

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

LOCALIZACION DEL SITIO DESACOPLANTE DE LAS
AMINAS UNIDAS A SEFAROSA Y SU MECANISMO
DE ACCION EN LA FOTOFOSFORILACION



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

CARLOS F. ARIAS ORTIZ

México, D.F.

1977



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.

CLAS tesis 1977
ABO M-26
FECHA _____
FREG _____
• _____



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE
SEGUN EL TEMA

Presidente	Dra. Estela Sánchez de Jiménez
Vocal	Dra. Victoria Valles
Secretario	Dr. Blas Lotina-Hennsen
1er. Suplente	Profra. Ma. Dolores Lastra Azpilicueta
2o. Suplente	Profra. Beatriz Medina Jiménez

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Bioquímica
División de Estudios Superiores
Facultad de Química

Sustentante:

Carlos Federico Arias Ortiz

CARLOS F. ARIAS O.

Asesor del Tema:

Blas Lotina-Hennsen



A mis padres

A mi familia

Al Dr. Blas Lotina-Hennsen

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Blas -- Lotina Hennsen la valiosa ayuda y dirección dadas a través de la elaboración de este trabajo, así como su tiempo invertido en mi formación académica. También quiero expresar mi gratitud al Dr. Richard Dilley por las donaciones instrumentales hechas a nuestro laboratorio, así como por su participación - decisiva en el montaje y adaptación de las técnicas empleadas. De igual manera manifiesto mi agradecimiento a la Dra. Marta Albores por la síntesis de algunas de las aminas ensayadas. - Estoy, asimismo en deuda con la Dra. Sánchez y la Dra. Victoria Valles, por las valiosas revisiones hechas a esta tesis, las cuales hicieron posible su ulterior edición. Gracias también al Ing. Arturo Herrera O. quién fotografió los sistemas experimentales usados en el presente trabajo, así como a la - Quím. Graciela Aguilera S. por la ayuda prestada durante la elaboración del mismo.

Finalmente quiero expresar mi profundo agradecimiento a mis padres, quienes me apoyaron en todos los aspectos a -- través de los años que necesité para alcanzar la culminación de esta etapa.

Carlos F. Arias O.

CONTENIDO

	Págs.
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	6
INTRODUCCION	8
GENERALIDADES	
I MORFOLOGIA DEL CLOROPLASTO	12
II CICLO DE CALVIN	17
III EVENTOS PRIMARIOS DE LA FOTOSINTESIS EN LA LUZ	
A. Absorción de la Luz	21
a. Pigmentos fotosintéticos	22
B. Transferencia de Energía	24
a. Transferencia heterogénea	26
b. Transferencia homogénea	26
c. Separación de cargas	26
IV EVENTOS SECUNDARIOS DE LA FOTOSINTESIS EN LA LUZ	
A. Transporte de Electrones a través de la Cadena Fotosintética	30
a. Componentes de la cadena de transporte electrónico	32
b. Evolución de oxígeno	37
c. Localización de los componentes de la cadena de transporte -- electrónico	38
B. Fotofosforilación	45
a. Acoplamiento entre la fotofos- forilación y el transporte de electrones	47

i.	Hipótesis química	48
ii.	Hipótesis quimiosmótica	52
iii.	Hipótesis conformacional	61

MATERIALES Y METODOS

I	AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS	63
II	DETERMINACION DE CLOROFILA	66
III	ACOPAMIENTO DE LAS AMINAS A SEFAROSA	66
	a. Activación del Polisacárido	66
	b. Adición del brazo hidrocarbonado diaminado	67
IV	DETERMINACION DE GRUPOS AMINO	68
V	MEDICION DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES	71
VI	DETERMINACION DE LA SINTESIS DE ATP	79
VII	MEDICION DE LA BOMBA DE PROTONES	84

RESULTADOS

I	EFFECTO DE LAS MONOAMINAS ALIFATICAS - CON DIFERENTES LONGITUDES EN SU BRAZO HIDROCARBONADO SOBRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES	86
II	EFFECTO DE LAS MONOAMINAS ALIFATICAS CON DIFERENTE LONGITUD EN SU CADENA HIDROCARBONADA SOBRE LA FORMACION DE ATP	87
III	EFFECTO DE LAS DIAMINAS ALIFATICAS CON DIFERENTES LONGITUDES EN SU BRAZO -- HIDROCARBONADO SOBRE EL TRANSPORTE - DE ELECTRONES	90
IV	EFFECTO DE LAS DIAMINAS ALIFATICAS CON DIFERENTES LONGITUDES EN SU BRAZO -- HIDROCARBONADO SOBRE LA SINTESIS DE ATP	95
V	EFFECTO DE LAS AMINAS UNIDAS A SEFAROSA SOBRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES BASAL	98

	Págs.
VI EFECTO DE LAS AMINAS UNIDAS A SEFAROSA SOBRE LA SINTESIS DE ATP	101
VII EFECTO DE LA SEFAROSA-DODECAMETILEN-DIAMINA SOBRE LAS REACCIONES PARCIALES Y LA BOMBA DE PROTONES	102
DISCUSION	106
BIBLIOGRAFIA	112

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

ADP, ATP	Adenosín di y trifosfato
Asc	Ascorbato
BSA	Albúmina de suero bovina
C ₅₅₀	Compuesto con una banda de absorción a 550 nm
CCCP	Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona
CF ₁	Factor de acoplamiento para la fotosfo- rilación en cloroplastos
Cl _a (b)	Clorofila a (b)
Cyt b ₅₅₉	Citocromo b con una banda de absorción a 559 nm
Cyt b ₆ 564	Citocromo b ₆ con una banda de absorción a 564 nm
Cyt f ₅₅₃	Citocromo f con una banda de absorción a 553 nm
DABS	Acido diazoniobencensulfónico
DBMIB	2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzo-- quinona
DCIP	2,6-diclorofenolindo fenol
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DMQ	2,5-dimetil-p-benzoquinona
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
E ₀	Potencial de oxido-reducción a pH 7 en - volts
F 710	Banda de emisión de fluorescencia en nm
FCCP	Carbonilcianuro p-trifluorometoxifenil-- hidrazona
Fd	Ferredoxina
FRS	Sustancia reductora de la ferredoxina
HEPES	{Acido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2- etanosulfónico}
h ν	un quantum de energía
MV	Metilviológeno
NADP ⁺ (NADPH)	Nicotín adenín dinucleótido oxidado (redu- ducido)

PD	Fenilendiamina
PS I (II)	Fotosistema I (II)
P680-690	Trampa de energía de PS II
P700	Trampa de energía de PS I
P430	Aceptor electrónico de PS I (pigmento con una banda de absorción a 430 nm)
PC	Plastocianina (posible donador electrónico de PS I)
Pi	Fósforo inorgánico
PQ	Plastoquinona
PMS	Fenazina metosulfato
Q	Aceptor de electrones primario para PS II
RuDP carboxilasa .	Ribulosa-1,5-difosfatocarboxilasa (carboxidismutasa)
TAPS	(Acido tris Hidroximetil Metilaminoprop <u>a</u> no sulfónico)
X	Aceptor de electrones primario para PS I
Z	Donador de electrones primario para PS II

RESUMEN

El flujo de equivalentes reductores y la fotofosforilación son dos procesos que se encuentran acoplados en el -- cloroplasto, i.e., en la naturaleza ocurren simultáneamente y no es posible que se efectúe uno, sin la ocurrencia del otro. El mecanismo de este acoplamiento, se puede estudiar indirectamente empleando desacoplantes, que son aquellas moléculas que permiten que el flujo electrónico continúe (en ocasiones estimulándolo), y abatiendo a su vez la síntesis de ATP.

Se midió el efecto desacoplante de mono y diaminas libres con diferentes longitudes en su cadena hidrocarbonada, -- resultando evidente que es necesario cierto grado de hidrofobicidad para poder ejercer su efecto desacoplante. Así, las monoaminas aumentaron su efecto al aumentar la longitud de su brazo hidrófobo, y las diaminas fueron menos potentes que las monoaminas correspondientes (por tener otro grupo amino que -- les confiere mayor polaridad).

Para poder localizar la actividad desacoplante de estas aminas, se unieron a sefarosa, y se ensayo nuevamente su efecto sobre el transporte de electrones y la síntesis de ATP, -- encontrándose que ninguna de las aminas mantuvo su efecto desacoplante con excepción de la ³amina de 12 carbonos, la cual estimuló significativamente el flujo electrónico mientras inhibía la formación de ATP. Se probó a su vez esta dodecame--tiléndiamina sefarosa sobre la bomba de protones, a la cual, inhibió completamente; indicándonos un aumento en la permeabi--lidad de la membrana. Se midió así mismo la actividad de esta diamina de 12 carbonos unida a sefarosa sobre el flujo de equivalentes reductores en PS I y PS I separadamente, produ--ciéndose una estimulación en PS I, mientras se inhibía PS II ligeramente. En base a los resultados presentados y a la discusión posterior, es posible concluir, que las aminas (al --

menos las de cadena larga] tienen un sitio específico de interacción que se encuentra aproximadamente a 21 Å desde la parte externa de la membrana del tilacoide, el cual es una región específica del factor de acoplamiento (tal vez la subunidad \mathcal{F}_1) produciendo en ella una perturbación que provoca una modificación en la permeabilidad de la membrana, haciendo que esta aumente y esté facilitado el paso para los protones y -- contra-iones, disipándose así el gradiente electroquímico formado por la bomba de protones, y lo cual llevará al desacoplamiento entre la síntesis de ATP y el flujo de equivalentes reductores.

INTRODUCCION

"La vela no ardería nuevamente y el ratón no podría -- respirar hasta que la ramita de menta hubiera restaurado el -- aire".

Por los más sencillos experimentos con gases Joseph -- Priestley, ministro inglés, en 1771, fue el primero en encontrar que las plantas podían hacer reversibles los efectos de combustión y respiración, empezándose a conocer la importancia real de las plantas verdes en el equilibrio ecológico. -- Sin duda Priestley es considerado como el descubridor del proceso que actualmente conocemos como fotosíntesis.

Literalmente fotosíntesis significa "síntesis con ayuda de la luz". Esto cubre una gran variedad de procesos en química orgánica e inorgánica. Sin embargo el término se -- aplica usualmente a una reacción en particular -la síntesis - de materia orgánica por las plantas, en la luz- un proceso -- llamado también "asimilación del carbono". Esto, es el proceso básico de la vida -al menos como lo conocemos sobre la -- tierra. Por medio de él se crea materia orgánica a partir de materiales inorgánicos, reconstituyendo la reserva de oxígeno en la atmósfera y almacenando la energía de la luz solar para efectuar las actividades vitales de los organismos.

La utilización de energía es un proceso estrictamente necesario para la elaboración de materia orgánica en las plantas verdes. Puesto que la célula funciona esencialmente a -- temperatura constante, no puede utilizar energía calorífica - para realizar este trabajo; por lo tanto debe obtener y utilizar la energía a baja temperatura a la vez que constante, en un medio acuoso diluido y dentro de estrechos límites de concentración de iones hidrógeno.

Para asegurarse su energía, la célula ha perfeccionado extraordinariamente durante los largos períodos de evolución orgánica, organelos celulares con mecanismos moleculares que trabajan con gran eficiencia en esas condiciones. Estos organelos son: las mitocondrias, lugar donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa y los cloroplastos, donde se efectúan los procesos fotosintéticos.

La energía luminosa captada por los cloroplastos es transformada a energía química, la cual se conserva en las moléculas de ATP a través de un enlace de alta energía con un grupo fosfato. La síntesis de estas moléculas de alta energía es un proceso acoplado al flujo de electrones producido por la luz, i.e., no puede haber síntesis de ATP si no hay flujo de electrones, y este flujo electrónico tampoco continuará si no se forma ATP simultáneamente. A pesar de la importancia del fenómeno y de los grandes esfuerzos desarrollados en esa dirección, todavía estamos lejos de conocer el mecanismo de acoplamiento, i.e., el mecanismo por el cual un flujo de equivalentes reductores puede dar lugar a la formación de moléculas con enlaces de alto contenido energético como lo es el ATP, habiéndose convertido en uno de los retos más atrayentes de la bioquímica moderna.

Una de las formas de abordar este problema, es estudiar el proceso inverso, i.e., el mecanismo de desacoplamiento, lo cual, se logra empleando sustancias como aminas alifáticas, atebrina, cloropromazina, gramicidina S, octilguanidina, nigericina, FCCP, CCCP, tiofosfato y otras, las cuales ocasionan la anulación de la fotofosforilación, sin inhibirse el transporte de electrones. El transporte de electrones liberado de la restricción impuesta por el mecanismo de acoplamiento se acelera grandemente, al mismo tiempo que la sín-

tesis de ATP decae. Las sustancias que producen estos efectos reciben el nombre de desacoplantes.

Las aminas tanto alifáticas como aromáticas se han usado extensamente para estudiar este mecanismo, habiéndose reportado sus efectos como desacoplantes clásicos (1,2,3).

El comportamiento más o menos aceptado de estas aminas es el de transportador móvil, i.e., se propone que las moléculas de amina son capaces de solubilizarse en la membrana del tilacoide, protonarse en el espacio interior de esta vesícula, entonces moverse hacia el exterior de dicha membrana y perder su ion hidrógeno en el medio externo correspondiente al estroma del cloroplasto (4). La continua entrada y salida de esta molécula causará una pérdida neta de iones hidrógeno al exterior de la membrana y así permitirá un flujo de electrones más rápido sin fosforilación.

Sin embargo, los conocimientos moleculares sobre la interacción de las aminas con los discos tilacoides, distan mucho aún de ser medianos; esto tal vez es debido a que estas aminas siempre que se han ensayado, se han añadido al medio en forma libre, i.e., sin tener limitada su movilidad, por lo que no se puede saber si están actuando por la parte externa de la membrana, embebidas en ella, interaccionando en su parte interna o solubilizadas en la fase acuosa de su interior.

Así, el objetivo fundamental del presente trabajo es localizar el sitio de interacción de las aminas en la membrana del tilacoide, y en base a esto, discutir su posible mecanismo de acción en la fotofosforilación.

Sabiendo que el factor de acoplamiento es un elemento clave en la conexión del transporte de electrones y de la sin

tesis de ATP, y conociendo además que este CF_1 se encuentra hacia la superficie de la membrana es de esperarse que la acción de las moléculas desacoplantes, esté estrechamente relacionada con dicho factor. Así, es importante, el probar aminas que tengan restringida su movilidad y a las cuales las podemos controlar su distancia de interacción dentro de la membrana, por medio de la longitud de su brazo hidrocarbonado, y así, tratar de localizar el sitio específico en el cual dichas aminas actúan para efectuar su actividad desacoplante.

Lo anterior se pretende lograr, uniendo diaminas de diferentes longitudes a sefarosa $[NH_2(CH_2)_nNH_2]$, donde $n = 2, 4, 6, 8, 10, 12$, con lo cual nos quedarán las monoaminas correspondientes (ya que uno de los grupos amino está involucrado en la unión con la sefarosa). Estas aminas unidas a sefarosa serán añadidas como reactivo a la mezcla de reacción y tendrán definitivamente restringida su movilidad, ya que no podrán actuar dentro de la membrana a mayor distancia de lo que longitud de su brazo les permita, pudiendo localizar de esta manera, más o menos con exactitud su sitio de acción como desacoplantes.

GENERALIDADES

Para comprender todos los procesos fotosintéticos que se llevan a cabo en los cloroplastos, es necesario conocer -- más a fondo la morfología y estructura molecular de los mismos, para lo cual se revisarán brevemente algunos aspectos -- conformacionales, así como funcionales de las membranas involucradas en las fotorreacciones.

I. MORFOLOGIA DEL CLOROPLASTO

El tamaño y la forma del cloroplasto varían de un tipo de planta a otro y en ocasiones de célula a célula. Mide -- aproximadamente 5μ y puede tener forma tanto ovalada como esférica [5].

La estructura de los cloroplastos es comparable a la -- de las mitocondrias. Tienen una doble membrana externa muy frágil llamada envoltura, que sirve de barrera de permeabilidad entre el citoplasma y el estroma del cloroplasto [fig. -- 1A y 1B] y una membrana interna, que es continua pero está -- plegada de modo muy complejo. La membrana interna está forma da de múltiples vesículas aplanadas, llamadas discos tilacoides, que usualmente están apiladas transversalmente por el -- cloroplasto. Estas hacinas reciben el nombre de grana (ver fig. 1A y 1B). Estos grana están interconectados por el sistema lamelar del estroma, entendiéndose por estroma, la ma-- triz proteínácea donde se encuentran las enzimas del ciclo de Calvin, delimitada por la doble membrana del tilacoide, la -- cual, contiene en adición al sistema lamelar interno del cloroplasto un cierto número de estructuras particulares, visi-- bles al microscopio electrónico, las cuales incluyen riboso-- mas y hebras de DNA. Se sabe ahora que ambos componentes juegan un papel importante en la autorregulación y replicación --

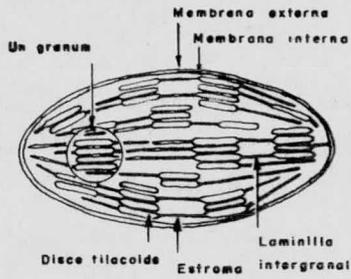


Fig. 1A. Dibujo esquemático mostrando la disposición de las membranas en los discos tilacoides.

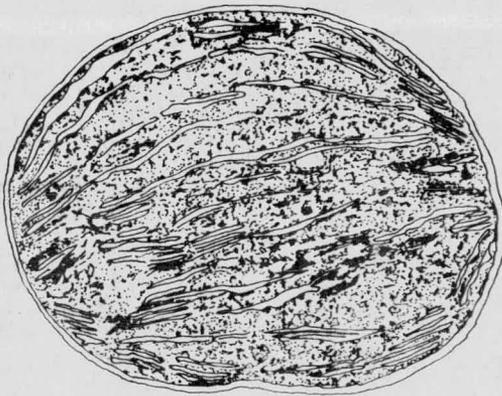


Fig. 1B.
Cloroplastos clase I
(con doble membrana)

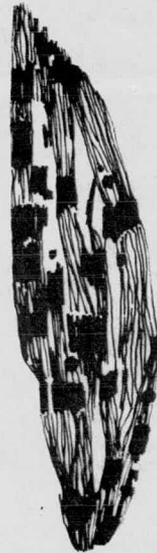


Fig. 1C.
Cloroplastos clase II
(sin membrana externa)

del cloroplasto [6]. A menudo se encuentran granos de almidón y grasa entre las lamelas del cloroplasto.

Los grana contienen esencialmente todos los pigmentos fotosintéticos del cloroplasto, y también las enzimas necesarias para las reacciones primarias dependientes de la luz. - Las membranas tilacoides son los sitios de la estructura donde se hallan los sistemas destinados a la captura de la luz.

El sistema lamelar de la membrana interna puede ser liberado del estroma al romper la membrana externa, rindiendo toda una gama de partículas que va desde discos tilacoides aislados a grana completos, que pueden recuperarse por centrifugación diferencial -cloroplastos clase II. (ver fig. 1C).

Dada la importancia de las funciones biológicas críticas que residen en la membrana, y para conocer los mecanismos moleculares, mediante los cuales se efectúan, es preciso ante todo, conocer la estructura de las membranas biológicas. Así, se han de aclarar tanto los principios generales como los detalles de la organización de las proteínas, lípidos, hidratos de carbono y de los constituyentes restantes de la membrana.

Esta estructura se ha tratado de visualizar mediante diferentes modelos, de los cuales, el más aceptado en la actualidad es el "modelo del mosaico fluido" [7] (fig. 2). En este modelo, los fosfolípidos forman una doble capa discontinua, con sus cadenas hidrofóbicas orientadas hacia el interior y las cabezas polares hacia el exterior, de igual manera que como fue postulado por Davson y Danielli en 1935 [8], donde las proteínas de conformación β , hoja plegada y forma fibrilar formaban una capa continua adherida a las caras hidrofílicas de las bicapas de lípidos. A diferencia, en el nuevo mo-

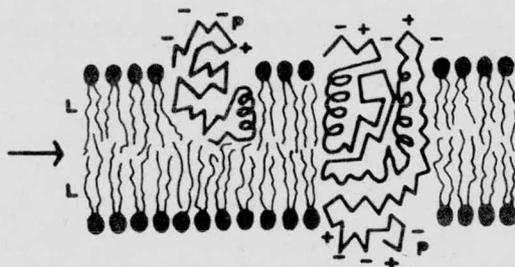


Fig. 2A. Esquema del modelo membranaral del "mosaico fluido". No se muestran los fosfolípidos asociados de manera especial con las proteínas. (P) proteínas; (L) lípidos; (- y +) - representan los residuos iónicos de la superficie. Tampoco están representados los carbohidratos.

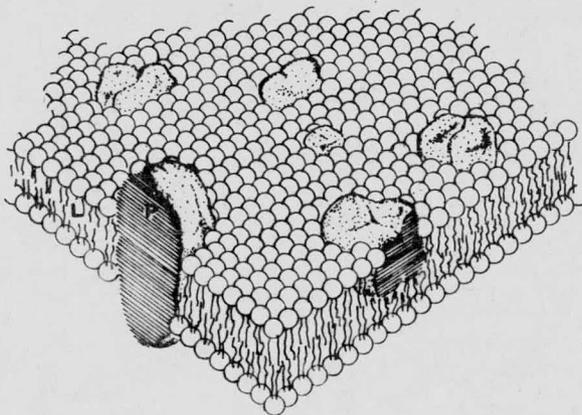


Fig. 2B. Esquema tridimensional del "modelo del mosaico fluido". Los cuerpos sólidos representan a las proteínas globulares integrales que se encuentran distribuidas al azar dentro de la bicapa lipídica.

delo de Singer, las proteínas se pueden encontrar tanto en el exterior -como en el modelo de Danielli-, llamándose periféricas, como parte de ellas sumergidas dentro de la bicapa y - parte en el exterior, denominándose integrales. Algunas otras proteínas se encuentran atravesando la membrana de lado a lado y están ancladas a ella por una serie de aminoácidos apolares que se fijan a la parte hidrofóbica de la bicapa, conteniendo algunos otros aminoácidos del tipo polar hacia los extremos. Las proteínas en este modelo son de naturaleza anfipática con predominancia en la conformación de α -hélice.

En condiciones fisiológicas, los lípidos que constituyen a la membrana, se encuentran en estado líquido, por lo -- que el mosaico presenta fluidez, pudiéndose visualizar a las proteínas como icebergs flotando libremente en un océano lipídico. Esta inferencia de movilidad de las proteínas en la membrana, representa una gran diferencia con el modelo de -- Davson y Danielli, en el que la membrana era una estructura rígida.

Si tomamos en cuenta las restricciones existentes para plantear un modelo de membrana, tendremos que aceptar que es necesario para tener una estructura lo más estable posible, - el que las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas estén maximizadas en la membrana, además de encontrarse en el estado de energía libre más bajo en el medio ambiente acuoso que las rodea. Para esto es necesario que los residuos de aminoácidos no polares de las proteínas, junto con las cadenas de los ácidos grasos de los fosfolípidos, estén secuestrados -en el máximo grado posible- del contacto con el agua, mientras que los grupos polares y iónicos de las proteínas, conjuntamente con los de los lípidos y oligosacáridos, deben estar en contacto con el solvente acuoso. Como mencione con anterioridad,

estos requerimientos significan restricciones a los modelos de estructura de membrana; en particular, hacen parecer muy poco probable el clásico modelo de arreglo trilaminar, con la bicapa continua de lípidos cubierta a ambos lados por una monocapa de proteínas. Este modelo es termodinámicamente inestable, ya que no solamente están los residuos de aminoácidos no polares expuestos al agua, sino que los grupos polares e iónicos de los fosfolípidos están obstaculizados por una capa de proteínas del contacto del agua. Por lo tanto ni las interacciones hidrofóbicas ni hidrofílicas están maximizadas en el modelo clásico.

El "modelo del mosaico fluido" es el único modelo membranaral descrito hasta la fecha que es consistente tanto con las propiedades físicas y estructurales de las membranas, como con las restricciones termodinámicas existentes en éstas.

II. CICLO DE CALVIN

La fotosíntesis consta de dos fases: una oscura y una luminosa. La fase oscura se efectúa en el espacio marginado por la doble membrana [descrito ya como estroma y cuyas características generales se han apuntado con anterioridad] y comprende la asimilación del bióxido de carbono para la formación final de hexosas en el ciclo de Calvin (fig. 3) (9).

El aceptor primario del bióxido de carbono es la ribulosa-1,5-difosfato, dando lugar a la formación de un ácido de 6 carbonos, el cual por una hidrólisis y subsecuente dismutación-oxidación de un grupo carbonilo a carboxilo y reducción de otro a alcohol- da lugar a dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico. La enzima que lleva a cabo esta reacción combinada es la carboxidismutasa o ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa.

