

11261
Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA

4.
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

RECONSTITUCION EN LIPOSOMAS DEL CORRIMIENTO
ELECTROCROMICO DE
Rhodobacter sphaeroides

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS BIOMEDICAS (BIOQUIMICA)
PRESENTA
JORGE RAFAEL DAVILA MARQUEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

INDICE

	Página
RESUMEN	1
ABREVIATURAS.....	3
CAPITULO 1 INTRODUCCION.....	5
1.1 La ecuación general de la foto- síntesis 1650-1930.....	5
1.2 Bacterias fotosintéticas.....	11
1.2.1 Clasificación de las bacterias fotosintéticas.....	11
1.2.2 Cultivo de bacterias fotosintéticas.....	16
1.2.3 Descripción de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> y <i>Rhodospirillum rubrum</i>	19
1.3 Cromatóforos bacterianos.....	21
1.3.1 Obtención de cromatóforos de bacterias fotosintéticas no sulfurosas.....	22
1.3.1.1 Ruptura mecánica.....	22
1.3.1.1 Rompimiento de proto- plastos bacterianos.....	22
1.4 Unidad fotosintética.....	24
1.4.1 El centro de reacción.....	26

1.4.2	Los complejos antena.....	30
1.5	Los carotenoides y sus características espectrofotométricas.....	37
1.5.1	Cambios en el espectro de absorción de los carotenoides.....	39
1.5.2	Naturaleza electrocrómica del cambio del carotenoide.....	44
CAPITULO 2	OBJETIVOS.....	48
CAPITULO 3	MATERIALES Y METODOS.....	49
3.1	Bacterias.....	49
3.2	Medios de cultivo.....	49
3.2.1	Medio sólido.....	49
3.2.2	Medio líquido.....	50
3.3	Siembra y cultivo de bacterias.....	53
3.3.1	Obtención de inóculos.....	53
3.3.2	Cultivos masivo.....	54
3.3.3	Cosecha de bacterias.....	54
3.4	Obtención de cromatóforos.....	55
3.5	Obtención de los complejos antena.....	56
3.6	Obtención de proteoliposomas.....	58

	Página
3.6.1 Método de obtención de los proteoliposomas.....	59
3.7 Otros métodos.....	60
3.7.1 Determinación del contenido de bacterioclorofila.....	60
3.7.2 Determinación de proteína.....	60
3.7.3 Mediciones de pH.....	61
3.8 Reactivos.....	61
CAPITULO 4 RESULTADOS	62
4.1 De la purificación de los complejos antena B800-850.....	62
4.2 De la purificación de los complejos antena B890.....	65
4.3 De la obtención de proteoliposomas.....	68
4.4 Efecto de la generación de potenciales electroquímicos sobre el espectro de absorción de los proteoliposomas B800-850.....	68
4.5 Espectros diferenciales de proteoliposomas B800-850 al generar un gradiente electroquímico	76

4.6	Relación entre la magnitud del corrimiento del espectro de absorción de los proteoliposomas B800-850 y el potencial establecido a través de la membrana de los mismos.....	82
4.7	Obtención del espectro diferencial en proteoliposomas.....	87
4.8	Efecto del protonóforo CCCP y del intercambiador nigericina sobre el corrimiento del caroteno provocado en los proteoliposomas B800-850 con valinomicina y potasio.....	90
CAPITULO 5	DISCUSION.....	96
5.1	Reconstitución en liposomas de complejos pigmento-proteína.....	96
5.2	Reconstitución en liposomas del corrimiento electrocrómico de los carotenoides.....	97

5.3 Caracterización de la fase
 III del corrimiento elec-
 trocromico de los carote-
 noides..... 99

5.4 Perspectivas..... 99

CAPITULO 6 CONCLUSIONES..... 101

REFERENCIAS..... 102

INDICE DE FIGURAS..... 118

RESUMEN

Reconstitución en liposomas del corrimiento electrocrómico
de *Rhodobacter sphaeroides*.

RESUMEN

En el presente trabajo mediante: la solubilización con el detergente aniónico LiDS y gradientes discontinuos de sacarosa, se obtuvieron complejos antena B800-850 de la bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. Los complejos B800-850 se reconstituyeron en liposomas mediante diálisis. Los complejos solubilizados o reconstituidos no presentaron alteraciones en sus propiedades espectrofotométricas.

En los proteoliposomas B800-850 el establecimiento de potenciales de membrana (mediante valinomicina ó CCCP y gradientes iónicos) provoco la aparición del corrimiento electrocrómico de los carotenoides.

El corrimiento de los carotenoides detectado en los proteoliposomas, fué igual al reportado en cromatóforos. Tanto en lo que se refiere a: la magnitud de los cambios de absorbancia; como en lo referente a: los valores máximos y mínimos del espectro diferencial del corrimiento.

El corrimiento detectado en los proteoliposomas fué directamente proporcional al potencial establecido. También se demostró su reversibilidad al anular el potencial de membrana mediante el intercambiador nigericina.

La aportación del trabajo fué la obtención de un sistema; en donde, sin la presencia de otros complejos pigmento-proteína y bajo condiciones de equilibrio podemos caracterizar la fase III del

. corrimiento electrocrómico de los carotenoides.

Pensamos que el sistema obtenido permitirá en un futuro el estudio del efecto de la carga de superficie sobre este fenómeno. O bien la detección del potencial generado por diferentes sistemas moleculares incorporados al proteoliposoma.

Reconstitution of light harvesting antenna pigments and the associated electrochromic carotenoid band shift into liposomes.

SUMMARY:

The light harvesting antenna complexes (B800-850) were obtained by solubilization with Lithium dodecyl sulfate from chromatophores of Rhodobacter sphaeroides, and purified by sucrose discontinuous density gradient. The complexes obtained showed no differences in their spectrophotometric properties in respect to those obtained by other methods and the native membrane.

The light harvesting complexes (B800-850) were reconstituted into liposomes by the dialysis method and analyzed spectrophotometrically, their properties remain unchanged.

In order to detect the carotenoid band shift a membrane potential was generated in two ways: By the pair valinomycin plus potassium or by uncouplers plus acid or base. The proteoliposomes carotenoid band shift detected was similar in magnitude and in spectral characteristics to those reported in chromatophores.

The electrochemical band shift found in proteoliposomes was proportional to the membrane potential generated by different concentrations of potassium in the presence of valinomycin. In this way a straight line was obtained in the calibration curve.

The proteoliposomes system could be used for detect the potential generated by others proteins and to study the general characteristics of the phenomena.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de Adenosina.	h	Constante de Planck.
B800-850	Complejo antena con máximos de absorción a 800 y 850 nm.	H	Subunidad proteica pesada (heavy) del centro de reacción de <i>Rb. sphaeroides</i> cepa R-26.
B875	Complejo antena con un máximo de absorción a 875 nm.	His	Histidina.
Bcl	Bacterioclorofila.	L	Subunidad proteica ligera (light) del centro de reacción de <i>Rb. sphaeroides</i> cepa R-26.
BSA	Albumina sérica bovina.	LHC I	Complejos antena B870.
CCCP	p-tricloro-metoxi-carbonil-cianuro-fenil-hidrazona.	LHC II	Complejos antena B800-850.
c.e.c.	...	corrimiento electrocrómico de los carotenoides.	Lids	Dodecil sulfato de Litio.
Cl	Clorofila.	M	Subunidad proteica mediana (medium) del centro de reacción de <i>Rb. sphaeroides</i> cepa R-26.
CMC	Concentración micelar crítica.	N	Nigericina.
D.O.	Densidad óptica.	ν	Frecuencia.
DTE	Ditio-eritrol.	OG	Octil glucosido
ΔT	Incremento de transmitancia.	P870	Centro de reacción.
EDTA	Acido etilen diamino tetra-acético.			

R. *Rhodospirillum.*
Rb. *Rhodobacter.*
SDS Dodecil sulfato de
sodio.
Ser Serina.
T Temperatura.
Thr Treonina.
V Valinomicina.

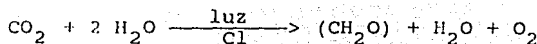
INTRODUCCION

CAPITULO 1 INTRODUCCION

1.1 La ecuación general de la fotosíntesis 1650-1930

Uno de los procesos fundamentales para la existencia de los seres vivos, es sin duda alguna, la fotosíntesis. Gracias a ella la energía luminosa proveniente del sol es convertida a energía química, por los diversos organismos fotosintéticos, siendo almacenada en forma de compuestos biológicos reducidos (Clayton, 1980a). Estos compuestos se transmiten de los organismos autótrofos, denominados productores, a los heterótrofos, denominados consumidores primarios; permitiendo así el comienzo de las diversas cadenas alimenticias en nuestro planeta (Odum, 1980).

El conocimiento que tenemos de la fotosíntesis es un ejemplo de que la ciencia es uno de los productos más elaborados de la actividad humana y como el desarrollo de la misma más allá de la vida o esfuerzo de un solo hombre, ya que es el resultado de los estudios de numerosos investigadores, llevados a cabo a través de siglos de actividad científica. La formulación de la ecuación general de la fotosíntesis oxigénica (ecuación 1.1) es el resultado de casi tres siglos de investigación científica.



Ecuación 1.1

Entre los numerosos investigadores que se abocaron al estudio de la fotosíntesis y cuyo esfuerzo se resume en la ecuación general podemos mencionar a :

Jean Baptiste van Helmont, médico flamenco, quien en el año de 1650 realizó un experimento sembrando un retoño de sauce en una cantidad de tierra, previamente pesada. Al cabo de cinco años y luego de confirmar que el aumento de masa del árbol (100 veces la original) no correspondía a la pérdida en el peso de la tierra (uno de los primeros experimentos biológicos de naturaleza cuantitativa), propuso que las plantas de alguna manera convertían el agua que absorbían en materia orgánica (Clayton, 1980a; Gómez Lojero, 1984). Cabe destacar que si bien sólo señaló una de las sustancias que intervienen en la fotosíntesis, su importancia fue la de demostrar que las plantas no se alimentaban del suelo como era ampliamente aceptado por aquella época. Otro aspecto que debe señalarse es que el experimento lo realizó antes de que Lavoisier enunciara el principio de la conservación de la materia en el siglo XVIII, es decir, que tuvo una visión muy acertada para interpretar que el aumento de masa de las plantas solo podía provenir de la captación de materia de su medio (Clayton, 1980a).

Joseph Priestley, pastor inglés nacido en 1733, realizó experimentos en los que encontró que las plantas, en presencia de luz, producían oxígeno; por decirlo en los términos de esa época, producían aire deflogisticado. El experimento consistió en colocar una candela prendida en un recipiente hermético. Después de quemar la candela se permitió por algún tiempo el crecimiento de una planta de menta, observando que una nueva vela ardía con una llama viva o

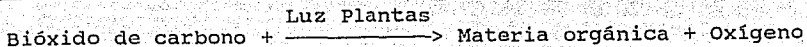
un ratón no sólo no moría sino se comportaba muy vivaz. Señalando así, de manera precisa al oxígeno como uno de los productos de la fotosíntesis en plantas (Gómez Lojero, 1984).

Jan Ingen-Housz, médico holandés, que después de conocer los experimentos de Priesley se dedicó al estudio de la fotosíntesis en plantas, demostró que éstas necesitan sus partes verdes para refrescar el aire y que en la noche lo corrompen igual que lo hacen los animales; es decir, además de señalar los órganos vegetales en que se lleva a cabo este proceso, destacó la imposibilidad de que se lleve a cabo en ausencia de luz (Clayton, 1980a; Gómez Lojero, 1984).

Jean Senebier señaló, en 1782, que las plantas requieren de aire fijo¹ (Gómez Lojero, 1984), como se denominaba al CO_2 , para producir el aire deflogisticado. A pesar de que interpretó correctamente que el aire fijo constituía el alimento de las plantas, se equivocó al señalarlo como la fuente del aire deflogisticado que producían éstas (Gómez Lojero, 1984). Esta idea fué ampliamente aceptada y persistió incluso hasta principios de nuestro siglo.

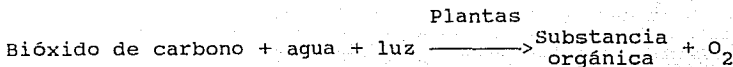
Ingen-Housz, en el año de 1796, y utilizando la nomenclatura dada por Lavoisier, sugiere que la fuente de la materia viva en las plantas era el CO_2 y que el proceso de la fotosíntesis podría representarse por la ecuación 1.2 (Gómez Lojero, 1984):

¹ Descrito por J. Black en 1754



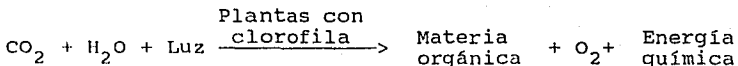
Ecuación 1.2

Nicolas Théodore de Saussure, químico suizo, en 1804, con base en el principio de la conservación de la materia, replantea las conclusiones de Van Helmont diciendo que la mayor parte del peso ganado por el sauce corresponde al CO₂ absorbido por la planta y que sólo una parte corresponde al agua (Clayton, 1980a; Gómez Lojero, 1984) por lo que a partir de él podríamos reescribir la ecuación 1.2 de la siguiente manera:



Ecuación 1.3

Julius Robert von Mayer, cirujano alemán, quien en 1840 desarrolló en forma paralela a Joule el principio de la conservación de la energía, señaló en 1845: "la energía tomada por las plantas en forma de luz solar es almacenada, en parte, en forma de energía química como el azúcar que producen" (Clayton, 1980a; Gómez Lojero, 1984). Después de sus trabajos y del aislamiento de la clorofila por P.J. Pelletier y J.B. Bienaimé en 1817 (Gómez Lojero, 1984), la ecuación de la fotosíntesis pudo escribirse en términos de materia y energía como:



Ecuación 1.4

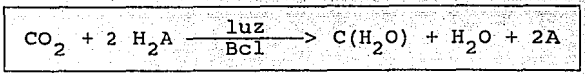
Jean Baptiste Boussingault, químico agrícola francés, redeterminó en 1864 el intercambio gaseoso (de O_2 y CO_2) de las plantas durante el proceso de fotosíntesis. Al obtener un valor cercano a la unidad para el cociente fotosintético (inverso del respiratorio CO_2/O_2), concluyó que la materia orgánica sintetizada en forma primaria debería ser un carbohidrato, señalando así que la fotosíntesis era el proceso inverso de la respiración (Gómez Lojero, 1984).

Sachs, botánico alemán, en 1864 demostró que durante la fotosíntesis existe una acumulación de almidón. Pfetter en 1873 demuestra que dicha acumulación no se presenta si se priva a la planta de CO_2 (Gómez Lojero, 1984).

Los químicos R. Willstätter y A. Stoll en 1913 y 1918 trataron de explicar el mecanismo de acción de la clorofila con sólo las bases de química orgánica de la época. sugirieron que el agua y el bióxido de carbono reaccionaban para formar ácido carbónico, el cual, al interaccionar con la clorofila y en presencia de luz, formaba un organoperóxido capaz de liberar oxígeno. De haber resultado esto cierto, el primer producto de la fotosíntesis sería formaldehído, el cual nunca pudo detectarse en plantas a pesar de haberse buscado ampliamente (Clayton, 1980a).

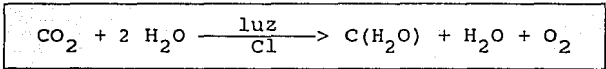
En el presente siglo, en la década de los 30's, van Niel demostró que en algunas bacterias sulfurosas la cantidad de CO_2 captado es proporcional a la cantidad de azufre depositada por las mismas en el medio. Foster, alumno de van Niel, encontró en una especie de rodospirilacea que la cantidad de CO_2 captado era proporcional a la cantidad de isopropanol oxidado hasta acetona. A

partir de estos estudios, van Niel generalizó la reacción para las bacterias fotosintéticas como se muestra en la ecuación 1.5 (Clayton, 1980a; Gómez Lojero, 1984).



Ecuación 1.5

En la ecuación 1.5 se observa como el CO_2 es reducido hasta una unidad de carbohidrato, al mismo tiempo que un substrato reducido H_2A es oxidado hasta 2A y H_2O . A partir de ésto, van Niel sugirió que la fotosíntesis oxigénica podía replantearse de acuerdo con la ecuación 1.6 (Clayton, 1980a; Gómez Lojero, 1984).



Ecuación 1.6

En esta ecuación la substancia que se oxida es el agua y el producto reducido es el $\text{C}(\text{H}_2\text{O})$. Esta ecuación es la ecuación general de la fotosíntesis oxigénica.

La formulación de la ecuación anterior, a partir del estudio de la biología comparada de bacterias que llevan a cabo fotosíntesis anoxigénica, es un ejemplo de como este tipo de microorganismos, al poseer una fotosíntesis más simple que la de organismos con fotosíntesis oxigénica, son un modelo de gran utilidad para la investigación en fotosíntesis.

1.2 Bacterias fotosintéticas

Las bacterias fotosintéticas empezaron a estudiarse desde el siglo pasado. Corresponde a Endelmann, en el año de 1888, identificar a "la luz" como un factor determinante para el desarrollo de este tipo de microorganismos (Van Niel, 1971). En el mismo año, Winogradsky, en forma independiente a Endelmann, descubre y da a conocer que las bacterias fotosintéticas (sulfurosas) requieren, para su establecimiento, de una fuente de H_2S y desarrolla un método para cultivarlas en el laboratorio (Van Niel, 1971).

1.2.1 Clasificación de las bacterias fotosintéticas

De acuerdo a la taxonomía tradicional las bacterias fotosintéticas pertenecen al orden Rhodospirillales. Orden en el que se incluye a los microorganismos que contienen bacterioclorofila y llevan a cabo fotosíntesis en forma anoxigénica (Pfennig y Trüper, 1974; Trüper, 1976).

Las Rhodospirillales se subdividen en dos subordenes: a) Chlorobiineae y b) Rhodospirillineae.

Los microorganismos del suborden Chlorobiineae reciben comúnmente el nombre de bacterias verdes, poseen los siguientes pigmentos: a) Bacterioclorofilas c, d o e, y en mucho menor proporción la a. y b) carotenos monocíclicos. Los pigmentos

mencionados se encuentran en estructuras membranales, que reciben el nombre de clorosomas (antes llamadas vesículas clorobium). Estas estructuras son vesículas oblongas que se encuentran en la periferia de la bacteria (Staehein y col. 1978; Staehein y col. 1980) y enlazadas por una estructura lipídica 2 ó 3 nm más delgada que una verdadera bicapa y se ligan a la membrana plasmática vía un plato basal. Sin embargo hasta el momento, la ontogenia tanto de los clorosomas como de sus estructuras de unión, no se ha esclarecido (Staehein y col. 1980). Este suborden se divide en dos familias: la Chlorobiaceae y la Chloroflexaceae.

Suborden Rhodospirillineae. Los integrantes de este suborden reciben el nombre común de bacterias púrpuras. Sus pigmentos son: A) Bacterioclorofilas a o b y B) Carotenos de tipo acíclico. Estos pigmentos se encuentran colocados en sistemas membranales intracitoplasmáticos, que son continuación de la membrana plasmática.

El suborden se subdivide en tres familias: a) la Chromatiaceae (bacterias púrpuras sulfurosas) antes Thiorhodaceae. b) La Rhodospirillaceae (bacterias púrpuras no sulfurosas) antes Athiorhodaceae y c) la Ectothiorhodospiraceae que se clasificaba anteriormente como el género Ectothiorhodospira (Imhoff, 1984).

Las bacterias de la familia Chromatiaceae son capaces de oxidar ácido sulfhídrico, azufre y tiosulfatos. Son anaerobios obligados y no presentan crecimiento en la obscuridad. Su crecimiento es masivo, abarcando numerosos y variados habitats.

A diferencia de los microorganismos de la familia anterior, las bacterias de la familia Rhodospirillaceae oxidan compuestos orgánicos y en algunas especies hidrógeno molecular. Son aerobios facultativos y en condiciones de aerobiosis son capaces de crecer en la oscuridad. Su crecimiento no es masivo y sus habitats se restringen a charcas de agua dulce; es decir, medios orgánicos simples en donde no se alcanzan condiciones extremas de salinidad o temperatura.

La división taxonómica del orden Rhodospirillales se resume en el cuadro de la figura 1.1.

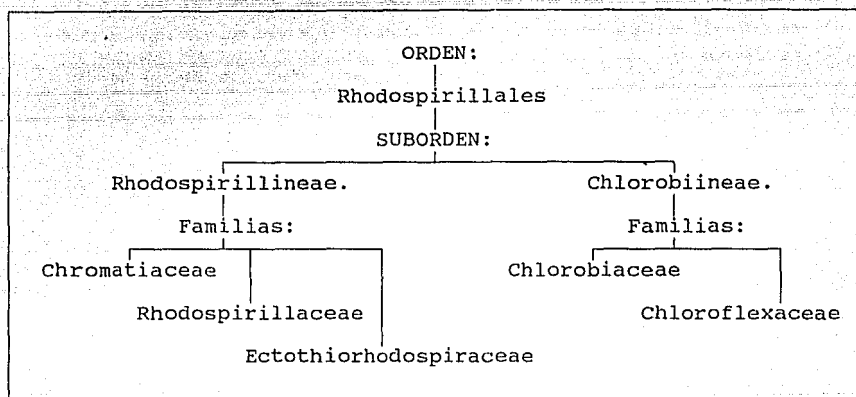


Figura 1.1 Taxonomía del orden Rhodospirillales.

Las bacterias que se utilizaron en el presente trabajo pertenecen a la familia Rhodospirillaceae su clasificación a partir de orden se muestra en el cuadro de la figura 1.2.

Orden:	Rhodospirillales
Suborden:	Rhodospirillineae
Familia:	Rhodospirillaceae
Géneros:	Rhodobacter (Imhoff y col. 1984) Rhodospirillum
Especies:	sphaeroides rubrum

Figura 1.2 Clasificación taxonómica de las bacterias fotosintéticas *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodospirillum rubrum*.

Otra forma de clasificación es la propuesta por Woese (Woese, 1987). Esta se hace con base en la secuencia de nucleótidos en el RNA ribosomal de los diferentes microorganismos. En la figura 1.3 se presenta el árbol filogenético propuesto por Woese.

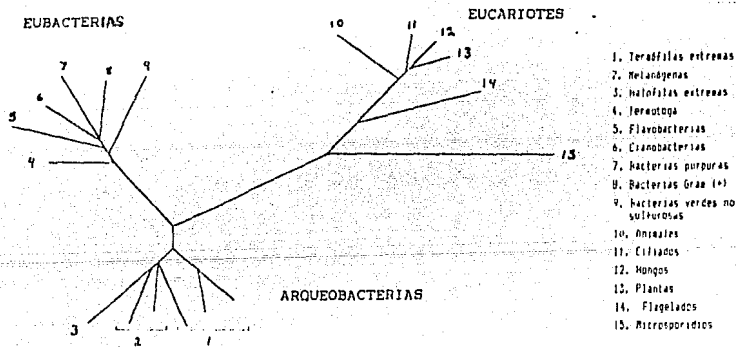


Figura 1.3 Arbol filogenético determinado por comparación de secuencias de RNA ribosomales. Tomado de Woese 1987.

Woese explica que el concepto de grupo debe subordinarse a la similitud en las secuencia de los nucleotidos sin importar que el fenotipo, tomado hasta ahora como criterio de clasificación, resulte incongruente. Esto se hace aparente al observar bacterias fotosintéticas en el mismo grupo que bacterias fijadoras de nitrógeno o aún bacterias patógenas (ver la figura 1.4).

