (ICN) purificado por el método descrito por de Meis (1984), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ preparado de acuerdo a Glynn y Chappel (1964). Los nombres y estructuras de las maleimidas y dimetilformamida empleadas en este trabajo se presentan en la tabla I y las fuentes de obtención se indican enseguida. N-etil-maleimida, 1-H-pirrol-2,5-diona y N-(4-carboxi-3-hidroxifenil)-maleimida (SIGMA Chemical Co.); N,N-dimetilformamida (MERCK); N-metilol-maleimida y N-N',etilenbismaleimida fueron sintetizadas según lo reportado por Lawney et al (1961) y Hedaya et al (1966) respectivamente; N-N',bismaleimida, N-clorometilmaleimida y N-N',dihidroxietilenbismaleimida fueron sintetizadas según Silva (1981); N-fenilmaleimida (Aldrich), N-N'-trimetilenbismaleimida y N-N'-tetrametilenbismaleimida fueron sintetizadas por el método reportado por Savers (1969).

(2) OBTENCIÓN DE PLANTAS DE CHICHARO.

Desde hace ya varios años en nuestro laboratorio se han aislado cloroplastos para tres propósitos principales:

(a) Estudio de fotofosforilación, transporte de electrones, y liberación de oxígeno en presencia de oxidantes naturales y

los centros reactivos, entre 3.54 y 9.24, de las pirifonales, y se evaluó su efecto en las actividades ATPasa y AIF-sintetasa generadas por energización, con luz, de cloroplastos de plantas.

La enzimología *in vitro* usualmente se efectúa en medios acuosos, frecuentemente bajo la consideración de que el agua representa el solvente real *in vivo*. Sin embargo se ha sugerido que el microambiente de la enzimas unidas a membranas, como la H^+ -ATPasa, y complejos multienzimáticos podría ser menos polar que el de un medio totalmente acuoso (Masters, 1981; Cooley y Wolosiuk, 1985). A la fecha no es claro el papel de las modificaciones en el microambiente en la regulación enzimática. El uso de solventes orgánicos para la estabilización de enzimas o para la modificación de la actividad catalítica ha contribuido al entendimiento del efecto de la polaridad del medio en las enzimas. En el campo de la bioenergética el uso de los disolventes orgánicos ha sido una herramienta valiosa para el estudio y entendimiento de la estructura y propiedades del complejo H^+ -ATPasa (F_0-F_1).

En el transcurso de nuestra investigación con maleimidias se observó que algunas de ellas son poco solubles en agua por lo que se seleccionaron algunos solventes orgánicos como: N,N-dimetilformamida (DMF), acetato de etilo, tetrahidrofurano, dimetoxietano e isopropanol, para solubilizarlas y adicionarlas a los medios de ensayo; al realizar los controles pertinentes, sin maleimidias, de algunas actividades fotosintéticas en presencia de estos solventes, observamos que la dimetilformamida producía efectos dramáticos en dichas actividades del cloroplasto. Por lo

distintos al CO_2 .

(b) Asimilación de carbono.

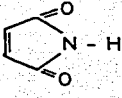

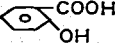
(c) Análisis de componentes estructurales y enzimas. El material biológico a usar, la extracción y el ensayo son establecidos dependiendo del propósito para el cual los cloroplastos serán usados.

Se han aislado cloroplastos con diversos usos de una serie amplia de vegetales; sin embargo los más comúnmente empleadas son: chicharo (*Pisum sativum*), espinaca (*Spinacea oleracea*), lechuga (*Lettuca sativa*) y maíz (*Zea mais*).

La planta que utilizamos en este trabajo fue el chicharo ya que puede crecerse en el laboratorio con relativa facilidad. Es preferible usar una variedad enana con germinación uniforme. La principal ventaja del chicharo es que en condiciones apropiadas puede crecer en suelo o en un medio inerte (como vermiculita) sin mostrar señales de deficiencia mineral, si la luz, temperatura y humedad se mantienen constantes; lo que conduce a la obtención de material vegetal reproducible.

La siembra y cultivo de las plantas de chicharo se realizó de la siguiente manera; se humedecieron con agua entre 35 y 40 g de semillas de chicharo durante una noche. Para lograr humidificación completa y evitar la contaminación de las semillas por fermentación se colocaron en un fragmento de gasa (de aproximadamente 20cm X 20cm) que se sujetó a la llave del agua, se hizo fluir el agua (goteando) y se mantuvo así durante 12 o 15 horas.

Tabla I. Compuestos ensayados.

Nombre	Estructura	Distancia entre centros reactivos (A)
N,N'-dimetilformamida (DMF)	H-CO-N-(CH ₃) ₂	—
1-H-pirrol-2,5-diona	 (M)	—
	radical maleimido	
N-etilmaleimida (NEM)	M-CH ₂ CH ₃	—
N-metilolmaleimida	M-CH ₂ OH	—
N, fenilmaleimida	M- 	—
N-(4-carboxi-3-hidroxi- fenil)maleimida	M- 	—

Continuación Table 1:

Nombre	Estructura	Distancia entre centros reactivos (Å)
N-cloro metil- maleimida	M-CH ₂ Cl	3.5
N,N'-bismaleimida	M-M	5.5
N,N'-etilenbismaleimida	M-(CH ₂) ₂ -M	7.5
N,N'-dihidroxi-etilen- bismaleimida	M-(CH-OH) ₂ -M	7.5
1,3-trimetilen- bismaleimida	M-(CH ₂) ₃ -M	8.3
Bismaleimidometileter	M-CH ₂ -O-CH ₂ -M	8.8
1,4-tetrametilen bismaleimida	M-(CH ₂) ₄ -M	9.2

Las semillas se sembraron en suelo húmedo a una o dos cm de profundidad contenido en charolas de plástico (de 25cm x 35cm) con una altura de 8cm o mas. Las plantas se utilizaron despues de 2 o 3 semanas de crecimiento a 22°C, con fotoperiodo de 11 horas de luz (aproximadamente a 1500 lux) por 13 de oscuridad al día, y riego cada 3 o 4 días.

(3) OBTENCION DE CLOROPLASTOS INTACTOS.

La fotofosforilacion ha sido estudiada ampliamente en cloroplastos lavados, se trata de cloroplastos rotos que han perdido su envoltura externa y el contenido estromal (membranas tilacoides aisladas). (Jagendorf, 1977). Esos estudios sugieren que la enzima (H^+ -ATPasa, factor de acoplamiento o CF_0 - CF_1) puede existir en diferentes estados o conformaciones que tienen diferente actividad dependiendo de las condiciones experimentales usadas para su obtencion.

Los cloroplastos lavados practicamente no catalizan la hidrolisis de ATP a ADP y P_i , aun cuando el sustrato se fije al sitio activo (Wimmer y Rose, 1977). El factor de acoplamiento tiene una actividad latente de ATPasa ya que la incubacion de CF_0 - CF_1 , unido a la membrana del tilacoide, cerca de su pH dual óptimo (pH 8 del lado de CF_1 externo y pH 5 interno, del lado de CF_0) en presencia de ditiolos (reactivos sulfhidrilo) como cisteina, ditiotreitolo o ácido lipoico permite la expresion de la actividad ATPasa, dependiente de Mg^{2+} y/o Ca^{2+} (Kaplan y

Se ha propuesto que los ditiolos modifican al complejo CF₁-CF₀ convirtiéndolo de una conformación que no cataliza la hidrólisis neta de ATP a una que sí lo hace. El mecanismo por el cual ocurre esto, o por que la actividad de ATPasa no se expresa en la enzima no modificada es motivo de controversias. Por otro lado, existe duda de si la modificación del factor de acoplamiento con ditiolos tiene o no alguna significancia fisiológica.

En la realización de éste trabajo se planteó la necesidad de ensayar la actividad de ATPasa en cloroplastos bajo condiciones semejantes a la activación *in vivo*, es decir, con luz, con el sistema enzimático endógeno del cloroplasto y sin adición de ditiolos exógenos. Se ha indicado que los cloroplastos intactos efectúan prácticamente todas las actividades fotoquímicas que realizan los cloroplastos cuando se encuentran en la hoja. Por esto se eligió la técnica de aislamiento de cloroplastos intactos y activación de ATPasa propuesto por Mills et al (1980) que se describe a continuación.

Se cosecharon 50-60g de plantas de chícharo cortadas aproximadamente un centímetro por encima del suelo. Se lavaron con agua destilada y seccionaron en segmentos menores de 0.5cm, se colocaron en vaso de licuadora que contenía 150ml de medio de aislamiento a 4°C, con la siguiente composición:

Sorbitol	0.35	M
Acido Ascorbico	5	mM

Acido 2-(N-morfolino)etano
sulfónico (MES) 20 mM
ajustado a pH 6.5 con KOH.

Se homogeniza en licuadora (Osterizer Custom Mod. L-21) por 5 segundos a máxima velocidad y filtro a través de 20 capas de gasa previamente humedecida con medio de aislamiento. El filtrado se centrifuga a 3000 x g por 4 min a 4°C. El precipitado (cloroplastos) se lava una vez con 40 ml de medio de aislamiento y se resuspendió en 1-2 ml de medio de resuspensión conteniendo:

Sorbitol	0.35	M
Acido etilen-diaminotetra- acético	2	mM
MgCl ₂	1	mM
Acido N-2hidroxietilpiper- zina-N'-2-etanosulfónico		
HEPES	50	mM
ajustado a pH 7.6 con KOH		

Los cloroplastos se separaron en alícuotas de 0.1 a 0.5 ml y se mantuvieron a 4°C en la obscuridad durante una hora antes de utilizarlos para los ensayos.

En todos los casos el paquete de cloroplastos fue resuspendido cuidadosamente con un pincel de fibras suaves. Usando el método descrito arriba se obtienen preparaciones de cloroplastos, con un rendimiento de 50-70% de cloroplastos intactos, lo que puede ser estimado por su impermeabilidad a

De la suspensión de cloroplastos se utilizó una alícuota de 20-50µl para la determinación de clorofila.

(4) CUANTIFICACION DE CLOROFILA.

Los cloroplastos aislados contienen dos tipos de clorofilas la a y la b, cada tipo de clorofila presenta un espectro de absorción diferente y depende del solvente usado para su extracción. El cálculo de la cantidad de clorofila presente en los cloroplastos debe reflejar la suma de las fracciones correspondientes a ambas clorofilas.

La clorofila se cuantificó por el método reportado por Arnon (1949).

Se adicionaron 0.05 ml de suspensión de cloroplastos en 5 ml de acetona al 80% (en H₂O v/v), se tapó y agitó vigorosamente en vortex (mod. K550-6), se mantuvo en la oscuridad por 5 min para permitir la extracción y solubilización de la clorofila en la acetona y evitar su degradación por luz. Se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min en centrifuga clínica (SOL-BAT mod. J-12) para sedimentar las proteínas y otros residuos de los cloroplastos. Se midió la absorción del sobrenadante a 663 nm y a 645 nm en un espectrofotómetro (BECKMAN mod DU-64), utilizando como blanco acetona al 80%. El contenido de clorofila en las muestras se

calcula utilizando la siguiente ecuacion :

$$C = (20.2 A_{615} + 8.02 A_{663}) 100$$

donde:

C = μ g de clorofila/ml

20.2 y 8.02 = constantes derivadas de los coeficientes de extincion (Arnon, 1949)

10 = factor de dilucion

(5) OBTENCION DE CLOROPLASTOS LAVADOS.

Cuando se desea eliminar la envoltura de los cloroplastos, la proteina estromal y activadores e inhibidores exogenos es conveniente diluir con medio de resuspension (inciso 3) y coleccionar las membranas tilacoides (cloroplastos lavados) por centrifugacion.

(6) ACTIVACION POR LUZ DE CF_0-CF_1 (Mg^{+2} -ATPasa) UNIDO A LA MEMBRANA DEL TILACOIDE.

Mills y Mitchel (1982) sugirieron que existen factores endogenos contenidos en el estroma del cloroplasto que funcionan en la modulacion de la actividad ATPasa dependiente de Mg^{+2} de CF_0-CF_1 por luz.

La activacion de CF_0-CF_1 , se efectuo por iluminacion de los cloroplastos con un proyector Swayer 550 A que tiene lampara de

En el agua y suministra luz a saturación (se utilizó la misma fuente luminosa para todos los experimentos de este trabajo en los que se requirió energizar cloroplastos). El haz luminoso se hizo pasar a través de una lente de Izawa que consiste de una botella con solución de sulfato de cobre al 5% y sirve como filtro luminoso y de calor (en este trabajo se utilizó la lente de Izawa siempre que los cloroplastos fueron iluminados con proyector). La luz que pasaba a los lados y por encima de la suspensión de cloroplastos se reflejó sobre dicha suspensión mediante dos espejos (formando un ángulo, aproximadamente, de 80° entre sí) colocados frente a la fuente luminosa y detrás de la suspensión de cloroplastos.

Los medios de activación estaban constituido por:

(i) 0.25 ml de un medio con la siguiente composición:

Sorbitol	1.2	M
Tricina	100	mM
ajustado a pH 8 con KOH		

(ii) 0.65 ml de medio para lisar los cloroplastos:

Mg Cl ₂	5	M
Tricina	15	mM
pH 8 (ajustado con KOH)		

(iii) 0.1 ml de cloroplastos concentrados conteniendo aproximadamente 0.3 mg de clorofila.

Si solo se utiliza el medio (i) para resuspender los cloroplastos, estos se mantienen intactos, el medio (ii) puede producir la lisis antes de la activación; ya que en algunos casos

la membrana externa de los cloroplastos intactos representa una barrera para la permeabilidad de algunos compuestos como las maleimidas, nucleótidos, etc. resultado necesario romper la envoltura. Esto se logra por choque osmótico, mediante la dilución (mínimo diez veces) del medio de resuspensión con el medio (ii), lo que produce virtualmente 100% de cloroplastos libres de envoltura en menos de un minuto (Walker, 1971). Es conveniente adicionar después del choque osmótico un medio que ayude a regenerar la tonicidad del medio para que no se altere la estructura y composición de la membrana tilacoide.

(7) ENSAYO DE ACTIVIDAD DE Mg^{2+} -ATPasa DE CF_0 - CF_1 UNIDO A LA MEMBRANA DEL TILACOIDE.

El segmento CF_1 es una ATPasa latente, la cual tiene que ser activada para que manifieste su función catalítica. La activación *in situ* de la enzima unida al tilacoide ocurre por energización de la membrana. Esta ATPasa puede ser también activada por: metanol en la obscuridad (Anthon y Jagendorf, 1983) o DTT en la luz (McCarty y Racker, 1968). El CF_1 aislado o unido a membrana exhibe una actividad dependiente de Ca^{2+} o Mg^{2+} en función del activador empleado (McCarty y Moroney, 1984), el sustrato real de la enzima es el complejo ATP-ion metálico.

En este trabajo se cuantificó la actividad de la ATPasa dependiente de Mg^{2+} y activada con luz por dos procedimientos distintos que a continuación se indican.

(7.1) Hidrolisis de ATP y cuantificación de Pi liberado.

A 0.1 ml de suspensión de cloroplastos activados por luz (inciso 6) se le adicionaron 0.9 ml del siguiente medio que contenía ATP-Mg^{2+} como sustrato (medio de ATPasa), simultáneamente a la adición del medio se apago la luz.

MgCl ₂	2 mM
NH ₄ Cl	1.1 mM
ATP	2.2 mM
Tricina	15 mM
Ajustado a pH 8 con KOH	

La hidrolisis del ATP se efectuó en oscuridad absoluta y con agitación de las muestras a 22°C durante 60 segundos, después de los cuales, la reacción se paró con 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20% en agua (p/v) y agitación (Mills et al, 1980).

El precipitado proteico se eliminó por centrifugación en una centrífuga clínica a 3000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se utilizó para cuantificar el fosfato liberado durante la hidrólisis por el método colorimétrico de Fiske-Subbarow (inciso 8).

(7.2) Hidrolisis de $\text{[}\gamma\text{-}^{32}\text{P]ATP}$ y cuantificación del

^{32}P i liberado.

La hidrólisis de ATP por los cloroplastos activados con luz se midió utilizando Mg-ATP radioactivo (marcado con fósforo 32 en la posición γ del nucleótido) como sustrato. La cantidad de fosfato inorgánico radioactivo (^{32}P i) liberado durante el tiempo de incubación de los cloroplastos con el medio de ATPasa fue tomado como la cantidad de ATP hidrolizado. A continuación se describe el procedimiento seguido en este trabajo.

(7.2.1) Para el ensayo de la hidrólisis de $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ iATP se mezclaron 0.1 ml de cloroplastos activados con luz (inciso 6) con 0.17 ml de una mezcla de medios (i) e (ii) (inciso 6) en una relación 1:3.6 v/v respectivamente para lisar los cloroplastos. Se adicionaron 30 μl del medio de ATPasa (concentrado 10 veces) el cual contenía aproximadamente 2×10^6 cpm/ μmol de ATP. La fuente luminosa que estaba funcionando como activadora de la ATPasa se apagó simultáneamente con la adición del medio de ATPasa. La hidrólisis de ATP se efectuó en completa oscuridad durante 1 min, con agitación y a 22°C . Se paró la reacción con la adición de 0.7 ml de una suspensión de carbón activado en HCl 0.1 N (el carbón activado se lavó previamente 4 veces con HCl 0.1 N) al 25% (p/v). Se centrifugó a 3000 rpm en centrifuga clínica, durante 15 min, y a temperatura ambiente y se utilizó una alícuota del sobrenadante (0.4 ml) para cuantificar el ^{32}P i liberado durante la hidrólisis.

Se depositaron las alícuotas de 0.4 ml del sobrenadante en

fragmentos de papel filtro Whatman (8cm X 7.5cm) y se dejaron secar. Cada papel, ya seco, se introdujo en un vial y se cubrió con líquido de Bray modificado que tenía la siguiente composición:

FFO (2,5-difeniloxazol)	5.5 g
PDFDF (1,4-bis[2-(5-feniloxazol)]benceno	0.125g

ajustado a un litro con tolueno.

Se cuantificó la radiación en un contador de centelleo líquido, Beckman (modelo LS 1000) en el canal de fósforo.

La velocidad de hidrólisis del ATP se calculó según la siguiente relación

$$V = (cpm-B)/D \times C \times T$$

donde:

V = velocidad de hidrólisis del ATP en $\mu\text{moles ATP} \cdot \text{mg}^{-1} \text{cl} \cdot \text{h}^{-1}$

cpm-B = cuentas por minuto del $^{32}\text{P}_i$ liberado por hidrólisis del ATP menos las cuentas por minuto del blanco (el blanco contiene todos los reactivos mas los cloroplastos destruidos inicialmente con carbon-HCl)

A = radioactividad específica en $\mu\text{moles de } [\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP} / \text{cpm}$ estimada con una alícuota (0.010 ml) de medio de ATPasa que contiene el ATP radioactivo.

D = alícuota (ml) de la muestra, usada para cuantificar la radioactividad

C = concentración de la clorofila en mg

T = tiempo de hidrólisis de ATP en h.

(7.2.2) Se utilizó otro procedimiento para cuantificar el ^{32}P liberado por hidrólisis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ por la ATPasa de los cloroplastos: consistente en la formación y cuantificación del complejo $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ -fosfomolibdato, extraído a una fase orgánica formada por acetona-butil acetato. En este método la radioactividad de la fase acuosa representa el $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ que no fue hidrolizado durante el ensayo y el Pi liberado en forma de complejo $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ -fosfomolibdato es extraído a la fase orgánica.

Se realizó la misma secuencia del inciso anterior (7.2.1) con la diferencia de que la reacción se paró con ácido tricloroacético a una concentración final de 10%, (volumen total 350 μl), en seguida, se colocaron los tubos en hielo durante 20 minutos para asegurar la precipitación de la proteína, se centrifugaron los tubos 10 minutos a 4000 rpm en centrifuga clínica. Se mezcló una alícuota del sobrenadante (0.3 ml) con 0.5 ml de agua y 1 ml de molibdato de amonio 3.3% en H_2SO_4 3.8N (1:1), con lo cual se formó el complejo $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ -fosfomolibdato, adicionando acetona (0.3 ml) y butilacetato (1 ml) y agitando en un mezclador Vortex durante 1 min. Las muestras se centrifugaron a velocidad máxima en centrifuga clínica durante cinco segundos, con lo cual se produjo la separación de dos fases: la acuosa (al fondo) y la orgánica (en la superficie). Se utilizaron alícuotas de la fase orgánica (0.4-0.5 ml) para cuantificar la radioactividad del fósforo radioactivo, lo cual se efectuó en la misma forma que en el inciso anterior (7.2.1).

(8) DETERMINACION DE Pi POR METODO COLORIMETRICO (FISKE-SUBBAROW).

El fosfato liberado en la hidrolisis de ATP se cuantifico por el metodo colorimetrico de Fiske-Subbarow (Summer, 1974). Una alicuota de la solucion problema (con un contenido maximo de 1 μ mol de Pi) se afero con agua a un volumen de 1.0 ml. Se adiciono: 0.25 ml de una solucion de $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$ al 5% en agua p/v mas H_2SO_4 7.5N en relacion 1:1. Se agito la mezcla con vortex y se le adiciono 0.2 ml de reactivo de color compuesto por sulfato ferroso al 10% en agua acidificada p/v (98 ml de H_2O + 2 ml de H_2SO_4 7.5N). Se agito la mezcla en vortex y dejo reposar 20 min a temperatura ambiente. El color desarrollado se midio en un espectrofotometro a 660nm.

Se elaboro una curva patron con concentraciones crecientes de KH_2PO_4 (entre 0.5 y 1 μ mol).

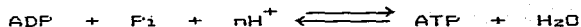
(9) REACCION DE INTERCAMBIO Pi-ATP.

Los intercambios Pi-HOH, ATP-HOH y Pi-ATP, reflejan probablemente, las reacciones de fotofosforilación y la formación de agua en ésta, son catalizadas en la oscuridad por cloroplastos en condiciones de fotofosforilación o por preparaciones modificadas de cloroplastos (cloroplastos expuestos a la luz en presencia de compuestos ditiol (Shavit, 1975) que son empleadas para desarrollar actividad de ATPasa.

En este trabajo se cuantificó el intercambio $^{32}\text{P}_i\text{-ATP}$ simultáneamente y bajo las mismas condiciones que la actividad AIFasa en cloroplastos (inciso 7.2). Con la diferencia, de que para el intercambio $^{32}\text{P}_i\text{-ATP}$ el sustrato fue una mezcla de P_i 3mM con 2×10^3 cpm/nmol de $^{32}\text{P}_i$ y ATP no radioactivo 2.2 mM (Tuena de Gomez-Fuou, 1984).

(10) EVALUACION DE LA FOTOFOSFORILACION.

Un gran numero de investigadores han demostrado que $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ en cloroplastos adaptados a la obscuridad es catalíticamente inactivo. La síntesis neta de ATP se observa cuando un potencial electroquímico de protones ($\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$) es generado a través de la membrana tilacoide; dicho $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$ es requerido por dos razones: (a) termodinámicamente, para proveer la energía libre para la síntesis de ATP (Boyer et al, 1977); (b) cinéticamente, para modificar la enzima a un estado catalíticamente activo (Junge, 1970). La reacción de síntesis de ATP por $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ unido a membrana puede representarse de la siguiente manera:



Alberty et al (1951) determinaron que durante la síntesis de una molécula de ATP se consume un H^+ a pH 8 en un rango de pMg^{+2} de 2 a 7.

Uno de los métodos usados para medir la fotofosforilación es el potenciométrico y se basa en el registro de los cambios de pH que induce la iluminación de los cloroplastos en un medio adecuado que contiene los sustratos ADP y Pi (Dilley, 1972).

(10.1) Evaluación potenciométrica de la fotofosforilación.

Se mezclaron cloroplastos intactos (inciso 3) que contenían 30 μ g de clorofila con 2.9 ml de medio para síntesis de ATP, cuya composición fue la siguiente:

Sorbitol	100 mM
MgCl ₂	1 mM
KCl	100 mM
Metil viológeno	50 μ M
ADP	1 mM
KH ₂ PO ₄	3 mM
Tricina	1 mM
Ajustado a pH 8 con KOH	

Las muestras se iluminaron con un proyector, manteniéndolas en agitación a 22°C. Simultáneamente con la iluminación se registraron los cambios de pH del medio (debidos a la fotofosforilación por la H⁺-ATP sintetasa) con un microelectrodo combinado, de respuesta rápida, conectado a un potenciómetro Corning (modelo 12) de escala expandida, y se registró el cambio de pH en función del tiempo con un graficador Gilson conectado al potenciómetro, a 10 mV y 1 mm/s. Se apagó la luz y se agregó una

cantidad conocida de HCl 0.01N (5 ml) para titular el cambio de pH observado.

La velocidad de síntesis se calculó empleando la siguiente relación:

$$V = A \cdot h/C$$

donde:

V = velocidad de síntesis de ATP en $\mu\text{Moles ATP} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Clf} \cdot \text{h}^{-1}$

A = $\mu\text{Moles de H}^+$ usados en la titulación (con 5ml de HCl 0.1N)/altura del trazo en cm

C = Concentración de clorofila empleada en mg/ml de medio.

h = pendiente de la curva obtenida durante la iluminación de los cloroplastos en cm/h

(10.2) Fotofosforilación de ADP con fosfato radioactivo (^{32}Pi).

La síntesis de ATP durante la fotofosforilación fue ensayada mediante la medición del ADP fosforilado con fosfato inorgánico radioactivo (^{32}Pi), según lo reportado por Tuena de Gomez-Fuyou et al (1984) con algunas modificaciones. El método empleado se describe a continuación.

Una alícuota de cloroplastos intactos (inciso 3) equivalente a 30-50 μg de clorofila se mezcló con medio de síntesis de ATP (inciso 10.1) conteniendo aproximadamente 1.5×10^5 cpm de ^{32}Pi a un volumen final de 0.3 ml. Los cloroplastos se iluminaron con un

proyector, durante un minuto, a 22°C y con agitación. La reacción se paro adicionando 0.06 ml de TCA al 30% en agua (p/v). Los tubos que contenian las muestras se colocaron en hielo, durante 20 min, para asegurar la precipitación total de la proteína. Se centrifugaron 7 minutos a 3000 rpm en centrífuga clinica a temperatura ambiente.

Para cuantificar el $^{32}\text{P}_i$ incorporado al ATP fue necesario eliminar el $^{32}\text{P}_i$ remanente, (o no incorporado), en el sobrenadante, lo que se hizo de la siguiente manera: a una alícuota del sobrenadante (0.25 ml) de la centrifugación anterior se adiciono 1 ml de agua suplementada con 0.5 ml de heptamolibdato de amonio 3.3% y H_2SO_4 3.6N agitando con vortex durante un minuto, de esta forma se produjo el complejo [$^{32}\text{P}_i$]fosfomolibdato extraíble con una mezcla de acetona-acetato de butilo (1 ml), se agitó energicamente con vortex durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugo en centrifuga clinica, subiendo al máximo y apagando de inmediato, lo que fue suficiente para separar las dos fases, y se aspiró, eliminandose el sobrenadante (fase organica).

La fase acuosa restante se reextrajo cinco veces con 0.015 ml de P_i 20 mM, 0.3 ml de acetona y 1 ml de acetato de butilo, agitando energicamente en vortex durante 1 minuto y centrifugando en las mismas condiciones que la centrifugación anterior para eliminar la fase organica de cada lavado. De la fase acuosa remanente se utilizo una alícuota que fue depositada en un papel filtro Whatman (de 8 cm x2.5 m) y se dejó sacar a temperatura ambiente. Se introdujo en un vial y se cubrió con liquido de Bray

inciso 10.2). La radiación se cuantifica con un contador de centelleo líquido Beckman en el canal de fósforo.

La velocidad de incorporación de $^{32}\text{P}_i$ se calcula mediante la siguiente relación:

$$V = (\text{cpm} - B) A \times V_t / C \times D \times t$$

donde:

V= fosforilación del ADP por $^{32}\text{P}_i$, indicando la síntesis de ATP en $\mu\text{Moles de ATP} \cdot \text{mg}^{-1} \text{clorofila} \cdot \text{h}^{-1}$

(cpm-B)= cuentas por minuto de la muestra menos las correspondientes al blanco (son cloroplastos inactivados con TCA antes de adicionar ADP y $^{32}\text{P}_i$ al medio de reacción)

A= $\mu\text{Moles de } ^{32}\text{P}_i$ de una alícuota del medio para síntesis de ATP/cpm generadas por la alícuota

V_t = Volumen total de medio de ensayo en ml.

C= mg de clorofila correspondiente a la alícuota usada para cuantificar la radiación.

D= alícuota de la muestra usada para cuantificar la radioactividad en ml

t= tiempo de síntesis en h.

(11) MEDICIÓN DE LA BOMBA DE PROTONES.

El método se basa en el cambio de pH del medio inducido por la cadena transportadora de electrones de la membrana del tilacoide, en presencia de luz (Newman y Jagendorf, 1964) y es

proporcional al gradiente electroquímico generado por los sitios o las bombas de liberación de H^+ .

La medición de la bomba de protones por el método potenciométrico es similar al descrito para la síntesis de AIF (unisco 10), con la excepción de que el medio de reacción no contiene ADP ni P_i , por lo tanto el cloroplasto no está fosforilando y la cadena oxidorreductora del flujo de electrones solamente está creando el ΔpH^+ .

Para calcular la velocidad en $\mu\text{equivales de } H^+ \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{clorofila} \cdot \text{min}^{-1}$ se utiliza la altura alcanzada en el trazo del graficador en un tiempo de 1 minuto de acuerdo con lo reportado por Dilley, 1972).