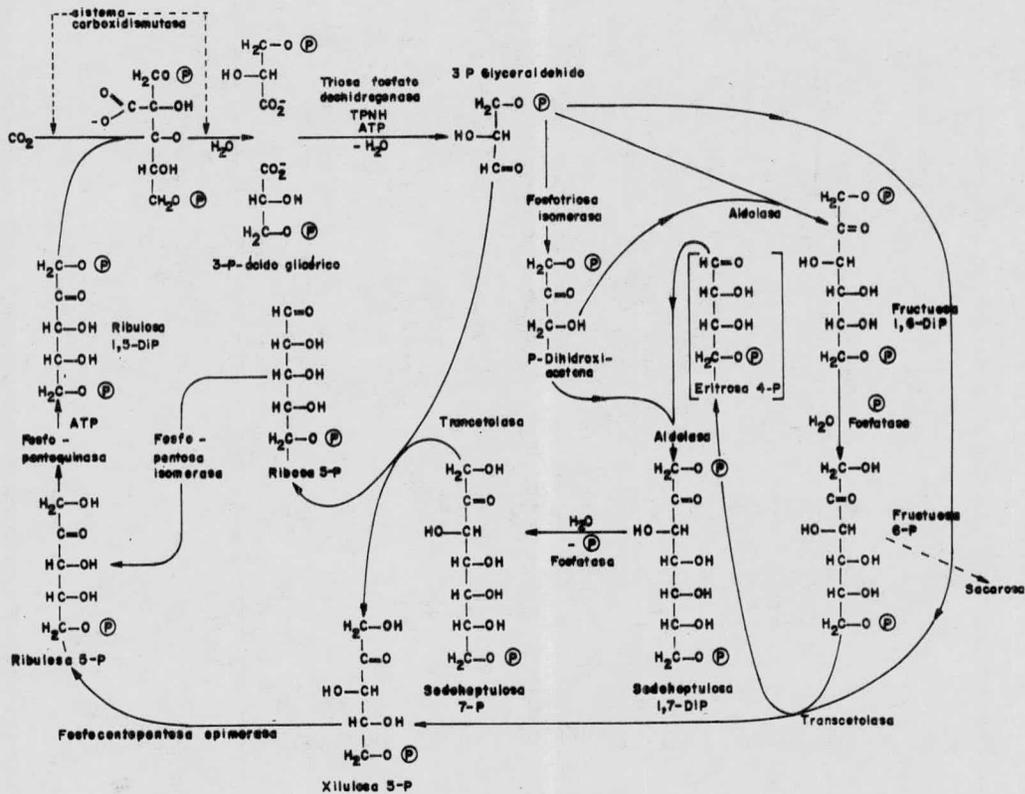


Fig. 3. Ciclo de la reducción fotosintética del carbono (Ciclo de Calvin)

La reducción del grupo carboxilo del ácido 3-fosfoglicérico a aldehído se supone que está dada por el equivalente reductor sintetizado en la luz, NADPH, pero tomando en cuenta que el potencial de NADPH $E_0' = -0.35 \text{ V}$, no es lo suficientemente negativo para reducir un grupo carboxilo con un $E_0' = -0.5 \text{ V}$, se ha sugerido que esta reducción puede ser posible - si está acoplada con la hidrólisis de una molécula de ATP que libere energía. Así, el ácido 3-fosfoglicérico se fosforila en el siguiente paso a ácido 1,3-difosfoglicérico. Este último es un fosfato de alta energía, ya que el segundo radical fosfato está unido a un grupo carboxilo. Esta reacción es catalizada por una cinasa. Ahora el ácido 1,3-difosfoglicérico puede ser reducido por NADPH si el grupo fosfato de alta energía es simultáneamente escindido. El producto de esta -- reducción da lugar al 3-fosfogliceraldehído, por medio de una deshidrogenasa.

En este punto estamos ya a nivel de carbohidratos, si consideramos el 3-fosfogliceraldehído como tal. Su transformación en otros carbohidratos mayores como pentosas -ribulosa, ribosa- o hexosas -glucosa o fructosa-, puede ocurrir por conversiones enzimáticas sin requerimiento adicional de energía ya que todos tienen el mismo nivel de reducción; aunque - se sabe que se requiere otra molécula de ATP para la conversión de ribulosa monofosfato o ribulosa difosfato.

El gliceraldehído-3-fosfato sufre una isomerización -- parcial -con la ayuda de una isomerasa- en dihidroxiacetona -fosfato. Una molécula de gliceraldehído-3-fosfato y otra de dihidroxiacetona fosfato se combinan -bajo la acción de una -aldolasa- para formar una molécula de fructosa-1,6-difosfato. Esta molécula pierde un grupo fosfato -por acción de una fosfatasa- formando fructosa-6-monofosfato, la cual con ayuda de

una isomerasa, sufre una isomerización parcial a glucosa-6-fosfato. Una vez que los monofosfatos de glucosa y fructosa se han formado, se pueden formar carbohidratos de peso molecular más elevado como sacarosa o almidón.

Después de este punto, la serie de reacciones siguientes para completar el ciclo, tienen por objeto el regenerar la ribulosa-1,5-difosfato. Así, la fructosa-6-fosfato formada se combina con una molécula de gliceraldehido-3-fosfato -- para dar (con ayuda de una transacetolasa) una molécula de -- xilulosa-5-fosfato y otra de eritrosa-4-fosfato; Esta última se une a su vez a través de una aldolasa con una molécula de dihidroxiacetona-fosfato para dar una molécula de sedoheptulosa-1,7-difosfato, la cual por acción de una fosfatasa pierde un grupo fosfato para quedar convertida en sedoheptulosa-7-fosfato. Esta sedoheptulosa-7-fosfato, puede combinarse ahora con una molécula de gliceraldehido-3-fosfato para rendir por la acción de otra transacetolasa, una molécula de ribosa-5-fosfato y otra de xilulosa-5-fosfato. Estos dos últimos productos, el primero por la acción de una isomerasa, y el segundo por la de una epimerasa, van a rendir ribulosa-5-fosfato, la cual, finalmente a través de una fosforribulocinasa va a producir la ribulosa-1,5-difosfato, necesaria para empezar otra vuelta del ciclo.

Después de que el ciclo ha dado seis vueltas, se han consumido 12 moléculas de NADPH y 18 moléculas de ATP para -- dar lugar a una molécula de hexosa a partir de la incorporación de 6 moléculas de CO_2 . El resto ha servido para regenerar la ribulosa-1,5-difosfato.

Los equivalentes reductores [NADPH] y la energía [ATP] consumida durante el ciclo de Calvin son metabolitos que se producen durante la fase luminosa de la fotosíntesis.

III. EVENTOS PRIMARIOS DE LA FOTOSINTESIS EN LA LUZ

Toda la serie de reacciones que pertenecen a la fase luminosa, como son: absorción de la energía radiante; transferencia de esta energía; separación de cargas; transporte de electrones: evolución de oxígeno: síntesis de ATP y reducción del NADP^+ , se efectúan completamente en la membrana del tilacoide (ver fig. 1). En este lugar se encuentra la cadena transportadora de electrones, a través de la cual fluyen los electrones provenientes de la oxidación del agua y que serán captados por el último aceptor, NADP^+ , para dar NADPH . El ATP es sintetizado en un proceso acoplado a este flujo electrónico fotoinducido.

¿Cómo se produce este flujo de electrones?, Para contestar esta pregunta, es necesario hablar de los eventos primarios en la absorción de la luz por las plantas verdes.

A, Absorción de la Luz.

La fusión termonuclear en el sol produce un continuo espectro de radiación, desde el ultravioleta, pasando por el visible hasta el infrarrojo. Este es el espectro clásico de un cuerpo caliente que tiene una temperatura en su superficie de 6000°C . Esta radiación es absorbida por los pigmentos de las plantas. Cuando la luz es absorbida por la materia, cada quantum es tomado por un átomo individual o molécula y la energía total del quantum es transmitida a él. El átomo o molécula que absorbió el quantum se "excita", i.e., cambia de su estado normal de baja energía -máxima estabilidad- a un estado excitado rico en energía (fig. 4). De acuerdo a la teoría de la estructura atómica y molecular de Bohr, un átomo o molécula puede existir únicamente en una serie de

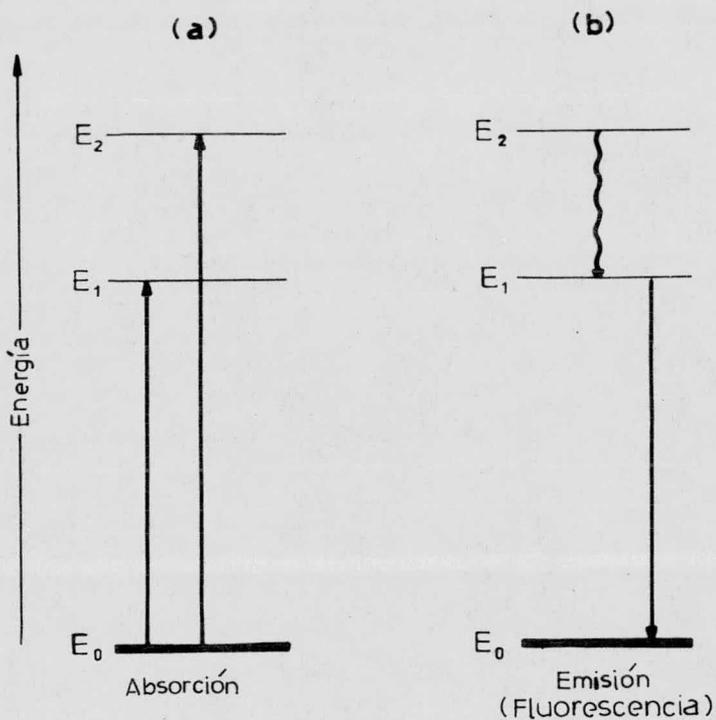


Fig. 4. Representación del estado basal (E_0), del átomo o molécula, en el cual existe, en la ausencia de una activación externa. Las líneas superiores (E_1 y E_2) representan estados de excitación electrónica -la única clase de estados excitados posibles en un átomo.

estados discretos de energía electrónica.

Solamente la luz absorbida puede excitar a las moléculas, por esto examinaremos los pigmentos característicos de las células fotosintéticas que absorben la luz.

a. Pigmento fotosintéticos

Los pigmentos fotosintéticos pueden ser clasificados en 3 grupos principales; clorofilas, carotenoides y ficobilinas (ver tabla I). La función de estos pigmentos es suministrar a la planta un sistema eficiente de absorción de luz a través del espectro visible. Esta energía es entonces transferida a los centros de reacción donde es utilizada para las reacciones fotoquímicas. El conjunto de pigmentos involucrados en la absorción de luz (y transferencia de energía) se conocen como pigmentos cosechadores de la luz.

i. Clorofilas

Hay dos clases de clorofilas en plantas superiores y algas verdes: clorofila a y clorofila b, (ver fig. 4 bis).

La clorofila a, es el pigmento más numeroso y está -- presente en todos los organismos fotosintéticos que producen oxígeno molecular. Se han postulado varias formas de clorofila a: clo a₆₆₀, clo a₆₇₀, clo a₆₈₀, clo a₆₈₅, clo a₆₉₀, - clo a₇₀₀₋₇₂₀. El subíndice indica la máxima absorción del -- rojo respectivamente (10). Las formas de clo a de corta longitud de onda son fluorescentes y están predominantemente en PS II. Las formas de longitud de onda larga, son débilmente fluorescentes y están presentes predominantemente en PS I.

La clorofila b, está presente en todas las plantas superiores y algas verdes. Su absorción en el rojo ocurre a --

TABLA I (11)

<u>Pigmento</u>	<u>Ocurrencia</u>	<u>Funciones</u>
<u>I Clorofilas</u>		
clorofila a	todas las plantas fotosintetizadoras (excepto bacterias)	cosechadora de luz, centro de reacción.
clorofila b	plantas superiores y algas verdes.	cosechadora de luz
<u>II Ficobilinas</u>		
ficocianinas	principalmente en algas verdes-azules, también algas rojas,	cosechadores de luz.
alloficocianina	algas rojas y verde-azules	cosechadores de luz,
ficoeritrina	principalmente en algas rojas, también en algas azul-verdes.	cosechadores de luz.
<u>III Carotenoides</u>		
α y β carotenos	α . En muchas hojas y ciertas algas, En algas rojas y un grupo de algas verdes (Siphonales). Es el caroteno que existe en mayor cantidad. β . Principal caroteno de las demás plantas	Principalmente como antioxidantes, cosechadores de luz en menor grado.
xantofilas	principal carotenol de hojas verdes, algas verdes y rojas	Sirven poco como cosechadores de luz, sufren un ciclo de oxigenación desoxigenación, la función del cual se desconoce.
luteína		
zeaxantina	segundo mayor carotenol de hojas	
violaxantina		

650 nm. Se piensa que existen dos formas: clo b_{640} y clo b_{650} . La mayor proporción de clorofila b está presente en PS II.

ii. Carotenoides

Son los pigmentos naranja y amarillo encontrados en casi todos los organismos fotosintéticos. Hay dos clases de carotenoides: a. Carotenos, de los cuales el β -caroteno es el (ver fig. 4 bis) más común, son hidrocarburos, absorben luz azul. b. Carotenoles, son alcoholes y son comunmente llamados xantofilas. Es aceptado generalmente, que la mayoría de los carotenos están presentes en PS I y xantofilas en PS II.

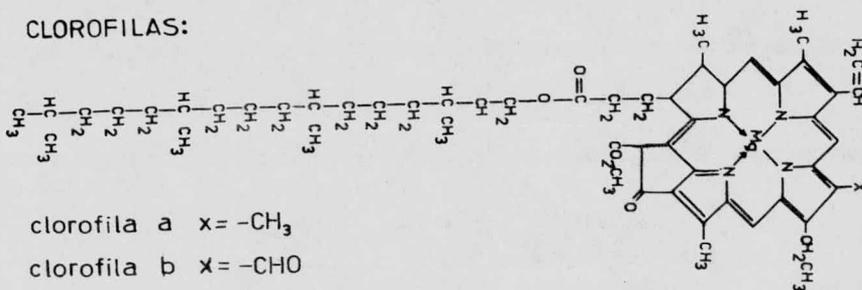
iii. Ficobilinas

Están presentes en algas rojas y azul-verdes, son tetrapirroles de cadena abierta. Hay dos clases de ficobilinas: a. Ficocianinas, las cuales predominan en algas azul-verdes y absorben a 630 nm. b. Ficoeritrinas, predominan en algas rojas y absorben por 540 nm. Las ficobilinas están asociadas principalmente con PS II, pero también están presentes en PS I. En la fig. 5 se puede ver un modelo de la composición de los dos sistemas pigmentarios en plantas verdes.

B. Transferencia de Energía

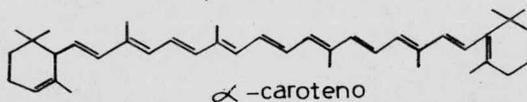
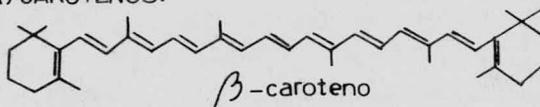
Una vez que los pigmentos han captado la energía radiante en forma de fotón. Esta energía se transmite a través de todos los pigmentos hasta llegar al centro de reacción, donde es convertida en energía química. La transferencia de energía puede ser de dos tipos,

CLOROFILAS:

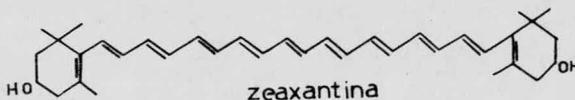
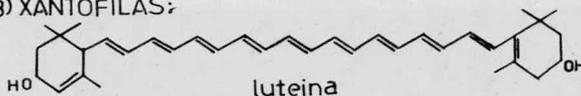


CAROTENOIDES:

A) CAROTENOS:



B) XANTOFILAS:



FICOBILINAS:

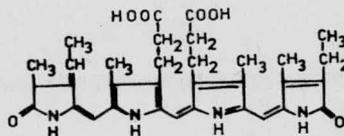
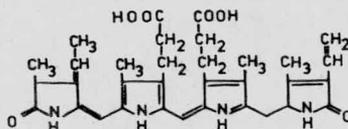


Fig. 4 bis. Estructura de los pigmentos fotosintéticos.

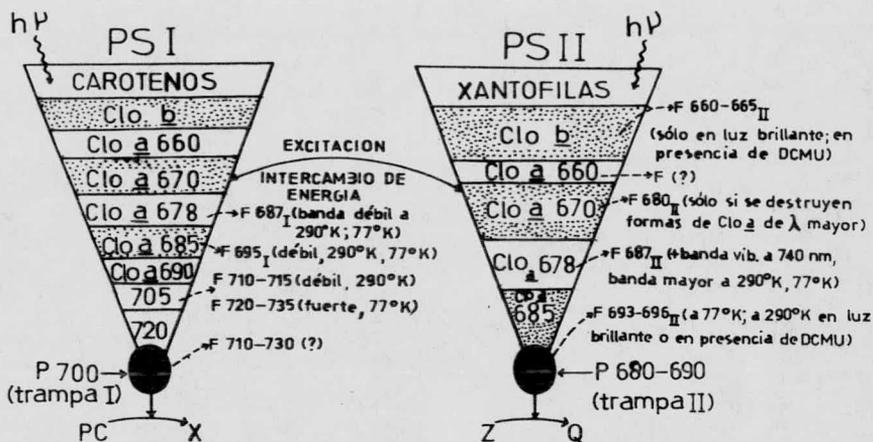


Fig. 5. Hipótesis de la distribución aproximada de los diferentes pigmentos en los dos fotosistemas pigmentarios en plantas verdes. El símbolo F seguido por los números se refiere a las bandas de emisión de la fluorescencia correspondientes. Las condiciones en las cuales se observaron estas bandas, están enlistadas entre paréntesis. Los números que siguen a la clorofila representan la absorción máxima aproximada en la porción roja del espectro. Como se muestra en la fig. 8, se asume que el PS I está localizado en la parte externa de la membrana del tilacoide, y el PS II en el lado interno, de tal manera que la transferencia de energía de excitación entre los dos fotosistemas es posible.

a. Transferencia heterogénea

La transferencia heterogénea involucra, la transferencia de la energía de excitación entre pigmentos de diferente clase -la energía absorbida por pigmentos de diferente clase a la clorofila, es siempre transferida a ésta última].

Se sabe que si una molécula absorbe a una determinada longitud de onda, fluoresce a una longitud de onda mayor. -- Así, la transferencia de energía heterogénea consiste en la yuxtaposición de la banda de fluorescencia del donador y la banda de absorción del aceptor, representada en la fig. 6.

b. Transferencia homogénea

La transferencia de energía de manera homogénea implica el proceso de migración de la energía de excitación a través de moléculas de la misma clase. En este caso la energía absorbida puede migrar de una molécula a otra como energía de excitación, i.e., puede llevarse a cabo por el proceso de migración de excitones. Un excitón consiste de un electrón "excitado" y una carga positiva o un hoyo -dejado por la transferencia del electrón al estado excitado. Este par se movería conjuntamente de una molécula a otra. El proceso de migración del excitón no implica separación de cargas.

c. Separación de cargas

Una vez que la energía alcanza el centro de reacción -presumiblemente un dímero de clorofila Fong[12] organizado de manera especial, con las clorofilas unidas a través de -- puentes de hidrógeno del agua [13]- es convertida en energía química, con la producción de un equivalente oxidante y otro reductor. Primero el centro de reacción alcanza el estado de

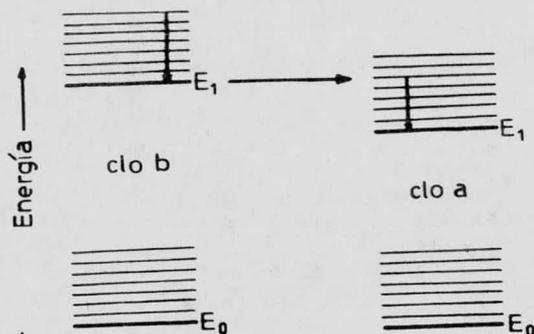


Fig. 6A. Diagrama de niveles de energía de clo b y clo a, indicándose porqué es posible la transferencia de energía desde el estado excitado más bajo de clo b a la clo a.

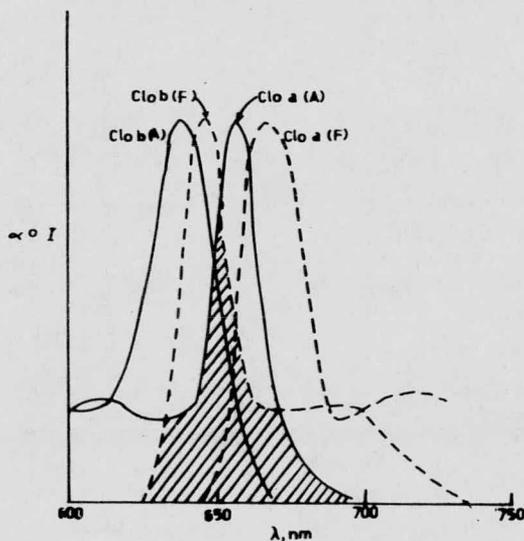


Fig. 6B. Yuxtaposición de la banda de absorción (A) de la clo a con la banda de fluorescencia - de clo b (F). La yuxtaposición se indica por la zona sombreada.

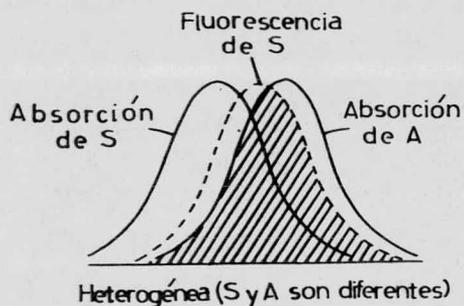
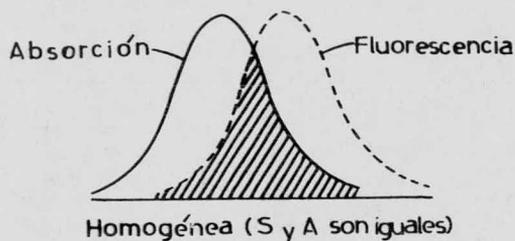


Fig. 6C. Yuxtaposición entre la banda de fluorescencia de un donador y la banda de absorción de un aceptor, del cual depende la eficiencia de la transferencia de energía "baja". La yuxtaposición se muestra por el área sombreada. Es mayor cuando el donador y el aceptor son diferentes (transferencia heterogénea, en las curvas inferiores) que cuando son iguales (transferencia homogénea, en las curvas superiores).

singulete excitado. Inmediatamente después de este evento, el aceptor primario de electrones se reduce y el centro de reacción se encuentra oxidado, el cual posteriormente recibe un electrón del donador primario de electrones. Así, el centro de reacción vuelve a su estado original, pero el donador primario de electrones y el aceptor están oxidado y reducido respectivamente (ver fig. 7).

IV. EVENTOS SECUNDARIOS DE LA FOTOSINTESIS EN LA LUZ

Una vez que se ha realizado la separación de cargas, i.e., que la energía de oxido-reducción o eléctrica, suceden los eventos secundarios, como es el transporte de electrones desde el agua al NADP^+ .

A. Transporte de Electrones a Traves de la Cadena - Fotosintética

De acuerdo al modelo propuesto por Hill y Bendall -- [14], la fotorreacción II oxida al agua para liberar oxígeno, y reduce a Q, mientras que la fotorreacción I reduce un aceptor electrónico de bajo potencial (X) y oxida a P700. Recientemente se ha sugerido que Q puede ser equivalente -- a un componente que produce un cambio de absorbancia a --- 500 nm. descrito como C550 [15], y similarmente X, a un componente descrito como P430 [16]. P700 oxidado es reducido por el componente o reducido, vía las reacciones exergónicas del transporte de electrones, que están acopladas a la fosforilación no cíclica del ADP. Se cree que los acarreadores que catalizan el transporte de electrones son Cit b_{559} -bajo potencial, PQ, Cit f y PC, en ese orden [27]. BBh_{me} y Cramer [18] demostraron que hay un sitio de fosforilación entre PQ y Cit f. El aceptor electrónico de bajo potencial

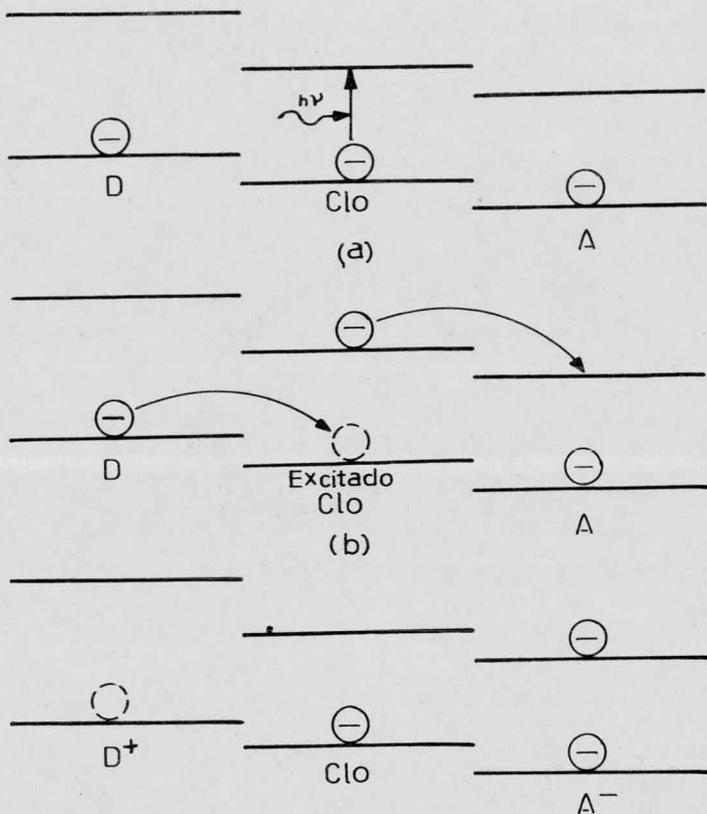


Fig. 7. Separación de cargas. La clorofila (clo) puede mediar la transferencia fotoquímica de un electrón, desde una molécula donadora D hasta un aceptor A, dando lugar al donador oxidado D^+ y al aceptor reducido A^- .

[X] para PS I, puede reducir el NADP^+ , vía FRS -sustancia reductora de la ferredoxina- y ferredoxina, entrando el NADPH al ciclo de fijación del carbono, o puede regresar su electrón de X^- a un acarreador intermedio -probablemente vía Cit b_6 . En el último caso, el transporte de electrones traza un circuito cerrado, utilizando solo PS I, el cual se conoce como transporte de electrones cíclico y a la formación de ATP ---acompañante se le ha llamado fotofosforilación cíclica [19].

a. Componentes de la cadena de transporte electrónico.

Es importante para comprender mejor como se efectúa el transporte de electrones descrito, así como los procesos asociados que se describirán posteriormente, el conocer un poco más detalladamente cada uno de los componentes de la cadena - a través de la cual fluyen los equivalentes reductores, así, como su localización espacial en la membrana del tilacoide.

i. NADP^+ .