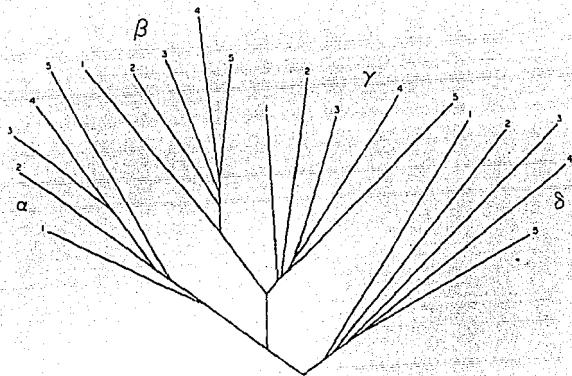


Figura 1.4 Arbol filogenético de las bacterias púrpuras. Con base en una distancia matricial evolutiva. Las secuencias utilizadas fueron para la División α : 1) *Rhodospirillum rubrum*. 2) *Agrobacterium tumefaciens*. 3) *Rhodopseudomonas palustris*. 4) *Rhodopseudomonas acidophila*. 5) *Rhodobacter capsulatum*. Para la subdivisión β : 1) *Neisseria gonorrhoeae*. 2) *Spirillum volutans*. 3) *Nitrosolobus multififormis*. 4) *Rhodocyclus gelatinosa*. 5) *Rhodocyclus pupureus*. Para la subdivisión γ : 1) *Chromatium vinosum*. 2) *Legionella pneumophila*. 3) *Pseudomonas aeruginosa*. 4) *Acinetobacter calcoaceticus*. 5) *Escherichia coli*. Para la subdivisión δ : 1) *Myxococcus xanthus*. 2) *Desulfovibrio desulfuricans*. 3) *Bdellovibrio stolpii*. 4) *Desulfotobacter postgatei*. 5) *Desulforomonas acetoxidans*. Tomado de Woese 1987.

El análisis de la secuencia de nucleótidos, además de servir como criterio de clasificación, aporta datos respecto a las relaciones evolutivas entre los organismos. De tal manera que al analizar, por ejemplo, el grupo de las bacterias púrpuras podemos esperar: que el ancestro común fuese una bacteria púrpura fotosintética. Ya que la capacidad fotosintética es una característica tan compleja, que su amplia distribución solo puede explicarse suponiéndola el carácter original. Carácter que se perdió en muchos miembros del grupo bajo diferentes condiciones y épocas.

De acuerdo a la propuesta de Woese *Rhodospirillum rubrum* pertenece al subgrupo $\alpha - 1$ de las bacterias púrpuras y *Rhodobacter sphaeroides* pertenece al subgrupo $\alpha - 3$ de las bacterias α -púrpuras.

1.2.2 Cultivo de bacterias fotosintéticas.

El primer método para cultivar bacterias fotosintéticas fue el ideado por Winogradsky (van Niel, 1971), quien estableció cultivos mixtos; es decir, en compañía de otros microorganismos, utilizando columnas de vidrio que llevan su nombre. Estas columnas se llenaban de agua. Y en la superficie se colocaba material biológico de descomposición lenta, como podrían ser raíces o celulosa, mezclado con lodo proveniente del habitat natural de las bacterias a cultivar. De esta manera, la mezcla no sólo se convertía en un soporte para el desarrollo de los microorganismos, sino contenía el inóculo de los mismos. Cuando se colocaban las columnas en la obscuridad, en la parte cercana al lodo se

- desarrollaban bacterias fermentativas provocando la descomposición del material biológico y enriqueciendo el medio con H_2S y sustancias orgánicas simples. Al mismo tiempo hacia el fondo de la columna se establecía un gradiente de concentración de oxígeno. Bajo estas condiciones, al colocar las columnas en la luz, empezaba el desarrollo de las bacterias fotosintéticas anoxigénicas. Se establecía así el ciclo de materia que se esquematiza en la figura 1.5.

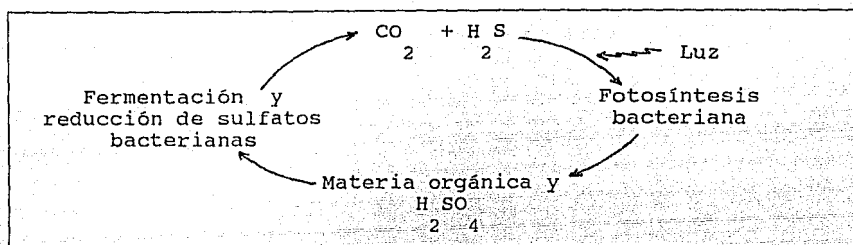


Figura 1.5 Ciclo primitivo de materia (van Niel, 1971).

El ciclo de materia, esquematizado en la figura 1.5, corresponde al que se establece en los lagos donde se desarrollan en la actualidad bacterias fotosintéticas (Takahashi e Ichimura, 1968; Culver y Brunskill, 1969). En éstos el gradiente de concentración de oxígeno y la transmisión de luz de diferentes longitudes de onda, a diferentes profundidades, provocan una estratificación bien definida en cuanto a las clases de organismos que se distribuyen de acuerdo a la profundidad.

Cabe señalar, por otra parte, que de acuerdo a la idea que tenemos de la evolución en nuestro planeta, el esquema

correspondería a las condiciones de hace 2.5 o 3 mil millones de años; es decir, a una atmósfera libre de oxígeno (Mayr, 1978), antes de la aparición de las cianobacterias productoras de oxígeno, que fueron las que cambiaron, a través de millones de años las condiciones de la atmósfera primitiva (Schopf, 1978).

Las columnas de Winogradsky o las de Molisch (en las que el material biológico era un pedazo de tejido animal) presentan el inconveniente de que su éxito depende del establecimiento temprano de microorganismos fermentativos que modifican, en forma no controlada, el medio de cultivo original. Dicha modificación se refleja en el desarrollo posterior de las bacterias fototrópicas. Por esta razón se consideran adecuadas sólo para la obtención de inóculos enriquecidos en organismos fototrópicas, tal y como las utilizó Larsen en 1952 (van Niel, 1971).

El diseño y desarrollo de medios, en los que la composición fuese plenamente controlable, significó un gran avance. Pfennig diseñó un medio mineral para el cultivo de la mayoría de las bacterias fotosintéticas sulfurosas y posteriormente lo modificó con Lippert (Pfennig y Lippert, 1966). Este medio no permite el desarrollo de aquellas bacterias que requieren de vitamina B₁₂, por lo que esta vitamina debe adicionarse a fin de asegurar un medio adecuado para el desarrollo de estos organismos.

En el caso de las bacterias fotosintéticas no sulfurosas el medio debe contener además de la base mineral, substratos

oxidables tales como: alcoholes primarios o secundarios, ácidos grasos o aromáticos, o ácido succínico. Debe evitarse (en la etapa de aislamiento del organismo que nos interese) la presencia de sulfatos o nitratos, a fin de eliminar el posible desarrollo de bacterias reductoras de estos compuestos. La adición de vitaminas es necesaria, pues como lo demostró Hutner (Hutner, 1946 y 1950), las diversas especies muestran requerimientos muy específicos de este tipo de compuestos.

1.2.3 Descripción de *Rhodobacter sphaeroides* y

Rhodospirillum rubrum

Estas bacterias pertenecen al grupo de las bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas (Pfennig, 1967 y 1978; Pfennig y Trüper 1983), su división es por fisión binaria y presentan la siguiente estructura:

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria ovoidea que mide de 2 a 2.5 μm de largo por 0.7 μm de ancho. *Rhodospirillum rubrum* presenta la forma de espirilo, mide 0.8 μm de ancho por 7 a 10 μm de largo. Ambas poseen flagelos polares. Presentan pared celular separada de la membrana plasmática por el espacio periplasmático (Remsen, 1980). Su sistema de transporte de electrones se encuentra en la membrana plasmática (Crofts, 1974), lo mismo que el aparato fotosintético. Cuando se crecen en condiciones fotosintéticas forman un sistema de invaginaciones de la membrana plasmática (Holt y Marr, 1965) hacia el citoplasma. Esta se denominan cromatóforos. En el espacio periplásmico se

encuentran proteínas que participan en el transporte de electrones como el citocromo c_2 .

Ambas bacterias son fotoheterotróficas; es decir, que en condiciones de anaerobiosis y luz son capaces de llevar a cabo el proceso de fotosíntesis, y que en condiciones de aerobiosis y obscuridad obtienen su energía de la oxidación de compuestos orgánicos (bajo estas últimas condiciones el sistema de cromatóforos no se desarrolla). En condiciones de obscuridad y anaerobiosis obtienen su energía mediante fermentación (Kohlmiller Jr. y Gest, 1951; Uffen y Wolfe, 1970).

El cultivo fotosintético de *Rb. sphaeroides* es de un color café rojizo, mientras que el de *R. rubrum* es rojo. Ambas bacterias requieren como factor de crecimiento biotina, pero *Rb. sphaeroides* también requiere niacina y tiamina (Hutner, 1946 y 1950; Trüper y Pfennig, 1978).

Como otras características que podemos señalar están: *Rb. sphaeroides* posee sólo ubiquinona₁₀ y los carotenos esferoidenona y el esferoideno, mientras que *R. rubrum* contiene ubiquinona₁₀, rodoquinona y como caroteno predominante la espiriloxantina.

Rb. sphaeroides posee los complejos pigmento-proteína B800-850 y B875, en cambio *R. rubrum* sólo presenta el B890 (Broglie y col., 1980).

1.3 Cromatóforos bacterianos

Cuando *Rb. spaheroides* o *R. rubrum* se cultivan en condiciones fotosintéticas desarrollan un sistema de membranas que se extiende hacia el citoplasma bacteriano (Tuttle y Gest, 1959; Frenkel y Hickman, 1959; Holt y Marr, 1965b), el cual se origina a partir de la membrana citoplasmática y nunca pierde su continuidad con la misma. Es en este sistema en donde se encuentra el aparato fotosintético de estas bacterias y recibe el nombre de cromatóforos.

Las vesículas obtenidas de bacterias fotosintéticas, crecidas en condiciones de iluminación y anaerobiosis, que contienen los pigmentos fotosintéticos de las células originales, y por lo tanto derivadas del sistema de membranas (cromatóforos) descritos en el párrafo anterior, fueron designadas, al principio, también como cromatóforos, que significa portadores de color (Schachman y col. 1952; Frenkel y Nelson, 1971). Debido a que estas vesículas no son unidades independientes en la arquitectura bacteriana (Tuttle y Gest, 1959; Frenkel y Hickman, 1959; Holt y Marr, 1965b) Kamen propuso la utilización del término fragmentos cromatofóricos para designarlas; sin embargo, este término no ha sido usado en forma tan amplia como el original. Además de lo anterior, el término cromatóforo se aplica en forma inespecífica a estructuras coloreadas de plantas y animales, por lo cual Frenkel y Nelson proponen el uso del término cromatóforos bacterianos o cromatóforos derivados de bacterias fotosintéticas (Frenkel y Nelson, 1971). En el presente trabajo se utilizarán cualquiera de estos dos términos.

1.3.1 Obtención de cromatóforos de bacterias fotosintéticas no sulfurosas

La obtención de cromatóforos bacterianos involucra la eliminación de la cápsula bacteriana y el rompimiento de la red de membranas fotosintéticas en el interior de las bacterias, lo que puede lograrse por cualquiera de los siguientes métodos:

1.3.1.1 Ruptura mecánica

El rompimiento de las células y la dispersión de su contenido se logra por:

- Sonicación: en el que las bacterias se someten a ultrasonido (Karunairatnam, 1958; Frenkel y Nelson, 1971).

- Mediante el uso de la prensa de French: en la que por cambios de presión se logra el rompimiento (Newton y Newton, 1957; Frenkel y Nelson, 1971).

- Molido con alúmina: que fue el primer método reportado (Schachman y col. 1952; Frenkel y Nelson, 1971).

1.3.1.2 Rompimiento de protoplastos bacterianos

Este método implica, en primer lugar, la obtención de protoplastos; es decir, la eliminación de la pared celular de las bacterias mediante la adición de lisozima, y en segundo, el rompimiento propiamente dicho, lo que puede lograrse por choque

osmótico o por homogenización suave de los protoplastos obtenidos (Karunairatnam y col. 1958; Frenkel y Nelson, 1971).

Cualquiera que sea el método con el que se haya logrado el rompimiento del sistema de membranas, es necesario eliminar la presencia del DNA bacteriano, debido a que provoca una gran viscosidad, lo que dificulta el manejo de la suspensión. Esta eliminación se logra mediante la adición de la enzima DNAasa (Frenkel y Nelson, 1971), después de lo cual la eliminación de otras estructuras como cápsulas, membranas íntegras y ribosomas se logra mediante el uso de uno de los siguientes métodos: centrifugación diferencial o centrifugación en gradientes (Frenkel y Hickman, 1959; Oelze y col. 1969; Holt y Marr, 1965b; Gorchein y col. 1968).

Una característica importante de los cromatóforos bacterianos consiste en que la polaridad de su membrana es contraria a la que se presenta en la bacteria íntegra. Esto se demostró en experimentos donde se observó el movimiento de H' (Mitchell, 1967; Scholes y col. 1969) bajo condiciones de iluminación y por estudios con anticuerpos anti-citocromo c_2 y anticentros de reacción (Oelze y col. 1969).

La integridad de la membrana en los cromatóforos bacterianos, preparados por cualquiera de los métodos descritos, puede confirmarse al ver que son capaces de llevar a cabo las

siguientes reacciones fotoquímicas (Mitchell, 1967; Scholes y col. 1969):

- Cambios de pH en el medio.
- Movimiento de iones a través de la membrana.

1.4 Unidad fotosintética

Emerson y Arnold en 1932, al someter a destellos cortos de luz el alga verde *Chlorella pyrenoidosa*, descubrieron que era necesario que entre dichos destellos hubiese un periodo de obscuridad (mayor de 0.04 segundos) para lograr un máximo de eficiencia en cuanto a la producción de O_2 (Emerson y Arnold, 1932). Esto lo interpretaron como el hecho de que la maquinaria química involucrada en la producción del oxígeno requería de ese tiempo para alcanzar las condiciones iniciales en las cuales se había logrado la captación de luz; es decir, que se completara un ciclo. Utilizando diferentes intensidades de luz determinaron, además, que se producía una molécula de oxígeno por cada 8 cuantos de luz absorbidos (Emerson y Arnold, 1932b), y que el máximo de eficiencia se alcanzaba cuando participaban 2,400 moléculas de clorofila (1 O_2 /2,400 Clorofilas) lo cual indicaba que el proceso de fotosíntesis es altamente cooperativo. Emerson y Arnold designaron a estas clorofilas, junto con la maquinaria química necesaria para la producción de oxígeno, como unidad fotosintética. Actualmente se puede aislar a la unidad fotosintética, que es el conjunto de complejos antena (o cosechadores de luz) y centros de reacción (Loach y col. 1963; Kuntz y col. 1964).

Los complejos antena son los encargados de captar la luz y transmitir la energía hacia el centro de reacción. Los centros de reacción son los que llevan a cabo la fotoquímica primaria; es decir, la transferencia de un electrón a un aceptor primario (Feher y Okamura, 1978). Con lo que se inicia el flujo de electrones a través de la cadena fotosintética de la bacteria.

Glazer ha señalado en plantas (Glazer, 1987) que los complejos antena se encuentran formando: 1) un núcleo (región central invariable) alrededor del centro de reacción. 2) Una región periférica rodeando el núcleo antes mencionado. En la región periférica se pueden distinguir dos tipos de complejos antena. Los complejos antena cercanos y los periféricos o móviles. Estos últimos deben su nombre a que pueden ser removidos de la unidad por fosforilación. La cantidad presente de los complejos antena móviles (LHCII móviles) depende de las condiciones de iluminación en las que se desarrolle la planta. En bacterias fotosintéticas que poseen más de un tipo de complejos antena ésta puede ser la estructura existente. Varga y Staehelin, en 1983, propusieron un modelo para la unidad fotosintética de *Rhodospseudomonas palustris*. En este modelo se presenta un núcleo de complejos B875 (LHC I) rodeando al centro de reacción y alrededor de este los complejos B800-850 (LHC II). Estos últimos (al igual que los móviles en plantas) son variables, conforme a las condiciones de iluminación a las que se exponga el cultivo.

1.4.1 El centro de reacción

La purificación de los centros de reacción se logró, mediante dos metodologías diferentes: la primera la destrucción selectiva de complejos antena; se llevo a cabo en la mutante R-26 de *Rhodopseudomonas sphaeroides* por feofitinización *in vivo* y en cromatóforos de la misma bacteria por iluminación en presencia del detergente Triton X-100 (Clayton, 1963). Lo anterior también se demostró en cromatóforos de cepas silvestres de *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum* y *Cromatium vinosum* se logró mediante la utilización de K_2IrCl_6 (Loach y col. 1963; Kuntz y col. 1964). La segunda fue el aislamiento de una mutante carente del complejo P_{870} . Mutante que posee complejos antena normales pero se comporta como heterótrofo obligado (Sistrom y Clayton, 1964). Este término ha sido utilizado para designar diferentes tipos de preparaciones enriquecidas en estos complejos pigmento-proteína pero que contienen diferentes elementos de la membrana de los cromatóforos como contaminantes (Reed y Clayton, 1968; Gringas y Jolchine, 1969).

La purificación de los centros de reacción, en diversas bacterias fotosintéticas involucra la solubilización con detergentes tales como: el SDS (dodecil sulfato de sodio) (Segen y Gibson, 1971; Sloten, 1972), el CTAB (Bromuro de cetil trimetil amonio) (Reiss-Husson y Jolchine, 1972) y el LDAO (óxido de dodecil dimetil amino) Clayton y Wang, 1971; Feher, 1971; Noël y col. 1972).

Ampliando la definición dada en párrafos anteriores, podemos decir que el centro de reacción es la entidad química mínima capaz de llevar a cabo la fotoquímica primaria (Okamura y

col. 1974; Feher y Okamura, 1978); es decir, que al recibir la energía luminosa, ya sea en forma directa o transmitida desde los complejos antena, son capaces de separar una carga, generando un reductor fuerte que se oxida al reducir al aceptor primario (que en las bacterias fotosintéticas es el complejo ferro-quinona (Celis, 1985)) y que vuelve a su estado reducido al captar un electrón desde el citocromo c_2 . La actividad fotoquímica descrita provoca cambios en los espectros de absorción de los centros de reacción. De dichos cambios el más notable es el blanqueo reversible a 865 nm (Duysens, 1952) que presenta un tiempo de decaimiento de 30 ms y se presenta a bajas temperaturas (80 ° K) (McElroy y col. 1974). Por lo anterior puede asegurarse que no está influenciada por el resultado de reacciones secundarias o terciarias respecto a la separación de carga en el centro de reacción y por lo tanto puede ser utilizado como monitor de la actividad fotoquímica en una preparación (Feher y Okamura, 1978).

La composición de los centros de reacción se encuentra plenamente caracterizada a partir de numerosas investigaciones. Sabemos que en la cepa R-26 de *Rhodospseudomonas spheroides* poseen tres subunidades proteicas (Feher, 1971; Feher y col. 1971; Feher y Okamura, 1978) denominadas: L, M y H (del inglés lighth, medium y heavy) y que corresponden a 21, 24 y 28 \pm 1 kdaltons de peso molecular aparente determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (Okamura y col. 1974). Esta composición es semejante en varias especies (Feher y col. 1971; Clayton y Heselkorn, 1972; Noël y col. 1972; McElroy y col. 1974; Okamura y col. 1974; Nieth y col. 1975).

col. 1974; Feher y Okamura, 1978); es decir, que al recibir la energía luminosa, ya sea en forma directa o transmitida desde los complejos antena, son capaces de separar una carga, generando un reductor fuerte que se oxida al reducir al aceptor primario (que en las bacterias fotosintéticas es el complejo ferro-quinona (Celis, 1985)) y que vuelve a su estado reducido al captar un electrón desde el citocromo c_2 . La actividad fotoquímica descrita provoca cambios en los espectros de absorción de los centros de reacción. De dichos cambios el más notable es el blanqueo reversible a 865 nm (Duysens, 1952) que presenta un tiempo de decaimiento de 30 ms y se presenta a bajas temperaturas (80 ° K) (McElroy y col. 1974). Por lo anterior puede asegurarse que no está influenciada por el resultado de reacciones secundarias o terciarias respecto a la separación de carga en el centro de reacción y por lo tanto puede ser utilizado como monitor de la actividad fotoquímica en una preparación (Feher y Okamura, 1978).

La composición de los centros de reacción se encuentra plenamente caracterizada a partir de numerosas investigaciones. Sabemos que en la cepa R-26 de *Rhodospseudomonas spheroides* poseen tres subunidades proteicas (Feher, 1971; Feher y col. 1971; Feher y Okamura, 1978) denominadas: L, M y H (del inglés ligh, medium y heavy) y que corresponden a 21, 24 y 28 ± 1 kdaltons de peso molecular aparente determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (Okamura y col. 1974). Esta composición es semejante en varias especies (Feher y col. 1971; Clayton y Heselkorn, 1972; Noël y col. 1972; McElroy y col. 1974; Okamura y col. 1974; Nieth y col. 1975).

Los cofactores en el centro de reacción de la mutante R-26 de *Rhodopseudomonas sphaeroides* son: cuatro bacterioclorofilas (Steiner y col. 1974; Sauer, 1974) con máximos en el espectro de absorción a 865 y 800 nm (Sauer, 1974). Dos feofitinas con un máximo de absorción a 760 nm (Sauer, 1974). Un fierro no hémico que fue determinado mediante espectroscopía de absorción atómica (McElroy y col. 1970). Y finalmente dos ubiquinonas (Slooten, 1972; Parson y Cogdell, 1975; Feher y col. 1972).

En los centros de reacción de cepas silvestres de *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodospirillum rubrum* encontramos también carotenos. En el caso de *Rb. sphaeroides* el caroteno es esferoideo (Beugeling y col. 1972; Jolchine y Reiss-Husson, 1975; Cogdell y col. 1976) mientras que en el de *R. rubrum* es espiriloxantina (Smith y col. 1972; van der Rest y Gringas, 1974).

A partir de la cristalización del centro de reacción de *Rhodopseudomonas viridis* (Michel, 1982), aunado a la secuenciación de las subunidades proteicas (Michel y col. 1985; Michel y col. 1986; Weyer y col. 1987) y al análisis por difracción de rayos X (Deisenhofer y col. 1984; Deisenhofer y col. 1985; Michel y Deisenhofer, 1986), se estableció un modelo estructural (Deisenhofer y Michel, 1988). En este modelo se observa que las subunidades L y M cruzan la membrana varias veces, uniéndose en la parte periplásmica con el 4-hemo citocromo y por la citoplasmática con una gran porción globular de la subunidad H cuya parte amino terminal se introduce en la membrana. Las subunidades L y M alojan de manera simétrica a los cofactores en dos ramas, A y B. De tal manera que cerca del lado periplásmico encontramos al dímero de

• bacterioclorofila seguido en cada rama por el monómero de bacterioclorofila encontrándose después la feofitina para terminar en las dos posiciones que fijan una menaquinona y la otra una ubiquinona del lado citoplásmico. Esta última quinona presumiblemente se pierde en el proceso de purificación (Deisenhofer y col. 1984; Deisenhofer y col. 1985; Michel y Deisenhofer, 1986; Deisenhofer y Michel, 1988).

La estructura de los centros de reacción de algunas bacterias fotosintéticas es semejante. Allen ha reportado diferencias mínimas entre los centros de reacción de *Rhodospseudomonas viridis* y los de *Rhodobacter sphaeroides* cepas R-26 y 2.4.1 (Allen y col. 1988). La cepa R-26 presenta como característica única la de carecer de carotenos. En la cepa 2.4.1 el caroteno se acomoda siguiendo una curvatura que ocupa el centro hidrofóbico de la subunidad M cerca del monómero de bacterioclorofila de la rama B. Y se encuentra rodeado de gran cantidad de residuos de aminoácidos aromáticos.

En el caso del centro de reacción de *Rb. sphaeroides* cepa Y, se ha reportado que la mayor parte del ión metálico presente en los centros de reacción es Mn^{2+} en lugar del Fe^{2+} como se ha mencionado para otros centros de reacción (Ducruix y col. 1988).

1.4.2 Complejos antena

Como se mencionó anteriormente, la mayor parte de la bacterioclorofila presente en la membrana de los cromatóforos bacterianos se encuentra formando parte de los complejos pigmento-proteína llamados complejos antena o cosechadores de luz (Clayton, 1980c; Cogdell y Thornber, 1980). La función de estos complejos es la de captar la energía luminosa y encauzarla hasta los centros de reacción (Clayton, 1980c; Cogdell y Thornber, 1980). La relación que existe entre los complejos antena y los centros de reacción es variable, dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo. Su valor puede ir desde 50 hasta 100 complejos antena por cada centro de reacción (Clayton, 1980b y 1980c).

