

Tesis de Posgrado

Efecto de la temperatura sobre el sistema transductor de energía de cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*

Fernández Velasco, Javier Gustavo

1984

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fernández Velasco, Javier Gustavo. (1984). Efecto de la temperatura sobre el sistema transductor de energía de cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1796_FernandezVelasco.pdf

Cita tipo Chicago:

Fernández Velasco, Javier Gustavo. "Efecto de la temperatura sobre el sistema transductor de energía de cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1984.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1796_FernandezVelasco.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Efecto de la temperatura sobre el sistema transductor de energía **de cromatóforos**
Rhodospirillum rubrum

Autor: Javier Gustavo Fernández Velasco

Director: Dr. Augusto Fernando García

Lugar de trabajo: Centro de Ecofisiología Vegetal -CEVEG- (FECIC-Fundación Miguel Lillo-CONICET)

Tesis.
1796.
ej. 3.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

-1984-

A mis padres, que me educaron con gran esfuerzo,
preocupación y cariño.

A la Profesora Rosa Guaglianone, mi primera
Maestra de Ciencias.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Augusto F. García quien con gran responsabilidad y experiencia dirigió mi formación con este trabajo, otorgándome libertad y su confianza. Su ejemplo de investigador sagaz y entusiasta consolidó mi vocación.

A la Dra. Norma L. Pucheu por que con generosa dedicación y paciencia guió mis primeros experimentos en esta disciplina.

A ellos y muy especialmente al Lic. Oscar Romero por haber participado intensamente en toda esta investigación. Compartieron conmigo la dureza del trabajo y la emoción del descubrimiento, brindándome su sincera amistad.

A mis compañeros del Laboratorio de Fotosíntesis por su constante ayuda y estimulante camaradería.

A la Sra. Norma de Martínez por haber mecanografiado el original.

A los miembros del Servicio de Dibujo y Fotografía Científicos del CONICET por la preparación de las Figuras.

Al Centro de Ecofisiología Vegetal y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado las Becas de Iniciación y Perfeccionamiento y facilitado los medios necesarios para esta investigación.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados y/o presentados según se indica a continuación.

Publicaciones

- 1- Fernández Velasco, J.; Romero, O.; Pucheu, N.L. and García, A.F. (1982) Irreversible inhibition of photophosphorylation by low temperature in Rhodospirillum rubrum chromatophores. *Photobiochem. Photobiophys.* 4, 39-46.
- 2- Pucheu, N.L.; Romero, O.; Fernández Velasco, J. and García, A.F. (1982) Kinetic behaviour of the energy transducing system of Rhodospirillum rubrum chromatophores treated under photophosphorylating conditions at low temperature. *Photobiochem. Photobiophys.* 4, 169-175.
- 3- Fernández Velasco, J.G.; Pucheu, N.L.; Romero, O.; Tiraboschi, B.H. and García, A.F. (1984) Temperature dependency of the Mg-ATPase and photophosphorylating activities in Rhodospirillum rubrum chromatophores. *Arch. Microbiol.* (en prensa).
- 4- Fernández Velasco, J.G.; Romero, O.; Benzacar, L.N.; Pucheu, N.L. and García, A.F. (1984) Kinetic behaviour of the Mg-ATPase activity in Rhodospirillum rubrum chromatophores. (Enviado para su publicación).

Presentaciones en Congresos

- 1- Efecto de la temperatura sobre la actividad de fotofosforilación y la fotoinhibición por PMS en cromatóforos de R. rubrum. Fernández Velasco, J.G.; Pucheu, N.L.; García, A.F. XVI Reunión Nacional de la SAIB, Mendoza, 1980.
- 2- Comportamiento cinético del sistema transductor de energía de cromatóforos de R. rubrum luego de un pretratamiento en condiciones fotofosforilantes a baja temperatura. Fernández Velasco, J.G.; Romero, O. y Pucheu, N.L. XVII Reunión Nacional de la SAIB, Mar del Plata, 1981.
- 3- Efecto de la temperatura sobre la velocidad de fotofosforilación y Mg⁺⁺-ATPasa en cromatóforos de R. rubrum. Romero, O.; Pucheu, N.L.; Fernández Velasco, J.G.; García, A.F. XVII Reunión Nacional de la SAIB, Mar del Plata, 1981.
- 4- Cinética de la hidrólisis de ATP en membranas de Rhodospirillum rubrum. Fernández Velasco, J.G.; Romero, O.; Pucheu, N.L. y García A.F. XVIII Reunión Nacional de la SAIB, Rio Tercero, 1982.

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
CAPITULO I - <u>Introducción</u>	
1.1 Fotosíntesis.....	2
1.2 Teorías sobre el mecanismo de acoplamiento.....	3
1.3 Fotosíntesis bacteriana.....	8
1.3.1 Características generales.....	8
1.3.2 Transporte de electrones fotosintético.....	10
1.3.3 Conservación de la energía y fosforilación.....	11
1.3.4 Inhibidores del sistema transductor de energía.....	12
1.3.5 El factor de acoplamiento de bacterias fotosintéticas.....	15
1.4 Regulación de la actividad del factor de acoplamiento.....	18
1.4.1 Regulación de la actividad ATPasa.....	18
1.4.2 Inhibiciones de la actividad del factor de acoplamiento por tratamientos de preiluminación.....	19
1.5 Efecto de la temperatura sobre procesos biológicos. Su relación con la interacción lípido-proteína en las membranas biológicas.....	21
1.5.1 Ecuación de Arrhenius.....	21
1.5.2 Teoría de colisiones de esferas sólidas.....	21
1.5.3 Teoría del complejo activado.....	22
1.5.4 Secuencia de reacciones en pasos múltiples.....	24
1.5.5 Efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas.....	24
1.5.6 Efecto del estado de los lípidos sobre las propiedades de las proteínas y en especial enzimas de membrana.....	26
Figuras (N° I- V) del Capítulo I.....	31
CAPITULO II - <u>Materiales y Métodos</u>	
11.1 Cultivo de las células, su cosecha y almacenamiento.....	34
11.2 Preparación de membranas cromatofóricas.....	35
11.3 Extracción y purificación parcial del F ₁	36
11.4 Determinación de bacterioclorofila.....	36
11.5 Control y medición de la temperatura.....	37
11.6 Fuente y medición de la luz.....	38
11.7 Control del pH de las mezclas de reacción.....	38
11.8 Medición de la actividad de fotofosforilación.....	39
11.9 Medición de la actividad de fotofosforilación llevada a cabo anaeróbicamente.....	39
11.10 Actividad de fotofosforilación medida por medio de un acoplamiento a una reacción de hexoquinasa e hidrólisis ácida de los nucleótidos.....	40
11.11 Determinación de la incorporación de fosfato radioactivo a compuestos orgánicos.....	41
11.12 Medición de la actividad ATPásica.....	42
11.13 Determinación de Fosfato inorgánico.....	44
11.14 "Quenching" de la fluorescencia de la 9-aminoacridina.....	44
11.15 Determinaciones espectrofotométricas.....	45
11.16 Drogas usadas.....	45
Figura (N° 1) del Capítulo II.....	46
RESULTADOS Y DISCUSION	
CAPITULO III - <u>Inhibición irreversible de la fotofosforilación originada durante el curso de la reacción de fotofosforilación mediada por PMS a ba- ja temperatura.</u>	
111.1 Introducción.....	47
111.2 Experimentos iniciales.....	48
111.3 Evidencias que descartan una acción directa del PMS como causa de la inhibición observada a bajas temperaturas.....	53
111.4 Efecto de la concentración de PMS y del pH sobre la inhibición de la fotofosforilación a baja temperatura.....	55
111.5 Efecto de la intensidad de luz y de la presencia de un de- sacoplante sobre la inhibición de la fotofosforilación	

	a baja temperatura.....	56
III.6	Inhibición de la fotofosforilación a temperaturas bajas e inhibición de la fotofosforilación por preiluminación, en ausencia de sustratos, en membranas de una preparación "cruda" en ausencia de mediadores redox artificiales.....	61
III.7	Irreversibilidad de la "inhibición por fotofosforilación a bajas temperaturas". Fenómeno "acumulativo".....	63
III.8	Características cinéticas a 30°C de las reacciones de fotofosforilación mediada por PMS y de hidrólisis de ATP de las membranas que sufrieron pretratamientos de fotofosforilación a baja temperatura y de preiluminación en presencia de PMS y ausencia de sustratos de fotofosforilación.....	68
III.8.1	Comportamiento aparente de la reacción de fotofosforilación respecto de Pi.....	68
III.8.2	Comportamiento aparente de la reacción de fotofosforilación respecto de ADP.....	69
III.8.3	Comportamientos aparentes de Pi y ADP de la reacción de fotofosforilación a 30°C llevada a cabo en ausencia de mediadores redox exógenos y para la reacción catalizada por PMS pero parcialmente inhibida por un desacoplante (FCCP).....	71
III.8.4	Comportamiento aparente respecto de ATP/Mg de la reacción de hidrólisis de ATP.....	73
III.8.5	Discusión.....	74
	Figuras (N°2-29) y Tablas (1-3) del Capítulo III.....	81
CAPITULO IV	<u>IV - Estudio de los gráficos de Arrhenius de las actividades de ATP_{psa} y de fotofosforilación en cromatóforos.</u>	
IV.1	Introducción.....	117
IV.2	Estudio del gráfico de Arrhenius de la actividad ATPásica constitutiva e inducida por el desacoplante FCCP en cromatóforos.....	118
IV.3	Estudio de los gráficos de Arrhenius de la actividad de fotofosforilación endógena (en ausencia de mediadores del transporte de electrones).....	122
IV.4	Estudio de los gráficos de Arrhenius de las actividades de fotofosforilación mediada por agentes redox exógenos: PMS y TMPD.....	125
IV.5	Discusión General.....	130
	Figuras (N°30-43bis) y Tablas (4-6) del Capítulo IV.....	136
CAPITULO V	<u>V - Descripción de un fenómeno de inhibición transitoria en la fase pre-estado estacionario en la actividad ATPásica de cromatóforos</u>	
V.1	Introducción.....	154
V.2	Caracterización inicial.....	154
V.3	Reproducibilidad de la fase pre-estado estacionario luego de una preincubación en condiciones de ATP _{psa} y/o fotofosforilación.....	157
V.4	Correlación entre la cinética de hidrólisis de ATP y el establecimiento del estado de alta energía del cromatóforo.....	158
V.5	Efecto de la luz sobre el fenómeno de inhibición en la fase pre-estado estacionario.....	159
V.6	Efecto de un desacoplante (FCCP) sobre la fase pre-estado estacionario.....	161
V.7	Discusión General.....	162
	Figuras (N° 44-56) del Capítulo V.....	166
CAPITULO VI	<u>VI - Resumen y Conclusiones</u>	181
CAPITULO VII	<u>VII - Bibliografía</u>	186

ABREVIATURAS

9-AA: 9-aminoacridina

ADP: adenosina-5 difosfato

ATP: adenosina-5 trifosfato

ATPasa: adenosintrifosfatasa

Bchl: bacterioclorofila

CCCP: cianuro de clorocarbonilfenilhidrazona

F: factor de acoplamiento

D.O.: densidad óptica (= absorbancia)

$\Delta\psi$: potencial eléctrico de membrana

ΔpH : potencial químico de membrana (gradiente transmembrana de pH)

Ea: energía de activación

FCCP: cianuro de fluorcarbonilfenilhidrazona

Pi: fosfato inorgánico

PMS: metosulfato de fenacina

μE : $\mu\text{Einstein}$ ($= 6,02 \times 10^{17}$ fotones)

Tc: temperatura de transición

TCA: ácido tricloroacético

TMPD: N, N, N', N',-Tetrametil-1,4-fenilendiamina

Tris: tris (hidroximetil) aminometano

Tricina: N-tris (hidroximetil) metilglicina

$\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$: fuerza protonmotiva, potencial del gradiente electroquímico de protones

I. Introducción

I.1 Fotosíntesis

Si bien en general se define Fotosíntesis como la asimilación de CO_2 en la luz para formar hidratos de carbono y oxígeno, se debe considerar que los productos primarios de la reacción lumínica pueden intervenir en otras vías metabólicas.

En la fotosíntesis de plantas el transporte de electrones inducido por la luz acoplado a fosforilación produce oxígeno, NADPH y ATP. Los dos últimos son consumidos a su vez en los ciclos de reducción de CO_2 . El ATP y los equivalentes de reducción pueden ser considerados los productos propios de la fotosíntesis, a pesar de que el sistema de transporte de electrones y el sistema de conservación de energía comparte muchas propiedades con otros sistemas de conservación y transducción de energía (por ejemplo la respiración oxidativa). Estrictamente, las etapas "lumínicas" se sitúan varios pasos antes de la síntesis de ATP y NADPH, que serían en realidad también etapas "oscuras", pues la luz interviene en los pasos de excitación de los complejos proteína-pigmento hasta la separación de cargas que en aquellos ocurre y que desencadena el flujo de electrones "fotosintético".

Aunque varios tipos de organismos fotosintéticos no fotolisan el agua como fuente de poder reductor y por lo tanto no liberan O_2 como subproducto, el principio de homología de las reacciones primarias en la fotosíntesis de bacterias y de plantas está firmemente establecido(3).

Las fases de la fotosíntesis también están separadas en el espacio. Los procesos de captación de la luz, de transporte de electrones y de fosforilación están localizadas en sistemas de membranas en todos los aparatos fotosintéticos conocidos, sean de organismos eucariontes o procariontes. Sus componentes forman parte de la membrana de manera intrínseca o extrínseca. En el caso de los organismos eucariontes (plantas y algas) están asentados en las membranas tilacoides que, con diferentes grados de apilamiento, se encuentran confinadas en una organela: el cloroplasto. Mientras que en el caso de bacterias fotosintéticas y de algas verdes azules, se encuentran en invaginaciones mas o menos extensas de la membrana citoplasmática las que muestran, según las especies y condiciones de crecimiento, distintos tipos de organización.

Las reacciones del metabolismo del carbono ocurren en general a nivel de enzimas solubles, que en los cloroplastos se sitúan en el estroma (fase homogénea que rodea los tilacoides) y en el caso de los procariontes directamente en el citoplasma.

El mecanismo general de transducción de energía involucra un transporte electrónico vectorial inducido por la luz dentro de la membrana al que están acoplados

reacciones y fenómenos que consumen energía, como por ejemplo la síntesis de ATP.

El vínculo entre ambos fenómenos sería, según se acepta en general, un gradiente electroquímico de protones mantenido por el transporte electrónico, principalmente por medio de una translocación de H^+ (también vectorial) a través de la membrana en los puntos de acoplamiento del flujo electrónico que son aquellas reacciones redox en las cuales se intercambian protones además de electrones.

1.2 Teorías sobre el mecanismo de acoplamiento

Los sistemas de transporte de electrones asociados a la membrana interna de las mitocondrias, las membranas tilacoides de los cloroplastos y las membranas plasmáticas de los procariontes de metabolismo respiratorio o fotosintético están funcionalmente ligados a un sistema de síntesis de ATP por medio de un mecanismo que es fundamentalmente similar en todos los seres vivos, en el cual interviene un intermediario energético que puede ser usado también por otros procesos que consumen energía como por ejemplo el transporte de iones a través de las membranas (5).

Acoplamiento químico

La hipótesis más antigua que explica esta transducción energética es la del acoplamiento químico. En esta se enfatizaba el papel de los transportadores de electrones en el proceso de conservación de la energía. Se proponía que una forma de alta energía de un transportador, participante de una reacción redox liberadora de energía, unido a un ligando específico era el vínculo entre el transporte de electrones y la fosforilación (6,7). Sin embargo, nunca fue demostrada la existencia de un intermediario definido de aquella manera.

Hipótesis quimiosmótica

Esta hipótesis se deriva del concepto metabólico vectorial de reacciones quimiosmóticas, definidas como reacciones que son tanto químicas, con un comportamiento macroscópico escalar, como también osmóticas, pues desarrollan de manera acoplada a la reacción química un proceso también macroscópico de translocación vectorial de solutos tales como H^+ (8,9).

La hipótesis quimiosmótica fue fundada en cuatro postulados principales que fueron casi enteramente hipotéticos cuando se propusieron en 1961 (10).

- 1) La ATP sintetasa es una ATPasa quimiosmótica protonmotiva localizada en membrana, es reversible y tiene una estequiometría $\rightarrow H^+/P$ característica.
- 2) Las cadenas de transporte electrónico respiratorias o fotoredox son también sistemas quimiosmóticos protonmotivos localizados en membrana y tienen la misma polaridad de translocación de protones a través de la membrana cuando operan en el sentido directo (normal) que la que tiene la ATPasa en la reacción de hidrólisis.

Tienen una estequiometría $\gt H^+/2e^-$ característica.

3) Existen sistemas de transporte de solutos ligados a protones o a hidroxilos que tienen un papel en la estabilización osmótica o en el transporte de metabolitos.

4) Los tres sistemas señalados están insertados a través de una membrana aislante y cerrada topológicamente (la membrana acoplante) que tiene muy baja permeabilidad a los solutos en general y a los iones H^+ y OH^- en particular.

En la Fig. 1 se muestra el fundamento de la hipótesis quimiosmótica de Mitchell (8-14) y se resume de la siguiente manera. Los transportadores de electrones están dispuestos en las membranas de tal manera que la transferencia de electrones, de centros de bajo a alto potencial redox, está obligatoriamente acoplada con el transporte de protones a través de la membrana de adentro hacia afuera en las membranas internas de las mitocondrias y en bacterias intactas, y de afuera hacia adentro en las membranas tilacoides de los cloroplastos y en las vesículas presentes en las preparaciones submitocondriales y en los fragmentos de bacterias, por ejemplo en cromatóforos. Como resultado del transporte electrogénico de protones, estos son acumulados a un alto potencial electroquímico (fuerza protonmotiva) en el exterior o interior de la membrana respectivamente. Los protones regresan a su posición inicial desplazándose a través de un canal de protones (F_0) en la membrana que conduce hacia la ATPasa (F_1). El sistema enzimático "factor de acoplamiento", que involucra los sitios activos (F_1) y el canal de protones que es parte integral de la membrana (F_0), acopla la hidrólisis de ATP con una translocación de protones a través del canal con una dirección opuesta a la posición del F_1 . Dado que esto es reversible, el pasaje de protones hacia el F_1 está acoplado con la síntesis de ATP. De esta manera, un circuito de protones acopla las reacciones liberadoras de energía (flujos eléctricos oxidativos o fotoquímicos) con la reacción de síntesis de ATP que requiere energía.

Independientemente del sistema transductor de energía y de la orientación de las membranas in vitro, las cadenas de transporte de electrones translocan los H^+ hacia el lado de la membrana opuesto al cual está unido el F_1 .

El gradiente de protones tiene dos componentes energéticas. Una es la química (ΔpH) y la otra es la eléctrica $\Delta\psi$. Con el uso de ionóforos pueden ser modificadas independientemente. ΔpH y $\Delta\psi$ son interconvertibles en cuanto a la síntesis de ATP.

En los sistemas fotosintéticos se suma al $\Delta\psi$ la polarización que establecen los actos fotoquímicos primarios determinada por la separación de cargas en los centros de reacción que se expanden a través de toda la sección de la membrana (15).

Actualmente está totalmente aceptado que todas las membranas que acoplan el transporte de electrones con fosforilación contienen actividad de bomba de H^+ ligada

a transferencia de electrones o a hidrólisis de ATP, con las características vectoriales requeridas por la hipótesis de Mitchell. También está demostrado que la transferencia de H^+ a través del canal de protones hacia el F_1 puede estar acoplada con la síntesis de ATP. De la diversidad de pruebas experimentales que apoyan la hipótesis, se puede citar para el caso de los sistemas fotosintéticos los fenómenos de fosforilación en oscuridad mediante un gradiente artificial de H^+ , establecido mediante una transición ácido-básica (16,17) y el de fosforilación post iluminación (18,19,117).

La hipótesis de Mitchell ha provisto de un contexto teórico relativamente sólido para la descripción del mecanismo de fosforilación. Sin embargo, como las reacciones de liberación y consumo de energía están en equilibrio, es difícil excluir otras explicaciones alternativas en las que se propone un vínculo más directo entre la cadena de transporte de electrones y la maquinaria de síntesis de ATP. A continuación se reseñan las hipótesis rivales a la quimiosmótica clásica.

Hipótesis de acoplamiento protonmotiva localizada

Williams (20-22) también sostiene que los protones translocados por el transporte de electrones son los responsables de la síntesis de ATP. Pero plantea que ellos son retenidos dentro de la membrana. En la Fig. 1 esto queda representado como un canal dentro de la membrana acoplante. Se establecerían así gradientes de actividad de H^+ localizados y existiría entre ellos, las cadenas de transporte de electrones y los factores de acoplamiento una vinculación funcional, espacial e incluso estequiométrica estrechas.

Esto es diametralmente opuesto a lo planteado por la hipótesis de acoplamiento quimiosmótica protonmotiva delocalizada (Mitchell, clásica) en la cual existe una independencia total entre las cadenas de transporte de electrones, que contribuyen con H^+ a un "pool" común en el espacio osmótico, y los factores de acoplamiento que de ellas dependen energéticamente.

Sin embargo, está firmemente establecida la existencia de una translocación de H^+ hacia el espacio osmótico inducida por el transporte de electrones oxidativo o fotosintético y también por la actividad del factor de acoplamiento al hidrolizar ATP. También lo es, la síntesis de ATP inducida por un gradiente artificial de protones a través de la membrana (16,17).

Para acomodar estos experimentos con la hipótesis de acoplamiento localizado se considera actualmente que los sitios de acumulación de H^+ intramembrana deberían estar en equilibrio (lento) con el espacio osmótico (5). Esto queda esquematizado en la Fig. 1 como un canal en la membrana que une ambos reservorios.

La suposición de que debería existir un vínculo más directo que un gradiente

de H^+ transmembrana se base en:

- 1) La existencia de relaciones estequiométricas entre los componentes del transporte de electrones y los factores de acoplamiento (23).
- 2) Fenómenos en los que la inhibición parcial de la fosforilación oxidativa (24, 25) o fotosintética (26,27) simultáneamente con inhibidores del transporte de electrones y de la transferencia de energía (inhiben a nivel del factor de acoplamiento) provee una respuesta que es interpretada como si los sistemas que catalizan el transporte de electrones y la fosforilación estuviesen operando como un complejo funcional único.
- 3) Estudios de translocación de H^+ en los que se detectan barreras de difusión que impiden su distribución homogénea entre todos los componentes de la membrana (28-30).

Todo esto no podría esperarse si los protones que difunden libremente fuesen el vínculo entre los dos procesos, tal como lo sostiene la hipótesis quimiosmótica clásica. En cambio, sí es coherente con la propuesta de que los protones son inyectados hacia la región del factor de acoplamiento sin equilibrarse con el espacio extramembrana (28, 133,177).

Las características fundamentales de tanto el modelo delocalizado de Mitchell como del localizado de Williams no involucran obligatoriamente la definición del papel que cumple el H^+ en la reacción química propiamente dicha de síntesis de ATP. De cualquier manera ambos autores han propuesto un papel químico para el H^+ de alta energía en la esterificación.

Mitchell (14) propone un mecanismo directo en el que los H^+ atacan al P_i para dar PO_3^+ y H_2O . Seguidamente un átomo de oxígeno del ADP ataca nucleofílicamente al átomo de P del ión PO_3^+ .

Williams (22) por su parte sugiere que el H^+ localizado dentro de la membrana, al formar el ión H_3O^+ cerca del sitio activo, hace descender la actividad del H_2O , de tal manera de desplazar la reacción en el sentido de los productos ($ATP + H_2O$).

Sin embargo, hay otro tipo de mecanismo propuesto para explicar los acontecimientos a nivel del factor de acoplamiento.

Hipótesis de los cambios conformacionales

Originalmente Boyer (31) había sugerido que el vínculo energético entre la síntesis de ATP y el transporte de electrones consistiría en un estado conformacional energizado que sería transmitido directamente desde las proteínas del transporte de electrones (a nivel de los sitios de liberación de energía redox) hasta las proteínas del factor de acoplamiento. En última instancia se produciría una secuencia

de cambios conformacionales durante el ciclo catalítico del factor de acoplamiento que conduciría las reacciones parciales de "binding" de sustratos y liberación de productos, ver Fig. 1.

Ultimamente, para compatibilizar dicho modelo con la estructura de la hipótesis quimiosmótica se propone que, si bien los gradientes de H^+ representan un primer intermediario de alta energía, este último debe ser transducido en cambios conformacionales del factor de acoplamiento para sintetizar ATP, a este modelo se le llama hipótesis de acoplamiento quimiosmótico indirecto (46). Existen diversos fenómenos que apoyan esta hipótesis.

El flujo electrónico en mitocondrias, cloroplastos y bacterias está acompañado por marcados cambios en la conformación del F_1 . Esto se evidencia por un aumento en el intercambio de 3H entre el F_1 y el agua cuando la membrana tilacoide está energizada (32,33); un aumento en la reactividad de la N-etilmaleimida con los grupos SH del F_1 en los cloroplastos (148); una disminución de la fluorescencia de la aurovertina unida al F_1 (23,34); la disociación de la subunidad inhibitoria del cloroplasto (35) y mitocondrias (36) y el aumento de intercambio con el medio de nucleótidos de adenina firmemente unidos al F_1 de cloroplastos (37), de mitocondrias (39) y de bacterias (39).

Aunque no es claro cual sería el papel exacto de estos cambios conformacionales, Boyer (40-44) y Slater (45) han sugerido que la mayor cantidad de energía para la síntesis de ATP se usa no en la formación del enlace entre el ADP y el P_i unidos a la enzima, sino que para la liberación del producto (ATP).

En la Fig. 1 se comparan todas las hipótesis.

- a) La hipótesis química sólo tiene carácter histórico (sin embargo es esencialmente compatible con las de acoplamiento localizado).
- b) La hipótesis quimiosmótica se presenta en su forma más simple, sin especificar de que manera queda establecido el gradiente de protones provocado por el sistema de transferencia de electrones o por el de hidrólisis de ATP (factor de acoplamiento). En esta hipótesis no se descartan los cambios conformacionales, pero de cualquier manera el centro de la hipótesis quimiosmótica es que los protones translocados a través de la membrana son el vínculo entre los dos sistemas.
- c) La hipótesis conformacional considera que los cambios estructurales y los gradientes de protones son dos fenómenos compatibles. Ambos reflejan una forma intermediaria de energía y están en equilibrio. El primero intervendría directamente en la síntesis-hidrólisis de ATP y el segundo en los transportes de cationes dependientes de energía.

Como la hipótesis quimiosmótica es sólidamente coherente con una gran diversidad de experimentos una pregunta que queda aún en pie es si, en adición al reservorio de energía que representa el gradiente de H^+ transmembrana, existe un vínculo más directo entre el factor de acoplamiento y el transporte de electrones (5).

1.3 Fotosíntesis Bacteriana (Rhodospirillaceae)

1.3.1 Características generales

Las bacterias fotosintéticas son las únicas eubacterias con capacidad para usar la luz como última fuente de energía (129). Por otra parte son también los únicos organismos fotosintéticos incapaces de usar el agua como último agente reductor y por lo tanto no liberan oxígeno, siendo necesaria la provisión de otro tipo de reductores. Estos organismos tienen un sólo fotosistema, mientras que todos los demás fotótrofos, incluyendo las algas verdes-azules (procariontes), tienen dos (47).

Aunque comparten la capacidad de crecimiento fototrófico, las bacterias fotosintéticas muestran como grupo una diversidad y versatilidad notables, no sólo en su morfología y condiciones de crecimiento, sino también en sus sistemas de pigmentos y metabolismo fotosintético. En la siguiente tabla se señalan las principales características de los tres grupos de bacterias fotosintéticas; tomada de (129).

Microorganismos	Bacterias verdes sulfúreas	Bacterias púrpuras	
		Sulfúreas	No sulfúreas
Clasificación antigua	Chlorobacteriaceae	Thiorodaceae	Athiorodaceae
Clasificación moderna	Chlorobiaceae	Chromatiaceae	Rhodospirillaceae
Géneros representativos	<u>Chlorobium</u> <u>Chloropseudomonas</u>	<u>Chromatium</u> <u>Thiospirillum</u>	<u>Rhodospirillum</u> <u>Rhodopseudomonas</u>
Pigmentos	Bacterioclorofila c ó d carotenoides monocíclicos	Bacterioclorofila a ó b carotenoides acíclicos	
Fuente de poder reductor	SH ₂ ; S; S ₂ O ₃ ²⁻ H ₂	SH ₂ ; S; S ₂ O ₃ ²⁻ H ₂ y compuestos orgánicos	Compuestos orgánicos (H ₂ en algunas especies)
Relación con el oxígeno	Anaerobios obligados	Anaerobios obligados	Muchas especies son anaerobios facultativas
Crecimiento en oscuridad	No	No	Sí, respiratorio

No sólo existen diferencias metabólicas entre los tres grupos sino que además las hay dentro de cada uno y por lo tanto no existe ningún organismo representativo para ser estudiado. Frenkel (48) ha enfatizado esto señalando la multiplicidad de modelos de transporte electrónico en la fotosíntesis bacteriana. Se observa gran versatilidad metabólica aún en una misma cepa. En efecto, en diversas especies es común que coexistan las potencialidades de respiración aeróbica, fotosíntesis, asimilación heterotrófica y autotrófica de N y respiración anaeróbica.

El aparato fotosintético bacteriano responsable de la etapa lumínica de la fotosíntesis está asentado a nivel de las membranas intracitoplasmáticas de cuya estructura forma parte con componentes intrínsecos y extrínsecos. En la gran mayoría de los casos estas membranas están en continuidad morfológica con la membrana plasmática (conformando invaginaciones más o menos extensas) y de ella se derivan en un proceso morfogenético que está regulado principalmente por los niveles de O_2 y por la intensidad de la luz (49,132). En esa membrana fotosintética se encuentran varios complejos supramoleculares y también moléculas más pequeñas que acopladas funcionalmente desarrollan toda la transducción energética, desde la captura de los fotones hasta la síntesis de uniones de alta energía (ATP y PPi) y la formación de poder reductor útil bioquímicamente (NADH). Las etapas "oscuras" de la fotosíntesis, por ejemplo las relacionadas con el metabolismo del carbono, son llevadas a cabo en general por enzimas citoplasmáticas. Como las membranas intracitoplasmáticas fotosintéticas no están confinadas en una "organela" no existe ninguna barrera de difusión entre los productos "energéticos" de la membrana y el citoplasma.

Cuando las bacterias son desintegradas por sonicación o por "French Press" las membranas fotosintéticas se fraccionan dando lugar a una suspensión de vesículas, en general topológicamente cerradas que son llamadas cromatóforos pues históricamente era la fracción del homogenato que portaba los pigmentos fotosintéticos (50). Esta preparación tiene las características sedimentatorias y de génesis artificial homólogas a la fracción "microsomal" de células eucariontes, a la fracción de partículas submitocondriales o a la de partículas subcloroplásticas. Los términos cromatóforos, membranas cromatofóricas o simplemente membranas son usados, en general y también en esta Tesis, indistintamente. El proceso de ruptura ocurre por estrangulación y resellado de las invaginaciones de tal manera que los componentes de membrana adyacente al citoplasma quedan orientados hacia afuera y por lo tanto quedan en contacto directo con el buffer de reacción, este es el caso del factor de acoplamiento (ATP sintetasa); en cambio, los componentes que están in vivo orientados hacia el lumen de la invaginación quedan mirando hacia adentro de

los cromatóforos (51). En la Fig. I se muestra una reconstrucción del sistema interno de membranas fotosintéticas de R. rubrum.

1.3.2 Transporte de electrones fotosintético (129)

La energía lumínica absorbida por la bacterioclorofila de los sistemas "antena", que son los complejos de pigmento-proteína mayoritarios de la membrana, es transferida muy eficientemente (53) a los componentes minoritarios "bacterioclorofila centro de reacción" (Bchl CR). El centro de reacción (CR) funciona como el iniciador de las reacciones de transporte de electrones pues su potencial medio de oxidoreducción se torna muy negativo cuando capta energía, absorbiéndola directamente de la luz o derivándola de la previamente atrapada por la "antena". Esta reacción primaria en cromatóforos es similar a la que ocurre en los centros de reacción de los Fotosistemas I y II de los cloroplastos, sin embargo, el transporte electrónico subsiguiente es diferente en sus detalles. Una de las características es que en cromatóforos la fotofosforilación ocurre en ausencia de aceptores y dadores electrónicos exógenos. En efecto, el transporte electrónico, al cual está acoplada la formación de ATP, es cíclico in vivo y no involucra la oxidación y reducción netas.

Las preparaciones de centro de reacción generalmente se logran libres de los complejos antena y contienen (además del complejo Bchl-proteínas) bacteriofeofitina, ubiquinona y hierro no hémico. Algunas preparaciones menos resueltas contienen también cobre y citocromos del tipo b y c (132).

El evento fotoquímico primario es la transferencia de un electrón del CR activado por la luz al aceptor primario (X): $CR X \rightarrow CR^+ X^-$.

Se han propuesto varios componentes como los aceptores primarios incluyendo quinonas y proteínas con hierro no hémico.

La separación de cargas provoca que el centro de reacción oxidado reciba electrones de un donador inmediato y que el aceptor primario reducido reduzca a su vez a otros componentes. Se establece de esta manera un flujo electrónico cíclico. Los transportadores electrónicos son en su gran mayoría citocromos de los tipos b y c y Ubiquinona. Esta última está en exceso sobre todos los demás componentes e intervendría en distintos puntos tales como en el aceptor primario (X) y en el secundario (Y).

Los transportadores redox están dispuestos anisotrópicamente en la membrana y establecen así una translocación vectorial de protones.

Estudios en condiciones pre-estacionarias o con inhibidores del transporte de electrones muestran que el cit. b se reduce y el cit. c se oxida, de manera reversible, cuando se iluminan los cromatóforos, indicando que el paso determinado por ellos es limitante en el flujo electrónico.

En la Fig. IV se muestra un esquema modelo del transporte de electrones en R. rubrum:

1.3.3 Conservación de la energía y fosforilación

En 1954 Frenkel (54) observó la existencia de fotofosforilación acoplada a transporte de electrones inducida por la luz al mismo tiempo que Arnon et al. descubrieron lo mismo en cloroplastos (55). La reacción sólo requiere ADP , Mg^{2+} y Pi como sustratos químicos (el nucleótido debe estar acomplejado con Mg^{2+}), y luz. Es indispensable, además, que la membrana fotosintética está lo más íntegra posible.

En concordancia con la hipótesis quimiosmótica se ha demostrado pH métricamente que en las bacterias fotosintéticas existe una intrusión de protones al cromatóforo inducida por la luz. La manifestación de esto in vivo es una extrusión de H^+ desde la célula hacia el medio (178,179).

La evaluación de la fuerza protonmotiva, que requiere la medición de los componentes $\Delta\psi$ y ΔpH , es un requerimiento indispensable para, comparando con el potencial fosfato, contrastar que el gradiente electroquímico de H^+ es un intermediario energéticamente válido para la síntesis de ATP (177).

El $\Delta\psi$ puede ser detectado a) espectrofotométricamente, sobre la base de la respuesta electrocrómica de los pigmentos carotenoides, que actúan como voltímetros moleculares; b) por el aumento de la fluorescencia del colorante artificial ácido 8-anilinaftalén sulfónico y c) distribución (entre el exterior e interior de la vesícula) de iones SCN^- , (177).

La determinación del ΔpH se hace estudiando la distribución de aminas de alto pK. Se usan aminas radioactivas o aminas fluorescentes. En este último caso la más usada es la 9-aminoacridina que fluoresce sólo cuando está en el medio exterior, extinguiéndose a medida que ingresa, como forma descargada, al interior de la vesícula. La entrada de la amina es proporcional al ΔpH (ácido adentro), (123-125,177).

Cabe indicar que los diferentes métodos para cada tipo de determinación no son exactamente equivalentes y esto origina la heterogeneidad del valor de $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$ determinado por los diferentes autores, agravándose el error cuando no se estudian todos los parámetros en las mismas condiciones o en la misma muestra (180).

Las señales de $\Delta\psi$ y ΔpH son ambas extinguidas por desacoplantes. La primera lo es también específicamente por valinomicina + K^+ y la segunda por nigericina + K^+ (181).

La presencia de sustratos de fosforilación colapsan, en general, parcialmente el $\Delta\psi$ y el ΔpH reflejando un consumo del intermediario de alta energía (182).

Todas las teorías sobre el mecanismo de acoplamiento de la fotofosforilación

implican algún tipo de intermediario o estado de alta energía entre el transporte de electrones y el aparato de síntesis de ATP. Dicho estado puede ser usado para mantener también otras diversas reacciones que requieren energía.

Tanto en cloroplastos (18) como en cromatóforos (19,117) el estado de alta energía fue demostrado por experimentos de síntesis de ATP post iluminación. En estos se logra una separación completa entre el transporte de electrones inducido por la luz y los pasos "oscuros" de síntesis de ATP. El estado de alta energía se colapsa durante el período de oscuridad con una vida media del orden de segundos. Esto, en términos de las hipótesis protonmótivas, se debe a la permeabilidad intrínseca de la membrana a los H^+ . Los experimentos demuestran que el gradiente de pH que se construye durante la etapa lumínica constituye el reservorio de energía que es usado durante las etapas oscuras de consumo de energía.

También fue demostrado en cloroplastos (16,17) y en cromatóforos (183) que un gradiente de pH artificial (ácido adentro) puede conducir la síntesis de ATP totalmente en oscuridad.

Estas demostraciones sugieren que los sistemas fotosintéticos pueden transducir la energía de un gradiente de pH en ATP, sin requerir del funcionamiento del transporte de electrones. Sin embargo, no se puede concluir de manera inmediata que el estado de alta energía mantenido por la luz sea idéntico al representado por el gradiente de H^+ o que dicho gradiente sea indispensable para la síntesis de ATP (129).

1.3.4 Inhibidores del sistema transductor de energía

La síntesis de ATP ocurre como último paso de una serie encadenada de reacciones y fenómenos de distintas índole, de manera tal que se puede provocar su inhibición a diferentes niveles. A continuación se indican para bacterias fotosintéticas los distintos tipos de inhibidores. En la Fig. III se reseña sus relaciones con el transporte de electrones y la fosforilación, evidenciándose el fenómeno de control fotosintético, y en la Fig. IV se muestra a qué nivel actuarían en el sistema de fotofosforilación de R. rubrum.

Inhibidores del transporte de electrones

o-fenantrolina inhibe la oxidación del aceptor primario (184).

Antimicina A y 2-heptil-4-hidroxiquinolina-N-óxido (HOQNO) inhiben el pasaje de electrones del citocromo b al c impidiendo que los protones sean translocados al interior de la vesícula (185 - 188). La Antimicina A se uniría estequiométricamente con el citocromo b (115).

Dibromotimoquinona (DBMIB) inhibe a nivel de las quinonas en un sitio paralelo

al de la Antimicina A pues hay un efecto sinérgico en la inhibición del transporte de electrones cuando ambos inhibidores están presentes (115).

La inhibición de la fotofosforilación por Antimicina A, HQNO y DBMIB queda sin efecto por el "by-pass" del PMS que establece un transporte de electrones artificial gracias a sus propiedades lipofílicas y potencial medio de oxidorreducción (115,128,169,185), ver Fig. IV.

No se conoce exactamente la amplitud de "by-pass" del PMS. Este podría donar los electrones al cit. c o directamente al centro de reacción fotooxidado (Fig. IV).

Otros compuestos que pueden anular la inhibición de la Antimicina A y HQNO son los pares redox ascorbato-diclorofenolindofenol o ascorbato-diaminodurene o ascorbato-TMPD. Esto es posible sólo en presencia de oxidantes tales como O_2 , NAD^+ o metil viológeno, pues se establece un transporte de electrones mantenido por la luz acíclico artificial desde el ascorbato al los oxidantes.

Aún en ausencia de Antimicina A, y siempre que exista un potencial redox ambiente adecuado (169), tanto PMS, TMPD como DAD estimulan ampliamente la velocidad de fotofosforilación (hasta más de 10 veces el valor endógeno) de manera tal que se ha propuesto que el paso limitante del transporte de electrones endógeno está a nivel del cit. b-cit.c (189).

Se interpreta además que los mediadores redox artificiales que translocan H^+ per se (PMS, DAD) establecen un mecanismo artificial de acoplamiento (130).

Inhibidores de la transferencia de energía

Inhiben, a nivel del complejo factor de acoplamiento, la síntesis y la hidrólisis de ATP como así también las reacciones dependientes de energía provista por la hidrólisis de ATP y el establecimiento del gradiente de H^+ transmembrana mantenido por dicha reacción. En cambio, no tienen acción directa sobre el transporte de electrones ni sobre la conservación de la energía transducida de la luz. Sólo lo tienen, de manera indirecta, a través del "control fotosintético" provocando que disminuya el transporte de electrones y aumentando el nivel de $\Delta\bar{\mu}H^+$ dado que inhiben su consumo a nivel de la síntesis de ATP (52).

Oligomicina y DCCD actúan de esa manera ligándose a un proteolípido de la fracción F_0 del factor de acoplamiento inhabilitando la capacidad de translocar protones a través de canal que conforma el F_0 , ver 1.3.5.

Desacoplantes

De manera amplia, el fenómeno de desacople puede ser definido como la destrucción del estado energético de la membrana, independizándose así el transporte electrónico, que queda estimulado, de la síntesis de ATP, que queda inhibida (190).

Los desacoplantes son en general ácidos débiles lipofílicos y aumentan la permeabilidad de las membranas (naturales o artificiales) a los H^+ . Desde un punto de vista de las hipótesis de acoplamiento protonmotivas, los desacoplantes inhiben la fosforilación pues evitan, actuando como cortocircuitantes, que se formen gradientes de protones a través o dentro de la membrana. Dos desacoplantes muy potentes usados en el estudio de la bioenergética de bacterias fotosintéticas son FCCP y CCCP (115).

La estimulación del transporte de electrones por un desacoplante se debe a la eliminación de la retropresión de H^+ que normalmente restringe la transferencia de electrones a nivel de los sitios de acoplamiento en la cadena redox (puntos de translocación de H^+). Esta es la manifestación del "control respiratorio" o "control fotosintético" en los cuales la presencia de sustratos de fosforilación estimula reversiblemente el transporte de electrones. En efecto, los sustratos permiten el consumo de H^+ a nivel del factor de acoplamiento y por lo tanto disminuye la fuerza protonmotiva (115).

Otras reacciones y fenómenos que están ligados al estado de alta energía de la membrana y por lo tanto inhibibles por un desacoplante son (115,129):

- Reducción del citocromo b y oxidación del citocromo c mediante la hidrólisis de ATP o de PPi
- Reacción de transhidrogenasa (reducción de $NADP^+$ mediante oxidación de NADH). La energía es provista por la luz o por la hidrólisis de ATP o PPi
- Reducción de NAD^+ por succinato usando energía provista por la luz o por hidrólisis de ATP

Ionóforos

Es un grupo de antibióticos lipofílicos que tienen la propiedad de aumentar la permeabilidad específica a ciertos cationes en las membranas biológicas y artificiales (181).

La valinomicina forma complejos cargados con iones alcalinos. Pueden crear de esta manera una permeabilidad específica para K^+ . En condiciones de luz continua inhibe parcialmente la fosforilación mediante el colapso de la componente eléctrica ($\Delta\psi$) de la fuerza protonmotiva ($\Delta\bar{\mu}H^+$).

Gramicidina transporta tanto protones como K^+ y Na^+ y es un potente inhibidor de la fosforilación y su acción es similar al de un desacoplante

Nigericina es un ionóforo que forma complejos descargados con K^+ al que transporta en intercambio con H^+ destruyendo el ΔpH .

Las combinaciones de valinomicina y nigericina en presencia de K^+ inhiben completamente la fosforilación. Esto es así aún en los casos en los que cada uno de los ionóforos por separado no proveen inhibición. En conjunto conforman un ciclo

de disipación de energía al transportar K^+ y H^+ a través de la membrana cromatofórica.

1.3.5 Factor de acoplamiento de bacterias fotosintéticas

La ATP sintetasa o factor de acoplamiento es la enzima clave en el proceso de fosforilación ligada a transporte electrónico. Esta enzima tiene una estructura y una función muy similares en todos los organismos estudiados, sean eucariontes (tanto en mitocondrias como en cloroplastos de plantas superiores y algas) o procariontes de metabolismo respiratorio o fotosintético.

Así como en 1962 Fernández-Morán (56) lo estudió en partículas submitocondriales, Löw y Afzelius en 1964 (57) identificaron en cromatóforos de R. rubrum por microscopía electrónica la estructura de lo que en 1966 fue demostrado ser el factor de acoplamiento por Kagawa y Racker (58). En 1970 Baccarini-Melandri et al. (59) aislaron de Rps. capsulata una enzima con actividad ATPasa que era capaz de reconstituir la fotofosforilación de las membranas de las cuales se la había extraído. Desde entonces se han extraído y purificado en diversos grados los factores de acoplamiento de diferentes bacterias fotosintéticas y en todos los casos comparten las mismas características principales de estructura y función (51), siendo el factor de acoplamiento de R. rubrum el mejor estudiado (60,61,146).

Originalmente los factores de acoplamiento fueron definidos como factores proteicos que estaban involucrados en la síntesis de ATP pero no catalizaban reacciones de oxido-reducción (62). Dichas enzimas están insertadas en las membranas transductoras de energía y están dotadas de una actividad ATPásica reversible que a su vez acopla una translocación de protones a través de la membrana (46, 51,63).

Algunos miembros de las bacterias fotosintéticas poseen la característica especial de poder sintetizar ATP tanto mediante un transporte de electrones inducido por la luz como por uno dependiente de respiración y se ha demostrado, en experimentos de reconstitución cruzada, la potencialidad para las dos funciones por parte de los factores de acoplamiento provenientes de bacterias crecidas en ambas condiciones (51).

El factor de acoplamiento tiene dos componentes, una extrínseca (F_1) fácilmente extraíble sin la destrucción de la membrana y otra que forma parte integral de la membrana (F_0), ver un esquema en la Fig. 43 bis.

El método usado para solubilizar la porción hidrofílica del factor de acoplamiento es análogo al usado en mitocondrias y cloroplastos. El método general varía desde incubaciones (10 min) con baja fuerza iónica a sonicaciones (1-2 min) en presencia de EDTA 1 mM, según la estabilidad del complejo proteína-membrana en las diferentes especies. La actividad de la enzima extraída debe ser protegida con concentraciones milimolares de ATP (51,112).

En bacterias fotosintéticas, por ejemplo Rps. capsulata o R. rubrum, la extracción del F₁ no perjudica ni la capacidad de transporte de electrones ni la conservación del intermediario de alta energía (gradiente electroquímico de protones). Esto contrasta con el desacople generalizado que ocurre en cloroplastos al extraer el F₁. En este último caso el F₁ tendría un papel estructural muy importante en la impermeabilidad a los protones de la membrana (51,129). Por otro lado, la remoción de la actividad ATPasa Mg-dependiente de la membrana es paralela a la pérdida de capacidad de fotofosforilación. En cambio, la actividad de pirofosfatasa no es modificada (129), ver más adelante.

Los factores de acoplamiento de las bacterias fotosintéticas tienen, en general, una alta actividad hidrolítica de ATP en oscuridad tanto cuando están unidos a las membranas como cuando están en forma soluble luego de su extracción. El sustrato de la actividad hidrolítica de la enzima unida a membrana es MgATP pero CaATP también puede ser hidrolizado, aunque con menor velocidad (51,146). Esta dependencia del catión es el origen de la nominación de la actividad como Mg-ATPasa. La enzima también es llamada H⁺-ATPasa cuando se quiere recalcar su papel de translocadora vectorial de protones. Cuando la porción F₁ de R. rubrum es solubilizada sea por sonicación en presencia de EDTA o por extracción con buffer a partir de un polvo acetónico de cromatóforos, la enzima sólo puede hidrolizar CaATP y el Mg²⁺ actúa como inhibidor competitivo (51,146). La enzima pierde su capacidad de hidrolizar CaATP y se transforma nuevamente en Mg-dependiente al ser reconstituído el sistema (51). En efecto, la porción F₁ puede ser fácilmente reasociada a los cromatóforos de los cuales se la extrajo. Los iones Mg²⁺ son un prerequisite para la reconstitución. Paralelamente con la reconstitución de la síntesis de ATP también se restauran otras actividades tales como el intercambio ATP-³²Pi (51,112). La reconstitución de la fotofosforilación es el criterio de definición de factor de acoplamiento.

La actividad de Mg-ATPasa de membrana es sensible a inhibidores de la transferencia de energía. En cambio, en Rps. capsulata y en R. rubrum la sensibilidad a oligomicina se pierde completamente luego de solubilizar y purificar la enzima F₁; dicha sensibilidad se recupera luego de la reconstitución (51,112).

La fracción extrínseca y soluble en agua F₁ tiene un peso molecular que varía entre 280 Kd y 380 Kd (64,146) y contiene cinco subunidades α , β , γ , δ y ϵ cuyos pesos moleculares son 54 Kd, 50 Kd, 32 Kd, 13 Kd y 7,5 Kd respectivamente, según su migración en una electroforesis en gel con SDS (60). Estos resultados concuerdan con los encontrados en cloroplastos (65,129).

En años más recientes se ha podido aislar de bacterias fotosintéticas, por medio de detergentes, el factor de acoplamiento íntegro es decir las subunidades F₁ y F_o juntas (66). En adición a las 5 subunidades que pertenecen al F₁ el complejo

contiene 3 ó 4 subunidades adicionales tal como aparecen en una electroforesis en gel con SDS (66-68).

Una de las subunidades de Fo es el proteolípido que ha sido aislado, purificado y secuenciado sus aminoácidos. (69). El proteolípido es la subunidad a la cual se une covalente e irreversiblemente el inhibidor de la transferencia de energía DCCD (diciclohexilcarbodiimida) (63). El proteolípido organizado de manera hexamérica actúa como una estructura protonofórica. El DCCD inhibe esta propiedad y se explica así el papel conductor de protones de la subunidad hidrofóbica Fo y la inhibición de la actividad de síntesis y de hidrólisis de ATP del factor de acoplamiento que de manera acoplada a dichas actividades transloca vectorialmente protones. De esta manera, el criterio para la purificación del F₁-Fo es su actividad MgATPasa sensible a DCCD y/o oligomicina.

Pirofosfatasa unida a membrana

Los cromatóforos de R. rubrum pueden catalizar en ausencia de ADP la síntesis de PPI inducida por la luz (70). En un principio esta actividad fue considerada como una reacción lateral de la ATPasa unida a membrana pero diversas evidencias muestran que la actividad PPIasa es llevada a cabo por otro factor que es insensible a la oligomicina.

La ATPasa y la PPIasa pueden ser selectivamente separadas sin ser afectada la otra actividad (71).

La síntesis de PPI es inhibible por desacoplantes y por inhibidores del transporte de electrones (115,129).

La actividad de PPIasa de membrana es inducible por un desacoplante tal como la de ATPasa (115), ver 1.4.1.

La función catalítica y posiblemente la función fisiológica de la PPIasa de membrana parece ser equivalente a la de un factor de acoplamiento. Evidencia de esto constituyen los siguientes fenómenos: 1) síntesis de ATP acoplada a la hidrólisis de PPI; las evidencias isotópicas sugieren que la reacción ocurre a nivel de enzimas diferentes y entonces el acoplamiento sería a través del estado de "alta energía de la membrana" (118).

Otras reacciones dependientes de la hidrólisis de PPI son: 2) Transhidrogenasa dependiente de energía (72), 3) reducción del citocromo b (73), 4) reducción de NAD⁺ por succinato (74), 5) intrusión de protones (75), 6) corrimiento del pico de absorción de carotenoides dependiente de energía (76).

Todos estos datos indican claramente que la PPIasa puede mediar la transducción de energía entre la síntesis de PPI (o hidrólisis) y otras reacciones de membrana generadoras de energía (o consumidoras de energía). El vínculo intermediario sería también el gradiente electroquímico de protones.

1.4 Regulación de la actividad del factor de acoplamiento

1.4.1 Regulación de la actividad ATPasa

La actividad del factor de acoplamiento de bacterias fotosintéticas es modificada por interacciones con los sustratos y con la cadena de transporte de electrones. Estas propiedades recuerdan en muchos casos a aquellas de los factores mitocondriales cloroplásticos. Estas observaciones hablan en favor de una constancia sustancial en la evolución de la proteína factor de acoplamiento y concuerdan también con su papel dual tanto en el metabolismo aeróbico como fotosintético (51).

El primer fenómeno de este tipo descubierto en cromatóforos de Rps. capsulata fue la estimulación (2-3) veces de su relativamente baja actividad ATPásica por iluminación (193). Esta activación es fácilmente reversible y es completamente inhibida por Antimicina A. La actividad estimulada es relevante a la transducción de energía pues es inhibida por los inhibidores de la transferencia de energía oligomicina y aurovertina (este último inhibe a nivel del F_1).

La MgATPasa de R. rubrum también puede sufrir cambios conformacionales. En efecto, flashes cortos de luz en presencia de P_i 1 mM activa transitoriamente la ATPasa a través de una disminución de la K_m para ADP. El $\Delta\psi$ sería el responsable de este fenómeno dado que es evitado con valinomicina + K^+ (147).