Es el aceptor electrónico final en el proceso de transporte electrónico fotosintético. La especificidad para NADP^+ más que para NAD^+ está dada por la ferredoxin- NADP^+ -reductasa, la cual se ha demostrado es específica para NADP^+ , aunque en algunas condiciones [20] (NAD^+ puede servir como un aceptor - final eficiente.

ii. Fd- NADP^+ -reductasa

Es una flavoproteína que contiene FAD^+ . La enzima es - específica para sus donadores electrónicos -Fd o NADPH- pero no específica para sus aceptores, que pueden ser colorantes - -ferricianuro, DCIP-, cit b_6 , PC, NADP^+ y Fd. Las principales evidencias de la posición de Fd- NADP^+ -reductasa mencionada - en la fig. 8, son: a. Su requerimiento para la reducción de NADP^+ [21]. b. La velocidad de su fotoreducción por cloro-

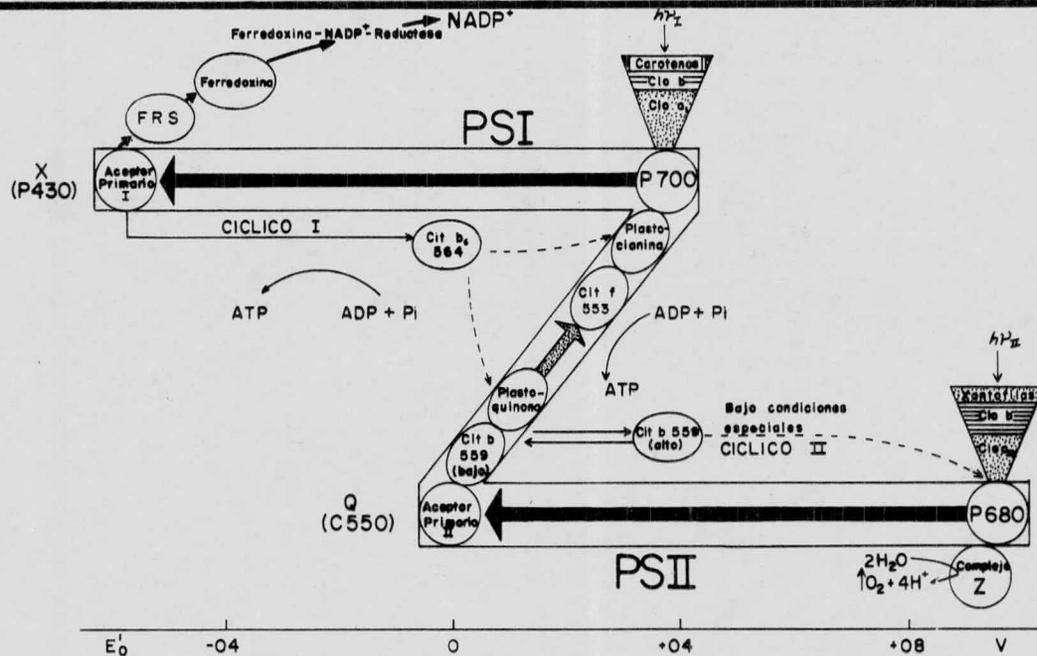


Fig. 8. Esquema Z para el flujo de electrones en la fotosíntesis. Las dos flechas, gruesas, negras, horizontales, representan las dos reacciones luminosas; todas las otras son reacciones en la oscuridad. El flujo de electrones desde el agua hasta el $NADPH$ se designa como flujo electrónico "no cíclico", y desde el aceptor primario del sistema pigmentario I -PS I- a los intermediarios entre los fotosistemas -plastoquinona o plastocianina- como "cíclico I". Un flujo cíclico similar de electrones involucrando solamente el sistema pigmentario II -PS II- puede existir también y podría designarse como "cíclico II".

plastos aislados, es linealmente dependiente de la cantidad de Fd reducida por el NADP^+ en preparaciones de cloroplastos es completamente inhibida por la adición de un anticuerpo -- contra la flavoproteína [22]. Ultimamente se ha visto que la enzima forma un complejo 1:1 con la Fd [23].

iii. Ferredoxina -Fd- [24]

Es una proteína con hierro y azufre con un bajo potencial redox $-E'_0 = -0.42 \text{ V}$. Las evidencias de su funcionamiento en la posición indicada son: a. Se requiere su adición para la reducción del NADP^+ , en cloroplastos a los que se les ha quitado. b. Es reducida en cloroplastos a los que se le ha extraído la Fd- NADP^+ -reductasa y funciona también en presencia de un exceso de anticuerpos contra la Fd- NADP^+ -reductasa, el cual inhibe completamente la reducción del NADP^+ .

iv. Sustancia reductora de la ferredoxina -FRS [25].

Hay múltiples evidencias indirectas de la existencia de una sustancia de bajo potencial, alrededor de -0.55 V . -- entre PS I y Fd. Cloroplastos extraídos de FRS muestran una capacidad disminuida para reducir NADP^+ en presencia de óptimas cantidades de Fd y de la reductasa [26]. La adición de -FRS restaura esta actividad. La actividad de un anticuerpo -- que reacciona entre PS I y Fd puede ser preneutralizada, reaccionándolo con preparaciones purificadas de FRS [27].

v. P700 [28].

Está constituido por un grupo de moléculas de clorofila situadas en un medio ambiente especial [12] y el cual es responsable del cambio del pico de absorción a 700 nm . Constituye cerca del 0.25% de la clorofila total de las hojas de

plantas superiores y se detecta por la disminución de la absorbancia a 700 nm al oxidarse. Tiene un potencial redox $E'_0 = + 0.43 \text{ V}$, es oxidado por la luz que afecta a PS I y reducido por la luz que afecta a PS II. La fotooxidación se efectúa aún a la temperatura del nitrógeno líquido ($- 189^\circ \text{ C}$). -- Cuando se excita por un flash muy intenso de corta duración, es la reacción más rápida observable en PS I. Por lo tanto se asume generalmente que ocupa la posición de donador electrónico primario para PS I.

vi. Plastocianina -PC [29].

Es una proteína con cobre. Está presente en una concentración de cerca de 0.2 % de la clorofila total, tiene un potencial redox $E'_0 = + 0.37 \text{ V}$ y es fácilmente fotoreducida por cloroplastos aislados. Su sitio de acción representa todavía una controversia. La mayoría de los investigadores la colocan en la posición indicada en la fig. 8. Esto está basado en mutantes específicos carentes de PC, los cuales no pueden fotooxidar al cit f, pero si fotoreducirlo, restaurándose esta actividad al añadir PC exógena. Sin embargo Knaff -no publicado- ha demostrado que en este sistema la fotoreducción de cit f se acelera al añadir PC. Estos datos son difíciles de conciliar con el esquema propuesto, pero se siente que en general las evidencias apoyan la posición indicada.

vii. Cit f.

Tiene un potencial redox $E'_0 = + 0.365$ y está en una concentración de 0.25 % de la clorofila total. Fue el primer componente que se localizó claramente entre los dos fotosistemas [30]. Su localización precisa está dada por los datos descritos en la localización de PC, y lo sitúan precedien

dola. Estudios con inhibidores indican que está localizado - más alla del sitio de acción de DCMU y DBMIB [18].

viii. Plastoquinona -PQ.

Su posición entre los dos fotosistemas se ha determinado al observarse que se oxida al iluminar con luz que afecta al PS I y se reduce al iluminar con luz que afecta a PS II. Es el único componente presente en cantidad suficiente - 5 a 10 % de la clorofila total- para aceptar el gran charco de -- aceptores electrónicos cinéticamente observado entre los foto sistemas y cerca del PS II. Su localización exacta está basa da principalmente en los datos de Böhme y Cramer [31] quienes mostraron que DBMIB, un análogo de la PQ inhibe la oxidación de cit b559 por PS I, pero no su reducción por PS II.

ix. Otros citocromos.

Se han descrito otros tres citocromos en el transporte de electrones fotosintético, pero su posición no está claramente definida aún [32]. Estos son: cit b559 en sus dos for mas de altos y bajo potencial $-E'_0 = + 0.37$ y $E'_0 = + 0.06$ V -- respectivamente. Notablemente la adición de FCCP convierte - al naturalmente más abundante cit de alto potencial en el de bajo. Cuando está en su forma de bajo potencial se comporta como si estuviera colocado entre los dos fotosistemas en la - posición indicada en la fig. 8, pero en su estado natural su posición es incierta -podría estar formando un ciclo alrede- dor de PS II.

El cit b563 es el citocromo de potencial más bajo en - el material fotosintético $-E'_0 = - 0.18$ V. Su función es in- -- cierta y se piensa que pueda estar involucrado en el flujo -- electrónico cíclico alrededor de PS I.

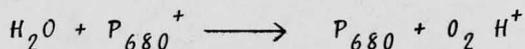
x. Q. C₅₅₀.

Se han asociado cambios en la fluorescencia de la clorofila con el estado de oxidación o reducción del aceptor primario de electrones de PS II, llamado Q con $E'_0 = -0.035$ V. Se reduce por excitación de PS II y se oxida por excitación de PS I. Su oxidación pero no su reducción es inhibida por DCMU. Evidencias recientes indican una posible identidad entre Q y un compuesto C₅₅₀, el cual, muestra un cambio de absorción a 550 nm [33].

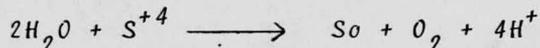
b. Evolución del oxígeno.

La evolución del oxígeno no está aún muy bien aclarada. Un componente Z desconocido es el donador primario de electrones. Z está unido con la oxidación del agua a través de uno o varios pasos. La naturaleza de Z y de los otros componentes involucrados no se conoce. Se sabe que los iones Mn^{2+} , $NaHCO_3^-$ y Cl^- están de alguna manera relacionados con la producción de oxígeno molecular proveniente de la oxidación del agua. También está implicada una proteína -enzima-, pero no ha podido ser aislada ni purificada.

En la actualidad se sabe que la regeneración de clorofila P₆₈₀ neutral -sistema oxidante del agua-



no ocurre por un proceso de un quantum. Cuatro quanta son convertidos a cuatro equivalentes oxidantes S^{+4} , los cuales son acumulados, hasta que actúan sobre dos moléculas de agua,



Kok y col. [34] mostraron que se acumulan cuatro reacciones

de Ésta, siempre y cuando sea una vesícula cerrada. De esta manera se ha logrado precipitar cloroplastos con anticuerpos preparados contra Fd-NADP⁺-reductasa o contra la ferredoxina. Con anticuerpos preparados contra PS I -fragmentos obtenidos con desoxicolato [35]- y PS II, se encontró que los primeros inhibían la actividad de PS I, mientras que los segundos no lo hacían con la actividad de PS II. Se concluyó por lo tanto que el PS I está accesible en el sistema lamelar y se tomó su resultado como prueba para el modelo binario de Arnzen, Dilley y Crane [36] para la estructura de la membrana del tilacoide, el cual, visualiza las partículas de PS I -localizadas en la mitad externa de esta membrana tilacoidal, en la parte superior de las partículas de PS II localizadas - en la mitad interna.

Dilley recientemente reforzó el modelo usando ácido --p-(diazonium)-bencen sulfónico (DABS) [37] marcado; el com---puesto no puede penetrar la membrana y por lo tanto marcará -únicamente grupos reactivos localizados en el exterior de la membrana. Después de marcar con DABS el autor fraccionó las membranas en partículas de PS I y PS II y obtuvo principalmente partículas de PS I marcadas con DABS.

Witt [38] fue el primero en producir evidencias acerca de la localización del sitio donador de electrones para PS II en la membrana. Encontró que los centros de reacción de ambos fotosistemas producen una separación de cargas a través de la membrana después de iluminarse, con la carga positiva hacia - el interior y la carga negativa hacia el exterior de la mem--brana -cada fotosistema contribuía con la mitad del campo eléctrico generado. Esto indica que el sitio donador y aceptor - de PS I deberían estar localizados en diferentes lados de la membrana, con el sitio donador dentro o hacia el interior de

la membrana. Estos experimentos se reforzaron con los resultados obtenidos por Hauska [39] con anticuerpos contra plastocianina y Cit f, no obteniéndose aglutinación de los cloro--plastos, ni inhibición de las fotorreacciones (transporte de electrones y fotofosforilación). Hauska probó también donadores artificiales como DCIPH₂/Asc, PMS, piocianina, y encontró que los sulfoderivados de estos, i.e., sulfo DCIPH₂/Asc, sulfo PMS y sulfopiocianina, no funcionaban como tales, a diferencia de los primeros, interpretándose esto como indicio de que el sitio donador de PS I no es accesible a compuestos hidrofílicos polares. Todos estos datos son difíciles de reconciliar con los resultados obtenidos con polilisina, la cual inhibe el transporte de electrones aparentemente a nivel de plastocianina. Dilley et al, usaron DABS³², pudiendo marcar bajo ciertas condiciones PC, indicando que esta cerca de la superficie.

En cuanto se refiere a la localización del sitio aceptor electrónico de PS II todo parece indicar que se encuentra orientado hacia el exterior de la membrana, si tomamos en cuenta las siguientes evidencias: anticuerpos contra clorofila a y plastoquinona reaccionan con PS II y PQ respectivamente en un 50 % aproximadamente, lo que parece indicar que están hacia el exterior aunque en pequeño grado, esto está apoyado también por la separación de cargas en la membrana, igual que en PS I. También se ha demostrado la accesibilidad de b₅₅₉ al reducir al ferricianuro fácilmente. Reinwal demostró [40] que la bien conocida bomba de protones del cloroplasto se debe al conjunto de plastoquinonas en la cadena de transporte de electrones. Los protones son tomados del exterior durante la reducción de PQ por PS II y en la oxidación de la plastohidroquinona (PQH₂) por PS I, los protones son liberados en el interior. Esto indica que el par PQ/PQH₂ atraviesa la membrana. También se ha observado un requerimiento de lipofilicidad para -

los aceptores electrónicos artificiales de PS II, lo cual nos indica que el sitio aceptor está sumergido en la región lipofílica de la membrana,

La localización del sitio donador para PS II es la más controvertida. Existen evidencias de que se encuentra expuesto hacia la parte externa de la membrana, la primera de ellas está basada en estudios con anticuerpos contra partículas de PS II, los cuales inhiben la fotólisis del agua [41]. Se ha marcado también con el reactivo no penetrante, DABS, obteniéndose un aumento de cuatro veces la marca cuando la membrana está iluminada, lo cual indica que esta membrana está sufriendo un cambio conformacional inducido por la luz, lo que provoca la exposición del sistema de oxidación del agua, ya que no inhibe el flujo a partir de difenilcarbazida como donador. El tratamiento con tripsina también inhibe la oxidación del agua. Sin embargo, hay otra serie de evidencias que parecen indicar que se encuentra hacia el lado interno de la membrana, como son, la ya discutida separación de cargas a través de la membrana. Junge [42] ha suministrado evidencias más directas de que la reacción de oxidación del agua, libera protones al interior de la membrana.

Tomando en cuenta las evidencias existentes hasta el momento, el esquema más adecuado parece ser el propuesto por Witt [43], en el cual se describe a los fotosistemas haciendo un zigzag en la membrana, con el transporte de electrones a través de ésta, teniendo el sitio aceptor de fotosistema I y fotosistema II hacia afuera y el lado donador de ambos fotosistemas hacia adentro (fig. 9).

En las figs. 10, 11 y 12 podemos ver el transporte de electrones propuesto [43] para PS II, y transporte electróni

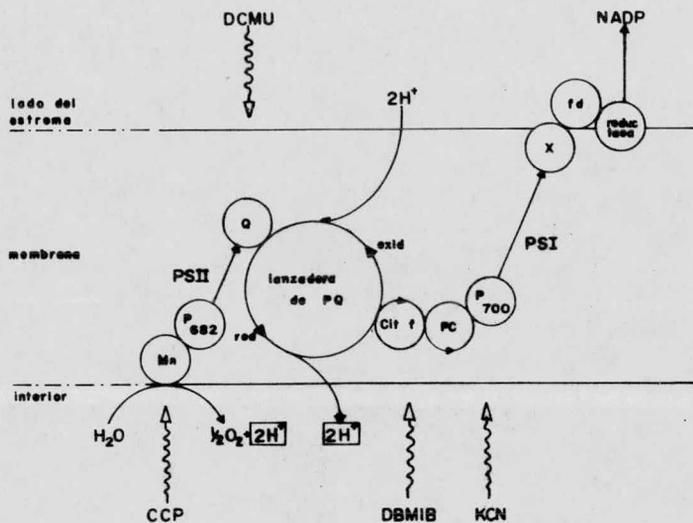


Fig. 9. Flujo electrónico fotosintético desde el agua hasta el NADP⁺ en zigzag a través de la membrana. Se indican también los dos puntos donde se liberan protones hacia el interior del tilacoide, así como el sitio de acción de algunos inhibidores del transporte electrónico.

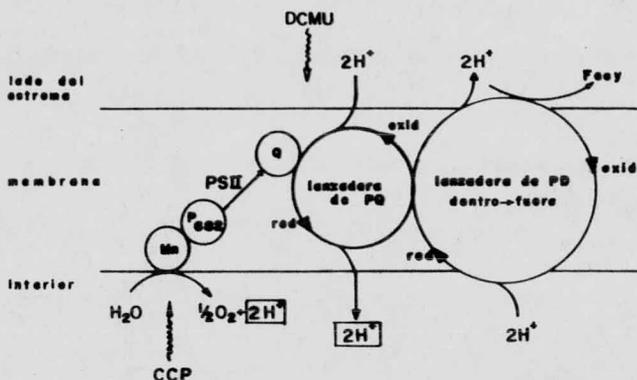


Fig. 10. Flujo de electrones fotosintético desde el agua hasta un aceptor (ferricianuro), en una reducción de fotosistema II vía una lanzadera de fenilendiamina.

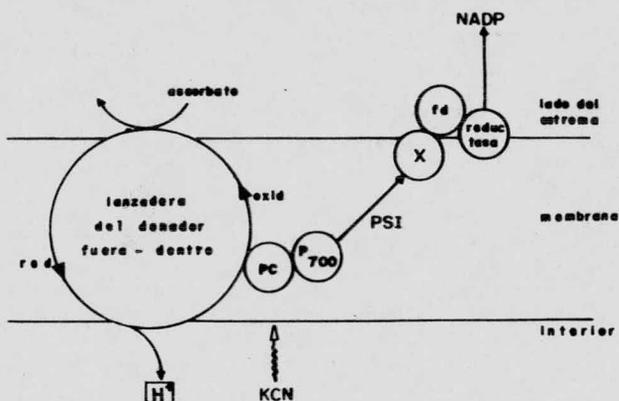


Fig. 11. Flujo de electrones fotosintético en una fotorreducción a expensas de un donador electrónico (ascorbato), vía lanzadera de un donador -el cual puede ser DCIP-, liberando protones al interior al oxidarse.

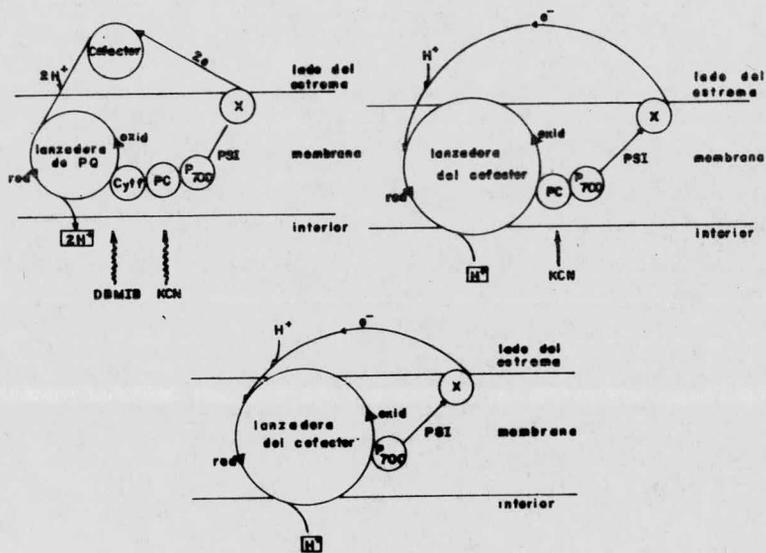


Fig. 12. Esquemas de tres diferentes caminos del flujo de electrones cíclico alrededor de fotosistema I. Se indican tanto el sitio nativo de conservación de la energía (lanzadera de plastoquinona), así como los puntos de acción de algunos inhibidores.

co cíclico respectivamente, cuando se emplean donadores y -- aceptores artificiales; indicándose los sitios de conserva-- ción de la energía.

B. Fotofosforilación

Al ver las membranas de los tilacoides de cloroplastos de plantas superiores al microscopio electrónico -por tinción negativa- se han observado en la superficie o fase externa, - pequeñas partículas (Fig. 13), las cuales fueron estudiadas - posteriormente por Moudrianakis [44], el cual, efectuó ensa-- yos correlativos enzimáticos y estructurales de estas partí-- culas unidas a la superficie, encontrando que dichas partícu-- las están usualmente distribuidas al azar, pero ocasionalmen-- te aparecen en arreglos paracrystalinos con una periodicidad de $150 \times 180 \text{ \AA}$. Para identificar la actividad enzimática de las partículas unidas a la superficie, Howell y Moudrianakis analizaron el sobrenadante de las soluciones después de un -- lavado secuencial con agua y EDTA diluido, de las membranas - lamelares aisladas. Demostraron que partículas de 120 \AA con estructura cuboide son liberadas de los tilacoides al lavar - con agua. La fracción que contenía estas partículas tenía una alta actividad específica para RuDPcarboxilasa. El tratamien-- to de las membranas lavadas con agua, con una solución diluí-- da de EDTA, liberaban un segundo tipo de partículas, las cua-- les tenían una actividad de ATPasa dependiente de Ca^{2+} y pa-- recía ser un polígono de 5-6 lados de 100 \AA de diámetro en -- las micrografías electrónicas. Los fragmentos lamelares des-- pués de lavar con agua y EDTA diluido aparecían lisas a la -- tinción negativa.

Se piensa que las partículas removidas al lavar con -- EDTA sea el factor de acoplamiento descrito por McCarty y -- Racker [45] el cual se sugirió que catalizaba el paso termi-- nal en el proceso de acoplamiento de energía, el cual forma -

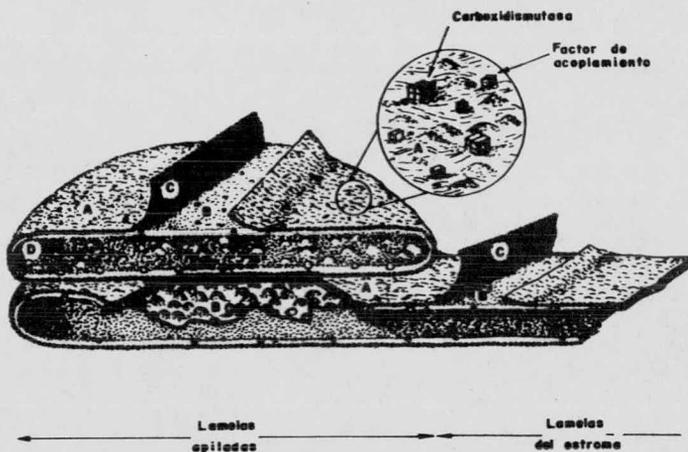


Fig. 13. Representación esquemática de dos tilacoides apilados y una porción unida de la lamela del estroma. La subestructura particular interna de la membrana está marcada con letras para corresponder al esquema descrito en la fig. 8. Debe notarse que las subunidades grandes de la membrana vistas en la cara de la fractura B únicamente se encuentran en la región de partición de los grana. En la cara B' de la lamela del estroma se encuentran partículas más pequeñas, así como en el final de las membranas del grana. En esta figura se enfatiza la naturaleza binaria de la membrana del cloroplasto representando a las partículas pequeñas (cara C) en la mitad externa, y las partículas mayores (cara B) en la mitad interna de una membrana asimétrica. La estructura irregular de la superficie del lado interno (loculus) de la membrana del tilacoide se muestra en la superficie D.

ATP. Este concepto está de acuerdo con la observación que la pérdida de las partículas de la superficie en preparaciones de EDTA estaba ligada a una pérdida en la capacidad de las -- membranas para catalizar la fotofosforilación. Se debe enfatizar que las partículas unidas a la superficie en la lamela de los cloroplastos, no participa en las actividades del --- transporte de electrones, ya que las membranas lavadas con -- EDTA, aún efectúan la reacción de Hill con colorantes o NADP^+ como aceptores finales.

- a. Acoplamiento entre la fotofosforilación y el transporte de electrones.

Como he mencionado con anterioridad, acoplada al transporte de electrones está la síntesis de ATP. Ahora bien, el mecanismo por el cual un flujo electrónico puede dar lugar a la formación de una molécula de alto nivel energético, representa uno de los problemas teóricos y experimentales más interesantes en la bioquímica actual.

Hasta este momento son tres principalmente las hipótesis que tratan de explicar el acoplamiento de estos dos procesos, además de relacionar otros efectos observados como son - el transporte de protones y de otros iones como el potasio.

Cualquier teoría válida tiene que explicar un cierto número de características necesarias para las partículas sinтетизantes de ATP:

1. Solamente las vesículas cerradas son capaces de - sintetizar ATP a partir de ADP y P_i .
2. El transporte de electrones está acoplado a la fosforilación, i.e., no hay formación de ATP a menos que ocurra flujo de electrones simultáneamente -un precepto violado áni

camente al crear un gradiente artificial de iones [46]. Vice versa, no habrá transporte de electrones, a menos que se sintetize al mismo tiempo ATP, cuando los cloroplastos están perfectamente acoplados; un transporte de electrones "basal" -- ocurre a velocidades entre 1/2 y 1/4 de las que se observan -- cuando se agrega ADP y Pi, con las consecuentes relaciones -- control -- la relación del transporte de electrones durante la fotofosforilación activa, a la velocidad más baja observada -- después de que la síntesis de ATP se detiene -- de 2 a 3.5. Con el mejoramiento en el método de aislamiento se han obtenido -- valores hasta de 6.