Este tipo de complejos ha sido ampliamente caracterizado en diferentes especies de bacterias fotosintéticas (Amez y Knaff, 1988). La extracción de estos complejos de la membrana del cromatóforo se ha logrado mediante la utilización de detergentes como el Triton X-100 (Sauer y Austin, 1978), el SDS (Sauer y Austin, 1978) y el LiDS (Broglie y col. 1980). Dependiendo del detergente utilizado es posible obtener unidades monoméricas o grandes agregados (Sauer y Austin, 1978). Dado que el tratamiento con detergentes puede provocar alteraciones tanto en la estructura como en la composición de los complejos pigmento-proteína, se han utilizado sus cualidades espectrofotométricas y sus espectros de dicroísmo circular para monitorear la conservación de sus propiedades durante su purificación (Broglie y col. 1980; Sauer y

Austin, 1978; Hayashi y Morita, 1980; Clayton y Clayton, 1981; Kramer y col. 1984; Cogdell y col. 1982; Drews, 1985; Cogdell y Thornber, 1980).

Los complejos antena se denominan por una letra B (del inglés bulk) seguida por el número o números que indiquen sus máximos de absorción en el infrarrojo cercano (Broglie y col. 1980; Glazer, 1983; Thornber y col. 1978; Cogdell y Crofts, 1978), y tanto su composición como sus características espectrofotométricas dependen no solo de la especie en particular de la que se trate, sino de la cepa o mutante en estudio. Por ejemplo en el caso de la mutante R-26 de *Rhodobacter sphaeroides* no se encuentran carotenos (Sistrom y col. 1956; Amesz y Knaff, 1988), mientras que en la cepa silvestre crecida en condiciones fotosintéticas, el caroteno predominante es el esferoideno (Trüper y Pfenning, 1978) y en *Rhodospirillum rubrum* es la espiriloxantina (Trüper y Pfenning, 1978). Mientras que *R. rubrum* solamente posee un complejo antena (Cogdell y col. 1982; Cogdell y Thornber, 1980), *Rhodobacter sphaeroides* posee dos (Broglie y col. 1980 ; Cogdell y Thornber , 1980) y otras, como *Rhodopseudomonas acidophila* y *Chromatium vinosum*, parecen poseer cuatro (Amesz y Knaff, 1988; Hayashi y Morita, 1980).

De acuerdo al tipo de complejos antena que presentan, las bacterias fotosintéticas se clasifican en tres grupos (Zuber, 1988). Cada grupo se identifica por los máximos de absorción que

presentan en el infrarrojo cercano. Estos grupos y bacterias representativas se presentan en la tabla 1.1.

Grupo	I	II	III
Bacterias	<i>R. rubrum</i> <i>Rp. viridis</i>	<i>Rb. sphaeroides</i> <i>Rb. capsulatus</i> <i>Rs. gelatinosus</i>	<i>Rps. acidophila</i> <i>Chromatiun vinosum</i>
Máximos de absorción	870 nm ó 1015 nm	800 - 850 nm y 875 nm	800 nm, 820 nm, 850 nm y 880 nm
Número de C.A. presentes	1	2	4

Tabla 1.1 Grupos de bacterias fotosintéticas de acuerdo a los tipos de complejos antena que poseen y bacterias representativas de cada uno de ellos (Zuber, 1988).

El complejo B870 se encuentra presente en las bacterias de todos los grupos, excepto en las que poseen el B1015, rodeando y en contacto directo con los centros de reacción (Cogdell y Thornber, 1980; Zuber, 1988). Los otros tipos de complejo se encuentran rodeando al conjunto de centros de reacción-B870. En general la transferencia energética se lleva a cabo de la siguiente manera (Cogdell y Scheer, 1985; Zuber, 1988):

B800-B820 · B800-850 -----> B870/B890 -----> Centro de reacción

En el complejo B800-850 de *Rhodobacter sphaeroides* se ha determinado la presencia de tres moléculas de Bcl a unidas a dos

polipéptidos (Broglie y col. 1980, Sauer y Austin, 1978; Clayton y Clayton, 1981; Cogdell y Thornber 1980). Estos polipéptidos reciben el nombre de α y β -apoproteínas (Cogdell y col. 1982). Dos de las moléculas de bacterioclorofila se encuentran muy cercanas (Sauer y Austin, 1978; Clayton y Clayton, 1981; Kramer y col. 1984) y son las responsables del máximo de absorción a 850 nm. La otra lo es del máximo a 800 nm (Clayton y Clayton, 1981; Kramer y col. 1984). El complejo B890 obtenido de *Rhodospirillum rubrum* posee la misma estequiometría (Cogdell y col. 1982); pero el complejo antena obtenido de la mutante R-26 de *Rhodobacter sphaeroides* posee dos moléculas de Bcl a asociadas a los dos polipéptidos (Sauer y Austin, 1978).

Se ha determinado la secuencia de aminoácidos de la α y β -apoproteínas de diferentes bacterias fotosintéticas (Brunisholz y col. 1981 y 1985; Gogel y col. 1983; Tadros y col. 1983 y 1984; Nozawa y col. 1985; Theiler y col. 1984, 1984b y 1985), y la similitud entre ambas subunidades es sólo de entre un siete y un trece por ciento (Nozawa y col. 1985; Cogdell y Scheer, 1985). Por el contrario, la similitud entre subunidades α o β de diferentes especies se halla entre un trece y un veintiocho por ciento (Nozawa y col. 1985; Zuber, 1988), encontrándose una porción hidrofóbica conservada de veinte aminoácidos que probablemente es la que se encuentra insertada en la membrana (Amesz y Knaff, 1988; Brunisholz y col. 1981 y 1985; Gogel y col. 1983; Tadros y col. 1983 y 1984; Nozawa y col. 1985; Theiler y col. 1984, 1984b y 1985) en forma de α -hélice. Una característica importante de la región

hidrofóbica es la presencia de un residuo de His que parece ser el sitio más apropiado para la unión de la Bcl (Amesz y Knaff, 1988; Brunisholz y col. 1981 y 1985; Gogel y col. 1983; Tadros y col. 1983 y 1984; Nozawa y col. 1985; Theiler y col. 1984, 1984b y 1985). En algunos casos se encuentra un segundo residuo de His situado entre los dominios hidrofóbico e hidrofílico al que puede unirse una segunda Bcl (Amesz y Knaff, 1988).

Otra característica importante es la presencia de cúmulos de residuos de Ser y Thr entre los dominios del carboxilo terminal y el hidrofóbico. Y la presencia de aminoácidos ácidos en el dominio amino terminal de la β -apoproteína (Zuber, 1988), o de Arginina en el mismo dominio de la α -apoproteína (Zuber, 1988).

Una diferencia fundamental entre el B890 y el B800-850 es que en el primero, existen cúmulos de residuos de aminoácidos aromáticos, principalmente Trp, en el dominio hidrofóbico (Brunisholz y col. 1981 y 1985; Gogel y col. 1983; Tadros y col. 1983 y 1984; Nozawa y col. 1985; Theiler y col. 1984, 1984b y 1985; Zuber, 1988) mientras que no existen en el B800-850.

El heterodímero formado por las subunidades α y β , queda estabilizado por interacciones específicas entre las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que los constituyen

(Zuber, 1988). En la membrana de los cromatóforos, varios complejos antena se unen por el mismo tipo de interacciones. Dependiendo del complejo antena y del detergente con que se solubilice de la membrana, se logra la separación de estas uniones (Clayton y Clayton, 1981; Cogdell y Thornber, 1980; Cogdell y Crofts, 1978; Zuber, 1988), provocando que la composición de las unidades mínimas difiera de una preparación a otra (Zuber, 1988; van Grondelle y col. 1982) y por lo tanto también sus características espectroscópicas.

Los agregados de complejos pigmento-proteína, solubilizados con detergentes, que conservan mejor las características funcionales que poseen en la membrana (Cogdell y Crofts, 1978; Zuber, 1988; van Grondelle y col. 1982), son: los hexámeros del B800-850 que contienen; 6 heterodímeros α - β , 12 Bcl 850, 6 Bcl 800 y 9 carotenos (Kramer y col. 1984) y los dodecameros del B870 o del B1015 (Zuber, 1988; Kramer y col. 1984).

Se ha logrado la cristalización del complejo antena B800-850 de la bacteria *Rhodospseudomonas capsulata* (Welte y col. 1985); sin embargo, no se han reportado resultados de la estructura por análisis de la difracción de rayos X de ninguno de estos tipos de complejos pigmento-proteína. Por lo que esta estructura se ha estudiado por otros métodos (Hayashi y Morita, 1980; Clayton y Clayton, 1981; Kramer y col. 1984; Cogdell y col. 1982; Drews, 1985; Cogdell y Thornber, 1980; Broglie y col. 1980; Glazer, 1983;

Thornber y col. 1978; Cogdell y Crofts, 1978; Brunisholz y col. 1981 y 1985; Gogel y col. 1983; Tadros y col. 1983 y 1984; Nozawa y col. 1985; Theiler y col. 1984, 1984b y 1985). Con base en los resultados de dichos estudios se ha propuesto el modelo que se presenta en la figura 1.6.

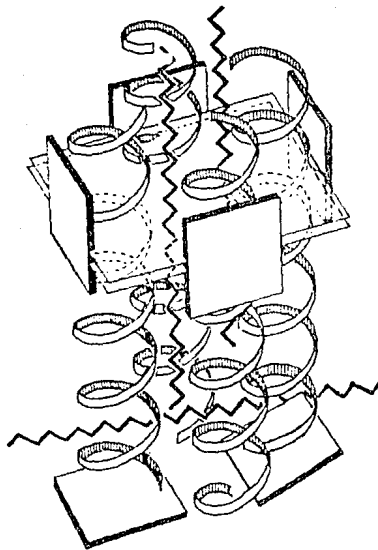


Figura 1.6 Representación esquemática del modelo para el complejo antena B800-850. La unidad básica consta de: cuatro Bcl 850 (cuadrados superiores). Dos Bcl 800 (cuadrados inferiores). Tres carotenos (líneas en Zig-Zag) y cuatro polipéptidos, dos α y dos β -apoproteínas. Las espirales representan la región de α -hélice transmembranal. Reproducida de Kramer y col. 1984.

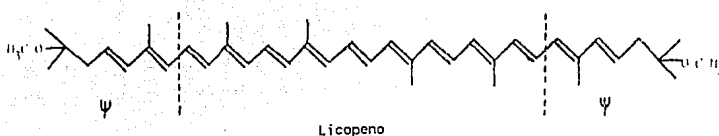
1.5 Los carotenoides y sus características espectrofotométricas

Se da el nombre de carotenoides a un conjunto de hidrocarburos insaturados conjugados de 40 carbonos (carotenos) y sus derivados oxigenados (xantofilas) (IUPAC e IUB, 1975). Todos ellos pueden derivarse de la molécula de licopeno, que forma su parte central (la cual se señala en la figura 1.7a), y se agrupan en: aldehídos, cetonas y ésteres, metil ésteres, alcoholes y glúcidos e hidrocarburos (IUPAC e IUB, 1975), conforme al tipo de substituciones que presente la molécula de licopeno. En los extremos de dicha molécula se unen diferentes grupos substituyentes, que en el caso de los carotenoides de bacterias fotosintéticas son en su mayoría de tipo alifático. Sin embargo existen algunos de tipo cíclico y β (Liaaen-Jensen, 1976 y 1978).

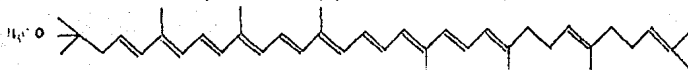
De los 350 diferentes carotenoides reportados en la naturaleza (Liaaen-Jensen, 1976) sólo unos 75 son sintetizados por las bacterias fotosintéticas. Se encuentran formando parte de los complejos pigmento-proteína, mencionado en los dos apartados anteriores, los complejos antena y los centros de reacción. Su presencia no resulta esencial para que estas bacterias lleven a cabo el proceso de fotosíntesis (Dutton, 1971); pero, participan en la transferencia energética a la bacterioclorofila (Ke, 1971) y en la protección de la Bcl de la fotooxidación (Griffith y col. 1955). Su sistema de dobles enlaces conjugados les confiere la característica de cromóforos y presentan un espectro de absorción en el intervalo de luz visible (Liaaen-Jensen, 1978; Ke, 1971), espectro con tres máximos de absorción en la zona de 450 a 600 nm.

La extracción de los complejos pigmento-proteína provoca que su espectro de absorción sufra un corrimiento hacia el rojo (corrimiento batocrómico) o hacia el azul (corrimiento hipsocrómico) dependiendo del solvente utilizado para la extracción (Liaaen-Jensen, 1978).

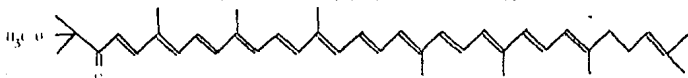
a) Espiriloxantina (1,1'-dimetoxi 3,4,3',4'-tetrahidro 1,2,1',2'-tetrahidro ψ, ψ caroteno)



b) Esferoideno (1-metoxi 3,4-dihidro 1,2,7',8'-tetrahidro ψ, ψ caroteno)



b) Esferoidenona (1-metoxi 3,4-dihidro 1,2,7',8'-tetrahidro ψ, ψ caroteno-2-ona)



c) Neurosporeno (7,8-dihidro ψ, ψ caroteno)

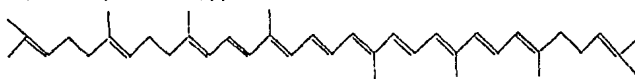


Figura 1.7 Fórmulas estructurales y nombres semisistemáticos (según las reglas de la IUPAC y la IUB, 1975) de los carotenoides presentes en: a) *R. rubrum* cepa silvestre, b) *Rb. sphaeroides* cepa silvestre y c) *Rb. sphaeroides* cepa G1C.

1.5.1 Cambios en el espectro de absorción de los carotenoides

Una de las características más notables de los carotenoides integrados a los complejos pigmento-proteína de membranas fotosintéticas, es la de experimentar un corrimiento al rojo en su espectro de absorción al someterse a iluminación o a oxigenación en la oscuridad (Chance y Smith, 1955; Chance 1958; Smith y Ramírez 1960). Este corrimiento es más evidente si se utilizan: espectros diferenciales o bien los incrementos de transmitancia o absorbancia entre dos longitudes de onda determinadas. En la figura 1.8 se muestra un espectro diferencial inducido por luz en *Rhodobacter sphaeroides*, y en la figura 1.9 se muestran incrementos de absorbancia en *Rhodobacter sphaeroides* bajo diferentes condiciones.

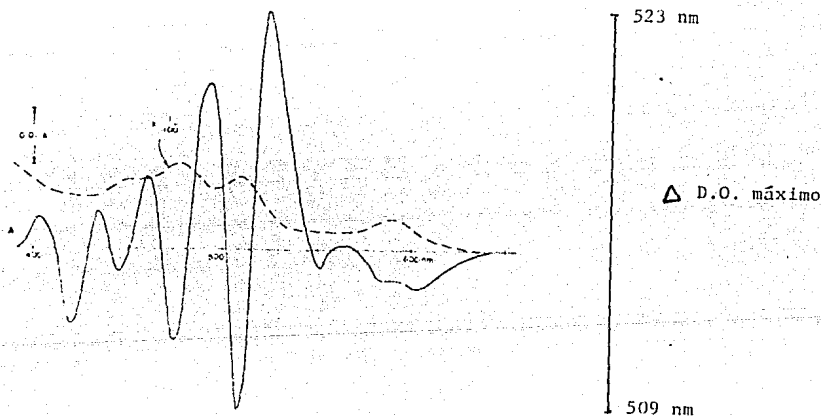


Figura 1.8 Espectro diferencial inducido por luz en cromatóforos de *Rb. sphaeroides* cepa silvestre. Reproducido de Wraight y col. 1978.

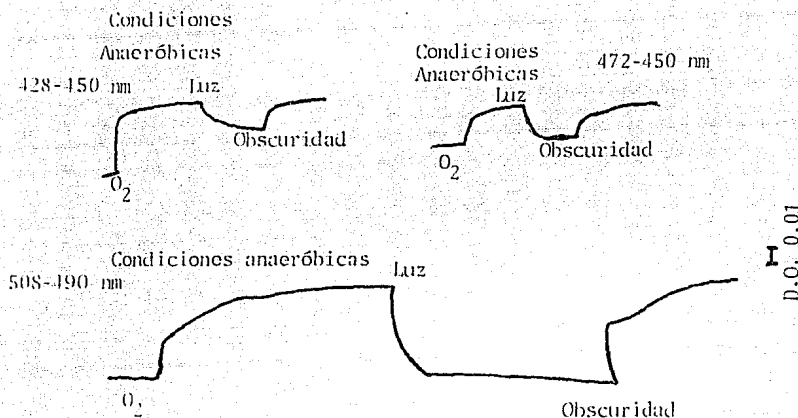


Figura 1.9 Gráficas de los incrementos de densidad óptica en *Rhodobacter sphaeroides* bajo iluminación en anaerobiosis y oxigenación en la oscuridad, los trazos se obtuvieron en un espectrofotómetro de doble rayo de bacterias tomadas directamente de las botellas de cultivo. Reproducida de Smith y Ramírez, 1960.

La relación entre el estado de alta energía de la fosforilación y el corrimiento de los carotenoides fue inferido de experimentos en los que se observó el efecto de varios inhibidores y desacoplantes sobre este fenómeno (Fleischman y Clayton, 1968). Se ha postulado que el corrimiento de los carotenoides es una respuesta a fenómenos físicos y no químicos (Wraight y col. 1978). Las características de aparición del corrimiento indican que guarda una relación estrecha con el potencial de membrana ya sea inducido por luz o generado a partir de la actividad respiratoria de las

. bacterias (Chance, 1958; Smith y Ramírez, 1960; Báltscheffsky, 1969; Holmes y Crofts, 1977; Wraight y col. 1978; Fleischman y col. 1978).

El corrimiento de los carotenoides presenta características únicas que dependen de la bacteria y del complejo pigmento-proteína de que se trate, así como de las condiciones en las que se estudie. Por ejemplo, en cromatóforos disecados de *Rhodobacter sphaeroides* es posible observar la respuesta inducida por luz a bajas temperaturas (Arnold y Clayton, 1960); pero, en *Rhodopseudomonas gelatinosa* se encuentra una complicada dependencia de la temperatura a 77°K (Dutton, 1971). El corrimiento de los carotenoides inducido por gradientes iónicos en cromatóforos de *Rhodobacter sphaeroides* es directamente proporcional al potencial generado a través de la membrana (Jackson y Crofts, 1969); pero, en el caso del corrimiento de *Rhodospirillum rubrum* este no es directamente proporcional al potencial.

La relación entre el corrimiento de los carotenoides en cromatóforos de *Rhodobacter sphaeroides* y la generación de un campo eléctrico a través de la membrana fue estudiada por Jackson y Crofts (Jackson y Crofts, 1970), utilizando diferentes tipos y tiempos de iluminación, lo que les permitió distinguir cuatro diferentes fases en el desarrollo del corrimiento. La fase I, que es la más rápida y de menor amplitud, inducida por un pulso del laser, se desarrolla en menos de 1 μ seg.. La fase II, que tiene una amplitud del 10 al 20% mayor que la I, es inducida por un destello de luz de xenón de 200 μ seg. y es bifásica. Presenta un componente rápido que se desarrolla durante el tiempo de iluminación y uno

, lento que alcanza su desarrollo completo en un tiempo de 300 μ seg. La fase III, que resulta ser similar en magnitud a la inducida por el destello de xenón, es inducida por iluminación continua. En esta fase se encuentra una respuesta bifásica con un componente rápido y uno lento. La fase IV que se presenta bajo iluminación continua una vez que la fase III se ha desarrollado por completo y consiste en un decaimiento del corrimiento. Esta última fase alcanza un valor de aproximadamente el 50% del valor alcanzado en la fase III. Y se desarrolla en un tiempo medio de 30 segundos.

Las cuatro fases fueron interpretadas por Jackson y Crofts (Jackson y Crofts, 1970) de la siguiente manera: la fase I corresponde al campo eléctrico generado por la separación de carga entre el donador y el aceptor primarios en el centro de reacción (evento fotoquímico primario). Lo anterior fue comprobado más tarde en centros de reacción aislados (Cogdell y col., 1977). La fase II en su primera parte, corresponde al mismo evento; pero, el desarrollo posterior corresponde a más de un ciclo del proceso de separación de carga, la transmisión de la carga hacia los elementos de la cadena de transporte de electrones y el paso de electrones por un segundo sitio electrogénico, el cual es inhibido por antimicina a. La fase III, con su gran extensión, corresponde a ciclos continuos del evento fotoquímico primario y al flujo continuo de electrones a través de la cadena transportadora, incluido el segundo sitio electrogénico. La fase IV refleja el establecimiento de un estado estacionario, en el que las cargas difunden hacia el exterior del cromatóforo por escurrimiento de iones.

El corrimiento electrocrómico también se presenta al establecerse una diferencia de potencial por movimiento de K^+ mediante valinomicina y gradientes de concentración (Jackson y Crofts, 1969). La adición de valinomicina a cromatóforos con K^+ en su interior, en un medio libre de K^+ , induce un espectro diferencial que es una imagen especular del obtenido bajo condiciones de iluminación (Jackson y Crofts, 1969). La adición de la valinomicina cuando en el medio existe una concentración de KCl 24 mM induce un espectro diferencial que es igual al obtenido por luz. Dado que la valinomicina transporta al K^+ a través de la membrana a favor de un gradiente de concentración (Mc. Laughlin y Eisenberg, 1975; Gómez-Pouyou y Gómez-Lojero, 1977), podemos concluir que al ser positivo el exterior de la vesícula el corrimiento de los carotenoides es hacia el azul y que es hacia el rojo en caso contrario. Lo mismo ocurre si el potencial se provoca mediante el desacoplante FCCP y gradientes de pH (Jackson y Crofts, 1969).

Como se mencionó anteriormente, en cromatóforos de *Rhodobacter sphaeroides*, el corrimiento del espectro de absorción de los carotenoides es directamente proporcional al potencial generado a través de la membrana. Esto fué demostrado por Jackson y Crofts al inducir el corrimiento mediante valinomicina y diferentes concentraciones de potasio en el medio (Jackson y Crofts, 1969). Al calcular los potenciales generados a cada concentración mediante la ecuación de Nernst se puede calibrar el corrimiento de los carotenoides en función del potencial establecido a través de la membrana, lo que permite obtener un valor del potencial generado,

en cromatóforos, al someterlos a iluminación (Holmes y Crofts, 1977; Jackson y Crofts, 1969; Jackson y Crofts, 1970).

1.5.2 Naturaleza electrocrómica del cambio de los carotenoides

A partir del reporte de los cambios en el espectro de absorción de los carotenoides inducidos por luz se han propuesto diversos mecanismos por los cuales se desarrollan dichos cambios (Smith y Ramírez, 1960; Fleischman y Clayton, 1968; Baltscheffsky, 1969). A partir de las características mencionadas en párrafos anteriores, se ha propuesto que se trata de una respuesta electrocrómica de estos compuestos (Jackson y Crofts, 1969 y 1970; De Grooth y Amesz, 1977; Symons y col.1978).

La forma en que un campo eléctrico puede modificar el espectro de absorción de una molécula puede ser directa o indirectamente (Wraight y col. 1978). En forma directa si existiese una interrelación entre el campo y el carácter dipolar de la molécula, en forma tal que el estado energético de la molécula se ve alterado, lo que consecuentemente provocaría un cambio en los espectros de absorción y emisión de la molécula.

Un modelo simple de electrocromismo es el presentado por Wraight y col. 1978, en el cual el incremento de la longitud de onda esta dado por la siguiente ecuación:

$$\Delta \lambda = \frac{\lambda^2}{h \cdot c} (\Delta \mu^0 + \Delta a \cdot E) E$$

En donde, $\Delta \lambda$ es el incremento en la longitud de onda, h es la constante de Planck, $\Delta \mu^0$ es el cambio en los dipolos permanentes (al pasar del estado basal al energizado), Δa es el cambio en la polarizabilidad, E es el campo eléctrico.

Este modelo predice que los isosbesticos deberán desplazarse de acuerdo con la magnitud del campo aplicado, lo cual fue reportado en cromatóforos de la mutante G1C de *Rhodospseudomonas sphaeroides* por Symons y col. en 1978.