Por otro lado, en Rps. capsulata el P_i en concentraciones 1 mM estimula la actividad modificando sólo la V_{max} (194). El sulfito ejerce una activación similar en R. rubrum (196). Los autores proponen que estos aniones activantes cambian la conformación de la enzima hacia un estado más activo.

Efecto de los desacoplantes

La actividad ATPásica de cromatóforos es estimulable por bajas concentraciones de desacoplante. Sin embargo, altas concentraciones producen un efecto inhibitorio de la actividad, la que puede llegar a adoptar valores mucho menores que los de la reacción constitutiva. La interpretación del fenómeno no es fácil, pero diversos autores (195) han propuesto que resulta de un control dual de la energía de la membrana sobre la actividad de la enzima. En ausencia de desacoplante el gradiente electroquímico de protones que establece la propia actividad de hidrólisis (dado el carácter quimiosmótico de la enzima) ejerce una retropresión de H^+ sobre la reacción. Esto tiende a frenar la reacción. La adición de concentraciones bajas de desacoplante aumenta la permeabilidad de la membrana a los H^+ y de esa manera se atenúa la retropresión y el "turnover" de la enzima aumenta. Sin embargo, la enzima parece necesitar de un cierto nivel de energía pues cuando está altamente desacoplada la actividad se inhibe. El Mg^{2+}

libre parece ser el causante de la inhibición, pero sólo cuando la membrana está desenergizada (195). La luz evita la inhibición pues colabora a mantener un nivel alto de energía a través del transporte electrónico fotosintético.

Rol de los nucleótidos unidos

La porción F_1 del factor de acoplamiento tiene nucleótidos de adenina fuertemente unidos y este fenómeno ha sido discutido en conexión con la hipótesis de fosforilación por cambios conformacionales de Boyer en la que existirían dos sitios que se alternarían en la síntesis de ATP (176), ver Fig. 1. El punto en discusión es si el ATP fuertemente unido es un prerequisite necesario para el proceso de fotofosforilación.

Parece ser una propiedad común de todos los factores de acoplamiento de tener nucleótidos de adenina fuertemente unidos. El factor de acoplamiento de cloroplastos (CF_1) tiene 2 moles de ADP por mol de CF_1 (78). El F_1 mitocondrial tiene 2 moles de ATP y 1 mol de ADP por mol de F_1 .

Los cromatóforos de R. rubrum contienen 1-2 moles de ATP por mol de F_1 ; también presentan ADP. El ATP o ADP es liberado lentamente en condiciones de iluminación en presencia de P_i , pero esta liberación es muy lenta como para dar cuenta de que los nucleótidos son intermediarios obligatorios en el proceso de fotofosforilación. La misma conclusión es extraída del hecho de que análogos de nucleótidos son fosforilados a velocidades considerables sin existir paralelamente liberación de nucleótidos, incluso en condiciones de flashes individuales de luz (79). Estos resultados descartan la propuesta de que el ATP fuertemente unido representase un intermediario directo en el proceso de fosforilación tal como había sido propuesto en (191, 192).

1.4.2 Inhibiciones de la actividad del factor de acoplamiento por tratamientos de preiluminación

Cuando se preiluminan los cromatóforos de R. rubrum con luz intensa en presencia de PMS pero en condiciones de fosforilación (ausencia de sustratos) se provoca una inactivación irreversible (50%-80%) de la fotofosforilación y también de la ATPasa inducible por desacoplantes (198-203). Este fenómeno tiene las siguientes propiedades.

-El curso de la fotoinactivación es del orden de la cinética del establecimiento del estado de alta energía de la membrana.

-Se puede evitar la inhibición si la preiluminación ocurre en presencia de desacoplantes (CCCP o FCCP) o en ausencia de PMS. Es decir el fenómeno ocurre sólo

si la membrana está altamente energizada.

- Las condiciones de fosforilación ofrecen una protección prácticamente completa. P_i , Mg^{2+} o ADP por separado, o en conjuntos de dos, no proveen protección. Tampoco lo hace el ATP.

- La dependencia del pH de la (s) reacción (es) que conducen a la fotoinhibición puede indicar que una reacción parcial del proceso de fotofosforilación, tal vez sólo un cambio conformacional del factor de acoplamiento preceda a la fotoinactivación.

- Se puede proteger la inhibición si la preiluminación transcurre en presencia de otras reacciones que consuman energía, tal como la fotorreducción de NAD^+ .

- Los cromatóforos pretratados por preiluminación se transforman en más permeables a los protones, tal como se refleja en una menor nivel de estado estacionario de intrusión de protones y en un menor tiempo medio de colapso de dicha intrusión al apagar la luz. También es menor el ΔpH . Estos fenómenos de los cromatóforos pretratados son evitables con el agregado de los inhibidores de la transferencia de energía DCCD y oligomícina, pero no por aurovertina. La mencionada obturación de la permeabilidad sólo restaura una fracción de la inhibición (15-40%).

1.5 Efecto de la temperatura sobre procesos biológicos. Su relación con la interacción lípido-proteína en las membranas biológicas

La energía de la mayoría de las moléculas (o átomos) de una población es usualmente insuficiente para permitirles participar en un proceso químico (reacción) o físico (por ejemplo difusión). La energía mínima necesaria para que dichos procesos ocurran se llama energía de activación.

Como los procesos biológicos dependen de, o están compuestos por, fenómenos químicos y físicos, se pueden estimar las energías de activación de aquellos procesos a partir de las correspondientes a los fenómenos químicos y físicos que los constituyen (80).

1.5.1 Ecuación de Arrhenius (80, 81, 82).

La velocidad de un proceso químico sigue, a menudo, una ley matemática que describe la velocidad en función de la concentración de los reactantes y de una constante de velocidad k dependiente de la temperatura. Esta última relación está explicitada por la ecuación de Arrhenius.

$$k = A \exp(-E_a/R.T) \quad (1)$$

Son características de esta ecuación: el factor pre-exponencial A ; la constante E_a ; R , la constante de los gases en unidades apropiadas y T , la temperatura absoluta.

La forma logarítmica de la ecuación

$$\ln k = \ln A - E_a/R.T \quad (2)$$

permite graficar los datos experimentales para corroborar el cumplimiento de la ley y el cálculo de los parámetros característicos de una reacción particular.

Se debe recalcar que la ecuación de Arrhenius es empírica y que sus constantes pueden ser interpretadas en términos de diferentes teorías.

A continuación se resume las diferentes teorías que son coherentes con la ecuación empírica de Arrhenius.

1.5.2 Teoría de la colisión de esferas sólidas (80,81)

Esta teoría considera que la velocidad de una reacción está determinada por la frecuencia de colisión entre las moléculas de los reactantes que son consideradas esferas elásticas perfectas.

La frecuencia de colisión es proporcional a la concentración y a la velocidad de los reactantes. Pero la velocidad de reacción no es igual a la frecuencia de colisión porque sólo una pequeña proporción de las colisiones proviene de moléculas con energía suficiente como para reaccionar. Este umbral de energía

es lo que se conoce como energía de activación (E_a). La ley de Maxwell-Boltzman indica que la fracción de moléculas de un sistema que posee una energía igual o superior a E_a , a una temperatura T , es proporcional a

$$\exp(-E_a/R.T) \quad (3)$$

Entonces, la velocidad de reacción es igual a la frecuencia de colisiones fructíferas.

Para la reacción $A + B \longrightarrow C$

$$v = k_2 [A] [B]$$

donde k_2 es la constante de velocidad de segundo orden dependiente de la temperatura.

$$k_2 = P.Z \exp(-E_a/R.T) \quad (4)$$

$P.Z$ es el factor no exponencial análogo al factor A de la ecuación (1).

P es la probabilidad de que ocurra la reacción cuando colisionan moléculas con energía suficiente. Depende de factores tales como la orientación de las moléculas colisionantes. Z es la frecuencia de colisión: número total de colisiones por unidad de volumen y de tiempo. Este factor es a su vez levemente dependiente de la temperatura, o sea que un gráfico de Arrhenius correcto deberá mostrar una leve curvatura hacia arriba. En general

$$Z = D.(T)^m \text{ con } m = 1/2 \text{ y } D \text{ es una constante}$$

Se puede calcular que el efecto de la temperatura sobre la frecuencia de colisiones es despreciable en el rango de temperaturas de interés biológico, y por lo tanto una eventual curvatura hacia arriba de un gráfico de Arrhenius no es justificable sobre esa base.

Estrictamente, la teoría de la colisión es aplicable solamente a gases.

1.5.3 Teoría del complejo activado (83,84)

El punto central de la teoría del complejo activado o de Eyring es que la velocidad de cualquier reacción a una dada temperatura depende sólo de la concentración de un complejo activado de alta energía que está en equilibrio con los reactantes no activados.



donde, en el caso de una reacción enzimática, S es el sustrato, E la enzima, SE^* el complejo activado y SE el complejo enzima-sustrato.

De acuerdo con la teoría, todos los complejos activados se desdoblán a una velocidad dada por

$$v \propto k_B \cdot T/h$$

donde k_B es la constante de Boltzman (R/n° Avogadro) y h es la constante de Plank.

Es decir, la velocidad del desdoblamiento es independiente de la naturaleza del complejo. La constante de velocidad será:

$$K = \frac{k_B \cdot T}{h} K^\ddagger$$

K^\ddagger es la constante de equilibrio para el equilibrio entre el complejo activado y las moléculas no activadas. Las ecuaciones termodinámicas clásicas pueden ser aplicadas a este equilibrio, de manera que

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger \quad ()$$

sustituyendo

$$K = \frac{k_B \cdot T}{h} \exp(-\Delta G^\ddagger/RT) = \frac{k_B \cdot T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right) \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right)$$

Suponiendo que ΔS^\ddagger no cambia con la temperatura se puede llegar a

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{1}{T} + \frac{\Delta H^\ddagger}{R \cdot T^2} = \frac{\Delta H^\ddagger + R \cdot T}{RT^2}$$

Esta ecuación puede ser comparada con la ecuación empírica de Arrhenius

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{E_a}{RT^2}$$

La homología permite

$$E_a = \Delta H^\ddagger + R \cdot T$$

La ecuación () puede ser reescrita como

$$d \log K = \frac{-\Delta H^\ddagger + R \cdot T}{2,303 R} \cdot d\left(-\frac{1}{T}\right)$$

Usualmente se grafica $\log K$ versus $1/T$. La pendiente de la recta será

$$- (\Delta H^\ddagger + RT)/2,303 R.$$

1.5.4 Secuencias de reacción en pasos múltiples (80,83)

La velocidad de reacción de un proceso único está determinada (si se mantienen las demás variables constantes) por su energía de activación. En el caso de una reacción única compleja, resultante de una serie de estados activados intermedios, su velocidad queda determinada por la energía de activación de aquella reacción componente de la serie que tiene la mayor E_a respecto del estado energético inicial. Esa etapa parcial de la reacción es la que constituye el paso limitante de toda la serie y por lo tanto el efecto de la temperatura sobre la reacción es a nivel de dicho paso.

En el caso de una reacción global resultante de un acoplamiento en serie de varias reacciones químicas (por ejemplo enzimáticas) la velocidad del último paso queda determinada por la marcha de la reacción componente más lenta, independientemente de las energías de activación.

Frecuentemente se obtienen datos cinéticos de reacciones biológicas (y no biológicas) que parecen ser tratables por interpretaciones simples a pesar de que en realidad la reacción está compuesta por varias etapas acopladas. Esto es así pues la reacción está limitada por el paso limitante que obviamente es único.

Cabe señalar lo siguiente. A priori se puede pensar en aislar los "sustratos" del paso limitante y estudiar las características cinéticas de esa reacción por separado. Pero, tal como sucede en todos los sistemas simplificados, es difícil predecir el grado de homología de dicho sistema respecto del original. Esto debe ser enfatizado, en especial en el estudio de procesos a nivel de membranas biológicas.

1.5.5 Efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas (81,82,83)

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas puede deberse a varias causas diferentes:

- Puede haber un efecto sobre la estabilidad de la enzima.
- O sobre la velocidad de descomposición del complejo enzima-sustrato para dar el producto (k_{+2}).
- En condiciones de desaturación, puede deberse a un efecto sobre la afinidad entre el sustrato y la enzima (k_{+1} o/y k_{-1}) o sobre la afinidad por activadores e inhibidores.
- También a un efecto de las funciones de pH de alguno o todos los componentes que participan en la reacción debido a una alteración de sus pKs.
- Un cambio de temperatura puede provocar la transferencia de la función limitante de la velocidad de una enzima a otra en sistemas que involucran

dos o más enzimas acopladas con diferente dependencia de sus velocidades con la temperatura.

- También puede haber efectos de la temperatura a través de causas secundarias tales como cambios en la concentración de O_2 debido a cambios de su solubilidad o cambios en el pH del buffer usado.

Todo esto sugiere que el efecto de la temperatura es extremadamente complejo y son diversos los parámetros que hay que controlar o estudiar para lograr información relevante.

Para que los valores de E_a , tal como se los determina a partir de un gráfico de Arrhenius tengan el significado correcto, se debe tener cuidado de obtener la V_{max} a cada temperatura para construir el gráfico. En efecto, la K_m puede depender de la temperatura y no es suficiente suponer que una concentración de sustrato que sature la enzima a una temperatura, lo haga también a otras. Este descuido ha resultado en considerables errores en muchos casos (85).

Cuando se grafica el logaritmo de la velocidad vs. $1/T$ no siempre se obtiene una línea recta en todo el rango de temperatura estudiado. En muchos casos el gráfico tiene una discontinuidad en la pendiente y se aproxima a dos rectas que se cruzan a una cierta temperatura a la que se llama "Temperatura de transición" (T_c). De esta manera hay dos E_a diferentes para los rangos de temperatura que separa T_c . Se han propuesto diferentes explicaciones para distintos casos.

1) Desnaturalización de la enzima. Se manifiesta por una caída brusca del gráfico por encima de una temperatura dada (relativamente alta) (Fig. V a).

2) Desoptimización de las condiciones de reacción de manera continua con el cambio de temperatura. Surge de haber establecido concentraciones saturantes u óptimas de ligandos y/o condiciones óptimas de pH, fuerza iónica, potencial redox, etc. a una temperatura y mantenerlas a todas las temperaturas probadas, sin corroborar que a estas últimas también sean óptimas. Independientemente de la temperatura en la que se establecieron las condiciones óptimas, el gráfico se curva hacia abajo manifestándose como en la Fig. V b cuando las condiciones óptimas se establecen en alguno de los extremos del rango de temperaturas estudiado, o como en la Fig. V e cuando dichas condiciones se establecen para una temperatura intermedia. Por otro lado, se puede obtener rectas con pendiente diferente que la real en los casos donde no existe ningún rango de temperatura donde las condiciones establecidas se mantengan óptimas.

3) Existencia de dos reacciones paralelas. Es el caso de dos enzimas o dos centros activos que catalizan la misma reacción pero con diferente dependencia de la temperatura. La velocidad de la reacción con mayor dependencia de la temperatura aumenta más pronunciadamente con el aumento de la temperatura. Por lo tanto, al medir

la velocidad global que involucra las dos reacciones, a temperaturas altas se presenta una E_a aparente mayor. En estos casos la discontinuidad no es abrupta a no ser que las dos E_a difieran mucho. El gráfico se curva hacia arriba (Fig. V c).

4) Un proceso global que involucra dos reacciones sucesivas con diferente dependencia de la temperatura. La reacción con una dependencia de la temperatura mayor es la que tiene velocidad mayor a temperaturas más altas y por lo tanto el proceso global va a estar limitado por la otra reacción. De esta manera, la velocidad y la E_a observadas son iguales a las de la reacción limitante. Esto queda reflejado en un gráfico de Arrhenius con concavidad hacia abajo. La Fig. V d muestra el caso hipotético de una serie lineal de reacciones acopladas que se constituyen sucesivamente en el paso limitante de la reacción global conforme cambia la temperatura.

5) La enzima tiene dos formas con diferente actividad. Las dos formas están en equilibrio y son activas, pero tienen diferente E_a . Si la temperatura tiene un efecto importante en el cambio de una forma a otra, se puede observar un cambio abrupto en el gráfico de Arrhenius. El gráfico puede adoptar formas convexas (Fig. V b) o cóncavas (Fig. V c) según la enzima, aunque no está claro cómo pueden ocurrir éstos fenómenos (83).

6) Un cambio de fase en el solvente. Tal como el que puede ocurrir en enzimas de membranas, ver 1.5.6 . En general el gráfico es convexo (Fig. V b)

7) Por otro lado se puede considerar el siguiente caso teórico. Una reacción que intrínsecamente debiera presentar un gráfico de Arrhenius "quebrado" hacia arriba, podría resultar rectificado artificialmente si la reacción está desoptimizada respecto de algún factor a un rango de temperatura extremo y no en el otro. En la Fig. V f se muestra un ejemplo teórico en el que ambas ramas de un gráfico de Arrhenius como el indicado en este parágrafo, pueden modificar sus respectivas energías de activación para dar origen a un comportamiento rectilíneo. Esto resultaría del efecto de dos factores limitantes independientes que estuvieran desoptimizados, uno en un rango de temperaturas y el otro en el rango extremo.

1.5.6 Efecto del estado de los lípidos sobre las propiedades de las proteínas y en especial enzimas de membrana (86)

La fracción de los lípidos que participan en las transiciones de fase en las biomembranas es, según el sistema, un 70-80% del total. La fracción restante está presumiblemente unida a las proteínas.

Las restricciones estéricas de los lípidos en las vecindades de una proteína pueden ser muy diferentes de aquellas donde el lípido está rodeado sólo de otras moléculas lipídicas. De esta manera, resultan también diferentes sus respectivas características.

Las propiedades catalíticas son un índice sensible de la conformación proteica.

Así es que se puede lograr información cualitativa acerca de las interacciones lípido-proteína sobre la base del requerimiento de lípidos por la actividad enzimática.

La interacción de lípidos y proteínas puede ser hidrofóbica dentro de la bicapa o también electrostática a nivel de la interfase de la bicapa.

La respuesta de las proteínas a los lípidos puede surgir de fenómenos tales como una estabilización de la conformación catalítica inducida por el lípido, solubilización del sustrato o un rol regulador sobre el ciclo catalítico de la enzima (87, 88,90). A su vez, las características de lípidos y proteínas que contribuyen a su mutua interacción serían: la naturaleza anfipática de ambos; los defectos estructurales y las propiedades de fase de la bicapa que dan lugar a compresibilidad y libertad de movimiento; la existencia de dominios hidrofóbicos que permiten acomodar superficies hidrofóbicas y modular así las interacciones entre subunidades de las proteínas, como también solubilizar y orientar los sustratos, productos y cofactores.

El efecto de la interacción lípido-proteína sobre la actividad catalítica de enzimas de membrana puede ser detectado de manera relativamente fácil, provocando cambios de fase inducidos por la temperatura. Esto es, cambios del estado llamado "líquido-cristalino" o "fluido" al otro llamado "sólido" o "gel".

Típicamente se observan anomalías en los gráficos de Arrhenius tales como cambios de pendientes ("queiebres") e incluso discontinuidades. Todas ellas pueden ser, luego de diversos controles, asociadas con las características de la fase lipídica (87,89). Estas anomalías, que no están restringidas a ninguna clase de enzima de membrana en particular, pueden encontrarse en membranas de células eucariotes animales y vegetales provenientes de la membrana plasmática y también de organelas, como así también de células procariontes. A continuación se citan algunas características generales.

- 1) Las anomalías se observan a temperaturas características. En algunos casos estas últimas corresponden a las temperaturas de transición (T_c) de los lípidos, tal como se determina por ESR y/o técnicas fluorimétricas. Pero existen diversos casos en que dicha correlación no se cumple. Es más, se han detectado "queiebres" en los gráficos de Arrhenius de enzimas totalmente libres de lípidos (164,165).
- 2) No todas las enzimas presentes en la misma membrana muestran tales anomalías e incluso aquellas que lo hacen lo manifiestan a diferentes temperaturas, sugiriendo una heterogeneidad en el modo de asociación entre lípidos y proteínas (91,92).
- 3) Aunque no en todos los casos conocidos, las energías de activación son mayores debajo de la T_c que por encima de ellas: 15 a 40 Kcal.mol^{-1} y 7 a 20 Kcal.mol^{-1} respectivamente (93).

4) Tanto la T_c como la E_a pueden ser cambiadas por alteración de la composición lipídica de la membrana (94,95). También pueden ser modificados esos parámetros (en general disminuidos) por el agregado de drogas liposolubles.

5) En bacterias, las características de transición de fase de los lípidos pueden ser alteradas por el suplemento de ácidos grasos o presencia de agentes liposolubles en el medio de cultivo, por mutaciones genéticas en la síntesis y degradación de fosfolípidos y por la temperatura de crecimiento. En dichos casos se observa, generalmente, que los quiebres de los gráficos de Arrhenius cambian en la dirección que se podría predecir sobre la base de un cambio en la temperatura de transición de los lípidos (96).

Todas estas observaciones en conjunto sugieren que los cambios de fase de los lípidos regulan la actividad de las proteínas asociadas.

Sin embargo la interpretación de los gráficos de Arrhenius de procesos de membrana requiere gran cuidado. En efecto, el incumplimiento de la ecuación de Arrhenius en un cierto rango de temperaturas, o sea la aparición de anomalías en el gráfico, puede surgir, tal como se señaló en 1.5.5, de

- a) Cambios en el pH debido a cambios dependientes de la temperatura del pK del buffer.
- b) Cambios en la estructura del agua.
- c) Perturbaciones de la conformación de la proteína afectada o no por los lípidos adyacentes.
- d) Cambio en la afinidad de la proteína por los sustratos
- e) Cambio en la orientación, agregación y libertad de movimiento de las proteínas.

La mayoría de los estudios que se presentan en la bibliografía no discuten rigurosamente las diversas posibilidades.

Se considera que los quiebres abruptos de los gráficos de Arrhenius de actividades de membrana (por ejemplo con una resolución entre 1 y 3°C) no representarían cambios de fase lipídica pues si así fuera implicaría la existencia de grandes unidades cooperativas, lo que no es verosímil en bicapas lipídicas de composición mixta.

La observación de que sólo ciertas proteínas, pero no todas, son afectadas por una cierta transición de fase implica que el microambiente de lípidos para las diversas proteínas de membrana puede ser diferente.

No se sabe aún con certeza como se transmite a las proteínas los cambios conformacionales de las cadenas acílicas. Se han citado las siguientes posibilidades:

- 1) Agregación y segregación de proteínas para dar lugar a "clusters" (97,98). Las características de agrupamiento y dispersión de las proteínas de membrana

dependerían no sólo de las propiedades de fase de los lípidos sino que también de la naturaleza de las proteínas (99).

- 2) Cambio en la orientación de las proteínas (100).
- 3) Interacción entre subunidades proteicas
- 4) Conformación de las proteínas

Con mucha frecuencia los puntos de quiebre de los gráficos de Arrhenius de las actividades enzimáticas ocurren a temperaturas que están por encima de aquella a la cual se dan los cambios de fase globales determinados por la composición lipídica promedio.

Se sabe que varias enzimas activadas por lípidos contienen un anillo de moléculas de lípidos fuertemente unidas(101). Se los llama en general "lípidos anulares". Además de estos lípidos, existen otros fuertemente unidos que están interdigitados con las proteínas. También hay evidencias que sugieren que los lípidos anulares inmovilizan (ordenan) parcialmente, a su vez, a algunos lípidos adyacentes formando un "halo" lipídico. Los casos investigados en detalle incluyen a la citocromo oxidasa(102); Na^+K^+ ATPasa(103, 104); Ca ATPasa (105); citocromo P-450 reductasa(106); citocromo b5 (107); rodopsina (108). También hay evidencias que sugieren que la citocromo oxidasa puede ordenar fosfolípidos incluso bien lejos de los que le son inmediatamente adyacentes (109).

Estos lípidos anulares tienen propiedades especiales. No pueden ser fácilmente extraídos, no se intercambian fácilmente con los lípidos más fluídos de la membrana y sus condiciones de estado son considerablemente diferentes de aquellas compartidas por los lípidos generales de la membrana pues en el entorno anular están más inmovilizados y el "ambiente" es más polar. Se estima que hasta un 50% del total de los lípidos de la membrana pueden estar en este estado.

El significado funcional de los lípidos anulares y de los dominios lipídicos separados en biomembranas es considerado trascendental (110). Se propone que los lípidos diferentes modulan funciones de diferentes proteínas, que componentes lipídicos minoritarios pueden tener efectos drásticos en las propiedades de la membrana modulando la función de componentes específicos y que las características de fase de las biomembranas surgen de la coexistencia de varias fases más que de una única fase resultante de la mezcla de diversas clases de lípidos. Se señala además que las diferentes fases pueden ser perturbadas por diversos agentes liposolubles de diferente manera, la interacción entre los distintos componentes de membrana dependerían significativamente de la composición, distribución y tiempo de vida de dichas fases y que la movilidad y movimientos de los diferentes componentes en la misma membrana también pueden ser diferentes.

En esta Tesis se estudian algunos fenómenos del sistema transductor de energía fotosintética de bacterias relacionados con la temperatura de reacción.

En el Cap. III se caracteriza la inhibición de la fotofosforilación que ocurre durante el transcurso de dicha reacción a temperaturas bajas. Se relaciona el fenómeno con el efecto que tiene el estado de alta energía de la membrana sobre la actividad del factor de acoplamiento. Los experimentos se basan sobre hipótesis derivadas de fenómenos ya descritos tales como los de Fotoinhibición de la fotofosforilación por PMS y N-etilmaleimida (198,208), en la existencia de cambios conformacionales del factor de acoplamiento de cloroplastos dependientes de energía (32,33) y también en la capacidad de dicho factor para ser regulado a través del contenido energético de la membrana tal como se evidencia en (195-196).

En el Cap. IV se estudian los gráficos de Arrhenius de la reacción de hidrólisis de ATP, constitutiva e inducida por un desacoplante, y los de la reacción directa de síntesis de ATP en diferentes condiciones de transporte de electrones.

Para llevar a cabo estos estudios se establecen las condiciones óptimas de reacción a temperaturas altas y bajas.

En el Cap. V se describen las características de la curva de tiempo de la hidrólisis de ATP, previa al estado estacionario. Se las discute sobre la base de los efectos regulatorios ejercidos por el nivel de alta energía de la membrana mantenido por la misma reacción.

Se propone un modelo en el que la actividad de la enzima está regulada diferencialmente por componentes localizados y osmóticos del gradiente electroquímico de protones, que es a su vez reconocido actualmente como intermediario directo o indirecto en la síntesis de ATP.

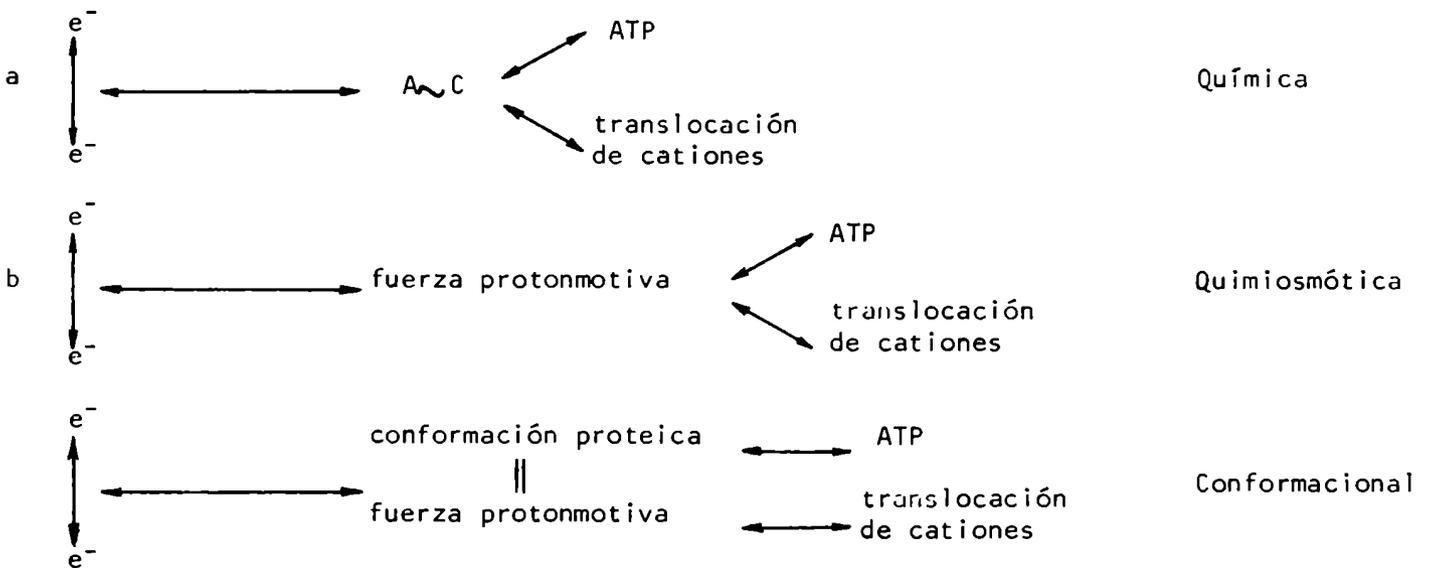
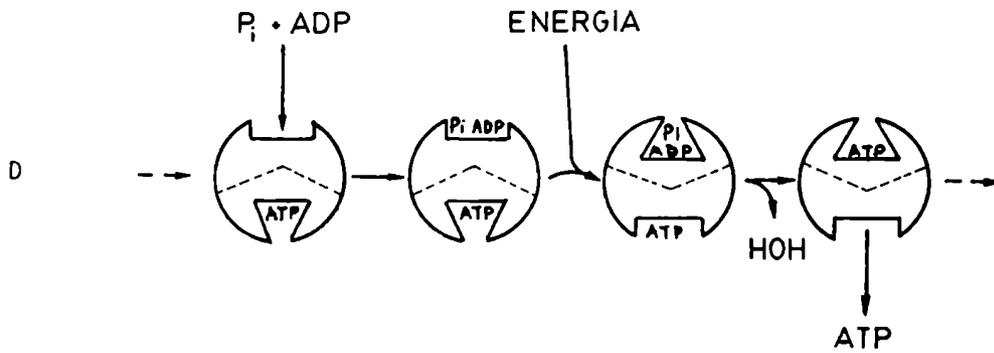
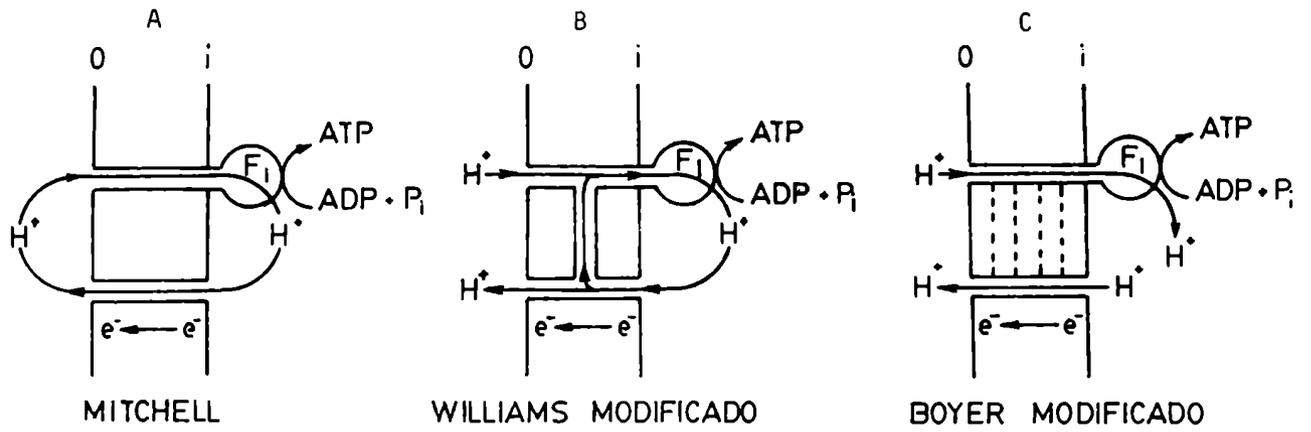


Figura 1

Resumen de las distintas hipótesis de acoplamiento (Tomado de 5 y 176)

A, B y C. Se muestran las hipótesis en relación con el flujo de electrones y la translocación de protones. Las líneas punteadas en C representan la posibilidad de que los cambios conformacionales se transmitan directamente desde el sistema de transporte de electrones hasta el factor de acoplamiento. o e i son los dos lados de la membrana.

D. Hipótesis de cambios conformacionales de Boyer a nivel del factor de acoplamiento. Modelo de dos sitios activos alternos.

a, b y c. Se presentan las hipótesis teniendo en cuenta su relación con intermediario de alta energía. Ver explicación en el texto (1.2).

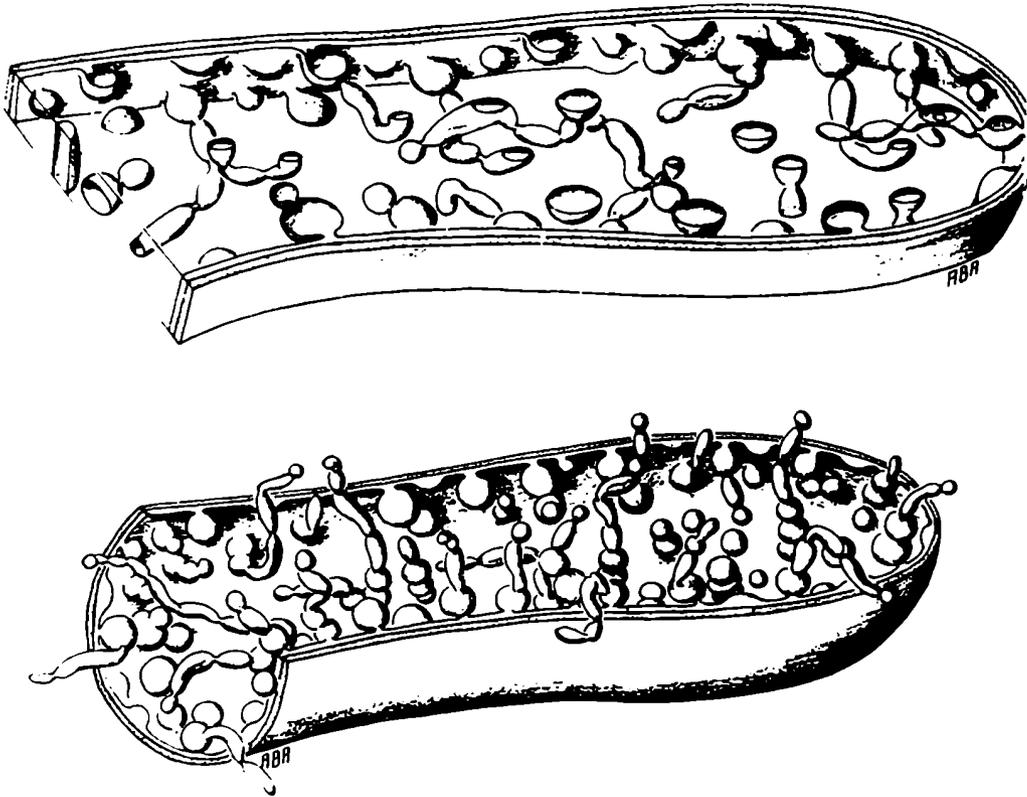


Figura II

Reconstrucción tridimensional, a partir de microfografías electrónicas, del sistema interno de membranas de *Rhodospirillum rubrum*. Nótese el vínculo con la membrana plasmática y la continuidad del lumen de las invaginaciones con el espacio periplásmico. Tomado de (175).

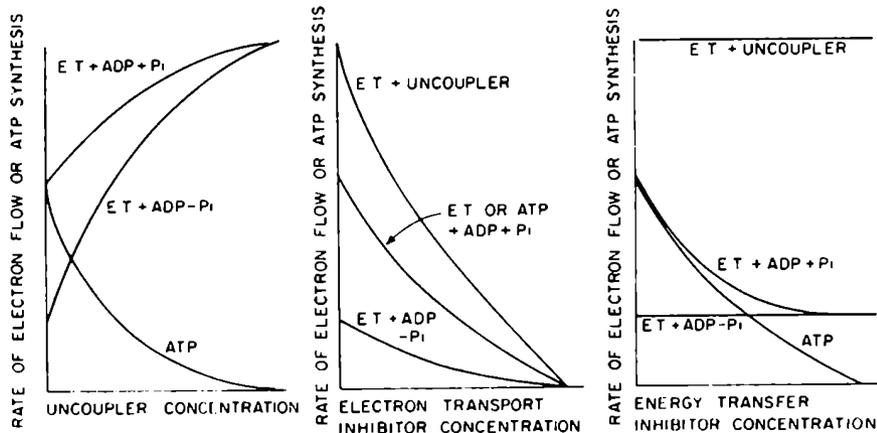


Figura III

Efecto de varios tipos de inhibidores de la fosforilación y del transporte de electrones. E.T.: velocidad de transporte de electrones. ATP: velocidad de fosforilación. Tomado de (52).

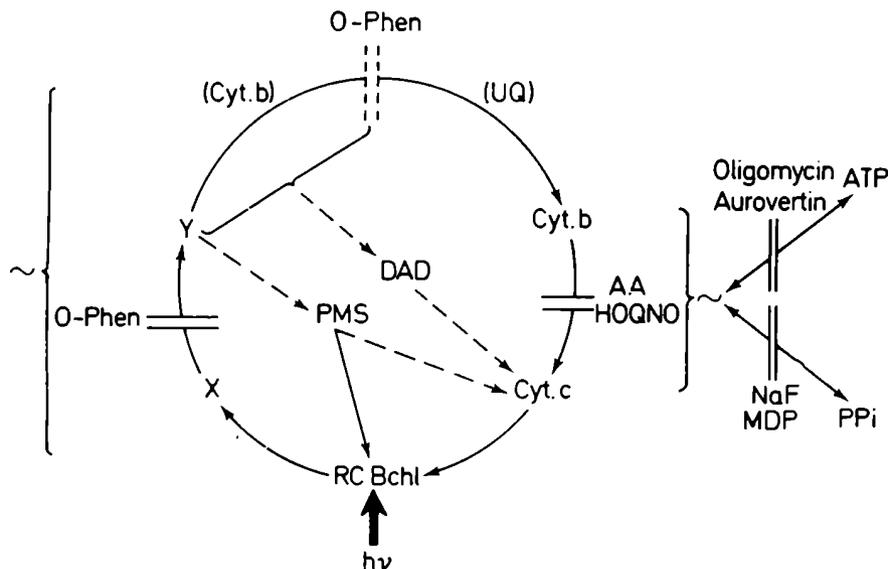


Figura IV

Representación esquemática del transporte electrónico cíclico inducido por la luz y los sitios de acoplamiento en cromatóforos de *R. rubrum*. — Reacciones de transporte de electrones estudiadas espectrofotométricamente. ---- Reacciones de transporte de electrones propuestas. == Sitio de acción de un inhibidor. === Sitio sugerido de inhibición. ~ estado de alta energía. AA:Antimicina A; MDP:metilendifosfato; O-Phen: o-fenantrolina; UQ:ubiquinona. Tomado de (129).

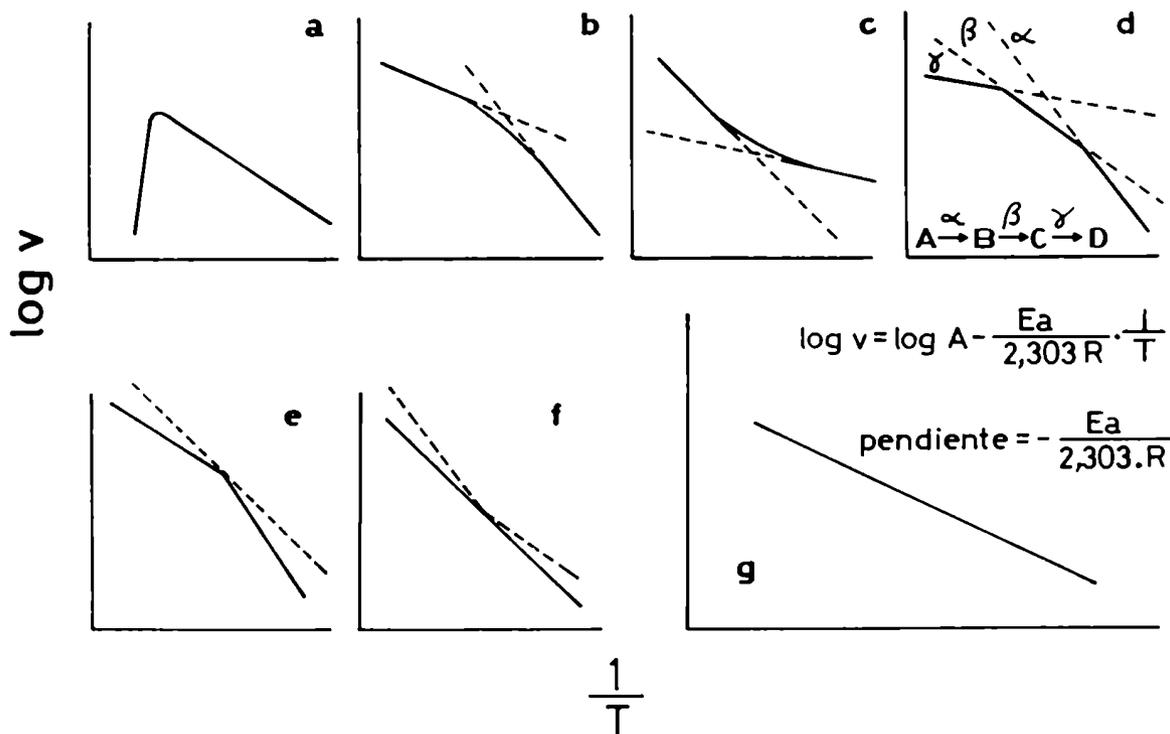


Figura V

Dependencia de la temperatura de los procesos físicos, químicos y biológicos. Representación de la ecuación de Arrhenius. Distintos tipos de desviaciones experimentales de la ecuación.

Los trazos enteros muestran el comportamiento observado, mientras que los discontinuos indican los comportamientos reales, o las extrapolaciones de los comportamientos observados a temperaturas extremas. Ver descripción en el texto. En (g) se muestran los parámetros de la representación de Arrhenius.

MATERIALES Y METODOS

11.1 Cultivo de las células, su cosecha y almacenamiento

La cepa se mantuvo en un "tubo punción" en agar 15 g.l^{-1} con extracto de levadura 3 g.l^{-1} . Una vez que las bacterias crecieron fotosintéticamente en dichas condiciones a temperatura ambiente ($25\text{-}30^\circ\text{C}$), se guardó la "punción" a 4°C y en oscuridad. Los repiques se llevaron a cabo cada 15-30 días.

El medio de cultivo líquido usado fue el de Hutner (111). Los cultivos líquidos se iniciaron a partir de un "tubo punción" al cual se le agregó medio líquido, habiendo previamente disgregado el agar. Una vez que este cultivo hubo crecido, se lo usó como inóculo para sembrar un volumen de 100-500 ml, según el caso, que a su vez sirvió como inóculo de los cultivos masivos. Los cultivos líquidos se hicieron en botellas de 1 litro, completamente llenas de medio y cerradas herméticamente, o en un fermentador. Se sembró con el inóculo en una relación de 2-5% (v/v).

Los cultivos en botella se hicieron con iluminación incandescente continua. Se usaron bombas de 100 W comunes ubicadas a unos 10 cm de las botellas, siendo la intensidad lumínica sobre la superficie de las mismas $100 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$. Se filtró el calor de las lámparas haciendo pasar la luz a través de 5 cm de agua. Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente o en un baño de agua a 30°C .

Los repiques y la cosecha final se hicieron entre las 48 y 72 hs luego de haber sembrado los cultivos (fase final del crecimiento exponencial-"plateau").

En algunos casos, en los que se requirió células en crecimiento exponencial estrictamente controlado (ver Resultados y Discusión), los cultivos se hicieron a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ en un fermentador New Brunswick modelo Magnaferm con una vasija de 6,8 litros y 17 cm de diámetro. Se iluminó con 2 baterías de 3 bombas incandescentes reflectoras de 100 W cada una. Las dos baterías fueron orientadas perpendicularmente entre sí y las bombas distaron 5 cm de la vasija. La agitación fue de 200 RPM. Se eliminó el O_2 con burbujeo de N_2 y se mantuvo una atmósfera de N_2 con una presión positiva de 25 cm de Hg. Se tomaron muestras periódicas del cultivo y se controló el crecimiento exponencial midiendo la D.O. a 680 nm (turbidez) y 880 nm (pico de absorción de la Bchl "in vivo"). Se cosecharon las células antes de llegar a $3,5 \text{ UDO}_{680\text{nm}}$.

Para cosechar se enfriaron los cultivos y se los centrifugó durante 20 min a 4°C en un rotor Sorvall HG-4L con capacidad de 4 l a 3.500 RPM (3.100 g).

Se lavó el "pellet" de células resuspendiéndolo en Tris-ClH 5 mM (pH 8,0), en

una relación de 1 litro de buffer por cada 10 litros de cultivo cosechado, y volviendo a centrifugar.

El "pellet" de células resultante del lavado se conservó congelado a -70°C hasta ser usado. Este almacenamiento se hizo hasta por 4-6 meses (Capítulos III y V).

En algunos casos (Capítulo IV) las células no se congelaron sino que se las procesó para obtener cromatóforos inmediatamente luego de cosechadas.

11.2 Preparación de membranas cromatofóricas

Se resuspendieron las células provenientes de 1 litro de cultivo en unos 30 ml de buffer Tris-ClH 50 mM (pH 8,0); Cl_2Mg 2,5 mM. Se sonicó durante 1 min un volumen de esta suspensión no mayor de 80 ml a 180 W con un sonicador Labsonic 1510 (B. Braun). Para evitar el calentamiento de la muestra se la refrigeró con un baño de hielo y sal y la sonicación se hizo a intervalos de 30 seg.

Una vez rotas las células, se centrifugó la preparación durante 20 min en un rotor Sorvall SS-34 a 12.000 RPM (17.000 g) para eliminar células enteras y trozos grandes de membrana. Se transvasó cuidadosamente la preparación cruda de cromatóforos (sobrenadante) para purificarla seguidamente por ultracentrifugación.

Para el estudio llevado a cabo en los Capítulos III y V, salvo que se indique lo contrario, se ultracentrifugaron los cromatóforos a través de un gradiente discontinuo de sacarosa en el mismo buffer de sonicación. El gradiente consistió en 5 ml de sacarosa 50% (p/v) y 15 ml de sacarosa 35% (p/v). Sobre esta última capa se sembraron 15 ml de la preparación cruda de cromatóforos. Se ultracentrifugó durante 60 min en un rotor de ángulo fijo (Beckman 60 Ti) a 59.000 RPM (250.000 g). Se recobró con una jeringa la fracción principal de membrana localizada aproximadamente en 40% (p/v) de sacarosa. Esta fracción fue diluída con el mismo buffer y vuelta a centrifugar de la misma manera. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y el "pellet" se resuspendió con un "Potter" en el buffer de sonicación*. Se ajustó la concentración de Bchl a 1 mg.ml^{-1} .

Para el estudio llevado a cabo en el Capítulo IV la preparación cruda de cromatóforos (15 ml) fue sembrada sobre 20 ml de sacarosa 20% (p/v) en el buffer de sonicación y ultracentrifugada en iguales condiciones que en el caso anterior. Se descartó el sobrenadante exhaustivamente y el "pellet" resultante fue resuspendido tal como ya se describió. La preparación de cromatóforos fue conservada en un baño de agua y hielo para ser usada siempre dentro de las 24-48 hs. En el

(*): Esta preparación es nominada "Moo" en algunos experimentos del Capítulo III.

caso de los experimentos del Capítulo V se conservaron las membranas de igual manera pero hasta por una semana.

En cambio y salvo que se indique lo contrario, las membranas cromatofóricas usadas en el Capítulo III se mantuvieron congeladas a -70°C hasta 15-20 días. Las fracciones alícuotas de la preparación cromatofórica fueron descongeladas para ser usadas una sola vez.
(*)

11.3 Extracción y purificación parcial del "factor de acoplamiento 1" (F₁)

Los cromatóforos se resuspendieron en Tris 5 mM pH 7,5; Cl_2Mg 0,25 mM y EDTA 1 mM, quedando una concentración final de Bchl igual a $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Se sonicó a 180 W durante 120 seg a intervalos de 30 seg en hielo. Se centrifugó a 250.000 g (Rotor 60 Ti) durante 60 min a 4°C . El sobrenadante se llevó a 2 mM ATP y se lo ultrafiltró (filtro Amicon con agitación magnética y presión de N_2) durante 12 hs en hielo, concentrándose 30 veces. Como la preparación contenía aún 0,5 mg $\text{Bchl}\cdot\text{ml}^{-1}$, se ultracentrifugó a 60.000 RPM en un rotor SW 65 Ti durante 90 min a 4°C . El sobrenadante se guardó en hielo y se lo usó a las 24 hs. El método general usado es el descrito en (112).

11.4 Determinación de bacterioclorofila

La concentración de bacterioclorofila fue el criterio usado para cuantificar la concentración de la suspensión de cromatóforos. Se determinó con el método descrito por Clayton (113). Se dispersó una alícuota de la preparación cromatofórica (unos 10 μl) en 2 ml de una mezcla de acetona-metanol 7:2 (v/v) para inmediatamente centrifugar el extracto orgánico en una centrífuga clínica a 3500 RPM por 5 min. El sobrenadante se leyó espectrofotométricamente a 772 nm. El cálculo se hizo usando un coeficiente de extinción (1 mM y 1 cm) = 75 y considerando un P.M. = 1000. La cantidad de preparación cromatofórica a extraer debe ser lo suficientemente baja como para que el "pellet" originado por el tratamiento resulte incoloro. Durante todo el proceso se evitó la exposición a la luz del extracto orgánico de los pigmentos.

(*) Nota: En esta Tesis se han usado dos cepas "wild type" de R. rubrum. Salvo que se indique lo contrario, se usó la cepa "W" en todos los experimentos del Capítulo III y la "FR1" en todos los de los Capítulos IV y V.

11.5 Control y medición de la temperatura

Las reacciones se hicieron en un baño de paredes de vidrio (largo = 40 cm, ancho = 22 cm y alto = 22 cm) calefaccionado por un termostato-bombeador Haake regulado por un sensor de contacto de mercurio. Toda la superficie de las paredes del baño, salvo aquella involucrada en la iluminación, fue aislada con 2 cm de "telgopor". Se termostataron los tubos de ensayo sumergiéndolos hasta unos 3/4 de su longitud. No se usó ningún sistema mecánico de agitación para los tubos.

Para llevar a cabo las reacciones enzimáticas a temperaturas menores que la ambiente, se usó como agente refrigerante un serpentín de cobre (diámetro = 9 mm y largo = 2,5 m) por el que se hizo circular etanol a -20°C con un flujo de $1,0 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$.

La medición de la temperatura se hizo con un teletermómetro (Yellow Spring Instruments (YSI) mod. 46 TUC, precisión = $0,15^{\circ}\text{C}$) con un sensor sumergible ubicado dentro de un tubo de ensayo, idéntico a los usados en los experimentos, que contenía 1 ml de agua destilada. El sensor usado (YSI N°401) tarda 35 seg en acusar el 99% de un cambio dado de temperatura. Por otro lado, como los tubos de reacción tardan ca. 1 min en manifestar el 95% de un cambio experimental de temperatura exterior, es que se tuvo cuidado de termostatarlos en oscuridad durante unos 5 min antes de desencadenar la reacción.

En los estudios de fotofosforilación catalizada por PMS o TMPD y salvo en los casos donde se usó un filtro rojo, ver Resultados y Discusión, la termostatación fue hecha en un compartimiento oscuro dentro del mismo baño para evitar la fotooxidación de dichos agentes redox. Los tubos de reacción no estuvieron más de 1 min a la luz antes del agregado de membrana.

Por otro lado, es necesario recalcar que la medición de la temperatura debe ser hecha dentro del tubo de reacción pues, a temperaturas extremas de la ambiental, dentro de él la temperatura es siempre diferente de la del baño (hasta $\pm 1^{\circ}\text{C}$).

En los experimentos en que se aplican cambios bruscos de temperatura, desde bajas ($2,5^{\circ}\text{C}$) a altas (30°C) se dispuso de 2 baños termostáticos a las respectivas temperaturas y el cambio se hizo transfiriendo rápidamente los tubos de ensayo (en 2 seg) y agitando luego el tubo manualmente para acelerar la termostatación. Se tuvo cuidado de considerar la velocidad sobre la curva de tiempo en su fase recta (aproximadamente luego de 30 seg después del cambio de temperatura), ver Fig. 8.

11.6 Fuente y medición de la luz

Se usó como fuente de luz 3 bombas reflectoras incandescentes de 150 W a 15 cm de la superficie de los tubos. De esta manera se proveyó de iluminación uniforme a una hilera de 12 tubos de ensayo. Dichos tubos fueron en todos los casos de 11 mm de diámetro y 10 cm de largo. Para disminuir la radiación infrarroja, la luz fue filtrada a través de 8 cm de agua y salvo que se indique lo contrario no se interpusieron filtros de color.