3. Ocurre una violación del párrafo dos, en presencia de "desacoplantes" químicos. La velocidad del transporte de electrones se acelera a velocidades tan rápidas o más rápidas que las que se observan durante la fosforilación. Además se anula la síntesis de ATP.

Así, las hipótesis que tratan de explicar el acoplamiento son:

i. Hipótesis Química,

Fue el primer mecanismo de fosforilación que se propuso --por Slater [47]-- e involucra un enlace covalente entre un transportador electrónico y alguna otra entidad. Esta hipótesis se puede sumarizar en una de sus muchas formas por las -- cinco ecuaciones descritas en la Fig. 14, en las cuales A, B y C son transportadores electrónicos -- A puede ser Q; B puede ser PQ y finalmente C puede ser Cit f -- con transporte de electrones desde A hasta C con liberación de energía. El truco -- está en decir primero que la forma reducida de B se acompleja fácil y reversiblemente con algún otro componente (una enzima que podría ser CF₁) aquí llamado I; y que BH₂ libre no es el

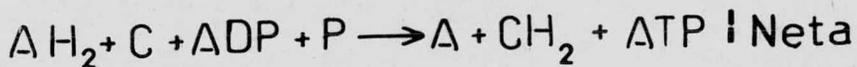
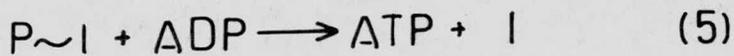
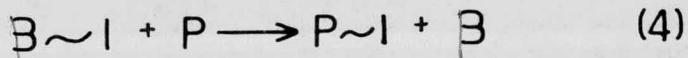
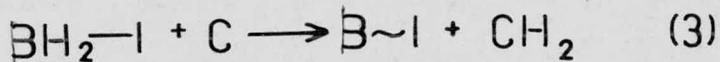
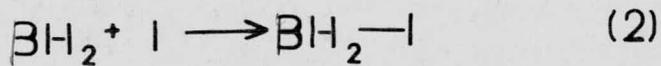
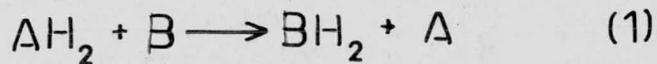


Fig. 14. Pasos secuenciales que representan la hipótesis química del acoplamiento energético en la fosforilación fotosintética.

verdadero donador de electrones a C, sino que solamente el complejo BH_2-I puede ejecutar esa reacción. Una vez que el complejo BH_2-I a perdido sus electrones, la unión entre B oxidado e I, es una unión que está al nivel de alta energía. Ya que se ha formado la unión de alta energía inicial, el usarlo para efectuar la fosforilación del ADP puede ser una simple transferencia de la unión, quizá secuencialmente como se muestra en la fig. 14, o tal vez en una reacción concertada.

La hipótesis explica el acoplamiento ya que una segunda serie de reacciones necesitaría -para los pasos 1 y 2- B libre e I libre respectivamente. Mientras el complejo Box I sea estable en el organelo, no podrá existir más flujo de electrones hasta que el ADP y Pi se combinen para dar ATP, liberando los requeridos B e I. Los desacoplantes serían aquellos compuestos que actuaran causando la hidrólisis de uno o más de los intermediarios de alta energía, liberando así B e I sin la necesidad de una reacción de fosforilación neta.

Mientras que esta hipótesis pareció lógica e inevitable durante bastante tiempo, no se han encontrado evidencias recientes que la refuerzen -especialmente no se ha encontrado el intermediario de alta energía constituido por un transportador electrónico y una "enzima acoplante". La única excepción es el complejo de alta energía DPN-enzima demostrada y aislada por Pinchot a partir de partículas fosforilantes de *Alcaligenes fecalis* [48]. No se han encontrado entidades de este tipo en partículas fosforilantes fotosintéticas, pero también hay que tomar en cuenta que los esfuerzos en este campo han sido mucho menores que los dedicados a las partículas respiratorias. Mientras que la secuencia proyectada de

eventos es bastante satisfactoria desde el punto de vista -- bioquímico, tiene también la gran deficiencia de que tiende a pasar por alto la necesidad de una membrana intacta y topo lógicamente completa, la cual, puede mostrarse experimentalmente.

ii. Hipótesis quimiosmótica

Esta es una hipótesis alternativa, bastante diferente en el planteamiento y más dependiente de la existencia de -- membranas intactas. Fue desarrollada por Mitchell en 1961 [49]. Se deriva de consideraciones de la fisiología de las membranas en adición a la bioquímica tradicional, y enfatiza la importancia de las reacciones vectoriales, provocando -- transferencia de protones a través de la membrana. Esta hipótesis puede ser descrita en cinco postulados mayores:

1. Las reacciones principales ocurren en una membrana impermeable o casi impermeable a protones [o iones hidroxilo], la cual encierra un espacio interno. Ya que partículas de -- cloroplasto sin la doble membrana externa, efectúan la fosforilación, se asume que el espacio interno importante es el de los tilacoides [loculus], el cual permanece intacto bajo la -- mayoría de las condiciones.

2. La membrana contiene los transportadores de electrones. El flujo de electrones de un acarreador a otro tiene que estar obligadamente acoplado al transporte vectorial de -- iones hidrógeno, en el caso de los cloroplastos desde el exterior al interior. El flujo de equivalentes reductores alterna de un acarreador de electrones (como los citocromos) a un acarreador de hidrógenos (como la plastoquinona) y otra -- vez al primero. Las reacciones secuenciales tienen que ocurrir en lados opuestos de la membrana con una geometría restringida dada por la orientación transversal específica de --

los acarreadores de electrones y de sus hidrógenos. Cuando los equivalentes reductores ven de un acarreador de electrones a uno de hidrógenos, los protones son tomados del medio externo de la partícula fosforilante, y cuando estos equivalentes reductores regresan a otro transportador de electrones, los protones ahora innecesarios serán liberados al espacio interior -el truco es tener el sistema arreglado de tal manera que los protones puedan únicamente obtenidos del exterior y puedan sólo ser liberados al medio interno. El efecto neto acopla el flujo de equivalentes reductores a través de la membrana a la translocación de iones hidrógeno desde el exterior hasta el interior [ver fig. 15],

3. Este flujo neto de iones H^+ a través de la membrana produce dos cosas: a. Hace que el interior sea más ácido que el exterior -i.e., crea un gradiente de pH- y también logra que el interior sea más eléctricamente positivo. Para prevenir la construcción de una diferencia de carga eléctrica excesiva, debe existir una forma -ya sea por libre difusión- de otros iones o por medio de acarreadores específicos- para que otros cationes sean expulsados de la vesícula, o que otros aniones entren al mismo tiempo. El movimiento de otros aniones es por naturaleza electroforético. De acuerdo a la medida de este transporte de iones será la diferencia de potencial eléctrico que se construya.

4. La combinación de la diferencia en la concentración de iones hidrógeno (ΔpH) y la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana ($\Delta \Psi$) se designa como "fuerza protonmotiva" o diferencia de potencial electroquímico de protones ($\Delta \mu_H$). En unidades eléctricas, la fuerza protonmotiva se expresa.

$$\Delta \mu_H = \Delta \Psi + \frac{RT}{F} (\Delta pH)$$

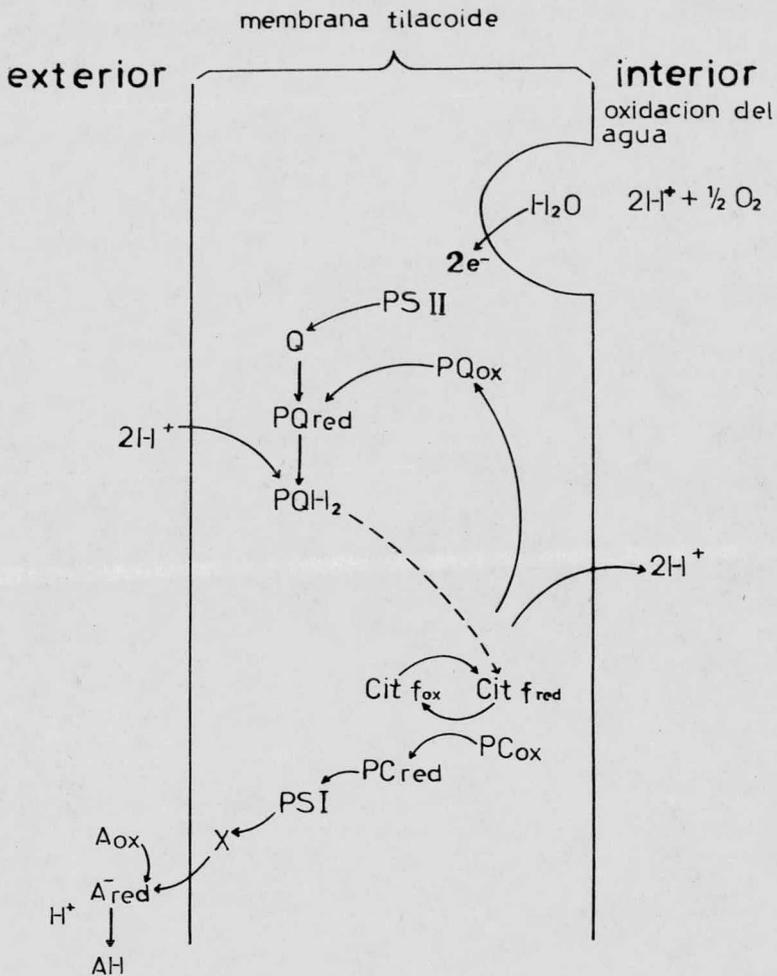


Fig. 15. Acoplamiento entre el flujo de equivalentes reductores a través de la membrana, con la translocación de iones hidrógeno desde el exterior hasta el interior en la hipótesis quimiosmótica del acoplamiento energético en la - fotofosforilación.

en donde $\Delta\mu_H$ está expresada en milivoltio; R y T son la constante de los gases y la temperatura absoluta, y \mathcal{F} es la constante de Faraday. Esta es la fuerza directa que maneja la síntesis de ATP, i.e., el intermediario acoplante.

5. La fuerza protonmotiva actúa para formar ATP vía una enzima anisotrópica unida a la membrana sintetizando ATP en la dirección indicada y actuando como ATPasa en la dirección contraria, i.e., es una ATPsintetasa reversible cuyas actividades son estrictamente vectoriales.

La fig. 16 es un diagrama de una de las formas más simplificadas en que Mitchell ha propuesto el modelo de acción de esta enzima, trabajando como una ATPasa. La porción OH^- del agua necesaria del agua para hidrolizar ATP actualmente la parte crucial de la reacción de alguna manera desconocida debe obtenerse estrictamente del lado interno de la vesícula, y el protón desde el lado externo. Así el efecto neto es la translocación de un ion hidrógeno hacia el interior simultáneamente que un ATP es escindido en ADP y P_i . Con modificaciones apropiadas se puede diagramar un modelo todavía simple, el cual translocará dos protones hacia el interior por cada ATP hidrolizado (ver fig. 17). Así, la consecuencia de la hidrólisis de ATP es una elevación en la fuerza protonmotiva interna de la vesícula elevando el estado energético del sistema, de igual manera a como lo hace el transporte de electrones. La síntesis de ATP ocurriría en este modelo, por una regresión directa de todos los pasos diagramados en la fig. 16, incluyendo la dirección invertida del movimiento de protones e hidroxilos. Así, una condición existente de una alta acidez interna y carga eléctrica positiva, i.e., una fuerza protonmotiva elevada, jalaría la síntesis de ATP al reformar agua cuando se combinaran con los -

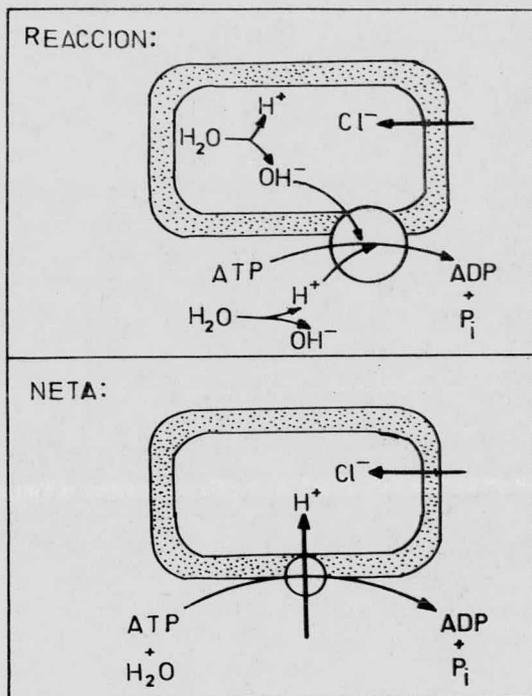


Fig. 16. Mecanismo de acción de una ATPasa vectorial unida a la membrana, de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica. El rectángulo grande representa la membrana de la vesícula y el círculo pequeño a la ATPasa. El cuadro superior representa la presumida reacción, en la cual, los componentes del agua se mueven vectorialmente desde lados opuestos de la membrana para ser usados en la hidrólisis del ATP. El cuadro inferior indica la reacción neta de un protón moviéndose hacia el interior por cada ATP hidrolizado. La síntesis de ATP se llevaría a cabo si seguimos la inversa de todas las flechas, incluyendo las de translocación de protones, liberándose estos protones del interior.

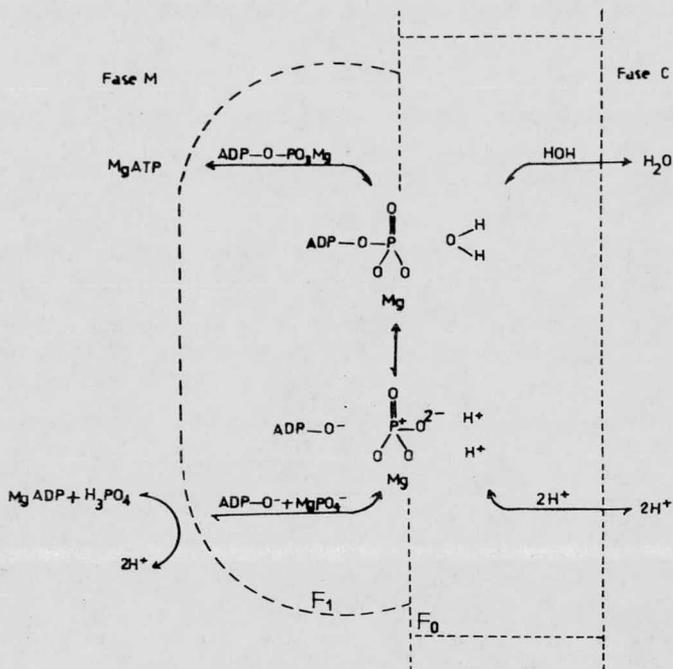
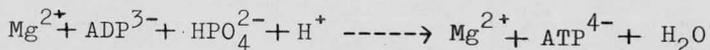


Fig. 17. Diagrama, el cual representa un posible mecanismo de la translocación de grupos O^{2-} para el sistema reversible protonmotivo de la ATPasa del cloroplasto. La dirección de las flechas (con doble barba) corresponde a la fosforilación del ADP protonmotivada. En este esquema se propone la reacción de translocación vectorial de $2 H^+$ y O^{2-} . La dimensión tiempo está crudamente representada alargando F_1 y F_0 en la dimensión vertical (el complejo ATPasa puede disociarse en dos componentes principales, una proteína hidrofílica llamada F_1 y un complejo de lipoproteínas hidrofóbicas llamada F_0 , que está integrada a la membrana). La característica fundamental de este esquema es que la entrada (reversible de dos protones) a través de la región conductora de protones de F_0 (desde la parte interna del tilacoide) hacia el centro activo de CF_1 , se piensa que -

está acoplada a la translocación reversible --
 del grupo O^{2-} de $ADPO^- MgPO_4$ desde el lado ex-
 terno del centro activo (parte exterior del ti-
lacoide) de la región de F_1 que une al sustra-
 to, ya que los dos protones atacan al $MgPO_4^-$ --
 desde el lado interno, mientras que el $ADPO^-$ a-
 taca al complejo transicional $MgPO_4^- -- MgPO_3^-$ en
 el centro activo, desde el lado externo, y el
 agua es expulsada hacia el lado interno. El --
 proceso se completa por la translocación de --
 $MgATP$ desde el centro activo en F_1 a través de
 la región que une al sustrato en el lado exter-
no. La reacción de deshidratación se escribe a
 pH 8.0:



iones hidroxilo removidos del ADP más P_i y transportado al interior.

El fenómeno de acoplamiento en esta hipótesis se explica por el hecho de que la translocación de protones es una parte obligada del transporte de electrones. Una vez que la actividad interna de protones ha alcanzado un nivel elevado, la reacción subsecuente tendiente a meter protones (i.e., el transporte de electrones continuado), tendría que luchar contra la fuerza protonmotiva existente. En esas condiciones, la síntesis de ATP, la cual transloca protones hacia el exterior, baja la fuerza protonmotiva y así permite que se lleve a cabo un transporte de electrones más rápido. Los desacoplantes en este sistema pueden trabajar aumentando la permeabilidad de la membrana a protones, lo que aboliría la fuerza proton motiva, o como se mencionó con anterioridad, catalizando la hidrólisis de un intermediario de alta energía.

La hipótesis quimiosmótica requiere una partícula relativamente impermeable y limitada, mientras que la hipótesis química ignora este requerimiento. Por otro lado la hipótesis química postula que la energía de la reacción del transporte de electrones se conserva primariamente en un enlace (probablemente covalente) químico, mientras que la hipótesis quimiosmótica pone un gradiente de iones como un estado obligado intermedio, el cual, separa el transporte de electrones de los pasos de unión química.

Las evidencias que apoyan esta hipótesis son bastante fuertes: a. Se sabe que hay un transporte de protones muy activo unido a la cadena de oxidorreducción [50] (ver fig. 18 a). Se ha medido también por medio de electrodos de respuesta rápida y flashes cortos e individuales [51] que los

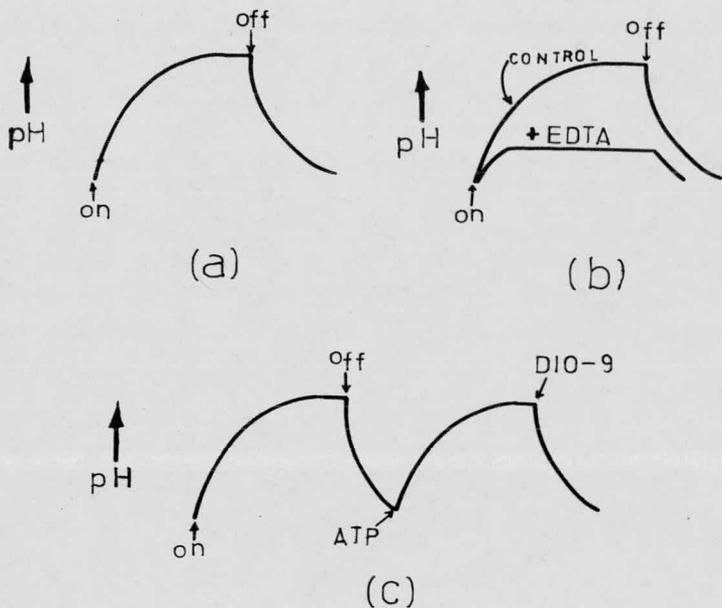


Fig. 18A. Bomba de protones observada al iluminar una suspensión de cloroplastos.
 B. Efecto observado sobre la bomba de protones al remover las partículas CF_1 con EDTA diluido de la membrana de los tilacoides.
 C. Efecto de la adición de ATP sobre el pH del medio (translocación de protones), con la subsecuente adición de un inhibidor de la transferencia de energía (síntesis de ATP).

protones provenientes de la oxidación del agua, se acumulan en el interior de la membrana.

b. ATPasa translocadora de H^+ : al quitar la ATPasa de la membrana con soluciones de EDTA diluido, ésta aumenta su permeabilidad a protones [52] (ver fig. 18 b) y el transporte de electrones se acelera.

c. Cuando la enzima actúa como ATPasa, mete H^+ dentro del tilacoide; esto se comprobó añadiendo ATP a la mezcla de reacción y midiendo el aumento en el pH externo [53] (ver fig. 18 c). El CF_1 debe haber sido activado por la luz.

d. Una transición ácido-base puede inducir la formación de ATP en la oscuridad, sin necesidad de transporte de electrones [54]. Se pusieron los cloroplastos a pH 4,0, se esperaron 20 seg. y rápidamente se llevó el pH a 8,0, se añadió ADP, Pi y Mg^{2+} y hubo síntesis de ATP. Todo lo anterior se realizó en el oscuridad -creándose por lo tanto un gradiente de protones artificial para la síntesis de ATP.

ii. Hipótesis mecanoquímica o conformacional o de fijación de cargas

Esta hipótesis está menos elaborada que las otras, -- como sugieren los tres nombres más o menos equivalentes que se le han dado. Postulada en su fase primaria por Boyer --- [55], propone que el transporte de electrones puede llevar a la localización de protones dentro de la membrana hidrofóbica, donde tenderán a combinarse con el agua removida del ADP y el Pi al sintetizarse el ATP, para formar iones hidronio, los cuales, a su tiempo son preferentemente expulsados de la membrana. El efecto neto sería el facilitar la reacción de deshidratación en las regiones hidrofóbicas de la membrana,

Dilley [56] también ha mencionado una concentración local de protones, y Straub [57] menciona evidencias de que el factor de acoplamiento (CF_1) por sí mismo debe de estar reducido y protonado para que la síntesis de ATP ocurra. Es fácil imaginar que tales distribuciones de carga en la membrana producirán cambios en los estados conformacionales de las proteínas embebidas en la membrana. Así, esta hipótesis coloca al "estado" energizado de la membrana transductora, por él mismo, como el intermediario entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP. La condición energética se debe a la disposición de diferentes concentraciones [de protones o -- electrones] dentro de la membrana, más que de un lado a otro. Los desacoplantes en esta hipótesis serían aquellos reactivos capaces de acarrear protones a las regiones lipofílicas interiores de la membrana, donde la actividad química de estos -- protones introducidos sería la responsable de descargar el estado de alta energía.

Con todos los conocimientos anteriores en mente, se -- procedió a montar la metodología que a continuación se menciona para lograr localizar el sitio de interacción de las aminas en la membrana del tilacoide y poder discutir así su posible mecanismo de acción en la fotofosforilación.

MATERIALES Y METODOS

I AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS

El método de aislamiento de cloroplastos, clase II -- (sin doble membrana externa), que se usó en este trabajo está reportado por Takaoki y col. [58] y consiste en lo siguiente: a 25 g de hojas de espinaca (*Spinacea oleracea*) -- previamente lavadas, y guardadas en el refrigerador, dentro de una bolsa de plástico durante toda la noche para eliminar el almidón, se les quita la vena central y se cortan en pedazos de 1 cm^2 aproximadamente, los cuales, se colocan en una licuadora (cuyo vaso ha sido enfriado previamente en el congelador por 30 min.). Se agregan 200 ml del medio de aislamiento [200 mM de sacarosa, TAPS 20 mM pH 8.0, KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM y 0.1 % de albúmina sérica bovina desgrasada y se licúa durante 10 seg consecutivos a velocidad máxima. Posteriormente se filtra a través de 4 capas de gasa colocadas en un embudo de vidrio para eliminar los pedazos de hoja remanentes; el homogenizado se centrifuga a 1500 rpm durante 3 min. [en una centrifuga MSE modelo LR-6] para eliminar células enteras, núcleos y pared celular. Se desecha el sedimento P_1 (ver fig. 19) y el sobrenadante S_1 se centrifuga a 3500 rpm durante 8 min. [en una centrifuga MSE modelo LR-6]. En el siguiente paso se desecha el sobrenadante S_2 y el sedimento P_2 [paquete de cloroplastos] se lava dos veces con la solución amortiguadora de resuspensión [sacarosa 100 mM, --- TAPS 20 mM pH 8.0, KCl 20 mM, MgCl_2 5 mM y 0.1 % de albúmina bovina sérica desgrasada]. El lavado se hace resuspendiendo el sedimento P_2 en el medio de resuspensión y centrifugándolo nuevamente a 3500 rpm por 8 min. Después -- de lavar dos veces, el sedimento P_3 se resuspende en 3 ml de la solución amortiguadora de resuspensión mencionada, y después de homogenizar brevemente la suspensión se guarda en un tubo frío cubierto con papel aluminio para evitar que la suspensión esté iluminada. Todo el proceso de aislamiento se -

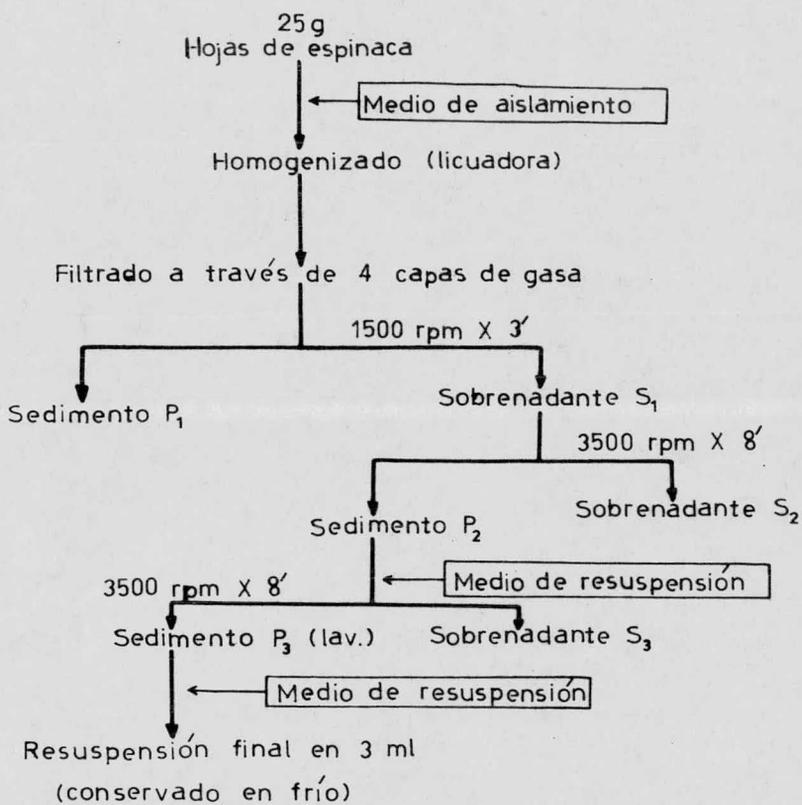


Fig. 19. Esquema del método empleado para el aislamiento de cloroplastos a partir de hojas de espinaca.

efectúa a 4° C y a pH 8.0 para prevenir la inactivación por galactolipasas y fosfolipasa D [59, 60].