Sin embargo, el modelo anterior no contempla la dependencia lineal del corrimiento respecto a la magnitud del campo eléctrico, lo que es de importancia dado que una dependencia directa indicaría que la forma en que interactúa la molécula con el campo eléctrico es a través de dipolos permanentes, mientras que una dependencia cuadrática indicaría que es a través de dipolos inducidos. Como puede verse en la figura 1.7, no puede justificarse la presencia de dipolos permanentes en las moléculas de los carotenoides, por lo que la respuesta directamente proporcional al potencial generado (Jackson y Crofts, 1969) sólo puede explicarse por la existencia de un campo permanente en el dieléctrico de la membrana (Jackson y Crofts, 1969 y 1970) que provoque una respuesta pseudolineal al inducir potenciales de cuando menos un orden de

magnitud menores que el permanente (Jackson y Crofts, 1969; Schmidt y col. 1971). La respuesta lineal se ve poco modificada en cromatóforos con carga neta cero (Wraight y col. 1978), lo que apoya esta proposición. Se ha reportado la presencia de cúmulos de residuos de aminoácidos cargados en la zona de α -hélice de las apoproteínas del complejo (Amesz y Knaff, 1988; Brunisholz y col. 1981 y 1985; Gogel y col. 1983; Tadros y col. 1983 y 1984; Nozawa y col. 1985; Theiler y col. 1984, 1984b y 1985; Zuber, 1988). La presencia de estos aminoácidos podrían originar la diferencia de cargas necesarias para provocar la aparición del campo permanente en la matriz de la bicapa.

La pequeña magnitud del corrimiento puede interpretarse como el hecho de que todos los carotenoides sufren un pequeño cambio o bien de que solo una fracción de ellos es la que responde electrocrómicamente al potencial inducido a través de la membrana. Para responder a esta interrogante se han realizado estudios en la mutante G1C de *Rhodobacter sphaeroides* y se ha concluido que la segunda proposición es la válida (Holmes y Crofts, 1977 y 1977b; De Grooth y Amesz, 1977; Holmes y col. 1980). Dado que esta bacteria solamente posee un carotenoide, éste refleja que no todos los carotenoides presentes tienen la misma orientación en la membrana ni las mismas interacciones con otros componentes de la misma (De Grooth y Amesz, 1977; Holmes y Crofts, 1977). Una prueba más concluyente la constituye el trabajo de Holmes y col. 1980, en donde se demuestra que la relación entre los complejos B800-850 y el B875, modificada por cultivo de la bacteria a diferentes intensidades de luz, es directamente proporcional a la magnitud del corrimiento en la cepa NCIB 8253 de *Rhodobacter sphaeroides*.

La poza de carotenoides que responde electrocrómicamente a la diferencia de potencial se caracteriza por presentar un espectro de absorción con un desplazamiento batocrómico de aproximadamente 7 nm respecto al de la poza que no responde (Holmes y Crofts, 1977; De Grooth y Amesz, 1977; Symons y col. 1978). Esta característica que puede ser el origen del corrimiento hipsocrómico de los carotenoides al establecer un potencial positivo en el exterior de la membrana de cromatóforos de *Rhodobacter sphaeroides* (Jackson y Crofts, 1969) y que origina un espectro diferencial que es imagen especular del inducido por luz.

Debemos destacar la posible coexistencia de otros fenómenos que provocan que no se valore adecuadamente la respuesta electrocrómica. Entre estos fenómenos tenemos: hipocrómismo de los carotenoides; cuya existencia podría explicar las discrepancias entre las observaciones experimentales y el modelo matemático (Conjeaudm y Michel-Villaz, 1976). Dispersión de luz (Duniet y Thorne, 1981); que se ha propuesto como la causa de los pequeños cambios de la posición de los isobésticos bajo destellos múltiples (Crofts y col. 1974). Quizá el más importante de todos es el corrimiento de la bacterioclorofila; el cual no sólo depende del potencial existente a través de la membrana, sino también del gradiente de protones que se establezca a ambos lados de la misma (Wraight y col. 1978).

OBJETIVOS

CAPITULO 2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Reconstituir el corrimiento electrocrómico del caroteno del complejo antena B800-850, de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*, en liposomas.

2.2 Objetivos intermedios

2.2.1 Obtener una preparación de complejos antena B800-850 libre de otros complejos pigmento-proteína, en la que los complejos antena conserven las características espectrofotométricas que poseen en el cromatóforo y se encuentren en una concentración lo suficientemente alta como para permitir la reconstitución en liposomas.

2.2.2 Llevar a cabo la reconstitución de los complejos antena B800-850 en liposomas.

2.2.3 Determinar la respuesta electroquímica de los complejos antena B800-850 reconstituidos, a la generación de potenciales electroquímicos, a través de la membrana, mediante el uso de ionóforos y gradientes de concentración.

MATERIALES Y METODOS

3.1 Bacterias

Las bacterias utilizadas en el presente trabajo fueron donadas por el Dr. A. Crofts y fueron:

Rhodobacter sphaeroides. Cepa silvestre.

Rhodospirillum rubrum. Cepa silvestre.

3.2 Medios de Cultivo

Se utilizaron dos tipos de medios de cultivo diferentes: medio líquido para los cultivos masivos y medio sólido para la verificación de la pureza de las cepas y para la conservación de las mismas.

3.2.1 Medio sólido

Contiene lo siguiente para un litro.

Extracto de levadura	-----	3 g.
Peptona de gelatina	-----	2 g.
Agar bacteriológico	-----	10 g.

Los componentes se disolvieron en agua a punto de ebullición, colocándose aproximadamente 10 ml de medio en frascos con tapón de rosca de 20 ml de capacidad. Los frascos conteniendo el medio se esterilizaron en un autoclave, a 15 libras de presión,

durante 15 minutos, con las tapas sobrepuestas. Estas se cerraron perfectamente al terminar la esterilización, para mantenerlos en prueba de esterilidad por una semana a temperatura ambiente. En el caso de las cajas de Petri, se colocaron aproximadamente 30 ml en cada caja, para proceder a la esterilización y la prueba de esterilidad por los mismos tiempos que en el caso de los frascos.

3.2.2 Medio Líquido

El medio líquido utilizado se preparó de acuerdo al formulado por Cohen-Bazire y colaboradores 1957, el cual es una modificación del propuesto por Hutner 1946.

Para la preparación de este medio se partió de las siguientes soluciones:

Solución I. Base Concentrada, que contiene lo siguiente por litro:

$N(CH_2COOH)_3$	-----	10.0	g.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	-----	14.45	g.
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	-----	4.35	g.
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	-----	0.0925	g.
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-----	0.0975	g.
Metales '44'	-----	50	ml.

Ajustándose el pH a 6.8.

* La solución Metales '44' contiene por litro lo siguiente:

EDTA	-----	2.5	g.
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-----	5.0	g.

ZnSO ₄ H ₂ O	-----	11.0 mg.
MnSO ₄ 6	-----	1.54 g.
MnCl ₂ 4H ₂ O	-----	1.37 g.
CuSO ₄ 5H ₂ O	-----	0.392 g.
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	-----	0.248 g.
Na ₂ B ₄ O ₇ 6H ₂ O	-----	0.177 g.
H ₂ SO ₄	-----	aprox. 4 gotas

El pH se ajusta a 6.8 antes del aforado.

Solución II. Contiene 136.09 g. de KH₂PO₄ en un litro de agua destilada, ajustándose el pH a 6.8.

Solución III. Contiene 100 g. de Acido succínico en un litro de agua destilada, ajustándose el pH a 6.8.

Solución IV. Contiene 100 g. de (NH₄)₂SO₄ en un litro de agua destilada.

Solución V. Contiene 50 g. de NaCl en un litro de agua destilada.

Solución VI. Contiene 100 g. de Acido L-glutámico para un litro de agua destilada, ajustándose el pH a 6.8.

Solución VII) Que contiene 20 g. de Acido L-aspártico para un litro de agua destilada, ajustándose el pH a 6.8.

El medio líquido final contiene, para 12.5 litros, las siguientes cantidades de las soluciones descritas en los párrafos anteriores:

Sol. I)	Base concentrada -----	250 ml.
Sol. II)	KH_2PO_4 -----	250 ml.
Sol. III)	Acido succínico -----	250 ml.
Sol. IV)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -----	62.5 ml.
Sol. V)	NaCl -----	125 ml.
Sol. VI)	Acido L-glutámico -----	25 ml.
Sol. VII)	Acido L-aspártico -----	25 ml.

Además de:

Peptona de gelatina ó -----	12.5 g.
Extracto de carne -----	12.5 g.
Acido nicotínico -----	12.5 mg.
Tiamina -----	6.25 mg.
Biotina -----	0.125 mg.

Antes de llevarlo al volumen final de 12.5 litros se ajusta el pH a 6.8.

El medio se esterilizó en el autoclave a 15 libras de presión, por 45 minutos, en frascos del volumen requerido (1 o 9 l. dependiendo del paso del cultivo de que se trate). En el medio caliente, se forma un precipitado blanco que se disuelve cuando el medio alcanza la temperatura ambiente, por lo que durante el enfriamiento el medio se agita una o dos veces. El medio es

transparente y de color semejante al del extracto de carne o de la peptona de gelatina, según se haya utilizado uno u otro.

3.3 Siembra y cultivo de bacterias

3.3.1 Obtención de inóculos

Para verificar la pureza de los cultivos o para obtener el inóculo para los cultivos masivos, se sembraron las bacterias en placa por el método de dilución, hasta obtener colonias aisladas. En el primero de estos casos, la homogeneidad de las colonias, en cuanto a textura, forma y color, fueron los criterios para calificarlas de puras. Para la conservación de las cepas, de las colonias aisladas se tomó una de ellas y se sembraron por punción los frascos con medio sólido. Después de la siembra, los frascos se colocaron en la obscuridad a fin de que las bacterias consumieran parcialmente el oxígeno de los frascos. Después de lo cual, los frascos se sometieron a iluminación mediante focos con filamento de tungsteno de 40 watts. La distancia entre los focos y los frascos fue de 30 cm. Una vez que se observó el crecimiento bacteriano en el interior del agar a lo largo de los sitios de punción, los frascos se almacenaron manteniéndose el cultivo en buenas condiciones entre 6 y 12 meses. En el caso de la obtención del inóculo para los cultivos masivos, se usaron los frascos obtenidos en este paso directamente o después de ser almacenados por un tiempo determinado.

3.3.2 Cultivos masivos

Para obtener grandes cantidades de bacterias se cultivaron en medio líquido, mediante la siguiente metodología: a los frascos que contenían las bacterias en medio sólido, se les agregó aproximadamente 10 ml del medio líquido y se agitaron. Se colocaron en la obscuridad durante 12 horas y se expusieron a la luz de focos de filamento de tungsteno de 40 Watts a 30 cm. Después de 5 ó 6 días, se observó crecimiento bacteriano en el medio líquido. Este cultivo se transfirió a frascos de 100 ml de capacidad a los que se les agregó medio líquido fresco hasta colmar su capacidad. Se repitió el proceso obscuridad-luz y se dejó crecer a las bacterias hasta la fase logarítmica tardía, la cual se alcanza a los 3 días. El inóculo bacteriano, obtenido así, se trasladó siguiendo los pasos descritos con anterioridad a frascos de uno y nueve litros sucesivamente. En cada caso, los frascos se cerraron herméticamente con tapones de hule, dejando la mínima cantidad de aire posible, ya que el crecimiento fotosintético de estos microorganismos se lleva a cabo en anaerobiosis. Por esta razón, es necesario en cada paso del cultivo, una etapa de obscuridad en la que las bacterias, mediante sus procesos metabólicos oxidativos, eliminan el oxígeno del medio. Los cultivos se mantuvieron a 30°C.

3.3.3 Cosecha de Bacterias

Las bacterias crecidas en los frascos de nueve litros de capacidad se cosechan en cualquiera de las siguientes formas: en una centrífuga de flujo continuo Sharples ó en una centrífuga Sorvall

RC2- B, con cualquiera de los siguientes rotores: el GSA o el GS-3, a 8,000 x g en la fase logarítmica tardía (a los cinco días). El crecimiento se determinó haciendo curvas de crecimiento, graficando la absorbancia en Unidades Klett contra el tiempo del cultivo.

Las bacterias cosechadas de esta manera forman una pastilla libre del medio líquido. A fin de eliminar residuos del medio de cultivo, la pastilla se resuspende en MOPS 50 mM, KCl 10 mM (pH 7.5), centrifugándose nuevamente a 8,000 x g durante 15 minutos para obtener la pastilla bacteriana. Las pastillas se pesaron y esto se consideró como peso húmedo. Las bacterias obtenidas de esta manera se almacenaron a -70°C en el congelador REVCO hasta ser utilizadas, o bien se procesaron inmediatamente para la obtención de cromatóforos.

3.4 Obtención de Cromatóforos

Se siguió el método descrito por Scholes y cols. 1969, para la obtención de cromatóforos.

- Las bacterias se resuspendieron en amortiguador de Tris 10 mM HCl pH 8.5, en una proporción de 1:10. Añadiendo 1 mg de DNAasa por 100 g. de peso húmedo de bacterias y $MgSO_4$ 1 mM.

- Para romper las bacterias, la suspensión obtenida en el paso anterior se sonicó en lotes de 25 ml durante 4 minutos, en un sonicador M.S.E. a la máxima, manteniendo la temperatura a 4°C con un baño de agua y hielo (Scholes y col. 1969).

- Las bacterias sonicadas se centrifugaron a 20,000 x g, en la centrífuga Sorval RC2-B, con el rotor SS-34, durante 20 minutos, para remover bacterias sin romper y cápsulas, las cuales forman una

• pastilla que se descarta.

- El sobrenadante del paso anterior se centrifugó a 120,000 x g por 60 minutos, en la centrifuga Beckman L5-75B, con el rotor 60 Ti, obteniéndose así un pastilla de cromatóforos. Los cromatóforos obtenidos de esta manera se resuspendieron en el mismo amortiguador y se centrifugaron a la misma velocidad. Los cromatóforos obtenidos en este último paso se resuspendieron en el mismo amortiguador ajustando la densidad óptica de la suspensión a $50 \times \text{cm}^{-1}$ a una longitud de onda de 870 nm. Esta suspensión de cromatóforos se puede almacenar a -70°C en el congelador REVCO o utilizarse inmediatamente para la obtención de los complejos antena B800-850 o B860 según el caso.

3.5 Obtención de los complejos antena

Para la obtención de los complejos antena B800-850 de *Rhodobacter sphaeroides* y B890 de *Rhodospirillum rubrum* se combinaron las técnicas descritas por Sauer y Austin, 1978 y las descritas por Broglie y col. 1980.

- Los cromatóforos se sometieron a agitación suave, manteniendo la temperatura a 4°C y bajo filtro de seguridad color verde (Schiff, 1972). Se les agregó, gota a gota, una solución de Dodecilsulfato de Litio (LiDS) al de 9.95 %, hasta obtener una concentración final del 0.9%.

- Se colocaron 3.5 ml de los cromatóforos solubilizados sobre un gradiente discontinuo de sacarosa 1.2 : 0.5 M, 14 ml de la solución de sacarosa 1.2 M y 3 ml de la solución de sacarosa 0.5 M, centrifugándose en la centrifuga Beckman L5-75B, con el rotor 60 Ti,

a 4°C, a 110,000 g, durante 135 minutos. Antes de tomar como definitivo, el uso del rotor 60 Ti, se utilizaron los rotores SW 40 Ti y SW 28 para correr el gradiente de sacarosa. Los resultados en los tres casos fueron semejantes en lo que respecta a las bandas obtenidas (una mayor descripción se hace en la sección de resultados), sólo que en el caso del 60 Ti la cantidad de complejos obtenidos fué mayor. Las condiciones para realizar el gradiente y las características de cada rotor se muestran en la Figura 3.1 y en el cuadro 3.1.

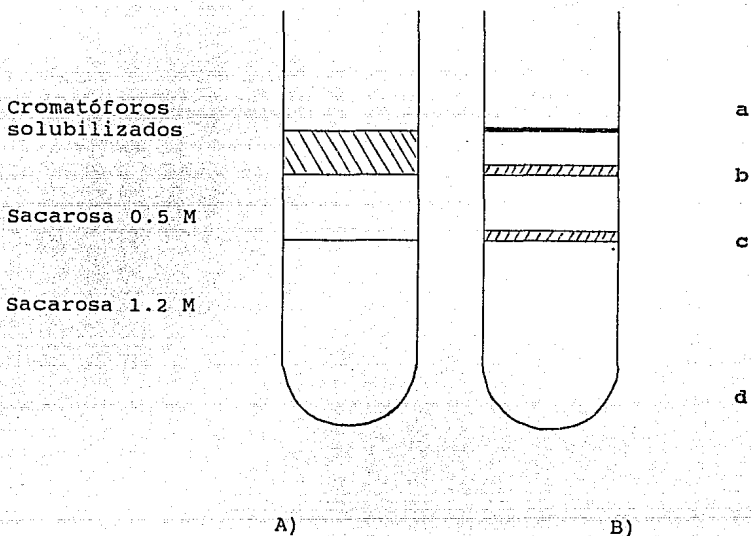


Figura 3.1 Esquema en que se muestran: A) la forma en que se colocaron los cromatóforos solubilizados con LiDS 0.9 % (3.5 ml) sobre el gradiente de sacarosa 0.5:1.2 M (3:14 ml) y B) las bandas obtenidas después de 135 minutos de centrifugación a 110,000 x g.

- Del gradiente se recolectó la banda coloreada de la interfase de las dos concentraciones de sacarosa comprobándose la presencia de los complejos antena, mediante la obtención de los espectros de absorción 400-900 nm.

Rotor	Tipo de rotor	r medio	Fuerza centrífuga $10^3 \times g$
SW 40 Ti	de columpio	11.27 cm.	190
SW 28	de columpio	11.82 cm.	110
60 Ti	de ángulo fijo	6.3 cm.	110

Cuadro 3.1 Características de los diferentes rotores utilizados en la obtención de los complejos antena mediante solubilización con LiDS y gradientes de sacarosa.

- A los complejos antena obtenidos en el paso anterior, se les midió la concentración de proteína, para ajustarse a un miligramo por mililitro. Para hacer dicho ajuste se utilizó un amortiguador de Tris 10 mM HCl LiDS 0.9% pH 8.5.

3.6 Obtención de Proteoliposomas

Para la obtención de los proteoliposomas se utilizó la técnica de remoción del detergente mediante diálisis, que se ha empleado para la reconstitución de diferentes proteínas de membrana (Kagawa y Racker, 1966 y 1972; Nishibayashi-Yamashita, 1972; Golding

y Tong, 1974; Hilden y col. 1974) en donde el colato ha sido el detergente a remover una vez que con el mismo se llevó a cabo la extracción de la proteína a reconstituir. En nuestro caso el detergente fue el LiDS.

Para la obtención de los proteoliposomas se utilizó: a) Asolectina (Sigma Chem. Com. type IIS) de soya purificada parcialmente por el método de Kagawa y Racker, 1966. En presencia de trazas de DL-Acetato de Tocoferol para retardar la oxidación de los fosfolípidos. Esta preparación contiene: Fosfatidilcolina 37%, Fosfatidil-etanolamina 37%, Cardiolipina 9% y un 17% de fosfolípidos no identificados. b) Los complejos antena B800-850 ó B890 obtenidos mediante la solubilización con LiDS y los gradientes de sacarosa.

3.6.1 Método de obtención de los proteoliposomas

- Se añadieron 30 mg de la Asolectina purificada, por cada mililitro del siguiente medio: Sacarosa 250 mM, $MgCl_2$ 10 mM, Tris 10 mM HCl pH 8.5. Se agitan hasta la emulsificación completa.

- La emulsión obtenida se sonicó durante 3 minutos a máxima potencia en un sonicador M.S.E. manteniendo la temperatura a 4°C con un baño de hielo y agua. En caso de que la clarificación no fuera completa se repite la sonicación.

- A los fosfolípidos sonicados se les agregó LiDS hasta una concentración final de 0.9 %. Se añadieron después los complejos

antena (1 mg de Proteína/ml) en una relación 1:1 en volumen.

- La mezcla anterior se sometió a diálisis contra un amortiguador de Tris 50 mM HCl pH 8.5, DTE 50 μ M, Sacarosa 200 mM, durante 48 horas con cinco cambios de amortiguador. El primero de ellos se realizó a las cuatro horas de iniciado el proceso de diálisis y los otros con intervalos de 12 horas entre cada uno. Se mantuvo a los proteoliposomas y al amortiguador de diálisis a una temperatura de 4°C y en la obscuridad.

- Los proteoliposomas resultantes se centrifugaron a 14,000 r.p.m. por 10 minutos y se descartó la pastilla formada. Rescatándose el sobrenadante donde se encontraron los proteoliposomas que se utilizaron en todos los experimentos.

3.7 Otros Métodos

3.7.1 Determinación del contenido de Bacterioclorofila

El contenido de bacterioclorofila en cada uno de los casos se determinó por la absorción a 770 nm de un extracto en acetona-metanol (7/2, v/v) de cada muestra, utilizando el coeficiente de extinción molar de 75 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ reportado por Clayton, 1963.

3.7.2 Determinación de Proteína

La cantidad de proteína se determinó por el método de Lowry y col. 1951, utilizando como referencia BSA.

3.7.3 Mediciones de pH

Las mediciones de pH se realizaron con un potenciómetro Corning modelo 7 equipado con un electrodo Trizma No. E4503, de Sigma Chem. Co.

3.8 Reactivos

Los cloruros de sodio y de potasio fueron de la Compañía Baker de grado analítico. El resto de los reactivos utilizados en el trabajo fueron de Sigma Chemical Company.

RESULTADOS

4.1 De la purificación de los complejos antena B800-850

El primer problema que enfrentamos al iniciar este trabajo fue la falta de una técnica para obtener los complejos antena B800-850, en cantidad suficiente y en condiciones de ser reconstituídos en liposomas. Se tenían como antecedentes: a) el trabajo de Sauer y Austin, 1978 en el que con el detergente no iónico TRITON X-100 y gradientes de sacarosa, se obtuvieron grandes cantidades del complejo antena B800-850 libres de otros complejos pigmento-proteína como son: los centros de reacción y los complejos antena B875. Sin embargo, los complejos obtenidos por este método presentan el inconveniente de que el CMC del TRITON X-100 es tan bajo, 0.25 mM (Robson y Dennis, 1977; De Vendittis, 1981; Brito y Vaz, 1986), que es difícil removerlo. b) Broglie y col. en 1980 utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida y el detergente iónico Dodecil sulfato de Litio (LiDS), separaron los diferentes tipos de complejo pigmento - proteína de *Rhodobacter sphaeroides*; sin embargo, para nuestro trabajo este método presenta, por un lado, el inconveniente de que las cantidades de complejos pigmento-proteína recuperables de dichos geles es muy pequeña; por otro lado, este método presenta la ventaja de que el LiDS tiene un CMC mayor que el del TRITON X-100, 7-10 mM (Mysels y Princen, 1959; De Vendittis, 1981; Chattopadhyay y London, 1984; Brito y Vaz, 1986), por lo que puede ser removido mediante diálisis permitiendo así la reconstitución (Kagawa y Racker, 1972; Hilden y col. 1974). Por lo tanto, se decidió combinar ambas técnicas para aprovechar sus ventajas y eliminar sus inconvenientes. Para lograrlo se utilizó el detergente LiDS para solubilizar los cromatóforos bacterianos y los gradientes de sacarosa

para separar los complejos antena B800-850. Desde la primera prueba se encontró que, a diferencia de las dos bandas coloreadas reportadas por Sauer y Austin (Sauer y Austin, 1978), después del gradiente, se podían observar en los tubos las bandas coloreadas que se esquematizan en la figura 3.1: un sobrenadante "a" en la superficie de la sacarosa 0.5 M. y una banda "b" aproximadamente a la mitad del volumen de dicha concentración. Además se observó una banda "c" sobre la interfase entre las dos concentraciones de sacarosa y una pastilla incolora "d" en el fondo del tubo. Tratando de reproducir los resultados de Sauer y Austin se utilizaron diferentes concentraciones de detergente, variando las relaciones entre las concentraciones de sacarosa y los volúmenes empleados en los gradientes. Sin embargo, la obtención de las bandas mencionadas fue constante, encontrándose que la única variación la constituían las concentraciones de proteína y bacterioclorofila que se alcanzaban en la banda de la interfase entre las dos concentraciones de sacarosa. Finalmente se eligieron las condiciones que se reportan en el capítulo de material y métodos, por las siguientes razones:

A) El espectro de absorción de los complejos recolectados en la banda "c" no muestra diferencias significativas respecto al de cromatóforos íntegros, como se muestra en la figura 4.1, lo que sugiere que no han sufrido alteraciones estructurales durante la purificación.