(12) DETERMINACION DE LA VELOCIDAD DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES ACICLICO, DE H_2O A METIL VIODOGENO.

La transferencia de e^- de H_2O a $NADP^+$ en cloroplastos es dirigida por una serie de reacciones redox potenciadas con la energía luminosa absorbida por los fotosistemas I y II que interaccionan cooperativamente.

Debido a que cuando se rompen los cloroplastos intactos se solubilizan en el medio la ferredoxina y el $NADP$, en este trabajo se utilizó metilviógeno como aceptor artificial de electrones.

Al reducirse el metilviologeno oxidado acepta dos electrones y dos protones, los dos electrones provienen de la fotólisis de una molécula de H_2O liberándose media molécula de oxígeno y donando dos electrones a la cadena, sin embargo, al oxidarse el metilviologeno $^{+}$, reducido por el oxígeno del medio reacciona con una molécula de oxígeno, el balance final de captación es de media mol de oxígeno por molécula de H_2O fotolizada.

El flujo de electrones de H_2O a MV en función del tiempo se determinó con un monitor de oxígeno (oxímetro YSI modelo 5300) al cual consta de un electrodo tipo Clark como ha sido descrito anteriormente.

(12.1) Transporte de electrones basal.

El flujo de electrones basal dependiente de luz se produce en cloroplastos aislados en ausencia de ADP y de Pi exógenos.

La metodología usada fue la siguiente: una alícuota de cloroplastos intactos (equivalente a 30 μg de clorofila/ml) se resuspendió en 3 ml de medio para bomba de H^+ con excepción de que la concentración de la tricina es de 10 mM (incisos 3 y 11). El electrodo del oxímetro se introdujo en la muestra, manteniéndolo en la obscuridad durante 30 seg, con agitación y a 22 C. Se inició el flujo de electrones por iluminación de la suspensión de cloroplastos con un proyector a través de una lente de Izawa, simultáneamente se registró la liberación de O_2 del sistema en

función del tiempo, con ayuda de un graficador conectado al oxímetro.

La velocidad del flujo de electrones se calculó mediante la siguiente relación:

$$V = (1200 \text{ n ato O} / 20\text{cm}) (2 \mu\text{eq e}^- / \text{n ato O}) (60 \text{ min} / \text{h}) (1/\text{mg clorofila}) A \text{ cm} / \text{min}$$
$$= (72 \text{ n atomos O}) (A) / \text{mg clorofila.}$$

donde:

$V =$ velocidad de transporte de electrones en $\mu\text{eq e}^- \cdot \text{mg}^{-1} \text{clorofila} \cdot \text{h}^{-1}$

1200 n ato O \equiv contenido de oxígeno solubilizado en el volumen de medio usado para el ensayo (3ml) estandarizado a la máxima altura que puede recorrer el graficador (20cm)

2 $\mu\text{eq e}^- / \text{n atomo O} \equiv$ equivalente de e^- involucrados en la liberación de un átomo de oxígeno por fotólisis de H_2O .

mg clorofila = mg de clorofila usados para el ensayo

A = pendiente del trazo obtenido.

(12.2) Transporte de electrones fosforilante.

La medición del transporte de electrones fosforilante, a diferencia del basal, se determinó en presencia de ADP y Pi substratos de la H^+ -ATP-sintetasa del cloroplasto.

La metodología fue la siguiente: se continuo iluminando los cloroplastos usados en el inciso anterior y se adiciono ADF y Pi para obtener una concentracion final de 1 mM:3 mM, respectivamente. Se continuo el trazo para detectar la deflexion producida por la adicion de substratos.

La velocidad del flujo de electrones fosforilante se calculo en la misma forma que lo señalado para el transporte de electrones basal (inciso 12.1).

(12.3) Transporte de electrones desacoplado.

El transporte de electrones desacoplado se determino en presencia de un desacoplante, es decir un compuesto que promueve la disipacion de energia generada por dicho transporte de electrones (McCarty, 1977) al actuar como protonóforo o acarreador de protones a traves de la membrana (Mitchel, 1966).

La medicion de la velocidad del transporte de electrones desacoplado se determino de la siguiente manera: se continuo iluminando los cloroplastos usados en el inciso anterior (y que se usaron para la determinacion del transporte de electrones basal incisos 12.1 y 12.2) y adicionando una solucion de NH_4Cl para obtener una concentracion final de 1 mM.

La velocidad del flujo de electrones desacoplado se calcula

	diamina (DAD)	0.4 mM
	ácido ascórbico	4 mM
Fotosistema II:	DAD	0.4 mM
	ferricianuro de potasio	
	$[Fe(CN)_6]^{3-}$	3 mM
	DBHE	1 μ M

El transporte de electrones basal fosforilante y desacoplado para los fotosistemas I y II separados se determinaron y calcularon en la misma forma que lo indicado en los incisos 12.1, 12.2 y 12.3.

RESULTADOS

(1) ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA Mg^{+2} -ATPasa.

Se ha encontrado que la iluminación intensa de cloroplastos intactos, aislados de diversos vegetales (Shahak, 1982), induce una actividad de Mg^{+2} -ATPasa del factor de acoplamiento que puede ser ensayada en la obscuridad, en cloroplastos que se rompen simultáneamente con la adición de Mg^{+2} -ATP. Con la finalidad de establecer las condiciones óptimas de ensayo de la actividad Mg^{+2} -ATPasa del factor de acoplamiento unido a la membrana del tilacoide, en este trabajo se determinaron: (A) el tiempo de máxima activación de la Mg^{+2} -ATPasa con luz saturante en cloroplastos intactos, (B) el tiempo óptimo de hidrólisis del ATP (tiempo de ensayo), y (C) la concentración óptima de Mg^{+2} -ATP como sustrato. La figura 1-A muestra que la iluminación con luz saturante de cloroplastos intactos obtenidos de plantas de chicharo, induce incremento en la velocidad de activación de la Mg^{+2} -ATPasa después de un minuto de iluminación, alcanza una V_{max} de $210 \mu\text{Moles Pi}_{\text{producidos}} \cdot \text{mg}^{-1} \text{clorofila} \cdot \text{h}^{-1}$, y se mantiene constante a tiempos mayores de 4 minutos. En este trabajo se seleccionó 1.5 min como tiempo óptimo de activación de la Mg^{+2} -ATPasa. Estos resultados son semejantes a los reportados por Mills et al (1980). En el segundo experimento los cloroplastos intactos fueron iluminados durante 1.5 min, luego rotos por choque osmótico y simultáneamente se ensayó la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa, a diferentes tiempos de incubación en la obscuridad,

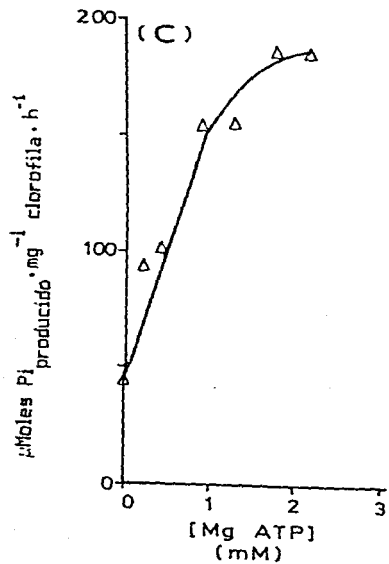
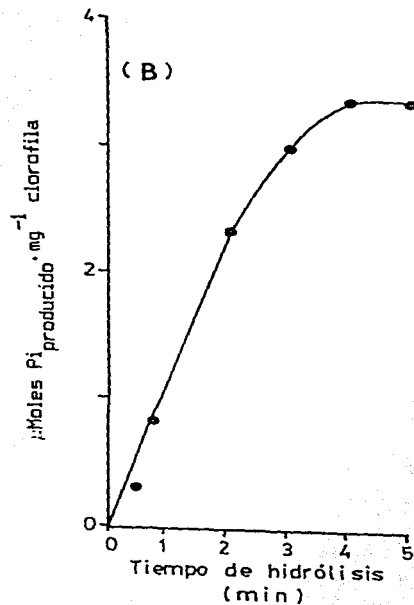
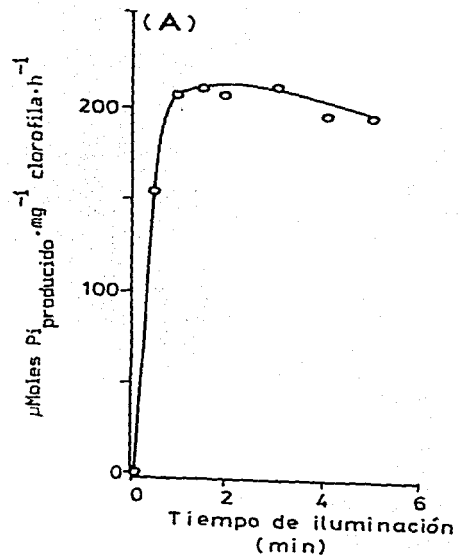


Fig. 1. Tiempo óptimo de activación, de ensayo y concentración óptima de sustrato para la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a tilacoides de cloroplastos de plantas de chícharo. (A) Cloroplastos intactos (30 μ g de clorofila) se iluminaron con luz saturante durante los tiempos indicados en (A), enseguida se lisaron por choque osmótico con un medio que contenía $MgCl_2$ 2mM, NH_4Cl 1.1mM, ATP 2.2mM, Tricina 15mM pH8 y 2×10^4 cpm/ γ Mol ATP, simultáneamente con ésta adición, la suspensión se colocó en la obscuridad manteniéndose 1 min con agitación. La reacción se paró con carbón activado en HCl y se cuantificó el $^{32}P_i$ liberado como se indicó en MATERIALES Y METODOS. (B) Después de activar la Mg^{+2} -ATPasa durante 1.5 min (tiempo obtenido de la Fig. 1-A) e iniciar el ensayo de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa como en (A) se dejaron transcurrir tiempos distintos de ensayo en la obscuridad (indicados en B), se paró la reacción y se cuantificó el $^{32}P_i$ liberado como en (A). (C) Después de activar la Mg^{+2} -ATPasa como en (B) se realizó el ensayo de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa en la obscuridad por un minuto (tiempo seleccionado de la Fig. 1-B) en un medio que contenía concentraciones crecientes de Mg -ATP no radioactivo. La reacción se paró con TCA (concentración final 3%) y el P_i liberado se cuantificó por el método colorimétrico de Fiske-Subbarov como se indicó en MATERIALES Y METODOS.

y se observó que la actividad hidrolítica se incrementa al aumentar el tiempo de hidrólisis (Fig. 1-B), se mantiene constante hasta los 2 min, ($2.4 \mu\text{Moles Pi}_{\text{producido}} \cdot \text{mg}^{-1}$ clorofila) y después de ese tiempo de hidrólisis en la obscuridad decae, probablemente por el incremento en la concentración de ADP en el medio, ya que, ha sido reportado como inhibidor de la Mg^{+2} -ATPasa (Pick, 1988). De esta gráfica se seleccionó 1 min de tiempo de hidrólisis del ATP (tiempo de ensayo), con el objeto de evitar la inhibición por ADP. En la figura 1C, la relación en las concentraciones de MgCl_2 y ATP se mantuvo 1:1, ya que se sabe que el sustrato real de la enzima es el complejo Mg-ATP , los iones metálicos o el ATP libre actúan como inhibidores de la enzima (Hochman y Carmeli 1981a). Se observó que concentraciones crecientes de Mg-ATP incrementan la actividad hidrolítica de la Mg^{+2} -ATPasa, y a 2.2mM de MgCl_2 -2.2mM de ATP se alcanzó una V_{max} de $185 \mu\text{Moles Pi}_{\text{producido}} \cdot \text{mg}^{-1}$ clorofila $\cdot \text{h}^{-1}$ (Fig 1-C). Se detectó una actividad hidrolítica basal de $44.2 \mu\text{Moles de Pi}_{\text{producido}} \cdot \text{mg}^{-1}$ de clorofila $\cdot \text{h}^{-1}$ en los cloroplastos activados durante 1.5 min con luz, y midiendo la hidrólisis del ATP durante un minuto en la obscuridad y en la ausencia de sustratos exógenos. Esta actividad fue restada en los ensayos de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa. Probablemente, esta actividad está dada por la presencia de sustratos endógenos que se encuentran en los cloroplastos intactos que al romperse se liberan al medio. Resultados semejantes fueron reportados por Sahak (1985), quien determinó que el choque osmótico de cloroplastos intactos, previamente energizados induce una mayor activación de la ATPasa, la cual osciló entre el 20 y 35% de activación en diferentes experimentos. No se ha entendido todavía

esta activación extra de la Mg^{+2} -ATPasa inducida por la lisis de los cloroplastos.

De los resultados presentados en la figura 1 seleccionamos las siguientes condiciones para los ensayos de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a membrana del tilacoide de cloroplastos intactos, activados con luz y rotos simultáneamente a la adición del sustrato y que de aquí en adelante los identificaremos con las siglas (CI-AL-RE): 1.5 min de tiempo de activación, un minuto de tiempo de ensayo de hidrólisis en la oscuridad y concentraciones de $MgCl_2$ 2.2mM - ATP 2.2mM. En esas condiciones, la velocidad específica de la Mg^{+2} -ATPasa obtenida con las diferentes preparaciones de cloroplastos de plantas de chicharo durante el desarrollo de nuestro trabajo, osciló entre 200 y 350 μ moles de $Pi_{\text{producido}} \cdot mg^{-1}$ clorofila $\cdot h^{-1}$.

(2) CONDICIONES DE ENSAYO PARA LA FOTOFOSFORILACION.

En la Fig. 2-A se presentan la actividad de la ATP-sintetasa en función del tiempo de iluminación de los cloroplastos que se rompen por choque osmótico durante la activación con luz. La actividad de la ATP-sintetasa alcanzó una $V_{\text{máx}}$ de 1225 μ moles de $ATP_{\text{producido}} \cdot mg^{-1}$ clorofila $\cdot h^{-1}$ en 15 seg de preiluminación o en menos (Fig. 2A). La $V_{\text{máx}}$ decae ligeramente si el tiempo de activación se prolonga hasta 7 min. Este resultado contrasta con lo presentado en la figura 1A, en la que se ve que la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa alcanza la $V_{\text{máx}}$ solo después de iluminar los

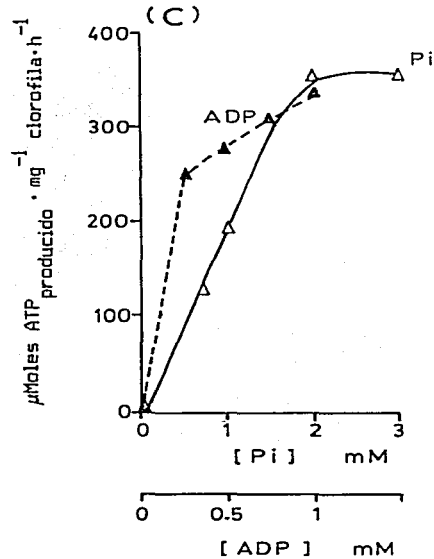
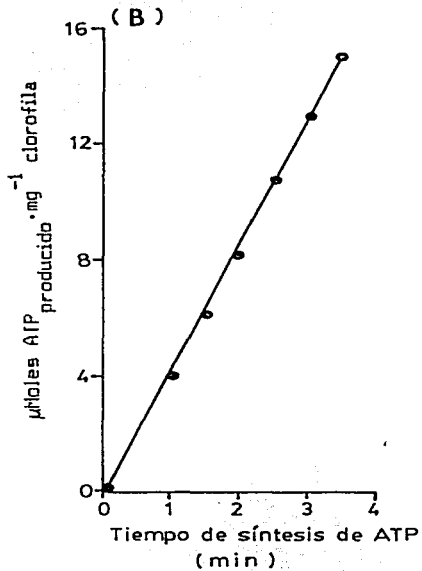
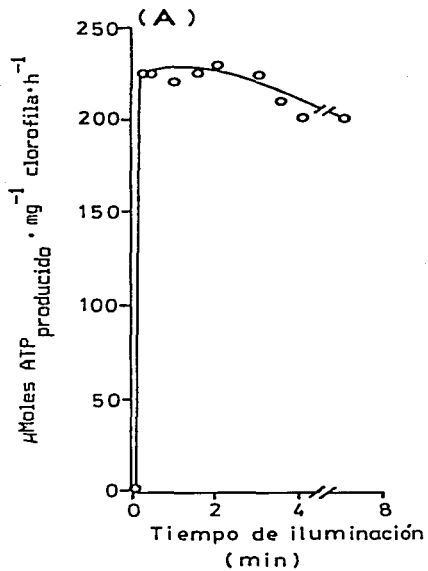


Fig. 2. Condiciones de activación, ensayo y concentraciones óptimas de sustratos para la actividad de la ATP-sintetasa unida a membranas de tilacoides de cloroplastos de plantas de chícharo. (A) Se iluminó una suspensión de cloroplastos (30 μ g de clorofila) con luz saturante, a tiempos variables como se indica en (A), se utilizaron 3ml de medio con la siguiente composición: sorbitol 100mM, KCl 100mM, $MgCl_2$ 1mM, metil viológeno 50 μ M y Tricina 1mM pH8, enseguida se adicionaron, simultáneamente, ADP y Pi para tener una concentración final de 1mM y 3mM, respectivamente, la síntesis de ATP se registró polarográficamente como se describió en MATERIALES Y METODOS. (B) La ATP-sintetasa se activó por iluminación de los cloroplastos durante 1.5 min en condiciones semejantes a las descritas en (A), la actividad de la ATP-sintetasa respecto al tiempo de síntesis de ATP se efectuó después de adicionar el ADP y el Pi a los tiempos señalados en (B) y la síntesis del ATP se evaluó como en (A). (C) Las concentraciones óptimas de los sustratos se determinaron después de activar la enzima durante 1.5 min con luz, la actividad de la ATP-sintetasa se realizó un minuto después de la adición de concentraciones crecientes de ADP(Δ) o Pi(Δ) (manteniendo constante la concentración de uno de los dos sustratos) como se indica en (C). Otras condiciones de ensayo se describieron en MATERIALES Y METODOS.

cloroplastos durante 1.5 min. Es decir, aparentemente el tiempo de activación para alcanzar la conformación requerida para la mg^{+2} -ATPasa de CI-AL-RE es mayor que el tiempo que se requiere para la ATP-sintetasa. Resultados semejantes fueron reportados por Biaudet y Haraux (1985), para cloroplastos libres de envoltura (membranas tilacoide lavadas) modificados químicamente con DTT. Los autores señalan que tal divergencia podría indicar a priori que la síntesis e hidrólisis de ATP son catalizadas preferencialmente por dos conformaciones diferentes de la misma enzima, y proponen un modelo en el que el DTT (modificación química artificial) induce dos formas diferentemente activas del factor de acoplamiento y que el $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$ generado por la energización de la membrana induce, a su vez, otras dos formas activas de la enzima (activación). De acuerdo a ese modelo, la aparente discrepancia cinética entre la síntesis y la hidrólisis refleja la transformación progresiva de las formas activas del factor de acoplamiento.

En cloroplastos, el $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$ generado por la iluminación, además de ser la fuerza director-motriz para la síntesis de ATP, activa a la enzima para la hidrólisis (Biaudet y Haraux, 1986). Esta activación se manifiesta no sólo por la capacidad de la enzima para sintetizar ATP en la luz, sino por su capacidad para hidrolizarlo en el período subsecuente de oscuridad. La hidrólisis de ATP se incrementa en presencia de ditiolos (como el DTT) o de tripsina durante la iluminación (Mills y Mitchel, 1984). No ha sido posible establecer completamente el significado fisiológico de la modificación por ditiolos y aún menos por la

tripsina. Es conveniente recordar que en nuestra investigación la Mg^{+2} -ATPasa unida a membrana del tilacoide fue activada con luz, con el contenido estromal nativo y no fue necesario adicionar acarreadores de electrones ni agentes tóxicos al sistema. Sin embargo hay similitud de resultados de éste trabajo con los obtenidos en cloroplastos intactos, *in vivo*, (Mills y Mitchel, 1984) y con cloroplastos modificados con DTT (Shahak, 1985).

Después se procedió a determinar el tiempo óptimo de ensayo de la síntesis de ATP en los cloroplastos lisados durante la activación con luz (1.5 min). En la figura 2B se muestra el incremento en la síntesis de ATP respecto al tiempo, se observó que la síntesis de ATP ocurre inmediatamente y no requiere de preiluminación, se incrementó linealmente durante los 4 minutos iniciales y después de éste tiempo permaneció constante, aparentemente, por las concentraciones crecientes del producto, ATP, en el medio. A diferencia de la actividad hidrolítica que alcanzó su máximo (Fig. 1B) en un minuto de hidrólisis o menos, y después de 3 minutos decayó. Estos resultados podrían sugerir que la conformación de la enzima, alcanzada en la luz y requerida para la hidrólisis del ATP en la obscuridad es inhibida rápidamente por los productos (fosfato y ADP) y que la conformación de la enzima requerida para la síntesis de ATP, también alcanzada por energización del cloroplasto es menos sensible a la inhibición por el producto (ATP).

La velocidad de fotofosforilación en función de la concentración de los substratos (ADP y fosfato) se muestra en la

figura 1C. Los ensayos se realizaron manteniendo uno de los dos substratos a concentración constante e incrementando el otro. Se utilizó ADF 1mM para ensayar concentraciones variables de P_i , y P_i 3mM para ensayar el incremento en la concentración del ADF. Concentraciones crecientes de cualquiera de los substratos, cuando uno de ellos se mantiene constante, producen incrementos notables en la velocidad de fotofosforilación hasta llegar al máximo de velocidad con las concentraciones óptimas que se indica arriba.

Las condiciones de ensayo para la fotofosforilación en el transcurso de nuestra investigación fueron seleccionados de los resultados presentados en la figura 2. Dichas condiciones son: preiluminación 1.5min (sin substratos, con la finalidad de mantener condiciones semejantes a las requeridas para la hidrólisis), tiempo de ensayo para la fotofosforilación de 2 min en presencia de substratos, con concentraciones de ADF 1mM - KH_2PO_4 3mM. La velocidad específica de la fotofosforilación osciló entre 225 y 400 μ Moles de ATP producido mg^{-1} clorofila h^{-1} en las diferentes preparaciones de cloroplastos de plantas de chícharo empleadas en el transcurso de nuestro trabajo, y bajo las condiciones antes señaladas.

(3) EFECTO DE MALEIMIDAS MONOFUNCIONALES Y BIFUNCIONALES EN LA ACTIVIDAD DE LA Mg^{+2} -ATPasa.

Diferentes investigadores (Biaudet y Haraux, 1986; Sherman y Wimmer, 1982; Shoshan y Shavit, 1979) postulan que bajo la

condición de energización del cloroplasto intacto se generan, al menos, dos conformaciones activas y diferentes en el complejo CF_0 - CF_1 , en donde una de ellas es específica para unir ADP y catalizar preferencialmente la formación neta de ATP y que la otra conformación es especializada para unir ATP y catalizar su hidrólisis. Si la consideración anterior es correcta, es posible evidenciar las diferentes conformaciones de la enzima mediante la incorporación de maleimidias que se unen covalentemente a los grupos -SH de las subunidades de la ATP-sintetasa que tienen este grupo funcional (Farron, 1970; McCarty y Fagan, 1973; Wold 1967). La incorporación de las maleimidias deberá efectuarse después de que la conformación requerida para la síntesis o la hidrólisis del ATP se haya alcanzado por energización del cloroplasto, lo que se consigue iluminándolo. La siguiente parte de nuestra investigación se realizó con la finalidad de comprobar lo antes planteado.

Inicialmente se determinaron los tiempos requeridos para el efecto máximo que inducen las maleimidias (estimulador o inhibitorio) en las actividades de la Mg^{2+} -ATPasa y de la ATP-sintetasa del factor de acoplamiento unido a los tilacoides de los cloroplastos intactos, que se rompen en el momento de la adición de las maleimidias. Con los resultados obtenidos se procedió a determinar algunos parámetros cinéticos para caracterizar el efecto de esos compuestos en las actividades enzimáticas señaladas.

(3.1) Inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa de

membranas tilacooides por maleimidas monofuncionales en función del tiempo de iluminación.

La actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a la membrana del tilacoide se desarrollo en los cloroplastos intactos después de iluminarlos durante 1.5 min, enseguida se adicionaron las maleimidas (concentración final 0.5 mM) en un medio cuya composición era isotónicamente diferente al que contenía a los cloroplastos intactos, con lo que se aseguró la accesibilidad de las maleimidas a las membranas tilacodales por ruptura de la envoltura provocada por la disminución en la tonicidad del medio . Se dejaron transcurrir tiempos variables de incubación, como se indica en la figura 3, sin apagar la fuente luminosa. De ésta manera, la actividad máxima alcanzada por la Mg^{+2} -ATPasa no decae debido a que es dependiente del $\Delta\bar{p}H^+$ generado por la energización del tilacoide (Mills y Mitchel 1982). Después de los tiempos variables de preincubación con iluminación y maleimidas se adiciono el sustrato y el ensayo de hidrólisis se efectuó en la obscuridad. Se elaboraron curvas del % de actividad de la Mg^{+2} -ATPasa respecto al control, en función del tiempo de preiluminación con maleimidas. En la figura 3 se presentan los resultados obtenidos para la metilol maleimida, fenilmaleimida y carboxihidroxi fenilmaleimida. Los resultados para la NEM y la 1-H-pirrol-2,5-diona no se muestran ya que son semejantes a los presentados para la fenilmaleimida. Se observó que las cinco maleimidas monofuncionales (0.5mM) inhiben parcialmente la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa generada por luz hasta en un 20%, el grado de inhibición es diferente para cada maleimida y es

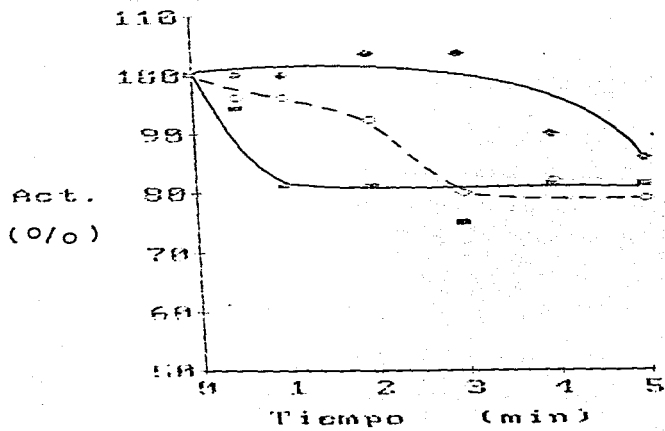


Fig. 3. Determinación de los tiempos óptimos de inhibición por maleimidas monofuncionales de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a membranas tilacoides de cloroplastos de plantas de Chicharo. Cloroplastos intactos (30 μg de clorofila) se iluminaron durante 1.5 min con luz saturante, enseguida se adicionaron: metilolmaleimida (●—●), fenilmaleimida (■—■) o carboxihidroxifenilmaleimida (○—○) solubilizadas en un medio que lisó los cloroplastos y cuya composición fue: sorbitol 100mM, KCl 100mM, $MgCl_2$ 1mM y Tricina 100mM pH 8. La concentración final de las maleimidas en el medio fue 0.5mM. Se continuó con la iluminación de los cloroplastos rotos durante los tiempos indicados en la figura, al cabo de los cuales se evaluó la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa en la obscuridad, por 1 min con la adición de un medio que contenía $MgCl_2$ 2mM, NH_4Cl 1.1mM ATP 2.2mM, Tricina 15mM pH 8. La reacción fue detenida por la adición de TCA (concentración final 3%) y el P_i liberado se cuantificó por el método colorimétrico de Fiske-Subbarov como se indicó en MATERIALES Y METODOS. Los valores graficados corresponden al % de actividad respecto al control en función del tiempo de interacción de las maleimidas con los cloroplastos en la luz.

dependiente del tiempo de incubación.

En la Tabla II se indican los tiempos óptimos de inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa (t_{Hoi}) por las cinco maleimidas monofuncionales. Los t_{Hoi} seleccionados para éste grupo de maleimidas oscilan en el rango de 2 y 4 min. Los valores obtenidos presentan el siguiente orden: carboxihidroxifenilmaleimida y metilolmaleimida 4 min > 1-H-pirrol-2,5-diona 3 min > NEM y fenilmaleimida 2 min. Estos t_{Hoi} son los que se utilizaron para los ensayos posteriores para determinar el efecto de concentraciones variables de las maleimidas monofuncionales en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa.

(3.2) Efectos de la concentración de maleimidas monofuncionales, en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa inducidos por luz.

La NEM, metilolmaleimida, 1-H-pirrol-2,5-diona, fenilmaleimida y carboxihidroxifenilmaleimida inhibieron la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa con todas las concentraciones ensayadas (entre 0 y 1mM) (Fig. 4). El grado de inhibición ($I_{Hmáx}$) de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa, unida a la membrana del tilacoide, fue 1-H-pirrol-2,5-diona (66.4%) > NEM (66%) > fenilmaleimida (56.4%) > carboxihidroxifenilmaleimida (53%) > metilolmaleimida (17.5%).

El valor de C_{Hi}^{50} representa la concentración de maleimida requerida para producir el 50% de inhibición de la actividad

Tabla II. Tiempos Óptimos para la inhibición de la hidrólisis y la síntesis de ATP por maleimidas monofuncionales y bifuncionales.