Los principales factores que incrementan la estabilidad de las membranas de los tilacoides y las funciones que se realizan en ella son: a. aislamiento en un medio que contenga K^+ , y almacenamiento en un medio que contenga sacarosa y baja concentración de electrolitos. b. La presencia de un antioxidante y una proteína tal como albúmina sérica bovina para remover los ácidos grasos libres en el medio durante el almacenamiento.

Es importante la presencia de K^+ en el medio de aislamiento, ya que va a funcionar como contra-ion, para mantener la neutralidad de carga [61] y facilitar así el transporte de protones a través de la membrana. El subsecuente efecto benéfico de resuspender los cloroplastos en un medio con sacarosa podría ser debido a la prevención de desnaturalización de las proteínas de la membrana por prolongado contacto con altas -- concentraciones de sales, además de la supresión de liberamiento de lípidos.

Se ha reportado que la peroxidación lipídica fotoinducida, destruye las actividades fotoquímicas en cloroplastos de espinaca clase II [62, 63]. Por lo tanto, la estabilización por antioxidantes tales como ascorbato o hidroxitolueno butilado, no es sorprendente.

En la oscuridad también existe oxidación de lípidos tales como galactolípidos y fosfolípidos, por acción enzimática con la consecuente liberación de ácidos grasos, los cuales -- ejercen una acción deteriorante sobre las funciones de la membrana [64] --principalmente los ácidos grasos insaturados-- por

lo que nos será de utilidad contar con BSA desgrasada en el medio para que nos elimine los ácidos grasos del mismo.

II DETERMINACION DE CLOROFILA (64)

La clorofila se determinó por el método colorimétrico de Strain y Svec, en el cual, se colocan en dos tubos de centrifuga clínica, 5 ml de acetona al 80 % [a temperatura ambiente] en cada uno de ellos. A uno de estos tubos se le agregan 20 μ l de la muestra y se incuban en oscuridad ambos tubos durante 10 min exactos, para permitir que la clorofila sea extraída y no sea dañada por la luz durante este lapso. - Centrifugamos por 5 min en la centrifuga clínica a máxima velocidad para sedimentar residuos de los cloroplastos extraídos, y estimamos la clorofila midiendo la absorción del sobrenadante a 649 y 665 nm en un espectrofotómetro Carl Zeiss M4 QIII 45309 - PM QII 46275, y calculando los valores mediante las siguientes ecuaciones:

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

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

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

Las recomendadas ecuaciones anteriores se derivaron de los coeficientes de extinción específicos (65, 66 y 67).

III ACOPLAMIENTO DE LAS AMINAS A SEFAROSA

La unión de aminos a sefarosa se realiza básicamente en dos pasos:

a. Activación del Polisacárido

La activación se realizó por el método descrito por -

March, Parikh y Cuatrecasas [68], que es una modificación del método original de Axen y col. [69]:

A un volumen de sefarosa 4B [Farmacia Fine Chemicals] previamente lavada con 1 litro de agua, se le añade 1 volumen de agua y 2 volúmenes de carbonato de sodio 2M y se mezcla. - En una campana bien ventilada añadir 0,05 volumen de una solución de bromuro de cianógeno en acetonitrilo [2 g de bromuro de cianógeno por ml de acetonitrilo], Se agita vigorosamente por 1 ó 2 min. Después de esto se filtra en un embudo frío - con membrana de vidrio poroso y se lava con 5-10 volúmenes de cada una de las siguientes soluciones: bicarbonato de sodio 0.1 M pH 9.5, agua, bicarbonato de sodio 0,2M pH 9.5 (solución amortiguadora donde se llevará a cabo el acoplamiento). Después del último lavado la sefarosa activada se filtra con vacío hasta empacarla.

b. Adición del Brazo Hidrocarbonado Diaminado

El paquete de sefarosa activada se transfiere rápidamente [el intermediario activado es muy inestable] a 1 volumen de bicarbonato de sodio 0.2 M pH 9.5 en el cual se encuentra disuelto el ligando (para las diaminas de 10 y 12 carbonos se utilizó al 50 % con dimetilformamida y el volumen de acoplamiento fue de 1 a 2 lts respectivamente). El acoplamiento se llevó a cabo agitando la solución durante 20 hrs. a 4° C. Después del acoplamiento la sefarosa se lavó con 20 vol. de acetato de sodio 0.1 M pH 4.0 y 20 vol. de acetato de sodio 0.1 M pH 10-cloruro de sodio 0.5 M,

La relación empleada fue:

10 g sefarosa 4B/0,5 ml BrCN-acetonitrilo/4 moles del ligando

En el caso de la dodecametilendiamina, después de los lavados se hizo una diálisis contra agua desionizada durante

3 horas, realizándose 6 cambios.

El grado de acoplamiento se determinó por la prueba colorida con ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico, la cual se menciona a continuación. Los geles contenían aproximadamente 30μ moles de grupos aminoalkil por g de sefarosa.

Las reacciones entre el bromuro de cianógeno y los alcoholes en soluciones alcalinas acuosas no se han estudiado ampliamente, debido probablemente a la rápida hidrólisis del bromuro de cianógeno en estas condiciones. Sin embargo, se han estudiado las relaciones entre los alcoholatos y el bromuro de cianógeno.

El producto principal entre alcoholatos y el bromuro de cianógeno es un cianato, aunque también se han podido identificar imidocarbonatos, carbamatos N-sustituídos e isoureas. Los carbamatos, siendo inertes y neutros no toman parte en las reacciones de acoplamiento, mientras que los grupos imidocarbonatos son los responsables de éste. Los grupos imidocarbonatos cíclicos de cinco miembros con grupos hidroxilo transvicinales son particularmente reactivos y probablemente juegan un papel muy importante en el acoplamiento (ver Fig. 20).

En la fig. 21 podemos ver la reacción general de los grupos amino con la sefarosa activada por el bromuro de cianógeno.

IV DETERMINACION DE GRUPOS AMINO

Okuyama y Satake [70] y Stake y col. [71] desarrollaron un reactivo muy útil: el ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico [TNBS] para determinar grupos amino primarios libres. Se encontró que reacciona específicamente y bajo condiciones suaves

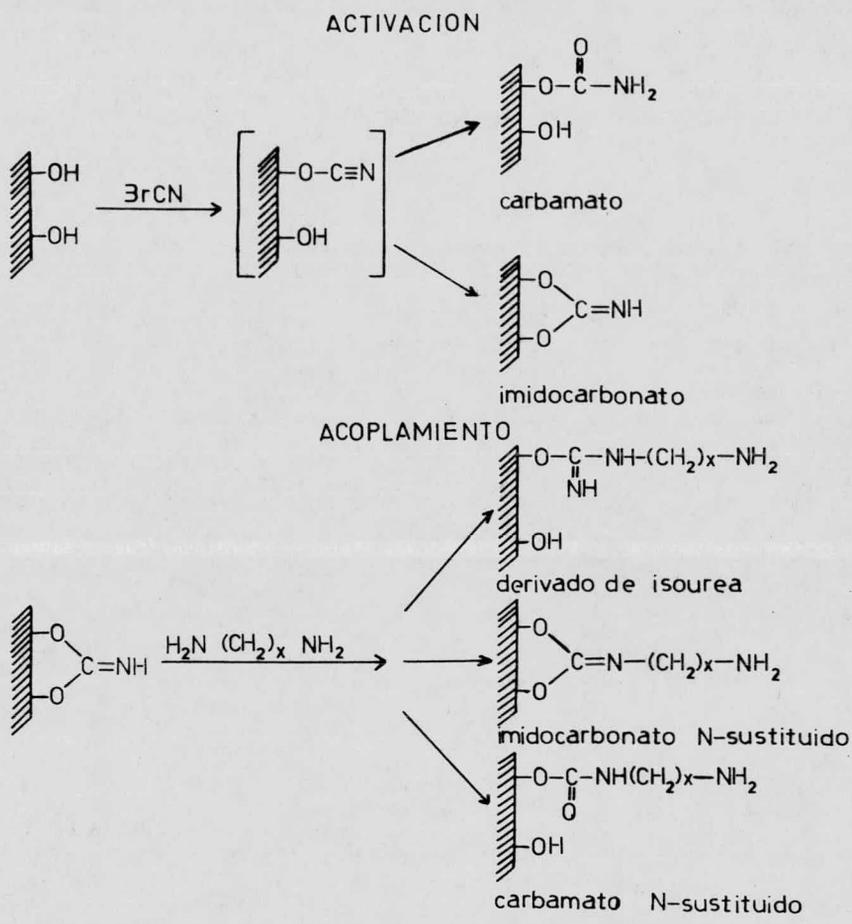


Fig. 20. Activación de la sefarosa por bromuro de cianógeno y el subsecuente acoplamiento de un brazo aminado.

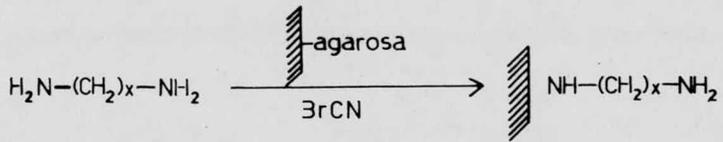
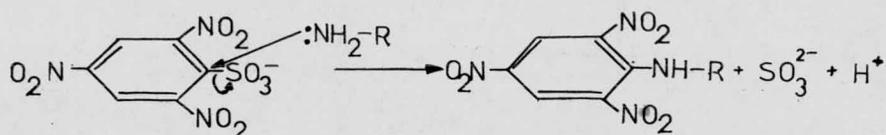


Fig. 21. Reacción general de los grupos amino con la sefarosa activada con bromuro de cianógeno.

con estos grupos amino libres para dar trinitrofenilderivados. En la reacción el sulfito es desplazado del TNBS por un ataque nucleofílico [72],



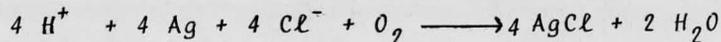
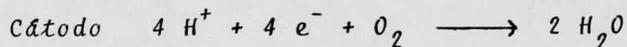
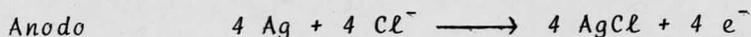
El trinitrofenil derivado puede estimarse colorimétricamente con facilidad [73]: a ,1-1 ml de la solución de aminas se le añade 1 ml de bicarbonato de sodio 4 % pH 8.5 o una solución reguladora al pH indicado y 1 ml de TNBS 0,1 %, A la solución se le permite reaccionar a 40° C durante 2 horas en un baño con agitación Lab-Line modelo 3581. Posteriormente se le agrega 0,5 ml de ácido clorhídrico 1 N para disociar el complejo del sulfito antes de leer (se sabe que el sulfito producido en la reacción se asocia reversiblemente con los -- grupos trinitrofenilamino para formar complejos cuyo espectro de absorción está alterado, haciendo difícil la cuantifica---ción). La absorbancia de la solución se lee a 335 nm en un espectrofotómetro Carl Zeiss M 4 Q III 45309 - PMQ II 46275, -- contra un blanco tratado de igual manera a como se menciona - antes, pero con 1 ml de agua o 1 ml de suspensión de sefarosa control en lugar de la solución de proteína.

De esta manera se determinó el grado de acoplamiento - del brazo diaminado, interpolando los valores obtenidos por - cada uno de los diferentes brazos en una curva patrón hecha - con la monoamina de la longitud del brazo hidrocarbonado --- correspondiente,

V MEDICION DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES (REACCION DE HILL)

El transporte de electrones en nuestro sistema se determinó midiendo la evolución de oxígeno de la fotólisis del agua con un electrodo tipo Clark [74, 75] que consiste de un cátodo de platino y un ánodo de plata, ambos inmersos en la misma solución de KCl concentrada y separada de la solución de prueba por una membrana (ver fig. 22), la cual está hecha de polytetrafluoroetileno [PTFE], es decir, teflón. Dicha membrana evita que el electrodo se contamine por las sustancias químicas existentes en la mezcla de reacción y ofrece además selectividad al paso del oxígeno y otros gases, en contra de los iones.

Principio: La medición de oxígeno por electrodos se basa en voltimetría y polarigrafía. El oxígeno es electroreducible y da lugar a una onda que se puede determinar. El voltaje aplicado se mantiene normalmente constante, y la diferencia en la corriente [la cual está relacionada a la concentración de oxígeno] se observa en un registrador. Si se usa un electrodo de platino conjuntamente con un ánodo de plata: se generan 4 electrones en el ánodo, los cuales son usados para reducir una molécula de oxígeno en el cátodo:



Si se aplica un voltaje de 0,5 - 0,8 V a través de los electrodos, la corriente que se genera es proporcional a la concentración de oxígeno en la solución.

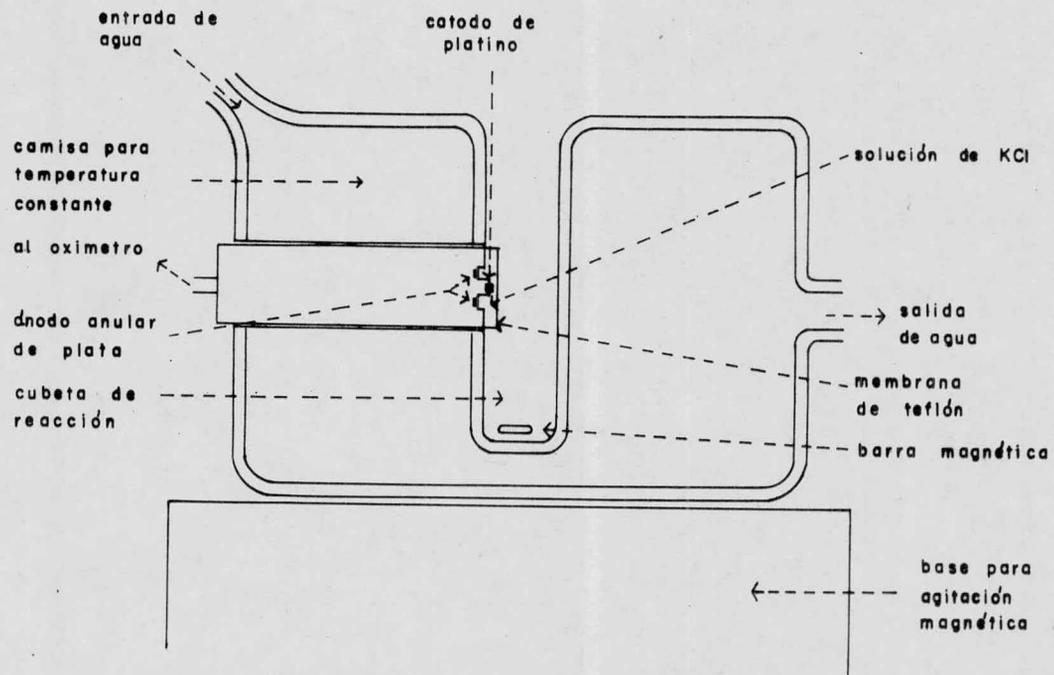


Fig. 22. Diagrama del electrodo de oxígeno desmantelado

Aparato: El registro de la cantidad de oxígeno consumido o producido se llevó a cabo con un oxígeno de fabricación particular, donado por el Dr. Dilley, el cual trabaja con un electrodo tipo Clark, conectado a un registrador Beckman 10" con escala linear-log. El par oxímetro-registrador suministró una escala total de 10 mV, lo cual equivalía de 1--2 μ equivale lentes electrónicos.

Como fuente de iluminación se empleó un proyector Sawyer's 550 A con una lámpara de 500 watts, el cual suministra luz a saturación. El haz luminoso se hace pasar a través de una lente de Izawa (un matraz balón de 500 ml con trazas de CuSO_4) la cual sirve como filtro y elimina el calor, además de concentrar el rayo de luz (ver fig. 23). Se empleó una base de agitación magnética Spin-Master modelo 4803 para lograr que la iluminación fuese constante al mantener homogénea la suspensión de cloroplastos, los cuales se encontraban en una cubeta protegida con una camisa para mantener constante la temperatura.

Mezcla de Reacción: La mezcla de reacción estándar -- tiene los siguientes componentes en un volumen total de 2 ml: Hepes 20 mM pH 8.0, sacarosa 100 mM, KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, albúmina 0.1 %, 0.5 mM de MV y 20 μg clo/ml (para calibrar se emplearon 10 μl de $\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.05 M en lugar del MV).

Las reacciones para fotosistema I (ver fig. 24) se llevaron a cabo teniendo además de la mezcla de reacción estándar, 2.5 mM de ascorbato, 0.4 mM de DCIP y 5 μM de DCMU.

Las reacciones para fotosistema II (ver fig. 24) se efectuaron quitando de la mezcla de reacción estándar, el MV, y adicionando 1 μM de DBMIB, 0.5 mM de DMQ, 0.4 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6$.

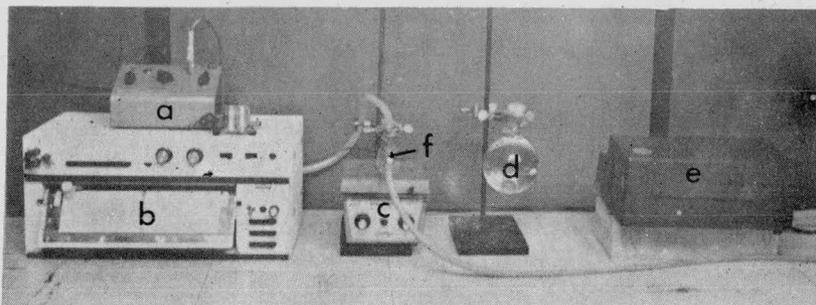
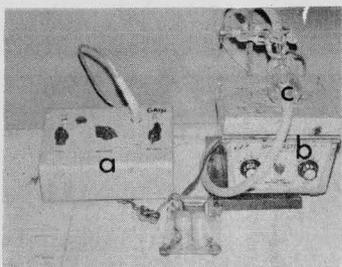
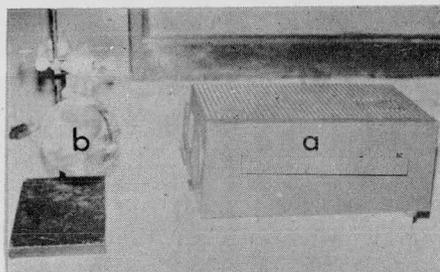


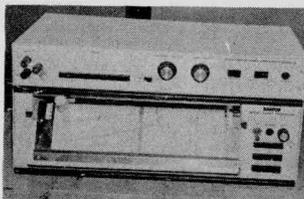
Fig. 23. Sistema empleado para la determinación del transporte de electrones. a. oxímetro; b. registrador; c. agitador magnético; d. lente de Izawa; e. fuente de iluminación; f. cubeta de reacción con camisa.



a. oxímetro; b. agitador magnético; c. cubeta de reacción con camisa.



a. fuente de iluminación; b. lente de Izawa.



registrador

Fig. 23'. Ampliación de los constituyentes del sistema empleado para la medición del transporte de electrones.

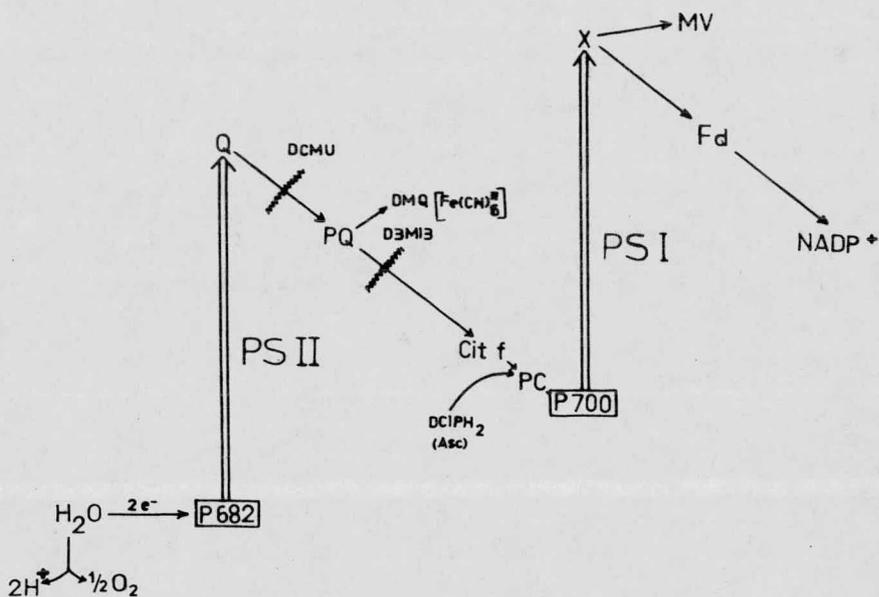


Fig. 24. Sitios de acción de aceptores, donadores e inhibidores electrónicos. ~~~~~ inhibición del transporte de electrones.

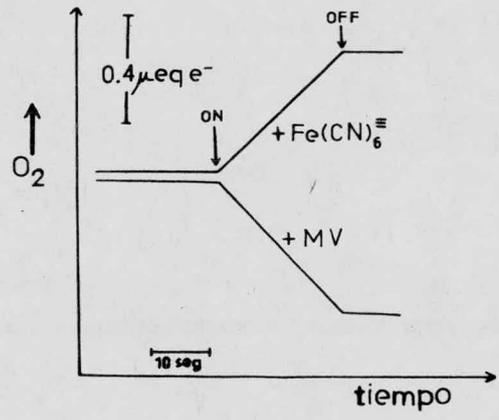
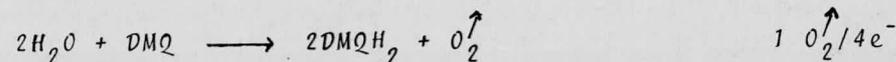
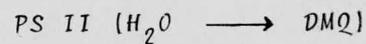
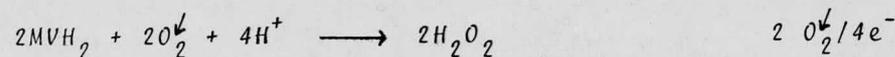
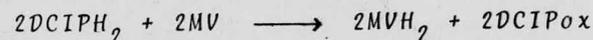
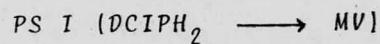
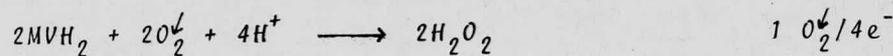
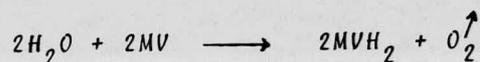
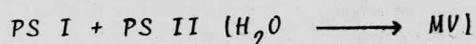
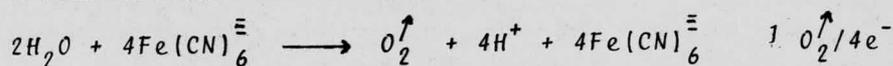
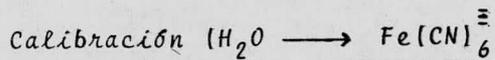


Fig. 25. Curvas obtenidas al registrarse evolución o consumo de oxígeno durante la fotólisis del agua. -- ON = luz encendida; OFF = luz apagada.

Para medir cualesquiera de las reacciones antes mencionadas en condiciones fosforilantes, únicamente se añadió 1 mM de ADP y 3 mM de KH_2PO_4 (concentraciones finales).

Las reacciones que se llevaron a cabo en la mezcla de reacción en cada uno de los diferentes casos fueron:



Análisis del trazo: El tipo de curva de evolución o -- consumo de oxígeno obtenida durante la fotólisis del agua se observa en la fig. 25. La velocidad de consumo o producción de oxígeno se puede determinar comparando la deflexión que su

fre el trazo de la pluma después de adicionar una cantidad -- conocida de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 0.05 M (calibración) con la deflección de la pluma ocurrida en nuestra muestra problema, por unidad de tiempo y mg de clorofila (añadida como cloroplastos). e.g., -- si suponemos que los trazos para el problema y la calibración son los que se presentan en la fig. 25", cuyos datos experimentales fueron: volumen total de la mezcla de reacción, 2 ml; velocidad de la carta, 1 pul/min; $37.5 \mu\text{g}$ de clo en los 2 ml;

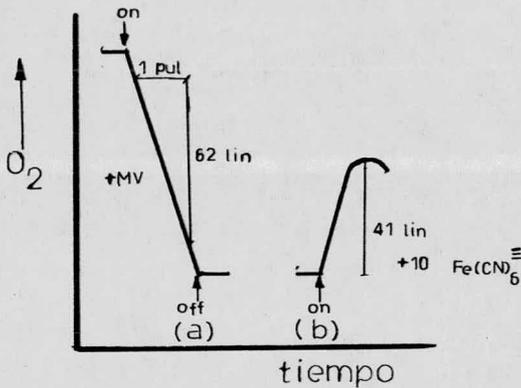


Fig. 25". on = luz encendida; off = luz apagada; lin = líneas. (a) muestra problema. (b) -- calibración.