B) La separación clara de las bandas coloreadas, "b" y "c", una intermedia y la otra sobre la interfase del gradiente, correspondiente esta última a los complejos B800-850 libres de otros complejos pigmento-proteína y en una concentración mayor de un miligramo por mililitro.

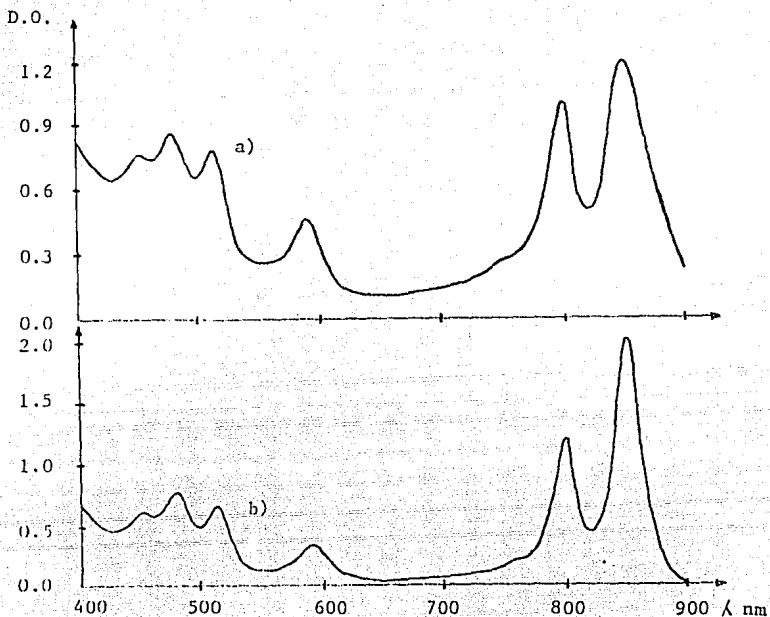


Figura 4.1 Espectros de absorción de 400 a 900 nm de: a) Cromatóforos de *Rhodospira rubra*, 20 μg de proteína (1.0 μg de bacterioclorofila) en 3.0 ml de Tris 10 mM HCl pH 8.5. b) Complejos antena B800-850, obtenidos de la banda de la interfase del gradiente, 1.8 μg de proteína (0.25 μg de bacterioclorofila) en 2.9 ml de Tris 10 mM HCl pH 8.5 LiDS 1.0 %. Este y todos los espectros de absorción de 400 a 900 nm se obtuvieron en el espectrofotómetro Aminco DW-2, equipado con un fotomultiplicador Hamamatsu R 473, 79, 12 para infrarrojo cercano, en modo split.

4.2 De la purificación de los complejos B890

A fin de contar con un control que permitiera la demostración de que los resultados obtenidos con los proteoliposomas B800-850 no eran una respuesta inespecífica debida a la presencia de complejos pigmento-proteína en la bicapa de los proteoliposomas, se decidió purificar, mediante el mismo método, un complejo diferente. El B890 de *Rhodospirillum rubrum* (Sauer y Austin, 1978; Cogdell y col. 1982; Picorel y col. 1983). La elección de este complejo antena obedeció a dos razones fundamentales: la primera es que los cambios en el espectro de absorción observados en cromatóforos de esta bacteria, durante la generación de potenciales electroquímicos, son cualitativa y cuantitativamente diferentes de los obtenidos con los cromatóforos de *Rhodobacter sphaeroides* (Jackson y col. 1968). La segunda es el hecho de que al ser éste el único complejo antena presente en *R. rubrum*, se facilitaría su obtención en forma libre de otros complejos pigmento - proteína. No se utilizó el B875 de *R. sphaeroides* debido no sólo a que éste se encontraba mezclado con los otros complejos pigmento-proteína (B800-850 y P860) en la banda "b" de los gradientes (Sauer y Austin, 1978), sino además por que el espectro de dicha banda mostraba alteraciones respecto al de cromatóforos, lo cual se interpretó como el hecho de que los complejos pigmento-proteína, presentes en dicha banda, habían sufrido alteraciones durante la purificación.

En los gradientes con cromatóforos de *R. rubrum* solubilizados con LiDS (0.9 %) no se formaron las dos bandas, como en el caso de *Rb. sphaeroides*, sino sólo una que abarcaba desde la parte intermedia de la concentración 0.5 M de sacarosa hasta la interfase de las dos concentraciones (ver la figura 4.2).

La banda antes mencionada se recolectó en diferentes

presentó un espectro que no difería del de cromatóforos íntegros, mientras que los espectros de las otras fracciones presentaban diferencias con éste, de manera más acentuada conforme se alejaban de la interfase. Por lo tanto, se eliminó la mayor parte de esa banda, rescatando solamente la parte más cercana a la interfase y que correspondía aproximadamente a la proteína de la banda del complejo B800-850 obtenido de *Rhodobacter sphaeroides*.

La similitud entre el espectro de la fracción colectada y el de cromatóforos íntegros de *R. rubrum* (figura 4.3), se interpretó al igual que en el caso del B800-850, como el hecho de que el complejo B890 no había sufrido alteraciones durante la purificación.

Una evidencia de que la banda recolectada de los gradientes contiene los

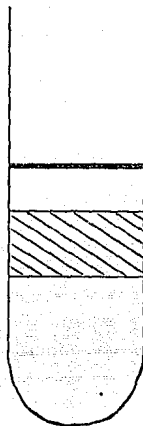


Figura 4.2 Esquema en donde se muestran las bandas obtenidas después de 135 minutos de centrifugación a 110,000xg sobre el gradiente de sacarosa 0.5/1.2 M de cromatóforos de *R. rubrum* solubilizados con LIDS 0.9%.

complejos antena B800-850 y B890 sin contaminación por centros de

reacción es que sus respectivos espectros de absorción no sufren ninguna alteración al someterse a iluminación (Cogdell y col. 1977).

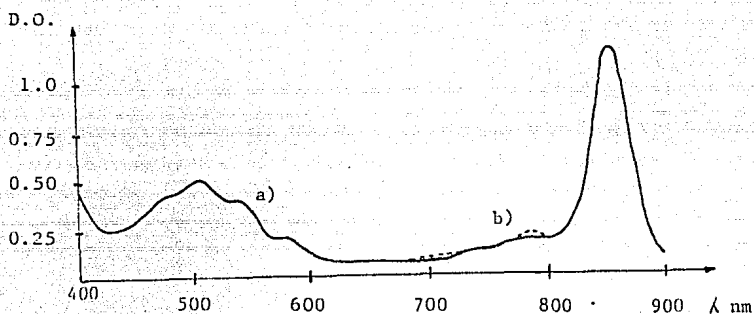


Figura 4.3 Espectros de absorción de 400 a 910 nm de: a) Cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*, 6 μg de proteína (0.3 μg de bacterioclorofila) en 3.0 ml de Tris 10 mM HCl pH 8.5. b) Complejos antena B890, obtenidos de la banda de la interfase del gradiente de sacarosa, 2.4 μg de proteína (0.3 μg de bacterioclorofila) en 3.0 ml de Tris 10 mM HCl pH 8.5 LiDS 1.0 %.

4.3 De la obtención de proteoliposomas

La suspensión de proteoliposomas, resultante del proceso de diálisis, presentó un aspecto opalescente, lo cual indica una gran dispersión de la luz. Esto se confirmó al obtener el espectro de absorción en la zona de 400 a 600 nm, en donde los máximos correspondientes a los carotenos se hacen prácticamente indetectables (Trazo "a" de la figura 4.4). Para eliminar este inconveniente, se obtuvieron liposomas en las mismas condiciones que los proteoliposomas, ajustándose con éstos la línea base. De esta forma se pudo obtener el trazo "b" de la figura 4.4, donde se puede observar que las cualidades espectrofotométricas del complejo B800-850 siguen sin alterarse una vez que se han integrado a la membrana de los liposomas. La reconstitución se confirmó en los experimentos del corrimiento electrocromático del caroteno que se discuten más adelante. Cambios en las condiciones de obtención de los proteoliposomas - como serían la presencia de luz, ausencia de Mg^{2+} o DTE - provocaron alteraciones en el espectro de absorción en el mismo intervalo de longitudes de onda, como puede observarse en la figura 4.5, lo que se interpretó como cambios estructurales en los complejos.

4.4 Efecto de la generación de potenciales electroquímicos sobre el espectro de absorción de los proteoliposomas B800-850

Para poder estudiar el efecto de la generación de potenciales eléctricos sobre el espectro de absorción de los complejos antena B800-850 y B890 reconstituídos en los proteoliposomas, se utilizaron, al igual que Jackson y col. 1968,

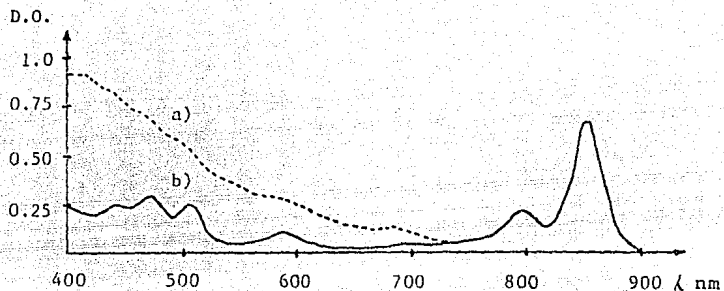


Figura 4.4 Espectros de absorción de proteoliposomas con B800- 850 de 400 a 900 nm. a) 1.5 μg de proteína (0.2 μg de bacterioclorofila) en 2.9 ml de Tris 10 mM HCl pH 8.5 KCl 100 mM cloruro de colina 40 mM, en el que la línea base se ajustó con el amortiguador señalado. b) La misma muestra, en la que la línea base se ajustó agregando a 2.9 ml del amortiguador, 100 μl de liposomas, sin complejos antena, obtenidos con la misma metodología que los proteoliposomas.

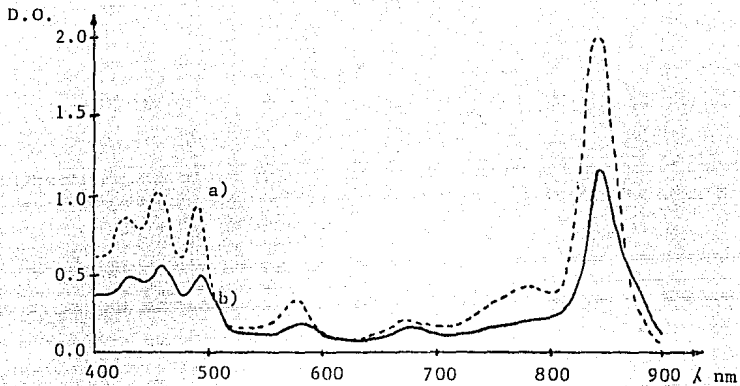


Figura 4.5 Espectros de proteoliposomas con B800-850 alterados, de 400 a 900 nm. a) 5.35 μg de proteína (0.75 μg de bacterioclorofila) en 2.9 ml de Tris 10 mM HCl pH 8.5 KCl 100 mM Cloruro de colina 40 mM. b) 3 μg de proteína (0.4 μg de bacterioclorofila) en 2.9 ml del amortiguador señalado para el trazo "a". La diálisis para la obtención de los proteoliposomas del trazo "a" se realizó en presencia de luz. En la diálisis para la obtención de los proteoliposomas del trazo "b" no se añadió al amortiguador de diálisis magnesio ni DTE.

la capacidad transportadora del iónoforo valinomicina (Mc. Laughlin y Eisenberg, 1975; Gómez-Puyou y Gómez-Lojero, 1977) y gradientes de concentración de K^+ , en tal forma que cuando el medio en que se encontraban los proteoliposomas no contenía potasio, éste era transportado por la valinomicina hacia el exterior, provocando que el exterior de la membrana resultase positivo respecto al interior. Lo contrario; es decir, que el interior fuese positivo respecto al exterior, se logró añadiendo potasio al medio en forma de KCl. El flujo de este ión y el $\Delta\Psi$ generado se esquematizan en la figura 4.6.

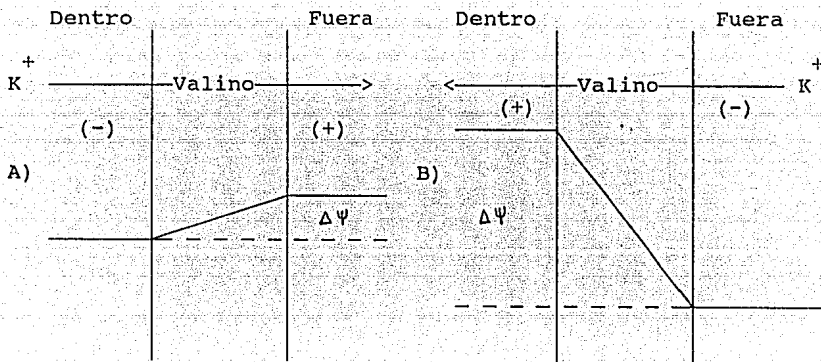


Figura 4.6 Transporte de potasio por el iónoforo valinomicina y potencial electroquímico generado en los proteoliposomas: A) en ausencia de Potasio en el medio. B) Con 100 mM de KCl en el medio.

El flujo del potasio dentro del sistema depende del incremento de su potencial electroquímico ($\Delta \tilde{\mu}_{K^+}$), mismo que está determinado por el del potencial químico del potasio ($\Delta \mu_{K^+}$) y el incremento de potencial eléctrico ($\Delta \Psi$) que exista a ambos lados de la membrana. De acuerdo con la relación que se muestra en la ecuación del cuadro 4.1, en donde Z_{K^+} es la carga del potasio y F la constante de Faraday (96,485 C mol⁻¹). En el presente trabajo, debido a que los experimentos se realizaron a concentraciones bajas, se utilizó la concentración como equivalente de la actividad química, que es la que determina el potencial químico.

$$\Delta \tilde{\mu}_{K^+} = \Delta \mu_{K^+} + Z_{K^+} F \Delta \Psi$$

Cuadro 4.1 Potencial electroquímico, explicación en el texto.

Para la condición de equilibrio $\Delta \tilde{\mu}_{K^+} = 0$ y el flujo neto del ión es cero, debido a que $\Delta \mu_{K^+} \equiv Z_{K^+} F$ en valor absoluto pero de signo contrario.

Antes de adicionar la valinomicina $\Delta \mu_{K^+}$ tiene un valor máximo y $\Delta \Psi = 0$, dado que las cargas del potasio se encuentran anuladas por sus contraiones. Al agregar el ionóforo, el potasio fluye a favor de su gradiente de concentración, por lo que la diferencia de potencial químico disminuye. Dado que no hay un mecanismo de transporte para su contraión (Cl⁻), se presenta un exceso de cargas positivas hacia donde se transporta, por lo que, se genera una diferencia de potencial eléctrico a ambos lados de la membrana.

El potencial eléctrico generado impulsará al K^+ en sentido contrario al flujo original hasta que el flujo neto del ión sea cero. En el último apartado de este capítulo se continuará la discusión sobre el flujo de potasio y el de protones hasta alcanzar la condición de equilibrio.

En los experimentos preliminares las cantidades del complejo B800-850 obtenidas eran muy pequeñas, por lo cual sólo podían prepararse pequeñas cantidades de proteolipasomas. De ahí que, para observar el efecto del establecimiento de una diferencia de potencial con el sistema valinomicina-potasio, se decidió obtener espectros diferenciales continuos (Cogdell y col. 1977), teniendo como referencia proteolipasomas B800-850 y adicionando en la cubeta de muestra 1 μg de valinomicina. Lo anterior a diferencia de lo reportado para cromatóforos bacterianos, en donde el espectro diferencial se había obtenido midiendo los Δ D.O., punto por punto en el intervalo mencionado (Smith y Ramírez, 1960; Jackson y Crofts, 1970; Crofts y col. 1974; Holmes y Crofts, 1977), así se obtuvieron los espectros mostrados en la figura 4.7. Como puede observarse, al provocar el potencial adicionando valinomicina en presencia de potasio en el medio se obtuvo un espectro diferencial que, en lo que respecta a la presencia de tres máximos (460, 493 y 523 nm) y dos mínimos (472 y 508 nm), es igual al espectro diferencial luz - oscuridad obtenido en forma continua en cromatóforos de *Rb. sphaeroides*, el cual se presenta en el trazo "a" de la figura 4.8. Resultados que coinciden con lo reportado por Jackson y Crofts, 1969 y 1970. Es decir, los

•, complejos reconstituidos reproducen el comportamiento en el cromatóforos cuando hay un bombeo de cargas positivas hacia el

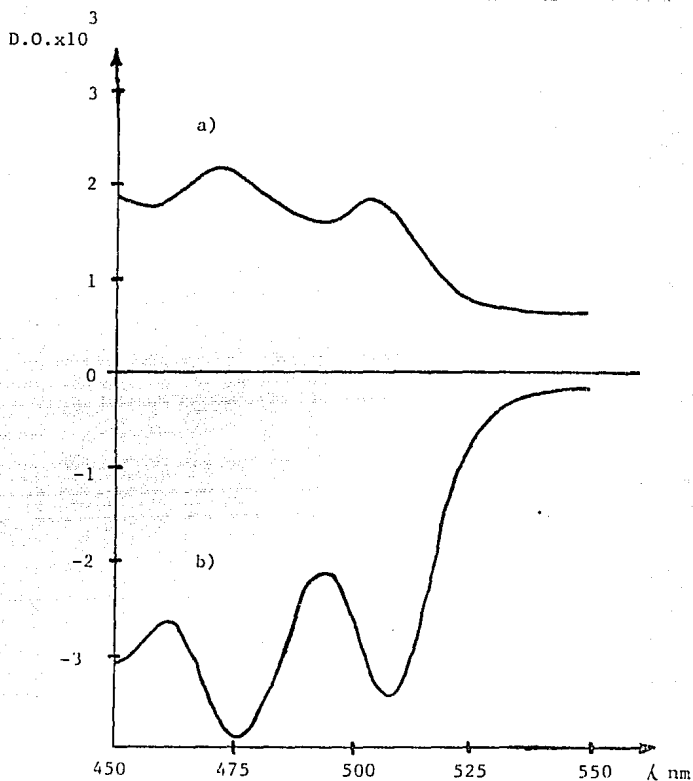


Figura 4.7 Espectro diferencial de proteoliposomas con B800-850 de 450 a 550 nm. 15 μg de proteína (2 μg de bacterioclorofila) + , - 1 μg de Valinomicina. a) en 2.0 ml de Tris 10 mM HCl pH 8.5 Cloruro de colina 145 mM. b) en 2.0 ml de Tris 10 mM HCl pH 8.5 KCl 100 mM Cloruro de colina 45 mM.

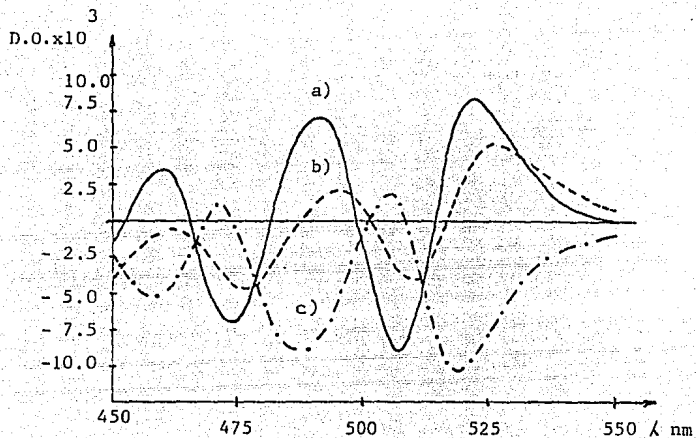


Figura 4.8 Espectro diferencial de cromatóforos de *Rhodobacter sphaeroides*, de 450 a 550 nm, 20 μg de proteína (1.0 μg de bacterioclorofila) en: a) 3.0 ml Tris 10 mM HCl pH 8.5 Cloruro de colina 145 mM, Luz - Oscuridad . b) 3.0 ml de Tris 10 mM HCl pH 8.5 KCl 100 mM Cloruro de colina 45 mM, +, - 1 μg de valinomicina. c) 3 ml de Tris 10 mM HCl pH 8.5 Cloruro de colina 145 mM +, - 1 μg de valinomicina .

interior, ya sea de protones al someterse a condiciones de iluminación o de respiración en la obscuridad (Chance, 1958; Smith y Ramírez, 1960), o de K⁺ al someterse a un gradiente iónico en presencia de valinomicina (Jackson y Crofts, 1969 y 1970); Es decir, cuando existe un potencial positivo en el interior de los proteoliposomas. También se encontró que la línea base se pierde de manera que la forma total del espectro es diferente. Al repetir este experimento en cromatóforos obtenidos de *Rb. sphaeroides*, se encontró que en éstos se presentaba el mismo efecto que en los proteoliposomas, es decir, aunque en menor escala había una pérdida de la línea base, como se observa en el trazo "b" de la figura 4.8. La pérdida de la línea base puede obedecer a un cambio en el volumen de las partículas con las que se está trabajando, provocándose por lo tanto un cambio en la dispersión de luz en el sistema (Duniet y Thorne, 1981). El hecho de que este fenómeno sea más acentuado en los liposomas puede ser debido a que los cromatóforos bacterianos son de tamaño diferente y por lo tanto provocan una menor dispersión de la luz.

4.5 Espectros diferenciales de proteoliposomas B800-850 al generar un gradiente electroquímico

Dada la similitud de respuestas discutida en el inciso anterior, se hizo necesario evaluar el verdadero espectro diferencial, eliminando el artificio que representa la pérdida de la línea base. Para lograrlo debería calcularse los Δ D.O. entre

los isobésticos del espectro diferencial obtenido y algunas de las longitudes de onda en el intervalo 450 y 550 nm. Sin embargo, como no era posible determinar dichos isobésticos en los espectros diferenciales obtenidos, se decidió tomar los reportados en los trabajos de Jackson y Crofts de 1969 y 1970 en donde se observa el corrimiento del caroteno en cromatóforos de *Rhodospseudomonas sphaeroides* bajo condiciones de iluminación y el efecto que tiene la adición de valinomicina y FCCP. Cabe señalar que aunque la respuesta al potencial inducido por el sistema valinomicina-K⁺ es menor en lo que respecta a la amplitud de los máximos y mínimos, que se presentan bajo condiciones de iluminación, como puede observarse en la figura 4.8, y que los isobésticos difieren de acuerdo al potencial establecido, ± 0.3 nm (Crofts, 1974; De Grooth y Amesz, 1977; Symons y col. 1978), se consideró que estas limitaciones no eran significativas para una primera evaluación de la respuesta de los complejos B800-850 reconstituidos. Así, se calcularon los Δ D.O. entre los pares de longitud de onda que se muestran en la Tabla 4.1. Los Δ D.O. obtenidos de esta manera se graficaron, encontrándose los espectros diferenciales (que se denominarán a partir de este momento "espectros diferenciales calculados") que se muestran en la figura 4.9. Como puede observarse, existe una plena correspondencia entre el espectro diferencial calculado de proteoliposomas y el de cromatóforos (Figuras 4.11 y 4.12) y son

•, bastante cercanos a los reportados por Dijkema y colaboradores en 1980 para espectros diferenciales (luz-obscuridad) de cromatóforos de *Rhodospseudomonas sphaeroides*.

452 ----- 456	501 ----- 493
465 ----- 460	501 ----- 497
465 ----- 463	501 ----- 504
465 ----- 469	514 ----- 508
479 ----- 472	514 ----- 511
479 ----- 476	514 ----- 518
479 ----- 486	536 ----- 523
	536 ----- 550

TABLA 4.1 Pares de longitudes de onda entre los que se calcularon los incrementos de densidad óptica (Δ D.O.) para obtener los espectros diferenciales calculados.

Lo anterior nos indica que los complejos B800-850 reconstituidos en liposomas son sensibles a la diferencia de potencial que se establece a través de la membrana; es decir, conservan las propiedades características de estos complejos antena en los cromatóforos de *Rb. sphaeroides*.