En los experimentos estándar la intensidad sobre la superficie de los tubos fue de $650 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$.

La luz fue medida con un "Radiómetro" Lambda LI-185 con un sensor cuántico con sensibilidad en el rango de 400 a 700 nm. La intensidad de la luz medida en el rango de sensibilidad del sensor es sólo una medida proporcional a la total emitida por las bombas incandescentes y dicha proporcionalidad no cambia a través del método usado para disminuir la intensidad (ver más adelante). Esto debe ser tenido en cuenta pues el espectro de acción de los cromatóforos se extiende casi hasta los 900 nm.

En los experimentos donde la variable es la intensidad de luz, salvo que se indique lo contrario, se logró su disminución alejando la batería de luces a distancias adecuadas y/o disminuyendo el número de bombas. Para intensidades de luz muy bajas se interpusieron filtros neutros (papeles de "seda" blancos). En todos los casos se constató que hubiera iluminación uniforme a lo largo de la gradilla de incubación.

11.7 Control del pH de las mezclas de reacción

El pH de las mezclas de reacción (con los componentes ya en sus concentraciones finales) fue controlado para cada rango de temperatura. Así, para el estudio de las curvas de Arrhenius, se ajustó el pH de las mezclas de reacción para que luego fueran usadas en las reacciones a temperaturas que diferían a lo sumo en $\pm 2-3^\circ\text{C}$ respecto de aquella a la cual se preparó la mezcla.

La preparación de las mezclas se hizo en un vaso de doble camisa termostatisado. Se usó agitación magnética y se controló la temperatura con un teletermómetro. El pH se midió con un electrodo de combinación y un pHmetro Radiometer PHM-84. Se lo calibró a cada temperatura con dos buffers estándar (pH = 7 y pH = 4) según las instrucciones del fabricante.

En los experimentos en los que la variable fue el pH, se procedió de manera

idéntica. Las mezclas de reacción que llevaron PMS, TMPD o desacoplantes se completaron con dichas sustancias a último momento.

11.8 Medición de la actividad de fotofosforilación

De manera estándar y salvo que se indique otra cosa, la reacción se llevó a cabo aeróbicamente en un volumen de 1 ml conteniendo 30 μ moles de Tricina-OHNa (pH 8,0 a 30°C y pH 8,7 a 3°C); 3,7 μ moles de $MgCl_2$; 2 μ moles de ADP; 2 μ moles de PO_4H_2Na conteniendo 3×10^6 cpm de ^{32}P y 50 nmoles de PMS. La reacción se desencadenó agregando cromatóforos equivalentes a 10 μ g de Bchl con una micropipeta de vidrio con enrase por estrangulación y fue interrumpida por el agregado rápido, con una pipeta automática, de 1 ml de reactivo de trietilamina (tal como se describe más adelante) y transfiriendo el tubo de reacción al hielo. En algunos casos la reacción se interrumpió con 80 μ l de TCA 50% (p/v).

Eventualmente se añadió a 1 ml de mezcla de reacción 18 μ moles de D-glucosa y 0,14 U de hexoquinasa (E.C. 2.7.1.1) a fin de capturar en glucosa-6P el Pi incorporado previamente en ATP, ver 11.10.

En todos los casos la medición de la actividad de fotofosforilación se hizo a través de curvas de tiempo.

Las mezclas que contuvieron PMS o TMPD fueron protegidas de la luz hasta el momento de la reacción.

Las concentraciones de todas las soluciones "madre" de ADP usadas en todos los experimentos fueron medidas espectrofotométricamente a 260 nm, considerando un coeficiente de extinción (mM y 1 cm) = 15. El ADP se preparó en solución acuosa (100 mM) a pH 7,5-8,0. Se lo guardó a -20°C por no más de 1 mes.

11.9 Medición de la actividad de fotofosforilación llevada a cabo anaeróbicamente

Se siguió el método descrito en (114). La mezcla de reacción señalada para la condición aeróbica fue suplementada con 20 μ moles de D-glucosa y se la cubrió con una capa de 1 cm de alto de vaselina líquida (de uso farmacéutico, marca Ewe) Con una microjeringa se agregó 5 U de glucosa oxidasa (E.C. 1.1.3.4) y 31 U de catalasa (E.C. 1.11.1.6). La glucosa oxidasa fue disuelta en agua y fue usada en el día. La mezcla así dispuesta se preincubó a 30°C durante 30 min para asegurar que sólo quedaran trazas de oxígeno. De manera rutinaria se lo controló a través de la decoloración del azul de metileno en una concentración inicial equivalente a ca. 0,5 UDO a 665 nm. En un ensayo control, el consumo de oxígeno

fue medido con un electrodo de Clark (YSI) y las condiciones fueron tales que la concentración fue menor que $1 \mu\text{M}$ luego de 10 min de incubación. Se agregaron los cromatóforos ($10 \mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$) con una micropipeta de vidrio en estricta oscuridad a 30°C y luego de incubar durante 5 min, los tubos fueron termostatizados por otros 5 min a la temperatura deseada en oscuridad. La reacción de fotofosforilación se desencadenó prendiendo la luz.

11.10 Actividad de fotofosforilación medida por medio de un acoplamiento a una reacción de hexoquinasa e hidrólisis ácida de los nucleótidos

En los experimentos en los que se quiso discernir entre la incorporación de Pi estrictamente en ATP de otros posibles intercambios de Pi a nivel de nucleótidos (115 - 117) fue necesario incorporar a la mezcla de reacción hexoquinasa y glucosa tal como ya se describió. El método general es el usado en (118).

Luego de finalizada la reacción se hidrolizaron totalmente los ésteres fosfóricos de los nucleótidos. La glucosa-6P es resistente a esta hidrólisis.

Como la hexoquinasa reacciona específicamente con ATP, se concluye que todo el fósforo radiactivo orgánico, luego de la hidrólisis, está incorporado en glucosa-6P y por lo tanto proviene exclusivamente del ATP.

El procedimiento consistió en:

- 1) Fotofosforilación en presencia de hexoquinasa y glucosa a 30°C .
- 2) Se detiene la reacción con $80 \mu\text{l}$ de TCA 50% (p/v), (resulta 4% final).
- 3) Se centrifuga en centrífuga clínica a 3500 RPM durante 5 min.
- 4) Se toman $0,5 \text{ ml}$ del sobrenadante y se los transvasa a un tubo de 20 ml .
- 5) Se agregan $50 \mu\text{l}$ de SO_4H_2 10 N (resulta 1 N final).
- 6) Se calienta a 100°C durante 10 min.
- 7) Se enfría y se extrae el Pi con el método de Avron o con el "Reactivo de trietilamina", ver 11.11.
- 8) Se cuenta la radioactividad.

Como la hexoquinasa tiene muy poca actividad a temperaturas bajas (3°C) fue necesario modificar ligeramente el método para capturar el fosfato y del ATP sintetizado a esa baja temperatura. A tal efecto, la reacción de fotofosforilación fue detenida a los tiempos convenientes apagando la luz. Inmediatamente se llevó el tubo de reacción a un baño a 30°C en oscuridad para permitir que actuara la hexoquinasa. Luego de 3 min en esas condiciones se detuvo toda acción enzimática con $80 \mu\text{l}$ de TCA 50% (p/v). La muestra fue luego procesada como se describe arriba.

Durante la incubación en la que actúa la hexoquinasa, la ATPasa de membrana

no hidroliza significativamente el ATP fotosintetizado previamente, ver como ejemplo la Fig. 8.

11.11 Determinación de la incorporación de fosfato radioactivo a compuestos orgánicos

Se siguió el método de extracción de fosfato con isobutanol-benceno descrito por Avron (119) o el de "Reactivo de trietilamina" descrito por Sugino y Miyoshi (120)*. Este último método fue el que se usó en la gran mayoría de los casos dado su gran practicidad. El mismo reactivo detiene la reacción enzimática precipitando la membrana cromatofórica además de precipitar el fosfato inorgánico. La técnica consiste en la precipitación del complejo fosfomolibdico en presencia de trietilamina. Para todo esto se agregó 1 ml del reactivo a 1 ml de mezcla de reacción.

Composición del reactivo

Molibdato de amonio. 4 H ₂ O-----	1 g
H ₂ O-----	30 ml
ClH (conc.)-----	4 ml
H ₂ O llevar a -----	99 ml
Trietilamina-----	1 ml

Luego de la interrupción de la reacción con el agregado del reactivo, se centrifugaron los tubos en una centrífuga clínica a 3500 RPM durante 5 min. Se obtuvo un "pellet" amarillo y un sobrenadante límpido. El primero representa el fosfato inorgánico (como complejo fosfomolibdico) no incorporado y los cromatóforos desnaturalizados. El segundo contiene el fosfato incorporado orgánicamente. De este sobrenadante se tomó una alícuota de 1 ml con la que se evaluó la radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS-3150 T midiendo la radiación Cerenkov del fosfato radioactivo (121). La muestra fue colocada en un vial de polietileno de 3,5 ml y se agregaron 2 ml de agua destilada. El vial de polietileno fue, a su vez, ubicado en un vial de vidrio común. En el caso de que la muestra fuese coloreada, por ejemplo si se usa TMPD en la reacción, se agregó 0,25 ml de H₂O₂.

Operando en las condiciones señaladas, se pueden precipitar hasta 3 μ moles

* Se agradece al Dr. Héctor Lucero del CEFODI (Rosario) por la comunicación de este método.

de fosfato inorgánico. Para los casos donde se tuvo que precipitar hasta 4 μ moles, se usó una mezcla de doble concentración que la descripta. Se hicieron curvas de calibración para determinar estas capacidades (Fig. 1).

Se comparó la actividad de fotofosforilación de cromatóforos de R. rubrum medida con el método de Avron y con el método del "Reactivo de trietilamina". Con este último la actividad observada fue un 20% superior a la medida con el primero (no se muestra). La normalidad protónica durante el procesamiento de la muestra es 1,65 en el caso del primer método y 0,24 en el del segundo. Podría ser entonces, que la mayor acidez del método de Avron cause una hidrólisis parcial del ATP sintetizado y entonces una pérdida de ^{32}P que había sido incorporada fotosintéticamente.

El método del "Reactivo de trietilamina" tiene, frente al de Avron, la gran ventaja de ser mucho más rápido e igualmente preciso aunque, sin embargo, en las condiciones usuales de reacción, tiene un "background" 10 veces superior.

En todos los experimentos la radioactividad fue medida con un 2% de error o menor.

Los puntos experimentales se grafican habiéndoseles descontado el valor del "background".

11.12 Medición de la actividad ATPásica

La reacción se llevó a cabo aeróbicamente y en oscuridad (salvo que se indique lo contrario). La mezcla de reacción contuvo, de manera estándar, en un volumen de 1 ml: 62 μ moles de Tris-ClH (pH 8,0); 2 μ moles de Cl_2Mg ; 2 μ moles de ATP y cromatóforos en concentraciones equivalentes a 10-30 $\mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$. La hidrólisis fue desencadenada con el agregado rápido de cromatóforos e interrumpida con la adición de 80 μl de TCA 50% (p/v) y poniendo al mismo tiempo los tubos en hielo. En los experimentos de los Capítulos III y IV se usaron volúmenes de reacción de 1 ml, representando cada uno de ellos un punto de la curva de tiempo.

En algunos de los experimentos del Capítulo V (sobre todo aquellas curvas de tiempo con muchos puntos experimentales) las reacciones se llevaron a cabo en un vaso de 30 ml termostatzado por una doble camisa por donde circuló agua a la temperatura apropiada con un flujo de unos 6 l.min^{-1} y con fuerte agitación magnética. A intervalos de 5 seg o mayores se tomaron muestras de 0,7 ml con una pipeta automática para inmediatamente (justo en el momento previsto) agregarlas a tubos de ensayo que contenían 80 μl de TCA 50% para interrumpir así la reacción. Enseguida se ubicaron los tubos en hielo. De esta manera se hicieron curvas de

tiempo de hasta 40 puntos.

En los experimentos del Capítulo V donde hubo que suministrar luz a la reacción, se usó el dispositivo de iluminación descrito para fotofosforilación si se usaban mezclas de incubación independientes para cada tiempo. En el caso de usar una mezcla única, el vaso de doble camisa fue iluminado con dos bombas reflectoras incandescentes de 100 W, cada una ubicada a 15 cm de la superficie del vaso. Sus irradiaciones convergieron diametralmente opuestas y el calor fue filtrado por 5 cm de agua.

Con cualquiera de los métodos, las muestras fueron procesadas inmediatamente luego de finalizada la curva de tiempo, manteniéndolas en hielo en todo momento posible. Esto fue para disminuir la hidrólisis no enzimática del fosfato γ y/o β de los nucleótidos presentes al finalizar la reacción. Esta hidrólisis está favorecida por las condiciones ácidas que provocan el TCA y el posterior agregado del reactivo de Pi. Sin embargo todo esto fue estrictamente controlado y no fue causa de ningún error sustancial en las mediciones, en especial en relación con los fenómenos mostrados en el Capítulo V. Los tubos se centrifugaron en una centrífuga clínica durante 5 min a 3500 RPM para precipitar los cromatóforos. Se tomaron muestras del sobrenadante, que resultó totalmente límpido, con una pipeta automática (0,6-0,8 ml) y se las transvasó a otros tubos. A estas alícuotas se les hizo la determinación de fosfato inorgánico, ver 11.13.

El ATP fue preparado en dilución acuosa (100 mM) a pH 7,5-8,0. Las concentraciones de todas las soluciones "madre" usadas en todos los experimentos fueron valoradas espectrofotométricamente a 260 nm considerando un coeficiente de extinción (mM y 1 cm) = 15. Se lo guardó a -20°C por no más de 1 mes.

En los casos en que se indica, la reacción ATPásica fue estimulada por el agregado del desacoplante FCCP. Este fue disuelto en metanol en una concentración de 10 mM y guardado a -20°C durante meses. No se agregaron volúmenes mayores de 30 $\mu\text{l/ml}$ de mezcla de reacción. Este volumen de metanol no afecta per se a la velocidad de la reacción. Las diluciones necesarias fueron hechas en el día en el mismo alcohol.

No se detectó hidrólisis no enzimática de ATP hasta por lo menos 15 min en un rango de temperaturas de 20°C hasta 38°C .

11.13 Determinación de Fosfato inorgánico

Se utilizó el método descrito por Taussky y Shorr (122) modificado mediante la concentración de sus constituyentes (4 veces) a fin de aumentar la sensibilidad disminuyendo el volumen de la mezcla final a ser leída espectrofotométricamente.

El reactivo se preparó de la siguiente manera:

SO ₄ Fe. 7 H ₂ O-----	2 g
Molibdato de NH ₄ 10% (p/v) en SO ₄ H ₂ 10 N-----	4 ml
H ₂ O llevar a-----	10 ml

Se agitó hasta la disolución completa de los cristales de sulfato ferroso. Se lo protegió de la luz y se lo utilizó en el día.

Se agregó el reactivo a las muestras, que se mantenían en hielo, con una pipeta automática (175 µl de reactivo/ml de muestra). Una vez que se procedió con todos los tubos (no más de 40 por vez) se transfirieron todos juntos del hielo a un baño a 30°C donde se los incubó por 2 min para facilitar que se desarrollara la reacción colorigénica. Se leyó inmediatamente a 660 nm manteniéndose, mientras tanto, los tubos a temperatura ambiente.

La curva de calibración cumple con la ley de Lambert y Beer hasta 0,9 UDO a 660 nm y la pendiente es ca. 2,7 UDO_{660 nm}·µmol Pi⁻¹. La precisión general es equivalente a una desviación no mayor a ± 0.010 UDO desde 0 a 0,9 UDO.

Las lecturas se hicieron contra un "blanco de reacción no enzimática" el cual fue incubado, en ausencia de cromatóforos, por un tiempo intermedio al máximo usado en la reacción enzimática (no detectándose, sin embargo, hidrólisis en esas condiciones, tal como se mencionó en 11.12). Luego del agregado de TCA se adicionó membrana cromatofórica y se procedió subsiguientemente como con los demás "puntos experimentales".

11.14 "Quenching" de la fluorescencia de la 9-aminoacridina

La mezcla de reacción contuvo en un volumen de 1 ml: 10 µmoles de Tricina-NaOH (pH 8,0); 2 µmoles de Cl₂Mg; 4 nmoles de 9-AA; 100 µmoles de ClK y cromatóforos equivalentes a 20 µg Bchl. La reacción se desencadenó con 2 µmoles de ATP. La fluorescencia se midió con un espectrofluorómetro Zeiss con geometría de 90°. Las bandas de excitación y emisión fueron 408 nm y 480 nm respectivamente.

La luz actínica (luz de excitación fotosintética) fue provista por una lámpara puntiforme Wild (Heerbrugg) de 15 W y conducida por medio de una fibra óptica

(de 6 mm de diámetro y 40 cm de largo). Todo el volumen de la muestra quedó iluminado uniformemente en dirección perpendicular a los ejes ópticos de excitación y emisión. La luz actínica fue filtrada por un filtro rojo de tipo "cut-off" (ver espectro de transmisión en la Fig. 9). La termostatación se logró mediante la refrigeración de la cámara de cubetas y del portacubetas haciendo circular etanol frío. Con un teletermómetro se controló la temperatura adentro de la cubeta antes de desarrollar la reacción.

La fluorescencia fue totalmente proporcional a la concentración de 9-AA hasta por lo menos 10 μ M. El método general es el descrito en (123 - 125). La reacción se registró con un registrador potenciométrico "Rikadenki" con un retardo de 1 seg para una deflexión de escala completa.

11.15 Determinaciones espectrofotométricas

Todas las mediciones de absorbancia incluyendo los espectros se hicieron con un espectrofotómetro "doble haz", visible-UV Zeiss DMR 21.

11.16 Drogas usadas

A continuación se indica el origen y número de catálogo de las drogas utilizadas.

Provistas por Sigma C.O. (St. Louis-EEUU)

ADP A 8146

ATP A 5394

9-aminoacridina A 1135

catalasa C-30

FCCP C 4017

α -D (+) glucosa G 5000

glucosa oxidasa (cruda) G-2258

hexoquinasa H 5000

oligomicina O 4876

PMS P 9625

Tricina T 0377

Tris (Trizma Base) T 1503

Provistas por Fluka (Buchs-Suiza)

TMPD 87890

Provistas por Mallinckrodt

Tritón X-100

Todas las demás drogas fueron "pro-análisis" y provistas por Mallinckrodt, Carlo Erba y Sintorgán. El ácido ortofosfórico radioactivo (32 P) fue provisto por la Comisión Nacional de Energía Atómica.

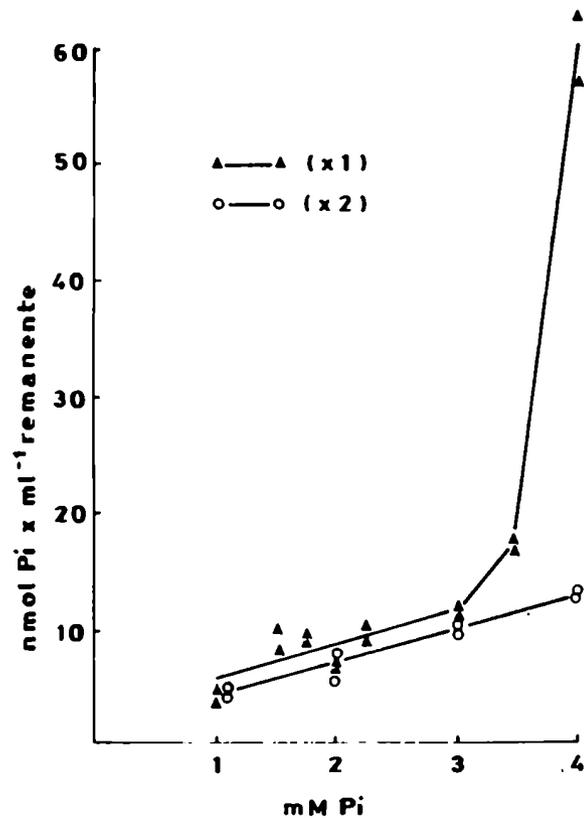


Figura 1

Capacidad del "Reactivo de Trietilamina" para precipitar exhaustivamente fosfato inorgánico.

Se grafica el Pi (³²P) remanente en el sobrenadante (ver método general en el texto) en función de la concentración de Pi en la mezcla de reacción. (x1): el reactivo tiene la composición estándar. (x2): el reactivo tiene duplicada la concentración de todos sus componentes.

III. Inhibición irreversible de la fotofosforilación originada durante el curso de la reacción de fotofosforilación mediada por PMS a baja temperatura

III.1 Introducción

La actividad del factor de acoplamiento de organismos fotosintéticos está asociada a cambios conformacionales durante su ciclo catalítico (12,40,42,43,44). Dichos cambios dependen del estado de alta energía de la membrana pero no está claro si tienen una relación causal directa con los eventos que conducen la reacción (tanto de síntesis como de hidrólisis de ATP) o si son una manifestación lateral de otros procesos aún no claramente conocidos. Mitchell (10-13) y Williams (20-21) proponen respectivamente que un gradiente protónico a través de la membrana o altas concentraciones de H^+ localizadas dentro de ella, constituyen los agentes primarios que provocan la síntesis de ATP, mientras que los cambios conformacionales, que en efecto ocurren, sería fenómenos secundarios. Por otro lado, Boyer (31,40) y Slater (45) postulan que los cambios conformacionales durante la síntesis de ATP podrían estar acoplados directamente al transporte electrónico. Frente al mecanismo quimiosmótico directo señalado arriba, donde los protones intervendrían directamente en la reacción, existen modelos más flexibles y abarcadores que sugieren que los gradientes protónicos proveerían la energía para la síntesis de ATP por medio de cambios conformacionales provocados por la translocación de H^+ hacia afuera a través del factor de acoplamiento durante el ciclo catalítico (mecanismo quimiosmótico indirecto) (9,46).

También se conocen cambios irreversibles en la actividad del sistema transductor de energía de cloroplastos y de cromatóforos que surgen de distintos pretratamientos experimentales. En general, dichos cambios se manifiestan como inhibiciones (50-80%) de tanto la síntesis de ATP como de su hidrólisis y surgen cuando se preiluminan (energizan) las membranas fotosintéticas en ausencia de alguno o de todos los sustratos de fotofosforilación durante tiempos del orden del minuto. El estado de alta energía de la membrana tiene un papel determinante. En efecto, su disipación por medio de un desacoplante o su consumo a través de reacciones que requieren energía (la propia síntesis de ATP o la fotoreducción de NAD^+) evitan la inhibición, ver Introducción 1.4.2.

La especulación que se plantea alrededor de estos fenómenos propone que la energía de la membrana, además de mantener la síntesis de ATP, puede tener un papel regulador sobre el factor de acoplamiento o, más en general, que en condiciones artificiales (ausencia de sustratos de fosforilación), un exceso de energía que no puede derivarse a la reacción de síntesis de ATP provoca la inhibición, que es interpretada a su vez como una reacción lateral.

En este Capítulo se detecta una inhibición irreversible (50%) del sistema de fotofosforilación de cromatóforos de R. rubrum que ocurre durante el curso de la fotofosforilación a baja temperatura (3°C). Aunque tiene lugar en presencia de sustratos, las hipótesis que condujeron la investigación proponen que también en este caso la inhibición está determinada por un exceso de energía en la membrana. Se establecería por un desbalance, determinado por la baja temperatura, entre la velocidad del transporte de electrones y la de disipación del estado de alta energía a través de la síntesis de ATP a nivel del factor de acoplamiento.

III.2 Experimentos iniciales

La reacción de fotofosforilación mediada por PMS muestra una clara dependencia de la temperatura (Fig. 2). A temperaturas superiores a los 20°C la reacción transcurre a velocidad constante hasta alcanzar niveles de producto relativamente altos. Por ejemplo a 30°C, la velocidad inicial se mantiene durante 3 a 4 min llegando a acumularse ca. 300 μM ATP (Fig. 8). Sin embargo, a temperaturas bajas, aproximadamente hasta 20°C, se observa una disminución de la velocidad inicial que, por ejemplo en el caso de la reacción llevada a cabo entre 2 y 3°C, se manifiesta luego de haber transcurrido alrededor de 1 min desde su desencadenamiento (entre 40 y 120 seg).

Con el método discontinuo usado para registrar la reacción se observa un "lag" aparente de 5 a 10 seg que es independiente de la temperatura, ver también Fig. 17. Sin embargo, su existencia parece depender de cada preparación cromatofórica.

La curva de tiempo a "temperatura baja", tal como se denominará en adelante, fue estandarizada a 2,5-3°C. Esta muestra dos zonas distintas luego del "lag" señalado arriba. La primera se extiende hasta aproximadamente el 1er minuto de reacción y es consistentemente rectilínea o de curvatura despreciable. Le sigue una zona de relativa angulosidad, que se llamará "quiebre", centrada entre los 40 seg y los 2 min para dar lugar, posteriormente, a una fase en la que la reacción está un 50% inhibida respecto de la velocidad inicial. La velocidad de esta 2da etapa se mantiene relativamente constante durante 4 o 10 min dependiendo del experimento, para luego disminuir paulatinamente.

Dentro de un intervalo medio de temperaturas, para cualquier tramo de las respectivas curvas de tiempo, la inhibición respecto de la velocidad inicial es mayor cuanto menor la temperatura. Sin embargo, la inhibición es nula a temperaturas relativamente altas (mayores de 20°C) y tiende a estabilizarse en un nivel de alrededor 40-60% a temperaturas bajas, recuadro interno de la Fig. 2.

También se evidencia que, avanzado el curso de la reacción (4-10 min) la inhibición queda aproximadamente estabilizada, tal como lo muestra la convergencia de las diferentes curvas de inhibición a bajas temperaturas. En este sentido queda definida la segunda fase de la reacción ya descripta arriba. Este comportamiento es similar, independientemente de la cepa usada.

Dado que la disminución de la velocidad durante el transcurso de la reacción a temperaturas bajas ocurre a tiempos de reacción y a niveles de producto notablemente menores que los requeridos para obtener algún descenso de velocidad a temperaturas mayores de 20°C, es que resultó atractivo caracterizar la índole de dicha inhibición.

Con la hipótesis de que el tramo de la curva de tiempo posterior al "quiebre" refleja algún tipo de forma de fotofosforilación de baja actividad o inhibida, se desarrollaron los siguientes experimentos, varios de los cuales fueron necesarios para descartar causas triviales de la inhibición observada.

Como la velocidad de la segunda fase decae (en algunos experimentos) levemente con el tiempo, se eligió a fines descriptivos la pendiente de una secante a la curva entre el minuto 4º y 6º como un índice estándar de la velocidad "inicial" de la actividad inhibida.

En la Fig. 3 (curvas B y C) se observa que incubaciones de la membrana a 2,6°C en presencia de sustratos de fosforilación, pero en oscuridad, no afectan el comportamiento característico de la reacción (curva A), que consiste, como se describió más arriba, en un marcado descenso de la velocidad inicial luego del transcurso de ca. 1 min desde su comienzo. La actividad a 30°C tampoco es modificada por una incubación previa de la membrana a 2,6°C en presencia de sustratos y en oscuridad, ver Fig. 8 (comparar las curvas controles A y A' con I).

Del curso de la reacción a 2,5°C, se puede calcular que en el momento del cambio de la velocidad inicial el porcentaje consumido de los sustratos (ADP y Pi) alcanza sólo un 0,5 a 1% según el experimento, siendo a su vez el nivel de producto acumulado entre 10 y 20 µM ATP (tener en cuenta que los valores graficados fueron normalizados a 1 mg Bchl y que la cantidad de cromatóforos utilizada representó en todos los casos 8-12 µg Bchl). Aunque los valores señalados son bajos (variaciones de ese orden no producen ningún efecto sobre la velocidad inicial de la reacción a 30°C, tal como se deduce de su constancia durante por lo menos 3 min, aún en ausencia de hexoquinasa y glucosa), se consideró necesario averiguar si el decaimiento de la velocidad inicial a temperatura baja se debía a una progresiva desaturación respecto de los sustratos o a una progresiva inhibición por producto. Esto, si así fuera, indicaría un comportamiento cinético diferente a temperaturas bajas respecto a altas.

Se estudiaron las curvas de saturación aparente tanto para Pi como para ADP manteniendo el otro sustrato constante.

La fase inicial y la inhibida muestran un comportamiento "michaeliano" respecto de Pi (Fig. 4). Se deduce que la inhibición observada no puede explicarse por desaturación de Pi pues su consumo no alcanza a producir ningún cambio significativo de la velocidad.

De igual manera, en la Tabla 1 se estudia la saturación por ADP. Tampoco en este caso se puede atribuir la inhibición observada a una progresiva desaturación del nucleótido en el curso de la reacción a baja temperatura.

La Fig. 5 muestra que el fenómeno en estudio tampoco es el reflejo de una inhibición por producto. En efecto, concentraciones de ATP similares y aún mayores a las presentes en el momento del "quiebre" no inhiben la velocidad inicial de fotofosforilación a 2,5°C.

Se debe señalar que todo el curso de la incorporación de ^{32}Pi a compuestos orgánicos depende de la luz (Figs. 3 y 8).

Se sabe que las membranas fotosintéticas también pueden catalizar incorporación de ^{32}Pi en reacciones que no involucran la síntesis de ATP, por ejemplo el intercambio de fosfato de nucleótidos (115,116) y la síntesis de PPI (115).

En R. rubrum la síntesis de ATP es el proceso de incorporación de ^{32}Pi a nucleótidos de mayor importancia (199). Como no se tenía evidencia de esto a temperatura baja, se llevó a cabo una curva de tiempo valorando el producto luego de una incubación con hexoquinasa y glucosa seguida de una hidrólisis ácida de los nucleótidos tal como se describe en "Materiales y Métodos". El resultado (Fig. 6 B) consistió en una curva de tiempo esencialmente igual a la lograda sin dicha hidrólisis. Corroborando este resultado se determinó que la incorporación, en ausencia de ADP, de ^{32}Pi inducida por la luz a compuestos no precipitables por el "Reactivo de Trietilamina" es nula en reacciones de hasta por lo menos 6 min a 2,5°C (Fig. 6 A).

Estos dos últimos experimentos fueron necesarios pues la curva de incorporación observada podría haber sido el resultado de la superposición de dos o más actividades, es decir, la síntesis de ATP perduraría luego de los primeros minutos, mientras que las otras sólo se manifestarían en el primer minuto y luego decaerían.

De estos resultados se concluye que: i) En ausencia de ADP exógeno y en el período de tiempo en el que se manifiesta la inhibición, no hay reacción de PPI sintetasa (el PPI no es precipitado por el Reactivo de Trietilamina (120)), ni hay una eventual fotofosforilación de ADP endógeno (unido) y posterior liberación. ii) De manera más general, la presencia de una inhibición (manifestada como la existencia de una primera y una segunda fases) no es la expresión de la producción transitoria de algún otro producto marcado hidrolizable además de ATP, ya que luego del tratamiento con hexoquinasa-glucosa y posterior hidrólisis aún se mantiene el "quiebre" en el curso de la reacción.

Con todos los experimentos señalados hasta el momento, se tuvo la evidencia de que se estaba en presencia de un fenómeno de inhibición de la actividad, determinado por el tiempo en condiciones de fotofosforilación a baja temperatura, pero no causado por desaturación de sustratos ni por inhibición por producto.

Usando concentraciones mayores de cromatóforos se obtiene una fase inicial de menor velocidad, Fig. 7 B. Esto se debe muy probablemente a un efecto de autoensombrecimiento que hace que la iluminación efectiva promedio de los cromatóforos caiga por debajo de los niveles de saturación (199)*. La fase inicial se prolonga hasta alrededor de los 5 min alcanzándose valores de producto acumulado 6 veces mayores que los que hay presentes en el momento de la inhibición en la reacción control A (esto es 100 μM vs. 15 μM ATP). Se debe aclarar que la inhibición que sufre la reacción B a los 5 min no se puede explicar de la misma manera que la de las reacciones A y C ya que, como se verá más adelante, las reacciones que tienen la velocidad inicial apreciablemente inhibida (50%) no muestran el fenómeno de "quiebre". En el caso particular de B la caída de la velocidad observada podría explicarse parcialmente por inhibición por producto (Fig. 5).

Proponiendo que las características cinéticas (respecto de sustratos y productos) sean similares en las dos condiciones energéticas (o sea alta iluminación efectiva con bajas concentraciones de cromatóforos y viceversa), es evidente que el "quiebre" de la reacción no depende de que se alcancen niveles críticos respecto de sustratos o productos, corroborándose lo visto en las Figs. 4 y 5 y en la Tabla 1. En apoyo a la premisa cotemplada para esta última conclusión compárense las Figs. 24, 25, 26, 41, y véase III.8.3.

Aplicando esos mismos argumentos e información, tampoco depende del número de ciclos enzimáticos de fotofosforilación, lo que sería de esperar si la entrada en la fase inhibida fuese la consecuencia de la acumulación de formas de menor actividad, surgidas de manera estadística a partir de un ciclo enzimático hipotético propio de la primera fase.

Esto sugirió que los factores tiempo y luz ejercen su efecto a través de pasos de la transducción de energía anteriores a los de la síntesis de ATP.

Por otro lado la reacción C de la Fig. 7 provee las mismas conclusiones anteriores. En esta reacción, disminuyendo la intensidad de luz se logra mantener la primera fase con velocidad constante durante casi 4 min. En apoyo a esto la Fig. 14 muestra un experimento más completo.

La estricta dependencia de la luz indujo a pensar que el fenómeno podría ser el reflejo de algún cambio funcional del sistema global de fotofosforilación provocado directa o indirectamente por la luz (por ejemplo a través del estado de alta energía del cromatóforo). Si así fuese, cabría la posibilidad de ser revertido por una interrupción de la iluminación por períodos más o menos largos, dado que en oscuridad el estado de alta energía se disipa. La Fig. 3 (curvas D y E) muestra que interrupciones de la luz efectuadas en la segunda fase de la curva A

(*) Ver discusión en la pág. 127.

durante períodos de tiempo de hasta 10 min no modifican el grado de inhibición que se manifiesta en el minuto 6°, con respecto a la velocidad de la primera fase*. En la curva A se observa además que la velocidad tiende a cero con el transcurso del tiempo. Por otro lado, en la misma figura la actividad ATPásica en oscuridad es despreciable en esas condiciones de reacción. Respecto de la continua inhibición de la segunda fase, la Fig. 5 B sugiere que la inhibición por producto no da cuenta del total de la inhibición observada. A este respecto ver el Capítulo III.7.

Se quiso saber si la actividad inhibida (segunda fase), una vez lograda, se manifestaba solamente a esa baja temperatura o también se mantenía si al sistema se lo incubaba a 30°C luego de una transferencia rápida a esa temperatura. Podría ocurrir que un eventual cambio, responsable del fenómeno, fuera revertido con una elevación de la temperatura (a 30°C) en oscuridad o permitiendo la fotofosforilación a esa alta temperatura.

En relación con esas hipótesis la Fig. 8 muestra que:

1) La actividad a 30°C, luego de 4 min de fotofosforilación a 2,6°C (por lo tanto ya en la fase inhibida) está inhibida en un 46% con respecto a la de la reacción llevada a cabo enteramente a 30°C (comparar reacciones E y A); es decir en el mismo grado en que lo está la actividad a 2,6°C luego de 4 min respecto de su primera fase (reacción B). Tampoco se logra revertir la inhibición con una incubación a 30°C en oscuridad intercalada entre la fase inhibida de fotofosforilación a 2,6°C y la fotofosforilación posterior a 30°C (comparar reacciones F y E).

2) Se observa que luego de los períodos intercalados de luz u oscuridad a 30°C, los niveles de inhibición de una nueva reacción a 2,6°C son del mismo orden (ca. 50%) que los que corresponden al momento inmediatamente anterior a la intercalación del tratamiento de incubación a 30°C, (comparar reacciones H y G con B).

3) Si se eleva la temperatura de reacción antes de haber transcurrido el primer minuto a 2,6°C, o sea en la primera fase de la reacción a baja temperatura, no se observa ningún cambio significativo en la actividad a 30°C, (comparar reacciones C y A).

4) Justo en el momento donde se empieza a evidenciar alguna inhibición a temperatura baja (zona del "quiebre") también se detecta una pequeña inhibición (15%) al transferir y medir seguidamente la reacción a 30°C, (reacción D).

En conclusión, una vez logrado un cierto nivel de inhibición a temperatura baja,

(*) Ver también otro fenómeno interesante provocado por un tratamiento de este tipo en la Fig. 54.

éste también se manifiesta en la actividad a temperaturas altas, y no es posible revertirlo al incubar a 30°C ni con tratamientos de oscuridad ni permitiendo que la membrana fotofosforile.

Este fenómeno de inhibición ocurre de la misma manera con membranas que no fueron congeladas nunca, provenientes de células que fueron almacenadas congeladas o procesadas inmediatamente luego de la cosecha. Esta información es relevante para hipótesis que planteen que el fenómeno está influenciado por la conformación de la membrana previa al experimento y que dicha conformación pudiese ser modificada irreversiblemente a partir del estado nativo, durante el congelamiento.

III.3 Evidencias que descartan una acción directa del PMS como causa de la inhibición observada a bajas temperaturas.

Se sabe que el PMS se fotooxida dando lugar a piocianina (126).

Se podría postular que la inhibición observada se debe a la desaparición de PMS, al transformarse a partir de su forma original (126,127), o a un efecto tóxico de él o de sus fotoderivados, tal vez dependiente del tiempo, sobre alguna parte del sistema de fotofosforilación. Es claro que si así fuese, tal efecto sólo se manifestaría a bajas temperaturas, pues a altas, en tiempos similares a aquellos en los cuales a bajas temperaturas se inhibe la reacción, no se observa inhibición, ver Fig. 2 y Fig. 8.

Por otro lado, se sabe que en cloroplastos(126,128) la piocianina también es un buen transportador de electrones.

En este trabajo experimental se han recopilado diversas evidencias que sugieren que la inhibición no depende de un efecto directo del PMS. Este agente redox cumpliría, entonces, sólo con su papel conocido de mediador en el transporte electrónico facilitando la energización de la membrana (115,129).

En la Fig. 9 se muestran las características espectrales del PMS y la cinética de fotodescomposición por luz blanca intensa. Las propiedades espectrales concuerdan con las tabuladas en la bibliografía(127,130,131) y tienen como características: a pH 8 los máximos de absorción son: 260 y 387,5 nm y el EmM(387,5 nm; 1 cm):26,3. Los correspondientes a piocianina:239,312,379 y 690*nm y el EmM (690 nm; 1 cm):4,5.

Se han considerado las siguientes evidencias en contra de una fotodestrucción del PMS como causa de la inhibición:

1) En algunas oportunidades se estudiaron reacciones de fotofosforilación a 3°C con mezclas de reacción estándar que habían sido preiluminadas (en ausencia de membrana) con luz blanca intensa durante 1-2 min, de tal manera que la mezcla de reacción con PMS se había tornado celeste (aparición de piocianina). Las curvas de tiempo mostraron un patrón de comportamiento en un todo similar al de la reac-

(*): Pico ancho.

ción desencadenada en mezclas de reacción mantenidas hasta ese momento en oscuridad (no se muestra).

2) Teniendo en cuenta los datos espectrofotométricos, a los 4 min de iluminación prácticamente todo el PMS está transformado en piocianina (Fig. 9 C). Sin embargo, la velocidad a 30°C continúa casi sin disminuir su velocidad (Fig. 8). Por otro lado en el min 1° habría aún suficiente PMS como para mantener la velocidad inicial a baja temperatura (cf. Figs. 9 C y 10). Así, se propone que la piocianina debe ser tan eficaz como el PMS.

3) Si se evita la fotodescomposición con un filtro rojo de tipo "cut-off" (ver su espectro de transmisión en la Fig. 9) se observa un comportamiento exactamente igual que en un control que se desarrolla con luz blanca, ver Fig. 37.

En la bibliografía se describe muy frecuentemente la iluminación con filtro rojo "cut off" (126). Este tipo de filtro no interfiere con la mayoría de la luz fotosintéticamente activa pues el espectro de absorción de la bacterioclorofila en la membrana tiene su pico máximo a 880 nm en R. rubrum (Fig. 9 D).

4) La protección de la inhibición por un desacoplante sería más difícil de explicar, ver III.5 y Figs. 15 y 16.

5) y 6) No se debería encontrar una "saturación" del tiempo necesario de iluminación para lograr el "quiebre" tanto respecto de la intensidad de luz (si la causa de la inhibición fuera la desaturación por desaparición de PMS o el aumento de productos de descomposición del PMS), ver Fig. 14, como respecto de la concentración de PMS (si la causa fuera la aparición de productos de descomposición del PMS), ver Fig. 10. En apoyo a esto último, se puede citar como argumento parcial que aún en presencia de altas concentraciones de PMS (200 μ M), si la intensidad de la luz roja es baja (150 V, cf. Figs. 37 y 43), no hay "quiebre" (no se muestra).

7) y 8) Aunque no fueron estudiados exhaustivamente, el hecho de que tanto con una preparación cruda en ausencia de mediador redox (Fig. 18), como con otros sistemas mediadores redox diferentes del PMS (Fig. 20) se observa la misma inhibición, también desacredita la hipótesis en discusión.

9) No es sólo una fotodescomposición de PMS y una consecuente desaturación lo que hipotéticamente afecte al sistema a 3°C y no a 30°C pues, entonces, debería ser reversible, por un lado, al elevar la temperatura a 30°C (Fig. 8) y por otro al recuperar las membranas por ultracentrifugación y ensayar luego la reacción con mezcla nueva (Figs. 21, 22, 24 y 25). En efecto, en todos esos experimentos la inhibición (50%) es irreversible.

10) El hecho de que el fenómeno de inhibición no se vuelva a repetir con membranas recuperadas luego de haber sido preincubadas a bajas temperaturas en condiciones de fotofosforilación durante un tiempo suficientemente largo (20-30 min),

es una nueva evidencia de que el fenómeno no depende de un efecto inespecífico de la incubación a baja temperatura en presencia de PMS y luz, ver Fig. 21.

11) Usando un pH subóptimo para la fotofosforilación (Figs. 12 y 13) no se observa inhibición. Cabe comentar acá que Slooten y Sybesma (198) observaron una caída de la velocidad inicial de fotofosforilación a 30°C que se estabiliza en un 50% de inhibición luego de 4-6 min de reacción. Paralelamente, observaron que el PMS se decoloraba. Lo asociaron a la fotoreducción del PMS por el agua, que sólo ocurre en condiciones anaeróbicas (126), tal el caso de esos experimentos. Mencionan que dicha inhibición es totalmente reversible luego de un lavado por ultracentrifugación, aún luego de 10 min de reacción.

III.4 Efecto de la concentración de PMS y del pH sobre la inhibición de la fotofosforilación a baja temperatura.

En las Figs. 10 y 11 se muestra para temperaturas bajas y altas las curvas de saturación de la reacción de fotofosforilación por PMS. A bajas temperaturas se observa un "lag" acentuado a bajas concentraciones de PMS. Sin embargo, dicho "lag" parece no existir o ser proporcionalmente menor en el caso de la reacción endógena (0 μM PMS). Este mismo resultado se encontró en otros seis experimentos donde las reacciones se registraron desde los 0-10 seg. Por otro lado, para que se manifieste el "quiebre" del curso de la reacción en estudio se necesita un umbral de ca. 15 μM PMS. A concentraciones mayores (35 μM) se saturan las velocidades de la primera y segunda fases, como así también se estabiliza el tiempo en que se manifiesta la inhibición. El "lag" detectado puede asignarse al tiempo necesario para el establecimiento del nivel de estado energizado del cromatóforo (197). Un comportamiento similar se encuentra con muy bajas intensidades de luz, Fig. 14.

A temperaturas altas, Fig. 11, la concentración de PMS necesaria para saturar la reacción, es mayor que a bajas (200 μM), ver discusión en la pág. 125. Las características de la saturación a 30°C son muy similares a las presentadas en (199). Tal como se manifiesta en varios gráficos anteriores, a 30°C no se observa inhibición hasta unos 4 min desde el desencadenamiento de la reacción, con concentraciones de PMS de hasta 80 μM . Sin embargo, con concentraciones mayores hay una pequeña inhibición (15%) que también ocurre luego del primer minuto de reacción. Con la preparación de membranas usada, también se observa un "lag", aceleración o primera fase de reacción (ver III. 8), sólo cuando se usa una concentración no saturante de PMS. Sin embargo, y de manera similar a la indicada para la reacción a baja temperatura, la reacción endógena (0 μM PMS) no parece tener "lag" tal como lo indican otros seis experimentos con reacciones registradas desde los 10 seg.

En las Figs. 12 y 13 se estudia el efecto del pH sobre la velocidad de fotofosforilación a temperaturas altas y bajas. Se eligió pH = 8,0 como el óptimo para el rango de 30°C a 20°C y 8,7 para las temperaturas inferiores a 20°C. Se observa que cuando el pH es subóptimo para inducir una velocidad de reacción máxima a baja temperatura no se detecta "quiebre" en el curso de la reacción.

No hay diferencias respecto del pH óptimo para la primera y la segunda fases de la reacción a temperaturas bajas (3 a 17,7°C), Figs. 13 A y B.

Para un rango de pHs entre 8,0 y 8,8, el tiempo de duración de la primera fase es mayor cuanto mayor es la temperatura (por encima de 10°C y hasta 17,7°C), Fig. 13 C. Este resultado es coherente con los mostrados en la Fig. 2.

Es interesante señalar que el fenómeno de inhibición no depende (al menos sólo) de una acción deletérea directa de la luz sobre el sistema de componentes endógenos de la membrana, como por ejemplo complejos proteína-pigmentos, transportadores de electrones, factor de acoplamiento, etc. En efecto, incubaciones con alta intensidad de luz en ausencia de PMS a bajas temperaturas no provocan inhibición hasta por 10 min (por ej. Fig. 10). Tampoco se desarrolla la inhibición cuando, aún en presencia de PMS y luz alta, se usan concentraciones bajas o altas de FCCP (Figs. 15 y 16), o cuando el pH no es óptimo (Figs. 12 y 13). Por otro lado, y en apoyo a las anteriores evidencias, se debe tener en cuenta la reversibilidad que se encuentra en el caso de la inhibición de las membranas "crudas" que fotofosforilaron a baja temperatura con luz alta sin PMS o que fueron preiluminadas en ausencia de sustratos y de PMS, ver III.6 y Figs. 18 y 19.

III.5 Efecto de la intensidad de luz y de la presencia de un desacoplante sobre la inhibición de la fotofosforilación a baja temperatura.

El hecho de que la inhibición investigada acá se manifieste a baja temperatura y no a alta, y el conocimiento del fenómeno de fotoinhibición de la fotofosforilación en presencia de PMS (198,199,200,201,202,203) indujo a pensar que la inhibición en estudio pudiera asemejarse a aquel en cuanto a ser producida también por un desbalance entre la velocidad de energización y la de disipación de dicha energía por el factor de acoplamiento durante la síntesis de ATP a bajas temperaturas.

Fue mostrado que la fotoinhibición en presencia de PMS ocurre en condiciones de alta energización pero en ausencia de síntesis de ATP (por falta de sustratos), pudiendo ser protegida mediante una disminución del nivel energético. Este fenómeno fue interpretado como debido a cambios conformacionales irreversibles del sistema transductor de energía, probablemente a nivel del factor de acoplamiento,

ver Introducción. En este contexto podría pensarse que la inhibición observada a baja temperatura, que ocurre aún en presencia de sustratos, podría ser la consecuencia de una dependencia diferencial de la temperatura de las velocidades de acumulación y de utilización de la energía, estableciendo un nivel energético en exceso respecto a aquel necesario para mantener una velocidad de síntesis de ATP máxima a esa temperatura. Llamaremos a estas condiciones de "sobreenenergización".

En consecuencia, si la acumulación de energía (en "exceso") es el primer paso que conduce a una modificación (o daño) irreversible, entonces, una disminución en la provisión total o una disipación parcial del nivel de energía (gradiente electroquímico de protones) debería, por un lado, mantener la fase inicial con la misma alta velocidad que la del control y, por otro, permitir que permanezca en operación durante tiempos mayores. Dichas variaciones experimentales se pueden lograr, por ejemplo en el primer caso, variando la intensidad de luz incidente y en el segundo, con la presencia de diferentes concentraciones de un desacoplante durante la reacción.

La Fig. 14 muestra el efecto de diferentes intensidades de luz sobre la fosforilación a bajas temperaturas. Tal como se propuso en la hipótesis planteada y había sido ya detectado en el experimento mostrado en la Fig. 7, la disminución de la intensidad de la luz dentro de ciertos límites resulta en un alargamiento de la primera fase sin cambio significativo de la velocidad. También se logran resultados similares a estos cuando se varía la intensidad de la luz que es filtrada con un filtro rojo, no se muestra. Por otro lado, nótese que las intensidades de luz que son saturantes para la primera fase de la reacción, también lo son para la fase inhibida, ver recuadro interno de la Fig. 14. A intensidades de luz aún más bajas (ca. $40 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$) en general se detecta un "lag" y/o una fase inicial de velocidad baja que luego de algunos minutos aumenta, alcanzando velocidades mayores. La duración tanto del "lag" como de la fase inicial de baja velocidad disminuye al aumentar la intensidad de la luz. Dentro del rango de intensidades de luz estudiadas (hasta $850 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$) y por encima de un cierto valor ($350 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$), no se observa ningún acortamiento adicional de la primera fase.

Cabe señalar que para que los fenómenos mostrados en la Fig. 14 puedan ser reproducidos dentro de los mismos rangos de intensidad lumínica incidente, se debe tener especial cuidado en usar las mismas concentraciones de cromatóforos, pues la iluminación efectiva varía al cambiar dicha concentración. Ver una discusión más extensa en la pág. 127. Esto es sobre todo importante en el caso de las intensidades de luz incidente bajas, para las cuales, las velocidades de reacción o el punto de "quiebre" muestran una clara dependencia.

Una interpretación posible es que por encima de $350 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ el contenido de energía de la membrana es saturante tanto para la fotofosforilación (lo es incluso desde intensidades menores ($80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$)), como para los fenómenos que conducen a la inhibición. También se puede deducir que el paso limitante a $2,5^\circ\text{C}$ a intensidades de luz mayores que $80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ es la "transferencia de energía", es decir la síntesis de ATP y no los pasos anteriores de transducción energética (transporte de electrones fotosintético y conservación del estado de alta energía como por ejemplo en forma de un gradiente de protones). En efecto, una vez saturada la síntesis de ATP por la luz (velocidad inicial invariante) aún se puede detectar la influencia de la intensidad de la luz sobre la manifestación de otro fenómeno también dependiente de energía tal como es el momento en el que ocurre el "quiebre" de la reacción.

En otras palabras, la velocidad de síntesis de ATP se saturaría con contenidos energéticos de la membrana menores que el nivel de energía máximo alcanzable a través del transporte de electrones cuando éste opera a máxima velocidad (en condiciones de luz saturante).

De esta manera, se podría concluir que el exceso de energía no utilizado para la síntesis de ATP sería el paso inicial responsable del "quiebre" de la reacción. Sin embargo, en esta Tesis no se han hecho mediciones directas del $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$ para contrastar la hipótesis de trabajo.

En las Figs. 15 y 16 se muestra el efecto de un desacoplante (FCCP) sobre el tiempo transcurrido antes de alcanzar el punto de "quiebre".

Se usaron concentraciones de FCCP subóptimas en relación a aquellas necesarias para inhibir apreciablemente la fotofosforilación. Se trata, con esto, de disipar parcialmente el intermediario de alta energía (gradiente electroquímico de protones). Tal como se indicó antes, con este experimento se quiere nuevamente contrastar si el nivel de energía por encima del requerido para la fotofosforilación, es el causante de la inhibición.

De manera parcialmente coherente con la hipótesis, concentraciones relativamente pequeñas del desacoplante prolongan la duración de la primera fase sin disminuir considerablemente la velocidad. En efecto, ya con concentraciones muy pequeñas de FCCP se observa una caída de la velocidad inicial, la que sin embargo se mantiene aproximadamente constante hasta concentraciones de ca. $1,5 \mu\text{M}$, ver Fig. 16 A. Dentro del mismo rango de concentraciones de desacoplante se detecta primero una clara prolongación del tiempo de permanencia de la primera fase, para retomar el comportamiento inicial a las concentraciones extremas de dicho intervalo.

A concentraciones mayores de $1,5 \mu\text{M}$ FCCP, la velocidad cae considerablemente y no se observa el fenómeno de inhibición en estudio, manteniéndose la velocidad

inicial hasta por lo menos 10 min, ver Fig. 15 ($2 \mu\text{M}$ FCCP). Es importante destacar que la rectificación de la curva de tiempo a concentración alta de FCCP (por ejemplo $2 \mu\text{M}$), se manifiesta a través de un fenómeno diferente de aquel en que se da con concentraciones bajas. En efecto, en este último caso la prolongación de la primera fase ocurre sin disminución considerable de la velocidad inicial ('plateau' de velocidades en la Fig. 16 A), en cambio, con concentraciones altas, la velocidad inicial está más de un 50% inhibida. Esto es coherente con experimentos llevados a cabo en otras condiciones, en las que se logran velocidades relativamente bajas (ausencia de PMS, Fig. 10; pH subóptimo, Figs. 12 y 13; muy bajas intensidades de luz, Fig. 14) y donde tampoco se observa el fenómeno de inhibición.