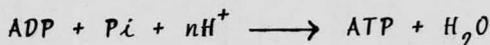
calibración con $10 \lambda \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 0.05 M (lo que es igual a $0.5 \mu\text{eq e}^-$ en los dos ml). Así, simplemente para saber la velocidad del flujo de equivalentes reductores, tenemos que relacionar las 41 líneas (impresas en el papel graficador) desplazadas por -- $0.5 \mu\text{eq e}^-$ (ver fig. 25") con el número de $\mu\text{eq e}^-$ que serían capaces de desplazar las 62 líneas/min observadas en el trazo producido por nuestra muestra problema (ver fig. 25") y hacer las conversiones necesarias para tener el resultado en función de horas y de mg de clorofila, Así, tendríamos finalmente:

$$0.5 \mu\text{eq } e^- [4] \text{ lín} \times 62 \text{ lín/mín} \times \frac{60 \text{ mín/hr}}{.0375 \text{ mg clo}} = 1209 \mu\text{eq } e^- / \text{hr/mg clo.}$$

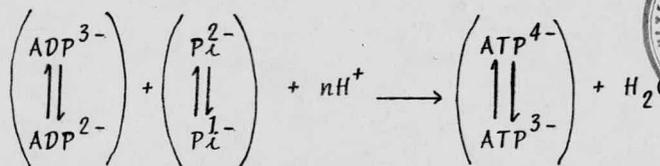
VI DETERMINACION DE SINTESIS DE ATP

La fotofosforilación se determinó registrando los cambios de pH en las mezclas de reacción que contenían los cloroplastos iluminados en las condiciones adecuadas para sintetizar ATP [76, 77].

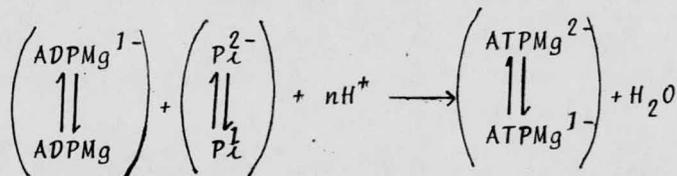
Principio: El método se basa en medir los pequeños cambios de pH que ocurren al disminuir la concentración de iones hidrógeno cuando la siguiente reacción se lleva a cabo en el rango de pH fisiológico:



en donde el valor de n ($n = \Delta \text{H}^+ / \Delta \text{P}_i$) se calcula teóricamente y la capacidad de amortiguamiento ($= \text{H}^+ \text{ añadido} / \Delta \text{pH}$) se determina experimentalmente por titulación. En el rango de pH de 7-9 la reacción mencionada arriba se puede expresar como sigue:



o cuando asumimos la formación del complejo de magnesio del -



La relación # iones hidrógeno desaparecidos/# iones ATP formado = n en las tres ecuaciones mencionadas en el rango de pH 7 - 9 se ha calculado teóricamente [76] tomando en cuenta los coeficientes de actividad para las formas que intervienen en la ecuación y se sabe que es igual a la unidad a pH 8,0

Aparato: el registro de los cambios de pH se llevó a cabo usando un pH metro Sargent-Welch modelo LSX de escala expandida [con un electrodo Sargent-Welch modelo S-30072-15] -- conectado a un registrador Heath Schlumberger Strip Chart -- Recorder unido a un Heath Servo Amplifier Patch Module. El par pHmetro-registrador suministra una escala donde la deflexión total de la pluma significa 0.5 unidades de pH. La iluminación está dada por un proyector Kodak Carrousel 600-K con una lámpara de 500 watts, el cual produce luz de intensidad saturante para el sistema empleado. Se empleó una lente de Izawa como filtro para evitar la mayoría de los efectos calóricos del rayo. La mezcla de reacción se colocó en una cubeta con camisa para mantener constante la temperatura. Se empleó un agitador magnético Mag-Mix modelo 65904 para mantener homogénea la suspensión (ver Fig. 26).

Mezcla de reacción: la mezcla de reacción estándar -- tiene los siguientes componentes en un volumen total de 7 ml; 100 mM de KCl, 5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de ADP, 3 mM de KH_2PO_4 , -- 0.5 mM de MV y 20-30 μg de clo/ml [para medir la fosforilación cíclica se empleó en lugar de MV, 30 μM de PMS], el pH se llevó a 8,0 con KOH 0,1 M.

Análisis del trazo: El tipo de trazo de pH obtenido por la fotofosforilación es el que se muestra en la fig. 27. La velocidad de síntesis de ATP puede ser determinada comparando el cambio de pH sufrido después de la adición de una -- cantidad conocida de ácido o base estándar, con la deflexión

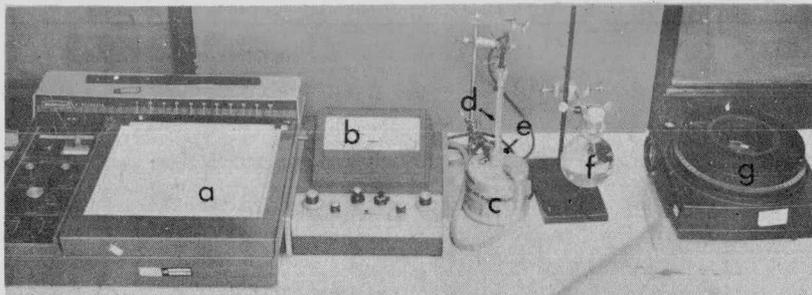
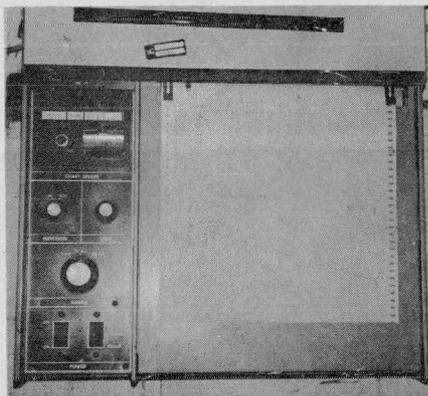
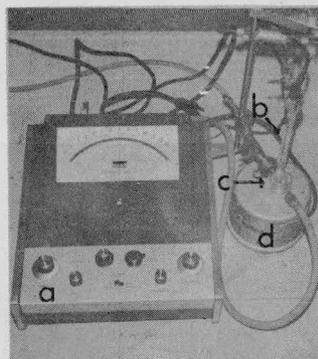


Fig. 26. Disposición espacial del sistema empleado para la medición de la síntesis de ATP. a. registrador; b. pHmetro; c. agitador magnético; electrodo combinado para medir cambios en la concentración de iones hidrógeno; e. cubeta de reacción con camisa; f. lente de Izawa; g. fuente luminosa.



registrador



a. pHmetro; b. electrodo; c. - cubeta de reacción con camisa; d. agitador magnético.



a. fuente de iluminación;
b. lente de Izawa.

Fig. 26'. Ampliación de los constituyentes del sistema empleado para la medición de la formación de ATP.

que sufre el trazo de la pluma por la alcalinización de nuestra muestra problema al sintetizarse ATP, expresándolo por unidad de tiempo y mg de clorofila. Por ejemplo, si suponemos que los trazos para el problema y la titulación (adición de cantidad conocida de ácido o base estándar) son los que están representados en la fig. 27", con los siguientes datos experimentales: volumen total de la mezcla de reacción, 7 ml; velocidad de la carta, 1 pul/min; 93,8 mg de clorofila en los 7 ml; titulación con 5 λ de HCl 0.01 N (lo que equivale a --

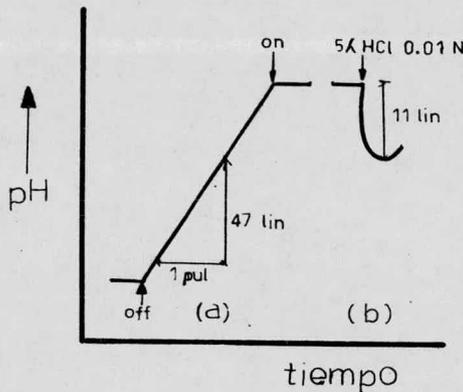


Fig. 27". on = luz encendida; off = luz apagada; lin = líneas. (a) muestra problema. (b) - titulación.

0.05 μ moles de H^+). De esta manera, para saber cual es la velocidad con la que se está sintetizando ATP, tenemos que relacionar las 11 líneas desplazadas por 0.05 μ moles de H^+ (ver fig. 27") con el número de H^+ desaparecidos, que serían capaces de desplazar en sentido contrario (hacia la basificación) las 47 líneas/min observadas en el trazo producido por

nuestra muestra problema (ver fig. 27") y hacer las conversiones necesarias para tener el resultado en función de horas y de mg de clorofila. Así, finalmente tendríamos:

$$0.05 \mu \text{ moles de ATP/11 lin} \times 47 \text{ lin/min} \times \frac{60 \text{ min/hr}}{.0938 \text{ mg clo}} =$$

$$= 136 \mu \text{ moles de ATP/hr/mg clorofila.}$$

VII MEDICION DE LA BOMBA DE PROTONES

Para medir la bomba de protones es conveniente ajustar el pH alrededor de 6.0 [78], lo que se consigue con ácido o base estandarizado. Una curva típica para los cambios de pH inducido por la luz en una mezcla de reacción que contiene cloroplastos, se puede observar en la fig. 28. Otra vez la velocidad y el cambio [grado] del pH se puede estimar debido a la deflección de la pluma provocada por la adición de una base o ácido estándar, la cual, se comparará con la basificación del medio al ser secuestrados los protones en el lóculus del tilacoide durante el transporte de electrones a través de la cadena fotosintética.

Para medir la bomba de protones, el medio de reacción es el mismo empleado para la fotofosforilación, eliminando únicamente el ADP y el P_i .

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima pureza,

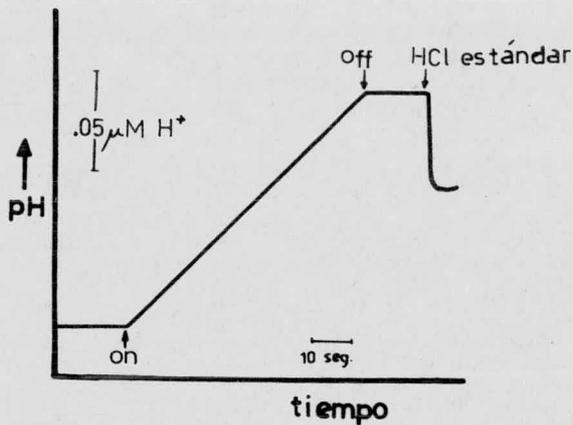


Fig. 27. Curva obtenida al registrarse el cambio de pH en el medio durante la síntesis de ATP. on = luz encendida; off = luz apagada.

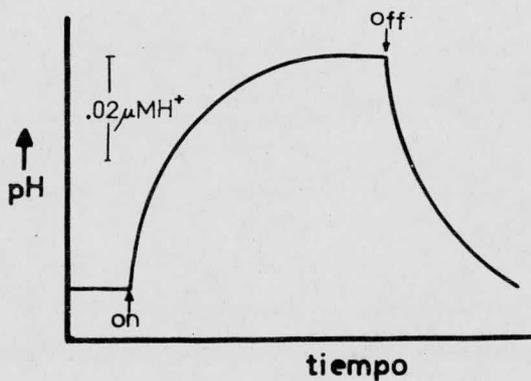


Fig. 28. Cambios de pH inducidos por la luz, observados con suspensiones de cloroplastos. on = luz encendida; off = luz apagada.

RESULTADOS

I EFECTO DE LAS MONOAMINAS ALIFATICAS CON DIFERENTES LONGITUDES EN SU BRAZO HIDROCARBONADO SOBRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES

Como se dijo anteriormente, una de las características de los desacoplantes es la estimulación de la velocidad del flujo de electrones en cloroplastos [1, 3]. El desacoplamiento de la fotofosforilación por aminas es causada por la base libre de la amina, y no por la especie catiónica de la misma [2].

Antes de ensayar el efecto desacoplante de las aminas unidas a sefarosa, era necesario contar con los controles de las monoaminas libres correspondientes $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ donde $n = 1, 2, 4, 6, 8, 10]$, ya que las diaminas al unirse a la sefarosa a través de uno de sus grupos diaminos se asemejarán a las monoaminas. Así, se midió su efecto sobre el transporte de electrones no cíclico del agua al metilviológeno, tanto en condiciones basales (sin ADP ni Pi), como en condiciones fosforilantes (más ADP y Pi). Los resultados obtenidos los podemos observar en la fig. 29: en esta figura, las velocidades del transporte de electrones dadas en $\mu\text{eq/hr/mg clo}$, están representados en % de actividad del control, lo que significa el aumento en porcentaje de la actividad correspondiente, en relación a un ensayo control al cual no se le agregó desacoplante.

Como se puede ver en la fig. 29, los datos nos indican que a medida que aumenta la longitud de la cadena hidrocarbonada de las aminas, se necesita menor concentración para activar la velocidad del transporte de electrones; concomitantemente a esto se observa una menor estimulación de las aminas alifáticas de cadena larga con respecto a las aminas alifáticas de cadena corta. Por ejemplo, la tabla II muestra que la

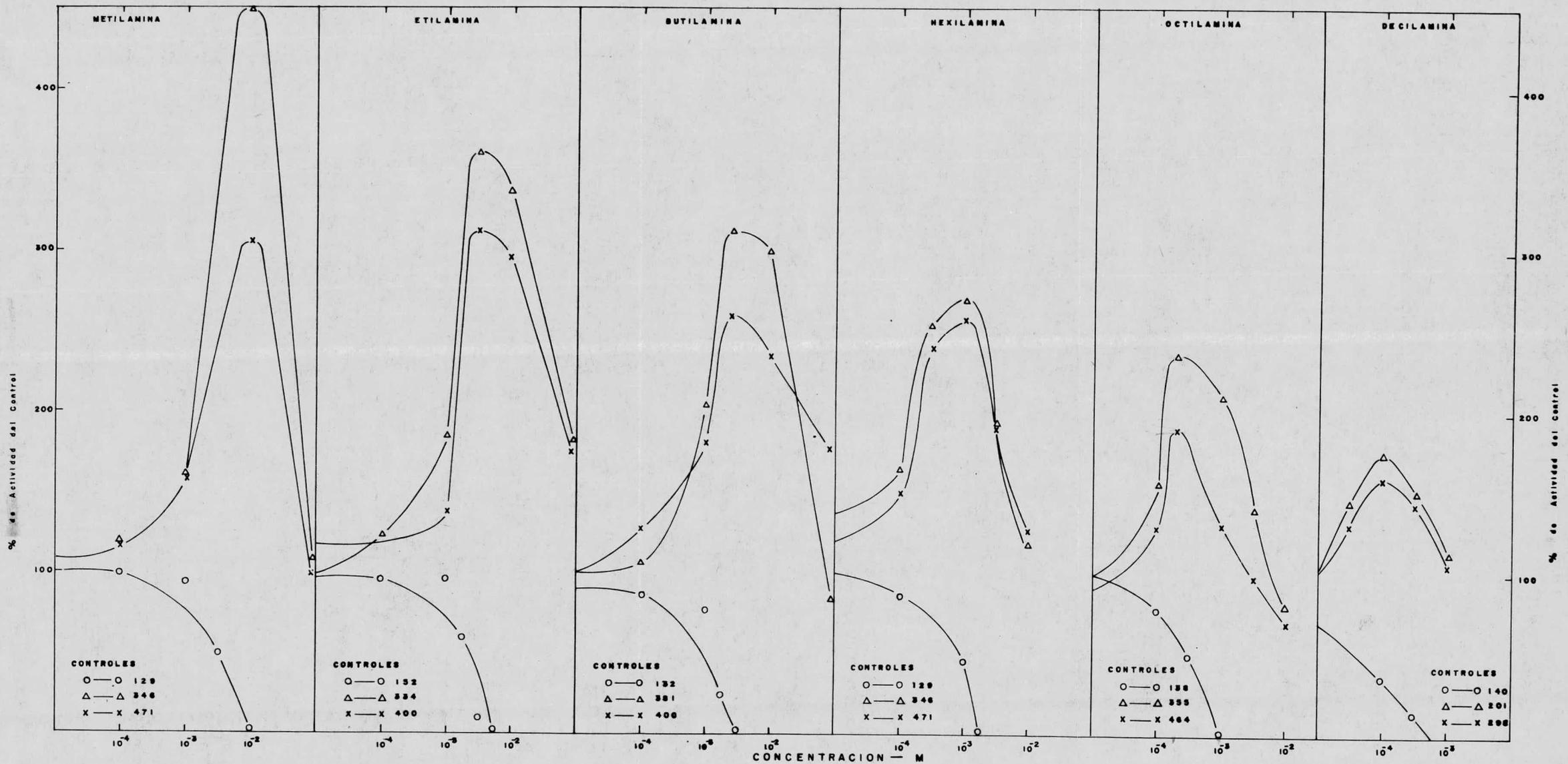


FIG. 29. EFECTO DE MONOAMINAS SOBRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES Y LA SINTESIS DE ATP DE $H_2O \rightarrow MV$

MEZCLA DE REACCION COMO SE DESCRIBE EN METODOS Y MATERIALES

FOTOFOSFORILACION EXPRESADA EN μ MOLES ATP/br/100 CLOROFILA (O—O) \bullet HEPES

FOTORREDUCCION EXPRESADA EN μ EQUIVALENTES e^- /br/100 CLOROFILA (Δ — Δ) \bullet ADP, PI (X—X) + ADP + PI

etilamina estimuló el transporte de electrones hasta un máximo, con 5 mM, mientras que se requirieron 0.1 mM de decilamina para alcanzar su máximo correspondiente. El transporte de electrones se estimuló mucho más en condiciones basales que en condiciones fosforilantes. Así, e.g., como se puede ver en la fig. 29, el valor control en condiciones basales cuando se determinó la hexilamina fue de 346 $\mu\text{eq/hr/mg clo}$, el cual se estimuló hasta 934 $\mu\text{eq/hr/mg clo}$, representando un incremento del 170 %, mientras que el control en condiciones fosforilantes fue de 471 $\mu\text{eq/hr/mg clo}$, estimulándose hasta 1215 $\mu\text{eq/hr/mg clo}$, lo que significaba un incremento de 158 %. Sin embargo como se observa claramente, los valores netos, son superiores en condiciones fosforilantes.

II EFECTO DE LAS MONOAMINAS CON DIFERENTE LONGITUD EN SU CADENA ALIFATICA SOBRE LA FORMACION DE ATP

Otra de las características de los desacoplantes es la de inhibir la síntesis de ATP, permitiendo el flujo de electrones [1, 3]. En el caso de las aminas alifáticas ensayadas, este efecto se produjo al disiparse el gradiente protónico establecido durante la fotofosforilación [50].

Se midió el efecto de las monoaminas alifáticas libres sobre la síntesis de ATP no cíclica. Los resultados obtenidos los podemos observar en la fig. 29, en donde la síntesis de ATP está dada en $\mu\text{moles ATP/hr/mg clo}$. Los valores están representados en % de actividad del control. En estos experimentos se observó una disminución en porcentaje de la actividad, lo que significa un incremento notable en el efecto desacoplante de las monoaminas, que se acentúa a medida que se alarga la cadena hidrocarbonada. Estos datos están concentrados en la fig. 30, donde podemos ver que las aminas de cadena

TABLA I I

RELACION ENTRE LA MAXIMA ACTIVIDAD DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DEL $H_2O \longrightarrow MV$, Y LA CONCENTRACION DE LAS MONOAMINAS NECESARIAS PARA LOGRARLA

Monoaminas	Concentración - mM	Máxima actividad (% del Control)
Metilamina	10	350
Etilamina	5	261
Butilamina	3	212
Hexilamina	1	170
Octilamina	0,3	137
Decilamina	0,1	75

La máxima actividad está representada en porcentaje de de actividad en relación al control. Los controles en $\mu eq e^- / hr / mg$ clo fueron: metilamina y hexilamina -- 346; etilamina 334, butilamina 381; octilamina 355; -- decilamina 201. La medición se hizo en condiciones -- basales (no ADP, Pi). Las otras condiciones fueron -- como se describen en métodos y materiales.

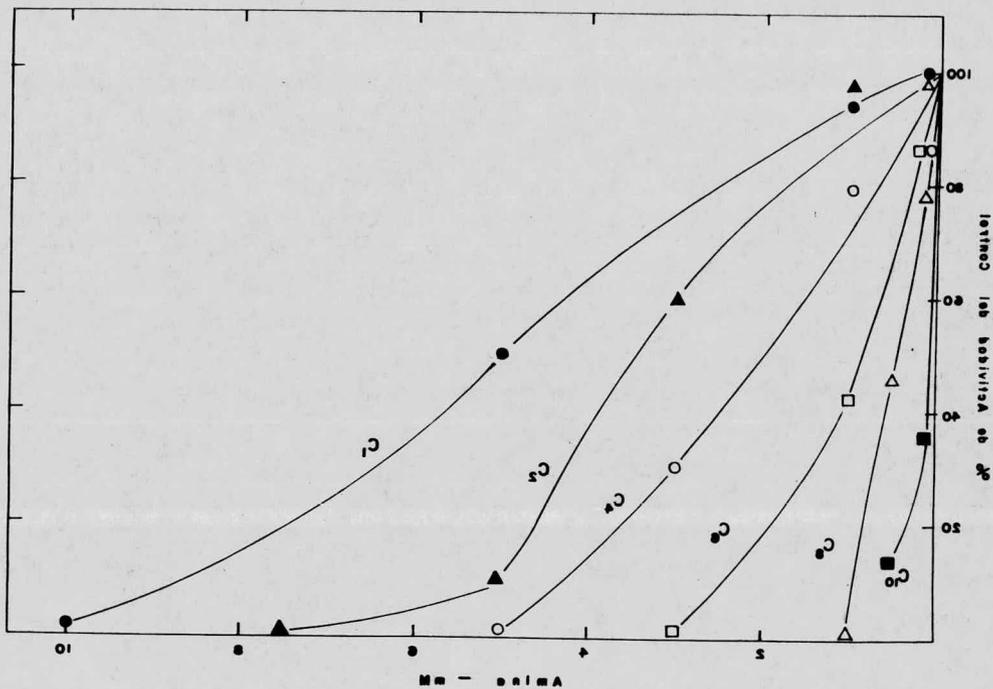


Fig. 30. Efecto de la longitud de la cadena hidrocarbonada sobre la inhibición de la fotofosforilación en cloroplastos, por las monoaminas. Las velocidades de los controles varían de 120 a 160 μ moles/hr/mg clorofila. C₁, C₂, etc. se refieren al número de átomos de carbono en la monoamina.

corta tales como metil o etilamina son menos efectivas que el cloruro de amonio para desacoplar la fotofosforilación en cloroplastos. Así, la efectividad de las monoaminas alifáticas para inhibir la fotofosforilación no cíclica en cloroplastos, aumenta marcadamente al incrementar la longitud de la cadena hidrocarbonada, e.g., la octilamina inhibió la formación de ATP en un 50 % con .45 mM, mientras que fue necesario 5 mM de metilamina para provocar el mismo grado de inhibición. Tomando en cuenta que el cloruro de amonio inhibió la síntesis de ATP en estas condiciones en un 50 % a una concentración de 1.5 mM, parece aparente que las monoaminas alifáticas con más de cuatro unidades de metileno son inhibidores más potentes de la fotofosforilación que el cloruro de amonio. Las concentraciones de las aminas requeridas para dar el 50 % de inhibición de la fosforilación, se determinaron de la fig. 30, los cuales indica la Tabla III.

Se constató tanto por la estimulación del flujo electrónico, como por la inhibición de la síntesis de ATP, que el desacoplamiento es más fácilmente alcanzado, a medida que aumenta el número de metilenos unidos a la amina, lo cual, parece indicar que la actividad desacoplante está relacionada con la solubilidad lipoidal del mismo.

III EFECTO DE LAS DIAMINAS ALIFATICAS CON DIFERENTES LONGITUDES EN SU BRAZO HIDROCARBONADO SOBRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES

Se sabe que las diaminas alifáticas varían en cuanto a su efecto desacoplante sobre varias fotorreacciones en relación con las monoaminas, por lo tanto, fue de interés el ensayar el efecto de la longitud del brazo hidrocarbonado sobre el desacoplamiento, cuando estas diaminas $[NH_2(CH_2)_nNH_2]$ donde

TABLA III

CONCENTRACION DE LAS MONOAMINAS NECESARIAS PARA
OBTENER EL 50 % DE LA FOTOFOSFORILACION NO CICLICA

Monoaminas	Concentración de mono-aminas [mM] para inhibir el 50 % de actividad
Metilamina	5.00
Etilamina	3.40
Butilamina	2.10
Hexilamina	0.80
Octilamina	0.45
Decilamina	0.07

El 100 % de actividad estaba dado por los valores control, los cuales están dados en μ moles de -- ATP/hr/mg clo y fueron: para metilamina 129; para octilamina 138; para decilamina 140. Las condiciones de reacción, fueron como se mencionan en métodos y materiales.