El que el espectro diferencial calculado en los protecoliposomas B800-850 con carga positiva en su exterior sea imagen especular del de aquellos en que la carga positiva se encuentra en el interior nos indica que se está dando un corrimiento del espectro hacia el azul. Esto demuestra que los

• complejos antena en su mayoría se encuentran orientados en la

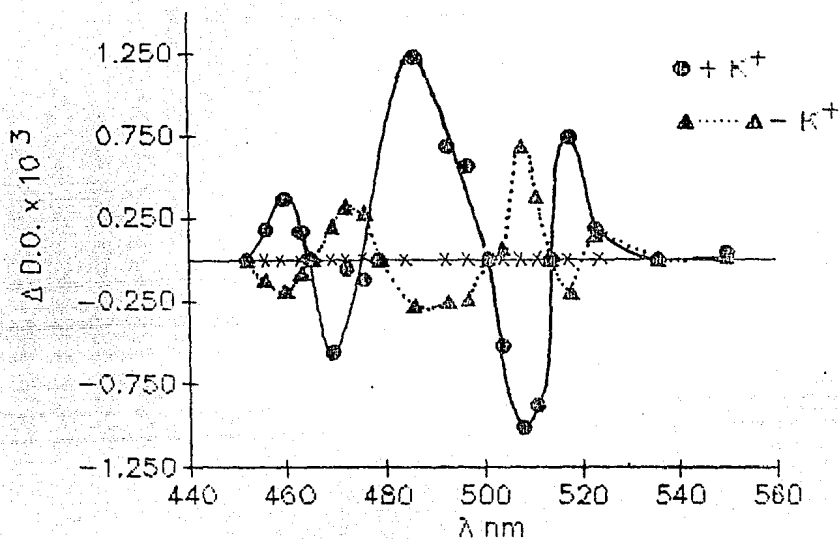


Figura 4.9 Espectros diferenciales 450-550 nm de proteoliposomas B800-850 al establecerse un gradiente electroquímico. Los

D.O. se calcularon sobre los espectros diferenciales de la figura 4.7 (donde se provocó el gradiente electroquímico con la adición de 1 μg de valinomicina) utilizando, los pares de longitud de onda señalado en la tabla 4.1. 15 μg de proteína (2 μg de bacterioclorofila). (---●---) Proteoliposomas B800-850 en Tris 10 mM, HCl pH 8.5, KCl 100 mM, Cloruro de colina 45 mM. (- △ -) Proteoliposomas B800-850 en Tris 10 mM HCl pH 8.5 Cloruro de colina 145 mM. (x) Complejos antena B800-850 en Tris 10 mM HCl pH 8.5 KCl 100 mM Cloruro de colina 45 mM LiDS 1.0 %.

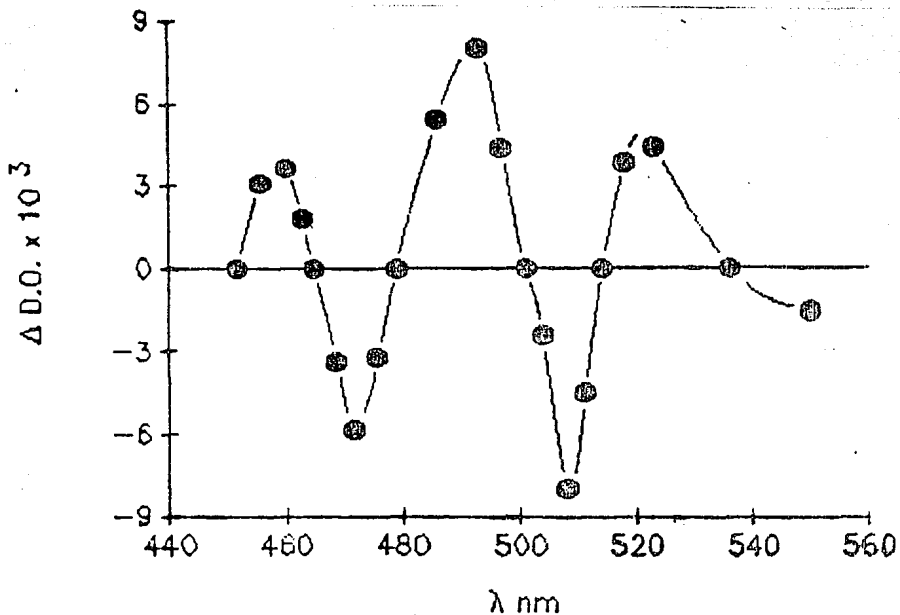


Figura 4.10 Espectros diferenciales 450-550 nm de cromatóforos de *Rb. sphaeroides* luz - oscuridad. Los Δ D.O. se calcularon sobre el espectro diferencial de la figura 4.8 utilizando los pares de longitud de onda de la tabla 4.1. Cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum* 20 μ g de proteína (1.0 μ g de bacterioclorofila) en 3.0 ml de Tris 10 mM HCl pH 8.5 Cloruro de colina 145 mM.

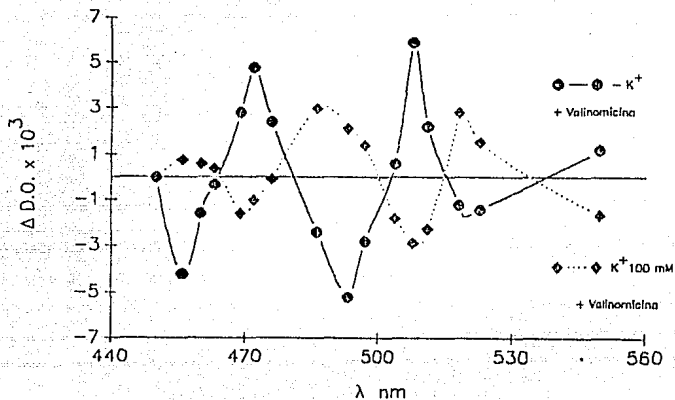


Figura 4.11 Espectros diferenciales 450-550 nm de cromatóforos de *Rb. sphaeroides* al establecerse un gradiente electroquímico. Los Δ D.O. se calcularon sobre los espectros diferenciales de la figura 4.8 utilizando los pares de longitud de onda de la tabla 4.1. Cromatóforos de *Rhodobacter sphaeroides* 20 μ g de proteína (1.0 μ g de bacterioclorofila) en 3.0 ml de: a) Tris 10 mM HCl pH 8.5 Cloruro de colina 145 mM, b) Tris 10 mM HCl pH 8.5 KCl 100 mM Cloruro de colina 45 mM. +, - 1 μ g de Valinomicina.

misma forma que en el cromatóforo, ya que si se encontraran distribuidos en forma simétrica, 50:50 debido a la reconstitución al azar, no podríamos observar espectro diferencial alguno dado que la respuesta de unos anularía la respuesta de los orientados en sentido opuesto.

El que los espectros diferenciales calculados de cromatóforos no presenten diferencia respecto a los reportados por Jackson y Crofts, 1969 y 1970 y que se obtuvieron al determinar los incrementos de D.O. a diferentes longitudes de onda respecto a la obtenida a 400 nm muestra que el método para calcular los Δ D.O. de un espectro diferencial continuo es una herramienta válida para evaluar los cambios en los espectros de absorción en este sistema.

Como un control de estos experimentos se utilizaron los complejos antena solubilizados en 1 % de LiDS. Con ellos se observó que la adición de valinomicina no provoca el diferencial obtenido en el caso de los proteoliposomas, lo que confirma tanto la reconstitución de los complejos antena en la bicapa lipídica como el que el cambio en su espectro es respuesta al gradiente electroquímico provocado mediante la adición de la valinomicina y diferentes concentraciones de K^+ .

4.6 Relación entre la magnitud del corrimiento del espectro de absorción de los proteoliposomas B800-850 y el potencial establecido a través de la membrana de los mismos

La dependencia del corrimiento electrocrómico del caroteno en *Rb. sphaeroides* respecto a la magnitud del potencial

generado a través de la membrana, demostrada por Jackson y Crofts al determinar la respuesta del corrimiento a diferentes potenciales generados mediante gradientes de concentración de K^+ y valinomicina (Jackson y Crofts, 1969 y 1970), así como al determinar la capacidad de la valinomicina para abatir el corrimiento provocado mediante un pulso de laser, en cromatóforos de *Rb. sphaeroides* (Jackson y Crofts, 1970), es una característica única de esta bacteria y se ha reconocido que está dada por parte de los complejos B800-850 de la misma (Holmes y col. 1980). Para comprobar que los complejos reconstituídos conservaban sus propiedades, se decidió utilizar las mismas condiciones reportadas para cromatóforos de *Rb. sphaeroides* (Jackson y col. 1968) en los proteoliposomas B800-850, determinándose el incremento de transmitancia entre las longitudes de onda; 509 y 523nm, utilizando el espectrofotómetro de doble rayo en modo dual. La respuesta obtenida se muestra en la figura 4.12, en donde puede observarse que los incrementos de transmitancia 509-523 nm son directamente proporcionales al logaritmo de la concentración de K^+ añadido al medio, en el que se hallan los proteoliposomas.

En la gráfica mencionada en el párrafo anterior, se calculó, a partir de la intersección con el eje de las X, la concentración de K^+ presente en el proteoliposoma, siendo ésta de 202 μM . Con este dato se calcularon, mediante la ecuación de Nernst, (cuadro 4.2) los potenciales generados a cada concentración de K^+ añadido al medio. La relación entre el incremento de transmitancia

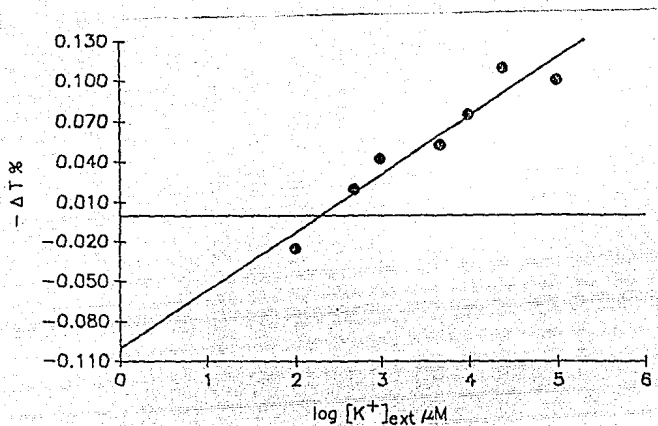


Figura 4.12 - ΔT 509-523 en proteoliposomas B800-850, al adicionar 1 μg de valinomicina, en función de la concentración de potasio en el medio. 15 μg de proteína (2 μg de bacterioclorofila) en Tris 10 mM HCl pH 8.5 con concentraciones variables de KCl, la presión osmótica del medio se equilibró a 300 miliosmoles con diferentes concentraciones de cloruro de colina, las concentraciones de KCl y cloruro de colina se muestran en el cuadro 4.3.

$$\Delta \psi = - \frac{R T}{|Z| F} \cdot \ln \frac{[K^+]_{int}}{[K^+]_{ext}}$$

Cuadro 4.2 Ecuación de Nernst. en donde el potencial generado se expresa en mvolts, la constante de los gases R es 8.31 Joul °K⁻¹ mol⁻¹, la temperatura T se expresa en °K, el valor absoluto de la valencia del ión |Z| es 1, la constante de Faraday F es 96,485 Coulomb mol⁻¹, la concentración del potasio externo es [K⁺] ext y la del interno [K⁺]int y el potencial generado se muestra en la figura 4.13 en donde puede observarse que el incremento de transmitancia es directamente proporcional a dicho potencial, encontrándose un incremento de 5 x 10⁻⁴ % en la transmitancia por cada 60 mvolts generados.

Tris 8.5 mM	p H	[KCl] mM	[Cl colina] mM	Osmolaridad mosmoles
	10	0.1	144.9	300
	10	0.5	144.5	300
	10	1.0	144.0	300
	10	5.0	140.0	300
	10	10.0	135.0	300
	10	25	120.0	300
	10	50	95.0	300
	10	100	45.0	300

Cuadro 4.3 Composición de los medios en que se provocó el establecimiento de potenciales electroquímicos en proteoliposomas B800-850 y B890 mediante la adición del ionóforo valinomicina.

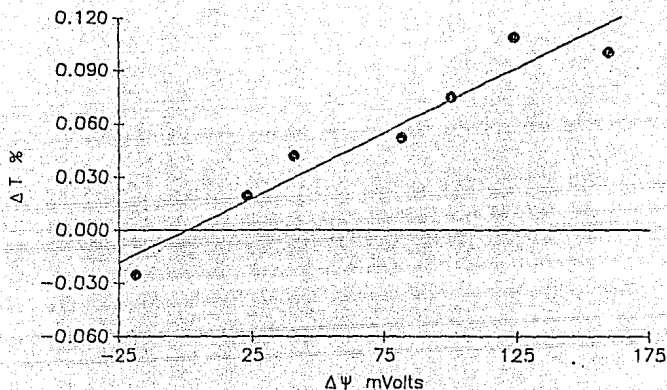


Figura 4.13 - ΔT 509-523 en proteoliposomas B800-850, en función del potencial generado a diferentes concentraciones de potasio, al adicionar 1 μg de valinomicina. 15 μg de proteína (2 μg de bacterioclorofila) en Tris 10 mM HCl pH 8.5 con concentraciones variables de KCl, la presión osmótica del medio se equilibra a 300 miliosmoles con diferentes concentraciones de Cloruro de colina.

Aunque se había encontrado que la relación lineal se mantenía en los complejos B800-850 reconstituídos, era necesario demostrar que no representaba un efecto general de la presencia de complejos pigmento - proteína en la bicapa del liposoma. Para lograrlo se prepararon proteoliposomas con los complejos B890 obtenidos de *Rhodospirillum rubrum*. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica de la figura 4.14. En la misma figura vemos los resultados con cromatóforos de esta bacteria, viendo que: a) la respuesta de los B890 es igual que la de cromatóforos íntegros. b) Que no existe la dependencia directa entre el cambio de caroteno y la magnitud del potencial inducido característica de los complejos B800-850.

4.7 Obtención del espectro diferencial punto por punto en proteoliposomas

Para caracterizar más ampliamente el espectro diferencial de los proteoliposomas B800-850, al establecer un potencial de membrana mediante valinomicina-potasio, se aplicó la fórmula utilizada en cromatóforos por Jackson y Crofts en 1969 a los proteoliposomas. Se midieron los Δ D.O. a los pares de longitud de onda señalados en la tabla 4.1. Los valores obtenidos se muestran en la gráfica de la figura 4.15. Nuevamente puede observarse la presencia de tres máximos y dos mínimos, aunque en este caso existe una diferencia, en cuanto a la magnitud, con los valores encontrados en cromatóforos. En el caso de los espectros calculados se encuentra una diferencia similar.

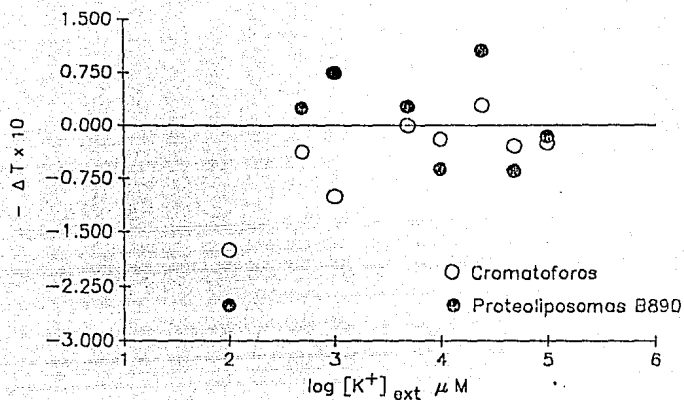


Figura 4.14 - ΔT 508-530 en proteoliposomas B890 y cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*, al adicionar 1 μg de valinomicina, en función de la concentración de potasio en el medio. o) 6 μg de proteína (0.3 μg de bacterioclorofila). o) 2.4 μg de proteína (0.3 μg de bacterioclorofila), en Tris 10 mM HCl pH 8.5 con concentraciones variables de KCl, la presión osmótica del medio se equilibró a 300 miliosmoles las diferentes concentraciones de cloruro de colina señaladas en el cuadro 4.3.

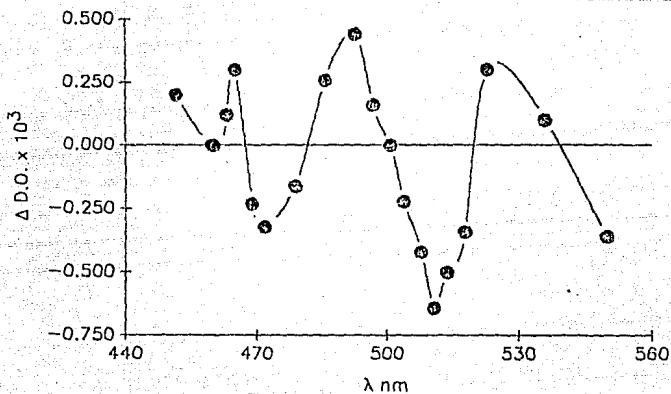


Figura 4.15 Incrementos de densidad óptica en proteoliposomas B800-850 entre los pares X - 400 nm, en donde $452 \leq X \leq 550$. Proteoliposomas B800-850 equivalentes a 2.25 μ g de proteína o 0.3 μ g de Bacterioclorofila, en 2.85 ml de Tris 10 mM, HCl pH 8.5, KCl 100 mM, cloruro de colina 45 mM, +, - 1 μ g de valinomicina.

4.8 Efecto del protonóforo CCCP y del intercambiador nigericina sobre el cambio del caroteno provocado en los proteoliposomas B800-850 con valinomicina y potasio

Como se señaló en el punto 4.4, el flujo del K^+ provocado por la valinomicina, se detiene cuando el valor del $\Delta\psi$ se hizo lo suficientemente grande como para anular el efecto de la diferencia de concentraciones del potasio entre el interior y el exterior del proteoliposoma (trazo a de la figura 4.16), sin que se alcance el equilibrio verdadero, ya que como se puede ver, el cambio de caroteno empieza a decrecer, como consecuencia de un reflujó de potasio hacia el exterior, alcanzándose el equilibrio en aproximadamente 32 segundos, en donde $\Delta\mu_{K^+} \equiv \Delta\psi$. Una vez alcanzado dicho equilibrio, la adición del protonóforo CCCP permite la salida de protones. Salida a favor de su gradiente químico y el potencial eléctrico generado por la anterior entrada de potasio. El resultado final es que el potencial se invierte hasta un valor máximo, a partir del cual se presenta el mismo proceso que en la primera parte del experimento. Es decir, el sistema evoluciona hasta alcanzar un nuevo equilibrio. El equilibrio alcanzado queda determinado por los dos iones involucrados. El hecho de que el potencial final no sea cero refleja la diferencia de concentraciones de ambas especies iónicas.

En la figura 4.17 se señala el flujo y reflujó de los diferentes iones, señalados en el inciso anterior, hasta alcanzarse el equilibrio final muy cerca del valor nulo de los potenciales químico y eléctrico.

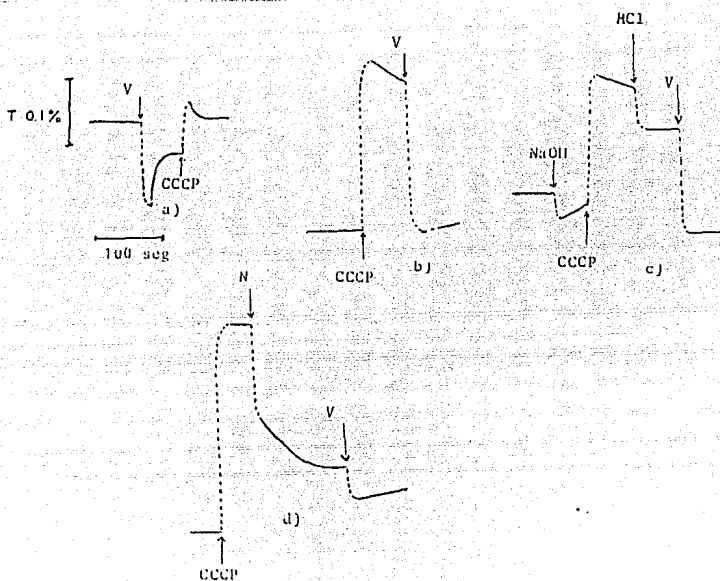


Figura 4.16 Δ T 509-523 en proteoliposomas B800-850 en presencia de valinomicina, CCCP y nigericina. Proteoliposomas, equivalentes a 3 μg de proteína o 0.4 μg de bacterioclorofila, en 2.8 ml de Tris 10 mM, HCl pH 8.5, KCl 100 mM, Cloruro de colina 45 mM. Se señala la adición de: V = valinomicina, CCCP = p-triclorometoxi carbonil cianuro fenilhidrazona, N = nigericina, HCl = 10 μl de Tris 1 M, HCl pH 8.2 y NaOH = 10 μl de Tris 1 M, HCl pH 8.6.

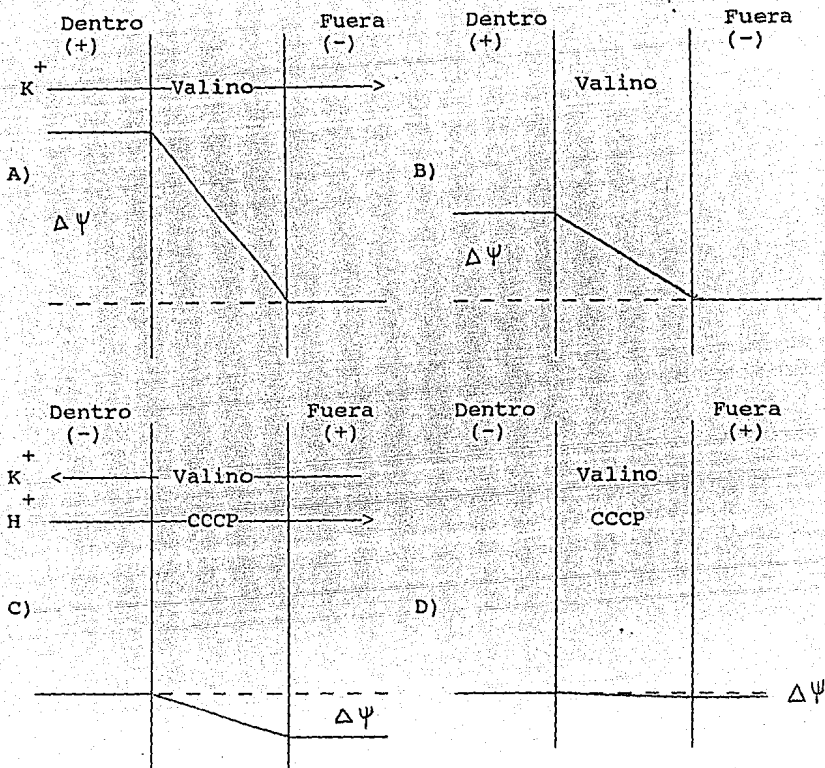


Figura 4.17 Flujo de los iones K^+ e H^+ en las condiciones señaladas en el trazo a) de la figura 4.16. A) Reflujo de potasio, mediante la valinomicina, hacia el exterior al haberse establecido un potencial eléctrico máximo a través de la membrana. B) Condición de equilibrio en la que el potencial eléctrico iguala al químico por lo que el flujo del potasio es cero. C) Flujo de Potasio y protones, mediante la valinomicina y el CCCP, a favor de sus gradientes químicos, alcanzándose la inversión del potencial eléctrico generado con valinomicina-potasio al principio del experimento. D) Condición de equilibrio final en que el flujo de ambos iones se hace cero.

En el trazo b) de la figura 4.16 puede observarse, que al adicionar en primer lugar el CCCP, se obtiene un incremento de transmitancia contrario al provocado por la entrada de potasio. La entrada de potasio al añadirse valinomicina disminuye la transmitancia, con lo que se demuestra que los cambios provocados por diferencias de potencial son reversibles; es decir, que los complejos antena se encuentran en forma funcional en los proteoliposomas.

Aunque aparentemente los incrementos de transmitancia son diferentes en ambos trazos, debe tenerse en cuenta que las partes punteadas de los mismos representan el tiempo en que no se registró el incremento de transmitancia, debido a que debía apagarse el alto voltaje para añadir el ionóforo y agitar la cubeta. Es por ésto que no podemos cuantificar en forma exacta la respuesta máxima, y por tanto el experimento tiene un carácter cualitativo más que cuantitativo.