Maleimida	Mg ⁺² -ATPasa	ATP-sintetasa
	t _{Hoi} (min)	t _{Soi} (min)
NEM	2	5
N-metilolmaleimida	4	2
1-H-pirrol2,5-diona	3	5
N, fenilmaleimida	2	5
N, carboxihidroxifenilmaleimida	4	5
N, clorometilmaleimida	1	5
N, N'-bismaleimida	2	5
Bismaleimidometileter	2	6
N, N'-dihidroxi-etilenbismaleimida	2	5
N, N'-etilenbismaleimida	3	6
1,3-trimetilenbismaleimida	1	6
1,4-tetrametilenbismaleimida	1	6

La hidrólisis y la síntesis de ATP fueron determinadas como en las figuras 4 y 5. t_{Hoi}: tiempo óptimo de inhibición de la actividad de la Mg⁺²-ATPasa en min; t_{Soi}: tiempo óptimo de inhibición de la síntesis de ATP en min.

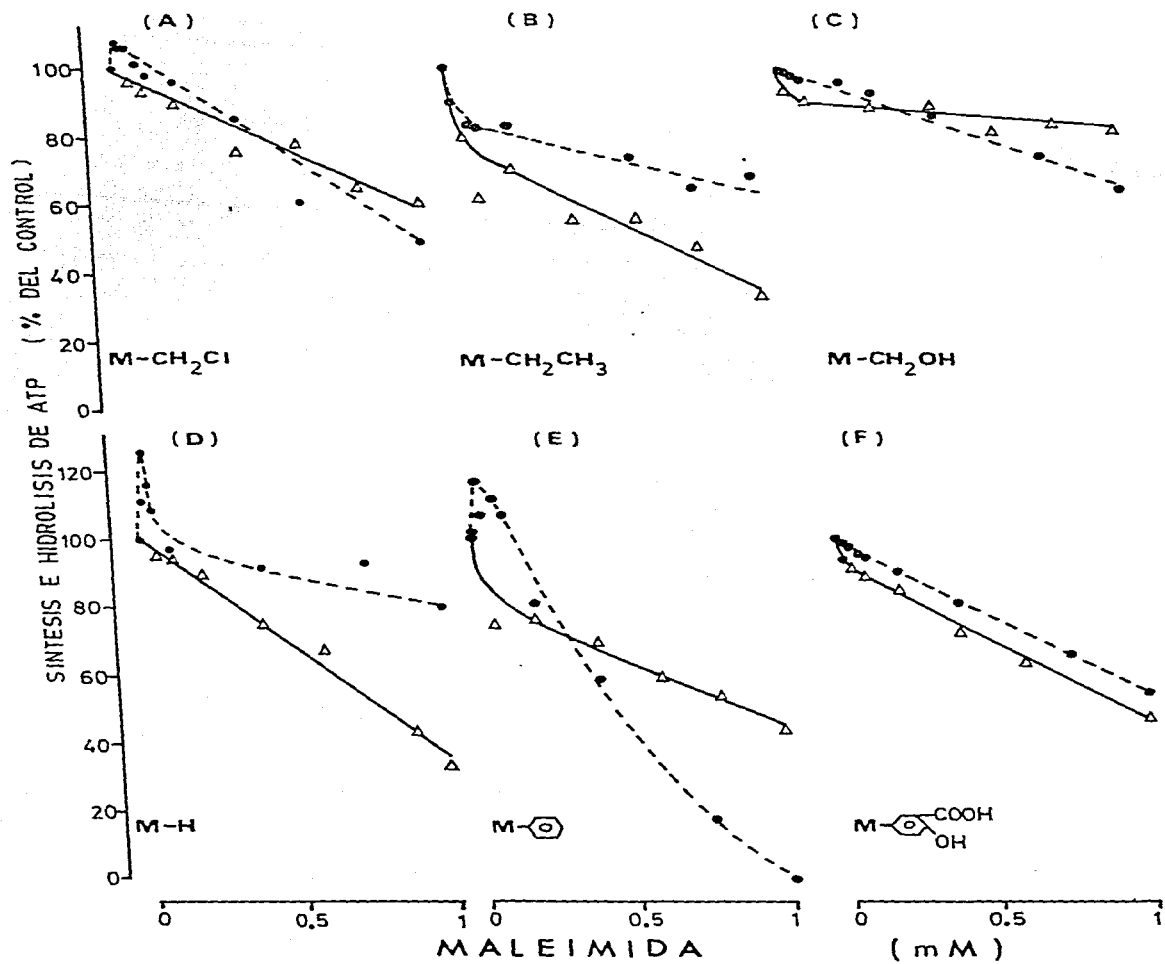


Fig. 4. Determinación del efecto de concentraciones variables de las maleimidias en las actividades de la Mg^{+2} -ATPasa (Δ - Δ) y de la ATP-sintetasa (●-●) unidas a membranas tilacoides de cloroplastos de plantas de chicharo. La Mg^{+2} -ATPasa se activó por iluminación de los cloroplastos intactos (30 μ g de clorofila) durante 1.5 min. Se adicionaron volúmenes adecuados de una solución de maleimidias a la suspensión de cloroplastos para obtener las concentraciones finales indicadas en la figura (las maleimidias fueron solubilizadas en el medio que se indicó en la Fig. 3). Se continuó con la iluminación de la suspensión de cloroplastos durante los tiempos "óptimos o de máximo efecto" en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa correspondiente a cada maleimida. Al finalizar ese periodo de tiempo se ensayó la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa como se describió en MATERIALES Y METODOS. La ATP-sintetasa se activó por exposición a la luz (1.5 min) de una suspensión de cloroplastos (30 μ g de clorofila) en un medio que contenía sorbitol 100mM, KCL 100mM, $MgCl_2$ 1mM, metil viológeno 50 μ M y Tricina 1mM a pH8. Se adicionaron volúmenes adecuados de las maleimidias solubilizadas en el mismo medio para obtener las concentraciones finales señaladas en la figura. Se continuó con la iluminación durante los tiempos óptimos o de máximo efecto de las de cada maleimida en la actividad de la ATP-sintetasa. Eneeguida se adicionaron el ADP y el Pi (1mM:3mM) para evaluar la actividad de la ATP-sintetasa por el método polarográfico descrito en MATERIALES Y METODOS. Los resultados se presentan como % de la actividad respecto al control en función de la concentración de maleimida en el medio.

Tabla III. Parámetros cinéticos para la inhibición o estimulación de la síntesis e hidrólisis de ATP en el estado estacionario por maleimidias monofuncionales y bifuncionales.

Maleimida	Mg ⁺² -ATPasa		ATP-sintetasa		
	$\frac{50}{C_{Hi}}$ (mM)	I_{Hmax} (%)	$\frac{50}{C_{Se}}$ (mM)	$\frac{50}{C_{Si}}$ (mM)	I_{Smax} (%)
NEM	0.27	66	-	0.48	35
Metilolmaleimida	0.1	17.5	-	0.42	33
1-H-pirrol-2,5-diona	0.6	66.4	0.01	0.44	20
Fenilmaleimida	0.32	56.4	0.01	0.43	100
Carboxihidroxifenil- maleimida	0.42	53	-	0.34	45
Clorometilmaleimida	0.5	15	0.005	0.35	50
N,N'-bismaleimida	0.5	80	-	0.3	100
Bismaleimido- metileter	0.46	12.5	0.025	0.5	44

continuación Tabla III:

Dihidroxi-etilen-					
bismaleimida	0.53	63	0.005	0.3	50
Etilenbismaleimida	0.5	44	-	0.28	89.4
Trimetilen-					
bismaleimida	0.51	54	-	0.004	30
Tetrametilen-					
bismaleimida	0.5	68	-	0.001	24

La síntesis e hidrólisis de ATP se midieron como en las figuras 4 y 5. C_{Hi}^{50} , C_{Si}^{50} concentración (mM) de maleimida para inducir 50% de la máxima inhibición producida por cada maleimida en la hidrólisis o en la síntesis de ATP, respectivamente. C_{Se}^{50} (mM) concentración para inducir 50% de la máxima estimulación de la síntesis de ATP por las maleimidias. I_{Hmax} , I_{Smax} Inhibición máxima de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa y ATP-sintetasa, respectivamente, expresada como porcentaje del control.

hidrolítica de la enzima (Tabla III). Los valores de C_{Hi}^{50} para el grupo de maleimidas monofuncionales fluctúan entre el rango de 0.1 mM para la hidroximetilmaleimida, hasta 0.6 mM para la 1-H-pirrol-2,5-diona. El orden decreciente de éste parámetro fue: 1-H-pirrol-2,5-diona (0.6mM) > carboxihidroxifenilmaleimida (0.42mM) > fenilmaleimida (0.32mM) NEM (0.27mM) > metilolmaleimida (0.1mM). Nótese que el orden de efectividad para inhibir la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa en función de la concentración y respecto al tiempo de incubación con las maleimidas monofuncionales son diferentes (comparar t_{Hoi}^{50} en la Tabla II y C_{Hi}^{50} en la Tabla III).

(3.3) Modificación de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa por maleimidas bifuncionales inducida por luz.

Teóricamente las maleimidas bifuncionales pueden unirse covalentemente a dos grupos -SH localizados en una misma subunidad o de subunidades diferentes del complejo CF_0-CF_1 , siempre y cuando los grupos -SH estén localizados a una distancia aproximadamente igual a las distancias mínimas o máximas de los centros reactivos que adquieren en el espacio de acuerdo con su configuración las maleimidas (Wold, 1967; Weiss y McCarty, 1977). Para cubrir una gama amplia de distancias crecientes, que existen entre los grupos -SH del complejo CF_0-CF_1 , se planteó el uso de siete maleimidas bifuncionales que se describen en la Tabla III. Este grupo de maleimidas varían entre sí por las distancias de los centros reactivos, así como por la liposolubilidad. Utilizando éstas

maleimidas esperamos ampliar los conocimientos respecto a los cambios conformacionales que sufre la enzima (H^+ -ATPasa) cuando se energiza la membrana del tilacoide, en relación a las distancias en las que probablemente se exponen y entrecruzan los grupos -SH de la H^+ -ATPasa del cloroplasto, así como un mayor conocimiento de la polaridad del microambiente donde se encuentran los grupos -SH. Las distancias que poseen las maleimidas seleccionadas, oscilan en un rango de 3.5 Å a 9.2 Å entre sus centros reactivos (tabla I). El otro aspecto interesante de esta serie de maleimidas bifuncionales es que debido a su estructura química, específicamente a la cadena central que une a los dos radicales maleimido (Tabla I), tienen entre sí coeficientes de reparto distintos, dados por el tamaño y naturaleza química del sustituyente que se une al nitrógeno del radical maleimido, dicho sustituyente le confiere a la molécula de maleimida una determinada liposolubilidad o hidrosolubilidad. Esto, amplifica la posibilidad de que las maleimidas tengan accesibilidad a los distintos grupos -SH expuestos de las subunidades del complejo CF_0 - CF_1 localizados en microambientes hidrofílicos-hidrofóbicos diferentes.

En la figura 5 se muestra la inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa en CI-AL-RE por bismaleimidas en función del tiempo de preincubación. En esta gráfica se incluyeron los resultados correspondientes a la clorometilmaleimida, trimetilenbismaleimida y tetrametilenbismaleimida en % de inhibición con respecto al control. La clorometilmaleimida aunque no contiene en su estructura dos radicales maleimido (Tabla I) es posible que se una

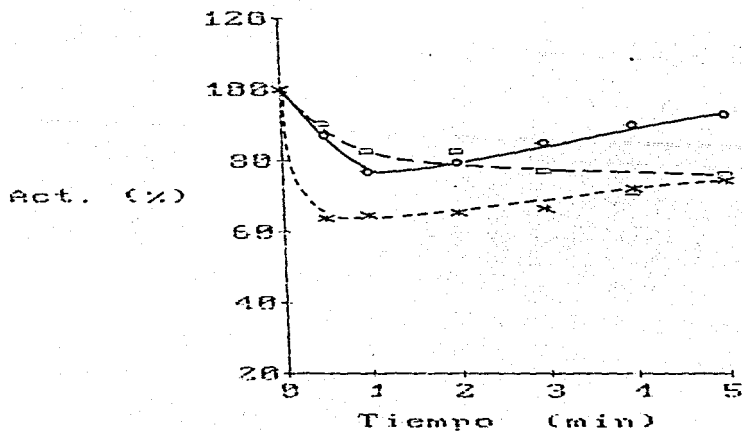


Fig. 5. Determinación de los tiempos óptimos de inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a membranas tilacoides inducida por maleimidas bifuncionales. Las condiciones de ensayo son semejantes a las descritas en la Fig. 3. Los ensayos corresponden a la clorometilmaleimida (x---x), trimetilbismaleimida (□---□) y tetrametilbismaleimida (●---●). Los valores graficados representan el % de actividad de los tratamientos respecto a la actividad del control en función del tiempo de interacción de las bismaleimidas con los cloroplastos.

covalentemente a dos grupos -SH debido a que además del radical maleimido las características químicas del cloro en el radical clorometilo unido al maleimido, es un excelente grupo saliente y entraría con especificidad al azufre de los grupos -SH de CF_1 . La inhibición que se observa es variable y depende del tipo de bismaleimida ensayada, alrededor de 1 min de incubación es suficiente para lograr el mayor efecto de inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida al tilacoide. El efecto del tiempo de preincubación para la N-N-Bismaleimida, dihidroxi-etilen-bismaleimida, bismaleimidometil-eter y metilbismaleimida (graficados de la misma manera) son semejantes a los presentados en la figura 5, por lo cual no se muestran, pero los tiempos óptimos (t_{Hoi}) correspondientes a éstas maleimidadas se presentan en la Tabla II. En general los óptimos de inhibición de la actividad Mg^{+2} -ATPasa por las maleimidadas bifuncionales son tiempos cortos, en ningún caso es mayor de 3 min (Tabla II) y son menores que los t_{Hoi} de las maleimidadas monofuncionales. Los valores del t_{Hoi} para las maleimidadas bifuncionales están en el siguiente orden: etilbismaleimida (3 min) > N,N'-bismaleimida, bismaleimidometil-eter, dihidroxi-etilbismaleimida (2 min) > trimetilbismaleimida, tetrametilbismaleimida, clorometilmaleimida (1 min).

(3.4) Efecto de la concentración de maleimidadas bifuncionales en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a la membrana del tilacoide.

La figura 4 muestra el efecto inhibitorio de concentraciones crecientes de la clorometilmaleimida en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa del factor de acoplamiento unido a la membrana del tilacoide. En la figura 6 se presentan los resultados correspondientes a la N,N-bismaleimida, etilenbismaleimida, dihidroxietilenbismaleimida, bismaleimidometileter, trimetilenbismaleimida y tetrametilenbismaleimida. Las maleimidias bifuncionales indujeron una inhibición parcial de la actividad Mg^{+2} -ATPasa, esta inhibición fue mayor a medida que se incrementó la concentración de las bismaleimidias, en el rango de concentraciones ensayadas (de 0 a 1mM), con excepción de la dihidroxietilenbismaleimida (Fig. 6D) y la bismaleimidometileter (Fig. 6E) que estimularon ligeramente la actividad enzimática a concentraciones menores de 0.1mM y concentraciones mayores causaron inhibición, éstas dos maleimidias tienen la característica de ser más hidrofílicas comparadas con las otras maleimidias bifuncionales ensayadas.

La $I_{Hmáx}$ obtenida de las figuras 4 y 6, de las maleimidias bifuncionales se presentan en la Tabla III. El orden decreciente de inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa producida por éstas maleimidias es:

N,N'-bismaleimida	(80%)	>
tetrametilenbismaleimida	(64%)	>
dihidroxietilenbismaleimida	(63%)	>
trimetilenbismaleimida	(54%)	>
etilenbismaleimida	(44%)	>
clorometilmaleimida	(15%)	>
bismaleimidometileter	(12.5%)	

La mayor inhibición producida por la N,N'-bismaleimida fue de 80% (Fig. 6F).

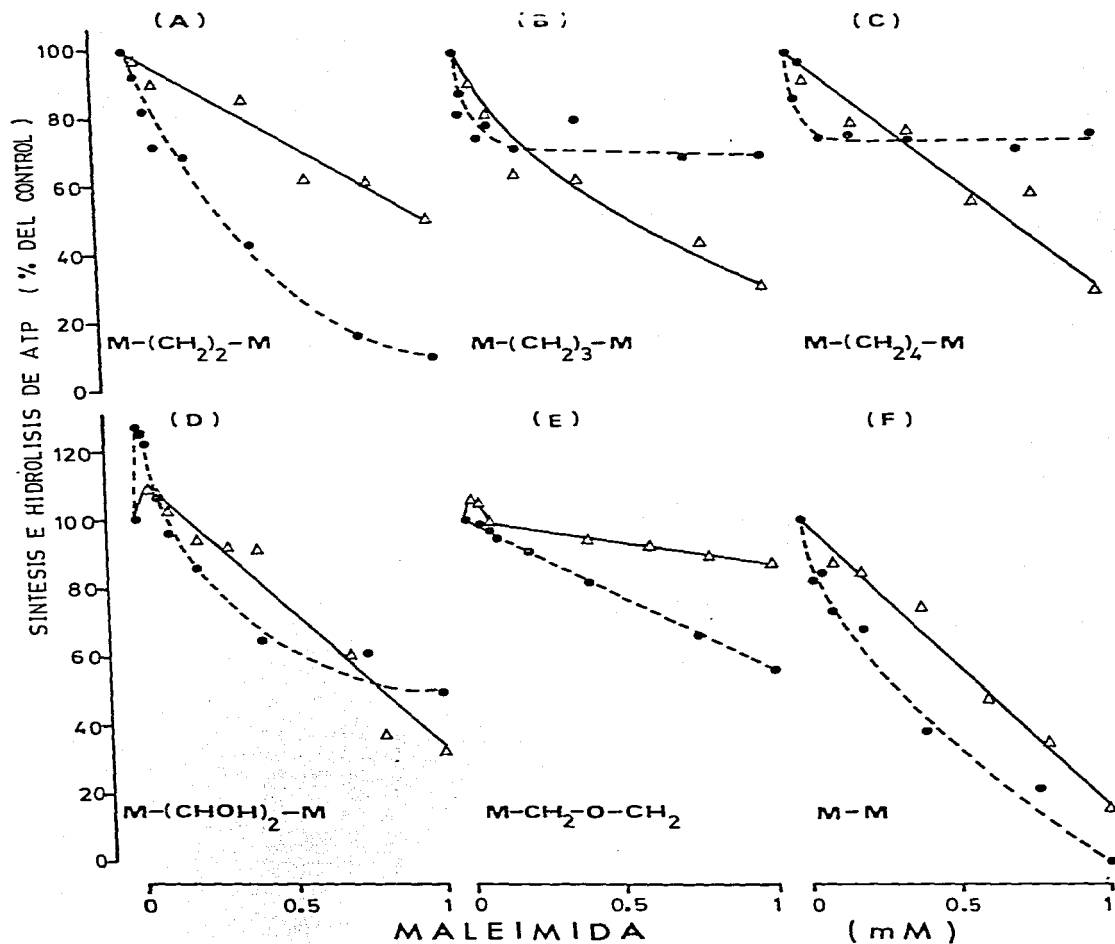
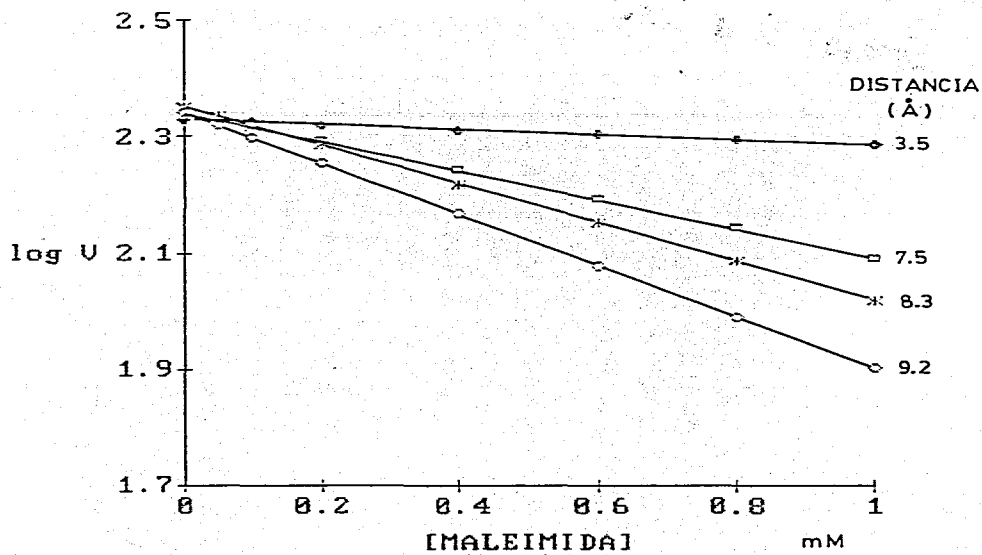


Fig. 6. Efecto de concentraciones variables de maleimidas bifuncionales en las actividades de la Mg^{+2} -ATPasa (Δ - Δ) y de la ATP-sintetasa (\bullet -- \bullet) unidas a membranas tilacoides de cloroplastos de plantas de chicharos. Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones que las descritas en la Fig. 4. Los resultados se presentan como % de la actividad de los tratamientos con respecto al control en función de la concentración de bismaleimidas en el medio.

Un aspecto interesante en relación al efecto de las maleimidas bifuncionales como inhibidores de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a la membrana del tilacoide, es que, aunque los valores de la inhibición máxima ($I_{H_{max}}$) son considerablemente diferentes entre sí (Tabla IID), los valores de la concentración para inducir 50% de inhibición en la actividad Mg^{+2} -ATPasa ($C_{H_i}^{50}$) son prácticamente iguales (0.5 mM) para las siete maleimidas bifuncionales (Tabla IID).

Con la finalidad de determinar si existe relación entre la inhibición de la Mg^{+2} -ATPasa unida a la membrana del tilacoide y la distancia entre centros reactivos de las maleimidas bifuncionales se graficaron los valores del logaritmo de la velocidad ($\log V$) en función de la concentración de las maleimidas obtenidos por regresión lineal (Fig. 7). Se seleccionaron las curvas pertenecientes a cuatro maleimidas que mostraron una relación lineal entre la distancia de sus centros reactivos y el grado de inhibición. El orden creciente de inhibición inducido por las bismaleimidas, la distancia creciente entre centros reactivos y el coeficiente de correlación obtenidos según la Fig. 7 es: clorometilmaleimida (15%, 3.5Å, -0.8) > etilenbismaleimida (44%, 7.5Å, -0.93) > trimetilenbismaleimida (54%, 8.3Å, -0.83) > tetrametilenbismaleimida (64%, 9.2Å, -0.9); de estos resultados se puede deducir que a mayor distancia entre centros reactivos hay mayor inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a la membrana del tilacoide. Sin embargo, nótese que la N,N'-bismaleimida (coeficiente de correlación -0.9) con una distancia de 5.5 Å entre centros reactivos (ligeramente mayor que



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Fig. 7. Inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa en función de la concentración de bismaleimidas y su relación con la distancia entre los centros reactivos de las bismaleimidas. Las curvas corresponden a la clorometilmaleimida (●—●), etilenbismaleimida (□—□), trimetilenbismaleimida (×—×) y tetrametilenbismaleimida (○—○). Los valores graficados se obtuvieron por regresión lineal del log de la velocidad de hidrólisis del ATP por la Mg^{+2} -ATPasa unida al tilacoide expresada en $\mu\text{Moles ATP hidrolizado} \cdot \text{mg}^{-1}$ clorofila $\cdot \text{h}^{-1}$ en función de la concentración de bismaleimida. Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones que las señaladas en la Fig. 4.

la clorometilmaleimida) promovió la mayor inhibición (I_{Hmax} de 80%) de entre todas las maleimidias (Tabla III). La recta obtenida para la N,N'-bismaleimida (no mostrada) tendría una pendiente menor que cualquiera de las rectas presentadas en la figura 9, es decir, estaría colocada abajo de la tetrametilenbismaleimida. El efecto observado con la N,N'-Bismaleimida podría sugerir que al menos uno de los grupos -SH que entrecruza no es accesible para las otras maleimidias, incluida la clorometilmaleimida, por lo cual no puede integrarse a la relación distancia-inhibición señalada arriba. Se obtuvieron resultados semejantes respecto a la ausencia de una relación entre las distancias de centros reactivos e inhibición para la dihidroxietilenbismaleimida y la bismaleimidometileter. Al analizar las estructuras de las bismaleimidias que no guardan una relación con las distancias de sus centros reactivos y la inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa, se observa que son más hidrofílicas comparadas con las bismaleimidias de la figura 7. Entre otros factores que pueden afectar la reacción de los grupos -SH con los centros reactivos de las bismaleimidias es el microambiente en el que se localizan dichos grupos -SH y el valor de coeficiente de reparto de las bismaleimidias, por lo que existe la posibilidad de que las bismaleimidias hidrofílicas puedan reaccionar solo con los grupos -SH expuestos hacia el medio acuoso de CF_1 .

(4) INFLUENCIA DE ADENIN NUCLEOTIDOS, FOSFATO Y DESACOPLANTE EN LA INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA Mg^{+2} -ATPasa DE CLOROPLASTOS POR MALEIMIDAS.

La iluminación de tilacoides de espinaca lavados 2 o 3 veces con el medio de resuspension, y modificados covalentemente con N-etilmaleimida (McCarty y Fagan 1973) y o-fenilbismaleimida (Weiss y McCarty 1977) en condiciones de iluminación promueve la incorporación de éstos compuestos en algunas de las subunidades del factor de acoplamiento 1. Esta incorporación produce inhibición de la fotofosforilación fotosintética (Magnusson y McCarty 1975, Weiss y McCarty 1977) y es protegido con desacoplantes y nucleótidos (ADP, ATP). Para determinar si éste era el caso en la inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a la membrana del tilacoide de CI-AL-RE de chícharo, rotos en el momento de la reacción con la maleimida, se eligieron dos maleimidias monofuncionales y cuatro bifuncionales para determinar el efecto de su unión covalente con los grupos -SH del CF_1 en la presencia de adenin nucleótidos, fosfato o NH_4Cl (desacoplante). Las maleimidias seleccionadas fueron: NEM, fenilmaleimida, clorometilmaleimida, N,N'-bismaleimida, trimetilenbismaleimida y tetrametilenbismaleimida. Los nucleótidos, fosfato, desacoplante y sus mezclas fueron: ADP (1mM), ADP+Pi (1mM, 3mM), ATP (2.2 mM), ATP+Pi (2.2mM, 3mM), Pi (3mM) y NH_4Cl (4mM).

En la tabla IV se presentan los resultados obtenidos respectoa a la inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a la membrana del tilacoide, muestra que la inhibición fue menor o totalmente protegida por la presencia de ADP, con excepción de la clorometilmaleimida, que indújo un incrementó en la inhibición y fue de 11% (sin ADP) a 65% (con ADP) respecto al control.

Tabla IV. Efecto de adenin nucleótidos, fosfato y cloruro de amonio en la inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa por maleimidas. La Mg^{+2} -ATPasa de cloroplastos intactos (30 μ g de clorofila) fue activada como se indicó en la Fig. 1. Enseguida se adicionaron simultáneamente las maleimidas y los nucleótidos, el Pi ó el NH_4Cl , se continuó con la iluminación por tiempos equivalentes a los "tiempos óptimos de inhibición" correspondiente a cada maleimida. Inmediatamente se apagó la fuente luminosa y se adicionó un medio cuya composición era: $MgCl_2$ 2mM; NH_4Cl 1.1mM; ATP 2.2mM + $[\gamma-^{32}P]ATP$ 2×10^6 cpm $^{32}P/\mu$ mol ATP; Tricina 15mM a pH 8. A las muestras que contenían el ATP desde el marcaje se les adicionó un medio semejante para el ensayo, pero sin el ATP 2.2mM. Los detalles de la activación y el ensayo de la Mg^{+2} -ATPasa están descritos en MATERIALES Y METODOS.

Actividad de la Mg^{+2} -ATPasa como % del control o ($\mu\text{mol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}\text{clorofila}\cdot\text{h}^{-1}$) por adición de:

Adición	-	ADP	ADP+Pi	ATP	ATP+Pi	Pi	NH_4Cl
-	100(200)	100(182.7)	100(216.7)	100(250)	100(295)	100(146.7)	100(262.3)
NEM	41.6(83.3)	89(162.6)	99.2(215)	119.3(298.3)	157.3(464)	200(294)	84.3(221)
Fenil-							
maleimida	60(120)	90.3(165)	110.8(240)	108(270)	92.2(272)	163.6(240)	58.2(152.5)
Clorometil-							
maleimida	89(178)	35(64)	76.2(165.17)	154.4(386)	184.4(544)	199(292)	32.8(86)
N,N'-bisma-							
leimida	32.5(65)	108.7(198.5)	110.8(240)	200.8(502)	143(422)	241.3(354)	110.3(289.5)
Trimetilen-							
bismaleimida	45.4(90.8)	91.5(167.17)	96.2(208.33)	100(250)	69.8(206)	103.6(152)	55.5(145.5)
Tetrametilen-							
bismaleimida	53(106)	91.8(167.7)	92.3(200)	76.8(192)	44.8(132)	99.5(146)	42(110.27)

En la misma Tabla IV, se observa que la presencia de ATP en el medio de reacción de la maleimida con los grupos -SH del CF_1 no solo eliminó la inhibición en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa por las maleimidadas, sino además, en la mayoría de los casos incrementó la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa (Tabla IV). Por ejemplo, 2.2mM de ATP y 1mM de N,N'-bismaleimida indujo una actividad de 200%, respecto al control. Este resultado podría sugerir que la N,N'-Bismaleimida entrecruza diferentes grupos -SH en CF_1 cuando ocurre el cambio conformacional por energización luminosa del tilacoide y que además N,N'-bismaleimida detecta el cambio conformacional inducido por ATP. En el primer caso la bismaleimida induce inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa, mientras que en el segundo caso el entrecruzamiento induce la activación de la enzima. Cambios conformacionales diferentes en el CF_1 han sido sugeridos por Ryrie y Jagendorf (1971), quienes evaluaron diferencias en la incorporación de 3H_2O en CF_1 de cloroplastos energizados en presencia y en ausencia de sustratos y desacoplantes.