$n = 2, 4, 6, 8, 10, 12$] estaban libres en el medio, y de esta manera tener también curvas control para comparar con aquellas curvas obtenidas cuando las diaminas estén unidas a la sefarosa. Así, se determinó el flujo de electrones en condiciones basales y fosforilantes, desde agua a metilviológeno. En la fig. 31 se puede apreciar que la estimulación del flujo de equivalentes reductores es bastante más baja en las diaminas en comparación con las monoaminas correspondientes, e.g., la tetrametilendiamina estimuló en un 60 % el flujo electrónico en relación al control a una concentración de 5 mM, mientras que a la misma concentración, la butilamina los estimuló en un 212 %. Esta actividad disminuida de las diaminas en relación a las monoaminas puede deberse al carácter más polar de las primeras, fortaleciéndose así, la idea del requerimiento de cierta liposolubilidad para potenciar la actividad desacoplante. También disminuyó la eficiencia como desacoplante de las aminas al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonadas, en la estimulación del flujo de electrones. En la misma figura podemos observar que las diaminas de 6, 8 y 10 carbonos en realidad no mostraron efecto desacoplante, si tomamos en cuenta la escasa estimulación del flujo de electrones y la mínima inhibición de la síntesis de ATP. Sin embargo, esta falta de desacoplamiento se observó hasta la diamina con 10 metilenos, ya que al ensayar la de 12 carbonos, se observó una actividad desacoplante mucho mayor que las diaminas con brazo hidrófobo más corto, e.g., la decametilendiamina estimuló en un 7 % el transporte de electrones a 1 mM, mientras que a esa misma concentración, la dodecimetilendiamina lo hace en un 114 %. En la fig. 32 podemos ver la relación entre el porcentaje de estimulación del transporte de electrones y el # de carbonos, tanto en las mono como en las diaminas. En esta figura sobresale el hecho mencionado anteriormente acer-

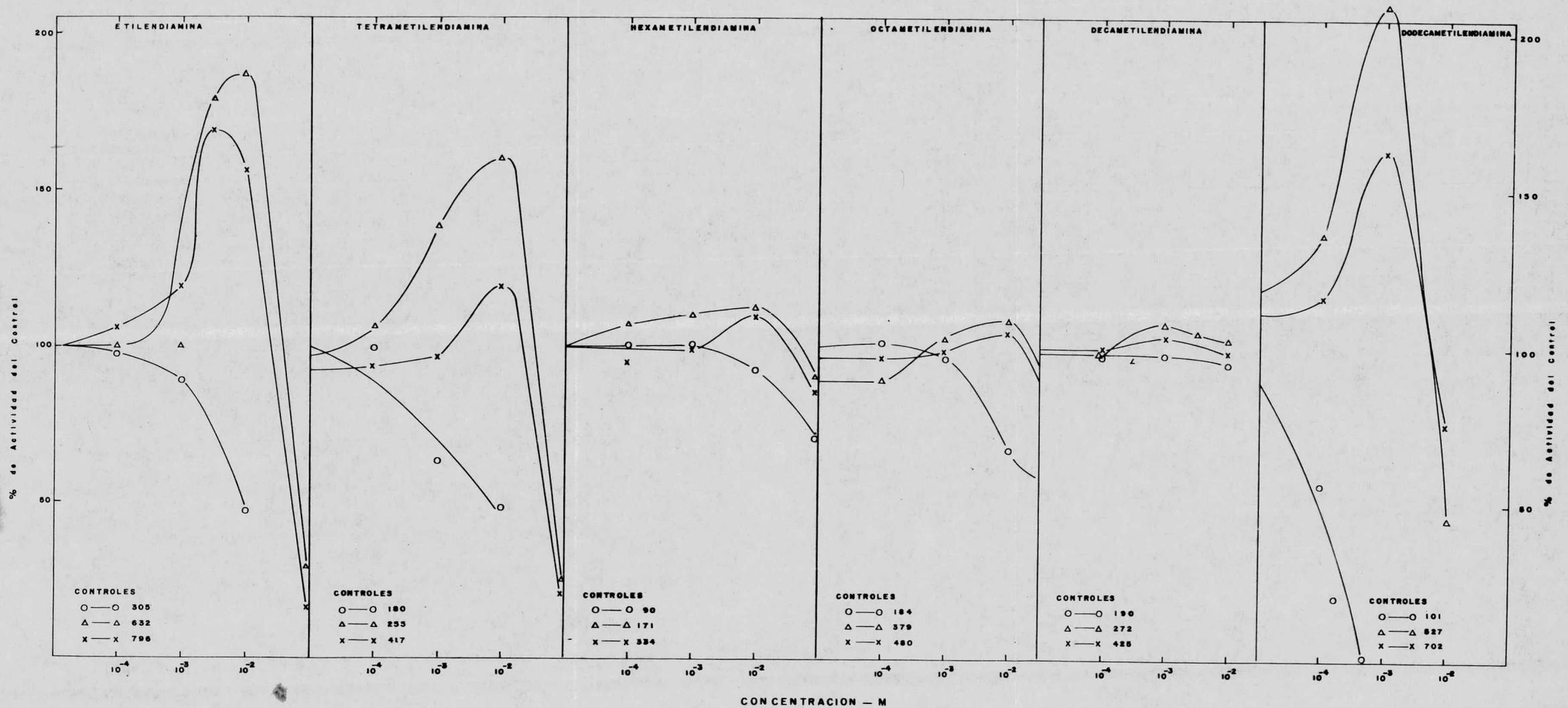


FIG.31. EFECTO DE DIAMINAS SOBRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES Y LA SINTESIS DE ATP DE H₂O → MV

MEZCLA DE REACCION Y DEMAS CONDICIONES COMO SE DESCRIBE BAJO METODOS Y MATERIALES
 FOTOFOSFORILACION EXPRESADA EN μ MOLES/hr/mg CLOROFILA (O—O) de NEPES
 FOTORREDUCCION EXPRESADA EN μ EQUIVALENTES h⁺/hr/mg CLOROFILA (Δ—Δ) de ADP, P_i
 (X—X) de ADP, P_i

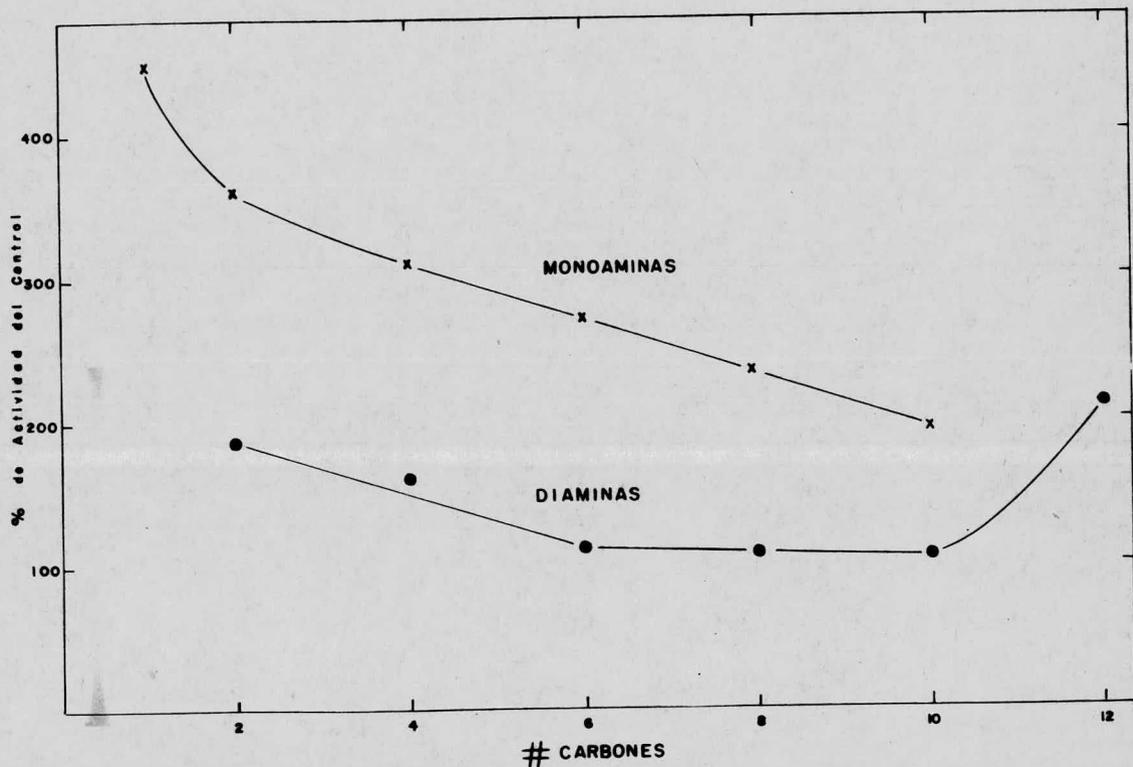


Fig. 32. Estimulación del transporte de electrones por mono y diaminas en relación a las diferentes longitudes de su brazo hidrocarbonado. Los valores control está expresados en μ equivalentes e⁻/hr/mg clorofila y son los mismos que se mencionan en la tabla II. Las condiciones de reacción fueron como se describen bajo métodos y materiales.

ca de la mayor actividad de las monoaminas en relación a las diaminas, además de que de estas últimas, de 6 carbonos hasta 10, son pobres como desacoplantes. En la fig. 33 se presenta la relación entre el número de carbonos de las aminas y la -- concentración necesaria para obtener la estimulación máxima -- del transporte de electrones, observándose nuevamente la tendencia a disminuir paralelamente al alargamiento de la cadena hidrofóbica. Es interesante notar el hecho, de que la diamina de 10 carbonos necesita la misma concentración que la de -- 12 carbonos para producir su máxima estimulación, pero siendo ésta mucho más pobre que la producida por la dodecametilendiamina.

IV EFECTO DE LAS DIAMINAS ALIFATICAS CON DIFERENTES LONGITUDES EN SU BRAZO HIDROCARBONADO SOBRE LA SINTESIS DE ATP

Para visualizar de manera más completa el efecto desacoplante de las diaminas, era necesario ver su influencia sobre la formación de ATP, así, se determinó también el efecto de la longitud del brazo hidrocarbonado de las diaminas li-- bres en el medio sobre la fotofosforilación no cíclica. En la fig. 31 se puede observar este efecto. No se puede apreciar una tendencia clara, pero en general, parece ser que el efecto inhibitorio se va haciendo más débil conforme se alarga la cadena hidrocarbonada. Al mismo tiempo se aprecia también la diferencia tan grande de actividad de todas las diaminas para inhibir la síntesis de ATP, en relación a la dodecametilendiamina, e.g., la decametilendiamina necesitó una concentración 10 mM para inhibir un 6 % la síntesis de ATP, mientras que la diamina de 12 carbonos a una concentración 100 veces menor, i.e., 0,1 mM habla ya inhibido el 50 % de la formación de ATP.

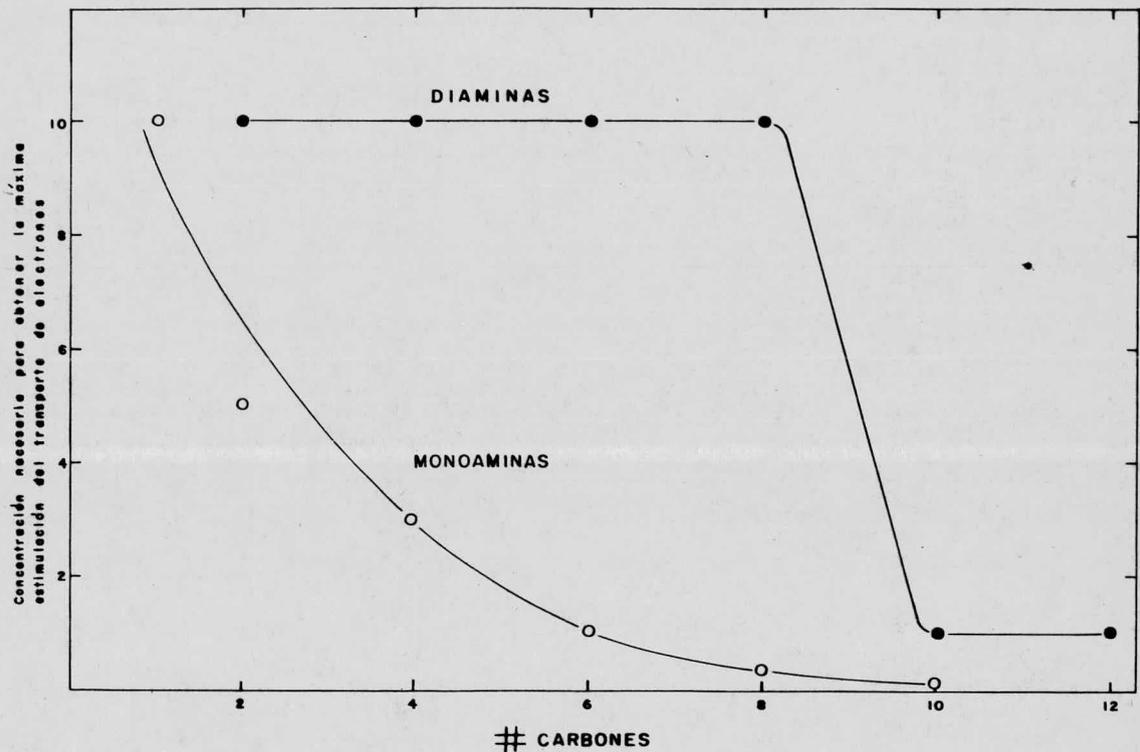


Fig. 33. Relación entre el # de carbonos y la concentración necesaria de las mono y las diaminas para obtener la estimulación máxima del transporte de electrones. Las estimulaciones máximas están expresadas en $\mu\text{eq e}^-/\text{hr}/\text{mg}$ clorofila y están representadas en % de actividad del control, las cuales podemos ver en la tabla II. Las condiciones de reacción fueron como se describen bajo método dos y materiales.

V EFECTO DE LAS AMINAS UNIDAS A SEFAROSA SOBRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES BASAL

Habiendo observado el efecto inesperado de la dodecamilendiamina sobre el transporte de electrones y la síntesis de ATP, resurgía la posibilidad de un sitio de interacción -- específica de las aminas para ejercer su efecto desacoplante [ver discusión]. Para comprobarlo, era necesario controlar la distancia de interacción de las aminas, desde la parte externa de la membrana del tilacoide, lo cual se logró, uniéndolas a moléculas de sefarosa que les restringían la entrada a la membrana, más allá de los que su brazo hidrocarbonado se lo permitiera. La distancia mayor era la que nos daba la sefarosa-dodecamilendiamina, correspondiente a 21 Å aproximadamente, y si tomamos en cuenta que el espesor de las membranas está entre 70 y 90 Å, entonces estaríamos cubriendo más o menos la cuarta parte de la membrana tilacoide, desde la superficie externa. El mantener el efecto desacoplante de alguna de las aminas unidas a sefarosa, nos indicaría que el desacoplamiento es producido por la interacción en la membrana con algún componente importante para el acoplamiento de los dos procesos -- [flujo electrónico y síntesis de ATP], ya fuera un pozo de -- protones embebidos en la zona hidrófoba de la membrana, lo -- cual favorecería la hipótesis conformacional; o interaccionando con un intermediario químico de alta energía, en favor de la hipótesis química; o finalmente podría estar ejerciendo su efecto sobre algún componente de la membrana (tal vez CF_1), -- cuya perturbación pudiera aumentar la permeabilidad de esta -- membrana a iones, disipando así el gradiente electroquímico -- formado, y apoyando de esta manera a la hipótesis quimiosmótica.

Con las premisas anteriores en mente, se probó el efecto de las aminas unidas a sefarosa [$\text{sefarosa-NH(CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$, don

de $n = 2, 4, 6, 8, 10, 12$] sobre el flujo electrónico no cíclico del agua al metilviológeno en condiciones basales. Tomando en cuenta que muchas de las moléculas de amina, las cuales están cubriendo a las moléculas de sefarosa, no están interaccionando con las membranas tilacoides por razones estéricas, se esperaba una inhibición menor de la síntesis de ATP. Como se puede observar en la fig. 34, se anuló el efecto de las diaminas de 2, 4, 6, 8, 10 carbonos completamente, cuando se les unió a la sefarosa, i.e., no presentaron ningún efecto estimulante sobre el transporte de electrones aún cuando se probaron a concentraciones a las cuales tenían efecto notorio cuando estaban libres. Contrastando con esto, la diamina de 12 carbonos unida a sefarosa mantuvo su efecto estimulante en el transporte de electrones lo cual nos indica que el proceso está desacoplado. Sin embargo se necesita una concentración ligeramente mayor de la dodecametilendiamina-sefarosa para lograr el efecto estimulatorio obtenido por la diamina libre correspondiente, además el efecto no es tan grande, e.g., la dodecametilendiamina libre estimuló el transporte de electrones en un 109 % a una concentración de 1 mM, mientras que a esta misma concentración, se observó un incremento en el transporte de electrones de 81 % causando por la dodecametilendiamina-sefarosa. Otra de las características que se puede observar, es que a concentraciones ligeramente mayores, no se observa inhibición del transporte de electrones en presencia de la diamina de 12 carbonos unida a sefarosa, lo cual nos indica que posiblemente esta sefarosa-diamina sea capaz de alcanzar el mismo grado de estimulación provocado por la diamina libre como desacoplante y que el efecto inhibitorio se encuentre en otro sitio. Se observó lo esperado sobre la menor inhibición de la síntesis de ATP por las diaminas unidas a sefarosa en relación a las diaminas libres, requiriéndose una mayor densidad de aminas por unidad de --

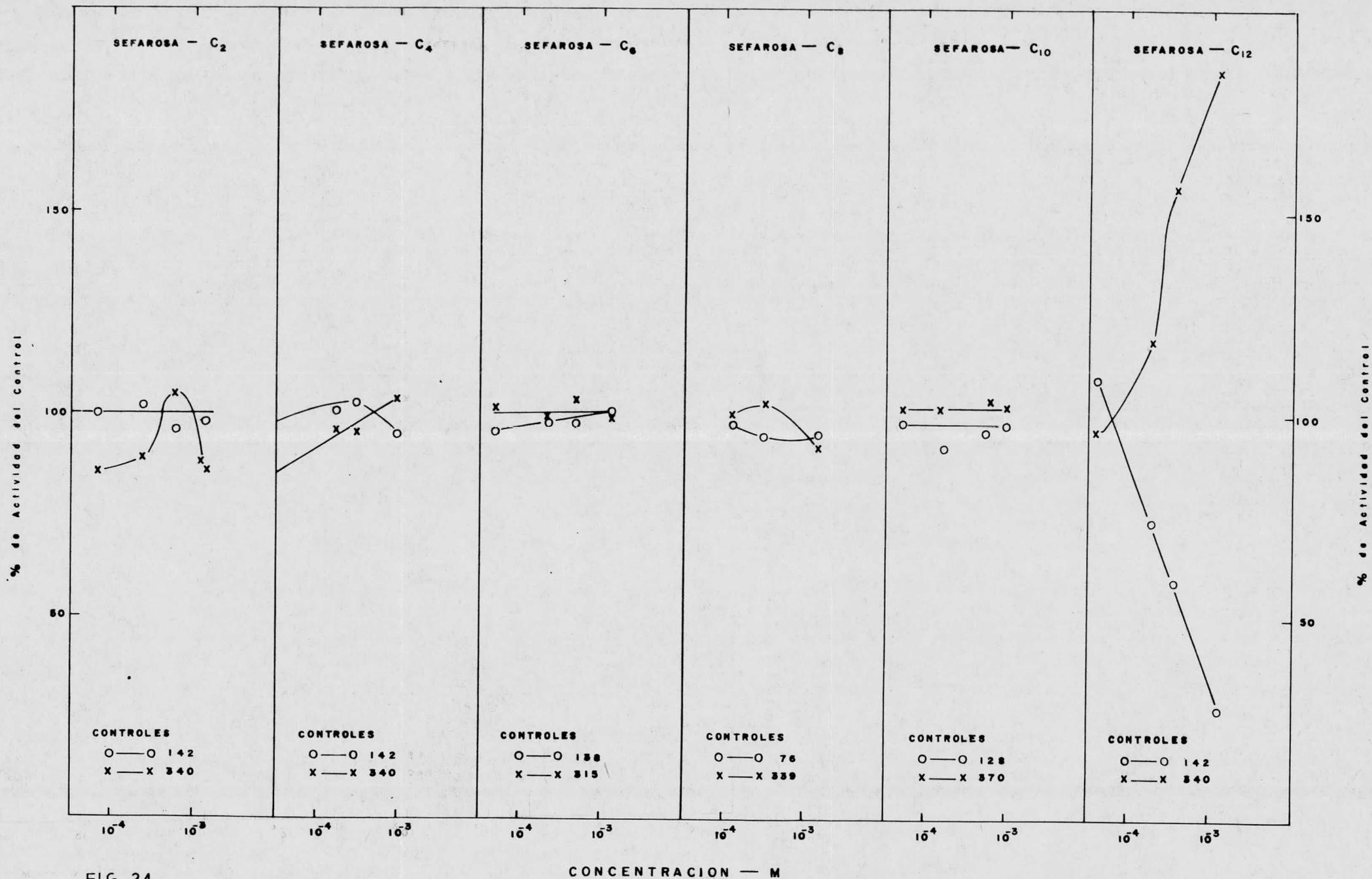


FIG. 34.

EFFECTO DE DIAMINAS UNIDAS A SEFAROSA SOBRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES Y LA SINTESIS DE ATP

FOTOFOSFORILACION EXPRESADA EN μ MOLES / hr / mg CLOROFILA (O—O) no HEPES
 FOTORREDUCCION EXPRESADA EN μ EQUIVALENTES e⁻ / hr / mg CLOROFILA (X—X) no ADP ni P_i
 SEFAROSA - C₂, - C₄, etc. SE REFIEREN AL NUMERO DE ATOMOS DE CARBONO DE LA DIAMINA UNIDA A SEFAROSA. MEZCLA DE REACCION Y DEMAS
 CONDICIONES COMO SE DESCRIBE BAJO METODOS Y MATERIALES.

area en la sefarosa, para poder alcanzar la concentración que igualaría el efecto de la diamina libre,

Los datos del flujo de equivalentes reductores en presencia de la sefarosa-dodecametilendiamina sugieren que el -- efecto de desacoplamiento observado por las aminas libres está localizado en un sitio a no más de 21 Å desde la superficie externa del tilacoide. Por otro lado el efecto inhibitorio que se observa en la dodecametilendiamina libre, probablemente se deba a que esté actuando en la cadena transportadora de electrones, evitando la fotólisis del agua, como lo hacen otras aminas, NH_2OH , CH_3NH_2 , a altas concentraciones (32), y este último sitio debe de estar a una longitud diferente al -- del desacoplamiento.

V EFECTO DE LAS AMINAS UNIDAS A SEFAROSA SOBRE LA SINTESIS DE ATP.

Era necesario para poder evaluar más la actividad desacoplante de las aminas unidas a sefarosa, el determinar su -- efecto sobre la formación de ATP. Así, se probó acción sobre la fotofosforilación no cíclica, con los resultados presentados en la fig. 34, donde podemos ver que no hubo inhibición -- de la síntesis de ATP por las aminas de 2, 4, 6, 8, y 10 carbonos, cuando estas estaban unidas a sefarosa, aún cuando las concentraciones probadas, correspondían a aquellas de las monoaminas y diaminas correspondientes que habían presentado inhibición cuando estaban libres. Un efecto bastante llamativo se observó al igual que durante la determinación del transporte de electrones, cuando se probó la sefarosa-dodecameti--lendiamina, ya que se obtuvo el 50 % de inhibición de la síntesis de ATP con solo 0.75 mM de esta diamina. Se puede observar que se necesitó una concentración un poco mayor para --

obtenerse el 50 % de inhibición de la fosforilación en relación a la necesitada por la diamina libre correspondiente, ya que ésta fue alcanzada por dicha diamina libre a una concentración de 0.1 mM, lo cual puede deberse como se mencionó ampliamente con anterioridad a que no todas las moléculas de amina interaccionan con los tilacoides por razones estéricas.

Los datos de inhibición de la fotofosforilación, en presencia de la sefarosa-dodecametilendiamina, otra vez nos indican que el efecto inhibitorio de las aminas está propiciado por la interacción de éstas en un sitio específico de la membrana no más allá de 21 Å desde la parte externa de la membrana del tilacoide.

VII EFECTO DE LA SEFAROSA-DODECAMETILENDIAMINA SOBRE LAS REACCIONES PARCIALES Y LA BOMBA DE PROTONES.

Habiéndose observado un sitio aparente de interacción específica de las aminas a 21 Å (distancia que corresponde burdamente a la longitud de una cadena de 12 carbonos y a un enlace covalente con un grupo amino) de la parte externa de los discos tilacoides, era de interés el poder situar un poco más el nivel de actuación de esta amina, en relación a la altura de la cadena fotosintética o región donde ejercía su acción. De esta manera, se midieron separadamente el transporte de electrones, en PS I y en PS II. El fotosistema II se midió como se explica en el capítulo anterior, bloqueando la cadena con DBMIB (un análogo de la plastoquinona) y poniendo como aceptor artificial al par $DMQ/Fe(CN)_6$, siendo a su vez donador, el agua. El fotosistema I se determinó, bloqueando el flujo electrónico con DCMU, y teniendo como donador artificial al par $DCIPH_2/Asc$ y como aceptor artificial al metilvio-

lógono. En la fig. 35 podemos ver que el flujo de equivalentes reductores en fotosistema II no es estimulado por la sefa rosa-dodecametilendiamina y aún, está ligeramente inhibido, - mientras que el fotosistema I se ve estimulado, casi de igual manera a como se afectó el sistema completo de agua a metil--viológono. En la Tabla III podemos ver la relación entre el efecto desacoplante producido por la sefarosa-dodecametilen--diamina en el sistema completo y sobre los fotosistemas medidos independientemente cuando la amina estuvo a una concentra--ción 1 mM. Estos resultados sugieren que la amina tiene dos sitios diferentes de actuación para fotosistema I y para foto sistema II.

Resultaba interesante también el ver si la acción del desacoplante alteraba de alguna manera la permeabilidad de la membrana a iones, de tal manera, se midió la bomba de proto--nes, con los resultados presentados en la fig. 36, donde pode--mos ver que esta bomba fue bastante activa cuando se midió a pH 6.0 y en ausencia del desacoplante (fig. 36 a), mientras - que, cuando se añadió la amina unida a sefarosa, se anuló com--pletamente la basificación del medio, i.e., aumento de manera notable la permeabilidad de la membrana a los iones hidrógeno (fig. 36 b). Ya que el transporte de electrones no está inhi--bido, sino estimulado, esto nos indica que la bomba de proto--nes está funcionando correctamente, introduciendo estos proto--nes al espacio interno del tilacoide, al nivel de la plasto--quinona y del sistema fotolítico del agua; sucediendo proba--blemente que la diamina-sefarosa esté interaccionando con un componente en la membrana, para aumentar la permeabilidad de esta a los protones y de esta manera equilibrar su concentra--ción a ambos lados de la membrana, sin la consecuente alcali--nización del medio externo y la disipación total del gradiente electroquímico necesario para la síntesis de ATP.