En el trazo c) de la misma figura se observa el efecto de la alcalinización del medio, al añadir 10 μ l de Tris 1 M HCl pH 8.6, aunque el pH alcanzado fue de 8.6, es claro que el incremento de transmitancia disminuye en lugar de aumentar. Esto puede interpretarse como un reflejo del hecho de que el poder amortiguador en el medio se aumentó al doble de su valor original, dando nuevos valores de concentración de las especies iónicas de la sal de Tris en el medio, lo mismo puede interpretarse de la adición de Tris 1M HCl pH 8.2 (con lo que se alcanzó un pH de 8.45) que no logra la inversión del potencial original, mismo que, basándonos en la calibración del corrimiento del caroteno que se

muestra en la figura 4.12, correspondería a un Δ pH de .15 unidades. La inversión del potencial sí se logra mediante la adición de valinomicina; sin embargo, el valor final es mucho menor que si no se hubiese modificado la concentración del amortiguador en el medio, que es el caso del trazo a) de la figura 4.12.

En el último experimento que se muestra en esta figura se añadió el intercambiador, K^+H^+ , nigericina después de haber generado un potencial de membrana mediante CCCP. A pesar de que el intercambio provocado por la nigericina es neutro eléctricamente el potencial se abate en casi un 50%. Lo que fué resultado de que al añadirla ya existía un exceso de protones en el medio por lo que al salir más, parte de ellos reingresarán disminuyendo así el potencial vía el CCCP. El poco efecto que provoca la adición de valinomicina al sistema confirma que las especies iónicas involucradas se encuentran cerca del equilibrio.

En la figura 4.18 se muestran los flujos de iones y los potenciales eléctricos generados bajo las condiciones señaladas para el trazo d) de la figura 4.16.

Si se permite el equilibrio entre los iones K^+ y H^+ mediante la adición de nigericina desde el principio del experimento, (trazo no mostrado) se comprueba que el intercambio es eléctricamente neutro y que adiciones posteriores de valinomicina o CCCP no tienen ningún efecto sobre el sistema.

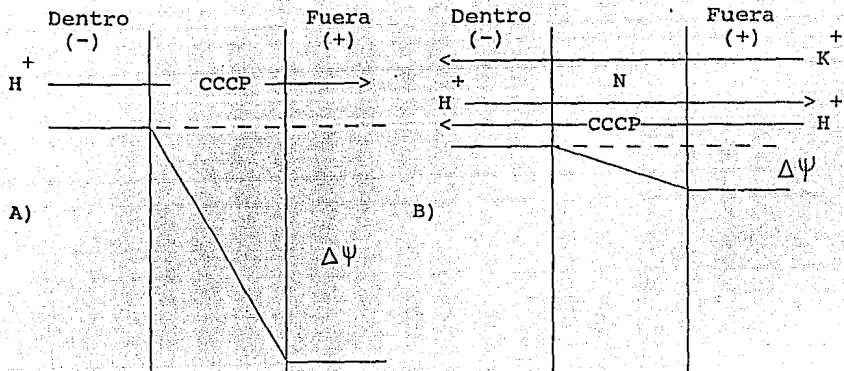


Figura 4.18 Flujo de los iones mediante CCCP y nigericina. En el diagrama A) se muestra el potencial eléctrico generado por el flujo de protones a favor de su gradiente de concentración al añadir CCCP al sistema. En el B) se muestran los flujos de protones y potasio, en presencia de nigericina y CCCP, así como el abatimiento del potencial eléctrico generado bajo las condiciones señaladas para el diagrama A). Las condiciones son las señaladas para el trazo d) de la figura 4.16.

DISCUSION

CAPITULO 5 DISCUSION

La utilidad del corrimiento electrocrómico del complejo B800-850 como monitor del potencial de membrana ha sido ampliamente reconocida (Crofts, 1974; Crofts y col. 1974; Conjeaudm y Michel-Villaz, 1976; De Groth y Amesz, 1977; Dijkema y col. 1980; Holmes y col. 1980), como se ha mencionado, su desarrollo en membranas fotosintéticas es bastante complejo y dependiente de: a) el organismo en estudio, b) de las condiciones del cultivo y c) de las condiciones de la determinación (Smith y Ramírez, 1960; Jackson y col. 1968; Jackson y Crofts, 1970; Holmes y Crofts, 1977a y 1977b; Dijkema y col. 1980;). Es por estas razones que cobra importancia la reconstitución en liposomas del complejo B800-850 lograda en el presente trabajo. Ya que en un sistema reconstituido se cumplen los siguientes puntos:

- La reproducción del corrimiento electrocrómico de los carotenoides bajo condiciones controladas.

- La eliminación de interferencias espectrofotométricas por parte de otros complejos pigmento-proteína.

5.1 Reconstitución en liposomas de complejos pigmento-proteína.

Varga y Staehelin, en 1985, reportaron la purificación y reconstitución en liposomas de complejos pigmento-proteína de *Rhodospseudomonas palustris*. Dependiendo del detergente utilizado en

la solubilización estos autores obtuvieron dos tipos diferentes de complejos. Mediante una mezcla de octil-glucosido (OG) y dodecil sulfato de sodio (SDS) obtuvieron varias fracciones, una de las cuales contenía el complejo B800-850 (LHC II). Utilizando solamente OG obtuvieron una sola fracción en la que se encuentran mezclados Centros de reacción (CR), complejos antena B870 (LHC I) y los B800-850 (LHCII). Es importante destacar que los espectros de absorción de los complejos obtenidos por esta metodología no se alteran.

En el caso de los complejos obtenidos mediante la metodología marcada en el capítulo 3, las características espectrofotométricas tampoco se alteran. Variaciones en las condiciones de solubilización de las membranas o de los gradientes utilizados solo provocan cambios en los rendimientos del material recolectado. Esto es coincidente con lo reportado al utilizar diferentes tipos de detergentes en la solubilización (Win y col. 1989).

5.2 Reconstitución en liposomas del corrimiento electrocrómico de los carotenoides.

Otra reconstitución de este tipo de complejos; pero, de la bacteria *Rhodobacter sphaeroides*, fue la realizada por Win y col. en 1989. En dicha reconstitución los detergentes utilizados en la purificación fueron colato y desoxicolato. La reconstitución en liposomas la lograron mediante diálisis. En este trabajo los complejos no solamente conservan sus espectros de absorción sino también el corrimiento electrocrómico del caroteno (c.e.c.).

Una pregunta que surge al obtener proteoliposomas en los que se presenta el c.e.c. es la topología de los complejos reconstituidos; es decir, ¿es necesaria una orientación de los complejos para observar el fenómeno? ; o bien, sólo se requiere que los complejos estén integrados a la membrana. La obtención de imágenes especulares (ver la figura 4.7) al variar el signo del potencial de membrana, es una evidencia de que si existe una orientación de los complejos. Otra evidencia es la de que Win y col. encontraron respuestas opuestas en los dos tipos de proteoliposomas que obtuvieron; así los proteoliposomas con LHC II presentan un espectro diferencial inverso al de cromatóforos; mientras que, los que contenían RC-LHC I-LHC II presentaban solamente un pequeño corrimiento (9 nm) al rojo.

Los proteoliposomas B800-850 obtenidos en este trabajo presentaron el c.e.c. que coincide con el descrito en cromatóforos de *Rhodobacter sphaeroides* (Crofts y col. 1974; Conjeaudm y Michell Villaz, 1976; De Grooth y Amesz, 1977; Holmes y Crofts 1977a y 1977b; Dijkema y col. 1980; Holmes y col. 1980). Una de las características más importantes es la relación lineal que guardan los incrementos de transmitancia (509-523) respecto a la magnitud del potencial de membrana (Jackson y col. 1968; Jackson y Crofts, 1970; Holmes y col. 1980; Symons y Sybesma, 1984). En el trabajo de Win y col. se plantea que esta característica también se presenta; sin embargo, en su trabajo no establecen un control absoluto en cuanto a la conservación de una presión isoosmótica en los experimentos. Esto podría estar alterando los valores de calibración por efecto de dispersión de luz (Duniet y Thorne, 1981). Este fenómeno podría explicar las diferencias entre los

valores reportados por Win y los reportados en el capítulo 4.

5.3 Caracterización de la fase III del corrimiento electrocrómico de los carotenoides.

Jackson y Crofts en 1970 demostraron la existencia de cuatro fases en el desarrollo del c.e.c. en cromatóforos de *Rhodobacter sphaeroides* bajo diferentes condiciones de iluminación. Una quinta fase llamada lenta puede provocarse por cambios de pH o iluminación continua (Koyama y col. 1983). Estas fases se han interpretado como consecuencia de diferentes eventos en la membrana de los cromatóforos tales como: Separación de la carga en el centro de reacción, flujo de los electrones a través de la cadena de electrones fotosintética y escurrimiento de iones. Específicamente la fase III corresponde al establecimiento de una diferencia de potencial a ambos lados de la membrana en estado estacionario. El sistema reconstituido en el presente trabajo permite disecar dicha fase y observar el efecto de la imposición de diferentes potenciales sobre el c.e.c. Así estamos en posibilidad de evaluar la contribución del potencial de membrana sobre el corrimiento en el sistema natural.

5.4 Perspectivas.

Los complejos antena reconstituidos permitirán, en un futuro, el estudio bajo condiciones controladas de las fases II, IV y lenta del corrimiento de los carotenoides (la I fué estudiada por Cogdell y col. en 1977 en centros de reacción solubilizados).

Se puede llevar a cabo el estudio del efecto de la carga de superficie sobre el c.e.c. mediante variaciones en el tipo de fosfolípidos que se utilicen en la formación de los liposomas.

Otra expectativa la constituye el estudio del potencial generado por bombas activadas por luz (centros de reacción o bacteriorrodopsina), por ATP (ATPasa de protones) o sistemas de oxido reducción (citocromo oxidasa).

CONCLUSIONES

CAPITULO 6 CONCLUSIONES

- 6.1 La utilización del detergente aniónico dodecil sulfato de litio, para solubilizar la membrana de cromatóforos, combinada con la centrifugación diferencial en gradientes discontinuos de sacarosa, permitió la obtención de complejos antena sin alteraciones espectrofotométricas y en cantidades adecuadas para llevar a cabo su posterior reconstitución.
- 6.2 La reconstitución en liposomas (mediante diálisis) de los complejos antena B800-850 y B890, obtenidos a partir de la solubilización de la membrana de cromatóforos con el detergente dodecil sulfato de litio, no provocó alteraciones significativas en los espectros de absorción de ninguno de los dos complejos.
- 6.3 Los complejos antena reconstituidos en liposomas presentaron una respuesta específica y reversible a los potenciales eléctricos establecidos a través de la membrana mediante difusión facilitada.
- 6.4 Los complejos B800-850 reconstituidos presentaron las características, cualitativas (corrimiento al rojo o al azul del espectro) y cuantitativas (respuesta directamente proporcional al potencial eléctrico impuesto a través de la membrana, que corresponden al corrimiento electrocrómico del caroteno.
- 6.5 Mediante la metodología planteada en la presente tesis es posible: obtener un sistema para el estudio del corrimiento electrocrómico del caroteno, libre de la presencia de otros complejos pigmento-proteína propios de los cromatóforos de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- ALLEN, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H. y Rees, D.C., 1988, "Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 y 2.4.1", en: The Photosynthetic Bacterial Reaction Center. Structure and Dynamics, (J. Breton y A. Verméglio eds.) NATO ASI series, S. A, L.Sc.Vol. 149, p. 21, Plenum Press, New York.
- AMESZ, J., y Knaff, D.B., 1988, "Molecular mechanisms of bacterial photosynthesis", en: Biology of anaerobic microorganisms, Wiley series in ecological and applied microbiology, (A.J.B. Zehnder ed.), p. 113, John Wiley & Sons, New York.
- ARNOLD, W., y Clayton, R.K., 1960, "The first step in photosynthesis: Evidence for its electronic nature", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 46: 769.
- BALTSCHIEFFSKY, M., 1969, "Energy conversion-linked changes of carotenoid absorbance in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores", Arch. Biochem. Biophys., 130: 616.
- BEUGELING, T., Slooten, L., y Barelds-van de Beck, P.G.M.M., 1972, "Thin-layer chromatography of pigments from reaction centers particles of *Rhodopseudomonas sphaeroides*", Biochim. Biophys. Acta, 238:328.
- BRITO, R.M., y Vaz, W.L., 1986, "Determination of the critical micelle concentration of surfactants using the fluorescent probe N-phenyl-1-naphthylamine", Anal. Biochem., 152:250.
- BROGLIE, R.M., Hunter, C.N., Delepelaire, P., Niederman, R.A., Chua, N.-H., y Clayton R.K., 1980, "Isolation and Characterization of the pigment-protein complexes of *Rhodobacter sphaeroides* by lithium dodecyl sulfate/poliacrilamide gel electrophoresis", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77:87
- BRUNISHOLZ, R.A., Jay, F., Sutter, F., y Zuber, H., 1985, "The light - harvesting polypeptides of *Rhodopseudomonas viridis*. The complete amino-acid sequences of B1015- α , B1015- β y B1015- ", Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 366: 87.

- BRUNISHOLZ, R.A., Cuendet, P.A., Theiler, R., y Zuber, H., 1981, "The complete amino acid sequence of the single light harvesting protein from chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* G-9+", FEBS Lett., 129: 150.
- CELIS, H., 1985, "Fotosíntesis microbiana", en: El mensaje Bioquímico, (G. Alvarez, L., Y., Saldaña, D., S., Jiménez, T., A., Hernández, T., y E., Escamilla, M., Eds.), Vol. VIII: p. 337, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina U.N.A.M., México D.F.
- CHANCE, B., 1958, "Oxygenic-linked absorbancy changes in photosynthetic cells", Brookhaven Symp. Biol. 11: 74.
- CHANCE, B., y Smith, L., 1955, "Respiratory pigments of *Rhodospirillum rubrum*", Nature (London), 175: 803.
- CHATTOPADHYAY, A., y London, E., 1984, "Fluorometric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergents charge". Anal. Biochem., 139:408.
- CLAYTON, R.K., 1963, "Toward the isolation of a photochemical reaction center in *Rhodopseudomonas spheroides*", Biochem. Biophys. Acta, 75: 312.
- CLAYTON, R.K., 1980a, "The chemical nature of photosynthesis", en: Photosynthesis, Physical mechanisms and chemical patterns, p. 3, Cambridge University Press, London.
- CLAYTON, R.K., 1980b, "The roles of chlorophylls and other pigments", en: Photosynthesis, physical mechanisms and chemical patterns, p. 19, Cambridge University Press, London.
- CLAYTON, R.K., 1980c, "Components of the photosynthetic membranes of bacteria: composition and function in energy transfer and photochemistry", en: Photosynthesis, physical mechanisms and chemical patterns, p. 88, Cambridge University Press, London.
- CLAYTON, R., K., y Clayton, B.J., 1981, "B850 pigment-protein complex of *Rhodopseudomonas sphaeroides*: extinction coefficients, circular dichroism, and the reversible binding of bacteriochlorophyll", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78: 5583.
- CLAYTON. R.K., y Haselkorn, R., 1972, "Protein components of bacterial photosynthesis membranes", J. Mol. Biol. 68: 97.

- CLAYTON, R.K., y Wang, R.T., 1971, "Photochemical reaction centers from *Rhodospseudomonas spheroides*", en: Methods in Enzymology (S.P. Colowick y N.O. Kaplan eds.), Vol. 23, p.696, Academic Press, New York.
- COGDELL, R.J., Celis, S., Celis, H., y Crofts, A.R., 1977, "Reaction centre carotenoid band shifts", FEBS Letters, 80: 190.
- COGDELL, R.J., y Crofts, A.R., 1978, "Analysis of the pigment content of an antenna pigment-protein complex from three strains of *Rhodospseudomonas sphaeroides*", Biochim. Biophys. Acta, 502: 409.
- COGDELL, R.J., Lindsay, J.G., Valentine, J., y Durant, I., 1982, "A further characterization of the B890 light-harvesting pigment-protein complex from *Rhodospirillum rubrum* strain S1", FEBS Lett., 150: 151.
- COGDELL, R.J., Parson, W.W., y Kerr, M. A., 1976, "The type, amount and energy transfer properties of the carotenoid in reaction centers from *Rhodospseudomonas spheroides*", Biochim. Biophys. Acta, 430: 83.
- COGDELL, R.J., y Scheer, H., 1985, "Circular dichroism of light-harvesting complexes from purple photosynthetic bacteria", Photochem. Photobiol., 42: 669.
- COGDELL, R.J., y Thornber, 1980, "Light-harvesting pigment protein complexes of purple photosynthetic bacteria", FEBS Lett., 122: 1.
- COHEN-BAZIRE, G., Sistrom, W.B., Stainewr, R.Y., 1957, "The Kinetics Studies of Pigment Shynthesis by non-sulfur purple bacteria". J. Cell. Comp. Physiol. 49:25.
- CONJEAUDM, H., y Michel-Villaz, M., 1976, "Photoinduced Electric field effect on the optical properties of photosynthetic membranes", J. Theor. Biol., 62: 1.
- CROFTS, A.R., 1974, "The electron transport system as a pump in the photosynthetic Bacteria", en: Perpectives in Membrane Biology. (Editores: S. Estrada y C. Gitler), p. 373 Academic Press. New York, Sn. Francisco y London.
- CROFTS, A.R., Prince, R.C., Holmes, N.G., y Crowther, D., 1974, "Electrogenic electron transport and the carotenoid change in photosynthetic bacteria", en: Proceedings of the third International Congress on Photosynthesis, (M. Avron, ed.), p. 1131, Esevier Scientific, Amsterdam.

- CULVER, D. A., y Brunskill, G.J., 1969, "Fayetteville Green Lake, New York. V. Studies of primary production and zooplankton in a meromictic lake", Limnol. Oceanogr., 14:862.
- DE GROOTH, B.J., y Amesz, J., 1977, "Electrochromic absorbance changes in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. II Analysis of the band shifts of carotenoid and bacteriochlorophyll", Biochim. Biophys. Acta, 462: 247.
- DEISENHOFER, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., y Michel, H., 1984, "X-Ray Structure analysis of a membrane Protein complex: Electron density map at 3 Å resolution a model of the Chromophores of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*", J. Mol. Biol., 180: 385.
- DEISENHOFER, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., y Michel, H., 1985, "Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution", Nature, 318: 618.
- DEISENHOFER, J., y Michel, H., 1988, "The crystall Structure of the Photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*", en: The Photosynthetic Bacterial Reaction Center, Structure and Dynamics, (J. Breton y A. Verméglio eds.) NATO ASI series, S. A, L.Sc. Vol. 149, p. 1, Plenum Press, New York.
- DE VENDITTIS, E., 1981, "A fluorimetric method for the estimation of critical micelle concentration of surfactants", Anal. Biochem., 115:278.
- DIJKEMA, C., Michels, P.A.M., y Konings, W.N., 1980, "Light-induced Spectral Changes of Carotenoids in chromatophores of *Rhodospseudomonas sphaeroides*", Arch. Biochem. Biophys. 201;2: 403.
- DREWS, G., 1985, "Structure and functional organization of light harvesting complexes and photochemical reaction center in membranes of phototrophic bacteria", Microbiol. Rev., 49: 59.
- DUCRUIX, A., Bernadette A., y Reiss-Husson F., 1988, "Crystallographic studies of the photosynthetic reaction center from wild type *Rhodobacter sphaeroides* (Y strain)", en: The Photosynthetic Bacterial Reaction Center, Structure and Dynamics, (J. Breton y A. Verméglio eds.) NATO ASI series, S.A, L.Sc. Vol. 149, p. 21, Plenum Press, New York.

- DUNIET, J.T., y Thorne, S.W., 1981, "Light-scattering artifacts can obscure the measurement of intramembrane electric fields by means of carotenoid spectral shifts", Photochem. Photobiophys., 2: 85.
- DUTTON, P.L., 1971, "Oxidation-reduction potential dependence of the interaction of cytochromes, bacteriochlorophyll and carotenoids at 77°K in chromatophores of *Chromatium D* and *Rp. gelatinosa*", Biochim. Biophys. Acta, 226: 63.
- DUYSENS, L.M.N., 1952, "Transfer of excitation energy in photosynthesis", Tesis doctoral, Universidad de Utrecht.
- EMERSON, R., y Arnold, W., 1932, "A separation of the reactions in photosynthesis by means of intermittent light", J. Gen. Physiol., 15:391.
- EMERSON, R., y Arnold, W., 1932b, "The photochemical reaction in photosynthesis". J. Gen. Physiol., 16:191.
- FEHER, G., 1971, "Some chemical and physical properties of bacterial reactions centers particle and its primary photochemical reactants", Photochem. Photobiol. 14: 373.
- FEHER, G., y Okamura, M. Y., 1978, "Chemical Composition and Properties of Reaction Centers", en: The Photosynthetic Bacteria, (Clayton R.K. and Sistrom W.R., eds.) p. 349, Plenum Press, New York, Londres.
- FEHER, G., Okamura, M. Y., y McElroy, J. D., 1972, "Identification of an electron acceptor in reaction centers of *Rhodospseudomonas spheroides* by EPR spectroscopy", Biochim. Biophys. Acta, 267: 222.
- FEHER. G., Okamura, M.Y., Raymond, J.A., y Steiner, L.A., 1971, "Subunit structure of reaction centers from *Rhodospseudomonas spheroides*", Biophys. Soc. Abstr. 11:38.
- FLEISCHMAN, D.E., y Clayton, R.K., 1968, "The effect of phosphorylation uncouplers and electron transport inhibitors upon spectral shifts and delayed light emission of photosynthetic bacteria", Photochem. Photobiol., 8: 287.
- FRENKEL, A.W., y Hickman, D.D., 1959, "Structure and photochemical activity of chlorophyll-containing particles from *Rhodospirillum rubrum*", J. Biophys. Biochem. Cytol. 6:285.

- FRENKEL, A. W., y Nelson, R. A., 1971, "Bacterial Chromatophores", en: Methods in Enzymology, (ed. A. San Pietro), vol. XXIII, p.256, Academic Press, New York.
- GLAZER, A. N., 1983, "Comparative biochemistry of photosynthetic light-harvesting systems", Ann. Rev. Biochem. 52: 125.
- GLAZER, A. N., 1987, "Photochemical reaction centers: Structure organization, and function", Ann. Rev. Plant Physiol., 38: 11.
- GOGEL, G.E., Parkes, P.S., Loach, P.A., Brunisholz, R.A., y Zuber, H., 1983, "The primary structure of a light-harvesting bacteriochlorophyll binding protein of wild type *Rhodospirillum rubrum*", Biochim. Biophys. Acta. 746:32.
- GOLDIN, S.M., y Tong, S.W., 1974, "Reconstitution of active transport catalyzed by the Purified Sodium and Potassium Ion-stimulated Adenosine triphosphatase from canine Renal Medula", J. Biol. Chem., 249:5907.
- GOMEZ-LOJERO, C., 1984, "Fotosíntesis", en: Mensaje Bioquímico, vol VII, (Y. Saldaña, G. Alvarez y M. Zentella, eds.) p. 267, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.N.A.M.
- GOMEZ-PUYOU, A., y Gómez-Lojero, C., 1977, "The use of ionophores and channel formers in the study of the biological membranes", en: Current topics in Bioenergetics, (D. Rao Samadi ed.), 6: 221, Academic Press, New York.
- GORCHEIN, A., Neuberger, A., y Tait, G.H., 1968, "The isolation and characterization of cellular fractions from pigmented cells of *Rhodospseudomonas sphaeroides*", Proc. Roy. Soc. London Ser. B, 170: 229.
- GRIFFITH, M., Sistrom, W.R., Cohen-Bazire, G., y Stainer, R.Y., 1955, "Funtion of carotenoids in photosynthesis", Nature (London), 176: 1211.
- GRINGAS, G., y Jolchine, G., 1969, "Isolation of a P_{870} -enriched particle from *Rhodospirillum rubrum*", en: Progress in Photosynthesis Research: Proceedings of the International Congress of Photosynthesis Research, Freudenstadt, 1968, (H. Metzner ed.), Vol. 1, p. 209, H. Lamp, Jr., Tübingen Germany.