Más difícil de explicar es el hecho de que sólo un rango limitado de concentraciones de FCCP provee máxima protección contra la inhibición. Este comportamiento es semejante al conocido para la reacción de hidrólisis de ATP inducida por concentraciones crecientes de desacoplante, ver por ejemplo Figs. 27 y 56. Esto último fue interpretado (195,196) en términos de un control ejercido sobre el factor de acoplamiento por el contenido energético de la membrana de manera tal que solo un cierto rango de energía induce una máxima actividad enzimática. A su vez, dicho control estaría provocado por cambios conformacionales dependientes de energía del factor acoplante, tal como fue demostrado en cloroplastos (32,33).

Basado en el mismo razonamiento, y ya que un aumento gradual de la concentración de FCCP es equivalente a una disminución del tenor de energía, se puede proponer que un intervalo preciso de niveles energéticos comprendidos entre los relativamente altos (hasta $1,5 \mu\text{M}$ FCCP) induciría una conformación particular del factor de acoplamiento que sería menos susceptible a la inhibición.

Sin embargo, el experimento mostrado en la Fig. 16 B no concuerda aparentemente con el de la Fig. 16 A, tal vez debido a falta de datos experimentales. De todas maneras también es clara en esa figura la prolongación de la fase inicial a bajas concentraciones de FCCP, concomitantemente con una inhibición sólo parcial de la velocidad, (considerar el rango $0 - 0,3 \mu\text{M}$ FCCP).

De estos resultados es evidente que tanto una disminución de la intensidad de la luz incidente, como una disipación parcial del gradiente electroquímico de protones por un desacoplante, resulta en una prolongación de la fase inicial de máxima velocidad. Sin embargo, comparando ambos efectos (Fig. 14 y Fig. 16 A), se manifiestan algunas diferencias:

a) El requerimiento hipotético de mantener la misma velocidad inicial durante períodos más largos de tiempo se cumple sólo a través de la disminución de la intensidad de luz, ya que aún a concentraciones muy bajas de FCCP ($0 - 0,3 \mu\text{M}$) se detecta una inhibición parcial (10-25%) de la actividad, la que sin embargo se mantiene constante hasta $1,5 \mu\text{M}$.

b) Mientras que usando un desacoplante, sólo un estrecho nivel de energía (estrecho rango de concentraciones de FCCP) provee máxima protección, disminuyendo la luz, se observa sólo un aumento del tiempo de protección.

Una explicación posible para justificar las diferencias señaladas es que los contenidos energéticos que se logran con las variaciones experimentales mencionadas (modificación de la intensidad de luz o presencia de FCCP) no abarquen rangos semejantes o no involucren formas exactamente equivalentes del estado energético.

Considerándolo de manera aislada, el estudio con un desacoplante (Figs. 15, 16 y 17) sugiere que no habría "sobreenergización" pues la velocidad inicial disminuye aún con concentraciones bajas de desacoplante. En cambio, llevaría a postular que a bajas temperaturas, pero no a altas, el contenido de alta energía del cromatóforo, al mismo tiempo que induce por un lado la síntesis de ATP, por otro provoca la inhibición del sistema transductor de energía ("quiebre"). Por dicha causa, al titular con FCCP, se observa una menor actividad de fotofosforilación y el "quiebre" tarda más en ocurrir. De cualquier manera seguiría siendo necesario el recurso de una hipótesis ad hoc para explicar el rango estrecho de concentraciones de desacoplante que da una protección óptima en los experimentos mostrados en la Fig. 16 A.

En la Fig. 17 se presenta un comportamiento contradictorio con los mostrados en las Figs. 15 y 16. En efecto, el curso de la reacción a baja temperatura tiene un "lag" cuya duración se alarga al aumentar la concentración de desacoplante ocurriendo a su vez una caída "brusca" de la velocidad de fotofosforilación. De cualquier manera, también se observa el fenómeno de inhibición ("quiebre"), pero es sólo del 35% (no se muestra).

Aunque no hay una explicación clara para este diferente comportamiento, se podrían proponer errores accidentales en la concentración de PMS (comparar con Fig. 10) o en la concentración efectiva de FCCP (subestimación), o la existencia de algún tipo de desacople propio de esa preparación cromatofórica. En este sentido cabe indicar que la preparación de cromatóforos estudiada en la Fig. 17 no fue congelada, mientras que las usadas en los experimentos de las Figs. 15 y 16 sí lo fueron. Sin embargo, no se estudió sistemáticamente el eventual efecto del congelamiento.

Sin embargo, en cierta concordancia con los otros resultados, se observa que la $I_{50\%}$ para el desacople es mayor a baja temperatura que a alta. Esto podría ser el reflejo de que a baja temperatura el nivel energético es proporcionalmente mayor que el requerido para la síntesis de ATP comparado con lo que ocurriría a alta temperatura. Sin embargo, no se pueden descartar problemas de solubilidad diferencial.

Nota: Es interesante comentar que, tal como se indica en las leyendas de la Fig. 4 y de la Tabla 1, si la reacción de fotofosforilación transcurre con baja velocidad por desaturación de Pi o por inhibición por sustrato (ADP) el "quiebre" de la reacción ocurre a tiempos más cortos. Esta observación está de acuerdo con la hipótesis planteada, dado que una menor velocidad de disipación de energía a través de la síntesis de ATP conduciría al establecimiento de un alto nivel de energía de la membrana en un tiempo menor.

III.6 Inhibición de la fotofosforilación a temperaturas bajas e inhibición de la fotofosforilación por preiluminación, en ausencia de sustratos, en membranas de una preparación "cruda" en ausencia de mediadores redox artificiales.

Los experimentos anteriores sostienen que el fenómeno de inhibición en estudio podría ser dependiente de un desbalance entre la velocidad de síntesis de ATP y el nivel de energía de la membrana mantenido por el transporte de electrones fotosintético, cumpliendo el PMS, fundamentalmente, el papel de catalizar el transporte de electrones.

Una manera de contrastar esto es intentar, en ausencia de PMS, el logro de un alto nivel energético de la membrana que se vería a su vez reflejado en una velocidad de fotofosforilación alta. A este efecto se desarrollaron diversos experimentos.

Uno de ellos, consistió en estudiar la reacción utilizando el producto de sonicación de las células luego de una centrifugación a baja velocidad (17.000 g). Así, usando este extracto crudo, en vez de membranas purificadas, se puede observar una actividad de fotofosforilación de velocidad relativamente alta en ausencia de PMS ya sea a temperatura alta como a baja, Fig. 18 A, A', D y D'. También en este caso, se presenta en el curso de la reacción a baja temperatura un punto de "quiebre" en la misma posición (1 min) en que se manifiesta con PMS.

Tanto la actividad a 3°C como a 30°C es unas cuatro veces superior que la de una membrana purificada medida en ausencia de PMS, comparar Fig. 18 con Figs. 10 y 11. Se interpreta que en el sobrenadante de sonicación, que contiene el citoplasma bacteriano y probablemente también componentes propios de la membrana que se desprenden de ella como producto de la sonicación (132 - 134) se encuentran mediadores redox que aceleran el transporte electrónico. Esto sería la causa de la existencia de velocidades tan altas en ausencia de PMS. En efecto, aunque también el procedimiento de ultracentrifugación (evitado en la preparación "cruda") provoca una pérdida parcial de la capacidad de fotofosforilación, no alcanza a explicar una diferencia tan grande. Como ejemplo de esto, comparando las Figs. 8 y 22 se puede ver que la velocidad inicial de la reacción se inhibe en un 25-35% luego de un lavado por ultracentrifugación.

Un indicio de que la inhibición observada con la membrana "cruda" a baja temperatura también podría estar relacionada con el contenido de alta energía, es que la reacción de fotofosforilación de esa preparación puede ser inhibida por preiluminación en ausencia de sustratos y de PMS a alta temperatura, en la Fig. 18 comparar las curvas B con A, o más estrictamente con C y, a su vez, en el caso de la membrana dializada se puede inferir un comportamiento muy similar (comparar B' con A'). En efecto, este último fenómeno, que es bien conocido cuando la preiluminación

se realiza en presencia de PMS(198,199,200,201,202,203), es explicado como causado por la energía transducida a partir de la luz que, mantenida en niveles proporcionalmente altos, no es disipada por el factor de acoplamiento en la fosforilación, dada la ausencia de sustratos. La preiluminación sin PMS no provoca inhibición (99).

Sin embargo, y en contraposición con lo que ocurre cuando se utilizan membranas purificadas en incubaciones con PMS, ambos tipos de inhibición observados con la membrana "cruda" pueden revertirse totalmente lavando la membrana (y tal vez lo deberían ser también con solo apagar la luz pues en la mezcla de incubación no hay ningún componente que se sospecha como causante de la irreversibilidad), tal como lo demuestra luego del lavado el análisis del curso de la reacción de fotofosforilación en presencia de PMS a temperatura alta y baja, Fig. 19.

Estos dos estados inhibidos no fueron estudiados en todos los detalles necesarios como para concluir que se tratan de fenómenos esencialmente iguales a los que ocurren con membranas purificadas y en presencia de PMS*. Sin embargo, aceptando a priori dicha identidad, se quiso saber si el papel del PMS en la irreversibilidad de la inhibición, cuando la preiluminación ocurre en su presencia, es "fijar" o "cristalizar" la forma inhibida del sistema. En este sentido se preiluminó la membrana "cruda" en ausencia de PMS y de sustratos. Inmediatamente luego de apagar la luz se agregó PMS, Fig. 19. Se observa que luego de lavar la preparación, no se presenta inhibición al medir la reacción a 30°C con PMS.

Una hipótesis posible es que habría dos niveles umbrales de energía involucrados en la inhibición que surge de la preiluminación en ausencia de sustratos.

El primero sería el necesario para conformar la inhibición del sistema. Este sería equivalente al que por lo menos se logra con la preparación "cruda" y que permite una velocidad de fotofosforilación a 30°C de alrededor de $4 \mu\text{mol ATP.mg Bchl}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

El segundo umbral, más alto, sería el necesario para otorgar irreversibilidad a la inhibición. Este se lograría usando, por ejemplo, PMS 50 μM y permitiría una velocidad de fotofosforilación a 30°C de alrededor de $12 \mu\text{mol ATP (mg Bchl.min)}^{-1}$, (Fig. 8).

Una hipótesis similar a esta podría plantearse para explicar la inhibición que surge a baja temperatura. Con membrana purificada y en ausencia de PMS no se observa inhibición en el curso de la reacción a baja temperatura, Fig. 10. Con la preparación "cruda" y sin PMS se observa inhibición pero es reversible, comparar Figs. 18 y 19, igual resultado se debería encontrar con algunas concentraciones de PMS relativamente menores que 50 μM (como ejemplo ver Fig. 10); esto no fue contrastado. Sólo con concentraciones de PMS suficientemente altas (50 μM) se lograría

(*) La inhibición observada en el curso de la reacción a baja temperatura con la preparación "cruda" no puede ser el resultado de una deficiencia relativa en la "captura" del $\text{ATP}_{32\text{P}}$ a distintas concentraciones del producto, pues a 30°C las curvas de tiempo son rectilíneas en un rango de concentraciones de ATP aún más amplio.

una inhibición irreversible.

Es de hacer notar que una membrana purificada que presenta una actividad de fotofosforilación a 3°C tan baja como la de D y D' (lo que se logra en condiciones estándar pero con algún tipo de desoptimización) no hubiera presentado el fenómeno de "quiebre". Sin embargo, en D y D' este fenómeno se observa claramente. Una posible explicación es que por tratarse de una preparación "cruda" se esté sobreestimando la concentración real de cromatóforos activos debido a la probable existencia de componentes pigmentados no capaces de sintetizar ATP y que sí contribuirían a la concentración de bacterioclorofila en la suspensión. Estos componentes serían totalmente eliminados en el paso de ultracentrifugación evitado en la preparación de membranas "crudas" *.

III.7 Irreversibilidad de la "inhibición por fotofosforilación a bajas temperaturas". Fenómeno "acumulativo".

De acuerdo con los resultados de los experimentos iniciales (Capítulo III.1, Fig. 8) se observa que la inhibición de la reacción lograda a 3°C es irreversible frente a un aumento de la temperatura a 30°C. Por otro lado, si dicho cambio se realiza antes del punto de "quiebre", no se observa modificación alguna de la velocidad respecto del control desarrollado enteramente a 30°C, tal como se podría predecir dado que la primera fase es rectilínea.

Se quiso saber si el comportamiento de "estabilidad de la forma inhibida" se mantenía luego de recuperar, por ultracentrifugación a través de un "colchón" de sacarosa, las membranas que catalizaron algunas de las reacciones mostradas en la Fig. 8.

Con dichas membranas se ensayó nuevamente la reacción de fotofosforilación catalizada por PMS a 3°C (Fig. 21) y a 30°C (Fig. 22), en las mismas condiciones estándar.

La membrana control (Mo) tiene respecto de la membrana original (Moo) descrita en "Materiales y Métodos", un pretratamiento en oscuridad y en hielo, y un paso de ultracentrifugación adicional para poder ser comparada con las demás membranas pretratadas. A 30°C, Mo muestra una velocidad de fotofosforilación que es aproximadamente un 25-35% menor que en Moo, tal vez como consecuencia de un desacople inespecífico producido por el proceso general de lavado. De cualquier manera, el patrón general del curso de la reacción en Mo es el mismo que en Moo, independientemente de la temperatura a la cual se la ensaya (3°C o 30°C), ver Figs. 8, 21 y 22. Este resultado era el esperado de acuerdo con los experimentos mostrados en la Fig. 3 (curva B y C) y en la Fig. 8 (curva I), donde se observa que un tratamiento en oscuridad a temperatura baja no produce ningún efecto.

(*) Por otro lado, muy probablemente la verdadera velocidad esté subestimada en un 20% debido a que se usó el método de Avron para evaluar ATP, ver II.11.

En cuanto al comportamiento de la reacción medida a 3°C de los diferentes tipos de membranas pretratadas y recuperadas (Fig. 21) se pueden hacer las siguientes observaciones.

Las membranas que fotofosforilaron a 3°C durante 20 seg (M3°C 20'') se comportan de manera idéntica al control (Mo). En cambio, la M3°C 10' muestra una fase inicial con una velocidad apreciablemente menor que la del control, lo que confirma la irreversibilidad de la inhibición aún frente al lavado de las membranas. Sin embargo, luego de 2 min durante los cuales estos cromatóforos recuperados fotofosforilan a velocidad constante, se observa de nuevo un "quiebre" en el curso de la reacción. Con tiempos mayores del mismo pretratamiento (M3°C 20' y M3°C 30') se observa que la inhibición se "satura" y que no aparece un nuevo "quiebre", manteniéndose la reacción lineal hasta por lo menos 4 min.

Las membranas que fotofosforilaron 2 min a 30°C (M30°C 2') no se muestran inhibidas, teniendo un comportamiento idéntico al del control (Mo). Esto era de esperar, pues la reacción llevada a cabo a 30°C no sufre ningún decaimiento de la velocidad a tiempos relativamente cortos (ca. 3 min), ver Fig. 8.

Por otro lado, las membranas inhibidas por preiluminación, durante un tiempo saturante (198-203), a 30°C en presencia de PMS y en ausencia de sustratos (M Preil 2') vuelven a inhibirse en el curso de la fotofosforilación a bajas temperaturas, aunque como era de esperar, ambas fases tienen una velocidad mucho menor que las respectivas del control (Mo). Esto sugiere que el fenómeno de inhibición por "baja temperatura" es diferente al de "preiluminación en presencia de PMS". Más adelante se presentan otras propiedades (Capítulo III.8) diferenciales para ambas inhibiciones.

Se puede deducir que el continuo, aunque suave decaimiento de la reacción a bajas temperaturas observable a largos tiempos (Fig. 3), no se puede justificar sólo por "inhibición por producto" (Fig. 5), pues sería reversible al reestablecer las condiciones iniciales. En efecto, el porcentaje de inhibición irreversible de la membrana pretratada se "satura" a tiempos del orden de 20-30 min, ver recuadro interno de la Fig. 21. Esto es coherente con los resultados mostrados para M3°C 10' en la que si bien la velocidad inicial está apreciablemente inhibida respecto del control Mo (tal como se podía pronosticar, con una velocidad igual que la que hubiese adoptado la segunda fase de la reacción de Mo luego de haber fotofosforilado 10 min), luego de 2 min puede inhibirse aún más, alcanzando una velocidad muy semejante a la que se observa en una M3°C 20' ó M3°C 30' (Fig. 21). También se puede observar en ese recuadro la presencia de un "lag" de por lo menos 1 min. Esto es coherente con el comportamiento rectilíneo de la primera fase de fotofosforilación a baja temperatura.

Los resultados de las reacciones medidas a 30°C en las mismas membranas pretratadas y recuperadas (Fig. 22), son totalmente concordantes con los mostrados en la Fig. 21. Sin embargo, la M30°C 2', presenta una pequeña inhibición del 10-20% que no es fácil de explicar, dado que en general no se observa ningún decaimiento de la velocidad inicial a 30°C en la membrana original (Moo), ver Fig. 8. En este punto cabe indicar que en algunas circunstancias se detectó que la reacción de fotofosforilación también sufre a 30°C una inhibición en el curso de la reacción (15 a 50%) luego de aproximadamente 1 min en casos en que transcurre con velocidad relativamente alta, ver por ejemplo las Figs. 11 y 12 d. Esta observación sugiere que el fenómeno descrito en este Capítulo pueda provocarse incluso a temperaturas altas, con sólo establecer condiciones energéticas del cromatóforo suficientemente altas.

En los recuadros internos de las Figs. 21 y 22 se propone con línea de puntos el nivel de inhibición irreversible frente al lavado por ultracentrifugación, en un período de tiempo en que falta información. A este efecto, por un lado se considera en la Fig. 21 el grado de inhibición que presenta para cada tiempo el curso de la reacción a 2,6°C respecto de la fase inicial (Fig. 8) y por otro lado, en la Fig. 22, el grado de inhibición de la reacción medida a 30°C luego de haber elevado bruscamente la temperatura de la reacción que transcurría desde su desencadenamiento a 2,6°C (Fig. 8).

Dicha información, expresada en ambas figuras en forma de triángulos vacíos, parece complementarse con la que surge al estudiar las membranas pretratadas por tiempos de 10, 20 y 30 min y recuperadas por ultracentrifugación.

Nótese que el grado de inhibición irreversible alcanzado a bajas temperaturas luego de 30 min es mayor que el alcanzado a altas. Por otro lado, obsérvese que el porcentaje de inhibición de las Vmax estimadas a 30°C para cada tipo de membranas en el Capítulo III.8 es coherente con el mostrado en la Fig. 22, ver Tablas 2 y 3.

Si el curso general del grado de inhibición irreversible por "lavado" fuese realmente el estimado en las Figs. 21 y 22 (triángulos vacíos) con la ayuda de la información no homóloga de la Fig. 8, se puede proponer que la inhibición del curso de la reacción a baja temperatura procede de manera bifásica. El modelo que se postula describe que un primer grado de inhibición, el más importante, se produce de manera abrupta luego de 1 min de reacción quedando dicha inhibición estabilizada hasta aproximadamente los 10 min, para luego aumentar lentamente. En apoyo a esta descripción, se puede observar un comportamiento similar en la Fig. 3. Cabe señalar que aún no considerando la información complementaria mencionada, el curso de la inhibición irreversible es "sigmoide", indicando un umbral en el tiempo. Por otro lado, el hecho de que la nueva inhibición que sufre en su curso

la reacción llevada a cabo a 3°C por $\text{M}3^{\circ}\text{C } 10'$ ocurra a tiempos mayores que lo que ocurre en la membrana control (M_0), sugiere de nuevo un comportamiento bifásico en la inhibición (Fig. 21).

Los resultados mostrados hasta ahora indican que la primera fase de fotofosforilación a baja temperatura es esencialmente rectilínea y por lo tanto implican que, durante ese lapso, no se está desarrollando ningún proceso de inhibición reflejable en la velocidad. En apoyo a esto, se debe considerar que la elevación de la temperatura a 30°C durante la primera fase muestra una reacción que se manifiesta como no inhibida (Fig. 8). También se debe tener en cuenta que membranas recuperadas por ultracentrifugación luego de fotofosforilar durante tiempos menores que aquél en el que se produce el "quiebre", presentan un comportamiento de fotofosforilación a 3°C y a 30°C en todo idéntico al del control (Fig. 21 y 22).

Entonces, se debe postular la existencia de algún proceso que justifique el tiempo necesario para que la inhibición se manifieste claramente. Así, se pueden proponer dos alternativas:

a) que dicho proceso pueda ser revertido si se interrumpe la provisión de energía. La dependencia de la energía (luz) ya fue demostrada en el Capítulo III.1. Por lo tanto, con sólo evitar que la reacción alcance un tiempo crítico (del orden de aquél en que se presenta el "quiebre"), se podrían reproducir un indefinido número de "fases iniciales" sin ningún cambio en sus respectivas velocidades ni en su tiempo de duración. Esto se lograría intercalando períodos de oscuridad suficientemente largos como para disipar el estado energizado de la membrana, al que se le asigna un papel importante en este fenómeno. El tiempo crítico sería aquél necesario para lograr un umbral de energía también crítico que induzca la inhibición.

b) que antes del punto de "quiebre", y cuando los cromatóforos están fotofosforilando bajo condiciones de velocidad "máxima" (primera fase) a baja temperatura, haya una acumulación de ciertos estados, no disipables por el colapso del estado energético de la membrana, que finalmente sean detectados como inhibición, recién luego de transcurrir un tiempo crítico (punto de "quiebre"). Si este fuera el caso, intercalando durante la primera fase períodos de oscuridad (para disipar el estado energizado) no sería posible reproducir indefinidamente sucesivos cursos de reacción con características de "primera fase".

Para discernir entre estas dos posibilidades se diseñó el experimento mostrado en la Fig. 23. De estos resultados se ve que las membranas que fotofosforilaron a baja temperatura en la primera fase durante diferentes períodos de tiempo, con el intercalado de un lapso de oscuridad de 2 min^* , siempre se inhibieron un 50%,

(*) El criterio adoptado acá respecto del colapso del estado de alta energía, es que, al apagar la luz, la síntesis de ATP se interrumpe instantáneamente (dentro de la escala de tiempo estudiada), ver Fig. 8. Por otro lado, 2 min es un lapso más que suficiente para colapsar el ΔpH inducido por la luz (por lo menos a 15°C), ver Fig. 50.

luego de 1 min neto de fotofosforilación incluyendo el primer y segundo período de reacción. Este resultado apoya la hipótesis b) y sugiere que los estados que se producirían durante la primera fase y que no se reflejan en la actividad de esta primera fase, no revierten a la condición inicial durante el período en que la membrana queda desenergizada en oscuridad a baja temperatura. Sin embargo, se debe mencionar nuevamente que si dentro del período que dura la primera fase se eleva la temperatura o se "lava" la membrana y se vuelve a ensayar la reacción no se manifiesta inhibición. De manera tal que se puede proponer que en la primera fase, los fenómenos que se desarrollarían son neutralizables a posteriori mediante una elevación de la temperatura o mediante incubaciones en oscuridad y frío pero por tiempos extensos (mayores que los 2 min probados en la Fig. 23), dado que el tratamiento de recuperación de las membranas previo al nuevo ensayo nunca fue menor de 4 horas.

Esto indica claramente que durante la primera fase se producen "fenómenos acumulativos" que conducen finalmente a una inhibición detectable.

Respecto de la irreversibilidad, es importante recordar que en ausencia de PMS, utilizando cromatóforos no purificados con los cuales se puede lograr una velocidad de fotofosforilación relativamente alta, se detecta un fenómeno de inhibición tal vez similar pero que es reversible luego de un lavado, ver Capítulo III.6.

Por lo tanto, con los experimentos mostrados hasta aquí, se podría postular que la irreversibilidad de la inhibición dependería de la presencia de PMS, aunque no se puede discernir si el PMS cumple sólo la función de aumentar el nivel de energía o si además tiene algún efecto directo sobre los fenómenos que conducen a la irreversibilidad.

Por último, cabe comentar acá que la propuesta de "sobreenergización", modelo que resulta coherente con buena parte de la información experimental presentada en este Capítulo, también fue presentada por Giersch (135) para explicar la estimulación de la fotofosforilación en tilacoides por bajas concentraciones de aminos desacoplantes. En dichos experimentos se observa una caída parcial en el $\Delta\bar{\mu}H^+$ y sin embargo la velocidad de síntesis, en vez de disminuir, se estimula. La interpretación del autor es que "... la velocidad de estado estacionario de la fotofosforilación depende tanto de la competencia energética y cinética de los cloroplastos ... y las aminos desacoplantes (NH_4Cl y metilamina) eliminan la limitación cinética de la fotofosforilación... Sin embargo, la estimulación sólo es posible cuando los cloroplastos están sobreenergizados, esto es cuando incluso un $\Delta\bar{\mu}H^+$ atenuado provee suficiente energía para permitir que la velocidad de síntesis proceda de manera inafectada o incluso aumente...".

III.8 Características cinéticas a 30°C de las reacciones de fotofosforilación mediada por PMS y de hidrólisis de ATP de las membranas que sufrieron pretratamientos de fotofosforilación a baja temperatura, y de preiluminación en presencia de PMS y ausencia de sustratos de fotofosforilación.

Con la hipótesis de que la inhibición de la actividad de fotofosforilación en estudio represente un "daño" o transformación del sistema transductor de energía a nivel del factor de acoplamiento, se quisieron estudiar las características aparentes de saturación para los sustratos de la reacción de síntesis y de hidrólisis de ATP desarrollada a 30°C en las membranas pretratadas por fotofosforilación a baja temperatura o "fotoinhibidas por PMS" (preiluminadas en presencia de PMS y ausencia de sustratos de fotofosforilación). Slooten y Branders (203) han demostrado que una parte de la inhibición por preiluminación en ausencia de sustrato (ver 1.4.2) es debida a un aumento de permeabilidad a los protones de la membrana. Por su parte Kerber (199) y Pucheu et al. (202) observaron en experimentos de reconstitución cruzada que la inhibición estaría a nivel de la membrana fotoinhibida en ausencia de sustrato y no a nivel del F₁.

III.8.1 Comportamiento aparente de la reacción de fotofosforilación respecto de Pi

En la Fig. 24 se muestran las representaciones de Lineweaver-Burk para Pi variante y ADP constante para la reacción de fotofosforilación a 30°C catalizada por PMS llevada a cabo por membranas pretratadas de diferentes maneras.

Tanto el pretratamiento de preiluminación en ausencia de sustratos (MPreil 4') como el de fotofosforilación a bajas temperaturas (M30°C 30') producen, tal como se esperaba, una inhibición de la V_{max} del 50% respecto de la membrana "control" (M₀), sin observarse cambios en el comportamiento general, que es "michaeliano", ni tampoco cambios importantes en el valor de la K_m aparente para Pi.

Por otro lado, las membranas que fotofosforilaron 3 min a 30°C (M30°C 3') muestran una pequeña inhibición de la V_{max} (14%).

Todos los resultados quedan resumidos en la Tabla 2.

III.8.2 Comportamiento aparente de la reacción de fotofosforilación respecto de ADP

En el caso de la determinación de los parámetros cinéticos para ADP a 30°C, las curvas de tiempo de la membrana "control" (Mo) muestran con cualquier concentración de ADP, un comportamiento bifásico. La reacción comienza con una velocidad inicial relativamente baja que se mantiene constante durante unos 10 seg y aumenta luego para dar una fase de alta velocidad que tiene una duración de por lo menos 2 min (no se muestra). Este comportamiento bifásico se detecta sólo cuando las membranas originales (Moo) sufren un lavado adicional, tal como es el caso de la membrana "control" (Mo), ver descripción del Método en la leyenda de la Fig. 22. En efecto, la preparación original (Moo) no muestra, en general, de manera tan acentuada, este tipo de actividad dependiente del tiempo. Sin embargo, tal como se indicó en III.2 esto depende de la preparación cromatofórica. Dicho comportamiento bifásico pudo ser detectado en el estudio para ADP, pero no para el de Pi, debido a que en el primer caso el curso de la reacción se midió desde tiempos más cortos, ver leyendas de las Figs. 24 y 25.

Se debe destacar que la Vmax de la membrana Mo está un 20% inhibida respecto de Moo. Otra evidencia de esto ya fue mostrada en la Fig. 22 y comentado en III.6 y III.7 en términos de una pérdida de la capacidad de fotofosforilación dada por el procedimiento de recuperación de las membranas Mo.

El hecho de que la fase inicial en las curvas de tiempo de la reacción catalizada por Mo a 30°C tenga valores de velocidad que representan un porcentaje (ca. 50%) de la velocidad de la fase de estado estacionario de dicha reacción, similar al que representa la fase inhibida que aparece luego del "quiebre" en la reacción a baja temperatura respecto de su correspondiente primera fase sugirió la posibilidad de que la fase inicial de Mo pudiera constituir una condición de fotofosforilación relacionada de alguna manera con la que surge del fenómeno de inhibición a baja temperatura. Otra alternativa es que esta fase inicial de velocidad baja pudiera reflejar el tiempo necesario para construir un $\Delta\bar{\mu}H^+$ suficientemente alto como para originar la fase de fotofosforilación de velocidad más alta (197). Según esta última hipótesis, esta fase aparecería preponderantemente en Mo y no en Moo pues aquella primera membrana estaría más "desacoplada" que esta última a causa de todo el pretratamiento y recuperación por ultracentrifugación.

Con esta idea se determinaron para la membrana Mo los parámetros cinéticos de ambas fases.

Para las dos fases de reacción catalizadas por Mo se encontró un comportamiento "michaeliano" y una K_m del mismo orden (Fig. 25 y Tabla 3) y así, la velocidad máxima de la primera fase es 51% menor que la de la segunda. En otras palabras, durante ese período de transición que media entre el desencadenamiento de la reacción y el establecimiento del estado estacionario, se manifiestan diferencias importantes sólo en los parámetros cinéticos que contribuyen a la V_{max} ("turnover" de la enzima) pero no en los que se relacionan con su comportamiento de saturación.

La Mo muestra características cinéticas similares a las de la fase de estado estacionario de Mo.

Además, se estudió el comportamiento de una membrana que fotofosforiló como pretratamiento durante 3 min a 30°C ($M_{30^\circ C} 3'$). En este caso, también se observa un comportamiento bifásico similar al encontrado para Mo, con características cinéticas también similares (Fig. 25 y Tabla 3). En efecto, esto corrobora que el pretratamiento por fotofosforilación a alta temperatura no induce cambios importantes, por lo menos en tiempos cortos (3 min) pero del orden de aquellos en los que sí se observa inhibición en el curso de una reacción a 3°C, comparar además con las Figs. 21, 22, 24 y Tabla 2.

En el caso de las membranas preiluminadas a 30°C durante 4 min en presencia de PMS 50 μM y en ausencia de ADP ($M_{Preil} 4'$) no se observó el comportamiento bifásico del curso de la reacción descrita arriba pero sí se presenta un "lag" de 5-10 seg. Comparando los datos cinéticos con los del control (Mo), se deduce que la inhibición queda reflejada sólo en la V_{max} , ver Fig. 25 y Tabla 3.

El resultado más interesante se encuentra con la membrana recuperada luego de haber fotofosforilado durante 30 min a 3°C ($M_{3^\circ C} 30'$). Tal como la $M_{Preil} 4'$, el curso de la reacción presenta un "lag" de 5-10 seg antes de entrar en el estado estacionario, pero presenta un comportamiento cinético totalmente diferente a todos los mostrados anteriormente. La curva de saturación muestra una clara sigmoidicidad, siendo sus parámetros $n = 2,67$ y $S_{0.5} = 14 \mu M$, ver Fig. 25 y Tabla 3. Por otro lado, tal como era de esperar, la V_{max} está inhibida un 50% respecto del control.

Las fases de estado estacionario de las membranas $M_{Preil} 4'$ y $M_{3^\circ C} 30'$, a altas concentraciones de sustratos, se mantiene con su velocidad constante durante por lo menos 2 min (cf. Fig. 21 y 22).

Sobre la base de la información obtenida, no se considera que las diferencias observadas en las K_m s aparentes para ADP (Tabla 3) sean significativas dado la dispersión que existe tanto entre las diferentes velocidades que constituyen un experimento como así también la que hay entre experimentos de un

ismo tipo.

Teniendo en cuenta las diferencias cinéticas entre la primera fase de la fotofosforilación de Mo y la del estado estacionario de $M3^{\circ}C$ 30' se descarta cualquier relación inmediata entre aquella primera fase y la condición inhibida que muestra $M3^{\circ}C$ 30', y se acepta como más probable la hipótesis que asigna a dicha fase una relación con el nivel de energía de la membrana.

Sobre la base de esto último se podría deducir que el comportamiento de saturación respecto de ADP no sería dependiente del nivel de energía de la membrana y la enzima detectaría el postulado aumento de $\Delta\bar{\mu}H^{\ddagger}$ manifestándose sólo un aumento en el "turnover".

Cabe comentar que a altas concentraciones de ADP (2 mM) se observa un fenómeno de inhibición por sustrato que presenta en todos los casos un nivel similar (20-35% respecto de la V_{max}). En la Fig. 25 dicha inhibición queda indicada como I 2 mM.

III.8.3. Comportamientos aparentes respecto de Pi y ADP de la reacción de fotofosforilación a $30^{\circ}C$ llevada a cabo en ausencia de mediadores redox exógenos y de la reacción catalizada por PMS pero parcialmente inhibida por un desacoplante (FCCP).

Como las características cinéticas diferenciales de las membranas $M3^{\circ}C$ 30' son coexistentes con una baja velocidad de fotofosforilación (dado que la actividad está inhibida irreversiblemente), se quiso saber si, en general, dichas características eran propiedades independientes de la velocidad máxima de fotofosforilación, por ejemplo independientes del nivel de energía de la membrana.

A tal efecto, se estudiaron las características aparentes de saturación respecto de ADP y de Pi para la reacción de fotofosforilación endógena (esto es, llevada a cabo en ausencia de mediadores redox exógenos) y para la reacción catalizada por PMS 50 μM pero en presencia de concentraciones de desacoplante que inhiben la reacción sólo parcialmente (30-60%).

La Fig. 26 muestra para ambas condiciones que el comportamiento cinético aparente para cada sustrato de fosforilación es "michaeliano", tal como los de las membranas control Moo y Mo, comparar con las Figs. 24 y 25 y ver Tablas 2 y 3. Sólo se observa un aumento de la K_m aparente para ADP en el caso de la reacción endógena de Moo y en el de la de Mo mediada por PMS parcialmente desacoplada. Sin embargo, la falta de suficiente información impide evaluar si las diferencias son significativas.

Una diferencia observada es la presencia de un "lag" de 10 a 20 seg para todas las concentraciones de ADP y Pi probadas en las reacciones desacopladas

con FCCP, pero no en las reacciones que transcurren en ausencia de mediadores redox. Esto último es llamativo pues la reacción endógena muestra una velocidad de reacción menor aún que la mediada por PMS y parcialmente desacoplada. De manera tal que es complicado interpretar por qué, con un nivel de energía menor, la reacción endógena entra en estado estacionario muchísimo antes que la mediada por PMS y desacoplada. En términos quimiosmóticos clásicos habría que esperar un "lag" o primera fase de reacción inversamente proporcional a la velocidad de estado estacionario. Véase una discusión sobre esto en el Capítulo IV.5.

Cabe comentar otra diferencia, esto es el grado de inhibición por sustrato. En efecto, tanto en el caso de la reacción endógena de Moo como en el de la Mo mediada por PMS 50 μM y al mismo tiempo desacoplada un 50% por FCCP 3 μM , se observa una inhibición 2 veces mayor que la que muestra cualquiera de los tipos de membranas estudiadas en la Fig. 25 en condiciones de relativamente alta energización (en presencia de PMS 50 μM). Los experimentos de la Fig. 41 corroboran la observación para Moo, incluso a diferentes temperaturas.

También es de recalcar la inhibición por sustrato (P_i) que se observa como único caso en la reacción endógena de Moo (comparar Figs. 24 y 26).

Se concluye que no hay cambios drásticos en las características cinéticas aparentes generales (comportamiento "michaeliano") en las diferentes condiciones energéticas. De manera tal que la sigmoidicidad observada en la membrana M3°C 30' que fotofosforila a baja velocidad es una característica intrínseca y no estaría dada por una baja energización o por una baja velocidad de "turnover". De manera concordante, se debe tener en cuenta que la membrana MPreil 4' tiene un mismo grado de inhibición que la M3°C 30' y sin embargo su comportamiento es "michaeliano" (Fig. 25).

Para contrastar si la velocidad de la ATP sintetasa está controlada de alguna manera por el $\Delta\bar{\mu}H^+$ a través de una variación de la K_m para ADP, otros autores han estudiado el efecto de desacoplantes en bacterias y partículas submitocondriales (137,138). Encontraron que, en efecto, con un desacople parcial la K_m aumenta pero, aún ejerciendo un grado similar de inhibición (70%), el dinitrofenol provoca un aumento de la K_m de 10 veces mientras que con FCCP la K_m sólo se duplica. Se concluye (137) que los cambios drásticos de la K_m provocados por el dinitrofenol probablemente se deban a una acción directa sobre el F1 tal como fue mostrado en (139) y que los cambios determinados eventualmente por la disminución del $\Delta\bar{\mu}H^+$ son, a lo sumo, pequeños.

III.8.4 Comportamiento aparente respecto de ATP/Mg de la reacción de hidrólisis de ATP

Para estudiar adecuadamente la reacción de hidrólisis de ATP inducida por un desacoplante en las membranas que sufrieron el proceso de "inhibición de la fotofosforilación por fotofosforilación a baja temperatura" respecto de las membranas control, se "tituló" la concentración óptima de FCCP para estimular la máxima actividad. Dicho experimento se hizo a varias concentraciones de ATP/Mg para poder estudiar las características de saturación de la reacción inducida por desacoplante.

En la Fig. 27 se observa que la concentración óptima de FCCP es algo menor para las membranas M3°C 30' respecto de las Mo (por ej. 0,6 μ M vs. 0,8 μ M para una concentración de ATP/Mg = 2 mM). Se muestra, además, el comportamiento de la membrana original (Moo). En general, en todos los casos, cuanto menor es la concentración de ATP/Mg, menor es también la concentración óptima de FCCP. Nótese además que la concentración óptima de FCCP para la membrana control (Mo) es menor que para la membrana original Moo. También es algo menor la actividad constitutiva. Estas últimas diferencias se interpretan como debidas a una pérdida de factores de acoplamiento y aumento de la permeabilidad a protones provocados por el pretratamiento (fundamentalmente ultracentrifugación).

Se observa que, usando concentraciones altas de ATP/Mg, la actividad constitutiva de la M3°C 30' no está inhibida respecto de la Mo (control). Sin embargo la actividad inducida por FCCP está parcialmente inhibida (33%) en aquellas mismas condiciones.

En la Fig. 28 se estudian los comportamientos de saturación de los tres tipos de membranas, Moo, Mo y M3°C 30'.

Mientras que Moo y Mo presentan un comportamiento "michaeliano" tanto para la reacción constitutiva como para la inducida por concentraciones óptimas de desacoplante, la membrana M3°C 30' muestra una curva de saturación ligeramente sigmoide para ambos tipos de reacción.

De manera paralela a lo que muestra la Fig. 27, la Vmax de la actividad constitutiva de la M3°C 30' no está inhibida, pero sí lo está la de la reacción inducida por desacoplante.

Dado que la Vmax de la actividad constitutiva de la membrana tratada y la de la control son iguales y, en cambio, las Vmaxs de las reacciones inducidas por concentraciones óptimas de desacoplante no lo sean (de hecho la actividad de M3°C 30' está inhibida un 30%), se puede proponer que el fenómeno que conduce a la inhibición (por lo menos de la ATPasa inducible por FCCP) no involucra un fenómeno de desacople. Esto es así pues, si hubiese algún grado de desacople,

al estar disminuida la retropresión de H^+ , la actividad constitutiva debería estar estimulada respecto de la del control y la inducida por concentraciones óptimas de desacoplante debería tener el mismo valor que la correspondiente al control pero a concentraciones de desacoplante menores, ver Introducción 1.4.1.

Por su parte, el proceso de "fotoinhibición de la fotofosforilación por PMS" también provoca la inhibición de la actividad en oscuridad de hidrólisis de ATP, inducida por desacoplante, por parte de los cromatóforos. La actividad constitutiva no es inhibida, de manera similar a lo mencionado para $M3^{\circ}C$ 30'. En la Fig. 29 se observa que la actividad constitutiva de MPreil 4' es prácticamente igual que la del control preincubado en oscuridad (Mo). La actividad inducida por desacoplante está inhibida un 30%. Slooten y Sybesma (198) y Slooten y Branders (203) presentaron resultados similares a estos, aunque señalan que la actividad inducida muestra un grado de inhibición mayor (50-80%). De nuevo, tal como se discutió para el caso de $M3^{\circ}C$ 30', los hechos de que la actividad constitutiva no esté estimulada, que la concentración de FCCP que induce la máxima actividad no esté desplazada hacia valores menores que los del control sin preiluminar y que la actividad inducida no alcance valores iguales que la del mencionado control, sugieren que el fenómeno de fotoinhibición no involucra un desacoplamiento funcional de la membrana. Este resultado es parcialmente contradictorio con el presentado por Slooten y Sybesma (198) en el que la concentración de desacoplante que induce la máxima actividad en la membrana preiluminada en ausencia de sustratos de fotofosforilación, es menor que la respectiva del control. Sin embargo, dichos autores usan CCCP como desacoplante y su experimento tiene un poder de resolución mucho menor.

III.8.5 Discusión

Se puede plantear la siguiente crítica al planeamiento experimental. Para estudiar las propiedades cinéticas de los cromatóforos que han sufrido una inhibición al fotofosforilar a bajas temperaturas, se usaron membranas pretratadas en dichas condiciones durante 30 min dado que el grado de inhibición irreversible se satura con tiempos de ese orden, ver Figs. 21 y 22. Sin embargo esto presenta un inconveniente que podría llegar a ser serio, pues a los 30 min de fotofosforilación a altas intensidades de luz (aunque no a bajas) el curso de la reacción está sustancialmente inhibido (Figs. 3 y 14), de tal manera que se establecen condiciones de alta energización pero baja disipación de energía debido a la muy baja velocidad de síntesis de ATP, de manera que aún en presencia

de sustratos de fotofosforilación teóricamente podrían establecerse las condiciones que dan lugar al conocido fenómeno de "fotoinhibición de la fotofosforilación por preiluminación en presencia de PMS". Se podría proponer que al fenómeno de "inhibición por fotofosforilación a baja temperatura" se le puede sumar el de "inhibición por preiluminación en ausencia de sustratos". Tal vez, la segunda parte del comportamiento bifásico de la inhibición irreversible se deba a esto (Figs.21 y 22).

Cabe indicar que a baja temperatura (3°C) las membranas también se fotoinhiben (50-80%) al ser preiluminadas en presencia de PMS 50 µM y en ausencia de ADP, incluso irreversiblemente respecto de la medición posterior a 30°C (aunque no está demostrado si lo es también frente a un lavado por ultracentrifugación), pero el tiempo en que se logra el 50% de la máxima inhibición es 6 veces mayor que el necesario a 30°C (no se muestra), cf. (199).

Sin embargo, el hecho de que el comportamiento cinético de las membranas MPreil 4' sea diferente del de las M3°C 30' en lo que se refiere a la reacción de fotofosforilación mediada por PMS, sugiere que ambos tipos de inhibición surgen a través de mecanismos también diferentes (Fig. 25 y Tabla 3). Pero, para considerar esto último se debe tener en cuenta que, aunque el nivel de inhibición por preiluminación en ausencia de sustratos queda saturado totalmente desde 1 min hasta 5 min (máximo tiempo estudiado) (198,199), los tiempos de pretratamiento de las membranas MPreil 4' y M3°C 30' son muy diferentes y no se sabe que efectos pudiera provocar una preiluminación en ausencia de sustratos durante períodos de tiempo mucho mayores (20-30 min).

Un control más apropiado para comparar el comportamiento de la membrana que fotofosforiló a 3°C durante 30 min hubiese sido una membrana que sufrió un tratamiento de fotofosforilación también durante 30 min pero a 30°C. En efecto, la hipótesis inicial de trabajo es que el fenómeno ocurre a baja temperatura pero no a alta. Lamentablemente, no se tienen dichas evidencias en esta Tesis. Por un lado se sabe que hasta unos 3-4 min se mantiene la velocidad constante a 30°C (Fig. 8) y Slooten y Sybesma (198) han mostrado que la reacción se puede mantener constante durante 10 min con el agregado periódico de Pi durante la reacción y también que luego de recuperar por ultracentrifugación las membranas que fotofosforilaron durante 10 min, dichas membranas no muestran inhibición. Sin embargo, habría que reponer los sustratos durante la reacción para mantener la alta velocidad de disipación de energía.

Cabe indicar que en algunos experimentos de esta Tesis se ha detectado una leve inhibición irreversible durante la fotofosforilación mediada por PMS a 30°C (10-20%), ver Figs. 22 y 24.

Esto sugeriría, tal como se adelantó en el Capítulo 11.7, que la inhibición observada a baja temperatura también podría ocurrir a 30°C con tal de establecerse condiciones energéticas suficientemente altas, ver además Figs. 11, 12 d y 22.

Por otro lado, un valioso experimento que podría aportar evidencias consistiría en pretratar las membranas en iguales condiciones que M3°C 30', pero en presencia de concentraciones altas de desacoplante, totalmente inhibitorias para la fotofosforilación pero estimulantes del transporte de electrones y, por otro lado, en presencia de aquellas concentraciones bajas que prolongan la primera fase (Figs. 15 y 16). Luego de recuperar dichos cromatóforos por ultracentrifugación se debería encontrar un comportamiento similar al control, si es que el contenido de energía de la membrana es el que provoca la inhibición, experimentos de este tipo fueron desarrollados para el estudio de la "fotoinhibición por PMS" pero en preincubaciones cortas (3-5 min), encontrándose una total protección (198,199).

Los controles adecuados consistirían por un lado en membranas preincubadas en condiciones estándar en oscuridad pero con desacoplante y por otro, a las membranas que son pretratadas en luz en ausencia de desacoplante (M3°C 30'), se les debería agregar desacoplante luego de haber interrumpido la reacción con oscuridad y antes de recuperar los cromatóforos por ultracentrifugación. Esto es para descartar un eventual efecto de la presencia remanente del desacoplante luego del lavado.

Si bien se usó un protocolo estándar y no se establecieron las condiciones óptimas de reacción para el estudio de las propiedades cinéticas de los distintos "tipos" de membranas se propone que las diferencias observadas son, al menos, cualitativamente válidas.

Con la información reunida hasta acá es difícil la interpretación de la sigmoidicidad observada en la fotofosforilación mostrada por M3°C 30'.

En efecto, los cambios en las características cinéticas (comportamiento general de saturación, V_{max} y "afinidad" por los sustratos) de la etapa terminal en la secuencia de reacciones acopladas en la transducción energética (síntesis de ATP), no necesariamente deben reflejar cambios intrínsecos del sistema a dicho nivel. El caso teórico de un cambio en la V_{max} es el más común, pues puede reflejar simplemente cambios en el transporte de electrones o en la conservación de la energía.

En el caso de los parámetros que cuantifican la saturación por los sustratos, sería la interpretación inmediata un cambio directo a nivel de los

acontecimientos del ciclo catalítico de la enzima. Sin embargo, se discuten más abajo otras alternativas.

Aún en el caso en que la sigmoidicidad reflejase sólo acontecimientos a nivel del factor de acoplamiento, la interpretación no es fácil pues pueden haber varias causas que lo produzcan, incluso artificios (83).

Se sabe que en el caso de los cloroplastos los nucleótidos ADP y ATP inducen (en ausencia de condiciones completas de fotofosforilación) un pequeño aumento del nivel de $\Delta\bar{u}H^+$ inducido por el transporte electrónico fotosintético. Esto es interpretado en términos de un aumento de la impermeabilidad a los protones de la membrana a nivel del factor de acoplamiento (dado que aquél es una vía natural de disipación en la síntesis de ATP). Los nucleótidos inducirían algún cambio estructural de manera de restringir aún más el escape inespecífico de H^+ (140-144).

En este sentido, se puede proponer que la inhibición que se produce durante la fotofosforilación a bajas temperaturas podría representar algún tipo de desacople causado por un aumento de la permeabilidad a los protones a nivel del factor de acoplamiento. Esto podría estar relacionado con la sigmoidicidad que muestra la saturación de ADP de la membrana $M3^{\circ}C$ 30'. En efecto, a baja concentración de ADP el factor de acoplamiento sería, anormalmente, una válvula (parcialmente?) abierta a los protones ("leaky") y entonces se disiparía el estado de alta energía intermediario en la síntesis de ATP. Sólo a más alta concentración de ADP se subsanaría el "defecto" estructural. De cualquier manera habría entonces, un grado (50%) de inhibición (también desacople?) no remediable por medio de los nucleótidos.

En concordancia con esto, se podría interpretar el "lag" que antecede la fase de estado estacionario en las membranas $M3^{\circ}C$ 30' y $MPreil$ 4' (cf. Tabla 3). En efecto, dicho "lag" podría reflejar el tiempo que se tarda en lograr un umbral energético suficientemente alto como para que la reacción proceda*. Esto sería un fenómeno del orden del señalado para M_0 y $M30^{\circ}C$ 3', en los que estaría atenuado y, en vez de aparecer un "lag", se observa una fase de menor velocidad.

Sin embargo, la discusión que se presenta en esta Tesis (III.8.4) respecto de la reacción inversa (ATP hidrolasa), propone que no habría un desacople "clásico" de la membrana provocado por el pretratamiento de fotofosforilación a baja temperatura. En apoyo a esto y en contraposición con lo discutido para la reacción de fotofosforilación, y ya que la reacción de hidrólisis es en efecto inducible por un desacoplante (Figs. 27 y 28), no se podría asignar a la sigmoidicidad de la reacción de hidrólisis constitutiva ser el reflejo de un desacople corregible por el "binding" de nucleótidos (ATP/Mg). En efecto, si existiese tal desacople, la representación de inversas debería ser cóncava hacia abajo indicando una activación de la reacción a bajas concentraciones de sustrato. Los resultados son

(*) Sin embargo, nótese que $MPreil$ 4' no tiene una saturación sigmoide para ADP.

diametralmente opuestos a ese pronóstico.

Con el mismo tipo de argumento, la reacción inducida por concentraciones óptimas de desacoplante (FCCP) no puede poner en evidencia ninguna inhibición determinada por otro tipo de desacople de características delocalizadas y por lo tanto su sigmoideidad respecto de ATP/Mg no puede ser explicada en aquellos términos.

De cualquier manera, aún se podría mantener la hipótesis mencionada para la fotofosforilación si se postulara que los mecanismos de acople entre el factor de acoplamiento y el intermediario de alta energía procedieran a través de pasos no exactamente equivalentes en la reacción de síntesis y de hidrólisis de ATP.

Queda por explicar por qué tanto en el caso de la membrana M3°C 30' como el de la MPreil 4', estando sus respectivas reacciones de fotofosforilación inhibidas, no lo están las reacciones constitutivas de hidrólisis de ATP pero sí, en cambio, las inducidas por FCCP.

Slooten y Branders han demostrado que en el caso de MPreil el transporte electrónico no está inhibido y, aunque la membrana queda parcialmente permeable a los protones, no se puede explicar con ese argumento la mayoría de la inhibición (203).

Se podría proponer que los hipotéticos cambios conformacionales que darían origen a la inhibición de la fotofosforilación en ambos casos (M3°C 30' y MPreil), aún cuando pudiesen ser no homólogos, sólo se manifestarían inhibiendo la reacción inversa (ATPasa) cuando el contenido de energía de la membrana no es alto (esto es cuando la reacción de hidrólisis transcurre en presencia de un desacoplante, ver Fig. 50).

En este Capítulo (III.6) se ha mostrado que el proceso de "inhibición por fotofosforilación a baja temperatura" y el de "fotoinhibición en ausencia de sustratos" también ocurrirían en ausencia de mediadores redox exógenos (p.ej. PMS) cuando se usa una preparación "cruda" de membranas, conteniendo todos los componentes citoplasmáticos o sólo los no dializables. Sin embargo, ambos fenómenos son reversibles tal como lo demuestra la actividad mediada por PMS a 30°C luego de haber "lavado" las membranas pretratadas.

Muy probablemente, la irreversibilidad sería provocada por la presencia de PMS durante la reacción, a través de algún mecanismo desconocido o más probablemente, tal como se discutió en III.3 y III.6, dicha irreversibilidad surgiría solo cuando se supera algún umbral energético, logrado, por ejemplo, estimulando el transporte de electrones con PMS.

También se puede deducir que el efecto de la fotofosforilación a baja temperatura no involucra directamente un mecanismo de inhibición irreversible del factor de acoplamiento.