Obsérvese que el fosfato (KH_2PO_4 3mM) no solo previno la inhibición de la actividad Mg^{+2} -ATPasa producida por las maleimidadas, sino que además condujo a un notable incremento de la actividad enzimática con respecto al control, por ejemplo, con la N,N'-bismaleimida la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa fue de 241%. Pero la 1,4-tetrametilenbismaleimida en presencia de fosfato produjo sólo protección de la inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa (Tabla IV), éste resultado es semejante al efecto que

produjo el ATP en la inhibición de la Mg^{+2} -ATPasa inducida por maleimidias.

En general las mezclas de ADP+Pi y maleimidias condujeron a velocidades hidrolíticas ligeramente mayores que las promovidas por las mezclas de maleimidias y ADP, pero son marcadamente menores que las obtenidas por las maleimidias en presencia de Pi solo (Tabla IV). La inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa de cloroplastos producida por NEM, N-fenilmaleimida, N,N'-bismaleimida, trimetilenbismaleimida y tetrametilenbismaleimida fue prevenida por la presencia de la mezcla ADP+Pi (1mM, 3mM) en el medio (Tabla IV). En el caso de la clorometilmaleimida, la mezcla de ADP+Pi provocó un incremento en la inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa de 11% a 23.8%, este efecto fue semejante al producido por el ADP (1mM), en cambio con la mezcla nucleótido-clorometilmaleimida la inhibición fue mayor (65%). Lo anterior nos indica que los efectos del nucleótido ADP y el fosfato no son aditivos y que el incremento en la actividad promovido por el fosfato solo es inhibido por el ADP, cuando se mezclan.

La adición de la mezcla ATP+Pi (2.2mM, 3mM) durante el marcaje de los cloroplastos con NEM, fenilmaleimida, clorometilmaleimida y N,N'-bismaleimida evitó la inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa (Tabla IV) y en algunos casos también incrementó considerablemente la actividad enzimática. La inhibición de la Mg^{+2} -ATPasa producida por la trimetilenbismaleimida y la tetrametilenbismaleimida (55%) no fue

prevenida totalmente (30.2%) por la presencia de la mezcla ATP+Pi. Nuevamente en esta serie de ensayos observamos que los efectos del nucleótido (ATP) y el Pi no fueron aditivos y los incrementos en la actividad catalítica producidos por las mezclas de Pi con maleimidas aparentemente son inhibidos parcialmente por el nucleótido.

EL fosfato y el ADP son productos de la hidrólisis del ATP, pero cuando la enzima cataliza la síntesis del ATP el fosfato y el ADP son los sustratos del complejo H^+ -ATPasa. En este trabajo observamos que los productos de la Mg^{+2} -ATPasa causan protección de la inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa de cloroplastos de chicharo inducido por maleimidas monofuncionales y bifuncionales. Finalmente el desacoplante NH_4Cl produjo sólo una protección parcial del efecto inhibitorio de las maleimidas; notándose una protección total sólo con la N,N'-bismaleimida (Tabla IV). En la misma Tabla se observa que el desacoplante en presencia de fenilmaleimida, trimetilenbismaleimida y tetrametilenbismaleimida no causó ninguna protección, ya que las velocidades son semejantes a las de los controles con maleimidas. Además, se observó que la clorometilmaleimida en presencia del NH_4Cl indujo una mayor inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa, de 11% respecto al control con maleimida a 67.2% en presencia de maleimida y desacoplante. Estos resultados son opuestos a lo reportado por McCarty y Fagan (1973) y Weiss y McCarty (1977) respecto a la protección de la inhibición por desacoplantes cuando la inhibición de la fotofosforilación es inducida por maleimidas monofuncionales o bifuncionales. Nuestros

resultados sugieren que al desenergizarse la membrana del tilacoide por efecto del desacoplante, podrian inducirse cambios conformacionales que exponen grupos -SH de las subunidades de CF₁ que normalmente no están expuestos en la luz o en la obscuridad y que resultan muy accesibles a la clorometilmaleimida, la cual induce una mayor inhibición que en ausencia del desacoplante.

Es interesante destacar el comportamiento de algunas maleimidias cuando se ensayaron en presencia de nucleótidos, Pi o desacoplante. De los compuestos ensayados, la clorometilmaleimida es la que tiene menor distancia entre sus centros reactivos (3.5Å, Tabla D). Se observó una fuerte tendencia al incremento de la inhibición en presencia de ADP, ADP+Pi y desacoplante con esta maleimida pero no con ATP.

Los nucleótidos, fosfato y desacoplante eliminaron totalmente la inhibición de la actividad de la Mg⁺²-ATPasa inducida por la N,N'-Bismaleimida, aún cuando ésa inhibición fue la más potente (I_{Hmáx} 80%, Tabla III) de entre las 12 maleimidias ensayadas. La distancia entre centros reactivos de la N,N'-bismaleimida es de 5.5Å y es mayor que la de la clorometilmaleimida (3.5Å). Los resultados sugieren que en ausencia de nucleótidos y desacoplante la N,N'-bismaleimida está reaccionando con grupos -SH que probablemente son inaccesibles a la acción de la clorometilmaleimida y que éstos grupos -SH se encuentran a una distancia mayor de 3.5Å y probablemente muy cercana a 5.5Å. El desacoplante, los nucleótidos, el fosfato y sus mezclas no solo evitaron la inhibición por la N,N'-bismaleimida, sino que, además

promovieron en todos los casos, incremento en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida al tilacoide. Los incrementos en la actividad hidrolítica más importantes, promovidos por ésta maleimida, se produjeron en presencia de ATP o Pi, 200% y 241%, respectivamente (Tabla IV).

Ni el ADP ni el desacoplante revirtieron totalmente la inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa inducida por la trimetilenbismaleimida que tiene 8.3Å de distancia entre centros reactivos y que resulta mayor que la de la clorometilmaleimida y la N,N'-bismaleimida. Únicamente en presencia de ATP o Pi se previno la inhibición al 100% (Tabla IV), lo que podría sugerir que el ATP y Pi, pero no el ADP ni el desacoplante, protegen los grupos -SH que bloquea la trimetilenbismaleimida.

Los centros reactivos de la tetrametilenbismaleimida están entre sí a una distancia de 9.2 Å, es la bismaleimida con mayor distancia entre centros reactivos de entre todas las utilizadas en éste trabajo. La inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa inducida por ésta maleimida no fue totalmente revertida por el desacoplante, nucleótidos o sus mezclas con Pi (tabla IV), además en la presencia de ATP+Pi o desacoplante se incrementó la inhibición.

Los resultados presentados en la Tabla IV, en relación a las maleimidias bifuncionales, sugieren que: aparentemente existe una distancia crítica (o un coeficiente de reparto de la enzima, que es semejante al de las bismaleimidias o la contribución de ambos

factores) entre centros reactivos de la maleimida para que se dé una protección efectiva con los productos, substrato o desacoplante a la inhibición de la actividad catalítica inducida por las maleimidas. La distancia entre los centros reactivos, de éstos compuestos entrecruzantes, de 5.5 Å o cercanas a ésta, aparentemente optimiza la efectividad de los nucleótidos, Pi, sus mezclas y desacoplante en la prevención de la inhibición. Distancias menores (3.5 Å) o mayores (8.3 Å y 9.2 Å) de los compuestos entrecruzantes parecen disminuir la susceptibilidad del sistema a la reversión de la inhibición. Aún más, distancias menores o mayores de 5.5 Å en presencia de nucleótidos o desacoplante parecen incrementar la inhibición.

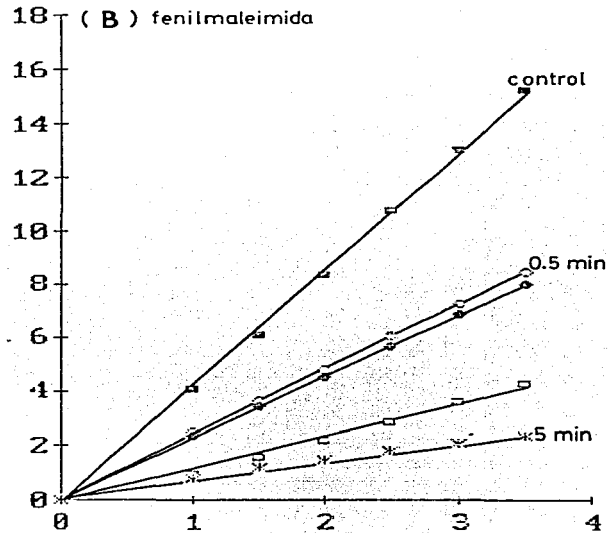
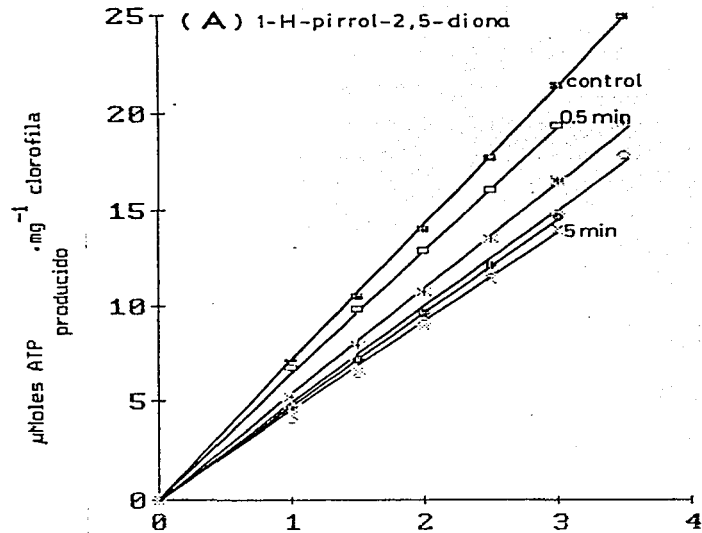
(5) MODIFICACION DE LA FOTOFOSFORILACION EN CLOROPLASTOS POR MALEIMIDAS MONOFUNCIONALES Y BIFUNCIONALES.

En nuestra investigación, la medición de la actividad de la ATP-sintetasa se inició con la adición de cloroplastos intactos a un medio isotónicamente menor al que contiene a los cloroplastos intactos, induciéndose la ruptura de los organelos simultáneamente con la iluminación, en ausencia de substrato (ADP-Pi) e incubando por 1.5 minutos. La activación de la ATP-sintetasa con luz saturante requiere de sólo unos segundos para llegar a la velocidad máxima del estado de equilibrio. Sin embargo se decidió utilizar (1.5min) que es el mismo tiempo empleado para inducir la activación de la Mg^{+2} -ATPasa unida a tilacoides para tener las

mismas condiciones de tiempo de activación en ambas actividades enzimáticas. Después del tiempo de activación se adicionaron las maleimidias solubilizadas en el mismo medio de ensayo y se continuó con la iluminación por tiempos constantes o variables (según se indica en las figuras), manteniendo el pH en 8, al final de tiempo de marcaje se adicionaron los substratos [ADP (1mM) y Pi (3mM)] para la síntesis de ATP, por incubación de la suspensión de tilacoides durante dos minutos tal como se indicó en MATERIALES Y MÉTODOS. Las condiciones de activación de la ATP-sintetasa e incorporación de las maleimidias se realizó en condiciones semejantes a los ensayos respectivos para la Mg^{+2} -ATPasa unida a tilacoides, con la finalidad de facilitar la interpretación de los resultados.

(5.1) Modificación de la fotofosforilación por maleimidias monofuncionales y bifuncionales en función del tiempo de preincubación en la luz.

Con el objeto de determinar el tiempo óptimo de reacción de las maleimidias monofuncionales con los tilacoides y evaluar su efecto en la síntesis del ATP, se variaron los tiempos de preincubación con las maleimidias y los resultados encontrados de la síntesis del ATP en el transcurso del tiempo a diferentes tiempos de preincubación de los tilacoides con algunas maleimidias se muestra en la figura 8 A-B. La 1-H-pirrol-2,5-diona (0.5mM) produjo inhibición creciente de la síntesis de ATP en función del tiempo de reacción de la maleimida. Las diferencias de



Tiempo de síntesis de ATP (min)

Fig. 8. Inhibición de la fotofosforilación en cloroplastos por maleimidias monofuncionales en función del tiempo de síntesis del ATP. Una alícuota de cloroplastos intactos (30 μ g de clorofila) se adicionaron a 3 ml de medio con la siguiente composición: sorbitol 100mM, $MgCl_2$ 1mM, KCl 100mM, metil viológeno 50 μ M y Tricina 1mM a pH8. Se preiluminaron, con agitación durante 1.5 min, enseguida se adicionó (A) la 1-H-pirrol-2,5-diona (0.5mM) o (B) fenilmaleimida (0.5mM) solubilizadas en el mismo medio y se continuó con la iluminación por tiempos diferente (entre 0.5 min y 1.5 min), después de transcurrido ese tiempo se adicionaron el ADP y el Pi (1mM:3mM) y se evaluó la velocidad de síntesis del ATP como se indicó en MATERIALES Y METODOS. Los resultados se presentan como μ Moles de ATP producido mg^{-1} clorofila (acumulación de ATP en el tiempo) en función del tiempo de fotofosforilación. Cada familia de rectas corresponde, además del control, a tiempos crecientes de iluminación de los cloroplastos en presencia de las maleimidias a concentraciones constantes (0.5 mM).

inhibición encontradas para la síntesis del ATP entre 1 y 8 min no fueron grandes, ya que, solo varió de 13 a 9 μ Moles ATP producido mg^{-1} clorofila (después de 2 min de hidrólisis) (Fig. 8-A). Un efecto mayor en la inhibición de la fotofosforilación se observó con la fenilmaleimida (Fig. 8-B), ya que, la inhibición se incrementó notablemente con el tiempo de preincubación. La inhibición de la síntesis del ATP producida por la fenilmaleimida es casi total con una concentración de 0.5mM de maleimida y 5 min de preincubación.

El efecto del tiempo de preincubación de la NEM, metilolmaleimida y carboxihidroxifenilmaleimida en la actividad de la ATP-sintetasa resultó semejante a lo descrito para la 1-H-pirrol-2,5-diona, por lo cual no se presentan las curvas obtenidas para éstas maleimidias. Aunque, los tiempos óptimos de inhibición de la fotofosforilación (t_{Sol}) para las maleimidias monofuncionales se reportaron en la Tabla II.

En la figura 9 A-B se presentan los resultados obtenidos con algunos tiempos de preincubación de maleimidias bifuncionales con los cloroplastos en la luz, y su efecto en la síntesis de ATP. Tiempos cortos (30 s) de preiluminación de los cloroplastos en presencia de 0.5mM de clorometilmaleimida, incrementaron la síntesis de ATP respecto al control de manera no lineal, por lo que, después de 4 min la síntesis de ATP es equivalente a la del control (Fig. 9-A). Sin embargo, 6 min de preiluminación produjeron una notable inhibición de la fotofosforilación y la inhibición se hace lineal respecto al tiempo de síntesis del ATP.

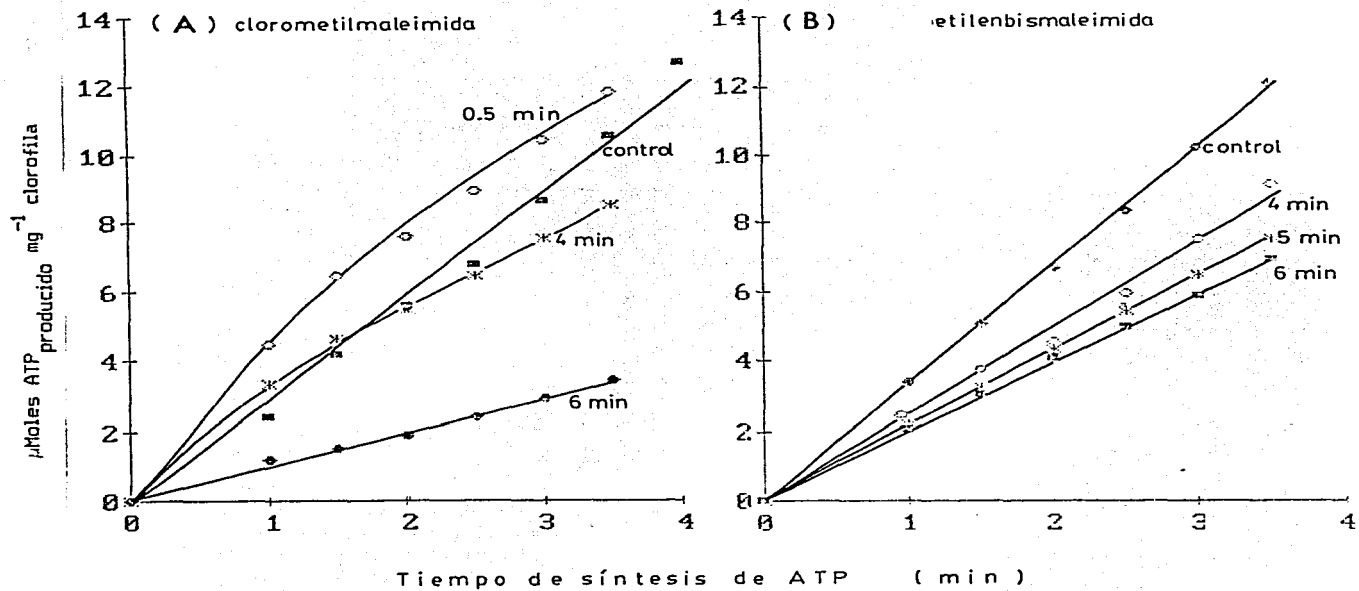


Fig. 9. Inhibición de la fotofosforilación en cloroplastos por bismaleimidias en función del tiempo de síntesis del ATP. Los ensayos se realizaron en las condiciones descritas para la Fig. 8. Cada familia de curvas corresponde además del control, a tiempos crecientes de iluminación (entre 0.5 min y 6 min) de los cloroplastos en presencia de: (A) clorometilmaleimida 0.5mM o (B) etilbismaleimida 0.5mM.

En la figura 9-B se muestran los resultados pertenecientes a la etilenbismaleimida, se observo que la fotofosforilación se inhibió en función del tiempo de preincubación de los cloroplastos con esta bismaleimida.

Los resultados de los ensayos correspondientes al efecto del tiempo de preincubación de los cloroplastos en la luz con la N,N'-bismaleimida, dihidroxi-etilenbismaleimida, bismaleimidometil-eter, trimetilenbismaleimida, bismaleimidometileter, trimetilenbismaleimida y tetrametilenbismaleimida no se muestran, ya que, presentaron efectos semejantes a las presentadas para la clorometilmaleimida o a las correspondientes a la etilenbismaleimida (Fig. 9 A-B). Los resultados encontrados del tiempo (t_{50}) de preiluminación de los cloroplastos con las maleimidias se muestran en la Tabla II, ^{Y se obtuvieron de la Fig. 10,} los t_{50} varían entre 5 y 6 minutos, con excepción de la 1-H-pirrol-2,5-diona (que fue menor), éstos tiempos resultaron mayores que los requeridos para inhibir la Mg^{+2} -ATPasa (Tabla II), con diferencia de hasta 5 minutos para la trimetilenbismaleimida, y la tetrametilenbismaleimida. Esta divergencia en tiempos de exposición a las maleimidias muestra que la modificación química por maleimidias al complejo H^+ -ATPasa de cloroplastos es más sensible para la hidrólisis que para la síntesis del ATP y sugiere que una misma maleimida, monofuncional o bifuncional, está detectando conformaciones diferentes del complejo H^+ -ATPasa en donde los grupos -SH a los que se unen las maleimidias están expuestos a distancias y/o medio ambiente diferentes.

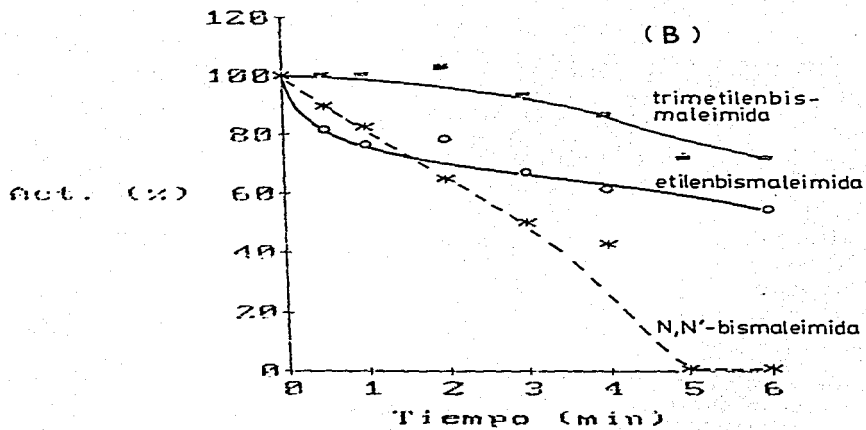
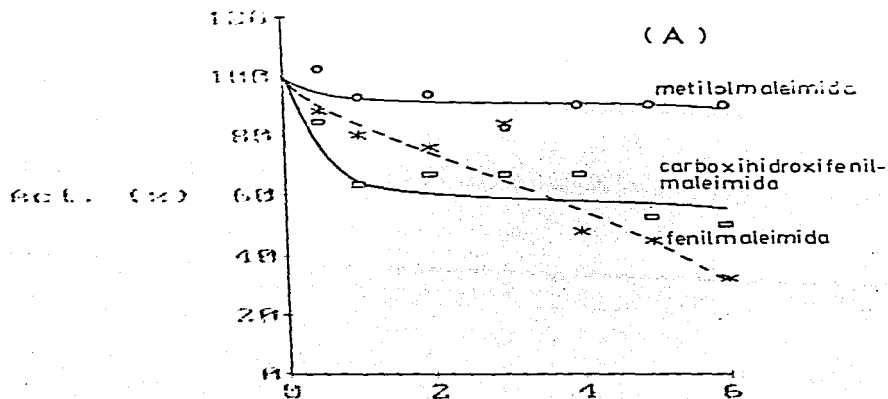


Fig. 10 Determinación de los tiempos óptimos de inhibición de la fotofosforilación en cloroplastos por (A) maleimidias monofuncionales y (B) bismaleimidias. Las condiciones de ensayo son semejantes a las descritas en las figuras 8 y 9. Los valores corresponden al % de la velocidad de fotofosforilación de los cloroplastos tratados con maleimidias respecto al control en función del tiempo de marcaje.

Weiss y McCarty (1977) reportaron que la maleimida bifuncional o-fenilencimaleimida (OPDM), inhibió irreversiblemente la fotofosforilación en tilacoides lavados de cloroplastos rotos de espinacas, concentraciones menores de $100\text{ }\mu\text{M}$, incubados por 1.5 min de reacción de la OPDM con el cloroplasto, por lo que fue, aproximadamente 500 veces mas efectiva que la NEM. Debiendo ser iluminados los tilacoides en presencia de ese reactivo antes del ensayo de la fotofosforilación. Además, la OPDM indujo aceleración en el transporte de electrones y abatió la bomba de protones, por lo que fue caracterizada como desacoplante, a diferencia de la NEM que es un inhibidor de la transferencia de energía (Moroney et al, 1982).

Considerando esos resultados, en éste trabajo realizamos ensayos con las bismaleimidias en un rango de concentración de $5\text{ }\mu\text{M}$ a $20\text{ }\mu\text{M}$, y de 0.1 mM a 1 mM . Se observó que las maleimidias bifuncionales, con excepción de la dihidroxi-etilenbismaleimida, a concentraciones de $5\text{ }\mu\text{M}$ inhibieron la fotofosforilación con respecto al control, con un tiempo óptimo menor de inhibición y concentraciones menor de maleimida como la N,N'-bismaleimida y trimetilenbismaleimida.

La disminución de la velocidad de inhibición de la síntesis de ATP por concentraciones de $5\text{ }\mu\text{M}$ respecto a la obtenida con 0.5 mM de maleimidias bifuncionales podría explicarse, probablemente, como un efecto de "dilución" del compuesto, ya que en este trabajo se utilizaron cloroplastos intactos que poseen una elevada cantidad de proteínas estromales que se ponen en contacto con las

maleimidas durante el ensayo y probablemente reaccionan con los -SH de estas proteínas. Para determinar el efecto de las maleimidas en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a membranas tilacoides se eligieron concentraciones en el rango de 0 a 1mM, ya que, fueron las concentraciones a las cuales se detectaron mejor los efectos de las bismaleimidas en la fotofosforilación.

(5.2) Efecto de la concentración de maleimidas monofuncionales y bifuncionales en la fotofosforilación.

En la figura 4 se presenta el efecto de concentraciones crecientes de cinco maleimidas monofuncionales en la síntesis de ATP por el complejo CF_0-CF_1 unido a la membrana del tilacoide de cloroplastos. La NEM, la maleimidametilol y la carboxi-hidroxifenilmaleimida inhibieron la fotofosforilación en forma lineal, la inhibición se incrementó junto con la concentración de maleimida. La 1-H-pirrol-2,5-diona y la fenilmaleimida presentaron dos efectos diferentes (Fig. 5): 1º) una activación de 30% y 20%, respectivamente, con concentraciones menores de 0.1mM, y 2º) una inhibición de 80% y 100% respectivamente, a concentraciones de 1mM. De las cinco maleimidas monofuncionales ensayadas, la fenilmaleimida fue el único compuesto que inhibió 100% la síntesis de ATP a 1mM. La activación de la fotofosforilación por la 1-H-pirrol-2,5-diona y la fenilmaleimida podría sugerir la modificación de grupos -SH diferentes a los que modifican las otras maleimidas monofuncionales ensayadas y que con el aumento de la concentración bloquean adicionalmente otros grupos -SH, ya que

se produce inhibición.

La inhibición máxima de la actividad de la ATP-sintetasa ($I_{Smáx}$) inducida por las maleimidas monofuncionales se muestra en la Tabla III. Se observó un rango amplio de inhibición, valores de $I_{Smáx}$ de entre 20% y 100%. Sin embargo, la C_{50} (concentración de maleimida requerida para producir el 50% de la máxima inhibición producida por la maleimida en la actividad de la ATP-sintetasa) para éstas maleimidas no presenta diferencias notables, puesto que todas son cercanas a 0,4mM (Tabla IID). El orden de inhibición de la fotofosforilación para las maleimidas monofuncionales en función de su $I_{Smáx}$ es el siguiente: fenilmaleimida (100%) > carboxihidroxifenilmaleimida (45%) > NEM (35%) > metilolmaleimida (33%) > 1-H-pirrol-2,5-diona (20%).

A continuación analizaremos el efecto del incremento en la concentración de las maleimidas bifuncionales en la actividad de la ATP-sintetasa unida a la membrana del tilacoide. Los resultados se presentan en las figuras 4 y 6. La clorometilmaleimida (Fig. 4-A) y la dihidroxi-etilenbismaleimida (Fig. 6-D) produjeron dos efectos en la síntesis del ATP. 1º) concentraciones menores de 1mM la activaron y 2º) concentraciones mayores la inhibieron. La activación de la fotofosforilación inducida por éstas maleimidas fue de 10% y 30% respecto al control, respectivamente (Fig. 4-A y 6-D). En cambio, la $I_{Smáx}$ (Tabla IID) para éstas dos maleimidas bifuncionales fue muy semejante, aproximadamente 50%.

El incremento en la concentración de trimetilenbismaleimida y

tetrametilenbismaleimida condujo a la inhibición de la ATP-sintetasa (Fig. 6-B y 6-C) en el orden de 30% y 24%, respectivamente, a concentraciones menores de 0.2mM. Concentraciones mayores de cualquiera de éstas dos maleimidas no incrementaron la inhibición de la actividad de la ATP-sintetasa.

En la Tabla III se presentan los valores de máxima inhibición de la fotofosforilación ($I_{Smáx}$) producidos por las maleimidas bifuncionales. Los datos fueron obtenidos de las figuras 4, 6 y 7.

El orden decreciente de inhibición de la fotofosforilación por las maleimidas bifuncionales en función de sus valores de $I_{Smáx}$ es el siguiente: N,N'-bismaleimida (100%) > etilenbismaleimida (89.4%) > clorometilmaleimida y dihidroxietilenbismaleimida (50%) > bismaleimidometileter (44%) > trimetilenbismaleimida (30%) y tetrametilenbismaleimida (24%). Aunque, no se observó una correlación directa entre las distancias de los centros reactivos de las bismaleimidas y la inhibición en la fotofosforilación, se ve que las bismaleimidas con cadena central más hidrofóbica producen menor inhibición de la fotofosforilación. Aparentemente, la inhibición disminuyó a medida que el número de átomos de carbono incrementa en la cadena central de las bismaleimidas.

La C_{Si}^{50} para la trimetilenbismaleimida y para la tetrametilenbismaleimida resultaron muy pequeñas: 0.004mM y 0.001mM, respectivamente, mientras que para las otras maleimidas bifuncionales los valores de C_{Si}^{50} fueron aproximadamente 0.3mM con excepción de la bismaleimidometileter cuya C_{Si}^{50} fue 0.5mM (Tabla III).

(6) EFECTO DE LA N,N'-DIMETILFORMAMIDA (DMF) EN ALGUNAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS DE CLOROPLASTOS DE PLANTAS DE CHICHARO.