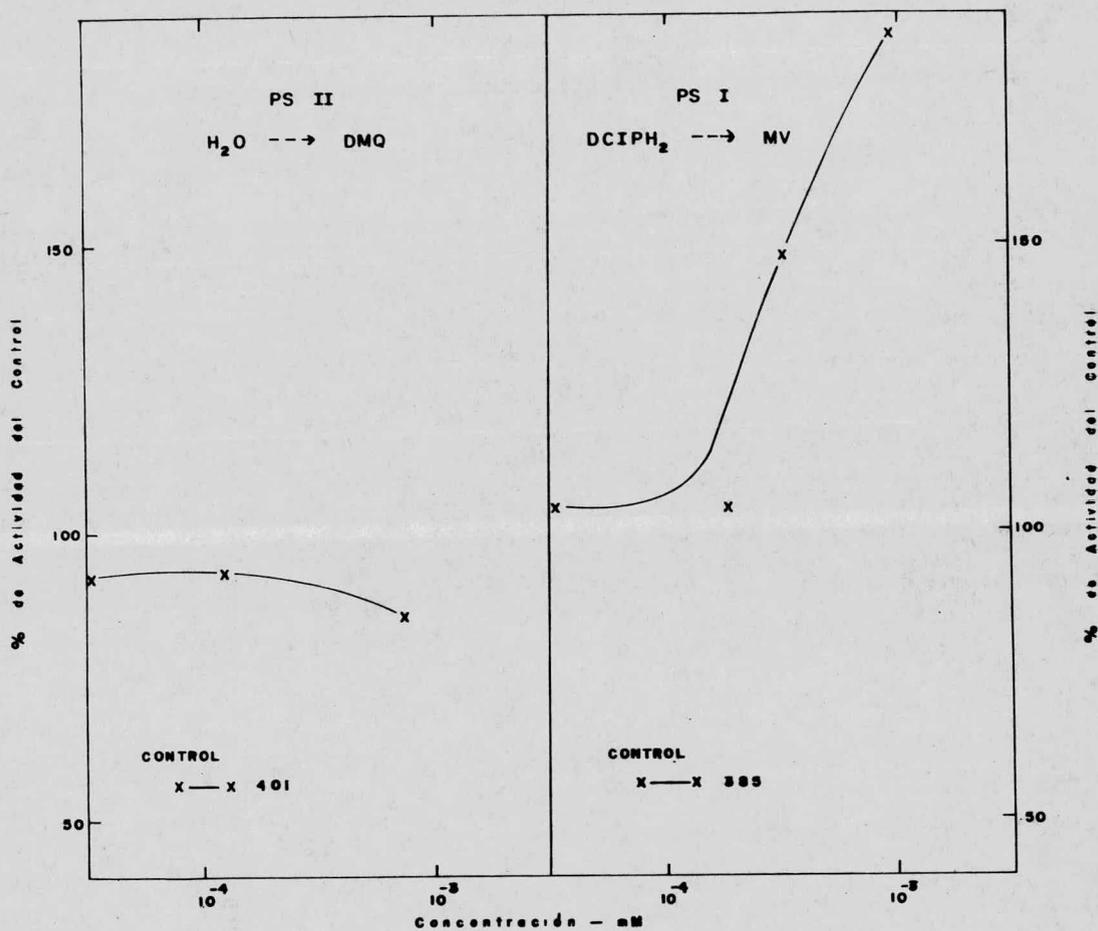


Fig. 35. Efecto de la dodecametilendiamina unida a sefariosa sobre el transporte de electrones, medido en fotosistema I y fotosistema II independientemente. los controles están dados en $\mu eq e^-/hr/mg \text{ clorofila}$. Las condiciones son las que se mencionan - bajo métodos y materiales.

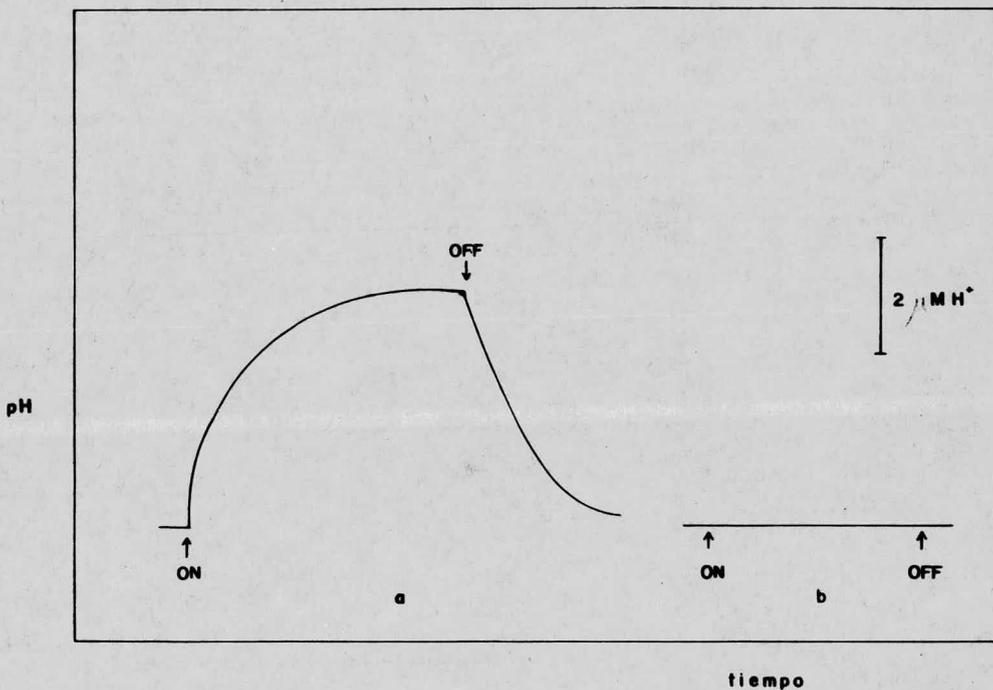


Fig. 36. Efecto de la dodecametilendiamina-sefarosa sobre la bomba de protones. En la curva a, se representa el cambio en el pH inducido por la luz con una suspensión de cloroplastos, sin amina en el medio. En la curva b se añadió 1 mM de sefarosa dodecametilendiamina. Las otras condiciones fueron como se mencionan en métodos y materiales.

TABLA IV

RELACION ENTRE EL EFECTO DESACOPLANTE PRODUCIDO POR LA SEFAROSA-DODECAMETILENDIAMINA SOBRE EL SISTEMA COMPLETO Y LOS FOTOSISTEMAS MEDIDOS INDEPENDIEMENTE CUANDO SE DETERMINO EL TRANSPORTE DE ELECTRONES

Condición	Sefarosa-dodeca- metilendiamina mM	Transporte de electrones % de actividad
$H_2O \rightarrow MV$	0	100
$H_2O \rightarrow MV$	1	181
$H_2O \rightarrow DMQ$	0	100
$H_2O \rightarrow DMQ$	0,75	85
$DCIPH_2 \rightarrow MV$	0	100
$DCIPH_2 \rightarrow MV$	1	176

El transporte de electrones está representado por el % de actividad del control, el cual esta dado en μ equivalentes e^- / hr/mg clo. Los valores para los controles fueron: para PS I 385; para PS II 401; para PS I + PS II 340.

DISCUSSION

Existen evidencias experimentales que indican la acción lipofílica de las aminas como un factor importante para determinar su efectividad como desacoplante. Estas observaciones son consistentes con los conocimientos sobre que la penetración de las aminas no cargadas al interior del espacio de los tilacoides o a determinada región de la membrana, juega un papel importante en el desacoplamiento de la fotofosforilación por las aminas.

Los resultados presentados en este trabajo corresponden al efecto de la longitud de la cadena hidrocarbonada en las aminas, sobre el desacoplamiento de la fotofosforilación en cloroplastos y apoyan las observaciones anteriores en el caso de las monoaminas. Independientemente de que se aumentó la efectividad desacoplante al añadir átomos de carbono a las monoaminas, en el caso de las diaminas se comprobó el requerimiento de la liposolubilidad al disminuir la efectividad como desacoplante cuando se añadió un segundo grupo amino a la molécula desacoplante, el cual le confiere una polaridad mayor. Así, estas diaminas con carácter más polar que las monoaminas se comportaron con menor efectividad, tanto en la estimulación del transporte de electrones, como en la inhibición de la síntesis de ATP (ver figs. 29, 31, 32, 33).

Un hecho sorprendente fue el de encontrar un efecto -- desacoplante notablemente mayor en la diamina de 12 carbonos, en relación con las otras diaminas, desde etilen hasta dodecametilendiamina. Si tomamos en cuenta las características químicas de la dodecametilendiamina en relación con la decametilendiamina, podemos ver que son bastante semejantes, ya sea en constantes de disociación para los grupos amino, solubilidad o un posible efecto detergente, así, de esta manera, la característica probablemente más diferencial sea la distancia de -

separación entre los dos grupos amino, que representan dos metilenos. Esta distancia podría ser crítica si pensamos -- que uno de los grupos amino esté protonado, quedando con carga positiva y de esta manera fijándose a la superficie externa polar de la membrana, mientras que el otro amino no cargado pueda penetrar libremente a la zona hidrófoba de la membrana y llegar a una distancia equivalente a la longitud de 12 carbonos, donde interaccionaría con un intermediario de alta energía que podría ser un pozo de protones aislado en la zona lipofílica. Alternativamente se puede visualizar esta interacción con un componente cuya modificación o perturbación pudiera alterar la permeabilidad de la membrana a iones. Así, se necesitaría una distancia de aproximadamente 21 Å desde el lado externo de la membrana del tilacoide (los cuales gruesamente corresponden a la longitud de una cadena de 12 carbonos y a un enlace covalente con un grupo amino) para interaccionar con el compuesto o intermediario mencionado. Esta distancia no podría ser alcanzada por la diamina de 10 carbonos. La actividad observada para las diaminas de cadena corta, correspondería al porcentaje de entidades que tuvieran sus dos grupos amino no protonados, pudiendo penetrar de esta manera la membrana, fácilmente y llegar al sitio de interacción. En la diamina de 12 metilenos, tendríamos el efecto sumatorio de -- las entidades con sus dos grupos amino no cargados y las que tuvieran un grupo protonado y el otro no protonado.

Estos datos son acordes con la proposición hecha por -- Dilley (56), el cual, menciona una concentración local de -- protones en el interior de la membrana como centro donador -- primario de protones para el funcionamiento de la ATPasa en -- la síntesis de ATP, existiendo la condición energética debido a la disposición de diferentes concentraciones (de protones o

electrones] dentro de la membrana, más que de un lado a otro. Estos datos están aunados a los reportados por Straub (57), el cual, menciona evidencias de que el factor de acoplamiento (CF_1) por sí mismo debe estar reducido y protonado para que la síntesis de ATP ocurra.

Por otra parte es interesante también, notar el hecho reportado por Dilley (79) de que, la polilisina, la cual inhibe la formación de ATP, también afecta el transporte de K^+ , de H^+ y los cambios de volúmen a concentraciones elevadas, - indicando que una distorsión de CF_1 , localizado en la parte superficial, incrementa la permeabilidad de la membrana.

Con esta distancia aproximada de interacción en mente, era de esperarse que si pudieramos restringir la movilidad de las aminas y así poder precisar el punto de interacción del grupo amino, tendríamos un efecto diferencial de las aminas - en relación a la distancia a que pudieran penetrar en la membrana, i.e., se esperaría que solo aquellos grupos amino con brazo hidrocarbonado suficientemente largo, podrían ejercer - su efecto desacoplante. Así, se logró esta inmovilización -- del grupo amino, uniéndolo a la sefarosa a través de un brazo lipofílico. Como se puede observar en la fig. 34 se encontró desacoplamiento con la diamina de 12 carbonos unida a sefarosa, y en cambio las longitudes más cortas fallaron como desacoplantes. Estos últimos datos confirman la interpretación del efecto de la diamina libre de 12 carbonos, que se ancla en la membrana desde afuera, con un grupo amino protonado en el exterior y el otro amino no protonado, interaccionando con un sitio específico en el interior de la membrana a 21 Å.

Con estos resultados aparentemente tendríamos que descartar el mecanismo propuesto principalmente por Crofts (4, - 80) para la acción desacoplante de las aminas libres, el cual,

menciona la actuación de estas moléculas (las aminas de cadena corta) como transportadores móviles, i.e., dichas moléculas no protonadas serían capaces de disolverse en la membrana, protonarse en el interior del tilacoide, entonces moverse hacia el exterior de la membrana y perder su ion hidrógeno en el medio externo. La continua entrada y salida de esta molécula causaría una pérdida neta de iones hidrógeno al exterior de la membrana y así permitiría un flujo de electrones más rápido, sin fosforilación. Sin embargo, McCarty ha reportado (81), haciendo ensayos con monoaminas de diferentes longitudes en su brazo hidrocarbonado que al graficar en $\log C_{50}$ (logaritmo de la concentración necesaria para obtener el 50 % de la inhibición de la fotofosforilación) contra el \log del coeficiente de partición octanol/agua (que corresponde gruesamente al coeficiente de permeabilidad), se encontró una pendiente de - 0.35 para aminas desde metil hasta hexilamina, mientras que para las aminas desde hexil hasta nonilamina se encontró un apendiente diferente de - 0.76. Estos resultados indican que las aminas de cadena larga pueden inhibir la fotofosforilación de una manera diferente a las de cadena corta. De hecho se comprobó posteriormente que las aminas de cadena larga inhibían el CF_1 aislado y purificado, mientras que las aminas de cadena corta no lo hacían.

También se contaba con la posibilidad de que este dodecetilendiamina-sefarosa estuviera actuando como detergente y solubilizando algún componente de la membrana al actuar sobre ella, de manera que se produjera el desacoplamiento. Lotina y Dilley (82) midieron cambios de volumen en los cloroplastos, siguiendo el cambio de densidad óptica a 540 nm, y encontraron que la dodecetilendiamina-sefarosa produce hinchamiento constante en estos cloroplastos tanto en la oscuridad como en la luz, teniendo así, el comportamiento clásico del efecto sobre los cambios de volumen producidos por

detergentes como Tritón X-100, del cual se dice, puede crear hoyos en la membrana, por donde los protones escaparían rápidamente como para que se pudiera mantener un gradiente significativo (83). Ahora bien, sería necesario probar el efecto de la sefarosa-dodecametilendiamina para ver si produce la misma respuesta sobre los cambios de volumen del cloroplasto, lo que nos indicaría que en este caso, la acción detergente no es la responsable del desacoplamiento.

De los resultados anteriores es tentador concluir que la sefarosa-dodecametilendiamina pudiera estar interaccionando directamente con el factor de acoplamiento, particularmente con la subunidad F_1 , que se conoce es la que confiere el acoplamiento en los cloroplastos, y que se encuentra enterrada en la parte lipofílica de la membrana, pudiendo simplemente modificarla o perturbarla, aumentando así la permeabilidad de la membrana, o solubilizarla por acción detergente, produciendo también el desacoplamiento.

Como se observa en la fig. 36, la sefarosa-dodecametilendiamina abate completamente la bomba de protones a una concentración 1 mM, lo cual nos indica que la permeabilidad de la membrana está alterada. Esta modificación en la permeabilidad de la membrana confirma lo antes mencionado, sobre la interacción de la amina con el CF_1 . Sería de interés para poder diferenciar entre las dos posibilidades señaladas, el lavar los cloroplastos después de que se ha producido el efecto desacoplante por la sefarosa unida a la dodecametilendiamina y medir nuevamente las fotorreacciones: si la amina actuó simplemente perturbando la ATPasa, el efecto de desacoplamiento sería reversible, por otro lado, si la amina solubilizó componentes de la membrana, entre ellos la subunidad F_1 del factor de acoplamiento, se encontraría en el sobrenadante al

centrifugar y este efecto no sería reversible a menos que se liofilizara el sobrenadante y se agregara nuevamente al cloroplasto que perdió esta subunidad proteica.

Como se puede ver en la fig. 35, la sefarosa unida a la diamina de 12 carbonos tiene un efecto diferencial sobre el transporte de electrones en PS I y en PS II, estimulando notablemente el primero e inhibiendo ligeramente el segundo. De este hecho se desprenden dos puntos: en primera, el efecto que se detecta cuando se mide el transporte de electrones en la cadena completa, puede ser la suma algebraica de los dos efectos presentados sobre los dos fotosistemas independientemente. En segundo lugar, hay algunos reportes (84,85) que nos indican que las aminas libres a altas concentraciones -- inhiben el PS II a nivel de la fotólisis del agua, de esta -- manera, si podemos aumentar el rendimiento de la unión de la dodecametilendiamina libre a la sefarosa para poder tener -- concentraciones finales en el medio de 10^{-2} , 10^{-1} M de la se -- farosa-dodecametilendiamina, obtendríamos posiblemente una -- inhibición mayor del flujo de electrones en PS II. Si al -- añadir un donador artificial de electrones a PS II como sería Mn^{++} , hidroquinonas, fenilendiaminas, difenilcarbazida, hi -- droxilamina, etc., se revirtiera esta inhibición, podríamos -- tener la seguridad de que en fotosistema II la amina está ac -- tuando a nivel del sistema oxidante del agua, y teniendo en -- cuenta que conocemos la distancia de interacción, esto ayuda -- ría en mucho a localizar uno de los sitios más controvertidos en cuanto a su localización dentro de la membrana, como es el sistema de oxidación del agua.

BIBLIOGRAFIA

1. Krogmann, D.W., Jagendorf, A.T. y Avron, M., *Plant -- Physiol.* 34 (1959) 277.
2. Hind, G. y Whittingham, C.P., *Biochim. Biophys. Acta*, 75 (1963) 194.
3. Good, N.E., *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 502.
4. Izawa, B. y Good, N.E., *Biochim. Biophys. Acta*, 109 (1965) 372.
5. Stryer, L., *Bioquímica*, Ed. Reverté (1976) cap. 19.
6. Kirk, J.T.O., *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 21 (1970) 11.
7. Singer, S.J. y Nicholson, L.G., *Paabs Rev.* vol. 2 No. 3 y 4 (1973) 519.
8. Danielli, J.F. y Davson, A.J., *Cell. Comp. Physiol.*, 5 (1935) 495.
9. *Photosynthesis*, eds. Rabinowitch y Govindjee, 1969, Ed. John Willey, cap. 17.
10. French, C.S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 68 (1971) 2893.
11. Rabinowitch y Govindjee, *Photosynthesis*, Ed. John Willey, New York (1969) pag. 107.
12. Fong,
13. Sauer, K. of *Bioenergetics of Photosynthesis*, ed. by Govindjee. Academic Press, New York (1975) cap. 3.
14. Hill, R. y Bendall, F., *Nature, London*, 186 (1960) 136.
15. Arnon, D.I., Knaff, D.B. McSwain, B.D., Chain, R.K. y Tsujimoto, H.Y., *Photochem. Photobiol.*, 14 (1971) 397.
16. Hiyama, T. y Ke, B., *Arch. Biochem. Biophys.*, 147 (1971) 99.

17. Trebst, A., *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 25 (1974) 423.
18. Böhme, H. y Cramer, W., *Biochemistry*, 11 (1972) 1155.
19. Böhme, H. y Cramer, W., *Biochim. Biophys. Acta*, 283
(1972) 302.
20. Forth, G., *Methods in Enzimology*, 23 (1971) 447.
21. Davenport, H.E., *Nature, London*, 199 (1963) 151.
22. Avron, M. y Chance, B., *Brookhaven Symp. Biol.*, 19
(1966) 149.
23. Shin, M., *Methods in Enzimology*, 23 (1971) 440.
24. Buchanan, B.B. y Arnon, D.J., *Methods in Enzimology*,
(1971) 23, 483.
25. Arnon, M., *Current Top. Bioenerg.*, 2 (1967) 1.
26. Trebst, A., *Proc. I-t. Congr. Photosynthesis*, 2nd (G.
Forti et al. eds.), Junk, The Hague, (1972) 399
27. Regitz, G. y Oettmeier, W., *Proc. INT. Congre. Photo-
synthesis 2nd.* (G. Forti et al. eds.) (1972)
499.
28. Marsho, T.V. y Kok, B., *Methods in Enzimology*, 23
(1971) 515.
29. Katoh, S., *Methods in Enzimology*, 23 (1971) 408.
30. Duysens, L.N.M. y Ames, J., *Biochim. Biophys. Acta*,
234 (1962) 381.
31. Böhme, H. y Cramer, W.A., *FEBS lett.*, 15 (1964) 349.
32. Avron, M. *in Bioenergetics of Photosynthesis* ed. by
Govindjee, Academic Press, New York (1975)
cap. 7.
33. Butler, W.L., *FEBS lett.*, 20 (1971) 333.

34. Kok et al, *Photochem. Photobiol.*, 11 (1970) 457.
35. Koenig, F., Menke, W., Craubner, H. Schmid, G. y Radunz, A., *Z. Naturforsch*, 27b (1972) 1225.
36. Arnzten, C.J., Dilley, R.A. y Crane, F.L., *J. Cell. Biol.* 43 (1969) 16.
37. Dilley, R.A., Peters, G.A. y Shaw, E.R., *J. Membrane Biol.* 8 (1972) 163.
38. Witt, H.T., *Quant. Rev. Biophys.*, 4 (1971) 365.
39. Hauska, G.A., *Abstr. 1st. Eur. Biophys. Congr. Baden*, ed. E. Broda (1971).
40. Reinwald, E., Stiehl, H.H. y Rumberg, B., *Z. Naturforsch* 23b (1968) 1616.
41. Braun, B.Z., Govindjee, *FEBS lett.* 25 (1972) 143.
42. Junge, W., *Abstr. Int. Congr. Photobiol. Bochun* (1971)
43. Junge, W. y Witt, H.T., *Z. Naturforsch*, 23b (1968) 244.
44. Moudrianakis, E.N., *Fed. Proc.*, 27 (1968) 1180.
45. McCarty, R.E. y Racker, E., *Brookhaven Symp. Biol.*, 19 (1966) 202.
46. Jagendorf, A.T. in *Bioenergetics of Photosynthesis*, etd. Govindjee, Academic Press Inc. (1975) cap. 9.
47. Slater, E. y Myers, D.K., *Biochem. J.*, 67 (1957) 558.
48. Pinchot, G.B. y Hormanski, M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 48 (1962) 1970.
49. Mitchell, P., *Nature (London)* 191 (1961) 144.
50. Neumann y Jagendorf, A.T., *Arch. Biochem. Biophys.*, 107 (1964) 109.
51. Fowler y Kok, *Biochim, Biophys. Acta*, 357 (1974) 299.

52. McCarty V. Racker, *Brookhaven Symp. Biol.*, 19 (1966) 203.
53. Carmeli, *Biochim. Biophys. Acta*, 376 (1975) 249.
54. Jafendorf, T.A., *Fed. Proc.*, 26 (1967) 1361.
55. Boyer, P.D. in "Oxidases and Related Systems" (T.E. King, H.S. Mason y M. Morrison eds.) vol. II, pag. 994, Willey, N.Y.
56. Dilley, R.A., *Prog. Photosynthesis Res.*, 3 (1968) 1354.
57. Lynn, W.S. y Straub, K.D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 63 (1969) 540.
- 58.- Takaoki, T., Torres-Pereira, J. y Packer, L., *Biochim. Biophys. Acta*, 352 (1974) 160.
59. McCarty, R.E. and Jagendorf, A.T. *Plant. Phisiol.*, 40 (1965) 725.
60. Kates, M. (1970) *Advances in Lipid Research*, vol. 8, pp 225 Academic Press. New York.
61. Murakami, S., Torres-Pereira, J. y Packer, L., (1973) *Bioenergetics of Photosynthesis* (Govindjee ed.) Academic Press, N.Y.
62. Heath, R.L. y Packer, L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 125 (1968) 189.
63. Heath, R.L. y Packer, L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 125 (1968) 850.
64. Strain, H.H. y Svec, W.A., *Methods in Enzimology* (1965)
65. Gottschalk, W. y Maller, F. *Plant*, 61 (1964) 259.
66. Vernon, L.P., *Anal. Chem.*, 32 (1960) 1144.
67. MacKinnev, G., *J. Biol. Chem.*, 140 (1942) 315.
68. March, S.C., Parikh, I. y Cuatrecasas, P., *Anal. Biochem.* 60 (1974) 149.

69. Axen, R. y Porath, J., *Nature*, 214 (1967) 1302.
70. Okuyama, T. y Satake, K., *J. Biochem. (Japan)*, 47 (1960) 654.
71. Satake, K., Okuyama, T., Ohashi, M. y Shinoda, T., *J. Biochem. (Japan)* 47 (1960) 654.
72. Fields, R., *Methods in Enzimology*, 25 (1971) 464.
73. Habeeb, A.F.A., *Anal. Biochem.*, 14 (1966) 328.
74. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry.*
Editors: Bryan L. Williams and Keith Wilson.
Ed. Eduard Arnold. 1975.
75. Clark, L.C., Wolf, R., Granger, D. y Taylor, Z., *J. Appl. Physiol.* 6 (1953) 189.
76. Nishimura, M. Ito, T. y Chance, B., *Biochim. Biophys. Acta* 59 (1962) 177.
77. Chance, B. y Nishimura, M., *Methods in Enzimology* (1965).
78. Dilley, R.A., *Methods in Enzimology* (1970).
79. Dilley, R.A., *Biochemistry*, 7 (1968) 338.
80. Crofts, A.R., *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 242.
81. McCarty, R.E. y Coleman, C.H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 141 (1970) 198.
82. Lotina-Hennsen, B. y Dilley, R.A., En preparación.
83. Neumann, J. y Jagendorf, T.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 109 (1965) 383.
84. Izawa, S., *Encyclopedia of Plant Physiology New Series*, eds. Trebst and Avron, vol. 5
85. Avron, M. y Shavron, N., *Biochim. Biophys. Acta*, 109 (1965) 317.