Esta capacidad para revertir a las condiciones "normales" sugiere la

posibilidad de que el efecto de la baja temperatura resulte en la acumulación preferencial de una forma estructural del complejo factor de acoplamiento, involucrada en el proceso de transducción de energía.

Entonces, si las nuevas propiedades cinéticas (sigmoidicidad) de las reacciones de síntesis y de hidrólisis reflejasen realmente una forma diferente del factor de acoplamiento producida durante el proceso de fotofosforilación a baja temperatura, surge la dificultad de definir cual sería la función de aquella forma estructural.

La dependencia de la velocidad de síntesis y de hidrólisis de ATP respecto de los sustratos en cloroplastos ha sido estudiada por diversos autores (cf. 145). En todos los casos publicados se encontró para los tres sustratos un comportamiento de saturación hiperbólico simple. Los productos de tanto la reacción de síntesis (ATP) como los de hidrólisis (ADP y Pi) ejercen una acción inhibitoria de tipo competitivo. De este tipo de estudios surgen las siguientes conclusiones.

- 1) Las Kms aparentes para la reacción directa varían, según las condiciones de reacción usadas por los diversos autores, entre 25-60 μM para ADP y 200-600 μM para Pi. Mientras que la correspondiente a la reacción de hidrólisis oscila entre 5 y 500 μM .
- 2) Los sustratos existen en diferentes estados de protonización, los que a su vez se acomplejan con Mg^{2+} y eventualmente con otros iones. Dado que no se conoce exactamente qué especies de ADP, ATP y Pi se unen realmente al factor de acoplamiento, sus concentraciones experimentales pueden no ser idénticas a las concentraciones de las especies "activas", las cuales dependen del pH y de la concentración de Mg^{2+} provocando, entonces, las variaciones aparentes de las Kms.
- 3) Las Kms aparentes pueden depender del nivel de energía de la membrana, esto es de la V_{max} medida en las condiciones experimentales (137,138).
- 4) Los valores de Km pueden ser diferentes para las ATPasas modificadas y las no modificadas.
- 5) No se conocen el orden secuencial de "binding" de los sustratos.

En R. rubrum, en ausencia de Pi, la Km para ATP es alrededor de 0,2 mM (146), en concordancia con los resultados de esta Tesis. En cambio, con Pi 0,5 mM, la Km se transforma en 5 μM y la actividad de ATPasa es estimulable con luz de una manera en la que la V_{max} no cambia pero si lo hace la Km que disminuye a 1 μM (147).

El comportamiento sigmoide para ADP mostrado por la membrana a 3°C 30' revela la posibilidad de arreglos estructurales y el valor de n_H indica la posible participación de hasta tres moléculas de ADP en un fenómeno de cooperación positiva.

Cabe recordar que los cambios estructurales que se conoce ocurren durante la operación del ciclo catalítico de fotofosforilación pueden ser explicados tanto por la hipótesis del "mecanismo quimiosmótico indirecto" como también por el mecanismo de Boyer de estados conformacionales energizados ligados directamente al transporte de electrones, ver Introducción 1.2.

Están bien documentados los cambios conformacionales, producidos por iluminación en las subunidades α , β y γ del complejo F_1 (148-152).

Ryrie y Jagendorf (32,33) han mostrado que la energización de la membrana del cloroplasto expone sitios adicionales para el intercambio de ^3H en el factor de acoplamiento. El fenómeno es sensible a desacoplantes. Otros experimentos, usando reactivos específicos para grupos, también indican modificaciones estructurales del factor de acoplamiento (148, 150-153).

Por otro lado se han descrito fenómenos de cooperatividad entre subunidades diferentes y similares del F_1 .

La modificación de 1 residuo de tirosina en una subunidad β del factor F_1 de mitocondrias causa una inhibición completa de la síntesis de ATP. Como la enzima tiene 2 o 3 copias de dicha subunidad se concluye que el F_1 muestra una asimetría inducida por el ligando (154,155).

Ebel y Lardy (156) proponen una cooperatividad negativa entre las subunidades catalíticas en F_1 de mitocondrias. Adolfsen y Moundriakis (157) concluyen que en el F_1 de Alcaligenes faecalis el "binding" de nucleótidos en un sitio de la enzima promueve, alostéricamente la disociación de nucleótidos en otro sitio. Otras evidencias del grupo de Boyer indican que el "binding" de ADP y P_i promueve la liberación de ATP durante la síntesis y el "binding" de ATP promueve la liberación de ADP y P_i durante la hidrólisis (158-160).

Los resultados presentados acá podrían por un lado, proveer evidencia de una capacidad del factor de acoplamiento para ser regulado y por otro mostrar la capacidad de "histéresis" de la enzima. Estas propiedades podrían participar en el control de las actividades de síntesis e hidrólisis de ATP.

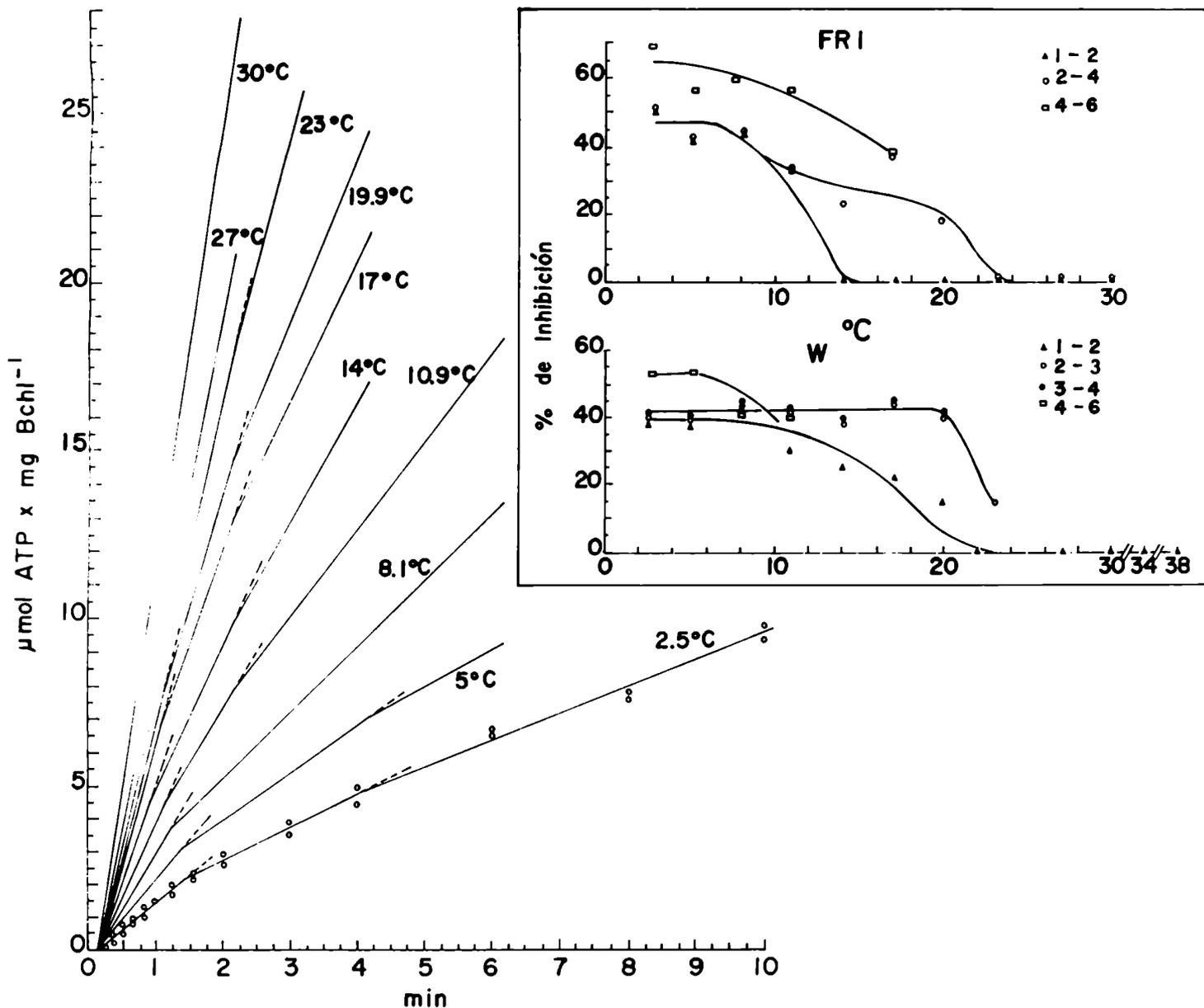


Figura 2

Curvas de tiempo de la fotosfosforilación, mediada por PMS 50 μM , a diferentes temperaturas en cromatóforos de *R. rubrum* W.

A todas las temperaturas se usa buffer Tricina-NaOH ajustado a pH = 8,0 a 20°C. La dispersión experimental de cada curva es del mismo orden que la mostrada para 2,5°C. Las curvas de tiempo se poligonizan para su análisis. Cada intervalo es prácticamente rectilíneo.

En el recuadro interno se muestra, en función de la temperatura, el grado de inhibición de la reacción respecto de la velocidad inicial, para varios intervalos de la curva de tiempo. FRI y W son las dos cepas "wild type" estudiadas. Los números que caracterizan cada símbolo indican los minutos entre los que está comprendido el intervalo. Obsérvese la presencia de un "lag" que es independiente de la temperatura.

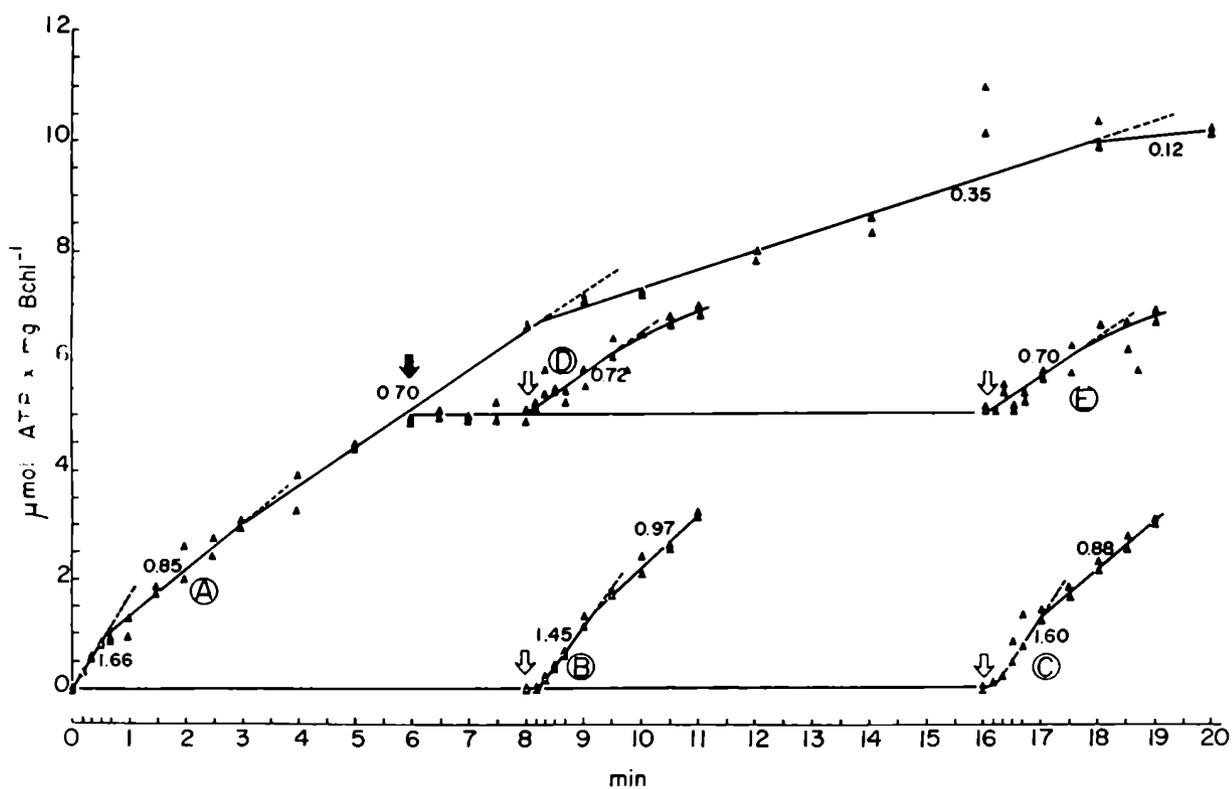


Figura 3

Efecto de tratamientos de oscuridad sobre la primera y segunda fases de la fotosfosforilación a temperatura baja (2,6°C).

A- La reacción se desencadena con cromatóforos estando la luz prendida previamente.

B y C- Los cromatóforos se agregan a la mezcla de reacción a tiempo cero y en oscuridad. Luego de 8 y 16 min respectivamente se desencadena la reacción prendiendo la luz.

D y E- Como A, pero la reacción se detiene a los 6 min apagando la luz. Luego de 2 y 10 min respectivamente, se reinicia la fotosfosforilación prendiendo nuevamente la luz.

Flecha negra: se apaga la luz; flecha blanca: se prende la luz. Las velocidades se expresan en $\mu\text{mol ATP} \cdot \text{mg Bchl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

La curva A se poligoniza para su análisis.

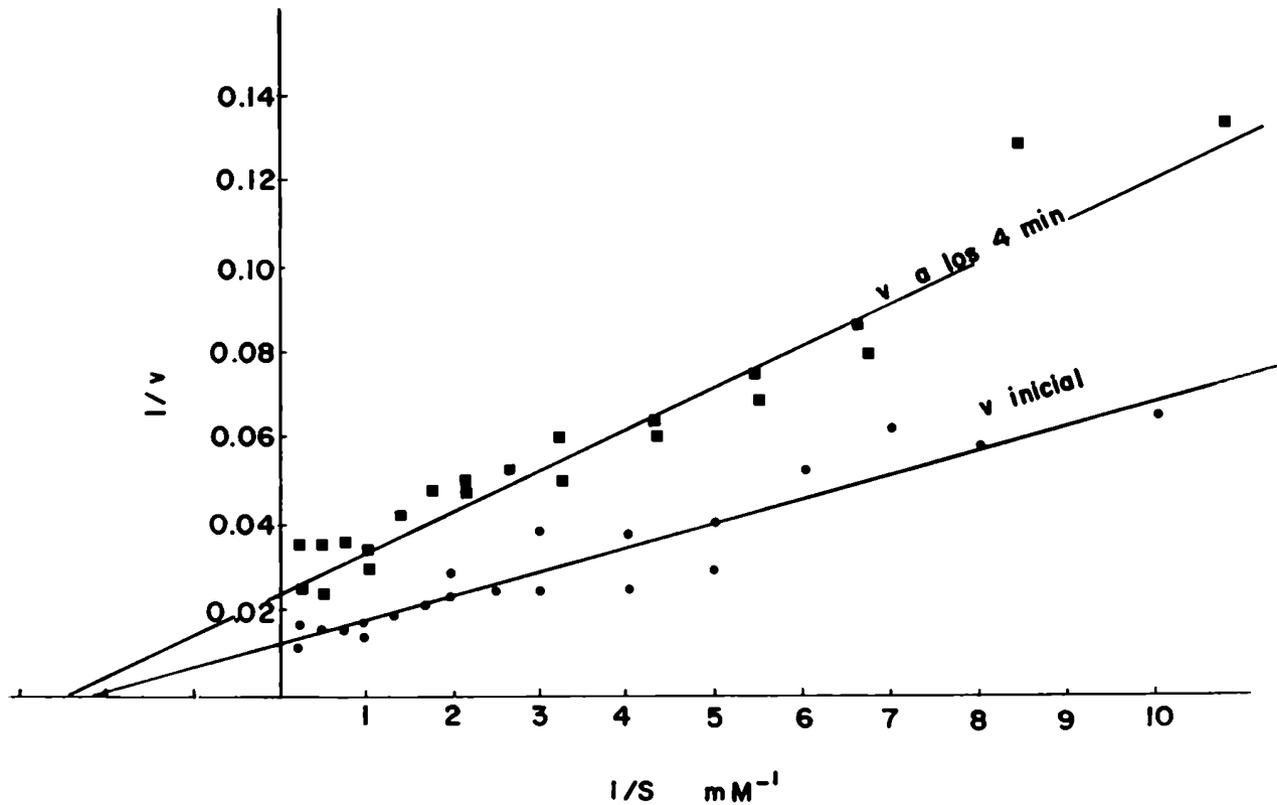


Figura 4

Representaciones de Lineweaver-Burk de la reacción de fotofosforilación a 2,5°C a Pi variable y ADP = 2,11 mM constante.

La representación se hace para 2 zonas de la curva de tiempo. En el caso de la velocidad inicial (primera fase) se estima una $V_{max} = 1,37 \mu\text{mol ATP.mg Bchl}^{-1}.\text{min}^{-1}$ y una K_m aparente = 0,46 mM. La velocidad de la actividad inhibida (segunda fase) fue calculada sobre la curva de tiempo entre el min 4° y el min 6° y la concentración real de Pi fue estimada mediante corrección en base al nivel de producto acumulado en el min 4°. En este caso, la $V_{max} = 0,68 \mu\text{mol ATP.mg Bchl}^{-1}.\text{min}^{-1}$ y la K_m aparente = 0,41 mM. El eje "y" tiene unidades de $\mu\text{mol ATP}^{-1}.\text{mg Bchl}.\text{hr}$.

Se presenta la información proveniente de dos experimentos distintos. Los tiempos de reacción son 0-10-20-30-40-60-90 seg -2-4-5-6-8 min. Independientemente de la concentración de Pi, el grado de inhibición de la 2da. fase respecto de la 1a. oscila entre 45 y 65%. Sin embargo, el tiempo de duración de la primera fase (y por lo tanto el momento en que ocurre el "quiebre") aumenta al aumentar la concentración de Pi. Así, es 40 seg para la menor concentración (100 μM) y aumenta paulatinamente hasta 3 min para 4 mM Pi.

(ADP) mM inicial	(a) velocidad primera fase	(ADP) mM en el min 4°	(b) velocidad segunda fase	% Inhib. b/a	El "quiebre" aparece en el min
0,176	2,05	0,132	0,55	73	2' 00"
0,211	2,00	0,173	0,65	68	1' 20"
0,247	1,65	0,207	0,55	67	1' 30"
0,350	1,55	0,309	0,75	52	1' 30"
0,530	1,50	0,494	0,55	63	1' 30"
1,050	1,30	1,012	0,68	48	1' 40"
2,110	1,45	1,960	0,68	53	0' 50"
3,880	1,55	3,846	0,58	63	1' 10"

Tabla 1

Velocidades iniciales (primera fase) y de la segunda fase (calculada entre el min 4° y 6°) de la fotofosforilación a 2,5°C a concentración de ADP variable y Pi 2 mM cte.

En el caso de las velocidades de la actividad de la segunda fase, la concentración real de ADP fue estimada mediante corrección por el nivel de producto acumulado en el min 4. Se indica, también, en que momento ocurre el "quiebre" para cada caso. Por falta de información a concentraciones de ADP menores que las estudiadas acá no se puede calcular la Km aparente, sin embargo, nótese que se observa inhibición por sustrato para la primera fase y que el "quiebre" aparece antes cuanto mayor es la concentración de ADP (véase pág. 60). Los experimentos de la Fig. 41 apoyan la información presentada acá y confirman que la inhibición del curso de la reacción ("quiebre") no se debe a una desaturación de ADP.

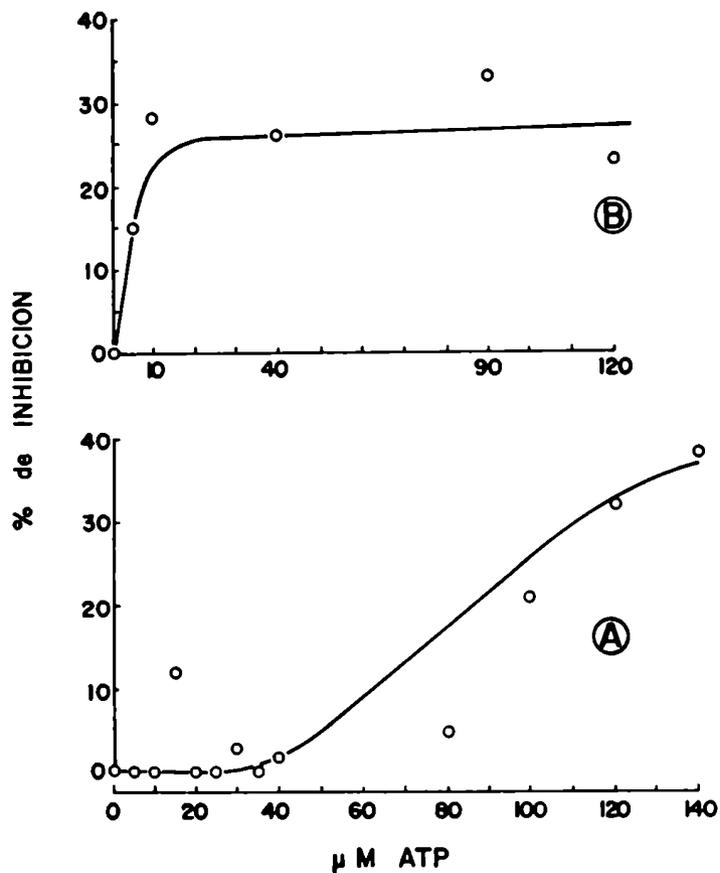


Figura 5

Efecto de distintos niveles de producto (ATP) sobre la velocidad de la primera y segunda fases de la fotofosforilación a temperatura baja (3°C).

A- Primera fase. Los tiempos de reacción son 10-20-30-40 seg. Las muestras se toman por duplicado. El curso de la reacción es en todos los casos rectilíneo. Velocidad control (0 μM ATP) = 1,49 μmol ATP.mg Bchl⁻¹.min⁻¹.

B- Segunda fase. Igual preparación experimental que en la Fig. 3. Se deja transcurrir la reacción de fotofosforilación 4 min. En ese momento se agregan concentraciones variables de ATP y se comienza el registro de la reacción. Las muestras, a partir de los 4 min, se toman (por duplicado) a los tiempos = 0-15-30-60-90-120 seg. El curso de la reacción es en todos los casos rectilíneo. Concentración de ATP ya presente a los 4 min = 35 μM. Velocidad de la segunda fase a 0 μM exógeno (control) = 0,69 μmol ATP.mg Bchl⁻¹.min⁻¹.

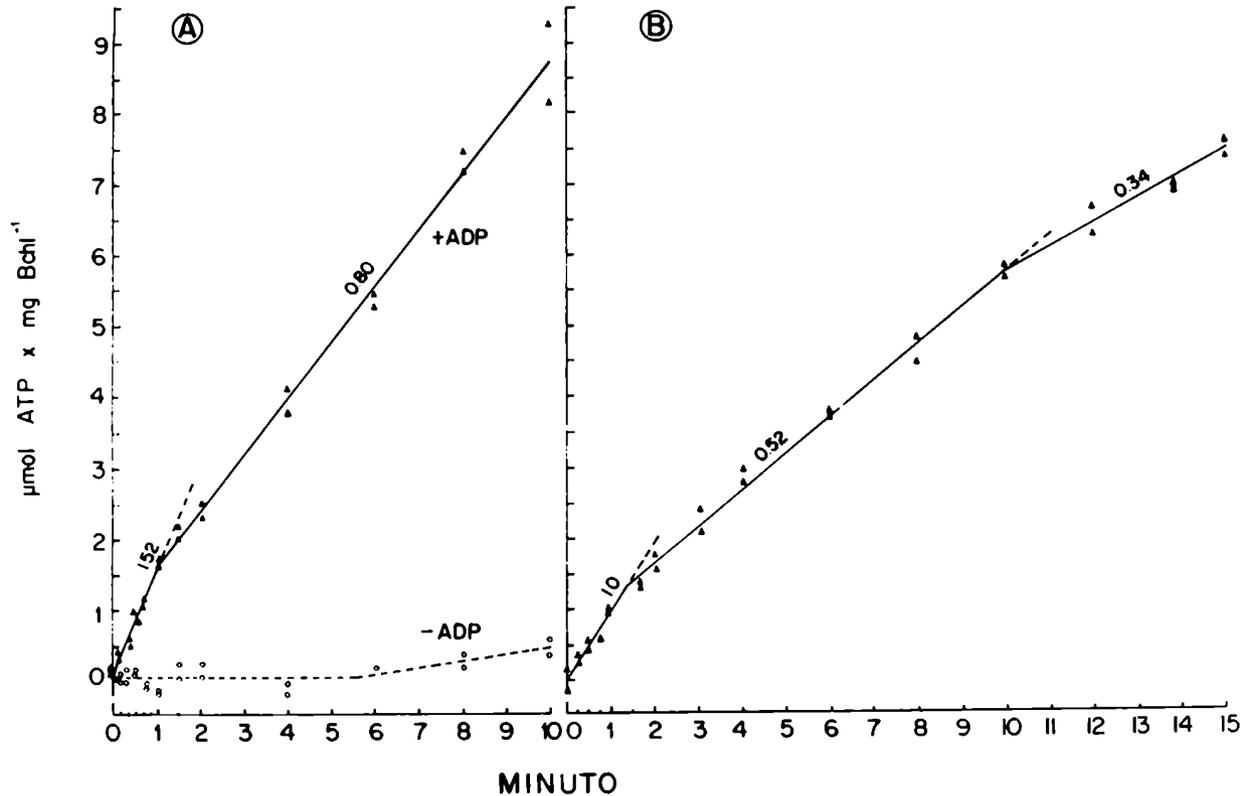


Figura 6

Análisis parcial de los productos de la reacción inducida por la luz a baja temperatura (3°C) y detectados como ^{32}P orgánico. Requerimiento de ADP exógeno.

A- Dependencia de la presencia de ADP exógeno. La reacción (+ADP) es el control llevado a cabo en condiciones estándar. La reacción (-ADP) se lleva a cabo en condiciones iguales a las del control salvo por la ausencia de ADP exógeno en la mezcla de reacción.

B- Reacción de fotofosforilación a baja temperatura con un posterior tratamiento de hexoquinasa e hidrólisis ácida, ver 11.10.

Las velocidades se expresan en $\mu\text{mol ATP} \cdot \text{mg Bchl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Las reacciones A y B fueron hechas en días diferentes.

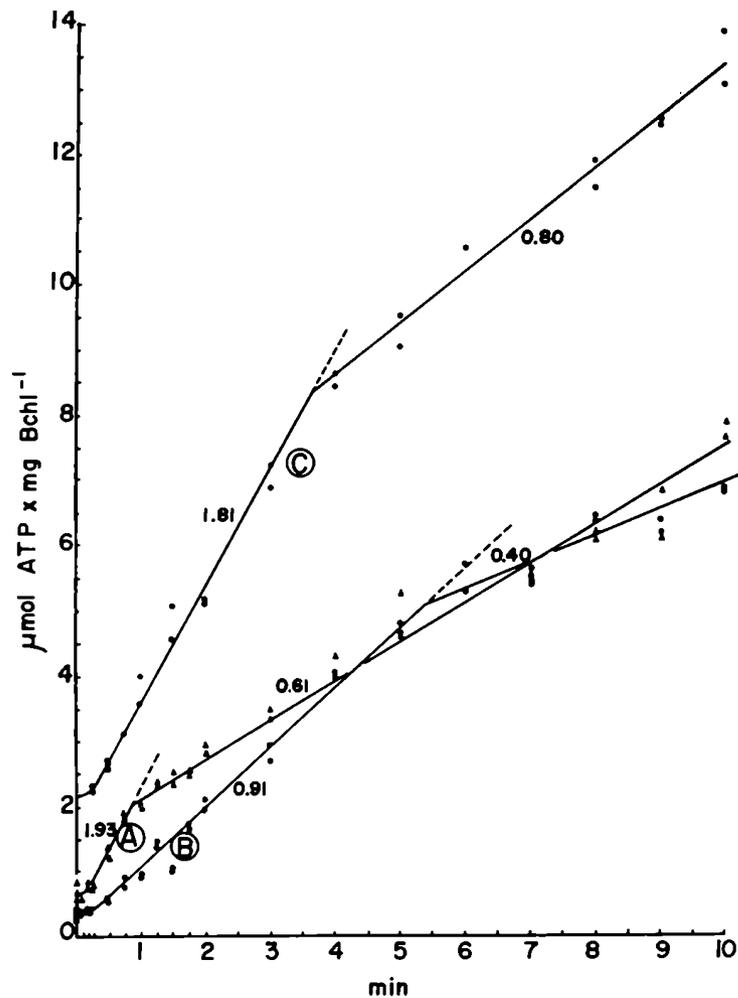


Figura 7

Fotofosforilación a temperatura baja a dos intensidades de luz diferentes y con dos concentraciones de cromatóforos diferentes.

A- Intensidad lumínica = $490 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$; $10 \mu\text{g Bchl ml}^{-1}$. Temp. = $2,7^{\circ}\text{C}$.

B- Intensidad lumínica = $490 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$; $20 \mu\text{g Bchl ml}^{-1}$. Temp. = $2,7^{\circ}\text{C}$.

C- Intensidad lumínica = $180 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$; $10 \mu\text{g Bchl ml}^{-1}$. Temp. = $2,45^{\circ}\text{C}$.

Las "curvas de tiempo" están ligeramente desplazadas hacia arriba por razones de claridad.

Las velocidades se expresan en $\mu\text{mol ATP} \cdot \text{mg Bchl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

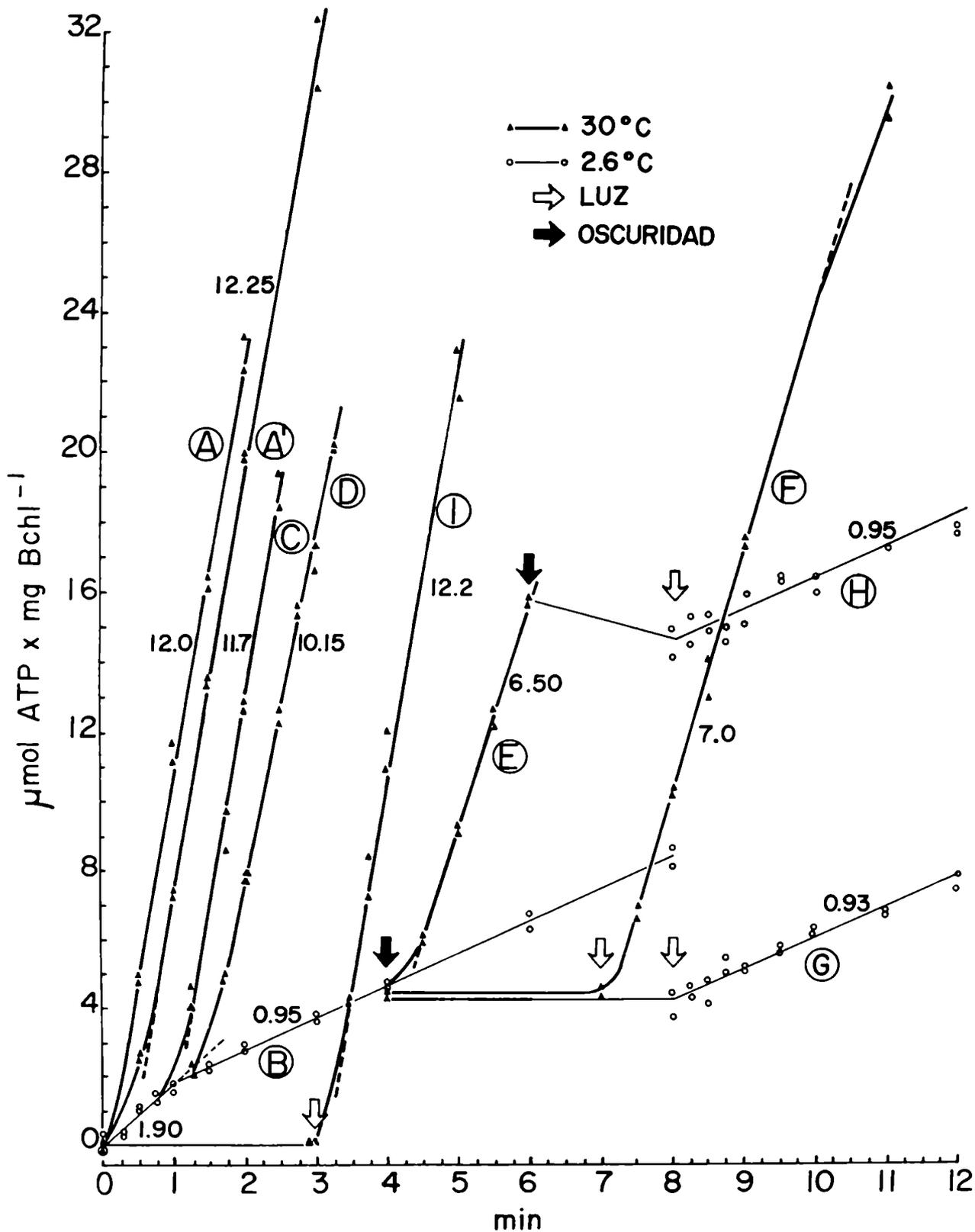


Figura 8

Efecto de un cambio de temperatura sobre las diferentes fases de la actividad de fotosfosforilación a baja temperatura. Ver la leyenda en la pág. 89.

Figura 8 (Leyenda)

Efecto de un cambio de temperatura sobre las diferentes fases de la actividad de fotofosforilación a temperatura baja.

La concentración de cromatóforos es equivalente a $7,5 \mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$. La reacción se lleva a cabo en presencia de hexoquinasa y glucosa para evitar la hidrólisis del producto durante los períodos de oscuridad a temperatura alta. Las velocidades se expresan en $\mu\text{mol ATP.mg Bchl}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

A- Se desencadena la reacción con cromatóforos. La luz está previamente prendida y los tubos de reacción termostatizados a 30°C .

A'- Los tubos de reacción están termostatizados en oscuridad a $2,6^{\circ}\text{C}$. Los cromatóforos se agregan a tiempo cero e inmediatamente (ca. 2 seg) se lleva a 30°C y luz.

B- Igual que A pero a $2,6^{\circ}\text{C}$.

C, D y E- Igual que B pero a los 45 seg, 75 seg y 4 min respectivamente se transfieren los tubos a 30°C (otro baño) en idénticas condiciones lumínicas.

F- Igual que B pero a los 4 min se interrumpe la reacción apagando la luz y se transfiere inmediatamente a 30°C y oscuridad. Luego de 3 min en esas condiciones se reinicia la fotofosforilación a 30°C prendiendo la luz.

G- Igual que B pero a los 4 min se interrumpe la reacción apagando la luz y se transfiere inmediatamente a 30°C y oscuridad, se incuba así 2 min y se vuelven a cambiar los tubos a $2,6^{\circ}\text{C}$. Luego de 2 min en estas condiciones (termostatización), se reinicia la reacción prendiendo la luz.

H- Igual que E pero a los 6 min se interrumpe la reacción apagando la luz y se transfieren los tubos a $2,6^{\circ}\text{C}$. Luego de 2 min de termostatización se reinicia la reacción a $2,6^{\circ}\text{C}$ prendiendo la luz.

I- Se agregan los cromatóforos en oscuridad en tubos termostatizados a $2,6^{\circ}\text{C}$. Luego de incubar 3 min en oscuridad, los tubos se transfieren a 30°C en presencia de luz, desencadenándose así la reacción.

Las reacciones C, D, E e I muestran una aceleración inicial menos acentuada que la reacción A. La reacción A' indica que esa aceleración es el reflejo del tiempo de termostatización necesario para llegar a 30°C .

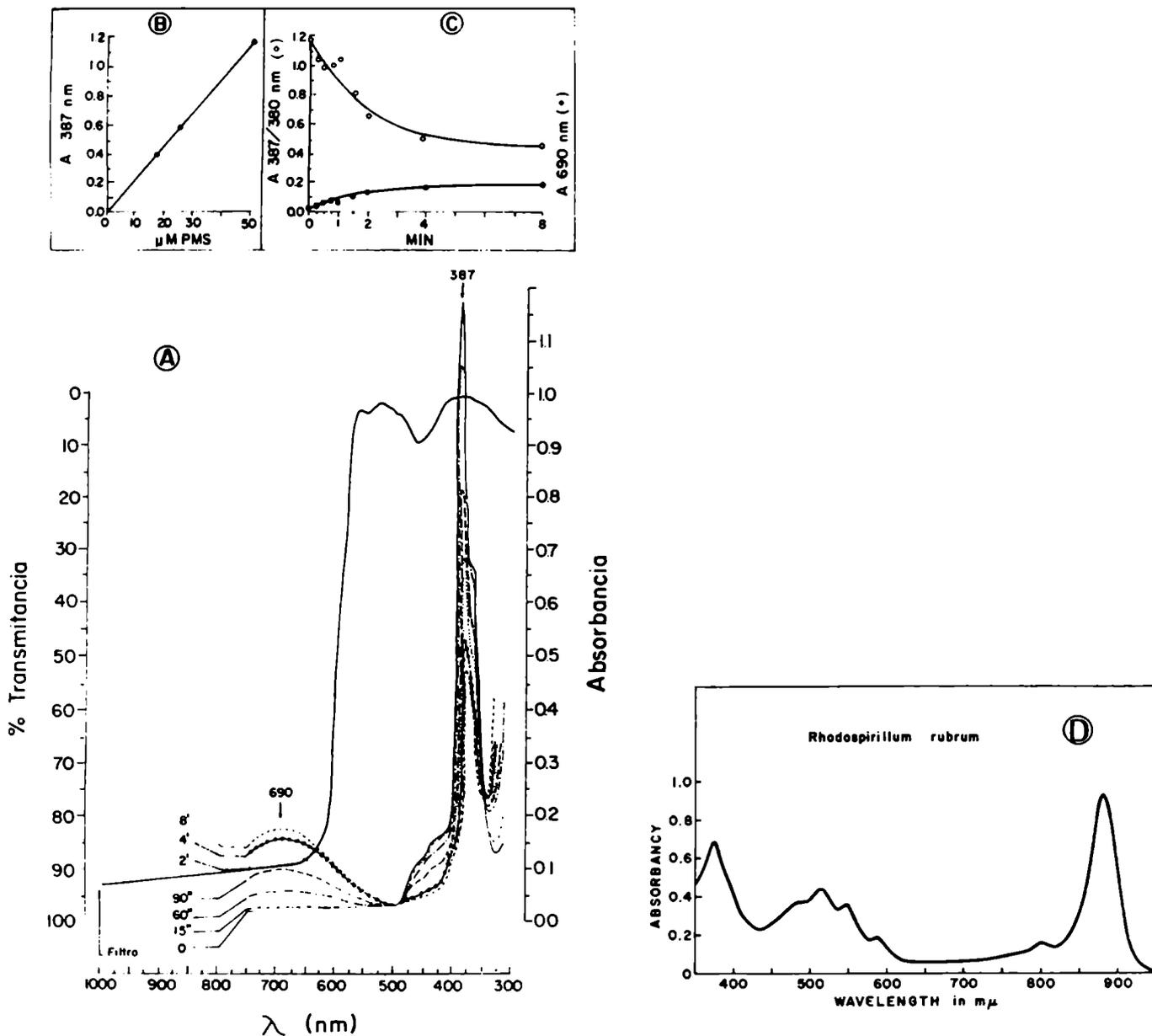


Figura 9

Fotodescomposición del PMS. Protección por un filtro rojo.

Se trataron alícuotas de una solución de PMS 50 μM en Tricina-NaOH 29 mM pH 8,0 a 24°C con períodos variables de iluminación. Se usó una lámpara reflectora de 100 W a 10 cm de la muestra. El calor se filtró con 7 cm de agua. Salvo en el período de iluminación la muestra se mantuvo en estricta oscuridad.

A- Espectro de absorción de diferentes alícuotas luego de la iluminación. Cada curva se distingue por el tiempo de iluminación. La muestra sin iluminar tiene el espectro característico del PMS oxidado, ver el texto (111.3).

El pico de 387 nm se corre hacia longitudes de onda menores cuanto mayor es el tiempo de iluminación de la muestra. Se superpone el espectro de transmisión del filtro rojo usado en algunos experimentos; sus características espectrales no varían luego de por lo menos 50 horas de uso en las condiciones estándar. El espectro de absorción de una muestra iluminada durante por lo menos 4 min con este filtro, es idéntica al de la mantenida en oscuridad.

B-Cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer a 387 nm de la muestra sin iluminar.

C- Absorbancia de los picos en la zona 387/380 nm y 690 nm de las muestras con distintos tiempos de iluminación.

D- Espectro de absorción de una suspensión de cromatóforos de *R. rubrum* equivalente a 6,6 $\mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$, tomado de (113).

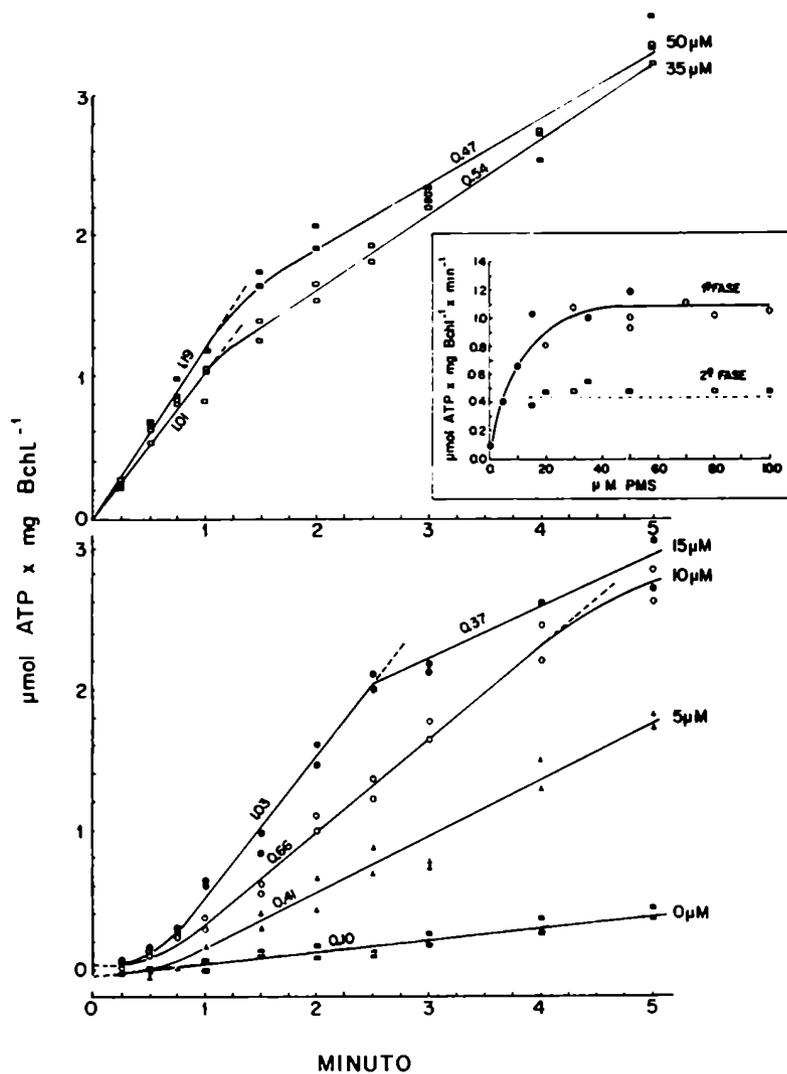


Figura 10

Fotofosforilación a $2,6^{\circ}\text{C}$ catalizada por distintas concentraciones de PMS. Intensidad lumínica: $500 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$. El pH es 8,6. La concentración de los cromatóforos es equivalente a $10 \mu\text{g Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$.

En el gráfico de velocidad vs. concentración, los símbolos llenos provienen de los cursos de reacción mostrados acá y los vacíos pertenecen a otro experimento similar. (—) Velocidad de la primera fase. (---) Velocidad de la segunda fase.

Por encima de $20 \mu\text{M PMS}$, el cambio entre la primera y segunda fase ocurre en todos los casos entre 1 min y 1,5 min. La reacción en ausencia de PMS se mantiene constante por lo menos durante 19 min (8 determinaciones diferentes). Este experimento se llevó a cabo con membranas no congeladas almacenadas en hielo durante 24 hs (símbolos vacíos del gráfico interno) y 10 días (símbolos llenos), en ambos casos provenientes de células sin congelar.

Las curvas con 0 y $5 \mu\text{M PMS}$ están levemente desplazadas hacia abajo por razones de claridad.

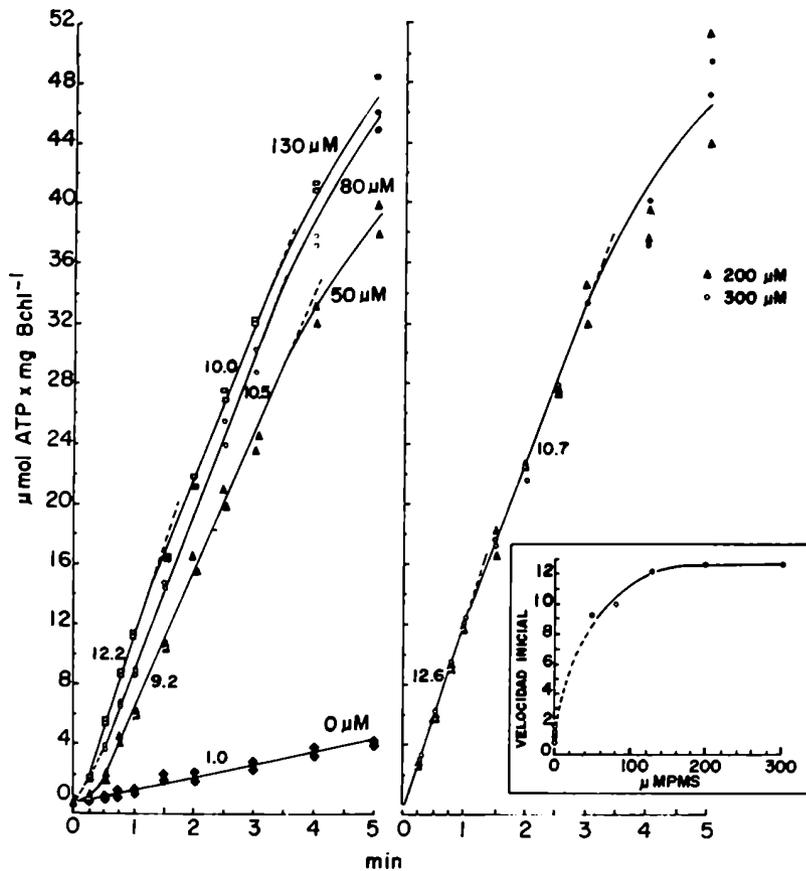


Figura 11

Efecto de concentraciones crecientes de PMS sobre la fotosfosforilación a 30°C y pH = 8,0.

La concentración de cromatóforos es equivalente a 10 $\mu\text{g Bchl}\cdot\text{ml}^{-1}$ y la intensidad lumínica es 500 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$. En el recuadro se muestra la velocidad inicial ($\mu\text{mol ATP}\cdot\text{mg Bchl}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) en función de la concentración de PMS. Para la condición 0 μM PMS se muestra la fluctuación de la velocidad de diversos experimentos. En todos estos últimos, la reacción se mostró rectilínea desde 10 seg hasta 5 min (intervalo mínimo y máximo estudiado respectivamente). Este experimento se llevó a cabo conjuntamente con el que está expresado por los símbolos llenos en el gráfico interno de la Fig. 10.

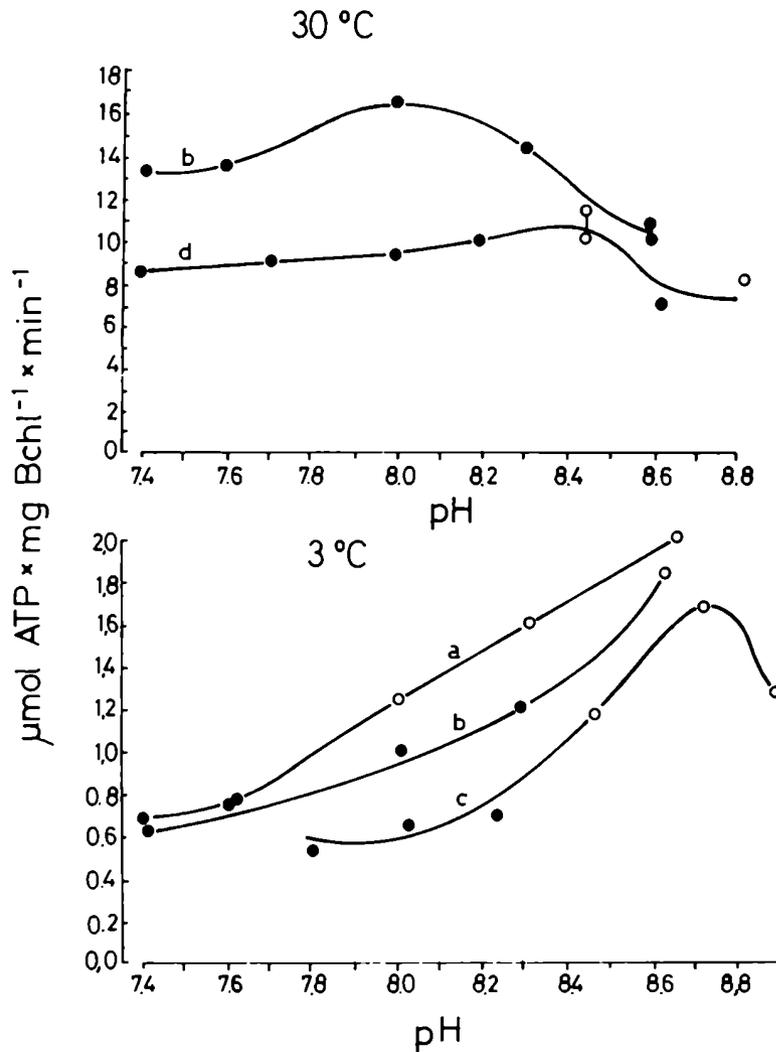


Figura 12

Efecto del pH sobre la velocidad de fotofosforilación catalizada por PMS 50 μM . (1)
 La reacción se desarrolla a 3°C y a 30°C. El buffer es Tricina-NaOH para todo el rango de pH. Las curvas identificadas por letras distintas provienen de experimentos con diferentes preparaciones cromatofóricas. Los símbolos llenos indican que la curva de tiempo es recta durante todo su transcurso, mientras que los vacíos indican que la reacción presenta el fenómeno de inhibición descrito en el Capítulo III. Los valores duplicados representan la incertidumbre máxima en la estimación de la velocidad de un mismo experimento.

Para las reacciones a 3°C los tiempos experimentales son: 10-20-30-40-50 seg -2-3-5 min, mientras que para las correspondientes a 30°C son: b) 15-30-45-60-90 seg y para d): 15-30-45-60-90 seg -2-2,5-3-4-6 min.

Las reacciones identificadas con b pertenecen al mismo experimento que las mostradas en la Fig. 34.

Ver también la Fig. 13.

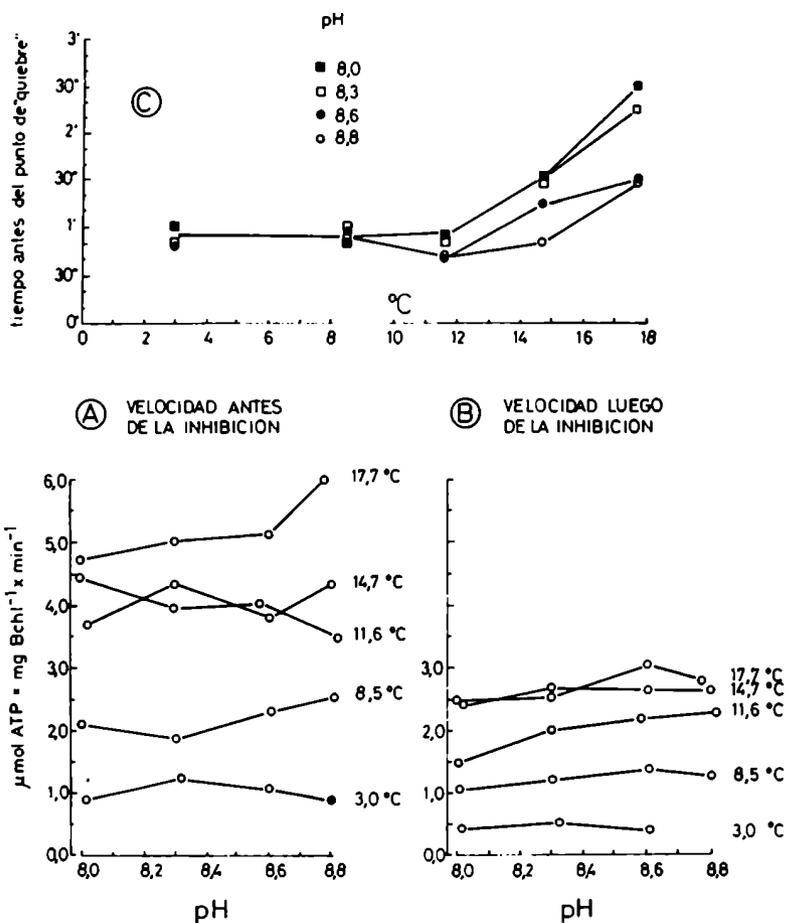


Figura 13

Efecto del pH sobre la velocidad de fotofosforilación catalizada por PMS 50 μ M.(11)

La reacción se desarrolla a diferentes bajas temperaturas en las que se manifiesta el fenómeno de inhibición. El buffer es Tricina-NaOH para todo el rango de pH. En A y en B se grafica la dependencia del pH de la reacción antes y después de la inhibición respectivamente. La primera y la segunda fases son rectilíneas en todo su transcurso.