(6.1) Inhibición de la fotofosforilación, reacciones de intercambio Pi-ATP y Mg^{+2} -ATPasa por DMF.

En la figura 11 se muestra la inhibición de la fotofosforilación, el intercambio Pi-ATP y la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa por DMF. Concentraciones bajas de DMF inhibieron drásticamente (100%) la reacción de intercambio Pi-ATP y la síntesis de ATP, 15% y 8% del solvente, respectivamente. Por otro lado, la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa fue inhibida parcialmente por la DMF, ya que con 32% de DMF, la inhibición fue sólo del 68%. Así, parecería que la DMF actúa como un inhibidor diferencial de la transferencia de energía.

(6.2) Efecto de la DMF en la bomba de H^{+} .

Los cloroplastos pueden efectuar una captación de protones dependiente de luz y generado por el transporte de electrones, produciéndose una alcalinización del medio que sirve para monitorear el cambio del pH externo (en ausencia de un amortiguador en el medio con cloroplastos). Este fenómeno se conoce como bomba de H^{+} . Como se muestra en la figura 11 y 12, la DMF no tuvo efecto en el incremento del pH externo (o bomba de

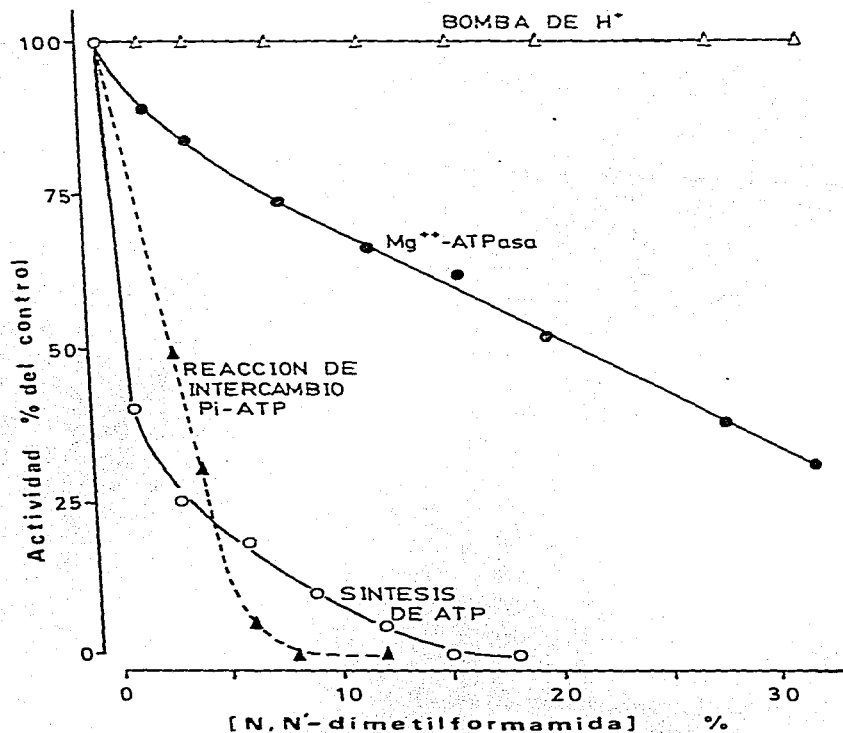


Fig. 11 Efecto de la DMF en el consumo de H⁺, Mg⁺²-ATPasa; síntesis de ATP y reacción de intercambio Pi-ATP. Las condiciones de ensayo fueron descritas en MATERIALES Y METODOS.

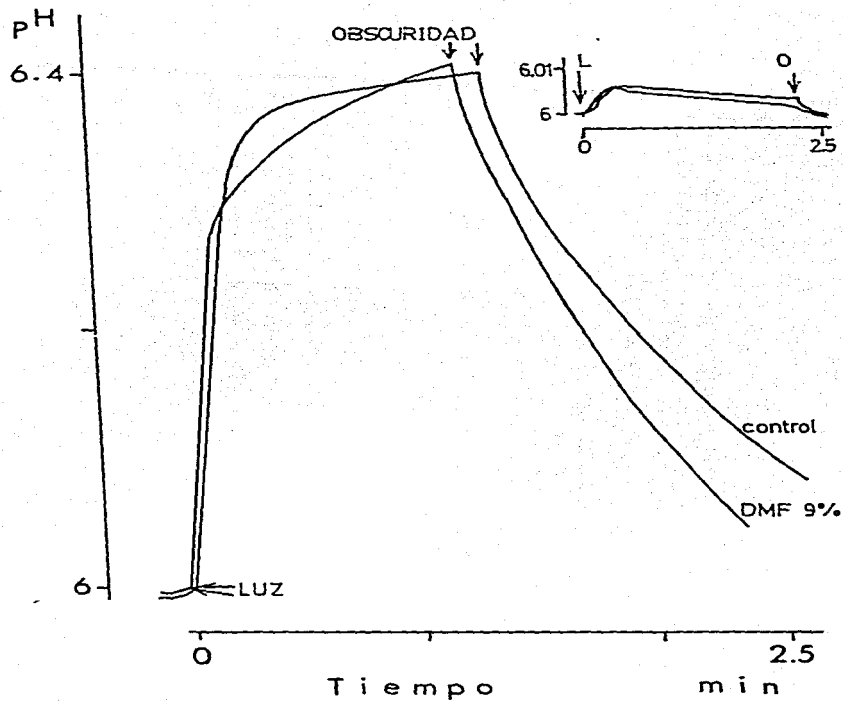


Fig. 12 Medición paralela del consumo de protones por membranas tilacoides en ausencia y en presencia de DMF. Una suspensión de cloroplastos (30 μg de clorofila) se utilizó para el ensayo de la bomba de protones, como se indicó en MATERIALES Y METODOS, en ausencia de DMF (control) o en presencia de 9% de DMF. Otro lote de cloroplastos se lavó con NaCl 10mM y se diluyó con EDTA 0.73mM (pH 7) para tener una concentración final de clorofila de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. después de 10min. de agitación a 15°C se centrifugó a 35 000xg y 10°C. se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue utilizado en el ensayo de la bomba de protones, en ausencia y en presencia de 9% de DMF (RECUADRO).

protones; de los cloroplastos, aun a concentraciones mayores de DMF que inhibieron 32% de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa o 100% la fotofosforilacion. Estos resultados podrian indicar que la DMF no interactua con el canal de H^+ , o que, de hacerlo no modifica la capacidad del canal para la entrada y salida libre de protones.

Efectos semejantes a los obtenidos con la DMF en la bomba de H^+ han sido reportados por el tratamiento de tilacoides con algunos inhibidores de la transferencia de energia, como la NEM (McCarty et al 1972), Dio-9 (McCarty et al 1965), DCCD (McCarty y Racker 1967) y el antisuero contra CF_1 (McCarty y Racker 1966).

En la figura 12 se observa que la DMF no afectó la constante de velocidad de primer orden para el incremento del pH externo de los tilacoides cuando se iluminaron, ni para la salida de H^+ del tilacoide al medio, producida por desenergización de la membrana (en la obscuridad). Si la DMF efectuara alguna interacción especifica con la membrana del tilacoide, de tal manera que, modificara su permeabilidad a protones, podria esperarse que la DMF actuara como los desacoplantes, abatiendo la bomba de H^+ . Sin embargo, aunque inhibió totalmente la sintesis de ATP no modificó en absoluto la bomba de H^+ . Por lo tanto, los resultados de la bomba de H^+ sugieren que la DMF no actúa como desacoplante en los cloroplastos, sino como inhibidor de la transferencia de energia. Además, inhibe la sintesis de ATP, el intercambio Pi -ATP y sólo inhibe parcialmente la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa. Se podria predecir además, que el transporte de electrones se inhibe paralelamente con la sintesis del ATP.

La caída en la velocidad de síntesis de ATP promovida por la DMF podría deberse a que el solvente orgánico tapara el canal de protones del tilacoide, en una forma semejante a como lo hace la N,N'-dicitilhexilcarbodiimida (DCCD) en bacteria, mitocondrias y cloroplastos (McCarty y Racker, 1967). También, es bien sabido que los cloroplastos depletados de CF_1 por iluminación no alcalinizan el medio externo en el que se encuentran los tilacoides, debido a la fuga de H^+ por CF_0 que en esas condiciones representa un canal de H^+ "destapado". Por lo que, a continuación se procedió a aislar cloroplastos depletados de CF_1 para observar el efecto de la DMF en la posible regeneración de la bomba de H^+ . La Fig. 12 (recudro) sugiere que la DMF no tapa el canal de protones (CF_0) ya que, concentraciones diferentes de éste compuesto no regeneraron la bomba de H^+ en los tilacoides depletados de CF_1 a diferencia de como lo hace la DCCD. Nótese que el trazo correspondiente a los cloroplastos depletados de CF_1 y tratados con DMF fue igual al del control (Fig. 12, recuadro).

(6.3) Reversión del efecto de la DMF en la fotofosforilación.

Aunque se conocen muchos detalles acerca de la estructura y propiedades funcionales de las ATPasas, aún están abiertas preguntas fundamentales en relación al mecanismo de transducción de energía y su regulación. Los inhibidores de las ATPasas son herramientas útiles que contribuyen al estudio de algunos de los pasos parciales de la cadena de reacciones que integran al proceso

de transducción de energía y a su regulación. Por ejemplo, la reacción covalente de la dicitlonhexilcarbodiimida con los polipéptidos de la fracción F_0 elucidaron la significancia de esa fracción en la translocación de protones identificándose, además, una de las subunidades integrantes del canal (McCarty y Racker, 1967). Por otra parte, se conocen una gran variedad de compuestos que reaccionan con la fracción F_1 , como la florizina (Izawa et al, 1966), Dio-9 (McCarty et al, 1965), maleimidas (McCarty y Fagan, 1973), que son inhibidores de la H^+ -ATPasa de cloroplastos, actuando como inhibidores de la transducción de energía o como desacoplantes, en el caso de las bismaleimidas que se unen covalentemente a algunas de las subunidades de CF_1 (Weiss y McCarty, 1977). El efecto de los inhibidores puede ser promovido por difentes tipos de interacciones que modifiquen el gradiente de H^+ transmembranal, el estado redox de grupos funcionales, el microambiente en los sitios catalíticos o regulatorios de nucleótidos (Minkov y Strotmann, 1989). Las modificaciones por los inhibidores pueden ser por unión covalente a los residuos de los aminoácidos de la enzima, a los lípidos de la membrana, por inducción de cambios conformacionales de la enzima, por liberación de alguna subunidad o por su interacción directa con los substratos.

Con la finalidad de determinar si el efecto de la DMF en la fotofosforilación, era permanente, debido a su unión covalente, o por inducir la liberación de alguna subunidad del complejo CF_0 - CF_1 de los cloroplastos, se diseñó el experimento descrito en la Tabla V. Los datos indican que la fotofosforilación se recupera a

Tabla V. Reversibilidad de la inhibición de la fotofosforilación producida por la N,N'-dimetilformamida. Se aislaron cloroplastos intactos como se describió en MATERIALES Y METODOS. Se incubó 1.5min bajo condiciones de fotofosforilación una alícuota de cloroplastos que contenía 30µg de clorofila (Experimento I, usado como control) o 100 µg de clorofila (Experimento II, con o sin 15% de DMF. En el Experimento II la suspensión de cloroplastos fue diluida (1:1) con medio (sorbitol 350mM, EDTA 2mM, MgCl₂ 1mM, HEPES 50mM a pH 7.6) y centrifugada para eliminar el medio de resuspensión, ésta operación se repitió dos veces más y se ensayó la síntesis de ATP en los Experimentos I y II. El experimento completo se realizó tres veces. La fotofosforilación se inició cuando la suspensión de cloroplastos se iluminó con una lámpara de proyector (Gaf 2660), después de pasar el haz de luz a través de 5cm de CuSO₄ al 1%.

Experimento	DMF 15%	Síntesis de ATP µMoles ATP mg ⁻¹ h ⁻¹	Actividad (%)
I	-	750	100
	+	0	0
II	-	607.5	100
	+	595.4	98

valores semejantes a los del control con tilacoides que previamente habían sido tratados con 15% de DMF y posteriormente lavados con medio libre de DMF. Lo que demostro que la DMF no se une covalentemente a su sitio (o sitios) de interacción que induce la inhibición de la transducción de energía, ni promueve la liberación de ninguna subunidad de la H^+ -ATPasa del cloroplasto.

Como se indicó en MATERIALES Y METODOS los ensayos de fotofosforilación se realizaron a partir de cloroplastos intactos que se rompieron durante la activación, por lo que el contenido total del estroma estaba presente en el ensayo. La ausencia del contenido estromal, como era de esperarse, no modificó el efecto de la DMF en la fotofosforilación. Lo anterior se comprobó evaluando la fotofosforilación con o sin DMF de membranas tilacoides lavadas previamente dos veces con medio de resuspensión en condiciones hipotónicas. En éstas condiciones, se obtuvo una curva igual a la mostrada en la Fig. 11 para la síntesis de ATP en presencia de diferentes concentraciones de DMF.

(6.4) Efecto de la DMF en el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado de agua a metil viológeno en cloroplastos intactos lisados durante el ensayo.

La DMF inhibió parcialmente el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado de agua a metil viológeno en CI-AL-RE. La inhibición se incrementó con el aumento de la concentración de DMF (Fig. 13). El transporte de electrones basal

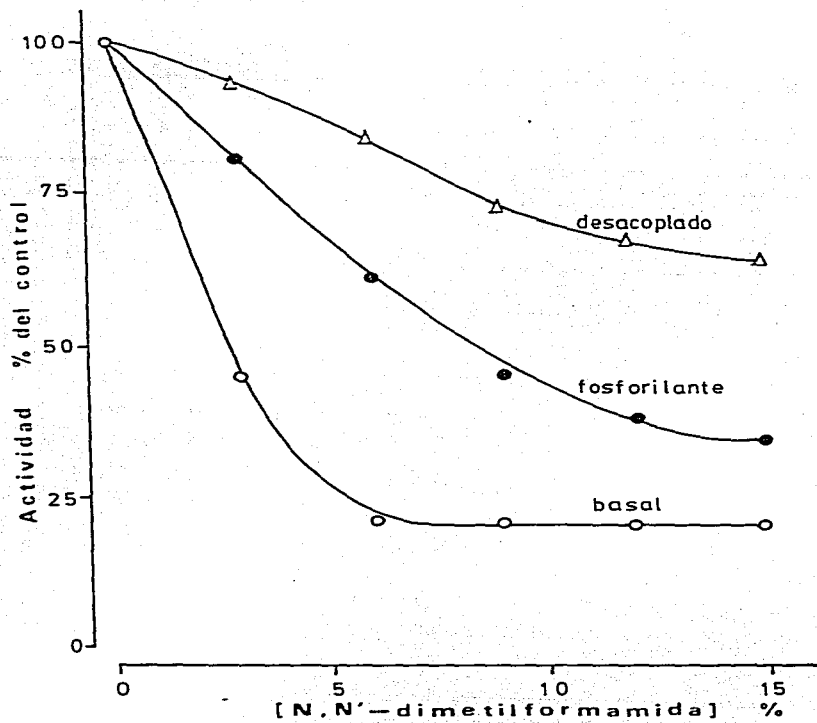


Fig. 13. Efecto de la DMF en la reacción de Hill (cadena transportadora de electrones), de agua a metilviógeno. Las condiciones de ensayo se describieron en MATERIALES Y METODOS. Cada experimento se inició cuando la mezcla de reacción se iluminó con una lámpara de proyector (gaf 2660), pasando el haz luminoso previamente a través de una solución de CuSO_4 al 1% con espesor de 5cm. Las velocidades del transporte de electrones para el control, expresadas en μmol de oxígeno mg^{-1} de clorofila h^{-1} fueron: basal 247, fosforilante 003 y desacoplado 916.

fue el más afectado, ya que se inhibió 80% respecto al control en la presencia de 6% o más de DMF. El transporte de electrones fosforilante fue inhibido sólo 65% a concentraciones mayores que las requeridas para la inhibición del transporte basal (15% de DMF), el efecto de la DMF observado en el transporte de electrones fosforilante sugiere que la DMF podría estar actuando como un inhibidor de la transferencia de energía, aunque, en presencia de cloruro de amonio y DMF el transporte de electrones basal fue revertido parcialmente, lo que sugiere que la DMF actúa como inhibidor parcial del flujo de electrones. La inhibición que se observa en el transporte de electrones fosforilante podría deberse a que la DMF inhibe parcialmente a nivel de CF_1 a bajas concentraciones.

Los resultados mostrados en las figuras 11 y 12 sugieren que la DMF actúa como un inhibidor de la transferencia de energía al igual que el Dio-9 (McCarty et al, 1965), florizina (Izawa et al, 1966) y sintalina (Gross et al, 1968). Sin embargo, el efecto en el transporte de electrones en presencia de cloruro de amonio (Fig. 13), sugiere que podría tener además un efecto de inhibidor parcial de la cadena transportadora de electrones semejante al del DCCD (Shoshan y Selman, 1980).

Debido a que la síntesis de ATP involucra la transformación de la energía del $\Delta\mu H^+$ generado por la cadena transportadora de electrones, se consideró interesante estudiar si la inhibición del transporte de electrones basal de agua a metilviológeno por DMF se protegía por sustratos (ADP y P_i) o producto (ATP) de la

H^+ -ATPasa. La figura 14-4 muestra el efecto de la DMF en el transporte de electrones basal, cuando se incrementó la concentración de DMF hasta 18% y en presencia o ausencia de Pi, ADP o ATP. El efecto de la DMF en el transporte de electrones basal en presencia de Pi o nucleótidos fue bifásica. A concentraciones menores de 3% de DMF más Pi o nucleótidos se observó inhibición del transporte de electrones basal, y fue revertida al incrementar las concentraciones de DMF y mantener constantes las concentraciones de Pi o nucleótidos.

El transporte de electrones fosforilante se evaluó en el mismo trazo, después de ensayado el transporte de electrones basal, por lo que, para completar los substratos de la fotofosforilación se le adicionó ADP a la suspensión que ya contenía Pi y viceversa. Se observó que la DMF en estas condiciones de ensayo inhibió el transporte de electrones fosforilante en menor grado que cuando el transporte de electrones basal se había realizado en ausencia de Pi o ADP (trazo inicial, previo al del transporte de electrones fosforilante) (Fig. 14-B), es decir, se revirtió parcialmente la inhibición por DMF del transporte de electrones fosforilante, pero en ningún caso igualó al control.

Con el objeto de dilucidar si la DMF inhibe el transporte de electrones, se adicionó NH_4Cl (5mM) como desacoplante (en la suspensión de cloroplastos con la que se evaluó el transporte de electrones fosforilante) de esta manera es posible evaluar la actividad de la cadena transportadora de electrones

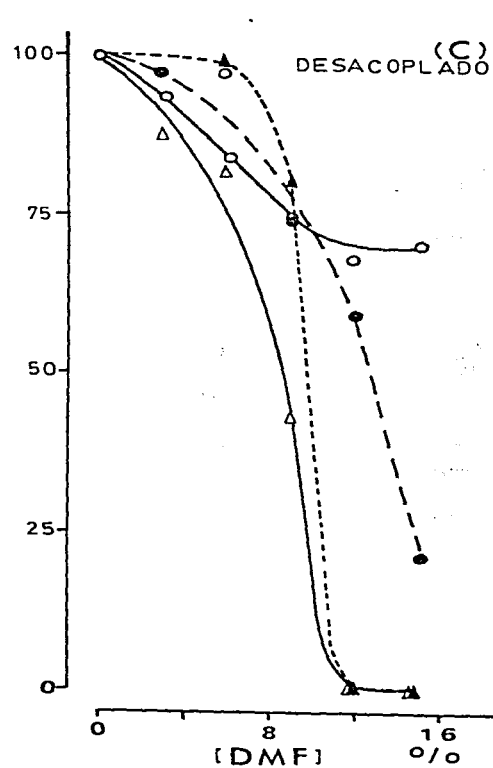
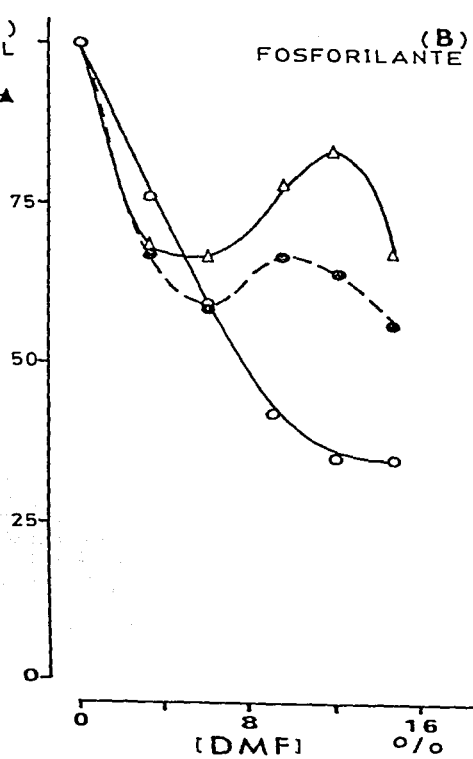
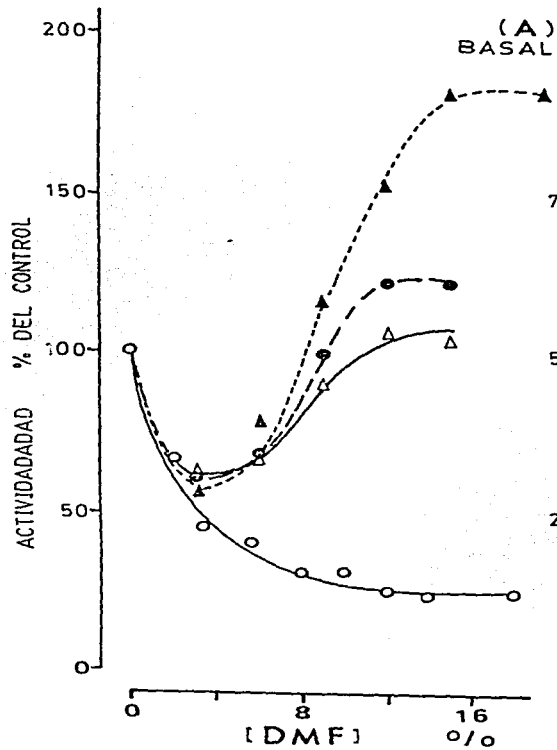


Fig. 14. Efecto de la DMF, ADP, Pi y ATP en la cadena transportadora de electrones. Las condiciones de ensayo se describieron en la Fig. 13. (A) El transporte de electrones basal se ensayó en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de DMF (○—○) y ADP 1mM (△—△), Pi 3mM (●—●) o ATP 2.2mM (▲-----▲). (B) El transporte de electrones fosforilante se evaluó con cada una de las suspensiones de cloroplastos indicadas en (A) adicionando al control (○—○) ADP y Pi para tener una concentración final de 1mM y 3mM respectivamente, adicionando ADP (3mM) a la suspensión que ya contenía Pi (●—●), y Pi (1mM) a la suspensión que ya contenía ADP (△—△). (C) El transporte de electrones desacoplado se cuantificó con la adición de NH_4Cl (5mM) a la suspensión de cloroplastos que contenían en (A) sólo DMF (○—○), o además de DMF: ADP (△—△), Pi (●—●) o ATP (▲-----▲). La velocidad del transporte de electrones para los cloroplastos sin DMF, expresada en μmoles de oxígeno mg^{-1} clorofila h^{-1} fueron: (A) 250, (B) 500 y (C) 1000.

En la figura 14-C se muestran los resultados del transporte de electrones desacoplado en presencia de diferentes concentraciones de DMF y concentraciones fijas de Pi o nucleótidos adicionados desde el ensayo del transporte de electrones basal. Se observó poca o ninguna inhibición del transporte de electrones desacoplado a concentraciones menores de 8% de DMF en ausencia o presencia de ATP, ADP o Pi. Estos resultados podrían indicar que la DMF a bajas concentraciones actúa como inhibidor de la transferencia de energía en cloroplastos, al igual que el Dio-9 (McCarty et al, 1965), florizina (Izawa et al, 1966) y sintalina (Gross et al, 1968). Sin embargo, cuando los nucleótidos estuvieron presentes desde el inicio del ensayo, concentraciones mayores de 12% de DMF inhibieron 100% el transporte de electrones desacoplado. Es decir, utilizando desacoplante en presencia de nucleótidos o fosfato fue posible distinguir la acción de la DMF como inhibidor de la transferencia de energía a bajas concentraciones, éste efecto se protegió por la presencia de nucleótidos o fosfato, en cambio la inhibición del transporte de electrones inducido por la DMF a mayores concentraciones fue amplificada en la presencia de los nucleótidos y el fosfato. Estos resultados nuevamente sugieren que la DMF es un inhibidor del transporte de electrones a concentraciones mayores de 10%. El comportamiento de la DMF sobre la cadena transportadora de electrones contrasta con el del Dio-9 (McCarty, 1965), florizina (Izawa et al, 1961) y Kaemiferol (Artzen y Falkental, 1974) los cuales no inhiben el transporte de electrones en presencia de

NH_3Cl . Si embargo, el efecto de la DMF en el transporte de electrones basal y fosforilante es similar a lo encontrado para la $\text{N}_2\text{N}'$ -diciclohexilcarbodiimida (McCarty y Racker, 1967).

Se ha reportado que la florizina (Iizawa et al, 1966), a concentraciones bajas de fosfato, es un fuerte inhibidor de la fotofosforilación cíclica y no cíclica. En relación a esto, se ensayó el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado en presencia de concentraciones crecientes de Pi y concentración óptima (para la fotofosforilación) y constante de ADF (1mM). El transporte de electrones basal en presencia de Pi fue usado como control (Fig. 15 A). Se mostró que el transporte de electrones basal fue inhibido a concentraciones bajas de Pi (1.5mM) y a concentraciones bajas de DMF (3%). Esta inhibición fue revertida fuertemente por el incremento en la concentración de Pi (hasta 6mM) y de DMF (hasta 15%), y además hubo un incremento de cerca del 300% respecto al control en la velocidad del transporte de electrones basal cuando estuvieron presentes concentraciones de Pi entre 7 y 8mM y 15% de DMF (Fig. 15-A). Sin embargo, el transporte de electrones fosforilante (Fig. 15-B) se inhibió con diferentes concentraciones de Pi (1.5mM-9mM) y DMF (3%-15%). Aunque, se notó una tendencia a la reversión de la inhibición con el incremento en la concentración del fosfato y con 3% de DMF, concentraciones mayores (6%-15%) de DMF y de fosfato no revirtieron la inhibición del transporte de electrones fosforilante (Fig. 15-B). El transporte de electrones desacoplado también se inhibió con diferentes concentraciones de Pi y DMF (Fig. 15-C). Cuando se incrementó la concentración de DMF, ésta

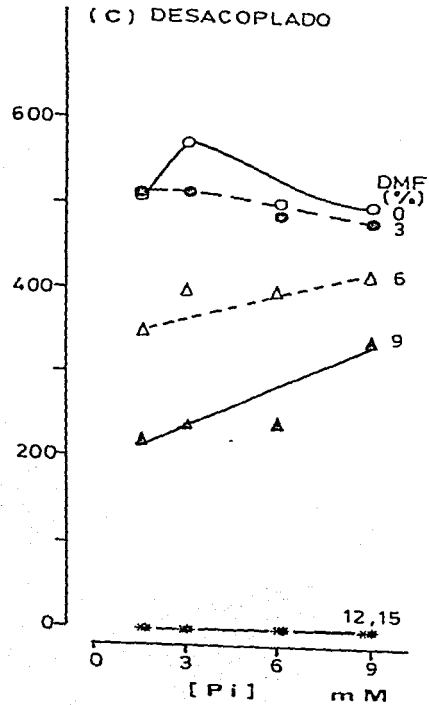
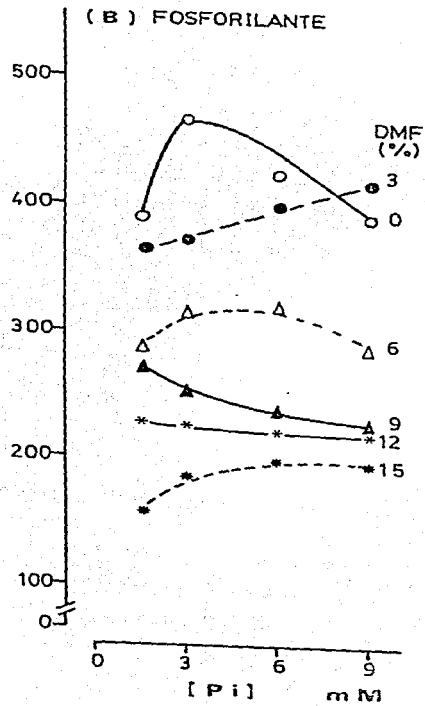
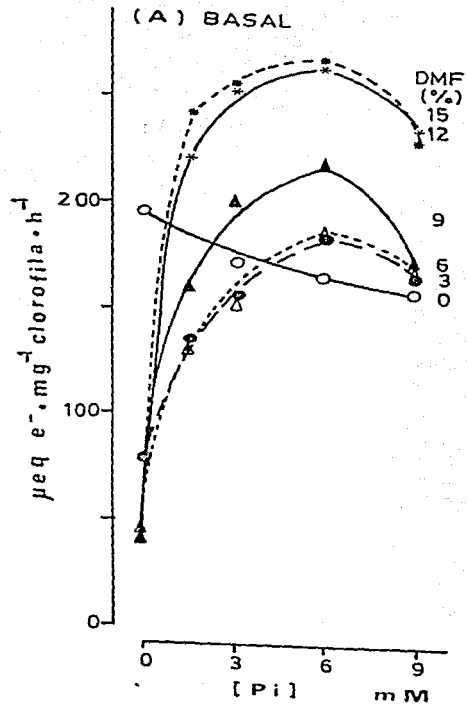


Fig. 15. Efecto del P_i y diferentes concentraciones de DMF en el transporte de electrones basal (A), fosforilante (B) y desacoplado (C). Las condiciones de ensayo fueron como las descritas en las figuras 13 y 14. El transporte de electrones basal se determinó en presencia de P_i y DMF como se indica en la figura. El transporte de electrones fosforilante fue determinado después del basal y el el transporte desacoplado se determinó enseguida del fosforilante.

inhibición fue total (100%) con 12% y 15% de DMF y con todas las concentraciones de fosfato ensayadas (Fig. 15-C). En cambio, a concentraciones menores de 9% de DMF disminuyó la inhibición al incrementarse la concentración de Pi.