- HAYASHI, H., y Morita, S., 1980, "Near infrared absorption spectra of light-harvesting bacteriochlorophyll protein complexes from *Chromatium vinosum*", J. Biochem., 88: 1251.
- HILDEN, S., Rhee, H.M., y Hokin, L.E., 1974, "Sodium Transport by Phospholipid Vesicles Containing Purified Sodium and Potassium Ion-activated Adenosine Triphosphatase", J. Biol. Chem., 249: 7432.
- HOLMES, N. G., y Crofts, A. R., 1977a, "The carotenoid shift in *Rhodospseudomonas sphaeroides* the flash induced change", Biochim. Biophys. Acta, 459: 492.
- HOLMES, N.G., y Crofts, A.R., 1977b, "The carotenoid shift in *Rhodospseudomonas sphaeroides* change induced under continuous illumination", Biochim. Biophys. Acta, 461:141.
- HOLMES, N.G., Hunter, C. N., Niederman, A., y Crofts, A. R., 1980, "Identification of the pigment pool responsible for the flash-induced carotenoid band shift in *Rhodospseudomonas sphaeroides* chromatophores", FEBS Lett., 115: 43.
- HOLT, S.C., y Marr, A.G., 1965, "Location of Chlorophyll in *Rhodospirillum rubrum*", J. Bacteriol. 89:1402.
- HOLT, S.C., y Marr, A.G., 1965b, "Isolation and purification of the intracytoplasmic membranes of *Rhodospirillum rubrum*", J. Bacteriol. 89:1413.
- HUTNER, S.H., 1946, "Organic growth essentials of the anaerobic nonsulfur photosynthetic bacteria", J. Bacteriol., 52:213.
- HUTNER, S. H., 1950, "Anaerobic and aerobic Growth of purple bacteria (Athiorhodaceae) in chemically defined media", J. Gen. Microbiol., 4:286.
- IMHOFF, J. F., 1984, "Reassignment of the genus *Ectothiorhodospira* Pelsh 1936 to a new family Ectothiorhodospiraceae fam. nov. and emended description of the Chromatiaceae Bavendamm 1924". Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 338.
- IMHOFF, J. F., Trüper, H. G., and Pfennig, N., 1984, "Rearrangement of the species and genera of the phototrophic 'purple nonsulfur bacteria'", Int. J. Syst. Bacteriol., 34:340.

- JACKSON, J.B., y Crofts, A.R., 1969, "The high energy state in chromatophores from *Rhodopseudomonas sphaeroides*", FEBS Lett., 4: 185.
- JACKSON, J.B., y Crofts, A.R., 1970, "The kinetics of light induced carotenoid changes in *Rhodopseudomonas sphaeroides* and their relation to electrical field generation across the chromatophore membrane", Eur. J. Biochem., 18: 120.
- JACKSON, J.B., Crofts, A.R., y von Stedingk, L.V., 1968, "Ion Transport Induced by Light and Antibiotics in Chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*", Eur. J. Biochem., 6: 41.
- JOLCHINE, G., y Reiss-Husson, F., 1975, "Studies on pigments and lipids in *Rhodopseudomonas sphaeroides* Y reaction centers", FEBS Lett. 52: 33.
- KAGAWA, Y. y Racker, E., 1966, "Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. IX Reconstitution of Oligomycin-Sensitive triphosphatase". J. Biol. Chem. 241: 2467-2474.
- KAGAWA, Y., y Racker, E., 1972, "Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation: XXV, Reconstitution of vesicles catalyzing ^{32}P -adenosine-triphosphate exchange", J. Biol. Chem., 246:5477.
- KARUNAIRATNAM, M.C., Spizisen, J. y Gest, H., 1958, "Preparations and properties of protoplasts of *Rs. rubrum*", Biochim. Biophys. Acta 29:649.
- KE, B., 1971, "Carotenoproteins", en; Methods in Enzimology, Vol. 23, parte A, (A. San Pietro, ed.) p. 624, Academic Press, New York.
- KOHLMILLER, E.F., Jr., y Gest, H., 1951, "A comparative study of the light and dark fermentations of organic acids by *Rhodospirillum rubrum*", J. Bacteriol. 61:269.
- KOYAMA Y., Tahara, M. y Segawa, S., 1983, "A slow phase of the carotenoid shift induced by pH jump or by continuous illumination. An electron absorption and resonance Raman study on chromatophores of *Rhodopseudomonas sphaeroides* G1C", Photobiophys. 6: 329.
- KRAMER, H.J.M., van Grondelle, R., Hunter, C.N., Westerhuis, W.H.J., y Ames, J., 1984, "Pigment organization of the B800 - 850 antenna complex of *Rhodopseudomonas sphaeroides*", Biochim. Biophys. Acta, 765: 156.

- KUNTZ, I. D., Loach, P. A., y Calvin, M., 1964, "Absortion changes in bacterial chromatophores", Biophys. J. 4: 227.
- LIAAEN-JENSEN, S., 1976, "New structures", J. Pure Appl. Chem. 47: 129.
- LIAAEN-JENSEN, S., 1978, "Chemistry of carotenoid pigments", en; The Photosynthetic bacteria, (R.K. Clayton y W.R. Sistrom, eds.) p.233, Plenum Press, New York.
- LOACH, P.A., Androes, G.M., Maksim, A.F., y Calvin, M., 1963, "Variations of electron paramagnetic resonance signals of photosynthetic systems with the redox level of their enviroment", Photochem. Photobiol., 2:445.
- LOWRY, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randal, R.J., 1951, "Protein measurement with the folin phenol reagent". J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- MAYR, E., 1978, "Evolution, Introducing and issue on the history of life viewed in the light of the modern theory of evolution", Scient. Am., vol. 239, no. 3, p.46.
- MCELROY, J.D., Feher, G., y Mauzerall, D., 1970, "Observation of a second light induced EPR signal from reaction centers of photosynthetic bacteria", Biophys. Soc. Abstr. 10: 204.
- MCELROY, J.D., Mauzerall, D.C. y Feher, G., 1974, "Characterization of primary reactants in bacterial photosynthesis II. Kinetics Studies of the light-induced signal ($g = 2.0026$) and the optical absorbance changes at cryogenic tempratures", Biochem. Biophys. Acta, 333: 261.
- MC. LAUGHLIN, S., y Eisenberg, M., 1975, "Antibiotics and membrane biology", Ann. Rev. Biophys. Bioenerg. 4: 335.
- MICHEL, H., 1982, "Three-Dimensional Crystals of a membrane protein complex the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*", J. Mol. Biol., 158: 567.
- MICHEL, H., Epp, O., y Deisenhofer, J., 1986, "Pigment-protein interactions in the photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*", EMBO J., 5: 2445.

- MICHEL, H., Weyer, K. A., Gruenberg, H., Dunger, I., Oesterhelt, D., y Lottspeich, F., 1986, "The 'light' and 'medium' subunits of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*: isolation of the genes, nucleotide and aminoacid sequence", EMBO J., 5: 1149.
- MICHEL, H., Weyer, K.A., Gruenberg, H., y Lottspeich, F., 1985, "The 'heavy' subunit of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*: isolation of the gene, nucleotide and aminoacid sequence", EMBO J., 4, 1667.
- MITCHELL, P., 1967, "Proton-Translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: Natural Fuel cells and solar cells", Fed. Proc. 26: 1370.
- MYSELS, K.J., y Princen, L.H., 1959, "Ligth scattering by some lauryl sulfate solutions", J. Phy. Chem., 63:1696.
- NABEDRYK, E., y Breton, J., 1981, "Orientation of intrinsic protein in photosynthetic membranes, Polarized infrared spectroscopy of chloroplasts and chromatophores", Biochim. Biophys. Acta, 635: 515.
- NEWTON, J. W., y Newton, G.A., 1957, "Composition of the photoactive subcellular particles from Chromatium", Arch. Biochem. Biophys. 71:250.
- NIETH, K.F., Drews, G., y Flick, R., 1975, "Photochemical reaction centers from *Rhodospseudomonas capsulata*", Arch. Microbiol. 105: 43.
- NISHIBAYASHI-YAMASHITA, H., Cunningham H., y Racker, E., 1972, "Resolution and reconstitution of the mitochondrial electron transport system: III Order of reconstitution and requirement for a new factor for respiration", J. Biol. Chem., 246: 5477.
- NOEL, H., van der Rest, M., y Gringas, G., 1972, "Isolation and partial characterization of a P₈₇₀ reaction center complex from wild type *Rhodospirillum rubrum*", Biochim. Biophys. Acta, 275: 219.
- NOZAWA, T., Ohta, M., Hatno, M., Hayashi, H., y Shimada, K., 1985, "Sequence homology and structural similarity among B870 (B890) polypeptides of purple photosynthetic bacteria and the mode of bacteriochlorophyll binding", Chem. Lett. 1985: 344.
- ODUM, E. P., 1980, "Principios y conceptos relativos a la energía", en: Ecología, Ed. Interamericana.México.

- OELZE, J., Biedermann, M., y Drews, G., 1969, "Die Morphogenese des Photosyntheseapparates von *Rhodospirillum rubrum*. I. Die Isolierung und Charakterisierung von zwei Membransystemen", Biochim. Biophys. Acta, 173:436.
- OKAMURA, M. Y., Steiner, L. A., y Feher, G., 1974, "Characterization of reaction centers from photosynthetic bacteria I. Subunit structure of the protein mediating the primary photochemistry in *Rhodopseudomonas spheroides* R-26", Biochem. 13:1394.
- PARSON, W.W., y Cogdell, R., 1975, "The primary photochemical reaction of bacterial photosynthesis", Biochim. Biophys. Acta, 416: 105.
- PFENNIG, N., 1967, "Photosynthetic bacteria". Annu. Rev. Microbiol., 21:285.
- PFENNIG, N., 1978, "General physiology and ecology of photosynthetic bacteria", en: The Photosynthetic Bacteria, (R.K. Clayton y W.R. Sistrom eds.), p. 3, Plenum Press, New York.
- PFENNIG, N., y Lippert, K. D., 1966, "Über das Vitamin B₁₂ Bedürfnis phototroper Schwefelbakterien", Arch. Mikrobiol. 55: 245.
- PFENNIG, N., y Trüper, H.G., 1974, "The phototrophic bacteria", en: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed. (R.E. Buchanan y N.E. Gibbons, eds.), pp.24-64, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- PFENNIG, N., y Trüper H. G., 1983, "Taxonomy of phototrophic green and purple bacteria: a review". Ann. Microbiol. B134:9.
- PICOREL, R., Bélanger, G., y Gringas, G., 1983, "Antenna holochrome B880 of *Rhodospirillum rubrum* S1. Pigment, phospholipids and polipeptide composition". Biochem. 22:2491.
- REED, D.W., y Clayton, R.K., 1968, "Isolation of a reaction center fraction from *Rhodopseudomonas spheroides*", Biochem. Biophys. Res. Commun., 30:471.
- REISS-HUSSON, F., y Jolchine, G., 1972, "Purification and properties of a photosynthetic reaction center isolated from various chromatophore fractions of *Rhodopseudomonas sphaeroides* Y", Biochim. Biophys. Acta, 256:440.

- REMSEN, C.C., 1980, "Comparative Subcellular Architecture of Photosynthetic Bacteria", en: The Photosynthetic Bacteria, (Clayton R.K. and Sistrom W.R., eds.) p. 31, Plenum Press, New York.
- ROBSON, R.J., y Dennis, E.A., 1977, "The size, shape and hydration of nonionic surfactant micelles TRITON X-100", J. Phy. Chem., 81:1075.
- SAUER, K., 1974, "Primary events and the trapping of energy", en: Bioenergetics of Photosynthesis, (Govindjee, ed.), p. 115, Academic Press, New York.
- SAUER, K., y Austin, L.A., 1978, "Bacteriochlorophyll-protein complexes from the light-harvesting antenna of photosynthetic bacteria", Biochem., 17: 2011.
- SCHACHMAN, H.K., Pardee, A.S. y Stainer, R.Y., 1952, "Studies on the macromolecular organization of microbial cells", Arch. Biochem. Biophys. 38:213.
- SCHIFF, J.A., 1972, "A green safelight for the study of chloroplast Development and other Photomorphogenetic Phenomena", en: Methods in Enzymology (San Pietro A. ed.) Vol. XXIV parte B, p. 321, Academic Press, New York.
- SCHMIDT, S., Reich, R., y Witt, H.T., 1971, "Electrochromism of chlorophylls and carotenoids in multilayers and in chloroplasts", Naturwissenschaften, 8: 414.
- SCHOLES, P., Mitchell, P., y Moyle, J., 1969, "The polarity of proton translocation in some Photosynthetic microorganisms", Eur. J. Biochem. 8:450.
- SCHOFF, W., 1978, "The evolution of the earliest cells, among other things, they gave rise to the oxygen in the atmosphere on which modern life depends", Scient. Am., vol. 239, no. 3, p. 110.
- SEGEN, B. J., y Gibson, K. D., 1971, "Deficiencies of chromatophore proteins in some mutants of *Rhodospseudomonas sphaeroides* with altered carotenoids", J. Bacteriol. 105:701.
- SISTROM, W.R., y Clayton, R.K., 1964, "Studies on a mutant of *Rhodospseudomonas sphaeroides* unable to grow photosynthetically", Biochim. Biophys. Acta, 88:61.
- SISTROM, W.R., Griffiths, M., y Stainer, R.Y., 1956, "The biology of a photosynthetic bacteria which lacks colored carotenoids", J. Cell. Comp. Physiol., 48:473.

- SLOOTEN, L., 1972, "Electron acceptors in reaction center preparations from photosynthetic bacteria", Biochim. Biophys. Acta, 272:208.
- SMITH, L., y Ramirez, J., 1960, "Reaction of carotenoid pigments in photosynthetic bacteria", J. Biol. Chem., 235: 219.
- SMITH, W. R., Jr., Sybesma, C.S., y Dus, K., 1972, "Isolation and characteristics of small, soluble photoreactive fragments of *Rhodospirillum rubrum*", Biochim. Biophys. Acta, 267, 609.
- STAEHELIN, L.A., Fuller, R.C., y Drews, G., 1978, "Visualization of the supramolecular architecture of chlorosomes (chlorobium type vesicles) in freeze-fractured cells of *Chloroflexus aurantiacus*", Arch. Microbiol., 119: 269.
- STAEHELIN, L. A., Golecki, J.R., and Drews, G., 1980, "Supramolecular organization of chlorosomes (chlorobium vesicles) and of their membrane attachment sites in *Chlorobium limnicola*", Biochim. Biophys. Acta, 589:30.
- STEINER, L.A., Okamura, M.Y., Lopez, A.D., Moskowits, E., y Feher, G., 1974, "Characterization of reaction centers from photosynthetic bacteria II. Amino acid composition of the reaction centers protein and its subunits in *Rhodospseudomonas spheroides* R-26", Biochem. 13: 1403.
- SYMONS, M., Swysen, C., y Sybesma, C., 1978, "The light-induced carotenoid absorbance changes in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. An analysis and interpretation of the band shift", Biochim. Biophys. Acta, 462: 706.
- SYMONS, M. y Sybesma C., 1984, "Comparison of carotenoid and bacteriochlorophyll calibrations of the membrane potential in chromatophores of *Rhodospseudomonas capsulata*", FEBS Letters, 178: 301.
- TADROS, M.H., Suter, F., Drews, G., y Zuber, H., 1983, "The complete sequence of the large bacteriochlorophyll - binding polypeptide from the light-harvesting complex II (B800-850) of *Rhodospseudomonas capsulata*", Eur. J. Biochem. 129: 533.
- TADROS, M.H., Suter, F., Seydewwitz, H.H., Witt, I., Zuber, H., y Drews, G., 1984, "Isolation and complete amino - acid sequence of the small polypeptide from light - harvesting pigment-protein complex I (B870) of *Rhodospseudomonas capsulata*", Eur. J. Biochem. 138: 209.

- TAKAHASHI, M., e Ichimura, S., 1968, "Vertical distribution and organic matter production of photosynthetic sulfur bacteria in Japanese lakes", Limnol. Oceanogr. Vol. 13, p. 644.
- THEILER, R., Suter, F., Pennoyer, J.D., Zuber, H., y Niederman, A., 1985, "Complete amino acid sequence of the B875 light - harvesting protein of *Rhodospseudomonas sphaeroides* strain 2.4.1. Comparison with R 26.1 carotenoid-less mutant strain", FEBS Lett. 184: 231.
- THEILER, R., Suter, F., Wienken, V., y Zuber, H., 1984, "The light-harvesting polypeptides of *Rhodospseudomonas sphaeroides* R-26.1. Isolation, purification and sequence analysis", Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler, 365: 703.
- THEILER, R., Suter, F., Zuber, H., y Cogdell, R.J., 1984b, "Comparison of the primary structures of the two B800-850 apoproteins from wild - type *Rhodospseudomonas sphaeroides* strain 2.4.1 and a carotenoidless mutant strain R-26", FEBS Lett. 175: 231.
- THORNBER, J.P., Trostler, T.L., y Strouse, C.E., 1978, "Bacteriochlorophyll in vivo: Relationship of spectral forms to specific membrane components", en: The Photosynthetic bacteria, (R.K. Clayton y W.R. Sistrom eds.), p. 133, Plenum Press, New York.
- TRÜPER, H.G., 1976, "Higher taxa of the phototrophic bacteria: Chloroflexaceae fam. nov., a family for the gliding, filamentous, phototrophic 'green' bacteria", Int. J. System. Bacteriol. 26:74.
- TRÜPER, H.G., Pfennig, N., 1978, "Taxonomy of the Rhodospirillales", in: The Photosynthetic Bacteria, (Clayton R.K. and Sistrom W.R., eds.) p. 19, Plenum Press, New York.
- TUTTLE, A.L., y Gest, H., 1959, "Subcellular particulate systems and the photochemical apparatus of *Rhodospirillum rubrum*", Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 45:1261.
- UFFEN, R.L., y Wolfe, R.S., 1970, "Anaerobic growth of purple nonsulfur bacteria under dark conditions", J. Bacteriol., 104:462.

- VAN DER REST, M., y Gringas, G., 1974, "The pigment complement of the photosynthetic reaction center from *Rhodospirillum rubrum*", J. Biol. Chem. 249: 6446.
- VAN GRONDELLE, R., Hunter, C.N., Bakker, J.G.C., y Kramer, H.J.M., 1983, "Size and structure of antenna complexes of photosynthetic bacteria as studied by singlet-singlet quenching of the bacteriochlorophyll fluorescence yield", Biochim. Biophys. Acta, 223: 30.
- VAN GRONDELLE, R., Kramer, H.J.M., y Rijgersberg, C.P., 1982, "Energy transfer in the B800-850-carotenoid light-harvesting complex of various mutants of *Rhodopseudomonas sphaeroides* and of *Rhodopseudomonas capsulata*", Biochim. Biophys. Acta, 682: 208.
- VAN NIEL, C. B., 1971, "Techniques for the Enrichment, Isolation, and Maintenance of the Photosynthetic Bacteria", en: Methods in enzymology, Vol. XXIII, part A (A. San Pietro, ed.), p. 3. Academic Press, New York.
- VARGA, A.R., y Staehelin, L.A., 1983, "Spatial differentiation in photosynthetic membranes of *Rhodopseudomonas pallustris*", Jour. Bacteriol., 154: 1414.
- VARGA, A.R., y Staehelin, L.A., 1985, "Pigment protein complexes from *Rhodopseudomonas palustris*: isolation, characterization y reconstitution into liposomes", Jour. Bacteriol., 161: 921.
- WELTE, W., Wacker, T., Leis, M., Kreutz, W., Shiozawa, J., Gad'on, N., Drews, G., 1985, "Crystallization of the photosynthetic light-harvesting pigment-protein complex B800-850 of *Rhodopseudomonas capsulata*", FEBS Lett., 182: 260.
- WEYER, K.A., Lottspeich, F., Gruenberg, H., Lang, F., Oesterhelt, D., y Michel, H., 1987, "Amino acid sequence of the cytochrome subunit of the photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis*", EMBO J., 6: 2197.
- Wim, C., Hellingwerf, K.J., y Konings, W.N., 1989, "Reconstitution of electrochromically active pigment-protein complexes from *Rhodobacter sphaeroides* into liposomes", Biochim. Biophys. Acta, 973: 205.
- WOESE, C.R., 1987, "Bacterial evolution", Microbiol. Rev., 51: 221.

WRAIGHT, C.A., Cogdell, R.J., y Chance, B., 1978, "Ion transport and electrochemical gradients in photosynthetic bacteria", en: The photosynthetic bacteria. (R.K. Clayton y W.R. Sistrom eds.), p. 471, Plenum Press, New York.

ZUBER, H., 1988, "The structure of antenna polypeptides from Phototrophic bacteria and Cyanobacteria", en: Light in Biology and medicine, Vol. 1, (R.H. Douglas, J. Moan y F. Dall'Acqua eds.), p. 423, Plenum Press, New York.

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE FIGURAS

	Página
1.1.- Taxonomía del orden Rhodospirillales.....	13
1.2.- Clasificación taxonómica de las bacterias fotossintéticas <i>Rhodobacter sphaeroides</i> y <i>Rhodospirillum rubrum</i>	14
1.3.- Arbol filogenético determinado por compara- ción de secuencias de RNA ribosomales.....	14
1.4.- Arbol filogenético de las bacterias púrpu- ras.....	15
1.5.- Ciclo primitivo de la materia.....	17
1.6.- Representación esquemática del modelo pa- ra el complejo antena B800-850.....	36
1.7.- Fórmulas estructurales y nombres semisis- temáticos de los carotenoides presentes en: a) <i>Rhodospirillum rubrum</i> cepa silves- tre, b) <i>Rhodobacter sphaeroides</i> cepa sil- vestre y c) <i>Rhodobacter sphaeroides</i> cepa G1C.....	38
1.8.- Espectro diferencial inducido por luz en cromatóforos de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> cepa silvestre.....	39

1.9.- Gráficas de los incrementos de densidad óptica en <i>Rhodobacter sphaeroides</i> bajo iluminación en anaerobiosis u oxigenación en la obscuridad.....	40
3.1.- Esquema en que se muestran: a) la forma en que se colocaron los cromatóforos solubilizados con LiDS 0.9% (3.5 ml) sobre el gradiente de sacarosa 0.5:1.2 M (3:14 ml) y b) las bandas obtenidas despues de 135 minutos de centrifugación a 110,000 x g.....	57
4.1.- Espectros de absorción de 400 a 900 nm de: a) cromatóforos de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> y b) complejos antena B800-850.....	64
4.2.- Esquema en donde se muestran las bandas se muestran las bandas obtenidas despues de 135 minutos de centrifugación a 1.1×10^5 x g sobre el gradiente de sacarosa 0.5/1.2 M de cromatóforos de <i>R. rubrum</i> solubilizados con LiDS 0.9%.....	66
4.3.- Espectros de absorción de 400 a 910 nm de: a) cromatóforos de <i>Rhodospirillum rubrum</i> y b) complejos antena B890.....	67
4.4.- Espectros de absorción de proteoliposomas B800-850 de 400 a 900 nm.....	69

	Página
4.5.- Espectros de absorción de proteoliposomas B800-850 alterados de 400 a 900 nm.....	70
4.6.- Transporte de potasio por el iónoforo valinomicina y potencial electroquímico generado en los proteoliposomas.....	71
4.7.- Espectros diferenciales de proteoliposomas B800-850 de 450 a 550 nm.....	74
4.8.- Espectros diferenciales de cromatóforos de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> inducidos por luz o gradientes iónicos y valinomicina de 450 a 550 nm.....	75
4.9.- Espectros diferenciales calculados de proteoliposomas B800-850 nm al establecerse un gradiente de potencial electroquímico de 450 a 550 nm.....	79
4.10.- Espectros diferenciales calculados de cromatóforos de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (luz - oscuridad) de 450 a 550 nm.....	80
4.11.- Espectros diferenciales calculados de cromatóforos de <i>Rb. sphaeroides</i> al establecerse un potencial electroquímico de 450 a 550 nm.....	81

4.12.- Relación entre los decrementos de transmitancia de proteoliposomas B800-850 en función de la concentración de potasio en el medio.....	84
4.13.- Relación entre los decrementos de transmitancia de proteoliposomas B800-850 y el potencial generado a través de la membrana.....	86
4.14.- Relación entre los decrementos de transmitancia de proteoliposomas B890 o cromatóforos de <i>R. rubrum</i> en función de la concentración de potasio en el medio.....	88
4.15.- Espectro diferencial punto por punto de proteoliposomas B800-850 de 450 a 550 nm....	89
4.16.- Cambios en los incrementos de transmitancia (509-523) bajo diferentes condiciones...	91
4.17.- Flujo de iones potasio e hidronio a través de la membrana de los proteoliposomas B800-850 por acción de valinomicina.....	92
4.18.- Flujo de iones a través de la membrana de los proteoliposomas B800-850 por acción de CCCP y nigericina.....	95