En C se muestra el tiempo de duración de la primera fase de la reacción para diferentes bajas temperaturas.

El único símbolo lleno en A indica que la reacción no se inhibe en todo su transcurso. Todas las reacciones son medidas en los siguientes tiempos experimentales: 10-20-30-40-50 seg -1-1,5-2-4-6 min.

Ver también la Fig. 12.

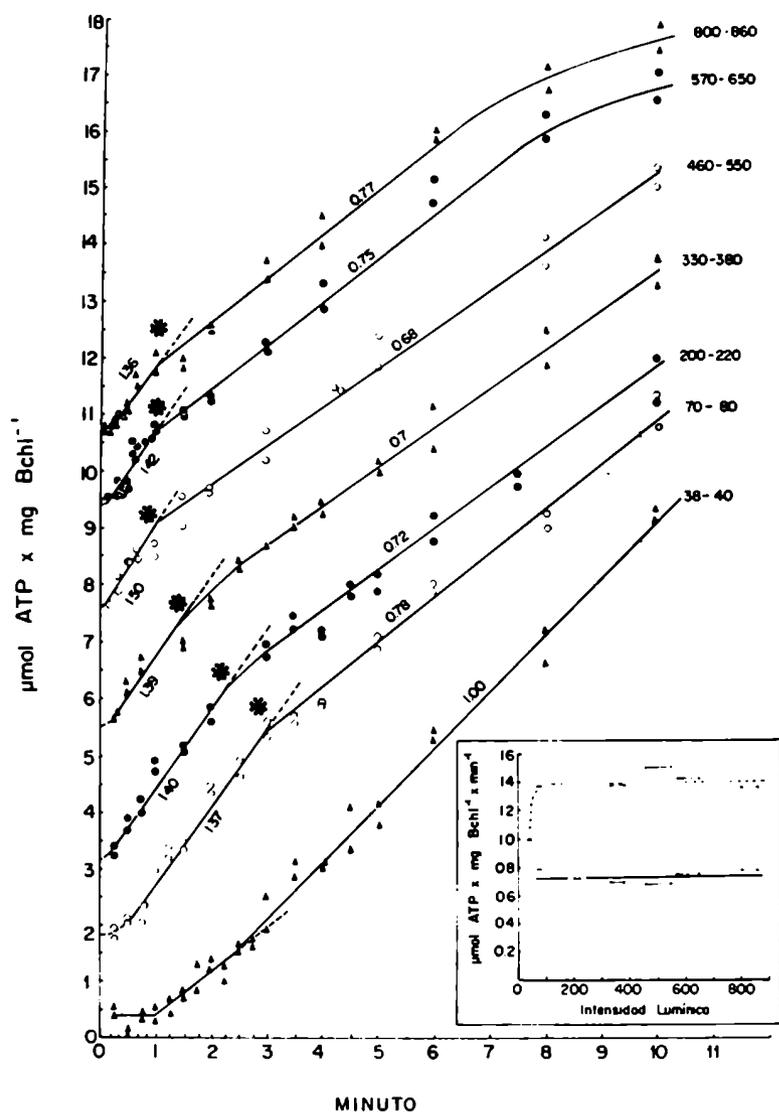


Figura 14

Efecto de distintas intensidades de luz sobre el curso de la reacción de fotofosforilación a 2,5°C.

En el extremo superior de cada curva de tiempo se indica la intensidad de luz ($\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$) a la cual se la realiza. En cada caso el intervalo representa la amplitud máxima de la intensidad lumínica a lo largo de la gradilla de incubación. Las curvas están desplazadas hacia arriba por razones de claridad. El asterisco indica la interpretación de la posición del punto de quiebre. Las velocidades se expresan en $\mu\text{mol} \cdot \text{ATP} \cdot \text{mg Bchl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. La concentración de cromatóforos es equivalente a $7 \mu\text{g Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$.

En el recuadro interno se grafica la velocidad de la primera (línea punteada) y segunda (línea entera) fases en función de la intensidad lumínica ($\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$). La reacción que se desarrolla a $38-48 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ se mantiene rectilínea hasta el min 14° y luego su velocidad decae suavemente, de manera tal que a los 30 min está un 50% inhibida respecto de la del estado estacionario. Como en ese momento la concentración de ATP acumulada es $220 \mu\text{M}$, se propone que la pérdida de velocidad se debe a inhibición por producto, ver Fig. 5. Comparar con lo que sucede a altas intensidades de luz (Fig. 3).

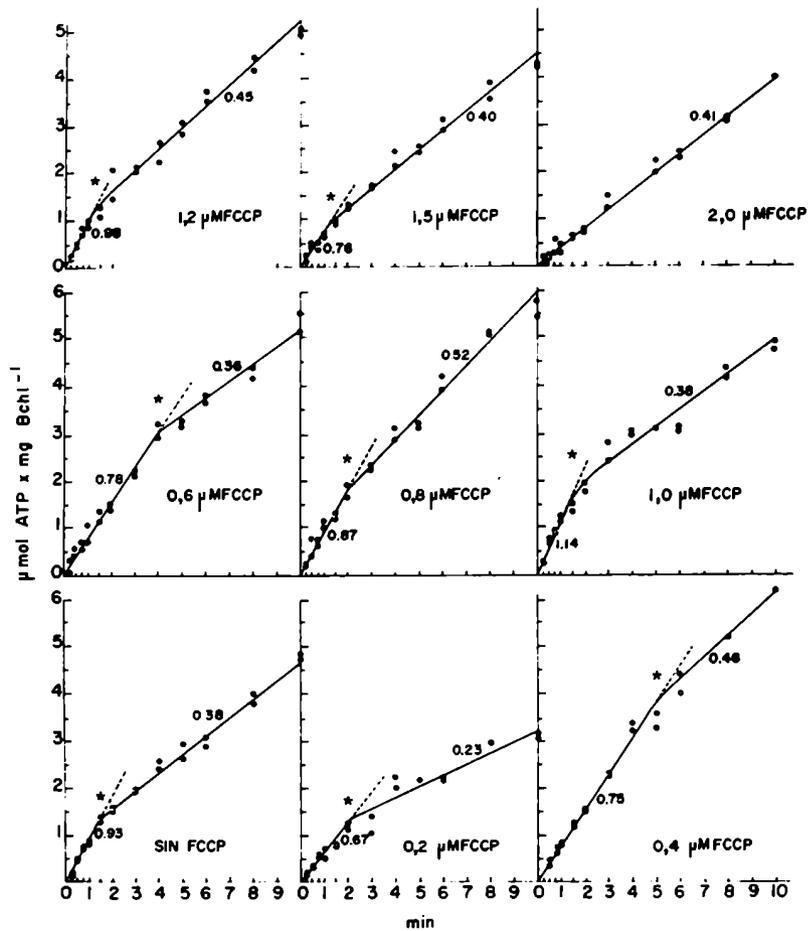


Figura 15

Curvas de tiempo de la fotofosforilación mediada por PMS 50 μM a $2,5^\circ\text{C}$ en presencia de distintas concentraciones del desacoplante FCCP.

La reacción se desencadena con el agregado de cromatóforos (almacenados congelados y provenientes de células congeladas) en concentración equivalente a $10 \mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$. El asterisco indica la interpretación del momento en que ocurre el "quiebre" de la reacción. Obsérvese cómo pequeñas concentraciones del desacoplante prolongan la primera fase de la reacción. *Estos resultados son mostrados de otra manera en la Fig. 16 A.

Las velocidades se expresan en $\mu\text{mol ATP.mg Bchl}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

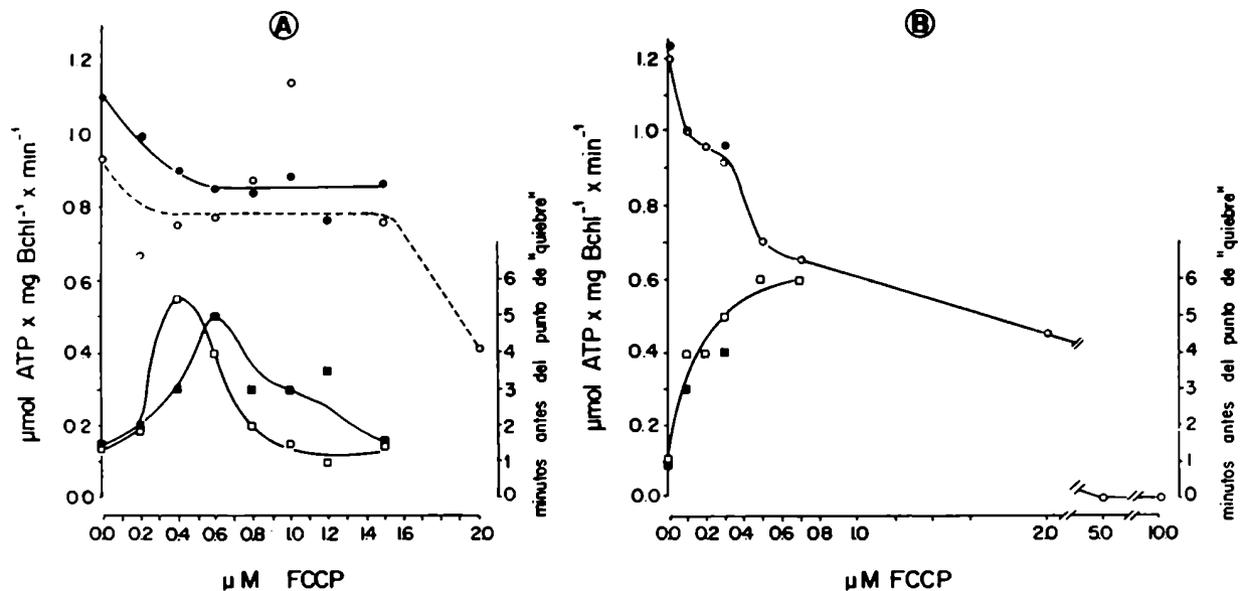


Figura 16

Efecto del desacoplante FCCP sobre la velocidad inicial y el punto de "quiebre" de la reacción de fotofosforilación mediada por PMS 50 μM a 2,5°C (1).

A y B son dos comportamientos algo diferentes encontrados. Tanto en A como en B, los símbolos llenos y vacíos son experimentos realizados en días diferentes. Los círculos representan la velocidad de la primera fase de fotofosforilación. Los cuadrados representan el tiempo de duración de la primera fase, o sea la posición, en la escala del tiempo, del punto de "quiebre". Los símbolos vacíos del gráfico A son la representación de los resultados de la Fig. 15. El resto de la información proviene de experimentos que fueron diseñados de igual manera que los mostrados en la Fig. 15. Tanto en A como en B se usan cromatóforos congelados provenientes de células congeladas.

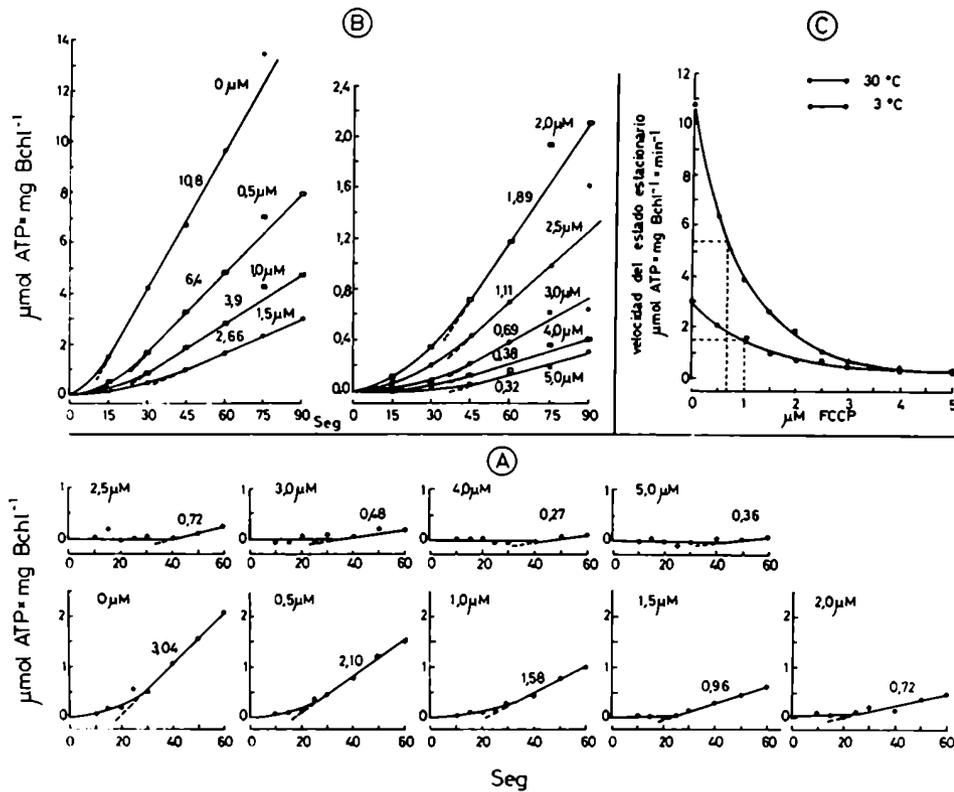


Figura 17

Efecto de un desacoplante (FCCP) sobre la reacción de fotofosforilación mediada por PMS 50 μM (II).

A - La reacción se estudia a 3°C y el pH es 8,7.

B - La reacción se estudia a 30°C y el pH es 8,0.

C - Representación de las velocidades de los estados estacionarios de las reacciones mostradas en A y B en función de la concentración de FCCP. Se indican las I 50% para las dos temperaturas (1 μM FCCP para 3°C y 0,68 μM FCCP para 30°C).

Se usa membrana no congelada almacenada durante 2 días en hielo y preparada a partir de células no congeladas. La concentración de cromatóforos es equivalente a 10 $\mu\text{g Bchl}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$.

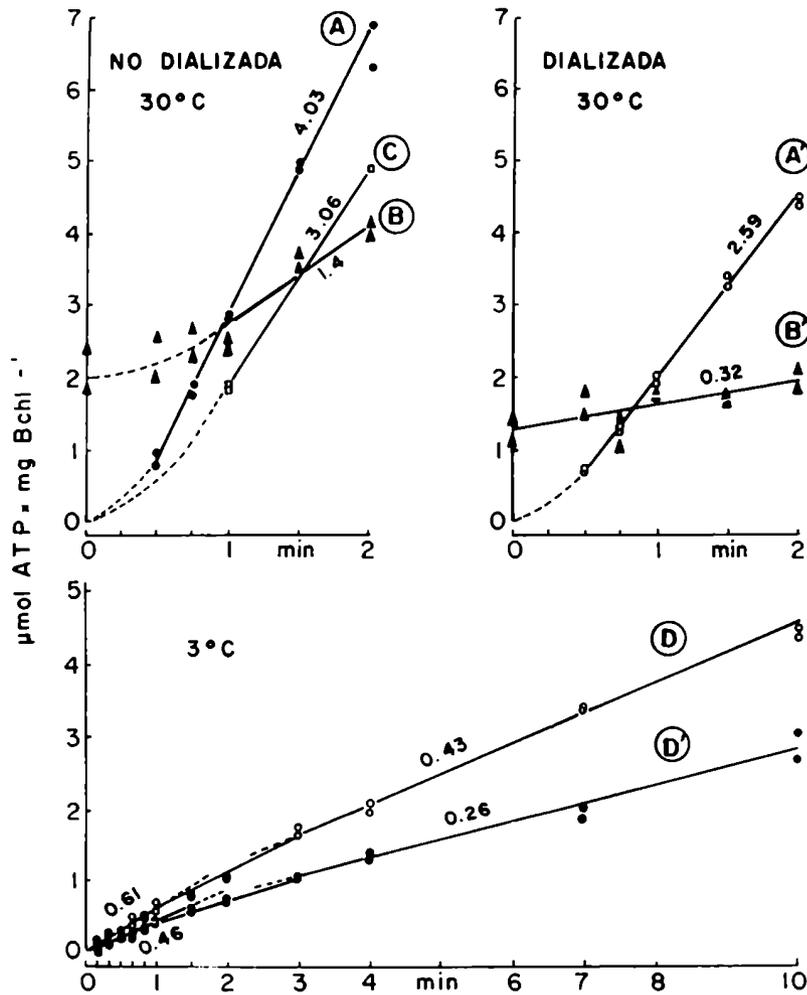


Figura 18

Fotofosforilación en ausencia de PMS de una preparación "cruda" de cromatóforos, a 3°C y a 30°C. Efecto de una preiluminación en ausencia de ADP y PMS. Ver la leyenda en la pág. 100.

Figura 18 (Leyenda)

Fotofosforilación en ausencia de PMS de una preparación "cruda" de cromatóforos, a 3°C y a 30°C. Efecto de una preiluminación en ausencia de ADP y PMS.

El producto de la reacción (ATP) se valora luego de un tratamiento con hexoquinasa y glucosa seguido por una hidrólisis ácida tal como se describe en "Materiales y Métodos" (11.10).

Preparación de las membranas: Se procedió como está descripto en "Materiales y Métodos" hasta completar el paso de centrifugación a 17.000 g. Se tomaron cuidadosamente los 2/3 superiores del sobrenadante y se los volvió a centrifugar de idéntica manera, para recuperar nuevamente los 2/3 superiores. Esta última fracción resultó con una concentración de cromatóforos equivalente a 0,4 mg Bchl.ml⁻¹.

La mitad del volumen original fue dializada contra el mismo "buffer de sonicación" durante 12 hs a 4°C con agitación magnética y en una relación de volúmenes del 3%. La alícuota restante se guardó en condiciones idénticas pero sin dializar.

En todas las reacciones la concentración de cromatóforos fue equivalente a 12 µg Bchl.ml⁻¹. Las velocidades se expresan en µmol ATP.mg Bchl⁻¹.min⁻¹.

A- Fotofosforilación a 30°C llevada a cabo por la membrana "cruda sin dializar". La reacción se desencadena con el agregado de cromatóforos en una mezcla de fotofosforilación sin PMS.

B- Fotofosforilación sin PMS llevada a cabo por la membrana "cruda sin dializar" luego de 5 min de preiluminación a 30°C en ausencia de ADP y PMS. La preiluminación se desencadena con el agregado de cromatóforos a una mezcla de fotofosforilación sin ADP y sin PMS. En el min 5° (sin apagar la luz) se agrega 2 mM ADP y se comienza el registro de la reacción que transcurre también a 30°C.

C- Como B, pero la preincubación se hace en oscuridad. En el min 5° se agrega 2 mM ADP y simultáneamente se prende la luz, iniciándose también el registro de la reacción.

D- Como A, pero a 3°C.

A', B' y D' igual que A, B y D respectivamente, pero usando la membrana dializada.

Para B y B' en el "tiempo cero" se indica el ATP acumulado durante el pretratamiento.

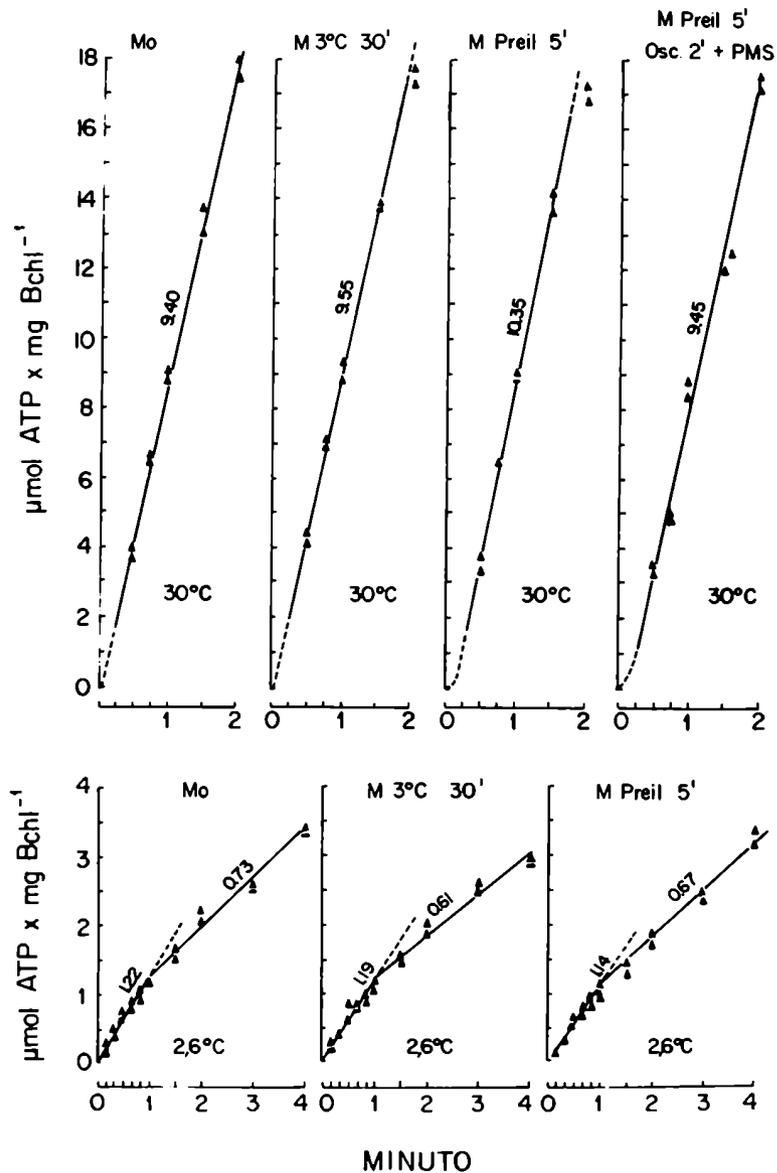


Figura 19

Capacidad de fotofosforilación a 2,6°C y 30°C mediada por PMS 50 μM (condiciones estándar) de membranas recuperadas por ultracentrifugación luego de haber sufrido, como preparación "cruda dializada", pretratamientos de fotofosforilación a baja temperatura (3°C) sin PMS o de preiluminación a 30°C en ausencia de ADP exógeno y de PMS. Ver la leyenda en la pág. 102.

Figura 19 (Leyenda)

Capacidad de fotofosforilación a 2,6°C y 30°C mediada por PMS 50 μ M (condiciones estándar) de membranas recuperadas por ultracentrifugación luego de haber sufrido, como preparación "cruda dializada", pretratamientos de fotofosforilación a baja temperatura (3°C) sin PMS o de preiluminación a 30°C en ausencia de ADP exógeno y de PMS.

La preparación "cruda dializada" es la misma que la descripta en la Fig. 18. Se la almacenó 48 hs en hielo y oscuridad. Se indica en cada gráfico la temperatura de reacción luego del pretratamiento.

M0: La membrana "cruda dializada" se preincubó en oscuridad durante 30 min a 3°C en mezcla de reacción de fotofosforilación sin ADP y sin PMS.

M3°C 30': Se permitió que la membrana "cruda dializada" fotofosforilase a 3°C durante 30 min en condiciones estándar, salvo por la ausencia de PMS.

M Preil 5': La membrana "cruda dializada" se preiluminó a 30°C durante 5 min en mezcla de reacción de fotofosforilación carente tanto de ADP como de PMS.

M Preil 5'; Osc 2' + PMS: Igual que M Preil 5' pero, inmediatamente luego de interrumpir la luz, se agregó PMS 200 μ M y se prosiguió la incubación en oscuridad y a la misma temperatura durante 2 min más.

En todos los casos se usaron volúmenes de reacción de 3 ml en los tubos de hemólisis estándar. La concentración de cromatóforos fue equivalente a 12 μ g Bchl.ml⁻¹. Luego de cualquiera de los cuatro pretratamientos se transfirieron los tubos al hielo y oscuridad. El volumen total de cada pretratamiento fue de 51 ml. Para recuperar los cromatóforos, las mezclas de reacción se ultracentrifugaron (250.000 g x 60 min, Rotor 60 Ti) a través de un "colchón" de sacarosa 20% (p/v) en "buffer de sonicación". Se descartó el sobrenadante cuidadosamente y se resuspendió el pellet en el "buffer de sonicación". Las diferentes membranas pretratadas y recuperadas se almacenaron temporariamente en hielo y el desarrollo de todo el experimento se hizo en el mismo día. Las velocidades se expresan en μ mol ATP. mg Bchl⁻¹. min⁻¹.

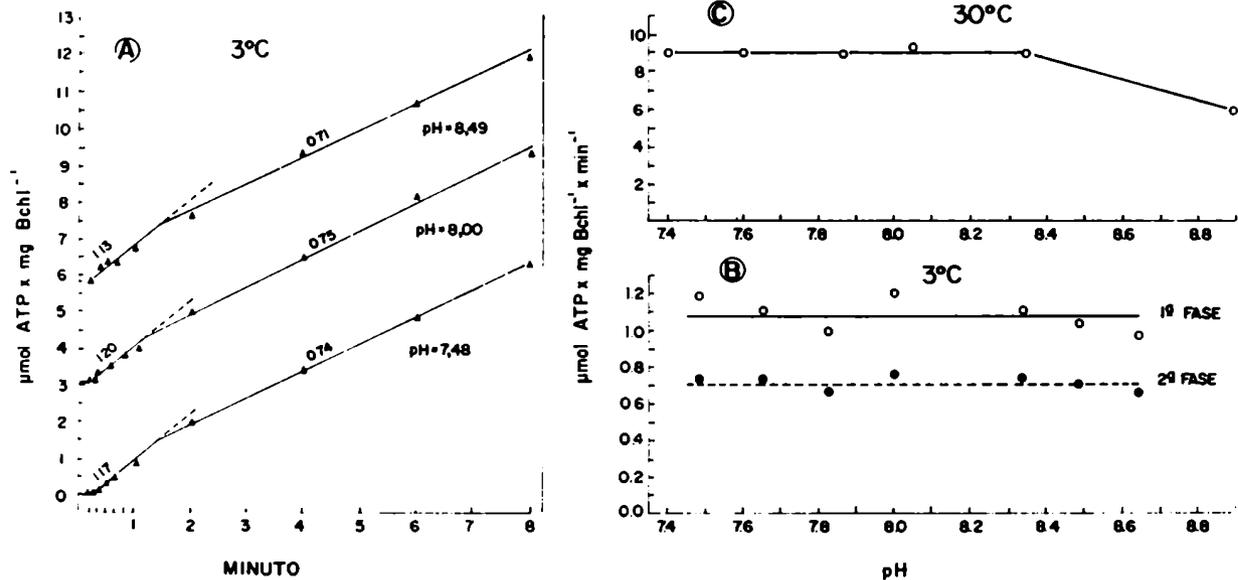


Figura 20

Efecto del pH (7,4-8,9) sobre la fotofosforilación mediada por el sistema TMPD $100 \mu\text{M}$, Ascorbato 20 mM en aerobiosis.

Se usa buffer Tricina para todo el rango de pH.

A- Curso de la reacción a 3°C a tres pHs diferentes. Las curvas están desplazadas hacia arriba por razones de claridad.

B- Velocidad de la primera y segunda fase de la fotofosforilación a 3°C . En todos los casos el "quiebre" de la reacción ocurre entre 60 y 90 seg y la velocidad de la segunda fase se mantiene constante hasta por lo menos el min 8.

C- Velocidad de la fotofosforilación a 30°C . Tiempos de reacción: 15-30-45-60-75 seg. Curso de la reacción: rectilíneo en todos los casos.

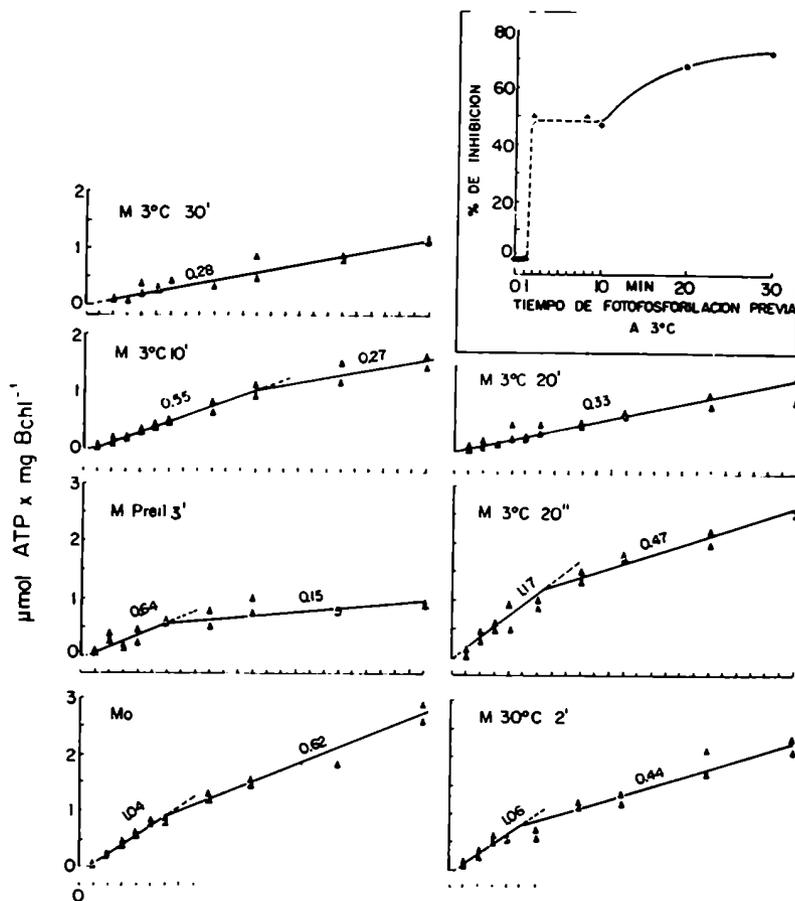


Figura 21

Capacidad de fotofosforilación a 3°C, mediada por PMS 50 μM en condiciones estándar, de membranas recuperadas por ultracentrifugación luego de haber sufrido pretratamientos de fotofosforilación a temperaturas bajas y altas, y de preiluminación en presencia de PMS 50 μM en ausencia de ADP. Ver la leyenda en la pág.105.

Figura 21 (Leyenda)

Capacidad de fotofosforilación a 3°C, mediada por PMS 50 µM en condiciones estándar, de membranas recuperadas por ultracentrifugación luego de haber sufrido pretratamientos de fotofosforilación a temperaturas bajas y altas, y de preiluminación en presencia de PMS 50 µM en ausencia de ADP.

En todos los casos, la concentración de cromatóforos pretratados usados en las mediciones es equivalente a 7 µg Bchl.ml⁻¹.

Pretratamientos

Para dar origen a los diferentes tipos de membranas pretratadas, se usan cromatóforos preparados tal como se describe en Materiales y Métodos (Moo). En todos los pretratamientos la concentración de cromatóforos es equivalente a 10 µg Bchl.ml⁻¹.

Mo: Las membranas son preincubadas en mezcla de fotofosforilación estándar en oscuridad y en hielo durante 30 min (control).

M30°C 2': Las membranas sufren un pretratamiento de fotofosforilación en condiciones estándar a 30°C durante 2'.

M3°C 20'', M3°C 10', M3°C 20' y M3°C 30': Las membranas sufren un pretratamiento de fotofosforilación en condiciones estándar a 3°C durante 20 seg, 10 min, 20 min y 30 min respectivamente.

MPreil 3': Las membranas son preiluminadas a 30°C durante 3 min en mezcla de fotofosforilación estándar salvo por la ausencia de ADP.

En todos los casos los pretratamientos se interrumpen llevando los tubos al hielo y oscuridad.

Los pretratamientos con iluminación se llevan a cabo en tubos de hemólisis conteniendo cada uno 3 ml de mezcla de reacción mientras que el pretratamiento en oscuridad (Mo) se hace en un recipiente único. Para cada caso se pretratan cromatóforos en cantidad equivalente a 1,5 mg Bchl.

Recuperación de las membranas pretratadas

Luego de la interrupción del pretratamiento se mantienen los tubos en oscuridad y en hielo durante aproximadamente 1 hora. Seguidamente las mezclas de reacción con los cromatóforos se ultracentrifugan a 60.000 RPM en un rotor 60 Ti durante 60 min a través de un colchón de sacarosa 20% (p/v) en buffer de sonicación. El pellet se resuspende en el mismo buffer en una concentración de 0,6 mg Bchl.ml⁻¹. Los cromatóforos así recuperados son almacenados a -70°C durante 12 hs antes del estudio de las reacciones.

En el recuadro interno se muestra el % de inhibición de las velocidades iniciales de las reacciones de fotofosforilación a 3°C que presentan las membranas recuperadas luego del pretratamiento por fotofosforilación a 3°C, respecto de la correspondiente a Mo. La línea punteada propone el comportamiento en una zona en que faltan datos, con el uso de la información provista por la Fig. 8 sobre el grado de inhibición respecto de la velocidad inicial que presenta para cada tiempo el curso de la reacción a 2,6°C. Dicha información está representada por triángulos vacíos. Además se indica el resultado de una membrana M3°C 30'' no mostrado en las curvas de tiempo.

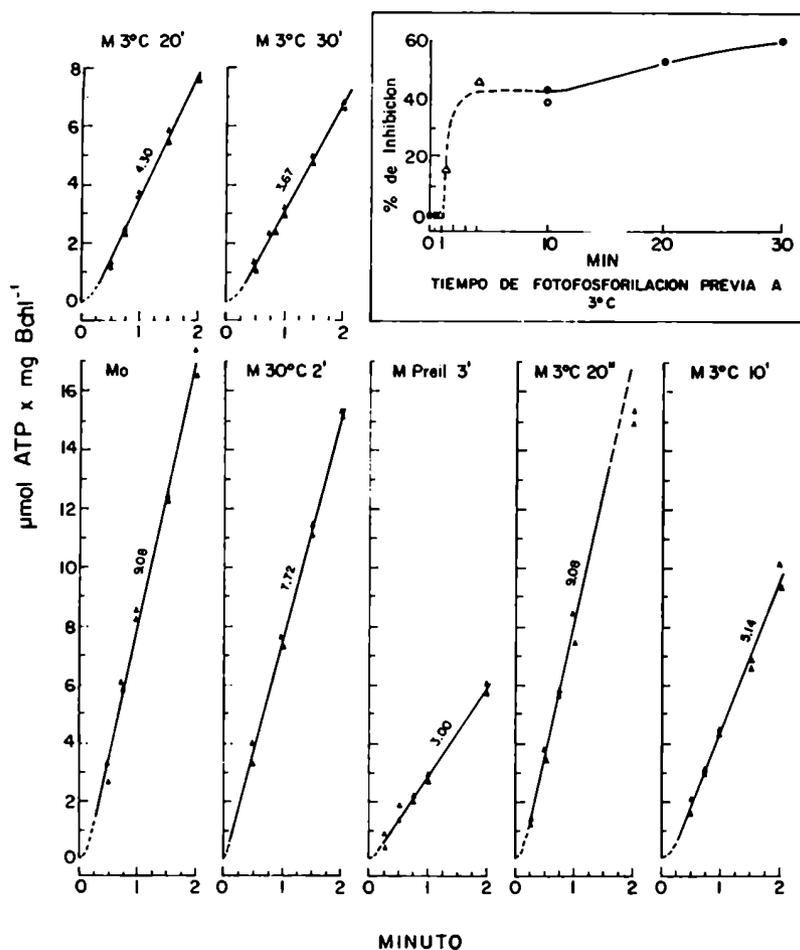


Figura 22

Capacidad de fotofosforilación a 30°C, mediada por PMS 50 μM en condiciones estándar, de membranas recuperadas por ultracentrifugación luego de haber sufrido pretratamientos de fotofosforilación a temperaturas bajas y altas y de preiluminación en presencia de PMS 50 μM y en ausencia de ADP a 30°C.

Los diferentes tipos de membranas ensayadas a 30°C en este experimento son alícuotas de las que se estudiaron a 3°C en la Fig. 21. Este experimento fue realizado en conjunto con el de la Fig. 21.

En el recuadro interno se muestra el % de inhibición de las velocidades iniciales de las reacciones de fotofosforilación a 30°C que presentan las membranas recuperadas luego del pretratamiento por fotofosforilación a 3°C, respecto de la correspondiente a Mo. La línea punteada propone el comportamiento en una zona en que faltan datos, con el uso de la información provista por la Fig. 8 sobre el grado de inhibición de la reacción medida a 30°C luego de haber elevado bruscamente la temperatura de la reacción que transcurría desde su desencadenamiento a 2,6°C. Dicha información está representada por triángulos vacíos. El círculo vacío a los 10 min es el resultado de otro experimento similar.

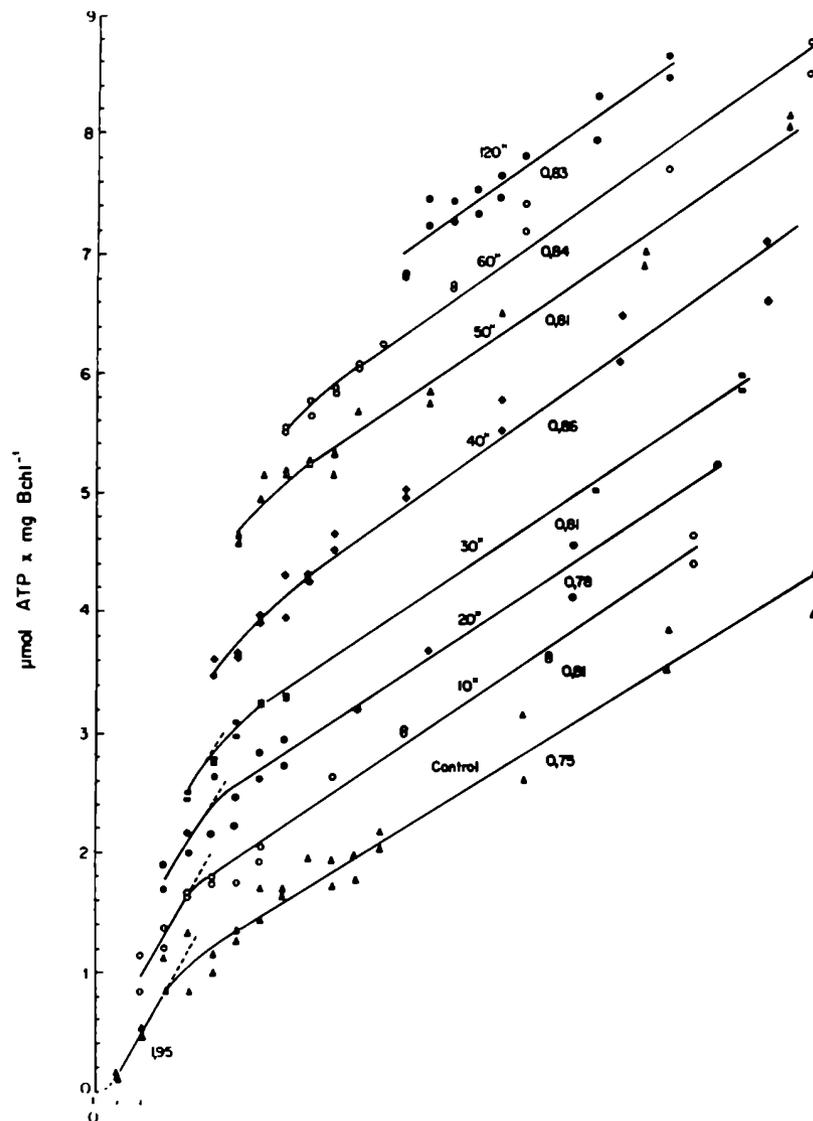


Figura 23

Efecto "acumulativo" de los eventos que conducen a la inhibición durante la fase primera (no inhibida) de la fotosforilación a baja temperatura (3°C).

La reacción de fotosforilación a 3°C en condiciones estándar, se desarrolla durante dos períodos de luz de duración variable, interrumpidos por 2 min de oscuridad a la misma temperatura. El primer período se extiende desde el desencadenamiento de la reacción por el agregado de cromatóforos, hasta la interrupción de la luz. Dicho intervalo varía desde 10 seg hasta 2 min. La incubación prosigue en oscuridad (sin hacerse mediciones) a la misma temperatura durante 2 min para inmediatamente reiniciar la reacción prendiendo la luz y luego de 10 seg, recomen-
zar también el registro de la reacción por 2 a 4 min adicionales. La curva control consta de un único período de iluminación. Las restantes curvas de tiempo muestran sólo el registro del segundo período y están identificadas por el tiempo (en segundos) de fotosforilación en el primer período.

Los valores se grafican en la escala de tiempo, conforme al tiempo neto de fotosforilación (el primero más el segundo período), obviando el lapso de oscuridad. Las curvas están desplazadas hacia arriba por razones de claridad. Las velocidades se expresan en $\mu\text{mol ATP} \cdot \text{mg Bchl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

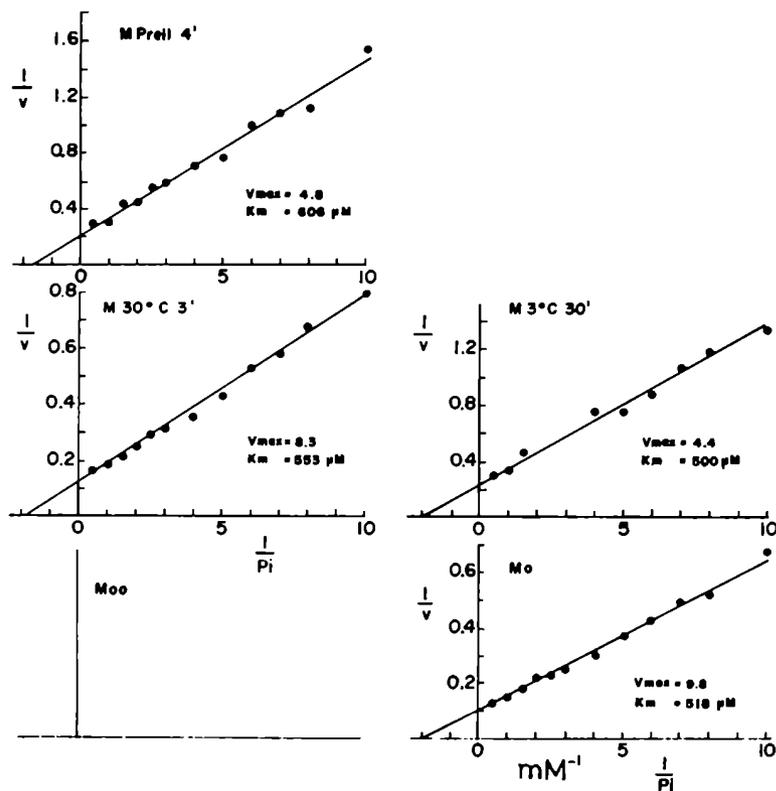


Figura 24

Características cinéticas aparentes de la reacción de fotofosforilación a 30°C respecto de P_i (a $ADP = 2 \text{ mM cte.}$) de las membranas cromatóforicas pretratadas de diferentes maneras.

Las reacciones se ensayaron en mezcla de reacción estándar a las que se les varió sólo la concentración de P_i . La concentración de cromatóforos es equivalente a $10 \mu g \text{ Bchl. ml}^{-1}$.

La nomenclatura de las membranas, los pretratamientos, la recuperación de las membranas pretratadas y su almacenamiento son los mismos que los indicados en la Fig. 21.

Ver en la Tabla 2 una descripción más amplia de las características de los experimentos presentados acá.

Exper. N°	Membrana	Vmax	Inh. %	Km ap. (μM)	nH n.m.	Temp. °C	Fig.	Cepa	OBSERVACIONES
1	Moo	n.d.	—	n.d.	n.d.	30	—	W	—
2	Mo	9,6	control	518	1,00		24		Tiempos 10-20-30-40-50seg. Reacción rectilínea en todo su curso.
3	M30°C 3'	8,3	14	555	1,00		24		Tiempos 10-20-30-40-50seg. Reacción rectilínea en todo su curso.
4	M3°C 30'	4,4	54	500	1,03		24		Tiempos 15-30-45-60-90seg. Reacción rectilínea en todo su curso.
5	MPreil 4'	4,8	50	606	1,00		24		Tiempos 10-20-30-40-50seg. Reacción rectilínea en todo su curso.
6	Moo endógeno (sin PMS)	2,38	—	500	1,00		26		Tiempos 15-30-45-60-90seg. Sin "lag". Reacción rectilínea en todo su curso.
7	Moo + FCCP 0,6 μM	n.d.	—	n.d.	n.d.		—		
8	Mo + FCCP 3 μM	3,51	63	525	1,00		26		Tiempos 10-20-30-40-50seg. Aparece un "lag" de 20 seg en toda concentración de Pi, luego la reacción es rectilínea.
9	Moo	1,37	—	460	1,00		2,5		4

Tabla 2

Resumen de las características cinéticas aparentes respecto de Pi a ADP 2 mM cte. para membranas pretratadas de diversas maneras y medidas en distintas condiciones.

Salvo que se indique otra cosa las reacciones se llevan a cabo catalizadas por PMS 50 μM. (n.m.) no se muestra. (n.d.) no se determinó.

Salvo donde se indica, por falta de información no se pudo establecer la existencia de un "lag" o fase inicial de menor velocidad. Sin embargo, debería existir teniendo en cuenta los resultados del estudio de saturación para ADP (Tabla 3).

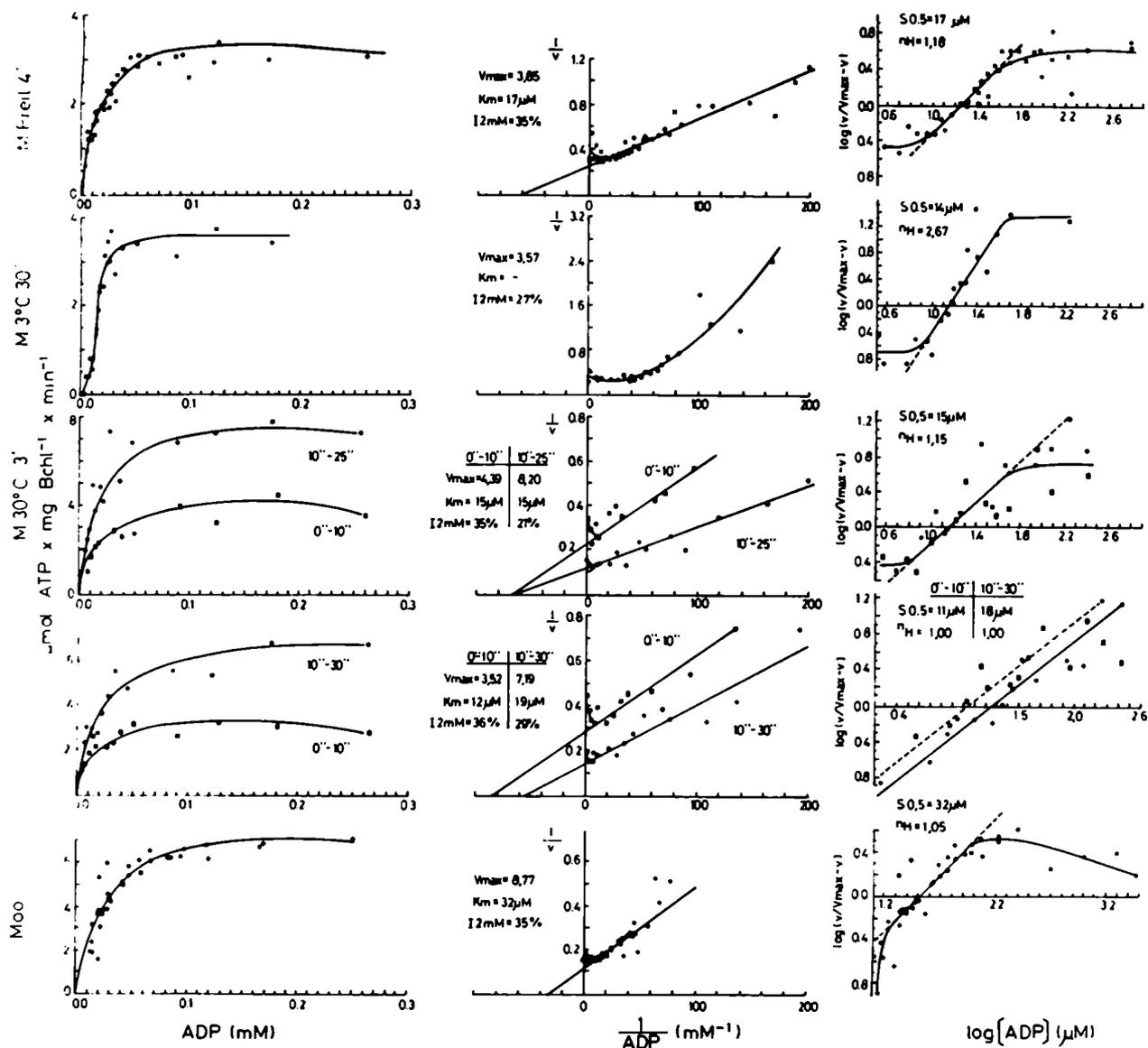


Figura 25

Características cinéticas aparentes de la reacción de fotosfosforilación a 30°C respecto de ADP (a $P_i = 2$ mM cte.) de las membranas cromatóforicas pretratadas de diferentes maneras.

Las reacciones se ensayaron en mezcla de reacción estándar a las que se les varió sólo la concentración de ADP. La concentración de cromatóforos es equivalente a $10 \mu\text{g Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$. La nomenclatura de las membranas, los pretratamientos, la recuperación de las membranas pretratadas y su almacenamiento son los mismos que los indicados en la Fig. 21. Ver en la Tabla 3 una descripción más amplia de las características de los experimentos presentados acá.

En el caso de Moo y M30°C 30' se presentan en conjunto los resultados de dos experimentos similares, mientras que en el de MPreil 4' son tres los experimentos que se presentan integrados. Como las reacciones que muestran Mo y M30°C 3' son bifásicas (ver el texto) se presentan las características de saturación de ambas fases identificándose cada una de ellas por el intervalo de tiempo en segundos en que se manifiestan o estudian. En ausencia de ADP exógeno la actividad es nula. I_2 mM es el porcentaje de inhibición por sustrato a ADP 2 mM respecto de la V_{max} .

Exp. N°	Membrana	Vmax	Inh. %	Km ap. (μM)	SO. 5 ap. (μM)	n _H	Temp. (°C)	Fig.	Cepa	OBSERVACIONES		
1	Moo	8,77	—	32	32	1,05	30	25	W	Tiempos 0-5-10-15-20-30seg. Sin "lag". Integración de dos experimentos.		
2		23,3	—	30	30 n.m.	1,00 n.m.		41	FR1	Tiempos 10-15-20-25-30seg. Sin "lag". PMS 200 μM.		
3 4 5	Mo 0"-10"	3,52 5,35 5,10	—	12 10 9	11 10 9	1,00 1,00 1,00		n.m. n.m.	25	W	Tiempos 0-5-10seg. Sin "lag". Reacción rectilínea en todo su curso.	
6	Mo 10"-30"	7,19	control	19	18	1,00		25	Tiempos 10-15-20-25-30seg. Experimento realizado en conjunto con el no. 3.			
7	M30°C 3' 0"-10"	4,39	—	15	15	1,15		25	Tiempos 0-10 seg.			
8 9	M30°C 3' 10"-25"	8,20 10,31	0	15 57	15 57	1,15 1,00		n.m.	25		Tiempos 10-15-20-25seg. Reacción rectilínea en todo su curso. Experimento en conjunto con el no. 7.	
10	M3°C 30'	3,57	50	—	14	2,67		25	Tiempos 15-30-45-60-90seg.			
11	MPreil 5'	3,85	46	17	17	1,18		25	Tiempos 0-5-10-15-20-30-45-60-90seg. Integración de 3 experimentos. Aparece un "lag" de 5-10 seg en toda concentración de ADP.			
12 13	Moo endógena (sin PMS)	2,27 3,50	—	44 18	44 18	1,00 1,00		n.m. n.m.	26 41		FR1	Tiempos 10-15-20-25-30-45seg. Sin "lag". Reacción rectilínea en todo su curso.
14	Moo + FCCP 0,6 μM	5,13	—	18	18	1,00		n.m.	26		FR1	Tiempos 0-10-20-30-40-50seg. Aparece un "lag" de 10seg en toda concentración de ADP, luego la reacción es rectilínea.
15 16	Mo + FCCP 3 μM	5,41 2,86	25 60	69 29	69 29	1,00 1,00		n.m.	26 n.m.		W	Tiempos 10-20-30-40-50seg. Aparece un "lag" de 20seg en toda concentración de ADP, luego la reacción es rectilínea.
17	Moo	11,2	—	15	15	1,00		17	41		FR1	Tiempos 10-15-20-25-30seg. Sin "lag". PMS 200 μM.
18		4,7	—	14	14	1,00		5	41	Tiempos 10-15-20-25-30seg. Sin "lag". La reacción es rectilínea en todo su curso. PMS 200 μM.		
19	Moo endógena (sin PMS)	1,56	—	11	11	1,00		17	41	Tiempos 15-30-45-60-90seg. Sin "lag". Reacción rectilínea en todo su curso.		
20		0,42	—	10	10	1,00		5	41	Tiempos 15-30-60-90-120seg. Sin "lag". Reacción rectilínea en todo su curso.		