El efecto de diferentes concentraciones de ADP y DMF en la velocidad del transporte basal, fosforilante y desacoplado se muestra en la figura 16 A-C. Se encontró que la curva del transporte de electrones basal en presencia de hasta 6% de DMF y diferentes concentraciones de ADP, es semejante a la del control, pero la inhibición del transporte de electrones basal con 12% de DMF se revirtió con bajas concentraciones de ADP y se activó ligeramente con 0.4mM de ADP (Fig. 16-A). Este dato sugiere que la DMF y el ADP son antagonicos en su acción.

Por otro lado, se observó que el transporte de electrones fosforilante medido en presencia de 6% y 12% de DMF y concentraciones crecientes de ADP presentó una tendencia a la reversion de la inhibición inducida por la DMF, la reversion fue mayor conforme se aumento la concentración de ADP (de 0.1 a 0.8 mM) y DMF (Fig. 16B). Sin embargo, la velocidad del transporte de electrones fosforilante permaneció inhibido aun con 12% de DMF respecto a la velocidad del transporte de electrones fosforilante en ausencia del solvente organico.

En la figura 16-C se muestra el efecto de concentraciones crecientes de ADP y DMF en el transporte de electrones desacoplado. La presencia de 6% de DMF no modificó la velocidad del transporte

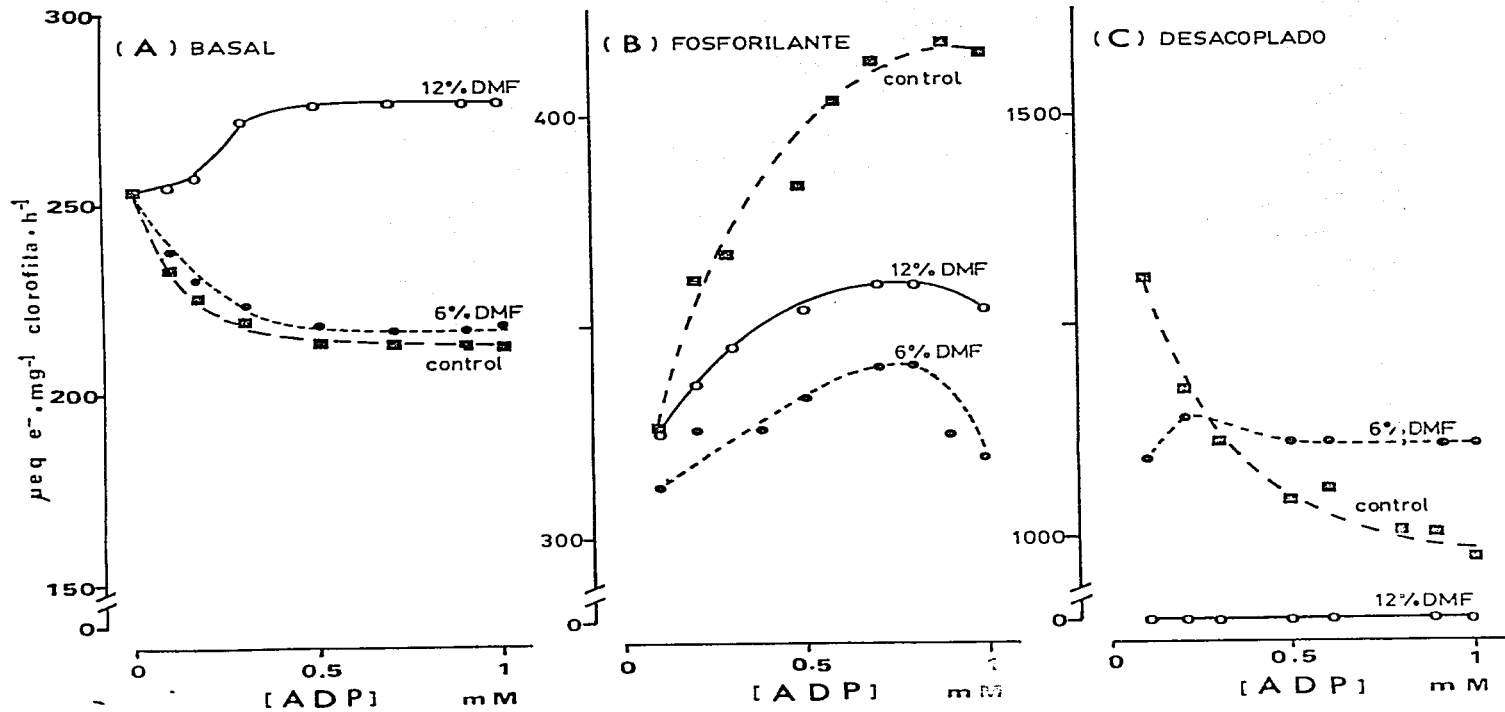


Fig. 16. Efecto del ADP y diferentes concentraciones de DMF en la velocidad del transporte de electrones (A) basal, (B) fosforilante y (C) desacoplado. Las condiciones de ensayo fueron semejantes a las descritas en las figuras 15 y 16.

de electrones desacoplado a bajas concentraciones de ADF, pero revirtio parcialmente la inhibicion de éste transporte producida por el ADF en el control. Cuando se utilizo 12% del solvente y ADF entre 0 y 1mM se inhibio totalmente el transporte de electrones desacoplado. Nuevamente, estos resultados sugieren que la DMF a concentraciones bajas actúa como inhibidor de la transferencia de energia y a concentraciones mayores actúa como inhibidor del transporte de electrones.

(6.5) Efecto de la DMF en los fotosistemas I y II.

Aunque los fotosistemas I y II de la cadena transportadora de electrones interactúan cooperativamente para el mantenimiento de la fotofosforilación en cloroplastos (Hill y Bendal, 1960), es posible determinar la eficiencia de cada uno de ellos, separándolos con la adición de inhibidores específicos. De esta manera, se planteo la posibilidad de determinar si la DMF afectaba preferencialmente alguno de los dos fotosistemas. en la Fig. 17 se presenta el efecto de diferentes concentraciones de DMF en el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado de los fotosistemas I y II. El transporte de electrones desacoplado del fotosistema II fue más sensible a la inhibición (60%) que el fotosistema I (30%) con 6% de DMF, en cambio el fotosistema II practicamente no fue inhibido con 5% de DMF. Así, podemos decir que la DMF inhibe diferencialmente el flujo de electrones en los dos fotosistemas, y que la inhibición fue más pronunciada a concentraciones mayores del 6%. El transporte de electrones basal

en los fotosistemas I y II se afecto de manera opuesta al transporte desacoplado. Los resultados sugieren que, aparentemente, la DMF inhibe la cadena transportadora de electrones en mas de un sitio.

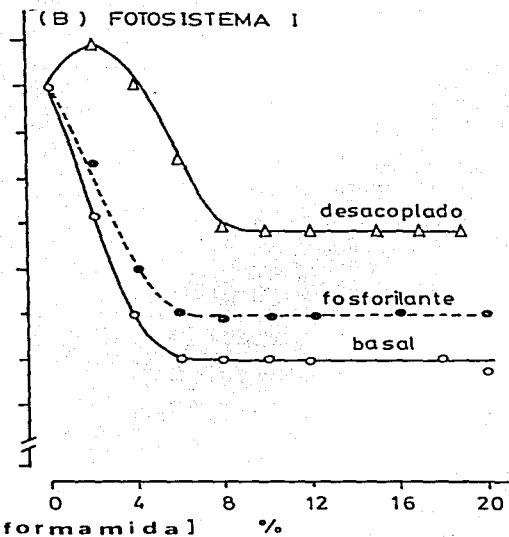
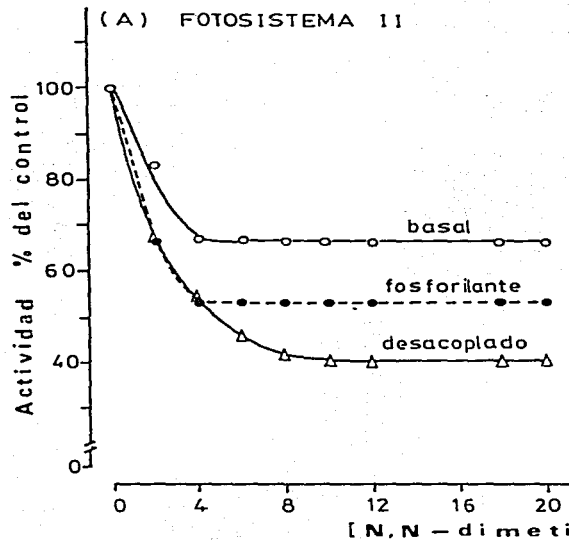


Fig. 17. Inhibición del transporte de electrones en los fotosistemas I y II por DMF. La velocidad del transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado de los fotosistemas II (A) y I (B) en presencia de diferentes concentraciones de DMF se expresaron en % respecto a sus propios controles. La mezcla de reacción y las condiciones de ensayo se describieron en MATERIALES Y METODOS. Los valores para el transporte de electrones del fotosistema II, expresados en $\mu\text{moles de oxígeno} \cdot \text{mg}^{-1} \text{clorofila} \cdot \text{h}^{-1}$ fueron (sin DMF): basal 103, fosforilante 112 y desacoplado 95; para el fotosistema I: basal 113, fosforilante 512 y desacoplado 724.

CINETICA DE ACTIVACION Y DESACTIVACION DEL COMPLEJO CF_0-CF_1 EN CLOROPLASTOS.

La iluminación de los cloroplastos activa el complejo CF_0-CF_1 para catalizar tanto síntesis como la hidrólisis del ATP. Bajo las mismas condiciones el tiempo óptimo para la activación de la NADP-sintetasa fue menor de 30 s (Fig. 2) ($< 10 \mu$ s según Ort y Dilley, 1976) en cambio para la activación óptima de la mg^{+2} -ATPasa se requirió de aproximadamente 1 min (Fig. 1). Este resultado es semejante al reportado por Mills et al. (1970). Lo anterior sugiere la formación rápida del "estado activo" dependiente de luz para la síntesis del ATP (en la oscuridad no sintetiza ATP, a menos que se desarrolle un gradiente electroquímico artificial) de un "estado inactivo" para la hidrólisis, una formación lenta del "estado hidrolíticamente activo" de la enzima en la luz. Estas diferencias podrían sugerir que la síntesis y la hidrólisis de ATP son catalizadas preferencialmente por dos formas diferentes de la enzima.

Recientemente Komatsu-Takaki (1987) demostró que durante la iluminación de cloroplastos, en ausencia de ADP y P_i se alcanza rápidamente la conformación E_2 de la enzima (complejo CF_0-CF_1) ATP-cinéticamente activa (para la síntesis del ATP) pero ATP-hidrolíticamente inactiva, y se convierte lentamente, en la

La reacción fotosintetizadora E_p es energéticamente activa, pero simultáneamente inactiva (o menos activa). La adición de ADP y P_i en la luz induce la conversión de E_p a E_a . Por lo que, aparentemente el ADP y el P_i reaccionan al estado de CF_0-CF_1 en la dirección de la síntesis del ATP. El mismo autor (1956) sugirió un posible modelo que incluye tres estados activos distintos de la ATPasa del complejo CF_0-CF_1 en cloroplastos. Adicionalmente, Franke y Strötmann (1961) observaron que bajo condiciones favorables (es decir en la luz; la afinidad aparente del complejo H^+ -ATPasa de cloroplastos por el ATP es menor que para el ADP en un orden de magnitud y que al cambio de condiciones (netas a hidrólisis (es decir al apagar la fuente luminosa) incrementa dramáticamente la afinidad por el ATP.

Las evidencias anteriores parecen indicar que en los primeros momentos de iluminación la conformación del complejo CF_0-CF_1 requerida para la hidrólisis del ATP está inhibida (poco activa, o ausente) y no se debe solamente a una competencia por fotofosforilación. Así mismo, sugieren: que la ATPasa del CF_1 puede ser el resultado de un equilibrio, dependiente de energía, entre diferentes conformaciones de CF_1 . En la oscuridad podrían ser favorecidas más de una conformación, que unan e hidrolizan ATP, mientras que bajo condiciones energizadas del cloroplasto, podría ocurrir un cambio conformacional que favoreciera una conformación que uniera ADP y P_i para sintetizar ATP en forma preferencial.

El estado cinéticamente activo de la enzima para la síntesis de ATP fue poco sensible al incremento en la concentración del producto en el medio (Fig. 2-E), al menos durante los primeros 5 min. mientras que bajo las mismas condiciones, pero en la oscuridad, el estado hidrolíticamente activo de la enzima empezó a inhibirse 2.5 min después de la adición del sustrato. Estos resultados sugieren que las conformaciones activas del CF_0-CF_1 son sensibles diferencialmente a las condiciones generadas durante la síntesis e hidrólisis del ATP. La inhibición rápida de la Mg^{+2} -ATPasa durante la iluminación podría deberse al incremento en la concentración de productos (ADP y Pi) en el medio, o a una modificación en el pH del medio, generado por los protones depositados en el exterior durante la hidrólisis del ATP. Esto último estaría de acuerdo con lo reportado por Komatsu-Takaki (1986), quien observó que la hidrólisis del ATP catalizada por CF_0-CF_1 en cloroplastos activados con luz y en ausencia de ditiolos exógenos, es altamente sensible al pH del medio, ya que, un incremento de H^+ disminuyó marcadamente la velocidad de hidrólisis del ATP. El efecto combinado del incremento en la concentración de ADP y acidificación del medio podría ser, también, el motivo de la rápida inhibición de la Mg^{+2} -ATPasa.

MODIFICACION QUIMICA DEL COMPLEJO CF_0-CF_1 DE CLOROPLASTOS CON MALEIMIDAS Y SU EFECTO EN LA ACTIVIDAD DE LA Mg^{+2} -ATPasa Y LA ATP-sintetasa.

La interacción de los reactivos sulfhidrilo, tanto en CF_0 como cuando está unido a la membrana del tilacoide, ha sido ampliamente estudiada (Andreo y Vallejós, 1976; Ketchum et al., 1984; McCarty et al., 1972; Moroney et al., 1980; Moroney et al., 1982; Moroney et al., 1984; Nalin y McCarty, 1984; Shahak, 1985; Vallejós y Andreo, 1976; Vallejós et al., 1977). Aunque no se conoce con exactitud el número real de grupos sulfhidrilo del complejo CF_0-CF_1 , han sido utilizados para incrementar el conocimiento acerca de la complicada estructura de las subunidades de la enzima y de su mecanismo de catálisis acoplado a la translocación de protones. Las limitantes respecto a la elucidación del número real de grupos sulfhidrilo presentes en la H^+ -ATPasa de cloroplastos son: 1^o) las subunidades γ , δ y II, todavía no han sido secuenciadas, por lo que no se conoce con exactitud su estructura primaria, y 2^o) se desconoce la estequiometría real de las subunidades. Sin embargo, considerando los resultados reportados por algunos grupos de investigadores y la estequiometría de las subunidades más aceptada de α , β_3 y δ , podríamos sugerir la presencia de 12 grupos -SH por complejo CF_0-CF_1 (Tabla VI). Las controversias acerca de la estequiometría de los residuos sulfhidrilo está, en parte, relacionada a los cambios en el estado oxidado-reducido de esos residuos, que ocurren durante la activación de la ATPasa por energización del cloroplasto al iluminarlo. La importancia de los grupos sulfhidrilo presentes en diferentes subunidades de la H^+ -ATPasa ha quedado bien establecida. Por ejemplo, se ha señalado que la subunidad γ de la enzima latente contiene un puente disulfuro

Tabla VI. CONTENIDO APROXIMADO DE GRUPOS SULFHIDRILLO POR MOLECULA DEL COMPLEJO CF_0-CF_1 .

Subunidad	Contenido de tioles/ subunidad (a)	Estequiometría		Origen	Fuente
		subunidad (b)	grupos tiol (a x b)		
α	1	3	3	trigo	Howe et al. 1982.
β	1	3	3	espinaca	Zurawski et al. 1985.
γ	4	1	(?) \geq 4	espinaca	Nalin y McCarty, 1984.
δ	(?) 0	1	(?) 0	-	-
ϵ	1	1	1	espinaca	Zurawski et al. 1982.
1	1	1	1	espinaca	Henning y Hermann, 1986.

II	0	1	(?)	-	-
III	0	(?) 6	0	espinaca	Henning y Hermann. 1986.
IV	0	(?) 1	0	espinaca	"
<hr/>					
Total de grupos tiol/ CF_0-CF_1			(?) 12		

(designados S_1 , S_2 y dos grupos sulfhidrilo libres; uno de ellos es accesible a oxidantes externos y reactivos-sulfhidrilo en la oscuridad, pero se hace accesible en la luz (S_3), mientras que el otro es accesible a esos compuestos tanto en la luz como en la oscuridad (Fletcher et al. 1984; Moroney et al. 1984; Nalin y McCart, 1984).

Los compuestos tioles se unen covalentemente a los grupos -SH de los aminoácidos. Los compuestos ditiolos pueden formar puentes disulfuros entre el compuesto y un -SH de una subunidad de la proteína u oxidar tioles vecinales a disulfuros (Grassetti y Murray, 1987). Por analogía las maleimidas bifuncionales pueden formar un disulfuro cruzado en los polipeptidos de la H^+ -ATPasa.

Nuestros resultados indican que hay un número de similitudes y diferencias en la sensibilidad del complejo H^+ -ATPasa a la modificación química con maleimidas, cuando la enzima está unida a la membrana del tilacoide y los cloroplastos intactos han sido energizados con luz. A continuación se enumeran los resultados más destacados de nuestro estudio.

(1) La conformación del complejo H^+ -ATPasa promovido por la luz en cloroplastos intactos y requerido para hidrolizar el ATP en la oscuridad, aparentemente, es más sensible a la acción de las maleimidas, tanto monofuncionales como bifuncionales. Observamos que el tiempo para el máximo efecto producido por las maleimidas en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa (t_{Hoi}) es menor (salvo alguna

excepción que el requerido para la ATP-sintetasa ($t_{50\%}$) con diferencia de hasta 5 min (Tabla III). Lo anterior podría sugerir que en la conformación de la Mg^{+2} -ATPasa se supone al menos un grupo sulfhidrilo regulatorio de dicha actividad, que resulta fácilmente accesible a todas las maleimidas. Al contrario, la conformación requerida para la ATP-sintetasa podría contener (al o los) grupos sulfhidrilo regulatorios poco accesibles a las maleimidas, por lo que solo después de tiempos mayores (5 o 6 min) las maleimidas pueden modificarlos covalentemente e inducir la inhibición de la actividad de la ATP-sintetasa.

(II) Independientemente del grado de modificación química o de los grupos sulfhidrilo a los que se unen, las maleimidas monofuncionales y bifuncionales interactúan con la H^{+} -ATPasa induciendo inhibición tanto de la Mg^{+2} -ATPasa como de la ATP-sintetasa. Observamos que concentraciones entre 0.2 y 1mM de las maleimidas monofuncionales y bifuncionales (a sus tiempos óptimos de inhibición, t_{H_0} y $t_{50\%}$) indujeron diferente grado de inhibición en la síntesis y en la hidrólisis del ATP (Fig. 4 y 6). Aparentemente no todas las maleimidas se unen a los mismos grupos -SH, lo que refleja el grado de inhibición diferente, producida por las maleimidas en ambas actividades enzimáticas. Además, aparentemente, los grupos sulfhidrilo del complejo H^{+} -ATPasa modificados químicamente por una misma maleimida son diferentes o están expuestos en diferente grado por lo que parecen tener diferente efecto regulatorio en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa y de la ATP-sintetasa. Esto podría explicar el diferente grado de

inhibición en la síntesis y en la hidrólisis del ATP por una misma metaloide (Fig. 4 y 6; Tabla III).

Spiegel (1985) investigó el efecto de oxidantes-tiol en la H^+ -ATPasa unida a membranas tilacoides de cloroplastos intactos activados con luz. Sugirió que la inhibición de la fotofosforilación y el incremento en la actividad de la Hg^{+2} -ATPasa, inducidas por el *o*-iodosobencato (IOI), reflejan la interacción del oxidante con los grupos S_1-S_2 fotorreducidos. También propone que S_1-S_2 , y no S_3 , como se había sugerido con anterioridad, es el sitio regulatorio dependiente de luz de la ATPasa. Aun más, el efecto de este sitio regulatorio parece ser dominante sobre factores como la interacción de los nucleótidos o el PPi, que regulan la enzima al unirse en o cerca del sitio activo en la subunidad β . Así mismo, McCarty y Hammes (1987) indican que la subunidad ϵ está involucrada en la regulación de la expresión de la actividad de la ATPasa del CF_1 , en base a que diversos tratamientos físicos o químicos del CF_1 aislado causan modificación del polipeptido ϵ (Richter et al. 1984; Richter et al. 1985). Estudios con sondas fluorescentes han indicado que el puente disulfuro de γ está cercano al grupo tiol de la subunidad ϵ , a una distancia no mayor de 22 Å. (Snyder y Hammes, 1984). En contraste con los sulfhidrilos de γ y ϵ que se encuentran muy lejanos de los sitios de unión de nucleótidos localizados en los polipéptidos β (62 Å y 80 Å respecto a γ , 50 Å y 60 Å respecto a ϵ). Se ha demostrado que al depletar a CF_1 del polipeptido ϵ se incrementa marcadamente la susceptibilidad del polipeptido γ a la

proteólisis y al efecto de agentes reductores (Richter et al., 1985; Schumann et al., 1985). Estos y otros resultados sugieren que los polipeptidos γ y ϵ interaccionan para la regulación de la actividad enzimática de la H^+ -ATPasa. Es probable que se lleve a cabo la interacción entre los puentes de estas subunidades de CF₁ durante los cambios conformacionales por energización, de tal manera que la presencia de maleimidas en el medio podría modificar dicha interacción en grado variable, obteniendo de las características de las maleimidas, a inocular diferente grado de inhibición en la H^+ -ATPasa, hasta el punto, no se ha excluido una interacción directa de los polipeptidos β y δ . En adición a las interacciones que podrían darse entre γ y ϵ . McCarty y Hammes (1987) sugieren que ϵ podría interactuar con β funcionando γ como intermediario. Si las interacciones entre los diferentes polipeptidos son selectivas en cuanto a la funcionalidad del complejo H^+ -ATPasa, es decir para la síntesis o para la hidrólisis del ATP, podría explicarse el hecho de que una misma maleimida (monofuncional o bifuncional) modifique diferencialmente las actividades de síntesis e hidrólisis del ATP por el complejo CF₀-CF₁.

(III) Algunas maleimidas produjeron efectos bifásicos en la actividad fotosforilante del complejo H^+ -ATPasa unido a membrana. Concentraciones bajas (< de 0.2mM) de 1-H-pirrol-2,5-diona, fenilmaleimida, clorometilmaleimida y dihidroxietilebis-maleimida estimularon la actividad de la ATP-sintetasa. Esta estimulación estuvo acompañada por la inhibición de la actividad

de la Hg^{+2} (antes de la adición de la dihidroxiacetilenoisomaleimida) con la misma concentración de maleimida (Fig. 4, b). Sin embargo, concentraciones mayores de las maleimidias condujeron a una pronunciada inhibición de la actividad de la ATP-sintetasa. Esto podría sugerir que los grupos -SH de CF_1 bloqueados por las maleimidias cuando se activa la enzima no son los mismos que se bloquean cuando la enzima se inhibe.

(IV) El grado de inhibición de las actividades de la Hg^{+2} -ATPasa y de ATP-sintetasa del complejo CF_0 - CF_1 del tilacoide inducido por (oos) maleimidias monofuncionales y bifuncionales fue variable. Es decir, aun despues de la iluminación por tiempos prolongados (6 min) y a altas concentraciones de maleimidias (1mM) la inhibición de la Hg^{+2} -ATPasa en todos los casos fue parcial ($I_{dmáx}$, Tabla III). Sin embargo, la fenilmaleimida y N,N'-bismaleimida inhibieron 100% la fotofosforilación ($I_{Emáx}$, Tabla III). Magnuson y McCarty (1975) y Weiss y McCarty (1977) reportaron que algunas maleimidias (NEM y *o*-fenilenoisomaleimida) inhiben sólo un 50 o 60% la fotofosforilación de tilacoides lavados (cloroplastos rotos, sin contenido estromal), dos o tres veces con medio de ensayo, cuando se incubaron a altas concentraciones de maleimida y por tiempos prolongados. La interacción de las maleimidias con el complejo H^+ -ATPasa, básicamente, se efectúa con las subunidades que contienen en su estructura residuos sulfhidrilo o puentes disulfuro que sean reducidos durante la energización del cloroplasto, siempre y cuando los sulfhidrilos se localicen en un ambiente

hidrofóbico-hidrofílico accesible a la maleimida en cuestión. Considerando que no todos los grupos tiol son esenciales para la fotofosforilación, la modificación química "selectiva" de los tioles por las diferentes maleimidas produciría sólo inhibición parcial de la actividad. Por el contrario, si la interacción de algunas maleimidas como la N,N' -bismaleimida con las subunidades del complejo H^+ -ATPasa, en función de su coeficiente de partición y de la distancia entre sus centros reactivos, pudiera entrecruzar dos tioles esenciales para la fotofosforilación, induciría la inhibición total de la actividad de la ATP-sintetasa. Una interacción semejante con otros tioles esenciales para la fotofosforilación se podría proponer para la fenilmaleimida que inhibió 100% la fotofosforilación, sin olvidar que esta maleimida es monofuncional, por lo que su mecanismo de acción no sería por entrecruzamiento.

(V) Aparentemente el complejo H^+ -ATPasa de cloroplastos iluminados adquiere una conformación para la síntesis del ATP que es más sensible a la inhibición por maleimidas (monofuncionales y bifuncionales) que la conformación requerida para la hidrólisis del ATP . En base a que determinamos que el promedio de C_{Hi}^{50} (Tabla III) para la Mg^{+2} -ATPasa fue 0.485 (con desviación estándar $\sigma_{n-1}=0.073$) y el promedio de C_{Si}^{50} fue 0.383 ($\sigma_{n-1}=0.08$) podemos sugerir que existe una mayor efectividad de las maleimidas para inducir la inhibición de la actividad de la ATP-sintetasa, que para inducir la inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa (los promedios de los valores de C^{50} se obtuvieron de los reportados en

la Tabla III, excluyendo los correspondientes a las dos maleimidas que tienen valores de R^{50} menores al promedio). Estos resultados podrían aplicar, nuevamente, la existencia de dos estados conformacionales distintos de la H^+ -ATPasa en cloroplastos energizados, los cuales poseen sensibilidad diferente al efecto de las maleimidas.

(VI) Apparently, existe una relación entre la distancia de los centros reactivos de las maleimidas bifuncionales (entre 5.5 Å y 9.2 Å), su hidrofobicidad y su efecto inhibitorio en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa (Fig. 7). Sin embargo, no se observó una relación equivalente a la anterior en la fotofosforilación. Podríamos sugerir que en la conformación de la Mg^{+2} -ATPasa están expuestos dos grupos -SH, regulatorios sólo para la hidrólisis del ATP, que son entrecruzados por las maleimidas bifuncionales, y que el grado de inhibición está en función directa a la distancia entre los grupos entrecruzados. Es decir, mayor inhibición de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa a mayor distancia de los centros reactivos de las bismaleimidas (distancia óptima para la inhibición 9.2 Å) (Fig. 7). La conformación de la H^+ -ATPasa requerida para la fotofosforilación también es modificada por las bismaleimidas, pero la inhibición producida parece no depender de la distancia de los grupos sulfhidrilo entrecruzados por las bismaleimidas.

Weiss y McCarty (1977) reportaron que la inhibición de la fotofosforilación inducida por maleimidas bifuncionales en tilacoides lavados de cloroplastos de espinaca se debía, en

principio, a la inducción de un desacoplamiento en los tilacoides. El desacoplamiento se debe al entrecruzamiento de las maleimidias con grupos sulfhidrilo de la subunidad y de CF_1 (Moroney y McCarty, 1982). lo que favorece la liberación de protones a través del complejo CF_0-CF_1 . Moroney y colaboradores (1982) compararon el efecto de la o. a. y p-fenilbismaleimida (tres maleimidias bifuncionales) en el transporte de electrones basal de tilacoides de cloroplastos de espinaca. Las maleimidias empleadas en ese estudio poseen entre 5 y 10 Å de distancia entre sus centros reactivos. Estos autores observaron que las tres bismaleimidias estimularon el flujo de electrones basal a bajas concentraciones (1 μ M) y la efectividad para este efecto disminuyó conforme la distancia entre los grupos entrecruzantes incrementaba siendo la óptima 10 Å. Sin embargo, aunque las bismaleimidias inhibieron la fotofosforilación no se observó ninguna relación entre el grado de inhibición de la fotofosforilación y la distancia entre los centros reactivos de las bismaleimidias (Tabla I en Moroney et al., 1982). Estos resultados son semejantes en parte, a los obtenidos en nuestro trabajo (inciso VI).