Tabla 3

Resumen de las características cinéticas aparentes respecto de ADP a Pi 2 mM cte. para membranas pretratadas de diversas maneras y medidas en distintas condiciones.

Salvo que se indique otra cosa, las reacciones se llevan a cabo catalizadas por PMS 50 μM. En los experimentos 1,2,6,9,11 y 17, a concentraciones de ADP menores de 30-50 μM, la reacción se mantiene rectilínea sólo durante los primeros 2-3 tiempos experimentales. (n.m.) no se muestra.

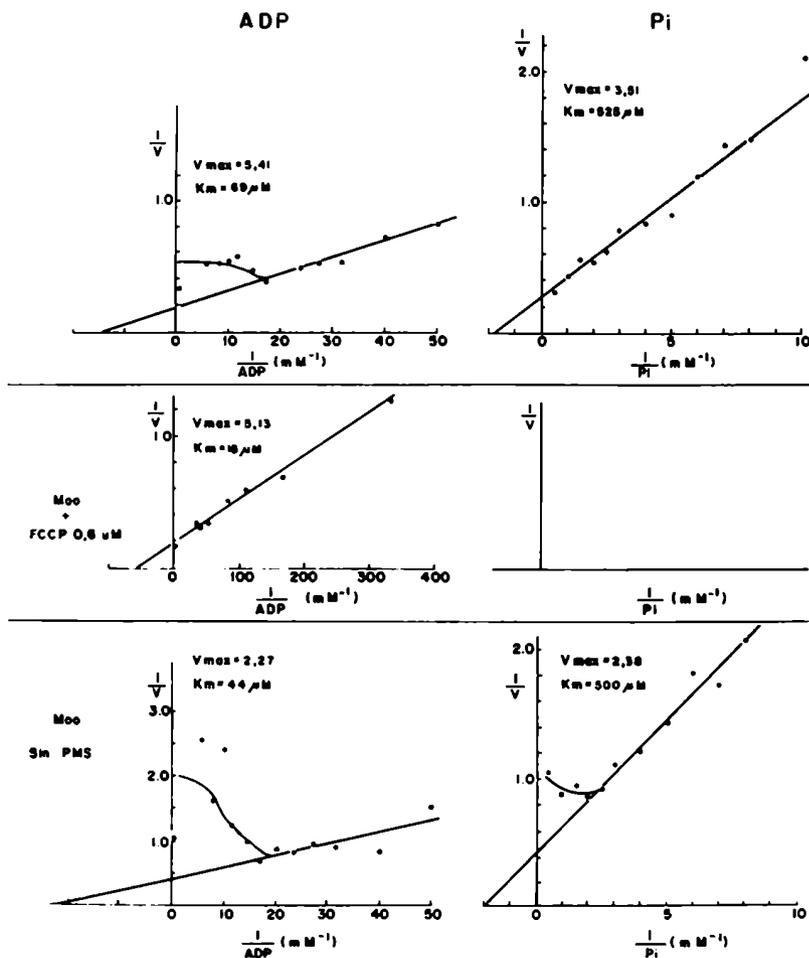


Figura 26

Características cinéticas aparentes respecto de Pi y ADP de la reacción de fotosforilación a 30°C cuando transcurre con baja velocidad al desarrollarse en ausencia de mediadores redox exógenos o cuando es catalizada por PMS pero estando parcialmente desacoplada por FCCP.

En todos los casos la concentración de cromatóforos es equivalente a 10 $\mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$. La nomenclatura de las membranas es la misma que la indicada en la Fig. 21.

La reacción se ensaya en mezcla de reacción estándar con PMS 50 μM salvo que se indique lo contrario. Se varió la concentración de ADP o de Pi, manteniendo el otro sustrato con una concentración de 2 mM.

En los dos casos en que se usa un desacoplante, se tituló previamente para lograr aproximadamente un 50% de inhibición.

Ver otra determinación de la K_m aparente para ADP de una membrana Moo sin PMS en la Fig. 41. En las Tablas 2 y 3 se da una descripción más amplia de las características de los experimentos presentados acá.

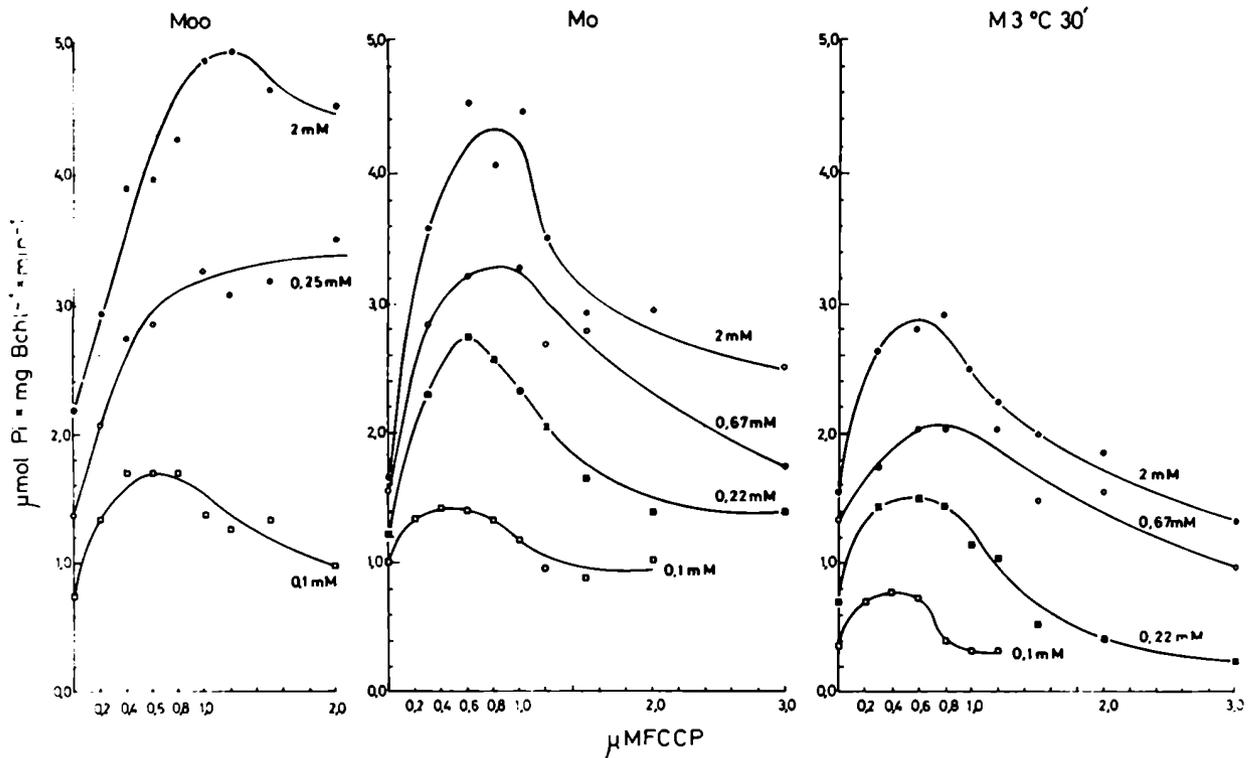


Figura 27

Inducción de la reacción de ATPasa de cromatóforos por un desacoplante (FCCP) a varias concentraciones de ATP/Mg y para tres tipos de membranas

La temperatura es 30°C y la reacción se desarrolla en oscuridad. Cada curva está identificada por la concentración de ATP y de Mg, que son a su vez isomolares. La concentración de cromatóforos es equivalente a 10 $\mu\text{g Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$ en los tres experimentos. Los tiempos de reacción son 30-45-60-90-120 seg y en todos los casos, con concentraciones mayores o iguales a 300 μM ATP/Mg, todo el curso de la reacción es rectilíneo (no se muestra). Para las concentraciones menores se deben estimar las velocidades iniciales.

Moo- Los cromatóforos se preparan tal como se describe en 'Materiales y Métodos'. Esta misma preparación de cromatóforos se usa para dar origen a las membranas Mo y M3°C 30'.

Mo- Las membranas fueron preincubadas en mezcla de fotofosforilación estándar en oscuridad y en hielo durante 30 min y luego fueron recuperadas por ultracentrifugación a través de un 'colchón' de sacarosa tal como se describe en la Fig. 21. Las membranas recuperadas se almacenaron en oscuridad y en hielo durante 12 hs antes de las mediciones de la actividad.

M3°C 30'- Las membranas fueron preincubadas en condiciones de fotofosforilación a 3°C durante 30 min. Luego fueron recuperadas y almacenadas como en el caso de Mo. Ver la representación de Lineweaver-Burk de estos resultados en la Fig. 28.

Obsérvese que i) Las membranas que sufren un pretratamiento (ya sea en luz o en oscuridad) seguido por una ultracentrifugación, muestran una concentración de FCCP óptima menor. ii) En cualquiera de los tres casos, a concentraciones menores de ATP/Mg, en general, también son menores las concentraciones de FCCP óptimas para la inducción de la actividad. iii) Parece detectarse un leve corrimiento hacia concentraciones de FCCP menores para estimular la máxima actividad en M3°C 30' respecto de Mo.

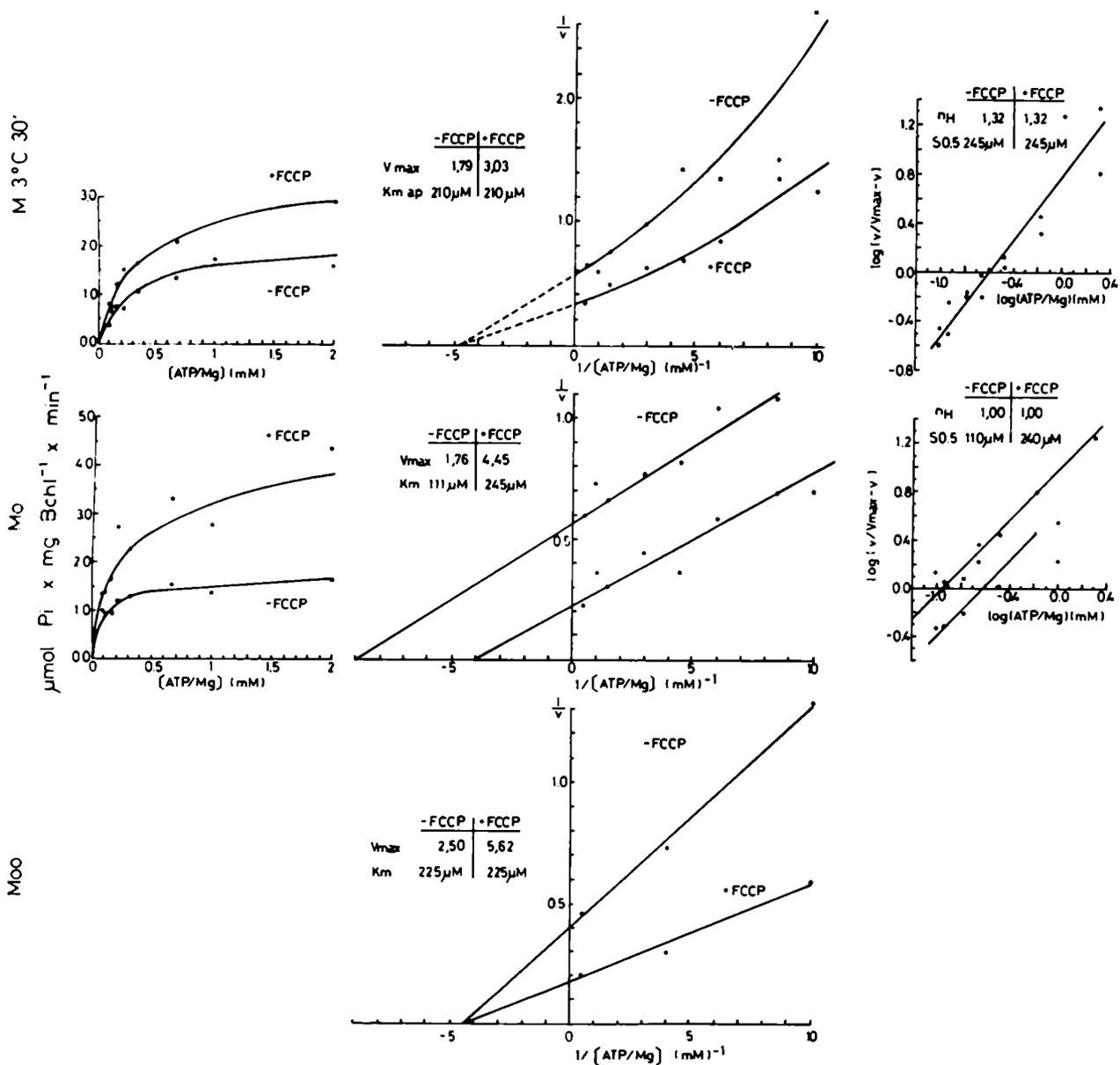


Figura 28

Comportamiento cinético aparente respecto de ATP/Mg de la reacción de hidrólisis de ATP a 30°C, constitutiva e inducida por concentraciones óptimas de desacoplante (FCCP), de membranas control (Moo y Mo) y de una membrana pretratada por fosforilación a baja temperatura (M3°C 30').

La información presentada acá proviene del mismo experimento del cual se muestra parte en la Fig. 27.

Los valores máximos de la actividad inducida por desacoplante para las concentraciones de ATP/Mg estudiadas en la Fig. 27 son los usados para la representación de "inversas". Para las demás concentraciones de ATP/Mg las concentraciones de FCCP usadas son elegidas en función de las concentraciones óptimas determinadas para las otras mencionadas condiciones de ATP/Mg. Así para las concentraciones de ATP/Mg 0,118 mM; 0,166 mM; 0,333 mM y 1,000 mM se usan respectivamente las concentraciones de FCCP: 0,7 μM; 0,7 μM; 0,8 μM y 1,0 μM para Mo y 0,4 μM; 0,4 μM; 0,5 μM y 1,1 μM para M3°C 30'.

Las inversas de las velocidades se expresan en (μmol Pi)⁻¹.mg Bchl.min.(n.m.): no se muestra. Sobre la base de tres experimentos similares a estos, se puede concluir que el comportamiento de la reacción de Moo y Mo, inducida o no por FCCP, es hiperbólico. En cambio, el de M3°C 30' tiene para ambos tipos de reacción un n_H=1,2 - 1,7. Todas las demás características se reprodujeron siempre con esencialmente los mismos valores mostrados en esta Figura, con la salvedad de que en Moo la Km de la reacción inducida puede ser diferente (doble o triple) que la de la constitutiva.

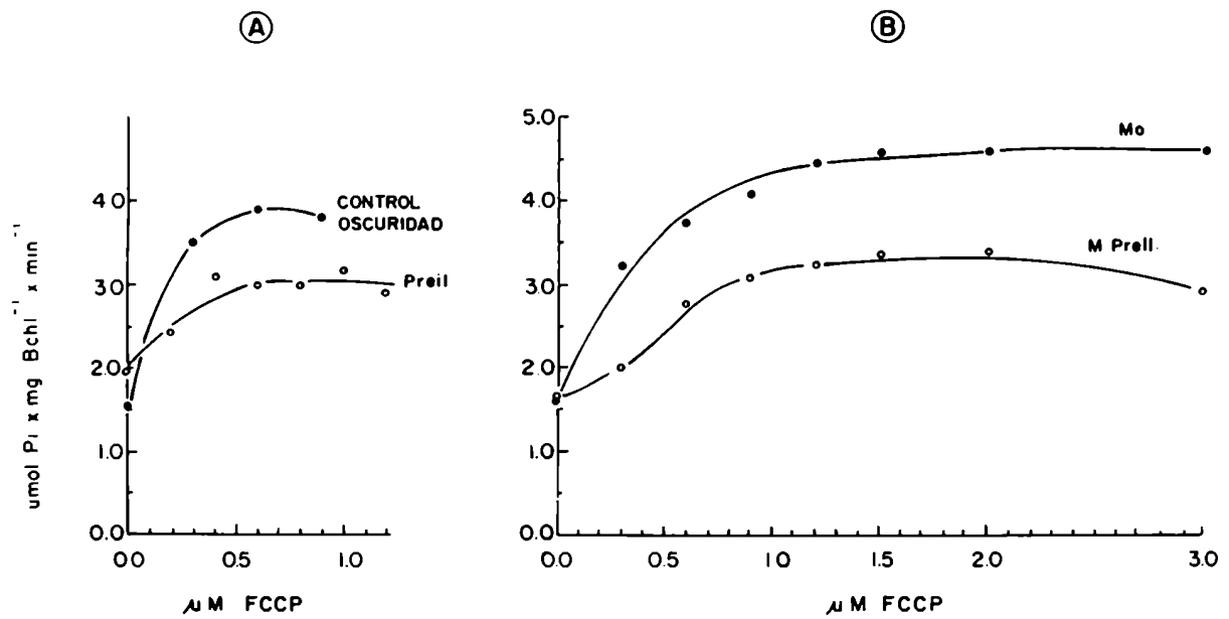


Figura 29

Hidrólisis de ATP constitutiva y su inducción por un desacoplante (FCCP) en membranas pretratadas por preiluminación a 30°C en ausencia de sustratos de fotofosforilación y en presencia de 50 μM PMS. Ver la leyenda en la pág.116.

Figura 29 (Leyenda)

Hidrólisis de ATP constitutiva y su inducción por un desacoplante (FCCP) en membranas pretratadas por preiluminación a 30°C en ausencia de sustratos de fotofosforilación y en presencia de 50 μ M PMS.

La intensidad de la luz durante la preiluminación es $600 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$.

A- Los cromatóforos se preiluminan durante 4 min en una mezcla de reacción de ATPasa carente de ATP y suplementada con PMS 50 μ M. Se usa la membrana descrita en "Materiales y Métodos" (Moo) y en concentraciones equivalentes a 13 $\mu\text{g Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$. Inmediatamente luego de apagar la luz, se completa la mezcla de reacción con 2 mM ATP y con las concentraciones de FCCP indicadas en el gráfico. La reacción de hidrólisis se desarrolla en oscuridad y se la registra tomando muestras (duplicadas) a los 1-2-3-4-5 min. El control se trata exactamente de la misma manera pero la preincubación se hace en oscuridad.

Una reacción de fotofosforilación, desarrollada en un ensayo paralelo inmediatamente luego del pretratamiento y desencadenada por el agregado de ADP y ^{32}Pi en concentraciones estándar, muestra que la membrana preiluminada está inhibida en un 65% respecto de la preincubada en oscuridad (no se muestra).

B- La capacidad de hidrólisis de ATP se estudia en membranas que fueron pretratadas y luego recuperadas por ultracentrifugación a través de un "colchón" de sacarosa. La mezcla de preincubación es la misma que en A.

La concentración de cromatóforos en el pretratamiento y en la posterior reacción de ATPasa es equivalente a 12 $\mu\text{g Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$.

La reacción de hidrólisis se ensaya en oscuridad en una mezcla de ATPasa estándar y con las concentraciones de FCCP indicadas en el gráfico. Los tiempos de reacción son 1-2-3-4 min y las muestras se toman por duplicado. En todos los casos, todo el curso de reacción es rectilíneo.

Mo- Las membranas fueron preincubadas 30 min en hielo y en oscuridad.

M Preil- Las membranas fueron preiluminadas 4 min a 30°C e inmediatamente, se transfirieron los tubos al hielo en oscuridad. Luego de finalizado el procesamiento de todas las alícuotas preiluminadas (ca. 1 h), se ultracentrifugaron los cromatóforos en un rotor Beckman R 30 a 30.000 RPM durante 90 min.

Todo el procedimiento de recuperación de los cromatóforos pretratados se hace en estricta oscuridad. Las membranas, así recuperadas, son almacenadas durante 12 hs en oscuridad y en hielo antes del estudio de las reacciones.

IV. Estudio de los gráficos de Arrhenius de las actividades de ATPasa y de fotofosforilación en cromatóforos *

IV.1 Introducción

La información bibliográfica indica que en Rhodospirillum rubrum y Rhodopseudomonas sphaeroides existe una discontinuidad en la pendiente del gráfico de Arrhenius de la actividad H^+ -ATPasa constitutiva de los cromatóforos. Este "quiebre" fue explicado como un reflejo de la posible existencia de una transición de fase termotrópica de "lípidos anulares" que rodearían al factor de acoplamiento (161,162).

Las discontinuidades de la pendiente en los gráficos de Arrhenius de las actividades enzimáticas de membrana indican, algunas veces, cambios en el estado ordenado o desordenado de los lípidos de membrana con acción sobre la actividad de la enzima (163). Pero también algunos otros fenómenos no relacionados con las transiciones de fase de los lípidos (83,89,164,165), como así también artificios (83,85) pueden causar dichas discontinuidades. En efecto, se debe asegurar un estricto control de las condiciones de reacción para que, a cada temperatura, se logre un mismo grado de optimización de la actividad.

El hecho de que una disminución de la temperatura produce un cambio drástico en la reacción inicial de la ATPasa de membrana (Capítulo V) y el panorama abierto por los resultados presentados en el Capítulo III, que sugieren cambios conformacionales en el sistema "factor de acoplamiento-membrana", impulsaron a reinvestigar la dependencia de la temperatura de algunas reacciones del sistema transductor de energía de esta bacteria, contemplando la posibilidad de que las propiedades de fase de los lípidos pudieran tener influencia sobre dichas reacciones, tal como fue sugerido por otros autores (161,162).

Para estudiar correctamente la dependencia de la temperatura y construir así los gráficos de Arrhenius para el cálculo de las energías de activación, se establecieron previamente para cada reacción y a dos temperaturas extremas, las condiciones óptimas de pH y de concentración de algunos factores importantes que en ellas participan.

Nishimura (166), en un estudio preliminar, determinó en R. rubrum la dependencia de la temperatura de la fotofosforilación endógena y de la mediada por PMS y concluyó que "... la baja velocidad de reacción a baja temperatura con iluminación continua es el resultado de la baja velocidad de un "proceso de oscuridad", probablemente el transporte de electrones".

Parte de estas investigaciones fueron realizadas en colaboración con la Lic. B.H. Tiraboschi.

IV.2 Estudio del gráfico de Arrhenius de la actividad ATPásica constitutiva e inducida por el desacoplante FCCP en cromatóforos.

Respecto de los factores que es necesario optimizar para el estudio del gráfico de Arrhenius de la actividad de ATPasa se hicieron los siguientes experimentos.

En la Fig. 30 se muestra el efecto del pH y se observa que, de los rangos de pH estudiados, el de 7,3 a 7,8 permite máxima actividad en cualquiera de las condiciones probadas.

Por otra parte, la Fig. 31 muestra que la concentración óptima de FCCP para estimular la ATPasa es levemente mayor a alta temperatura que a baja. También, y para todas las temperaturas, se observa un incipiente decaimiento de la inducción a concentraciones altas, ver discusión en pág. 18. Como causa de la dependencia de la concentración de FCCP óptima respecto de la temperatura, se podría postular que, dada la mayor actividad de la ATPasa a alta temperatura, es mayor la concentración de desacoplante necesaria para lograr un nivel de energía (óptimo) que permita máxima actividad, ver Introducción. Al mismo tiempo o alternativamente, se pueden considerar fenómenos estructurales inducidos por la temperatura (como, por ejemplo, permeabilidad a los protones o difusibilidad del FCCP dentro de la membrana) que provoquen la diferencia en la concentración óptima de desacoplante.

La Fig. 32 muestra el gráfico de Arrhenius del sistema ATPasa de membrana en condiciones aeróbicas y en oscuridad. Se observa que no hay discontinuidades en la pendiente del gráfico de Arrhenius de la actividad constitutiva (recta a). Tampoco las hay cuando la reacción se induce con concentraciones óptimas del desacoplante FCCP. En este sentido, y con la información de la Fig. 31, se eligieron dos rangos de temperatura en los que se usaron dos concentraciones diferentes de FCCP, tal como se indica en la Fig. 32 b.

Circunstancialmente, los estudios se hicieron a pH 8,0 en todas las temperaturas y condiciones, a pesar de que el límite superior de pHs óptimos para todas las condiciones, es en general algo menor. En estos experimentos no se han estudiado los efectos del buffer, ni los del catión, ni tampoco la saturación por ATP. Aunque respecto a esto último, considerando la Tabla 4 y el hecho de que la "curva de tiempo" de la reacción es rectilínea a todas las temperaturas estudiadas hasta por lo menos transformarse un 40% del sustrato original (2 mM), se puede concluir que el grado de saturación de la enzima debió haber sido similar y alto a todas las temperaturas*. De cualquier manera, los resultados encontrados sugieren que no se han cometido errores importantes en la optimización relativa de la reacción a cada temperatura en virtud del comportamiento lineal del gráfico de Arrhenius. Sin embargo, aún se puede contemplar la posibilidad de que ocurra alguno de los comportamientos rectos artificiales

(*) Obsérvese la semejanza de los valores de K_m presentados en la Tabla 4 respecto de los obtenidos en esta Tesis a 30°C (Fig. 28).

discutidos en 1.5.5.

Estos resultados están en contradicción con los de Kaiser y Oelze (161,162) en los cuales se muestra una discontinuidad en la pendiente del gráfico de Arrhenius de la actividad de ATPasa de membrana no inducida por desacoplante a temperaturas cercanas a los 20°C, siendo la rama de las temperaturas bajas la que tiene una E_a aparente mayor. Los resultados de estos autores se indican en la Tabla 4. La explicación de esta discrepancia yace, según nuestros experimentos, en el comportamiento cinético complejo que tiene la ATPasa (en especial a bajas temperaturas) y que consiste en que la reacción entra en estado estacionario sólo luego de tiempos variables. A temperaturas mayores, este comportamiento es menos evidente, ver Capítulo V y Fig. 44. En efecto, Kaiser y Oelze han medido la reacción a un tiempo fijo que fue diferente según la temperatura (mayor cuanto más baja). Para ello preseleccionaron aquellos tiempos que proveían velocidades "constantes" en gráficos de velocidad aparente en función del tiempo (161). Dichos autores, al realizar esa preselección, reconocieron que la velocidad de la reacción, especialmente a bajas temperaturas, aumentaba con el tiempo, tal como lo indican en (162). Sin embargo, al considerar que la velocidad aparente podía llegar a tomar valores constantes cometieron un error teórico pues el gráfico de velocidad aparente vs. tiempo, sólo puede dar en un caso de fase pre-estado estacionario de duración considerable, un valor de velocidad real asintótico. La virtual estabilización de la velocidad aparente en un valor constante podría ser originada por valores de la reacción que entran dentro del error del método (enzimológico-espectrofotométrico), tal como se puede ver en la Fig. 33. El error no es despreciable y según esta Tesis origina un "quiebre" aparente en el gráfico de Arrhenius. Este "quiebre" es potenciado, además, si no se controla adecuadamente el pH a cada temperatura, en especial si se usa buffer Tris.

Por otra parte, usando concentraciones óptimas de FCCP disminuye considerablemente la fase pre-estado estacionario (ver Capítulo V), de manera que si se midiese la reacción inducida por desacoplante usando un sólo tiempo no se cometerían errores importantes. De la misma manera, el error de una extrapolación a tiempo cero de la actividad constitutiva a temperaturas altas es menos importante. En efecto, hay una mejor correlación entre nuestros resultados y los de Kaiser y Oelze a temperaturas por encima de la del "quiebre" presentado por ellos, comparar las Tablas 5 y 4 respectivamente.

Por otro lado, si con la información disponible en esta Tesis se estima la velocidad con el mismo criterio que lo hicieron Kaiser y Oelze, el gráfico de Arrhenius se transforma en el presentado por ellos, y a su vez, procesando las curvas de velocidad aparente vs. tiempo presentadas por Kaiser en (161), de manera tal de

construir a partir de aquellas las respectivas curvas de tiempo, se obtienen gráficos de Arrhenius con comportamiento lineal y con una energía de activación similar a las mostradas acá.

La reacción que es más sensible a una desoptimización diferencial de las condiciones experimentales es la inducida por FCCP. En efecto, la Fig. 30 muestra que si el pH es algo superior a 8,0, la reacción a baja temperatura se desoptimiza respecto de la que se desarrolla a temperaturas superiores. Esto ocurre, involuntariamente, si se usa por ejemplo, buffer Tris-ClH ajustado a pH 8,0 a temperatura ambiente, y se lo utiliza luego a baja temperatura en la medición de la reacción, pues el pH del buffer sube al bajar la temperatura.

Es interesante señalar que este buffer es uno de los que varían más su pH con la temperatura: $-0,03 \text{ UpH.}^\circ\text{C}^{-1}$ (131).

Es por eso que en los gráficos de Arrhenius en los cuales no se controló el pH ni se utilizó una concentración óptima de FCCP a cada temperatura (tal como se discutió más arriba), se observan quiebres hacia abajo en el caso de la reacción inducida por FCCP, pero no en la constitutiva. Ese "quiebre" puede ser "corregido", con los mismos datos experimentales, usando la información de las Figs. 30 y 31.

Por otro lado, hay evidencias preliminares que indican que el uso de una relación 7 mM ATP/1 mM Mg^{+2} en lugar de la estándar (2 mM/2 mM), no modifica significativamente la E_a de la actividad constitutiva, ver Tabla 5.

En la Tabla 5 quedan resumidos los resultados de los diversos experimentos realizados.

Es interesante señalar que en los experimentos llevados a cabo con diferentes preparaciones de membrana, aunque la E_a es relativamente invariante, se presenta alguna diferencia en la "ordenada al origen" de la representación de Arrhenius, especialmente en la actividad constitutiva. Esto es el reflejo de los distintos grados de inducción de la actividad por desacoplante, tal como se indica en la Tabla 5, y puede ser explicado proponiendo que las diferentes preparaciones de membrana tienen per se distintos grados de desacople.

Como primera conclusión y en relación con los antecedentes bibliográficos y la hipótesis general de trabajo, con estos resultados queda descartado que haya cambios termotrópicos en la actividad de la H^+ -ATPasa unida a membrana reflejables en un gráfico de Arrhenius.

Como la hipótesis que condujo estas investigaciones giraba alrededor de la posible existencia de una interacción entre lípidos y proteínas en el funcionamiento de la H^+ -ATPasa de la membrana cromatófórica, detectable en un gráfico de Arrhenius, se prestó una atención especial a la "historia" previa de los cromatóforos.

A tal efecto se compararon los gráficos de Arrhenius de la reacción catalizada por cromatóforos que fueron almacenados a -70°C con los que lo fueron en hielo y también con cromatóforos que fueron preparados con células recién cosechadas (sin congelamiento alguno) o de células que fueron almacenadas a -70°C durante períodos de tiempo variables. El efecto del tiempo, sin embargo, no fue estudiado de manera sistemática.

En efecto, se puede sospechar que las actividades enzimáticas de membrana sufran modificaciones irreversibles en sus propiedades cinéticas, si los cromatóforos son pretratados con muy bajas temperaturas (comportamiento histerético respecto de la temperatura); en relación con esta hipótesis véase (161,166).

En estos experimentos no se han encontrado diferencias significativas, provocadas por los pretratamientos de temperatura señalados arriba, ni para la actividad constitutiva ni para la inducida. Tampoco hay diferencias entre las cepas FR1 y W de R. rubrum (Tabla 5).

Un nivel óptimo de inducción de la reacción por desacoplante sólo cambia el factor no exponencial de la ecuación de Arrhenius (ordenada al origen de la representación), ver Fig. 32. Esto sugiere que, como la E_a no cambia, el paso catalítico que limita la reacción global en los sistemas constitutivo e inducido es el mismo y no varía en el rango de temperatura probado.

A su vez, la modificación de la velocidad (una estimulación máxima, con la concentración elegida de desacoplante) podría ser el resultado de una disminución en la concentración de protones que ejercería su efecto a través de la Ley de Acción de Masas^{*}, frenando la reacción. Sin embargo, no se puede descartar alguna acción regulatoria indirecta de los protones, en especial porque a concentraciones mayores de desacoplante la actividad se inhibe e incluso muestra velocidades menores que las de la reacción constitutiva, ver Introducción y Figs. 31, 27 y 56. Lamentablemente, aquí no se estudió el gráfico de Arrhenius de la reacción de hidrólisis de ATP inhibida por concentraciones saturantes de FCCP a todas las temperaturas. Con la primera hipótesis y sobre la base de la Teoría de Colisiones, no es necesario postular ningún cambio en las constantes que representan tanto la frecuencia de colisión como la orientación de las moléculas colisionantes que participan en el paso limitante, tal como lo indicaría un cambio (aumento) del factor no exponencial, ver Introducción (1.5.2). En efecto, el aumento de la velocidad podría ser sólo la consecuencia de la disminución de la retropresión de protones que induce la reacción inversa (síntesis de ATP).

(*) Aquí se toma a la Ley de Acción de Masas con un criterio amplio que abarca tanto el componente químico como el eléctrico.

IV.3 Estudio de los gráficos de Arrhenius de la actividad de fotofosforilación endógena (en ausencia de mediadores del transporte de electrones).

Para optimizar las condiciones de reacción se estudió el efecto del pH sobre la fotofosforilación endógena a dos temperaturas extremas (Fig. 34). En todos los casos el pH = 8,0 provee máxima actividad.

La Fig. 35 a y b muestra el gráfico de Arrhenius de la actividad endógena en aerobiosis y anaerobiosis. En condiciones aeróbicas se encuentran dos tipos de comportamiento.

En algunos experimentos, con membranas "frescas" (midiendo 24 hs después de su preparación) se detecta un sólo punto de "quiebre" localizado ca. 8-15°C (Fig. 35 a, representación I). El envejecimiento de esta misma preparación (2 a 3 días en oscuridad y en hielo) da lugar a una membrana que muestra tres puntos de "quiebre" alrededor de 20°C, 10°C y 6°C (no se muestra). Un comportamiento similar a éste puede ser encontrado con algunas preparaciones de membrana recién obtenidas (Fig. 35 a, representación II).

La disminución de la energía de activación aparente a valores cercanos a 0 Kcal.mol⁻¹ en ciertos rangos de temperatura, no podría estar determinada por un efecto de la temperatura solamente a nivel del factor de acoplamiento, pues no ocurre con otras condiciones que afectan el transporte de electrones, ver las consideraciones que se exponen más abajo.

En general y tal como se indicó arriba, el patrón del gráfico de Arrhenius de la fotofosforilación endógena, parece cambiar y la actividad inhibirse de manera continua con el tiempo desde su preparación (no se muestra), sugiriendo una modificación paulatina de los factores que gobiernan el transporte de electrones. En efecto, la actividad de la misma preparación envejecida, pero catalizada por PMS 50 µM a 30°C tiene una velocidad similar a la de la preparación nueva, ensayada en iguales condiciones (no se muestra), lo que indica que, de manera global, no hay daños a nivel del factor de acoplamiento ni tampoco a nivel de la conservación de la energía.

Se acepta generalmente que un cambio de la pendiente indica que es otro paso el limitante de la reacción global (en el caso de reacciones acopladas), o que el mecanismo de un mismo paso ha cambiado. Tal como se demuestra comparando con la Fig. 36, el condicionamiento térmico de la capacidad de "turnover" de las moléculas del factor de acoplamiento no es el limitante de la velocidad del sistema endógeno dentro de ese rango de temperaturas. En efecto, la adición de concentraciones catalíticas de PMS aumenta considerablemente (unas 10 veces) la actividad de síntesis de ATP. Por lo tanto, al medir la fotofosforilación endógena, el paso limitante

que se detecta es otro, muy probablemente el transporte de electrones.

Si eso fuera así, se puede proponer en un primer modelo, que en los rangos de temperaturas de 8-15°C a 2°C en algunos casos (Fig. 35 a, representación I) o de 20°C a 10°C y de 6°C a 2°C, en algunos otros (Fig. 35 a, representación II), se está detectando un mecanismo de transporte de electrones que tendría una alta eficiencia, dada la muy baja energía de activación. A su vez, los rangos de alta energía de activación aparente podrían estar reflejando alguna transformación del sistema de transporte de electrones, de manera tal que las velocidades resultantes medidas sean diferentes. Este cambio sería continuo, pero ocurriría sólo dentro de algunos rangos de temperatura. Dicha transformación originaría únicamente un cambio reflejable en el factor no exponencial y no cambiaría la energía de activación, que sería para todas las temperaturas similar y muy baja. En términos de la Teoría de las Colisiones, lo que podría cambiar (optimizándose) de manera continua al elevar la temperatura en los intervalos señalados, sería la orientación de las moléculas colisionantes que participan en el paso limitante.

Obviamente existe otra posibilidad. El segundo modelo difiere del primero sólo en la interpretación de las "ramas" de alta energía de activación aparente. En efecto, en este modelo igual que en el primero, en las zonas de baja energía de activación, la transferencia de electrones es menos dependiente de la temperatura y por lo tanto conformaría un mecanismo de transporte de electrones de alta eficiencia. Las zonas de energía de activación alta, serían interpretadas por este modelo como la manifestación de la operación de un mecanismo de transporte electrónico diferente (menos eficiente).

Siguiendo con el segundo modelo, nótese que a baja temperatura, en la Fig. 35 a, representación I, o para cada transición "alta a baja" E_a , como se muestra en la Fig. 35 a, representación II, el factor no exponencial disminuye. Esto significaría, en base a la Teoría de las Colisiones, que tal vez, la orientación de las moléculas colisionantes (transportadores redox) está obstaculizando el transporte de electrones. Sin embargo, un contacto de los transportadores cuando están con la orientación correcta, conduciría a una transferencia de electrones de una manera más eficiente que a temperaturas mayores donde habría un cambio de entalpía de activación mayor, ver Introducción (1.5.2). A su vez, en el primer modelo, la desoptimización en la orientación de las moléculas colisionantes (disminución del factor no exponencial) también sucedería al disminuir la temperatura pero de manera continua en ciertos intervalos, a diferencia del segundo modelo donde sólo ocurriría en los puntos de "quiebre".

De manera alternativa o simultáneamente, el hecho de que en los intervalos

de temperatura donde, aún habiendo caído el valor de E_a a niveles muy bajos, la velocidad de la reacción es casi idéntica a la que muestran los puntos pertenecientes a la rama de E_a alta (y por lo tanto, manifestantes del otro hipotético sistema de transporte de electrones) podría explicarse admitiendo que un cambio drástico en las características de la membrana impone una nueva distribución energética de las moléculas reaccionantes. Esto ocurriría a través de una disminución del número de aquellas moléculas con energía suficiente para reaccionar. Esta última propuesta es totalmente compatible con la disminución observada en la energía de activación. De manera análoga a esto, se han propuesto modelos (168) en los que el transporte electrónico puede ocurrir por difusión al azar de los transportadores de electrones, pero donde se pueden lograr velocidades "microscópicas" mayores mediante la formación de complejos transitorios entre los pares redox apropiados. Así, en los experimentos presentados aquí, sólo dichas formas podrían reaccionar a baja temperatura, aumentando la eficiencia de la transferencia de electrones pero al mismo tiempo disminuyendo el número de moléculas capaces de entrar en este estado, dando cuenta así de las velocidades menores medidas. Esta situación podría surgir de modificaciones estructurales y/o restricciones provocadas por la baja temperatura.

El segundo modelo presupone la restricción de que, tal como se mencionó antes, la transición desde zonas de alta a baja E_a (o viceversa) ocurre de una manera en la que una modificación, tanto del término exponencial como del no exponencial de la ecuación de Arrhenius, permita la existencia de puntos comunes que estarían determinados por ambos hipotéticos mecanismos de transporte electrónico. Sin embargo, esto resultaría una coincidencia llamativa, porque el supuesto en el que se basa, es sólo una de las muchas diferentes modificaciones que podrían haber ocurrido, pues a priori; el cambio hipotético en el sistema de transporte de electrones podría proceder a través de la adopción de cualquier valor de E_a y/o del factor no exponencial.

Desde otro punto de vista, la baja energía de activación detectada sugeriría que el paso limitante podría ser un fenómeno de índole física (80).

Es interesante notar que en condiciones anaeróbicas hay una modificación sustancial del gráfico de Arrhenius el que está caracterizado por tener un "quiebre" hacia abajo a los 12°C y por la ausencia de zonas de muy baja energía de activación (Fig. 35 b). Sin embargo, para considerar esta información, se debe tener en cuenta que no se estudió el pH óptimo para temperaturas altas y bajas sino que se usó un pH = 8,0, que es el óptimo para las temperaturas extremas en el sistema endógeno aeróbico. Tampoco se estudió una eventual influencia directa de las enzimas glucosa oxidasa y catalasa sobre el sistema de transporte electrónico endógeno.

Este resultado (controles adecuados mediante) podría constituirse en otra prueba de que es realmente el transporte electrónico el paso limitante medido, dado que la interpretación inmediata del efecto de la presencia o ausencia de oxígeno sería a nivel del potencial redox de la mezcla de reacción modificando el estado redox de los constituyentes del sistema de transporte de electrones, ver por ej. (169).

IV.4 Estudio de los gráficos de Arrhenius de las actividades de fotofosforilación mediada por agentes redox exógenos: PMS y TMPD.

En las Figs. 12 y 13 se estudia el efecto del pH sobre la fotofosforilación catalizada por PMS a diferentes temperaturas. Por debajo de 18°C, el pH óptimo es 8,7, mientras que a 30°C es 8,0.

En las Figs. 10 y 11 se observa que la saturación de la fotofosforilación por PMS se alcanza a concentraciones mayores a temperaturas más altas, ver discusión más abajo.

A diferencia de lo observado para la reacción endógena, el gráfico de Arrhenius de la fotofosforilación catalizada por PMS 200 μM en condiciones aeróbicas es lineal en todo el rango de temperaturas estudiadas, ver Fig. 36. Se debe recalcar que a temperaturas bajas (menores de 20°C) se considera la primera fase de la reacción (no inhibida), ver el Capítulo III.

El comportamiento parece ser independiente de la cepa usada. Sin embargo hay diferencias según los cromatóforos y/o las células de las cuales provienen hayan sido congelados (-70°C, 2-60 días) o no (preparación de los cromatóforos inmediatamente luego de cosechadas las células y mantenidos luego en hielo 0-48 hs), ver Tabla 6. Con este último tipo de cromatóforos, se obtiene un "quiebre" hacia abajo en el gráfico de Arrhenius entre los 10 y 20°C si se usa PMS 50 μM para todo el rango de temperatura. Esto se evita si se eleva la concentración de PMS a 200 μM , tal como ya se mostró en la Fig. 36. Sin embargo, con cromatóforos y/o células congeladas el gráfico de Arrhenius, aún medido con PMS 50 μM , es recto en toda su extensión (3-38°C).

La explicación del comportamiento de los cromatóforos "no congelados" es que PMS 50 μM no es saturante para altas temperaturas aunque sí lo es para las bajas (Figs. 10 y 11). En efecto, con esa información acerca del grado de saturación se pudieron rectificar los gráficos que presentaban "quiebre".* Cabe señalar además, que en los experimentos con PMS 50 μM , la E_a de la rama de baja temperatura es algo mayor que la encontrada con los cromatóforos "congelados", aunque no se dispone de una explicación obvia para este comportamiento.

En el caso de los cromatóforos "congelados", una razón posible es que el proceso de congelamiento, ya sea sólo de las células como también de los cromatóforos

(*): Un quiebre similar al artificial encontrado acá es mostrado por Nishimura (166) en un experimento donde se usa PMS 110 μM .

provenientes de aquellas, cambie la estructura de la membrana, de manera que PMS 50 μM sea saturante para todo el rango de temperaturas; esta hipótesis no fue específicamente contrastada, nótese que las curvas de saturación mostradas en las Figs. 10 y 11 fueron hechas con membranas "no congeladas". Sin embargo, la propuesta es coherente con la forma recta del gráfico de Arrhenius y con la conclusión del Capítulo III en el sentido de que, por lo menos a baja temperatura, el paso limitante en la síntesis de ATP es la disipación de energía a nivel del factor de acoplamiento, dado que, tal como ya fue tratado en el Capítulo III, el "quiebre" del curso de la reacción a baja temperatura ocurre independientemente de que los cromatóforos hayan sido congelados o no.

Sin embargo, los experimentos realizados con cromatóforos "congelados" a alta temperatura (30°C) sugieren que el nivel de energía de la membrana alcanzado en esas condiciones no sería mucho mayor que aquel necesario para lograr una máxima velocidad de síntesis de ATP. En efecto, si el proceso de inhibición estudiado a baja temperatura depende sólo de la existencia de una "sobreenenergización", entonces también debería manifestarse a altas temperaturas siempre que se lograra establecer a dicha alta temperatura condiciones similares de desbalance entre la velocidad de acumulación de energía (gradiente electroquímico de H^+) y la de disipación a través de la síntesis de ATP a nivel del factor de acoplamiento. Pero esto no es lo que ocurre, ya que la reacción de fotofosforilación transcurre sin aparecer ninguna inhibición en su curso, por lo menos hasta 3-4 min. Así se podría postular que el nivel de energía mantenido por el transporte de electrones sería justo el necesario, o sólo levemente superior, como para mantener una velocidad de fotofosforilación máxima a esa alta temperatura.

De manera análoga a la discutida para la reacción de ATPasa, no parece haber un error de desoptimización diferencial de la reacción, dada la linealidad de la representación de Arrhenius. Sin embargo, también se debe considerar la posibilidad de un proceso de rectificación artificial de un gráfico de Arrhenius intrínsecamente "quebrado" hacia arriba que surja de desoptimizaciones de uno o más factores independientes a diferentes temperaturas extremas, ver Introducción (1.5.5)

No se puede asegurar que, en las condiciones de la Fig. 36, el paso limitante sea, a todas las temperaturas, la disipación de energía por el factor de acoplamiento al sintetizar ATP. Sin embargo así quedó propuesto en el caso de temperaturas bajas para explicar los resultados del Capítulo III. En su apoyo se debe señalar que usando cromatóforos no congelados la reacción está saturada de PMS (200 μM) en los extremos del rango de temperaturas estudiado. Por otro lado, ya fue demostrado que a bajas temperaturas la reacción está saturada respecto.

de la intensidad de luz (Fig. 14). Sin embargo, para las altas temperaturas sólo se tiene la evidencia indirecta que se presenta a continuación.

- 1) Considerando que la radiación es perpendicular a los tubos de ensayo (colimada) y usando para la suspensión de cromatóforos el coeficiente de extinción para bacterioclorofila en membrana EmM (880 nm; 1 cm) = 140 y un peso molecular de la bacterioclorofila de 1000 (113) se puede calcular que la transmitancia en la mitad (eje) del tubo de ensayo (5 mm) es 85,1% para una concentración de cromatóforos equivalente a $1 \mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$ y 20% para $10 \mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$. Por lo tanto, usando $1 \mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$, tal como se hace en la Fig. 36, a alta temperatura hay una intensidad de luz 4 veces más intensa que la que ya es ampliamente saturante a bajas temperaturas cuando se usan $10 \mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$ (Fig. 14). Esta información y el hecho de que el gráfico de Arrhenius es recto sugieren que, en efecto, la intensidad de luz es saturante para todas las temperaturas.
- 2) Por otro lado, se observa en la Fig. 37 que cuando se utiliza $1 \mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$ y PMS saturante ($200 \mu\text{M}$), aún iluminando através de un filtro rojo (disminuye en un 10% la luz incidente que excita la bacterioclorofila (880 nm) y elimina totalmente las frecuencias del otro extremos del espectro de absorción de los cromatóforos, ver Fig. 9) se tiene un curso de reacción idéntico al logrado con luz blanca (provista por exactamente la misma fuente anterior pero sin el mencionado filtro). Este experimento descarta la influencia de una fotodescomposición del PMS (ver Capítulo III) sobre la reacción de fotofosforilación y corrobora que a bajas temperaturas el sistema está saturado de luz.
- 3) Cabe señalar que usando cromatóforos provenientes de células congeladas, en concentración $10 \mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$ e iluminando con luz blanca se obtienen para todas las temperaturas las mismas velocidades que en la Fig. 36 y por lo tanto la misma energía de activación (experimento N°8 de la Tabla 6).

Como hipótesis alternativa, se podría proponer como paso limitante a algún tramo del transporte de electrones existente en presencia del "bypass" establecido por el PMS.

Si se acepta que es la síntesis de ATP el paso limitante medido, puede ser deducido, tal como lo fue para la reacción de hidrólisis, que no hay transiciones de fase termotrópicas que afecten la reacción de síntesis de ATP a nivel del factor de acoplamiento. De cualquier manera, no las habría tampoco a otro nivel.

También se estudió el efecto de la temperatura sobre la fotofosforilación mediada por el agente redox TMPD que transporta sólo electrones (169).

En la Fig. 38 se estudia el efecto del pH en condiciones aeróbicas y anaeróbicas a dos temperaturas extremas, sobre la fotofosforilación catalizada por TMPD.

De manera similar a la encontrada con PMS, la concentración que provee el 50% de la velocidad máxima de fotofosforilación, es mayor a temperatura alta que a baja (Fig. 39). La Fig. 40A sugiere que el gráfico de Arrhenius de la fotofosforilación mediada por TMPD comparte un patrón similar con aquel que muestra la reacción mediada por PMS (Fig. 36), mientras que si se usa una concentración de TMPD no saturante en todo el rango de temperaturas se observa un "quiebre" artificial.

Se quiso establecer si el grado de saturación de la reacción por ADP era similar en todo el rango de temperaturas. En la Fig. 41 se estudia el comportamiento de saturación aparente por ADP, a P_i 2 mM constante. Se observa que en la reacción endógena, y en la catalizada por PMS 200 μ M, existe un fenómeno de inhibición por sustrato. Sin embargo, tanto el grado de inhibición por sustrato en las condiciones estándar de reacción como la K_m aparente son similares en las tres temperaturas probadas para cada uno de los sistemas de transporte de electrones estudiados (Tabla 3).

De la misma manera, la K_m aparente para P_i , a ADP 2 mM constante, es similar a temperaturas bajas y altas, ver Figs. 4 y 24. Esto último se estudió sólo en el caso de la reacción catalizada por PMS 50 μ M.

También hay evidencias preliminares de que, tanto para el caso de la fotofosforilación endógena, como para el de la catalizada por PMS, los gráficos de Arrhenius construidos con las velocidades observadas cuando las condiciones experimentales son las estándar son prácticamente similares a los construidos con las velocidades máximas (saturación de ADP), ver Fig. 42*.

Se quiso saber si la energía de activación de la reacción de fotofosforilación catalizada por PMS 200 μ M podía depender del nivel de energía de la membrana. La Fig. 43 A y B muestra que disminuyendo la intensidad de luz de manera tal que la velocidad de fotofosforilación disminuya entre un 40 y un 75%, no cambia significativamente el valor de E_a , por lo menos en un rango de temperaturas bajas. El comportamiento del gráfico de Arrhenius de dicha reacción (Fig. 43 A y B) es claramente diferente respecto del de la reacción endógena en ese mismo rango de temperaturas (Fig. 43 C, ver además la Fig. 35 a). El "quiebre" que se observa en la Fig. 43 A a altas intensidades de luz es interpretado como una desaturación de luz a alta temperatura, encontrada en ese caso especial debido al hecho conjunto de que se ilumina sólo con una fracción del espectro y se usan concentraciones de cromóforos relativamente altas ($10 \mu\text{g Bchl. ml}^{-1}$). Se podría proponer, entonces, que a alta temperatura la membrana estaría más desacoplada que a baja temperatura, esto es, sería más permeable a los protones. O, más en general, que la eficiencia de la

(*) Nótese que la carencia de suficientes temperaturas experimentales en la Fig. 42 A no permite hacer comparaciones directas con la descripción completa mostrada en la Fig. 35 a.

transducción energética sea menor a temperaturas altas.

Esta información es relevante para hipótesis que propongan que el comportamiento diferencial de los gráficos de Arrhenius de la reacción endógena respecto de la catalizada por PMS depende en realidad, sólo del nivel de energía de la membrana y no del sistema de transporte de electrones particular y que la actividad del factor de acoplamiento sea en todos los casos un paso limitante controlado por la temperatura. Lamentablemente en estos experimentos preliminares, disminuyendo la luz no se lograron velocidades suficientemente bajas como las de la reacción endógena.

La manifestación de un mismo valor de E_a en los mencionados experimentos es difícil de explicar, pues es claro que con esa baja intensidad de luz, el aporte de energía es por su cuenta limitante para la reacción global. Podría ser, entonces, que la energía de activación detectada sea la de un paso limitante a nivel del transporte de electrones establecido por el PMS, al menos en condiciones de luz baja, y que sea una mera coincidencia el hecho de que su valor sea igual al de la reacción que está saturada de luz y de PMS.

Sin embargo, se puede considerar otra hipótesis respecto de la interpretación de la energía de activación del sistema de fotofosforilación mediada por PMS. Esto es que la reacción esté limitada por dos factores diferentes; por un lado, por la temperatura directamente sobre la velocidad de reacción del factor de acoplamiento y por otro, por el nivel de energía de la membrana. Se propone un modelo sobre esto más abajo.