INFLUENCIA DE SUBSTRATOS, PRODUCTOS Y DESACOPLANTE EN LA INHIBICION INDUCIDA POR MALEIMIDAS DE LA ACTIVIDAD DE LA Mg^{+2} -ATPasa.

Se sabe que las maleimidias actúan como inhibidores de la transferencia de energía, es decir, el efecto que producen en la

síntesis o en la fosforilación del ATP es producida por su interacción directa con el CF_1 (Moroney et al., 1982). Es esperarse que la interacción de los inhibidores de la transferencia de energía con la enzima sea modificada por la presencia de nucleótidos en el medio de ensayo, ya que, estos se unen al sitio(s) catalítico y regulador(s) del CF_1 en el complejo H^+ -ATPasa (Bickel-Sandkotter, 1983).

Nuestros resultados indican que, aunque, el ADP previno parcialmente la inhibición inducida por las maleimidas en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa de cloroplastos, este nucleótido fue más efectivo en la protección cuando también estuvo presente el fosfato inorgánico. Exceptuando a la clorometilmaleimida el efecto inhibitorio de las maleimidas, presentadas en la Tabla IV, fue revertido por el ADP hasta 94.26% en promedio ($\sigma_{n-1}=8.15$), mientras que cuando estuvo presente el fosfato más el ADP la reversión de la inhibición fue 101.9% ($\sigma_{n-1}=8.52$).

A diferencia del ADP, el ATP no sólo revertió la inhibición inducida por las maleimidas, sino además promovió un incremento del 27% ($\sigma_{n-1}=44.4$) en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa (Tabla IV). El efecto del ATP no se modificó con la presencia del fosfato adicionado al medio de ensayo, ya que (exceptuando a la tetrametilenbismaleimida) la velocidad de la Mg^{+2} -ATPasa, en promedio, se incrementó 29.3% ($\sigma_{n-1}=47.2$) en presencia de maleimida-ATP- F_1 , valor muy semejante al 27% calculado en ausencia de P_i .

Ragnsson y McCarty (1975) reportaron que los adenin nucleótidos di- o trifosforados previenen solo parcialmente el desarrollo de la inhibición de la fosforilación producida por NEM. en tilacoides lavados de cloroplastos de espinacas. los nucleótidos fueron más efectivos cuando estuvieron también presentes fosfato inorgánico o arsenato.

Es ampliamente reconocido el hecho de que la conformación de CF_1 es diferente en los cloroplastos energizados con luz que la que posee cuando los cloroplastos no han sido iluminados. también se ha sugerido que durante el intercambio de nucleótidos del medio con los de la enzima, cuando se energiza la membrana, se inducen cambios conformacionales. adicionales. en CF_1 (Ryrie y Jagendorf, 1972; Schloeder y Witt, 1981; Wagner y Junge, 1980). Aparentemente, una consecuencia del cambio conformacional es la exposición de grupos sulfhidrilo de las diferentes subunidades de CF_1 , los cuales reaccionan con las maleimidas. El ATP o el ADF podrían prevenir la reacción de esos grupos con las maleimidas, al menos, en dos formas. Primera, si la unión del ATP o del ADF ocurriera en sitios suficientemente cercanos a los que reconocen las maleimidas para su unión covalente, podría efectuarse un "enmascaramiento" parcial, o total de los sitios de unión de las maleimidas, previniéndose la inhibición de la actividad enzimática total o parcialmente. Segunda, si la unión del ADF o del ATP a las subunidades de CF_1 afectan la conformación de la enzima después de que la membrana del tilacoide ha sido energizada

con luz, es probable que los grupos que inicialmente eran sensibles a las maleimidas ahora no lo sean, aun en la medida por la que la unión covalente de las maleimidas no se efectuara.

Resulta interesante el hecho de que el F_1 potencie la protección por ADP, y que el ATP no lo requiere para proteger de la inhibición por maleimidas a la Mg^{+2} -ATPasa unida a la membrana del tilacoide. Recordemos que el ADP y el F_1 son los productos de la actividad enzimática del complejo H^+ -ATPasa cuando está actuando en sentido microclítico; pero cuando el complejo está funcionando en el sentido de la fotofosforilación, el ADP y el F_1 son los sustratos. Nuestros resultados podrían sugerir que la Mg^{+2} -ATPasa requiere o de la presencia de su sustrato, ATP, (el sustrato real utilizado fue Mg -ATP) o de sus productos, ADP+ F_1 para "insensibilizarse" al efecto inhibitorio de las maleimidas. A diferencia de la ATP-sintetasa que se protege totalmente del efecto inhibitorio de maleimidas con sus sustratos, ADP+ F_1 , pero no con su producto, ATP, puesto que requiere además de la presencia de P_i (Magnuson y McCarty, 1975; Weiss y McCarty, 1977).

Según los resultados presentados en la Tabla IV, el fosfato revirtió completamente la inhibición inducida por maleimidas (monofuncionales y bifuncionales) y en la mayoría de los casos indujo, además, un notable incremento en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa, la actividad promedio para estos casos fue 201% ($\sigma_{n-1}=31.77$). Se ha reportado que la actividad ATPasa de F_1 soluble de mitocondrias, en presencia de $MgCl_2$, es activada por

concentraciones de fosfato mayores de 1 mM (Penefsky, 1974). La activación de la Mg^{+2} -ATPasa de F_1 de mitocondria también se observa cuando parte del agua del medio de incubación se reemplaza por un disolvente orgánico, como el metanol o dimetilsulfóxido (Ortiz-Flores et al. 1982; Gómez-Fuyou et al. 1983; Yuena de Gómez-Fuyou et al. 1984). La activación producida por el dimetilsulfóxido o el metanol es mucho más pronunciada en presencia de concentraciones crecientes de fosfato (de Meiss, 1987). También se ha reportado que el etilenglicol a una concentración de 10% en el medio de reacción inhibe totalmente la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa de la F_1 soluble de mitocondria, sin embargo, en las mismas condiciones pero con la adición de F_1 0.2mM se induce un incremento de más del 150% en la actividad hidrolítica (de Meiss, 1987). Los resultados descritos por de Meiss son semejantes a lo encontrado en nuestra investigación con el fosfato y las maleimidas en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa unida a la membrana del tilacoide, activada con luz en los cloroplastos intactos y ensavada en la oscuridad con lisis del cloroplasto. A la fecha no se conoce el mecanismo por el cual el fosfato induce incrementos en la actividad hidrolítica de la F_1 -ATPasa de mitocondria, pero los resultados, en conjunto, podrían sugerir que el efecto de las maleimidas más el fosfato y el de los solventes orgánicos más el fosfato promueven una modificación del factor de acoplamiento (una conformación específica, o una modificación especial en el sitio activo) requerida para activar la Mg^{+2} -ATPasa soluble de mitocondrias y la de cloroplastos cuando está unida al tilacoide, independientemente

de que el solvente o la maleimida en forma individual promuevan inhibición de la actividad.

Magnusson y McCarty (1975) reportaron que la actividad máxima de fotofosforilación por tilacoides lavados, obtenidos de cloroplastos de espinacas, en presencia de NEM y P_i disminuyó 53%, y que la P_m aparente en presencia de P_i no se afectaba. Concluyeron que el grado de inhibición de la fotofosforilación inducida por NEM no se afectaba con el P_i . En forma semejante Weiss y McCarty (1977) indicaron que el P_i no previene la inhibición de la fotofosforilación en tilacoides lavados, inducida por la bismaleimida DFDM. Estos resultados son opuestos a los obtenidos en nuestra investigación. La discrepancia aparente podría explicarse de varias formas. Es probable que en los cloroplastos intactos estén presentes nucleótidos endógenos u otros factores del sistema intacto que potencian la protección y la activación de la Mg^{+2} -ATPasa en presencia de P_i y maleimidas, efecto que no se conserva en la actividad de la ATP-sintetasa de tilacoides lavados. Independientemente de factores adicionales o nucleótidos endógenos, podríamos sugerir que la conformación del complejo H^+ -ATPasa requerida para la fotofosforilación y sensible a la inhibición por maleimidas, no es susceptible a la protección del fosfato y menos aún a la estimulación de la actividad, a diferencia de la conformación requerida para la hidrólisis del ATP.

La presencia de un desacoplante (NH_4Cl) en el medio de

marcado de los cloroplastos con maleimidas produjo efectos variados (Tabla IV). Estos son: incremento en la sensibilidad de la Mg^{+2} -ATPasa a la inhibición por clorometilmaleimida y tetrametilendimaldeimida, reversión total de la inhibición inducida por la N,N-Dimaldeimida, no modificación del efecto inhibitorio de la fenilmaleimida, y reversión parcial de la inhibición inducida por NEM y trimetilendimaldeimida. Aparentemente, no es posible señalar un efecto general del cloruro de amonio en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa inhibida por maleimidas. Se ha reportado que los osescolantes NH_4Cl y carbenticarbocina α -acetofenilborazona (CPB-1) protegen la fotofosforilación en tilacoides lavados, de la acción inhibitoria de la NEM (McCarty et al, 1972); asimismo, el NH_4Cl previno parcialmente la inhibición de la fotofosforilación inducida por CPDM en tilacoides lavados (Weiss y McCarty, 1977). Fick (1983) ha sugerido que la desactivación de la CF_0 - CF_1 ATP-sintetasa por diferentes osescolantes resulte de una interacción específica entre la enzima y el protonóforo, además de la interacción de este con la bicapa de la membrana. La interacción con la H^+ -ATPasa es facilitada por el ADP y algunos glicolípidos, y es inhibida por el fosfato y durante la hidrólisis del ATP. De ser este el caso del NH_4Cl , la interacción adicional de las maleimidas con el complejo H^+ -ATPasa podrían promoverse efectos variados en la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa y de la ATP-sintetasa. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo y los reportados por el grupo de McCarty son consistentes con este planteamiento.

En base a los resultados obtenidos en la fase inicial de nuestro trabajo, consideramos que se aportan algunas evidencias que apoyan la posible existencia de conformaciones diferentes de la H^+ -ATPasa, unida a la membrana del tilacoide en cloroplastos de plantas de crichano, las cuales poseen propiedades cataliticas distintas para la sintesis y la hidrolisis del ATP. Las conformaciones diferentes de la enzima son inducidas por la luz, durante la energizacion de la membrana tilacoide en los cloroplastos intactos, pudiendo participar de forma independiente en la fotofosforilacion (en la luz) y en la hidrolisis del ATP (en la oscuridad).

EFEECTO DE LA DMF EN ALGUNAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS.

Se han estudiado ampliamente los efectos de mezclas acuosas con solventes orgánicos en una gran variedad de enzimas (ver referencias en de Meiss, 1989). Así, se ha observado la estimulación por solventes orgánicos de la actividad de la Mg^{+2} -ATPasa de F_1 -mitocondrial (Schuster, 1979; de Meiss, 1979; Ortiz-flores et al. 1981; Krausel et al. 1982). Las mezclas acuosas de diferentes solventes orgánicos disminuyen la energía de hidrólisis del pirofosfato y del ATP, en relación a la que se requiere en sistemas totalmente acuosos (de Meiss, 1989). Esto se interpreta como una modificación de la actividad del agua por los solventes orgánicos, lo que podría afectar el sitio catalítico de las enzimas. Así mismo, el primer paso en la dirección de la síntesis de un enlace de alta-energía es facilitada por la presencia de solventes orgánicos (de Meiss, 1989 y referencias ahí citadas) y estimulan la síntesis espontánea del ATP en F_1 -ATPasa bacteriana (Yoshida, 1983) y F_1 -ATPasa mitocondrial (de Meiss, 1989; Gomez-Ruyou et al. 1986; Kanopol et al, 1987), a partir del fosfato del medio y el ADP "fuertemente" unido a la enzima.

En este trabajo determinamos que la DMF inhibió las actividades de la Mg^{+2} -ATPasa, ATP-sintetasa y la reacción de intercambio F_1 -ATP del complejo CF_0 - CF_1 unido al tilacoide de cloroplastos de plantas de chicharo (Fig. 11). Nuestros resultados parecerían opuestos a los reportados previamente para las F_1 solubles de diferentes fuentes. Sin embargo, podría argüirse que

las propiedades de la enzima cambian cuando la F_1 es removida de las membranas, por lo que, los parámetros determinados en esos estudios no pueden compararse con los obtenidos en el sistema intacto. Esta consideración ya ha sido contemplada, previamente, por varios autores (Felman y Sigman, 1985; Shahak, 1982). Nuestros resultados son semejantes, en parte, a los resultados por Tuena de Gomez-Fuou et al (1984), ya que la fotofosforilación oxidativa y la reacción de intercambio P_i -ATP en partículas mitocondriales fué inhibida por DMF y otros solventes miscibles en agua.

La inhibición de la fotofosforilación, Mg^{+2} -ATPasa y la reacción de intercambio P_i -ATP por DMF en los cloroplastos (Fig. 11) es indicativo de que este solvente orgánico actúa como un inhibidor de la transferencia de energía. Sin embargo, el diferente grado de inhibición entre la hidrólisis y la síntesis del ATP (incluyendo el intercambio P_i -ATP) sugiere que la DMF actúa como inhibidor diferencial de algunas actividades fotosintéticas en cloroplastos. El comportamiento diferencial de la DMF es semejante al de otros inhibidores de la transferencia de energía como el kampferol (Artzen et al, 1974), el cual, afecta menos la hidrólisis que la síntesis del ATP en cloroplastos.

La inhibición diferencial entre la síntesis y la hidrólisis del ATP producida por la DMF en cloroplastos, podría explicarse por el cambio en las constantes cinéticas involucradas en esas reacciones (Shavit et al, 1984). Sin embargo, existen algunas

evidencias que apoyan la existencia de formas cinéticamente diferentes de la H^+ -ATPasa que catalizan la síntesis o la hidrólisis del ATP (Bar-Sagi y Shavit, 1980; Shavit et al., 1984; Shoshan y Shavit, 1979). Nuestros resultados muestran que la DMF inhibió más drásticamente la ATP-sintetasa, que la Mg^{+2} -ATPasa de los cloroplastos. Esto sugiere que diferentes conformaciones de la enzima podrían estar participando en la hidrólisis del ATP (en la oscuridad) y en la síntesis del ATP (en la luz). Adicionalmente, si durante la fosforilación oxidativa se promueven transiciones hidrofóbico-hidrofílicas en el sitio catalítico de F_1 (Pedersen y Carafoli, 1987), la DMF podría modificar diferencialmente dichas transiciones en el sitio catalítico o regulatorio de la H^+ -ATPasa del cloroplasto, produciéndose un efecto inhibitorio diferencial de las actividades hidrolítica y fotofosforilante en el cloroplasto por la DMF.

Aparentemente, la DMF no causó un incremento inespecífico en la permeabilidad a protones de las membranas tilacoides, a concentraciones (12%) que inhibieron completamente la fotofosforilación (Figs. 11 y 12) o aún a concentraciones mayores (33%). De interaccionar directamente con el canal de protones (CF_0) en los cloroplastos, es probable que lo haga de manera diferente que el DCCD (McCarty y Racker, 1967), el cual evita la salida de H^+ a través de CF_0 en cloroplastos depletados de CF_1 (Fig. 12). Adicionalmente, se observó que la DMF inhibió el transporte de electrones basal, y que esta inhibición es revertida parcialmente por cloruro de amonio (Fig. 13). En conjunto, estos

resultados sugieren que la DMF actúa como un inhibidor de la transferencia de energía por su interacción con una o varias de las subunidades de CF_1 unido al tilacoide, de manera semejante a como interactúan el Dnp-9 (McCarty et al., 1965), la florizina (Izawa et al. 1966), o la sintalina (Gross et al. 1968). Sin embargo, el efecto de la DMF en la cadena transportadora de electrones cuando está presente el cloruro de amonio (transporte de electrones desacoplado Figs. 13, 14-C) sugiere que la DMF tiene un efecto adicional en la cadena transportadora de electrones.

La observación de que el transporte de electrones desacoplado no fue inhibido con concentraciones de hasta 0% de DMF y varias concentraciones de ADP (Fig. 16-C) y en presencia de ATP (Fig. 14-C), pero fue totalmente inhibido a concentraciones mayores de 12% en la presencia de los nucleótidos y del fosfato (Fig. 15-C), reafirmaría la idea de que la DMF inhibe la cadena transportadora de electrones, pero que este efecto es inducido a concentraciones mayores (12%) de las requeridas para la inhibición de la fotofosforilación (< 12%) (Fig. 11).

El transporte de electrones basal fue inhibido a bajas concentraciones de DMF (3%) y a bajas concentraciones de Pi (1.5mM) (Fig. 13) y no sufrió cambio, respecto al control, en presencia de 0% de DMF y diferentes concentraciones de ADP (Fig. 16), la velocidad del transporte de electrones basal fue incrementada notablemente (inhibición fuertemente revertida) por concentraciones crecientes de fosfato (hasta 6mM) o con el

incremento de la concentración del ADF ó en la presencia de AIP (Fig. 14). Sin embargo, la velocidad del transporte de electrones fosforilante permaneció inhibida con todas las concentraciones de Pi, nucleótido y DMF ensayadas (Figs. 14-B, 15-B, 16-B). Estos resultados sugieren que la DMF interactúa, al menos, en el sitio o los sitios de interacción del fosfato y los nucleótidos del CF₁.

La(s) modificación(es) inducidas por la DMF en el complejo CF₀-CF₁, unido a la membrana del tilacoide, o en los complejos enzimáticos de la cadena transportadora de electrones, aparentemente, no son provocadas por la liberación de alguno de los constituyentes naturales del cloroplasto, ni por su unión permanente con ellos, ya que, los cloroplastos modificados con la DMF lavados y resuspendidos en medio libre de DMF recuperaron la velocidad de la fotofosforilación a valores similares a los del control (Tabla V). Se ha reportado que algunos solventes orgánicos inducen diferenciación de células neoplásicas (Dexter et al. 1979; Dibner et al. 1985), aunque el mecanismo de acción de esos agentes no se conoce aún, se ha propuesto la posibilidad de que los solventes orgánicos, como la N-etilformamida, DMF y dimetilsulfóxido, inducen un cambio en la movilidad lateral de los lípidos de la membrana semejante al que sucede durante el proceso natural de maduración celular. Dibner y colaboradores (1985) determinaron un incremento significativo en la viscosidad de la membrana de células cancerosas de colon y su consecuente diferenciación por el tratamiento prolongado con N-etilformamida ó DMF de las células en cultivo. Así mismo, demostraron que existe

reversibilidad del fenómeno por eliminación de los solventes del medio de cultivo. Un efecto semejante en la disminución de la movilidad (ó incremento en la viscosidad) de los lípidos de la membrana del tilacoide inducido por la DMF, podría conducir a alteraciones en la funcionalidad de los complejos enzimáticos de la cadena transportadora de electrones, puesto que parece existir una relación importante entre la estructura (física) y función de de las membranas tilacoides, en las que se encuentran inmersos la gran mayoría de los complejos enzimáticos que llevan a cabo las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis (Harwood, 1980). Modificaciones en la fluidez de la bicapa podrían alterar la difusibilidad de los componentes de la cadena transportadora de electrones, los cuales, interactúan cooperativamente con los complejos macromoleculares durante la fotofosforilación (Barber, 1987; Harwood, 1980).

La inhibición del transporte de electrones basal por la DMF fué fuertemente revertido por el ADP, ATP y fosfato (Fig. 14-A, 15-A 16-A). este resultado podría sugerir que los aniones ensayados al interactuar con el complejo CF_0-CF_1 en presencia de DMF (concentraciones mayores de 6%) modifican indirectamente la actividad de la cadena transportadora de electrones, de tal manera que bajo esas condiciones no se inhibe, pero si se activa. Otra posibilidad podría ser que los nucleótidos y el fosfato tengan un papel modulador en la cadena transportadora de electrones del cloroplasto, y que en presencia de la DMF se altere dicha modulación. Esta última posibilidad podría estar de acuer con lo

reportado para mitocondrias. Puesto que, varias líneas de evidencia indican que un cambio conformacional alostérico inducido por ATP en la citocromo c oxidasa puede modular la transferencia de electrones (Antonini et al., 1988; Rigoulet et al., 1987). Las evidencias pueden resumirse de la siguiente manera: (i) concentraciones milimolares de ATP modificaron la cinética del estado pre-estacionario y estacionario de la citocromo c oxidasa, soluble o reconstituida en vesículas artificiales (Bisson et al., 1987; Kadencz, 1989; Malatesta et al., 1987); (ii) el ATP se unió a las subunidades VIII y IV de la citocromo c oxidasa en experimentos efectuados con el compuesto fotoactivable ácido-ATP (Montecucco, et al., 1986); (iii) el ATP indujo un cambio en los residuos ácidos de la citocromo c oxidasa expuestos a la fase acuosa (Bisson et al., 1987); (iv) el ATP indujo una perturbación espectral en la región Soret de la citocromo c oxidasa soluble o reconstituida en partículas de fosfolípidos (Antonini et al., 1988; Malatesta et al., 1987).

Por el momento, no es posible plantear un mecanismo general que explique los efectos de la DMF en las diferentes actividades fotosintéticas en los cloroplastos, puesto que aparentemente, este solvente orgánico interacciona en más de un sitio del sistema transductor de energía de esos organelos. Sin embargo, podemos sugerir que la DMF actúa como un inhibidor de la transferencia de energía (a bajas concentraciones) en cloroplastos, y además (a mayores concentraciones) como un inhibidor de la cadena transportadora de electrones.

BIBLIOGRAPHIA

- Robost MB, Ozarnecki JJ and Selman BK (1984) Localization of the high-affinity binding site for ATP on the membrane-bound chloroplast ATP synthase. *J Biol Chem* 259:12271-12278
- Hiley CW, Crepeau RN, Dunn SD, McCarty R E and Edelman SJ (1983) Electron microscopy and single molecule averaging of subunit-deficient F₁-ATPase from *Escherichia coli* and spinach chloroplasts. *EMBO J* 2:1407-1415
- Liberty R, Smith R and Book R (1951) The apparent ionization constants of the adenosine phosphates and related compounds. *J Biol Chem* 190:422-424
- Alt J, Winter F, Sebald W, Moser JB, Schedel R, Westhoff P and Herrmann G (1982) Localization and nucleotide sequence of the gene for the ATP synthase proteolipid subunit on the spinach plastid chromosome. *Current Genet* 7:129-135
- Andreo CB and Vallejos RA (1976) Sulphydryl groups in photosynthetic energy conservation 1. Light-dependent inhibition of photophosphorylation by the sulphhydryl reagent 2-2 dithio bis-(5-nitropyridine). *Biochim Biophys Acta* 423:550-561
- Arnon GE and Jagendorf AT (1983) Effect of methanol on spinach thylakoid ATPase. *Biochim Biophys Acta* 723:352-365
- Arnon GE and Jagendorf AT (1984) Methanol induced release of tightly bound adenine nucleotides from thylakoid-associated CF₁. *Biochim Biophys Acta* 766:354-362
- Arnon GE and Jagendorf AT (1986) Evidence for multiple effects in the methanol activation of chloroplast coupling factor 1. *Biochim Biophys Acta* 846:92-98

- Antonini G, Malatesta F, Sarti F and Vallone B (1963) NIP-induced spectral changes in cytochrome c oxidase. A kinetic investigation. *Biochem J* 25:835-840
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24:1-15.
- Artzen
- Attardi G, Chonayn H and Mariottini P (1984) En: H^+ -ATPase (ATP synthase): structure, function, biogenesis the F_0F_1 complex of coupling membranes, (S Papa, K Altendorf, L Ernster, L Facker eds) pp 25-40. Italy. IOSU
- Benai H, Shavit H and Chipman DR (1972) Specificity of nucleotide binding sites in isolated chloroplasts coupling factor (CF_1). *Biochim Biophys Acta* 504:100-107
- Bar-Zvi D and Shavit H (1983) Differential inhibition of P_i /ATP exchange in relation to ATP synthesis and hydrolysis by modification of chloroplasts thylakoid membranes with glutaraldehyde. *Biochim Biophys Acta* 724:299-305
- Barber J (1987) Composition, organization and dynamics of the thylakoid membrane in relation to its function. En: *The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise* (P.K. Stumpf and EA Conn eds), Vol X pp 75-130 Academic Press Inc New York
- Barker-Grunwald T and van-Dam K (1974) On the mechanism of activation of the ATPase in chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 347:290-298
- Betzborn RJ, Roos F and Bonnekamp G (1984) Stoichiometry and function of the δ -subunit of CF_1 . En *Advances in Photosynthesis Research* (C Sybesma ed) Vol II pp 587-590

- Siedler P and Haneck H (1966) An investigation of $\Delta\mu_{H^+}$ activation of chloroplasts ATPase. Biochem Biophys 16:111-125
- Siegel-Sandkottter S (1980) Loose and tight binding adenine nucleotides by membrane-associated chloroplast ATPase. Biochim Biophys Acta 723:71-77
- Sisson R, Schiavo B and Montecucco C (1987) ATP induces conformational changes in mitochondrial cytochrome c oxidase. J Biol Chem 262:5992-5996
- Boyer PD, Cross RL and Jensen W (1973) A new concept for energy coupling oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reaction. Proc Natl Acad Sci US 70:2837-2839
- Boyer PD, Chance B, Ernster L, Mitchell P, Racker E and Slater EC (1972) Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Ann Rev Biochem 41:985-1026
- Boyer PD, Mohlbrenner WE, McIntosh DB, Smith LT and O'Neal CC (1982) ATP and modulations of catalysis by F_1 and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPases. Ann NY Acad Sci 402:65-83
- Bruist MF and Hammes GG (1981) Further characterization of nucleotide binding sites on chloroplasts coupling factor one. Biochemistry 20:3295-3305
- Bruist MF and Hammes GG (1982) Mechanism for catalysis and regulation of adenosine 5'-triphosphate hydrolysis by chloroplasts coupling factor 1. Biochemistry 21:3370-3377
- Cerione RA and Hammes GG (1981) Nucleotide interactions with the dicyclohexylcarbodiimide-sensitive adenosinetriphosphatase from spinach chloroplasts. Biochemistry 20:3359-3365

- Corione RA and Hammes GG (1982) Structural mapping of nucleotide binding sites on chloroplast coupling factor. *Biochemistry* 21:748-750
- Corione RA, McCarty RE and Hammes G (1983) Spatial relationships between specific sites on reconstituted chloroplasts proton adenosine triphosphatase and the phospholipid vesicle surface. *Biochemistry* 22:769-776
- Corley E and Wolosiuk RA (1985) The effect of organic solvents on the activation and the activity of spinach chloroplasts fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* 260:3978-3983
- Cozen AL, Walker JE, Phillips AL, Huttly AK and Gray JC (1986) A sixth subunit of ATP Synthase, an F_0 component, is encoded in the pea chloroplast genome. *EMBO J* 5:217-221
- Cozen AL and Walker (1987) The organization and sequence of the genes for ATP synthase subunits in the cyanobacterium *Synechococcus* o30. *J Mol Biol* 194:359-383
- Cross RL (1981) The mechanism and regulation of ATP synthesis by F_1 -ATPases. *Annu Rev Biochem* 50:681-714.
- Cross RL, Grubmeyer C, Penefsky H (1982) Mechanism of ATP hydrolysis by beef heart mitochondrial ATPase. *J Biol Chem* 257:12101-12105.
- Czarnecki JJ, Abbott MS and Selman BR (1982) Photoaffinity labeling with 2-azido-adenosinediphosphate of a tight nucleotide binding site on chloroplasts factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7744-7748
- Czarnecki JJ, Abbott MS and Selman BR (1983) Localization of the tight ADP-binding site on the membrane-bound chloroplast coupling factor one. *Eur J Biochem* 136:19-24

- Czernacki JJ (1984) Tautomerism of 2-acido-adenosine nucleotides. Effects on enzyme kinetics and photoaffinity labeling. *Biochim Biophys Acta* 800:41-51
- Lavenport J and McCarty RE (1984) An analysis of proton flux coupled to electron transport and ATP synthesis in chloroplasts thylacoids. *Biochim Biophys Acta* 766:363-374
- de Hoij HJ, Jochemsen AB, Willemsen PThJ and Groot GSP (1984) Protein synthesis during chloroplast development in *Chlorella vulgaris*. *Eur J Biochem* 136:161-168
- de Meiss L and Viana AL (1979) Energy interaction by the Ca^{2+} -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Ann Rev Biochem* 48:275-292
- de Meiss L (1984) Pyrophosphate of high and low energy. Contributions of pH, Ca^{+2} , Mg^{+2} , and water to free energy of hydrolysis. *J Biol Chem* 259:6090-6097
- de Meiss L (1987) Effects of organic solvents and orthophosphate on the ATPase activity of F_1 ATPase. *FEBS Lett* 213:333-336
- de Meiss L (1987) Role of water in the energy of hydrolysis of phosphate compounds-energy transduction in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 973:333-343
- de Meiss L, Benrens MI, Petretski JH and Folini MJ (1985) Contribution of water to free energy of hydrolysis of pyrophosphate *Biochemistry* 24:7783-7789
- de Meiss L, Martins O and Alves EW (1980) Role of water, hydrogen ion and temperature on the synthesis of adenosine triphosphate by the sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase in absence of a calcium ion gradient. *Biochemistry* 19:4252-4261

- de Meise L, Ortero ME, Martinis OB, Alves EW, Inesi G and Nakamoto R (1982) Phosphorylation of sarcoplasmic reticulum ATPase by orthophosphate in the absence of Ca^{2+} gradient. *J Biol Chem* 257:4992-4998
- Deno H, Shinozaki F and Sugiura M (1983) Nucleotide sequence of tobacco chloroplast gene for the subunit of proton-translocating ATPase. *Nucleic Acids Res* 11:2186-2191
- Deno H, Shinozaki F and Sugiura M (1984) Nucleotide sequence and transcription of tobacco chloroplast genes for CF_0 subunits of proton-translocating ATPase. *Gene* 33:195-201
- Deno H and Sugiura M (1984) Homology between the α and β subunits of chloroplast and bacterial proton translocating ATPase. *FEBS Lett* 172:209-211
- Dewey TG and Hammes GB (1981) Steady state kinetics of ATP synthesis and hydrolysis catalyzed by reconstituted chloroplasts thylakoids. *J Bioenerg Biomemb* 16:173-183
- Dexter DL, Barbosa JA and Calabresi P (1979) N,N-Dimethylformamide induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cell. *Cancer Res* 39:1020-1025
- Dibner MD, Kathleen AI, Koerner LA and Dexter DL (1985) Polar solvent-induced changes in membrane lipid lateral diffusion in human colon cancer cells. *Cancer Res* 45:4978-5003
- Dilley RA (1972) Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena) in *Methods Enzymol* vol XXIV-B:68-74
- Dilley RA and Schreiber U (1984) Correlation between membrane-localized protons and flash-driven ATP formation in chloroplast thylakoids. *Eur J Biochem* 131:567-570

- Evans JA and Gibbons IB (1985) Activation of dynein 1 adenosine triphosphatase by organic solvents and triton X-100 (1986). J Biol Chem 261:14044-14048
- Faludi-Daniel A, Schmidt O, Szcepaniak A, and Machold O (1983) Distribution of characteristic membrane proteins in granum and stroma thylakoids. Eur J Biochem 131:567-570
- Farron F (1970) Isolation and properties of a chloroplast coupling factor and heat-activated adenosine triphosphatase. Biochemistry 9:3820-3825
- Farron F and Racker E (1970) Studies on the mechanism of the conversion of coupling factor 1 from chloroplasts to an active adenosine triphosphatase. Biochemistry 9:3629-3636
- Feldman RI and Sigman DS (1983) The synthesis of ATP by the membrane-bound ATP synthase complex from medium $^{32}\text{P}_i$ under completely uncoupled conditions. J Biol Chem 258:12178-12183
- Finel H, Rubinstein M and Pich U (1984) Preparation of an efficient chloroplast coupling factor 1 having a high ATPase activity. FEBS Lett 166:85-89
- Flores S and Ort DR (1984) Investigation of the apparent inefficiency of the coupling between photosystem II electron transfer and ATP formation. Biochim Biophys Acta 766:289-302
- Franek U and Strotmann H (1981) Nucleotide specificity of CF_1 -ATPase in ATP synthesis and ATP hydrolysis. FEBS Lett 120:5-6
- Frasch WD, Green J, Caguiat J and Mejia A (1989) ATP hydrolysis catalyzed by a β subunit preparation purified from the chloroplasts energy transducing complex: CF_1 CF_0 . J Biol Chem 264:5064-5069

- Galmiche JM, Girault G and Lemaire C (1985) Structure and function of the coupling-factor of photophosphorylation. *Photosynth Photobiol* 41:707-713
- Girault G, Berger G, Galmiche JM and Andre F (1988) Characterization of six nucleotide-binding sites on chloroplasts coupling factor 1 and one site on its purified β subunit. *J Biol Chem* 263:14690-14695
- Girault G and Galmiche JM (1977) Further study of nucleotide-binding site on chloroplasts coupling factor 1. *Eur J Biochem* 77:501-510
- Girault G, Galmiche JM, Lemaire C and Stulzhaft O (1982) Binding and exchange of nucleotides on the chloroplast coupling factor CF₁. Role of magnesium. *Eur J Biochem* 126:405-411
- Glynn IH and Chapell JB (1964) A simple method for the preparation of ³²P_i-labeled adenosine triphosphate of high specific activity. *Biochem J* 90:147-149
- Gómez-Puyou A, Azaiz G, Muller U and Tuena de Gómez-Puyou M (1983) Regulation of the synthesis and hydrolysis of ATP by mitochondrial ATPase. *J Biol Chem* 258:13673-13679
- Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez-Puyou M and de Meiss L (1986) Synthesis of ATP by soluble mitochondrial F₁-ATPase and F₁-inhibitor-protein complex in the presence of organic solvents. *Eur J Biochem* 159:133-140
- Gräber P and Schlodder E (1981). In *Photosynthesis II. Photochemical electron transport and Photophosphorylation*, ed G Akeyunoglou, pp 867-879. Philadelphia: Balaban 1035pp
- Gräber P, Junesch U and Schatz GH (1984) Kinetics of proton-transport-coupled ATP synthesis in chloroplasts.

- Identification of the ATPase by an artificially generated
 ΔpH and $\Delta\psi$. For Sundeen. Phys Chem 22:599-608
- Gross E, Shavit N and San Pietro A (1968) Synthetin: an inhibitor
of energy transfer in chloroplasts. Arch Biochem Biophys
127:224-228
- Hangarter RP and Good NE (1984) Energized state responsible for
adenosine 5'-triphosphate synthesis in preilluminated
chloroplasts *lemniscas*. Biochemistry 23:122-130
- Harris DA and Slater EC (1975) Tightly bound nucleotides of energy
transducing ATPase of chloroplasts and their role in
photophosphorylation. Biochim Biophys Acta 387:335-348
- Harwood JL (1980) Membrane lipids: structure and function. En: The
biochemistry of Plants. A comprehensive treatise. Vol IV
Lipids (PK Stumpf EE Conn eds) PP 57-84 Academic Press Inc
New York
- Hedaya E, Hinman RL and Theodoropoulos S (1966)
N,N -Bisoxaleimide and its cyclic isomers. J Org Chem
31:1311-1312
- Henning J and Herrmann RG (1985) Chloroplast ATP synthase of
spinach contains nine nonidentical subunit species, six of
which are encoded by plastid chromosomes in two operons in a
phylogenetically conserved arrangement. Mol Genet 8:543-549
- Hill R and Bendall DS (1960) Nature 186:136-137.
- Hochman Y and Carmeli C (1981a) Correlation between the kinetics
of activation and inhibition of adenosinetriphosphatase
activity by divalentmetal ions and the binding of
manganese to chloroplasts coupling factor 1. Biochemistry
20:6287-6292

- Hochman J and Carroll J (1981) Modulation by bicarbonate, phosphate and malate of the kinetics of adenosinetriphosphatase activity and of the binding of manganese ions to the chloroplasts coupling factor 1. *Biochemistry* 20:2293-2297
- Hollekens M, Ronswick MJ, Fearnley IM and Walker JE (1983) The sites of labeling of the β -subunit of bovine mitochondrial F_1F_0 -ATPase with 8-acido ATP. *J Biol Chem* 258:9307-9313
- Hong YD and Jung W (1983) Localized or delocalized protons in photophosphorylation? On the accessibility of the thylakoid lumen for ions and buffer. *Biochim Biophys Acta* 711:197-208
- Hoppe J and Sebald W (1984) The proton conducting F_0 -part of oxenoid ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 768:1-21
- Horner AP, Foccoluzzi GF and Naudtsianakis EN (1980) Initial products of photophosphorylation with ^{14}C and ^{32}P Pi. *J Biol Chem* 255:5618-5621
- Hove CJ, Fearnley IM, Walker JE, Dyer TA and Gray JC (1985) Nucleotide sequences of the genes for α , β and ϵ subunits of wheat chloroplasts ATP synthase. *Plant Mol Biol* 4:333-345
- Hudson GS and Mason JG (1988) The chloroplast genes encoding subunits of the H^+ -ATP synthase. *Photosyn Res* 18:205-222
- Huttly AK and Gray JC (1984) Localization of genes for four ATP synthase subunits in pea chloroplast DNA. *Mol Gen Genet* 194:402-409
- Izawa S, Winget GD and Good EN (1966) Phlorizin, a specific inhibitor of photophosphorylation and phosphorylation-coupled electron transport in chloroplasts. *Biochem Biophys Res Commun* 21:223-226

- Jagendorf AT (1977) en: Encyclopedia of Plant Physiol. (Trib: A y Avron M eds) vol 5 pp 307-337, Springer-Verlag, Berlin
- Jorgensen PL (1982) Mechanism of the Na^+ , K^+ pump protein structure and conformations of the pure (Na^++K^+) -ATPase. *Biochim Biophys Acta* 674:57-68
- Junge W (1970) The critical electrical potential difference for photophosphorylation. Its relation to the chemiosmotic hypothesis and to the triggering requirements of the ATPase system. *Eur J Biochem* 14:582-592
- Junge W, Hong YQ, Qian LF and Viale A (1984) Cooperative transient trapping of photosystem II protons by the integral membrane proton (CFo) of chloroplasts ATP-synthase after mild extraction of the four subunit catalytic part (CF₁). *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3078-3082
- Kadenbach B (1986) Regulation of respiration and ATP synthesis in higher organisms: Hypothesis. *J Bioenerg Biomembr* 18:37-54.
- Kagawa Y Yoshida M Mihara H Ramakrishnans VR (1984) Active site in proton translocating ATPase. En *Frontiers in Bio-organic Chemistry and Molecular Biology* (Y Ovchinnikov ed) Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam
- Kanazawa H, Kayano T, Kiyasu T and Futai M (1982) Nucleotide sequence of the genes for β and ϵ subunits of proton-translocating ATPase from *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Comm* 105:1257-1264
- Kanazawa H, Noumi T, Oka N and Futai M (1983a) Intracistronic mapping of the defective site and the biochemical properties of subunit mutants of *Escherichia coli* H^+ -ATPase: correlation of structural domains with functions of the

subunit. Arch Biochem Biophys 227:596-608

Kanazawa H, Noumi T, Futai M and Nitta T (1983b) *Escherichia coli* mutants defective in the subunit of proton-translocating ATPase: intracistronic mapping of the defective site and the biochemical properties of the mutants. Arch. Biochem Biophys. 223:521-532

Kandpol RP, Stempel EK and Boyer PD (1987) Characteristics of the formation of enzyme-bound ATP from medium inorganic phosphate by mitochondrial F_1 adenosinetriphosphatase in the presence of dimethylsulfoxide. Biochemistry 26:1512-1517

Kaplan JH and Jagendorf AT (1967) Further studies on chloroplasts adenosine triphosphatase activation by acid-base transition. J Biol Chem 243:972-975

Ketcham SR, Davenport JW, Warneke K and McCarty (1984) Role of the γ subunit of chloroplast coupling factor 1 in the light-dependent activation of photophosphorylation and ATPase activity by dithiothreitol J Biol Chem 259:7285-7293

Khananashvili D and Gromet-Elhanan Z (1984) Demonstration of two bindings sites for ADP on the isolated β -subunit of the *Rhodospirillum rubrum* F_1F_0 ATP synthase FEBS Lett 178:10-14

Klein-Hitpass L and Berzborn RJ (1984) Accessibility and function of CFO -subunits in chloroplast thylakoids. In: Advances in Photosynthesis Research pp 563-566

Kneusel RE, Merchant S and Selman B (1982) Properties of the solvent-stimulated ATPase activity of chloroplast coupling factor 1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochim Biophys Acta 681:337-344

Komatsu-Takaki M (1987) Correlation between the ATP synthetic

- active state and ATP hydrolytic active state in chloroplast ATP synthase-ATPase complex: CF_0 - CF_1 . J Biol Chem 262:8201-8205
- Krebbers ET, Larrinua IM, McIntosh L and Bogorad L (1982) The maize chloroplasts genes for the β and ϵ subunits of the photosynthetic coupling factor CF_1 . Nucleic Acids Res 10:4985-5001
- Laszlo JA, Baker GM and Dilley RA (1984) Chloroplast thyladoid membrane protein having buried amine buffering groups. Biochim Biophys Acta 160:169
- Lemaire C, Galmiche JM and Grrault G (1984) Flash-induced ATP synthesis in pea chloroplasts and open cells of *Chlamydomonas reinhardtii*: CW-15. En: Third European Bioenergetics Conference, short reports. Congress edition Vol 3A pp 245-246
- Magnusson RP and McCarty RE (1975) Influence of adenine nucleotides on the inhibition of photophosphorylation in spinach chloroplasts by N-ethylmaleimide. J Biol Chem 250:2593-2598
- Malatesta F, Antonini G, Sarti P and Brunori M (1987) Modulation of cytochrome oxidase activity by inorganic and organic phosphate Biochem J 248:161-165
- Masters CJ (1981)
CRC Crit Rev Biochem 11:105-143
- McCarty RE (1977) En: Encyclopedia of Plant Physiology (Trebbs A Avron M eds) vol 5:436-447.
- McCarty RE and Fagan J (1973) Light stimulated incorporation of N-ethylmaleimide into coupling factor 1 in spinach chloroplasts. Biochemistry 12:1503-1507

- McCarty RE, Guilliony RJ and Racker E (1965) Dio-9, an inhibitor of coupled electron transport and phosphorylation in chloroplasts. *J Biol Chem* 240:4822-4823
- McCarty RE and Hammes GG (1987) Molecular architecture of chloroplast coupling factor 1 *TIBS* 12:234-237
- McCarty RE and Moroney JV (1984) in *The Enzymes of Biological Membranes* (Martonosi A ed) 2nd Ed. pp 383-413 Plenum Press, New York
- McCarty RE, Pittman FR and Tsuchiya Y (1972) Light-dependent inhibition of photophosphorylation by N-ethylmaleimide *J Biol Chem* 247:3046-3051
- McCarty R and Racker E (1966) Effect of a coupling factor and its antiserum on photophosphorylation and hydrogen ion transport. *Brookhaven Symp Biol* 19:202-214
- McCarty RE and Racker E (1967) Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation II. The inhibition and stimulation of photophosphorylation by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. *J Biol Chem* 242:3435-3439
- McCarty RE and Racker E (1968) Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation III. Activation of adenosine triphosphatase and $^{32}\text{P}_i$ -labeled orthophosphate - adenosine triphosphate exchange in chloroplasts. *J Biol Chem* 243:129-137
- Merchant S and Selman BR (1983) Identification of the α and β subunits of the chloroplast coupling factor one in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem.* 137:373-376
- Merchant S, Shaner SL and Selman BR (1983) Molecular Weight and subunit stoichiometry of the chloroplasts coupling factor 1

from *Chlamydomonas reinhardtii*. J Biol Chem. 258:1026-1031

Mills JD, Mitchell P and Schürmann P (1980) Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts. The role of thioredoxin system. FEBS Letters 112:173-177

Mills JD and Mitchell P (1982) Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts reversal of thiol modulation in the dark Biochim Biophys Acta 679:75-83

Mills JD and Mitchell P (1984) Thiol modulation of the chloroplasts protonmotive ATPase and its effect on photophosphorylation. Biochim Biophys Acta 764:93-104

Minkov IB and Strotmann H (1989) The effect of azide on regulation of the chloroplasts H^+ -ATPase by ADP and phosphate. Biochim Biophys Acta 973:7-12

Mitchell P (1977) A commentary on alternative hypotheses of protonic coupling in the membrane system catalysing oxidative and photosynthetic phosphorylation. FEBS Lett 76:1-20
Biol Rev 41:445-502.

Mitchell P (1977) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. Science (Washington DC) 206:1148-1159

Moase EH and Green BR (1981) Isolation and properties of chloroplasts coupling factor from Wheat Eur J Biochem 119:145-150

Montecucco C, Schiavo G and Bisson R (1986) ATP binding to bovine heart a cytochrome c oxidase Biochem J 234:241-243

Moraes VLG and de Meiss L (1987) ATP synthesis by $(Na^+ + K^+)$ -ATPase in absence of an ionic gradient. Effect of organic solvent
FEBS Lett 222:163-166

- Moroney JV, Andreo CS, Vallejos RH and McCarty RE (1980) Uncoupling and energy transfer inhibition of photophosphorylation by sulfhydryl reagents. J Biol Chem 255:6670-6674
- Moroney JV, Fullmer CS and McCarty RE (1984) Characterization of the cysteinyl-containing peptides of the γ subunit of coupling factor 1. J Biol Chem 259:7281-7285
- Moroney JV, Lopresti L, McEwen BF, McCarty RE and Hammes GG (1983) The Mr-value of chloroplasts coupling factor 1. FEBS Lett 158:58-62
- Moroney JV and McCarty RE (1982) Effects of proteolytic digestion of the Ca^{+2} -ATPase activity and subunits of latent and thiol-activated chloroplasts coupling factor 1. J Biol Chem 257:5910-5914
- Moroney JV, Warncke K and McCarty RE (1982) The distance between thiol groups in the γ subunit of coupling factor 1 influences the proton permeability. J Bioenerg Biomembr 14:347-360
- Nalin CM, Béliveau R and McCarty RE (1983) Selective modification of coupling factor 1 in spinach chloroplasts thylacoids by a Fluorescent maleimide. J Biol Chem 258:3376-3381
- Nalin CM and McCarty RE (1984) Role of a disulfide bond in the γ subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1 J Biol Chem 259:7215
- Nelson N, Nelson N and Racker E (1972) Partial resolution of enzymes catalysing photophosphorylation. XI Magnesium-adenosine triphosphatase properties of heat-activated coupling factor from chloroplasts. J Biol

- Nelson N and Cidon S (1984) New molecular aspects of energy-transducing protein complex. *J Bioenerg Biomembr* 16:11-3e
- Neumann J and Jagendorf AT (1964) Dinitrophenol as an uncoupler of photosynthetic phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 16:562-567
- Ort DR and Dilley RA (1976)
Biochim Biophys Acta 449:95-107
- Ortiz-Flores G, Acosta A and Gómez-Puyou A (1982) Characteristics of adenylyl imidodiphosphate and ADP-binding sites in soluble and particulate mitochondrial ATPase. Studies with methanol. *Biochim Biophys Acta* 679:466-473
- Patrie WJ and McCarty RE (1984) Specific binding of coupling factor lacking δ and ϵ subunits to thylakoids. *J Biol Chem* 259:11121-11126
- Federsen FL and Carafoli E (1987) Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output. *Trends Biochem Sci* 12:186-189
- Penefsky HS (1974) En: *The Enzymes* (Boyer PD ed) 3rd edn, vol 10 pp375-394, Academic Press, New York
- Petrack B, Craston A, Sheppy F and Farron F (1965) Studies on the hydrolysis of adenosine triphosphate by spinach chloroplasts. *J Biol Chem* 240:906-914
- Pick U (1988) Deactivation of CF_0CF_1 ATP synthase by uncouplers. *Biochemistry* 27:8284-8290
- Pick U and Bassilian S (1982) Activation of magnesium specific adenosine triphosphatase in chloroplasts coupling factor 1 by octyl glucoside. *Biochemistry* 21:6144-6152
- Pick U and Finel M (1983) Detection of conformational changes in

- chloroplast coupling factor 1 by 8-amino-1-naphtalene-sulphonate fluorescence changes. Eur J Biochem 135:559-567
- Pick U, Gounaris N, Admon A and Barber J (1984) Activation of the CF_0 - CF_1 ATP synthase from spinach chloroplasts by chloroplast lipids. Biochim Biophys Acta 765:12-20
- Pick U and Recker E (1979) Purification and reconstitution of the N,N-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ATPase complex from spinach chloroplasts. J Biol Chem 254:2793-2798
- Portis AR Jr, Magnusson RE and McCarty RE (1975) Biochem Biophys Res Commun 64:877-884
- Richter ML, Patrie WS and McCarty RE (1984) Preparation of the ϵ subunit and ϵ subunit-deficient chloroplasts coupling factor 1 in reconstitutively active forms J Biol Chem 259:7371-7373
- Richter ML, Snyder B, McCarty RE and Hammes GG (1985) Binding stoichiometry and structural mapping of the ϵ polypeptide coupling factor 1. Biochemistry 24:5755-5763
- Rigoulet M, Guerin B and Denis M (1987) Modification of flow-force relationships by external ATP in yeast mitochondria. Eur J Biochem 168:275-277
- Rodermel SR and Bogorad L (1985) Maize plastid photogenes: mapping and photoregulation of transcript levels during light-induced development. J Cell Biology 100:163-176
- Rott R and Nelson N (1984) Conservation and organization of subunits of the chloroplasts proton ATPase complex. In Advances in Photosynthesis Research (ed C Sybesma), Vol II pp 501-510
- Rumberg B and Becher U (1984) en H^+ -ATPase (ATP synthase): structure, function, biogenesis-the F_0F_1 complex of coupling

membranes (Papa S, Altendorf K, Ernster L, Facker L eds) pp
421-430. ICSU Press, Bari Italy

Ryrie IO and Jagendorf AT (1972) Correlation between a
conformational change in the coupling factor protein and
the high energy state in chloroplasts. J Biol Chem
247:4453-4459

Sakamoto J (1984) Identification of nucleotide-binding site for
ATP synthesis and hydrolysis in mitochondrial soluble
 F_1 -ATPase. J Biochem (Tokyo) 96:475-481

Sakamoto J and Tonomura Y (1983) Synthesis of enzyme-bound ATP by
mitochondrial soluble F_1 -ATPase in the presence of
dimethylsulfoxide. J Biochem 93:1601-1614

Savers CK (1969) The dehydration of N-arylmaleic-acid with acetic
anhydride. J Org Chem 34:2275-2279

Schlodder E and Witt HT (1981) Relation between the initial
kinetics of ATP synthesis and of conformational change
in the chloroplast ATPase studied by external field pulses.
Biochim Biophys Acta 635:571-584

Schreiber U (1984a) ATP-induced increase in chlorophyll
fluorescence characterization of rapid and slow indication
phases. Biochim Biophys Acta 767:70-79

Schreiber U (1984b) Comparison of ATP-induced and DCMU-induced
increases of chlorophyll fluorescence. Biochim Biophys Acta
767:80-86

Schumann J (1984) A study on exchange of tightly bound
nucleotides on the membrane-associated chloroplast ATP
synthase complex. Biochim Biophys Acta 766:334-342

Schumann J, Richter MR and McCarty RE (1985) Partial proteolysis

- as a probe of the conformation of the γ subunit in activated soluble and membrane-bound chloroplast coupling factor 1. *J Biol Chem* 250:11817-11823
- Schnuster SM (1979) Effect of organic solvents on the beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *Biochemistry* 18:1162-1167
- Shahak Y (1982) Activation and deactivation of H^+ -ATPase in intact chloroplasts *Plant Physiol* 70:87-90
- Shahak Y (1985) Differential effect of thiol oxidants on the chloroplasts H^+ -ATPase in the light and in the dark. *J Biol Chem* 260:1459-1462
- Shavit N (1975) Exchange reactions (plant) $^{32}P_i$ -ATP, ATP- $H^{18}OH$, and P_i - $H^{18}OH$. *Metn Enzymol* 27:318-321
- Shavit N, Aflalo C, Bar-Zvi D and Tiefert MA (1984) Modulation of the chloroplast ATP synthetase: conformational states, nucleotide binding and limited accessibility to the active site. In: *Advances in Photosynthesis Research* (C Sybesma Ed) Vol II pp 493-500. Martinus Nijhoff/DW Junk: The Hague
- Sherman FA and Wimmer MJ (1982) Two types of kinetic regulation of the activated ATPase in the chloroplasts photophosphorylation system *J Biol Chem* 257:712-7017
- Shinozaki K, Deno H, Kato A and Sugiura M (1983) Overlap and cotranscription of the genes for the beta and epsilon subunits of tobacco chloroplasts ATPase. *Gene* 24:147-155
- Shoshan V and Selman BR (1980) The interaction of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide with chloroplasts coupling factor 1. *J Biol Chem* 255:384-389
- Shoshan V and Shavit N (1979) ATP synthesis and hydrolysis in

- chloroplasts membranes (Differential inhibition by antibodies to chloroplasts coupling factor 1). *Eur J Biochem* 94:87-91
- Shoshan V, Shevit N and Chipman DM (1978) Kinetics of nucleotide binding to chloroplasts coupling factor (CF₁). *Biochim Biophys Acta* 504:108-122
- Silva AL (1981) Tesis de Quimico. Facultad de Quimica. UNAM Mexico
- Snyder E and Hammes GG (1984) Structural mapping of chloroplasts coupling factor. *Biochemistry* 23:5787-5795
- Snyder E and Hammes GG (1985) Structural organization of chloroplast coupling factor. *Biochemistry* 24:2324-2331
- Strotmann H and Bickel-Sandkötter S (1977) Energy-dependent exchange of adenine nucleotides on chloroplasts coupling factor (CF₁). *Biochim Biophys Acta* 460:126-135
- Strotmann H, Bickel-Sandkötter S, Edelmann K, Schlimme E, Boos KS and Lüsthoff J (1977) Studies on the tight adenine nucleotide binding site of chloroplasts coupling factor (CF₁). In *Structure and Function of Energy-Transducing Membranes* (ed K van Dam BF van Gelder) pp307-317. Amsterdam
- Strotmann H, Bickel-Sandkötter S, Edelmann K, Eckstein F and Schlimme E (1979) Thiophosphate analogs of ADP and ATP as substrates in partial reactions of energy conversion in chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 545:122-123
- Süss KH and Manteuffel R (1983) The chloroplasts ATP synthetase consists of the subunits, $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ and proteolipid only. *FEBS Lett* 153:134-140
- Tawney FO, Snyder RH, Conger RP, Leibrand KA, Stiteler CH and Williams AR (1961) The chemistry of maleimide and its

derivatives. II. Maleimide and N-methylolmaleimide. J Org Chem 28:15-21

Tiedge H, Lünsdorf H, Schäfer G and Schaire HU (1984) Electron microscopic approaches to the quaternary structure of F_1 and CF_1 . En third European Bioenergetics Conference, short reports Vol 3A pp 31-32

Tuena de Gómez-Puyou M, Ayala G, Darzon A and Gómez-Puyou A (1984) Oxidative phosphorylation and the P_i -ATP exchange reaction of submitochondrial particles under the influence of organic solvents. J Biol Chem 259:9472-9478

Vallejos RH, Arana JL and Ravizzini RA (1983) Changes in activity and structure of the chloroplast proton ATPase induced by illumination of spinach leaves. J Biol Chem 258:7317-7321

Vallejos RH and Andreo CS (1976)
FEBS Lett 61:95-99

Vallejos RH, Ravizzini RA and Andreo CS (1977) Sulphydryl groups in photosynthetic energy conservation IV. Inhibition of the ATPase of chloroplast coupling factor 1 by sulphydryl reagents. Biochim Biophys Acta 459:20-26

Vambutas VM and Racker E (1965) Partial resolution of enzymes catalyzing photophosphorylation. I. Stimulation of photophosphorylation by a preparation of latent Ca^{++} -dependent adenosine triphosphatase from chloroplasts. J Biol Chem 240:2660-2667

Van der Bend-RL, Cornelissen JB, Berden JA and van Dam K (1984) Factors depending the functional coupling of bacteriorhodopsin and ATP synthase in liposomes. Biochim Biophys Acta 767:87-101

- Van der Meullen DL and Govindjee E (1977) Binding of modified adenine nucleotides to isolated coupling factor from chloroplast as measured by polarization of fluorescence. Eur J Biochem 78:585-598
- Wagner R and Junge W (1980) Two different types of conformational changes of membrane-bound CF₁ as revealed by the triplet probe eosine. FEBS Lett 114:327-333
- Wagner R and Junge W (1982) Coupling factor for photophosphorylation labeled with eosin isothiocyanate: activity, size and shape in solution. Biochemistry 21:1890-1899
- Walker DA (1971) En: Methods in Enzymol (San Pietro A ed) vpl XXIV, Academic Pres pp 211-220
- Walker JE, Saraste M and Gay NJ (1984) Nucleotide sequence, regulation and structure of ATP synthase. Biochim Biophys Acta 768:164-200
- Weiss MA and McCarty RE (1977) Cross-linking within a subunit of coupling factor 1 increases the proton permeability of spinach chloroplast thylakoids J Biol Chem 252:8007-8012
- Westhoff P, Nelson N, Bünemann H and Hermann RG (1981) Localization of genes for coupling factor subunits on the spinach plastid chromosome. Curr Genet 4:109-120
- Wimmer MJ and Rose IA (1977) Mechanism for oxygen exchange in the chloroplasts photophosphorylation system. J Biol Chem 252:6769-6775
- Wold F (1967) Bifunctional maleimide derivatives. Methods Enzymol 11:622-623
- Yoshida M (1983) The synthesis of enzyme-bound ATP by the

- F_1 -ATPase from the thermophilic bacterium PS 3 in 50% dimethylsulfoxide. Biochem Biophys Res Commun 114:907-912
- Yoshida M and Allison WS (1983) Modulation of ADP and Mg^{+2} of the inactivation of the F_1 -ATPase from the thermophilic bacterium PS3, with dicyclohexylcarbodiimide. J Biol Chem 258:14407-14412
- Younish HM, Weber G and Boyer JS (1983) Activity and conformational changes in chloroplasts coupling factor induced by ion binding: formation of a magnesium-enzyme phosphate complex. Biochemistry 22:2505-2512
- Zurawski G, Bottomley W and Whitefield PR (1982) Structures of the genes for the β and ϵ subunits of spinach chloroplasts ATPase indicate a dicistronic mRNA and an overlapping translocation stop start signal. Proc Natl Acad Sci USA 79:6260-6264
- Zurawski G and Clegg MT (1984) The barley chloroplasts DNA *atpBE*, *trnM2* and *V1* loci. Nucleic Acids Res 12:2549-2559