El hecho de intentar la disminución del nivel de energía en la Fig. 43 mediante una disminución drástica de la intensidad de la luz entraña un problema de interpretación. En efecto, aunque la velocidad aparente medida disminuye, se podría postular que en cierto grado ese resultado sea la expresión de la actividad de un gradiente de poblaciones de cromatóforos diferencialmente iluminadas a lo largo del camino de la luz en el tubo de ensayo. De manera tal que los que están inmediatamente cercanos a la superficie del tubo están saturados de luz (a bajas temperaturas se saturan con baja intensidad) y los que están más atrás están desaturados o incluso inactivos. Así, la disminución de la velocidad normalizada en términos de Bchl sería análoga a la inactivación de una enzima y el experimento sería equívoco. No se puede descartar la existencia de dicho fenómeno pero, sin embargo, hay dos fenómenos cualitativos que aparecen al disminuir la luz que no se pueden explicar de ninguna manera que no implique la existencia de una desaturación de luz a nivel "microscópico" de la mayoría de los cromatóforos. Estos son la aparición y alargamiento de un "lag" o fase de aceleración y la desaparición del "quiebre" en el curso de la reacción, ver Capítulo III y Figs. 7 y 14.

Así se tiene la evidencia de que existe una desaturación de luz intrínseca para mayoría de los cromatóforos y es lícita la discusión acerca de los gráficos de Arrhenius de las Figs. 43 A y B donde se usan intensidades de luz limitantes.

IV.5 Discusión general

Para tratar de justificar la propuesta de dos factores limitantes y en consecuencia el posible control de la temperatura a dos niveles diferentes, se hicieron las siguientes consideraciones.

Cuando se establece un sistema de transporte de electrones mediado por PMS, se observa un "lag" o fase de aceleración pre-estado estacionario en el curso de la reacción de fotofosforilación, en casos en los que por ejemplo, el sistema no está saturado de PMS (Figs. 10 y 11) o cuando se lo desacopla con FCCP (Fig. 17) o cuando se limita la intensidad de luz por debajo de cierto umbral (Fig. 14).

Se acepta como hipótesis de trabajo que el "lag" observado con bajas concentraciones de PMS es homólogo a los provocados por FCCP o por disminución de la intensidad de luz y no se debería al tiempo en que tarda en difundir el PMS en la membrana. Dicho "lag" representaría en los tres casos el tiempo necesario para lograr en la membrana un alto nivel de energía. Se debe contemplar esto último pues no se hicieron experimentos donde se preequibre la membrana con PMS; en todos los casos mencionados arriba la reacción se desencadenó con el agregado de cromatóforos. El resultado con el desacoplante FCCP es claro en aquel sentido, pues no se puede asimilar el tiempo de duración del "lag" con el tiempo que tarda el desacoplante en difundir y saturar la membrana pues, en todo caso, el resultado debería ser precisamente inverso al encontrado.

Teniendo en cuenta lo anterior, es necesario explicar cómo los sistemas catalizados por PMS tienen, cuando la reacción de síntesis de ATP está desoptimizada, el mencionado "lag" manifestando, sin embargo, velocidades de reacción en el estado estacionario del mismo orden o aún mucho mayores que las del sistema endógeno tanto a alta (30°C) como a baja (3°C) temperatura, mientras que la reacción mantenida por el sistema endógeno entra en estado estacionario en tiempos mucho más cortos, ver Figs. 10 y 11.

En términos quiosmóticos clásicos, se debería esperar un "lag" en el curso de la reacción de síntesis de ATP de duración inversamente proporcional al "input" de energía y por lo tanto a la velocidad de síntesis de ATP en el estado estacionario (197).

De manera concordante Keister y Minton (170) no encontraron "lag" ni en el tiempo ni en la intensidad de la luz en la reacción de fotofosforilación endógena de R. rubrum. En cambio, tampoco encontraron "lag" de tiempo en la reacción mediada por PMS 20 μ M. Esto está en contraposición con lo mostrado en esta Tesis. Sin embargo, como el rango de tiempo estudiado por dichos autores fue muy corto (hasta 15 seg) no se descarta acá que luego la velocidad hubiese aumentado. Dichos

autores indican, también, que las preparaciones envejecidas en las que la velocidad de síntesis está severamente disminuída se encuentra un "lag" en la intensidad de luz. Igual efecto causa el desacoplante CCCP.

En cloroplastos, por otro lado, existen ambos tipos de "lag" y son interpretados como el reflejo del tiempo necesario para lograr un alto nivel de energía (171-174).

De acuerdo con propuestas de otros autores en cloroplastos (128) y en cromatóforos (115), resulta pertinente considerar acá que el mecanismo de translocación de protones es diferente según el sistema de transporte de electrones sea el endógeno o el mediado por un agente redox artificial (por ej. PMS). En efecto, se sabe que el PMS desvía el curso natural de circulación de electrones y como él mismo transporta protones en el ciclo redox, entonces establece un mecanismo de intrusión artificial de H^+ al espacio osmótico y provee, por lo tanto, un "acople" artificial.

Teniendo en cuenta esto, se propone acá que cuando se agrega PMS los protones translocados por medio del transporte electrónico fotosintético cambiarían el destino natural de acumulación transitoria previo a su acceso al factor de acoplamiento. Entrarían a un compartimiento con mayor capacidad "buffer" que el que correspondería al sistema endógeno y por eso se presentaría el "lag" o primera fase de baja velocidad de síntesis de ATP. Representaría el tiempo necesario para llegar a un nivel de estado estacionario en el contenido de energía y por lo tanto a la máxima velocidad de síntesis posible. El mencionado compartimiento podría ser, aunque no necesariamente, el espacio osmótico del cromatóforo.

En cambio, en el caso del sistema endógeno, el transporte de electrones proveerá al factor de acoplamiento de protones energizados de tipo localizado (gradiente intramembrana). Este hipotético tipo de acoplamiento propuesto por Williams (20,21,22) tiene la característica de requerir muchos menos protones para energizar suficientemente la membrana (182) y por lo tanto se establecerían las condiciones energéticas adecuadas mucho antes en el tiempo, tal vez casi inmediatamente luego de los primeros ciclos de transporte de electrones. Se dispone de diversas evidencias que proponen que el acoplamiento entre la ATP sintetasa y el transporte de electrones es de tipo directo o localizado en sistemas bacterianos fotosintéticos en ausencia de mediadores redox y en estudios de fotofosforilación en flashes (27,133).

A continuación se proponen las características de los modelos de acoplamiento establecidos por el sistema de transporte de electrones endógeno y mediado por PMS de manera que sean coherentes con los resultados de los estudios de los gráficos

de Arrhenius.

Modelo hipotético para el sistema endógeno*

El postulado acople "localizado" del sistema endógeno no tendría "capacidad" de reserva de H^+ . Esto sería así aún cuando exista una translocación de H^+ al "pool" osmótico y se pueda detectar un $\Delta\bar{\mu}H^+$. Tal vez, la energía del "pool" osmótico no tenga un papel importante en la energización de la membrana, al menos cuando opera en condiciones de luz continua, aunque si lo tendría, tal como fue demostrado, en los fenómenos de fosforilación por post-iluminación (19,117) y en los de fosforilación por transición ácido-base (183).

Dada la falta de "capacidad", o al menos la no utilización de la energía del "pool" osmótico, el factor de acoplamiento debe marchar en la síntesis de ATP directamente a la velocidad con que se repone un "conjunto mínimo de H^+ energizados" en el sitio inmediato al activo que se llamará acá "compartimiento localizado". Dichos H^+ energizados son a su vez consumidos en la síntesis de ATP.

Se llamará "cuanto" al conjunto mínimo de protones en el "compartimiento localizado". El "cuanto" tendría una suficiente alta concentración como para que los H^+ sean de alto potencial (energizados), pero al mismo tiempo dicho compartimiento tendría baja capacidad.

Tal como ya se mostró y discutió en este mismo Capítulo, el factor de acoplamiento no está limitado por la temperatura cuando el sistema opera con el sistema de transporte de electrones endógeno. Esto es así pues la velocidad de síntesis aumenta más de 10 veces, con el agregado de PMS, en todo el rango de temperaturas estudiado. De manera tal que aunque un aumento en la temperatura permita al factor de acoplamiento llevar a cabo 1 ciclo catalítico en menos tiempo, no se podrá manifestar dicho efecto a nivel del "turnover" global del sistema pues este último dependerá de la frecuencia con que el transporte de electrones endógeno reponga el "cuanto".

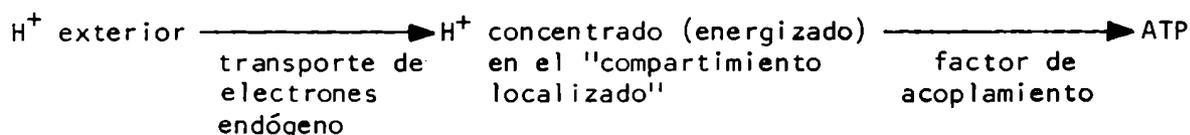
El modelo propone, entonces, que la constante catalítica para el consumo de los "cuantos" (síntesis de ATP) a nivel del factor de acoplamiento sería a todas las temperaturas estudiadas mucho mayor que la constante catalítica para la producción de los "cuantos" a nivel del transporte de electrones, ver Fig. 43 bis.

Tener en cuenta que para el sistema mediado por PMS a baja temperatura se ha propuesto un modelo análogamente contrario (Capítulo III).

(*) Se agradece la discusión con el Lic. Raúl A. Fernández

Así, quedaría claro de qué manera el gráfico de Arrhenius de la fotofosforilación endógena podría ser el reflejo directo del gráfico de Arrhenius de la velocidad del transporte de electrones endógeno.

El modelo se asemeja a una secuencia de dos reacciones catalizadas acopladas, de propiedades tales que la última reacción tenga una muy alta "afinidad" por el producto de la reacción antecesora, de manera que no existan fenómenos extensos de "lag" o umbral y además tenga una constante de velocidad mucho mayor que la de la primera, de manera tal que no se acumulen productos intermediarios. El esquema es el siguiente:



Teniendo en cuenta las muy bajas energías de activación detectadas en algunos rangos de temperatura en los gráficos de Arrhenius del sistema endógeno de fotofosforilación, se puede proponer que el paso limitante de toda la reacción podría ser la difusión de los protones ("cuantos") desde la "fuente" o sea los sitios de producción de protones energizados a nivel del transporte de electrones, hacia el "sumidero" o sea el sitio de consumo de protones ("compartimiento localizado"). El modelo de "fuente-sumidero" es usado frecuentemente en los fenómenos explicables por acople localizado (77).

Modelo hipotético para el sistema mediado por PMS

El transporte de electrones mediado por PMS conduciría los H^+ hacia un reservorio (transitorio?), que podría ser el "pool" osmótico del espacio interno del cromatóforo u otro compartimiento funcional, que tendría una gran capacidad comparándolo con el hipotético diferente sitio de acumulación de H^+ del sistema endógeno. Al compartimiento de alta capacidad se lo llamará acá "pool osmótico".

El tenor de energía a nivel del "pool osmótico" puede tener diferentes valores dependiendo de las concentraciones de PMS y desacoplantes, o de la intensidad de la luz y también de la temperatura actuando a nivel del transporte de electrones.

La capacidad "buffer" del compartimiento "pool osmótico" separaría funcionalmente al factor de acoplamiento del transporte de electrones y pondría a dicho factor en una situación similar al de cualquier enzima "soluble" o "descoplada". Esto es, su actividad dependería (en condiciones de saturación de sus sustratos químicos ADP y P_i) independientemente y al mismo tiempo, por un lado de la concentración de su otro "sustrato" es decir el energético ("cuantos" de H^+ energizados) y por

otro lado, de la temperatura que actúa a nivel de la constante catalítica de la reacción de síntesis.

Así, la velocidad del factor de acoplamiento al sintetizar ATP podría depender del efecto de la temperatura, tanto sobre la velocidad de reacción química, como también sobre la velocidad de estado estacionario de la bomba de protones mantenida por el transporte de electrones y entonces sobre el nivel de energía.

Respecto de las diferencias con la reacción endógena, también se contempla la posibilidad de que la vía de acercamiento de los H^+ al sitio activo del factor de acoplamiento sea también diferente en el caso del sistema mediado por PMS.

En presencia de PMS, se propone que la dependencia del "sustrato" (H^+ energizado) lo es en términos totalmente equivalentes al de una enzima "común". Esto es, el tiempo de duración de cada reacción particular es invariante. Lo que sí varía es la frecuencia con la cual cada enzima entra en actividad (desencadena un ciclo). Cada acontecimiento que ocurre a nivel del factor de acoplamiento sería insensible a que haya un mayor o menor nivel de energía. La energía se pone de manifiesto sólo con características de umbral: si está disponible la energía necesaria para la unión ester, la reacción ocurre. Es decir, una vez que esté la energía mínima requerida el factor de acoplamiento opera a una velocidad independiente de que haya justo esa energía o haya mucha más.

También en el sistema PMS el sitio inmediato al activo podría ser el "compartimiento localizado", pero con la diferencia de que en vez de ser abastecido directamente (por vía localizada) por el transporte de electrones natural (endógeno), lo sería a través del "pool osmótico". En el sistema endógeno los H^+ van directamente conducidos al "compartimiento localizado". En el sistema mediado por PMS el destino de los H^+ hacia el "pool osmótico" sería el predominante e incluso, el funcionamiento de la vía endógena podría estar totalmente anulada debido al efecto competidor del PMS con el transporte de electrones natural.

Queda por explicar por qué, al aumentar la energía, aumenta la velocidad de síntesis global.

Se propone que la frecuencia con que el "compartimiento localizado" se activa (se carga con un "cuanto") depende estadísticamente del $\Delta\bar{\mu}H^+$ delocalizado. Cuanto mayor sea el nivel de este, mayor será la frecuencia con que trabaje un factor de acoplamiento y por lo tanto, en un momento dado, mayor será el % de factores de acoplamiento en actividad. A su vez cuanto más rápido cumpla un ciclo la enzima, con mayor frecuencia quedará en condiciones de recibir otro "cuanto".

Sin embargo, en estas consideraciones se debe tener en cuenta que la concentración de H^+ en el "compartimiento localizado" y por lo tanto el nivel de energía

respecto del espacio osmótico exterior no puede ser mayor que en el "pool osmótico". Se debe considerar entonces que el $\Delta\bar{\mu}H^+$ del espacio osmótico debe ser igual o mayor que el mínimo y saturante del "compartimiento localizado" de manera tal de poder aumentar la frecuencia de aporte (reposición) de "cuantos" al factor de acoplamiento al aumentar el nivel de energía en el "pool osmótico".

Alternativa o simultáneamente se puede considerar el siguiente modelo. Para sintetizar ATP el factor de acoplamiento necesita un cierto número de protones con un $\Delta\mu H^+$ mínimo. Sin embargo, los "compartimientos localizados" tendrían diferentes grados de permeabilidad inespecífica a los protones, de manera tal que para que se logren las condiciones energéticas necesarias en todos los factores de acoplamiento se necesita una fuente de energía mucho mayor, esto es, el espacio osmótico tendría que tener un $\Delta\bar{\mu}H^+$ mayor.

Por lo tanto, al disminuir la concentración de PMS o la intensidad de la luz, o aumentar la concentración de FCCP, se hace disminuir la energía del espacio osmótico y entonces disminuye el % de factores de acoplamiento que pueden lograr las condiciones energéticas umbral.

Quedaría así explicado el comportamiento de Arrhenius de la reacción mediada por PMS. Cuando se disminuye la luz en la Fig. 43 el gráfico se desplaza hacia abajo de manera paralela pues es como inactivar en un cierto % el número de enzimas activas.

Los dos gráficos de Arrhenius, el de la reacción mediada por PMS y el de la endógena, son esencialmente diferentes pues son dos mecanismos diferentes de acoplamiento, el de la primera delocalizado y el de la segunda localizado.

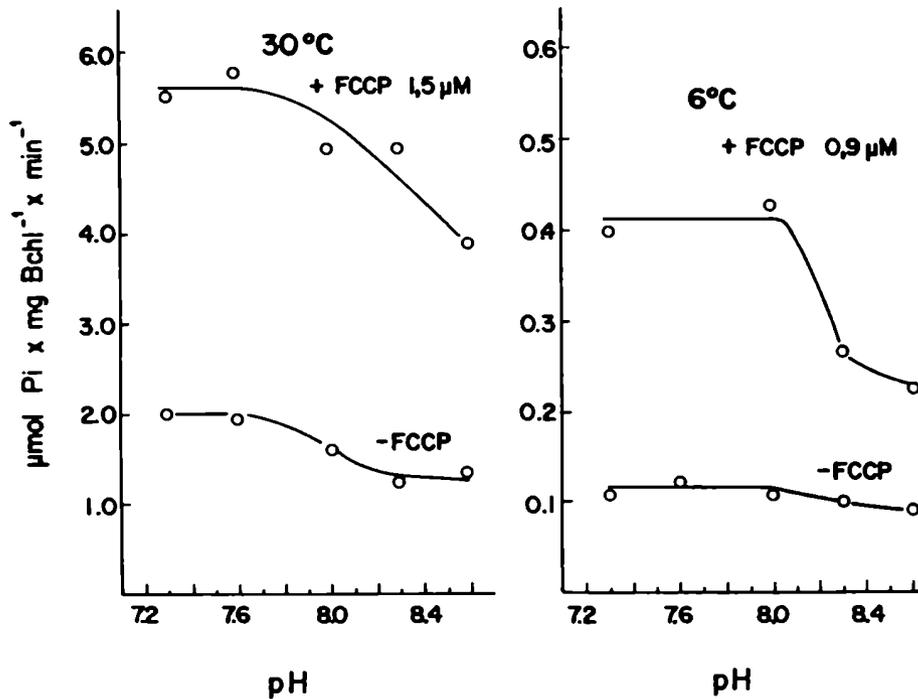


Figura 30

Efecto del pH (7,3-8,6) sobre la velocidad ATPásica a 6°C y 30°C. Se estudia la actividad constitutiva e inducida por el desacoplante FCCP.

Se usa buffer Tris-ClH para todo el rango de pH. Tiempos de reacción: a 6°C: 25-30-35-40-45 min y a 30°C: 1-1,5-2-3-4 min. El curso de la reacción es rectilíneo en todos los casos.

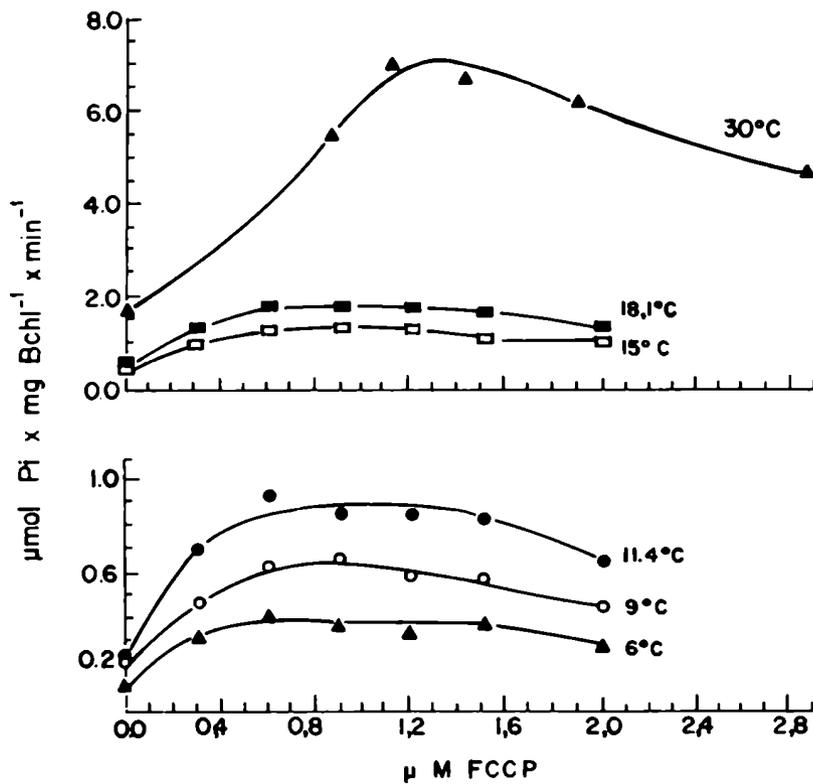


Figura 31

Estimulación de la actividad ATPásica por el desacoplante FCCP a diferentes temperaturas.

El pH es 8,0 en todos los casos. Tiempos de reacción: a 6°C, 9°C y 11,4°C: 25-30-35-40-45 min; a 15°C: 15-20-25-30-35 min; a 18,1°C: 3-5-7-9-11 min y a 30°C: 1-1,5-2-3-4 min. En todos los casos el curso de la reacción es rectilíneo durante todo el período de medición. Estos resultados también fueron reproducidos en otros dos experimentos similares.

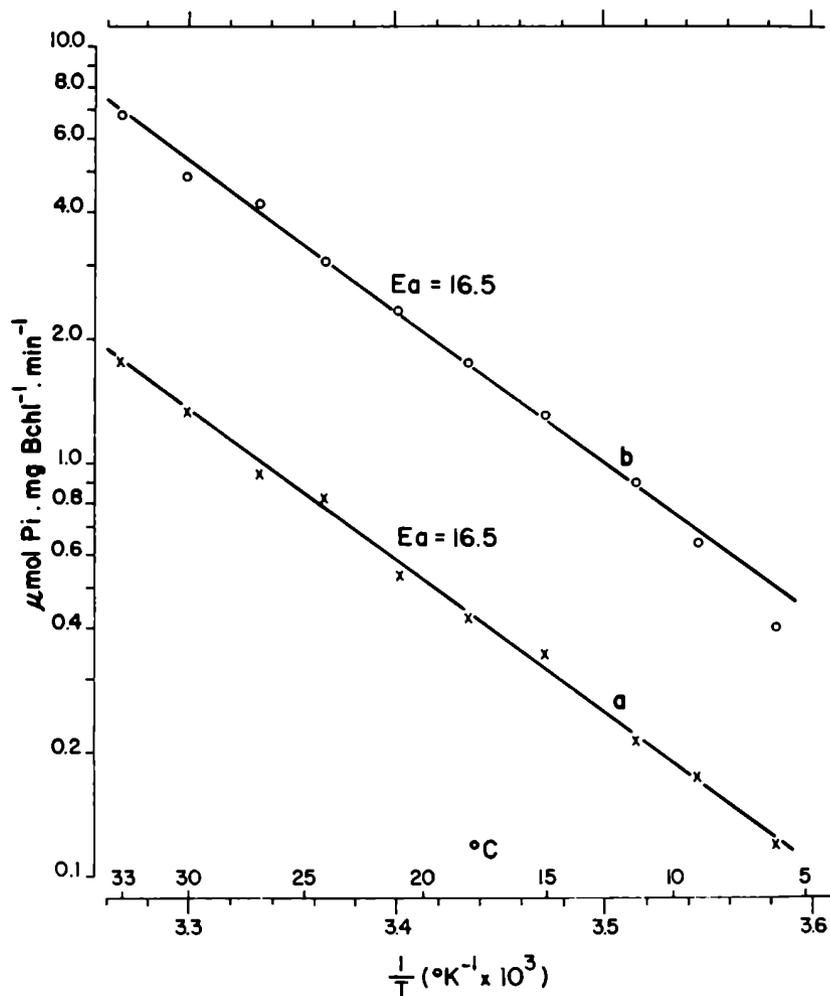


Figura 32

Gráfico de Arrhenius de la actividad ATPásica de cromatóforos, constitutiva e inducida por el desacoplante FCCP. La reacción se lleva a cabo aeróbicamente y en la oscuridad.

a. Actividad constitutiva. El pH es 8,0 para todas las temperaturas y los cromatóforos están en concentración equivalente a 10 μg Bchl.ml⁻¹.

b. Actividad inducida por FCCP. Las condiciones son exactamente iguales a a. Se adiciona FCCP 0,9 μM para el rango 6°C-18°C y 1,5 μM para el rango 21°C-33°C.

En ambos casos la velocidad de ATPasa se calcula de la pendiente de la curva de tiempo en la región del "estado estacionario" (5 tiempos experimentales). La reacción es desarrollada en el intervalo correspondiente entre 1 min y 11 min en el rango de 18,1°C a 33°C y entre 15 min y 45 min en el rango de 6°C a 15°C. En todos los casos la reacción es rectilínea durante todo el período de medición. Los valores de Ea son en Kcal.mol⁻¹.

Parte de la información presentada en esta figura ya fue mostrada de otra manera en la Fig. 31. Ambas figuras provienen de un mismo experimento.

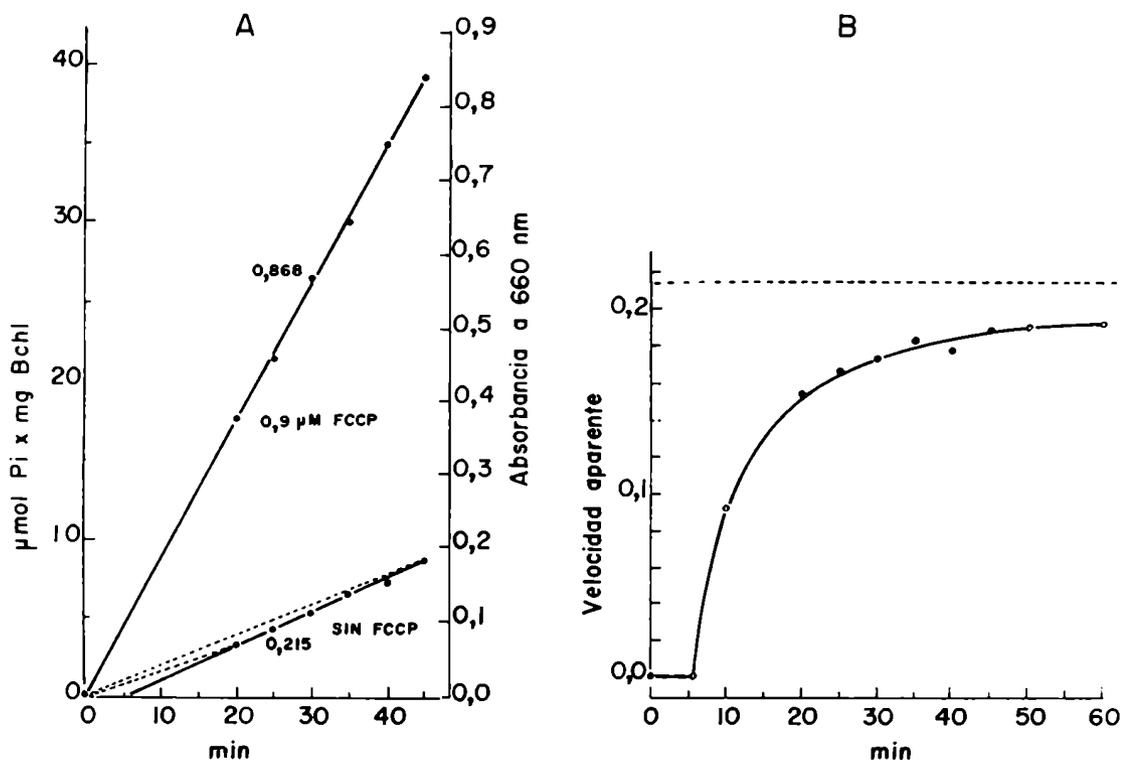


Figura 33

Subestimación de la actividad de ATPasa no inducida por desacoplante a bajas temperaturas cuando no se consideran las velocidades del estado estacionario.

A- Cursos de las reacciones constitutiva e inducida por 0,9 μM FCCP a 11,4°C cuyas velocidades se muestran en el gráfico de Arrhenius de la Fig. 32. Las líneas punteadas representan algunas de las velocidades aparentes que se establecerían al normalizar el producto por el tiempo. La velocidad se expresa en μmol Pi.mg Bchl⁻¹.min⁻¹.

B- Velocidad aparente (expresada como μmol Pi.mg Bchl⁻¹.min⁻¹) de la reacción constitutiva a 11,4°C (A) en función del tiempo de normalización. Los símbolos llenos son los valores experimentales y los vacíos surgen de la extrapolación del gráfico A. La línea de puntos es el valor real de la velocidad, Obsérvese cómo se comete una subestimación de la velocidad aún con valores de velocidad aparente que parecen haberse "estabilizado". En efecto, a los 30 min se comete un 20% de error y a los 60 min un 10%. Kaiser y Oelze (161,162) hubiesen elegido para esta temperatura un tiempo de 30 min.

ENERGIAS DE ACTIVACION

Células cultivadas a	Ea (Kcal.mol ⁻¹)	
	t<20°C	t>20°C
30°C	26,0	15,0
14°C	26,8	14,8

CARACTERISTICAS DE SATURACION

	Temperatura de medición	Km (mM)
ATPasa Mg ²⁺	16°C	0,30
	25°C	0,33
ATPasa Ca ²⁺	16°C	0,58
	25°C	0,58

de Kaiser, I. y Oelze, J. Arch. Microbiol. 126: 195-200 (1980).

Tabla 4

Resumen de los resultados presentados por Kaiser y Oelze respecto del efecto de la temperatura sobre la reacción de ATPasa constitutiva de cromatóforos de R. rubrum.

Experimento N°	Cepa	Rango de temperaturas (°C)	Ea (Kcal.mol ⁻¹)		Cociente entre la velocidad inducida y la constitutiva	OBSERVACIONES
			Actividad constitutiva	Actividad inducida por FCCP		
1	FR1	6 a 33	16,5	16,5	4,0	pH = 8,0 ajustado a cada temperatura. Células y membranas sin congelar. Ver este experimento en la Fig. 32.
2	FR1	10 a 40	17,2	n.d.*		pH = 8,0 ajustado a cada temperatura. Células congeladas, membranas sin congelar. Ver este experimento en la Fig. 44.
3	FR1	4,9 a 30	18,1	18,5	3,2	pH = 8 a 20°C (sin ajustar a cada temperatura). Células y membranas sin congelar.
4	FR1	15 y 23	9,7	n.d.	-	
5	FR1	5 a 31,5	21,0	20,0	2,3	pH = 8 a 20°C (sin ajustar a cada temperatura). Células congeladas, membranas sin congelar.
6	FR1	15; 20 y 30	19,0	n.d.	-	
7	FR1	10,5 y 14,5	16,0	n.d.	-	
8	FR1	12 y 15,8	18,0	n.d.	-	
9	FR1	7; 8 y 11	20,2	n.d.	-	pH = 8 a 15°C (sin ajustar a cada temperatura). Células congeladas, membranas sin congelar. ATP = 7 mM y Cl ₂ Mg = 1 mM
10	FR1	5 y 11,5	20,2	n.d.	-	
11	FR1	3 a 38	19,1	n.d.	-	pH = 8 a 20°C (sin ajustar a cada temperatura). Células y membranas congeladas. ATP = 2 mM y Cl ₂ Mg = 1 mM
12	W	5 a 30	20,5	22,4	2,8	pH = 8 a 20°C (sin ajustar a cada temperatura). Células y membranas sin congelar.
13	W	4,7 a 29,9	20,7	21,6	1,9	pH = 8 a 20°C (sin ajustar a cada temperatura). Células y membranas congeladas.
14	FR1	15,5 y 30	21,4	-	-	Actividad del "EDTA-F1" con 4 mM Cl ₂ Ca y 2 mM ATP. Ver este experimento en la Fig. 47.

Tabla 5

Resumen de diversas determinaciones de las energías de activación de la reacción ATPasa en distintas condiciones.

En todos los casos se trata de diferentes preparaciones cromatofóricas y las velocidades de reacción son determinadas en el estado estacionario. La distribución de temperaturas y la de tiempos para cada una de ellas es del orden de la indicada en la Fig. 32. La concentración de ATP/Mg²⁺ usada es 2 mM/2 mM, salvo en los experimentos en los que se señala otra cosa. En varios casos, tal como se indica, la Ea fue estimada sólo a partir de 2 ó 3 temperaturas. En los gráficos de Arrhenius de las reacciones inducidas por FCCP de los experimentos N°5 y 12 ocurren "quebres" hacia abajo artificiales a temperaturas bajas (ca. 8°C). En esos experimentos se usó una única concentración de FCCP (1,5 µM) y no se controló el pH a cada temperatura, ver discusión en el texto. En esos casos, la Ea indicada es la que corresponde a la rama de alta temperatura. * n.d.: no se determinó.

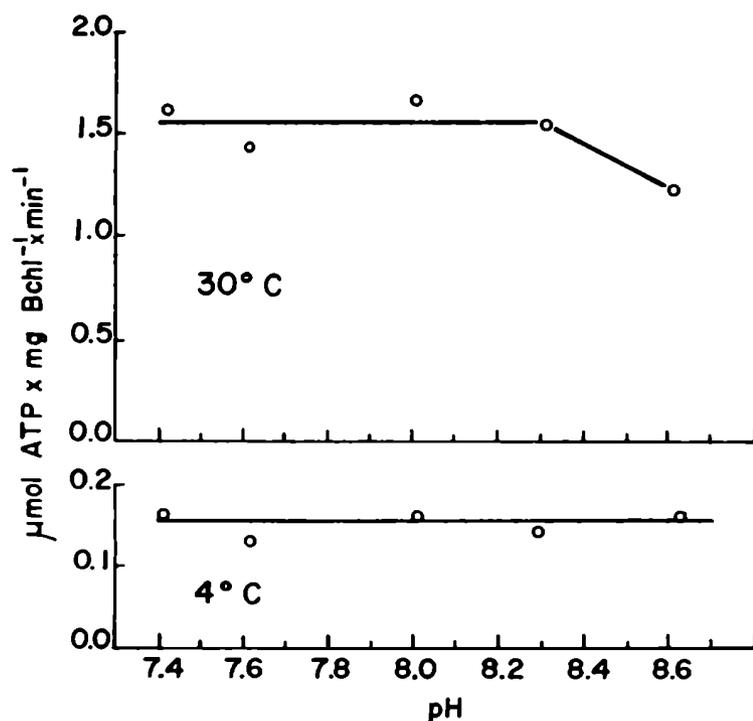


Figura 34

Efecto del pH (7,4 a 8,6) sobre la velocidad de fotofosforilación endógena en aerobiosis a 4°C y 30°C.

El buffer es Tricina-NaOH para todo el rango de pH. Tiempos de reacción: a 4°C: 1-2-4-6-8 min y a 30°C: 15-30-45-60-90 seg. El curso de la reacción es rectilíneo en todos los casos. Estas reacciones pertenecen al mismo experimento que las mostradas en la Fig. 12b.

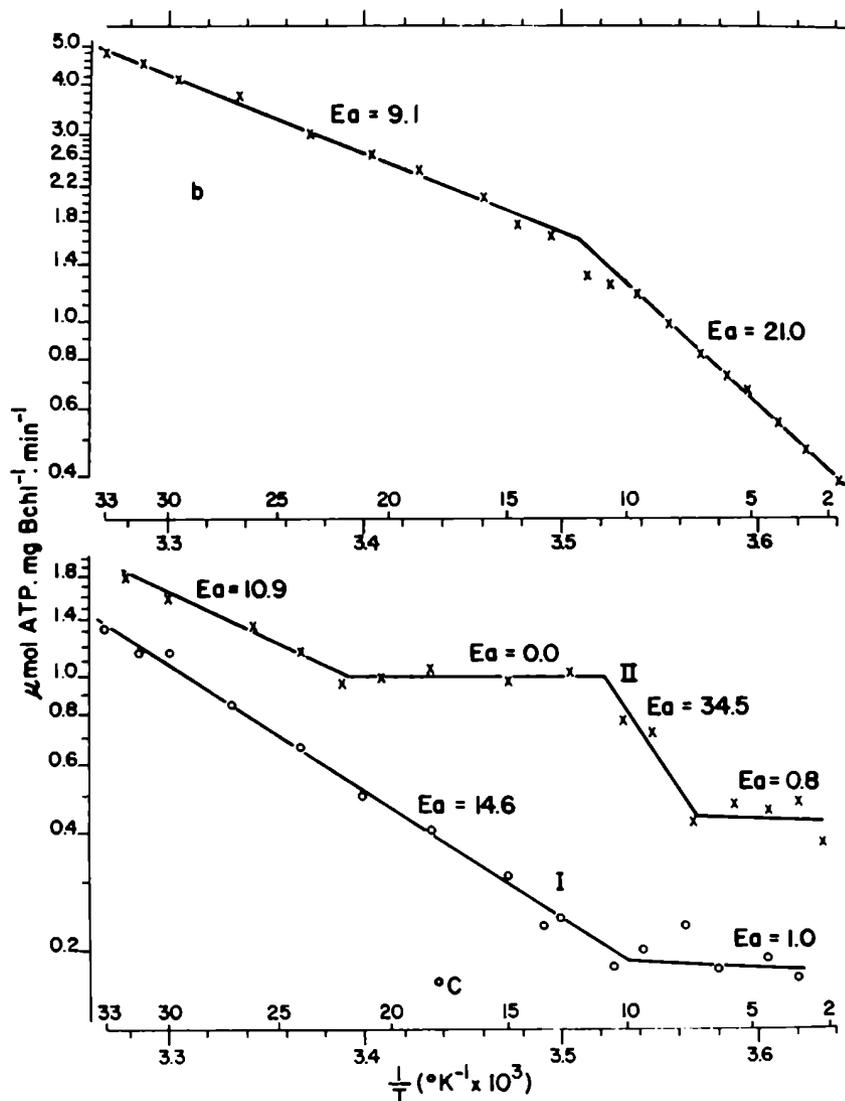


Figura 35

Gráfico de Arrhenius para la fotosfosforilación endógena llevada a cabo aeróbica y anaeróbicamente.

a- Reacción aeróbica. El pH es 8,0 para todas las temperaturas. Las representaciones I y II son dos tipos de comportamiento encontrados en estas condiciones, ver el texto.

b- Reacción anaeróbica. Las condiciones de reacción son las mismas que en a. La anaerobiosis se provoca tal como se describe en "Materiales y Métodos".

Tanto en el caso de a como en el de b, los cromatóforos (10 $\mu\text{g Bchl}$) se añaden en oscuridad a 30°C y luego de 5 min los tubos son retemostatizados durante otros 5 min a la temperatura deseada. La reacción se desencadenó prendiendo la luz. En todos los casos la velocidad se calcula de una curva de tiempo (6 tiempos experimentales). La reacción es desarrollada en el intervalo comprendido entre 30 seg a 6 min en el rango de 3°C a 18°C y entre 15-seg y 2 min en el rango de 20°C a 30°C. Los experimentos a-II y b fueron hechos el mismo día y con la misma preparación de membrana, mientras que el experimento a-I fue hecho con otra preparación. También se obtienen los mismos resultados que a-II en dos experimentos independientes usando luz roja (ver espectro en la Fig. 9) y una concentración de cromatóforos de 1 $\mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$ (no se muestra). Las Ea son en Kcal.mol⁻¹. En todos los casos se usan membranas no congeladas provenientes de células no congeladas.

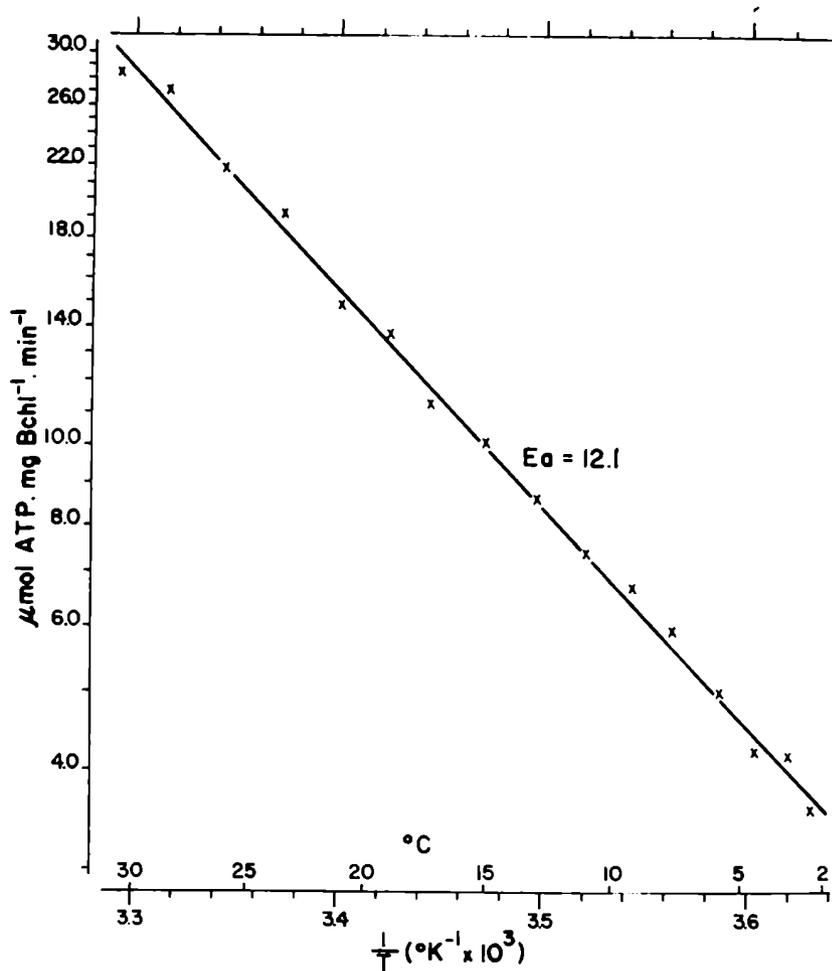


Figura 36

Gráfico de Arrhenius de la actividad de fotofosforilación catalizada por PMS 200 μM en condiciones aeróbicas.

El pH (valor óptimo) establecido para la reacción es 8,7 entre 2°C y 17°C y 8,0 entre 19°C y 32°C. La reacción se desencadenó con la adición de cromatóforos (1 μg Bchl.ml⁻¹). Las velocidades graficadas son las iniciales y son calculadas de la pendiente de las respectivas curvas de tiempo (6 tiempos experimentales). Para todo el rango de temperatura la reacción es desarrollada en el intervalo comprendido entre 5 seg y 60 seg. En este experimento se adiciona un filtro rojo en el sistema de iluminación descrito en "Materiales y Métodos", ver su espectro de transmisión en la Fig. 9. El valor de Ea es en Kcal.mol⁻¹. Se usa una preparación de membranas no congelada proveniente de células no congeladas.

Exper. N°	Cepa	Rango de temp. (°C)	Tipo de membrana	Condiciones de reacción	Forma del gráfico de Arrhenius	Ea	OBSERVACIONES
1	W	10 a 35	Células y membranas congeladas	Aeróbica PMS 50 μM		8,1	pH = 8,0 ajustado a 20°C
2		3 a 38				7,3	
3		7 a 38				7,6	
4		3 a 38				11,8	
5		3 a 38				12,4	
6		3 a 38				10,3	
7	FR1	3 a 30	Células congeladas, membrana no congelada	Aeróbica PMS 200 μM	Recta en toda su extensión	10,3	pH = 8,7 para el rango 2 a 17°C. pH = 8,0 para el rango 19 a 31°C
8		2 a 31				12,5	
9		2 a 10				12,1	
10	W	3 a 30	Células y membranas no congeladas	Aeróbica PMS 50 μM	"Quiebre" hacia abajo	16,8	pH = 8,0 ajustado a 20°C
11	FR1	3 a 33				14,0	
12		3 a 30				13,7	pH = 8,0 controlado a cada temperatura
13		3 a 31				18,9	pH = 8,7 para el rango 3 a 18°C pH = 8,0 para el rango 21 a 31°C
14		3 a 36				15,0	pH = 8,7 para el rango 3 a 15°C pH = 8,3 para el rango 19 a 36°C
15		2 a 32				12,6	pH = 8,7 para el rango 2 a 18°C pH = 8,0 para el rango 20 a 32°C. Luz roja-1 $\mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$

Tabla 6

Resumen de diversas determinaciones de las energías de activación de la reacción de fotosfosforilación mediada por PMS en distintas condiciones.

El número de diferentes temperaturas estudiadas en cada intervalo varía entre 8 y 12. En general, los tiempos experimentales son 10-20-30-40-50-60 seg. Se usó luz blanca y 10 $\mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$ salvo que se indique otra cosa. Tal como se explica en el texto, los experimentos que muestran un "quiebre" hacia abajo están desaturados de PMS a temperaturas altas y la Ea (Kcal.mol^{-1}) indicada en esos casos corresponde a la de la rama de bajas temperaturas.

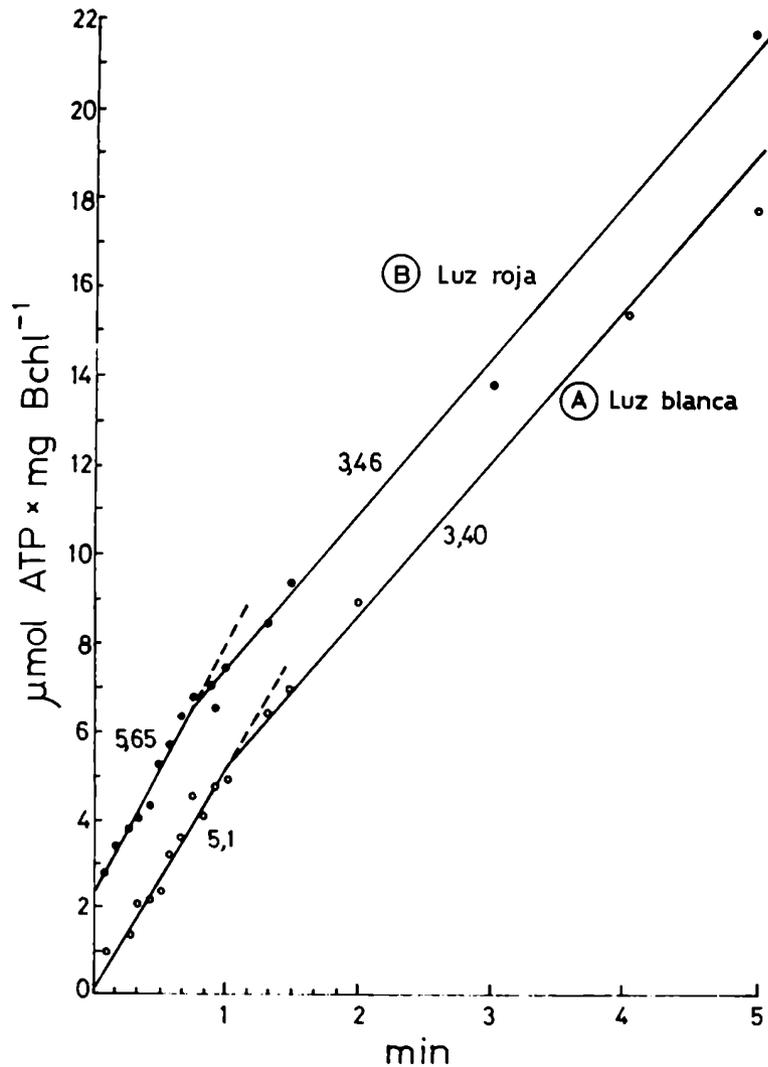


Figura 37

Curso de la reacción de fotofosforilación a 4,5°C llevada a cabo por muy bajas concentraciones de cromatóforos y mediada por PMS 200 μM con luz blanca y con luz roja.

La concentración de cromatóforos es equivalente a 1 μg Bchl.ml⁻¹.

A - Se usa el sistema de iluminación descrito en "Materiales y Métodos".

B - Igual que A, pero adicionando un filtro "rojo" cuyo espectro se muestra en la Fig. 9. En ambos casos se eleva la tensión sobre la batería de lámparas a 225 V con un autotransformador "Variac". Las velocidades se expresan en μmol ATP.mg Bchl⁻¹. min⁻¹. La curva B está desplazada hacia arriba por razones de claridad.

Nota: La preparación de cromatóforos usada en este experimento muestra una actividad de fotofosforilación excepcionalmente alta y es la misma que la usada en la Fig. 43.

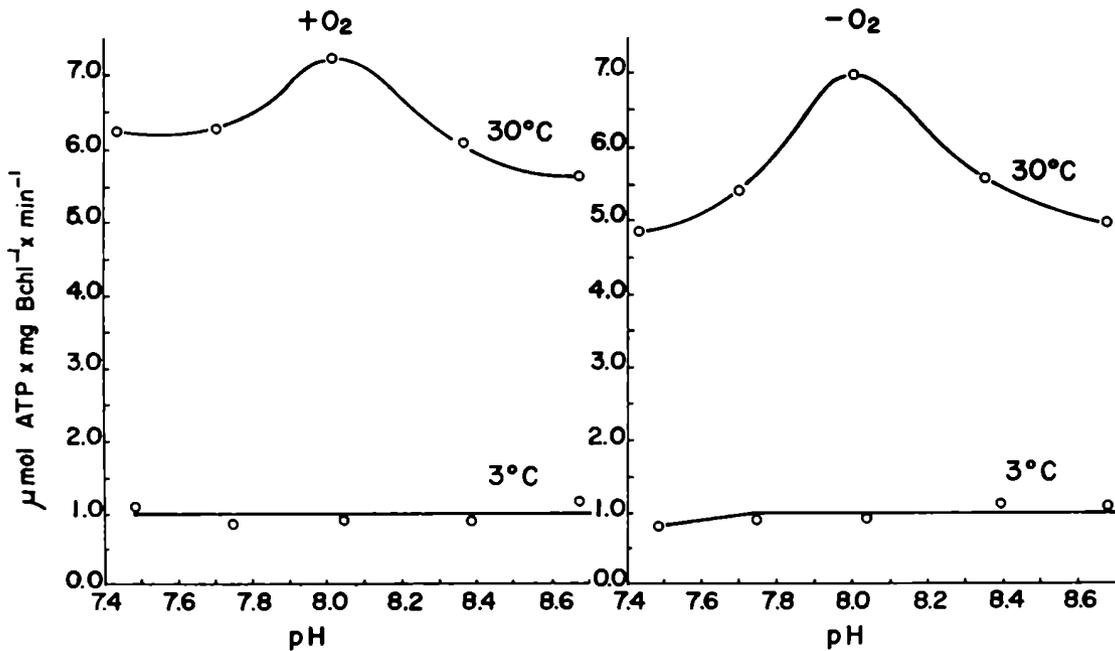


Figura 38

Efecto del pH (7,4-8,7) sobre la velocidad de fotofosforilación catalizada por TMPD 50 μM a 3°C y 30°C.

El buffer es Tricina-NaOH para todo el rango de pH. La reacción se lleva a cabo aeróbica y anaeróbicamente (ver "Materiales y Métodos"). Tiempos de reacción en todas las condiciones: 10-20-30-40-50 seg. El curso de la reacción es rectilíneo en todos los casos. Las mezclas de reacción para las reacciones aeróbicas y anaeróbicas son, a cada pH, alícuotas de una misma mezcla. Este experimento se lleva a cabo con membranas no congeladas almacenadas en hielo durante 4 días, provenientes de células sin congelar.

Nótese la diferencia que existe en el curso de la reacción (linealidad) a bajas concentraciones de mediador redox respecto de cuando se usa PMS, ver Figs. 10 y 11.

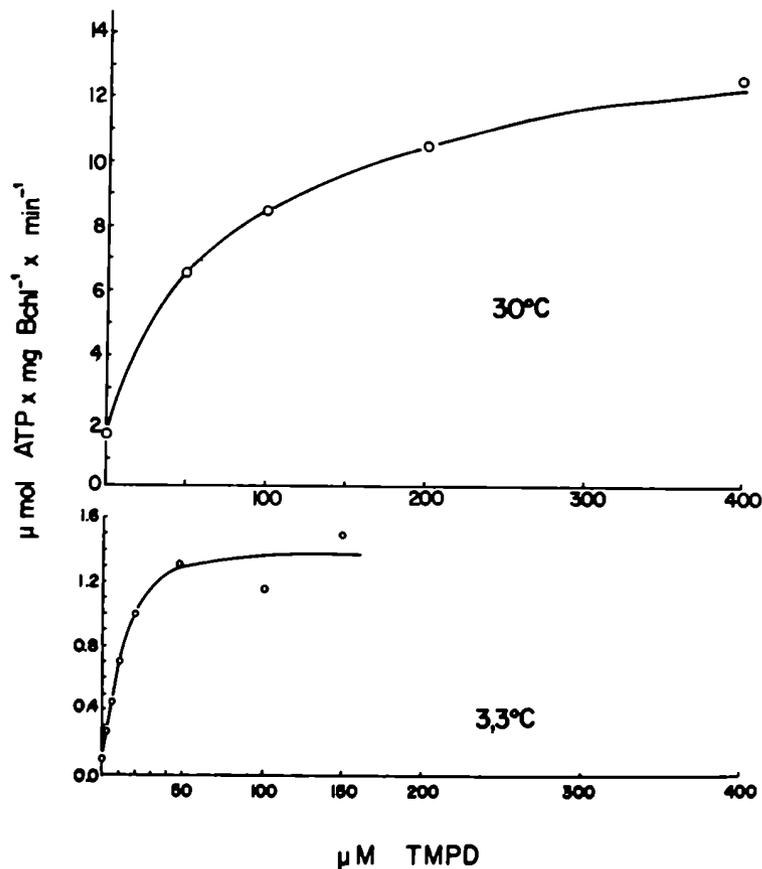


Figura 39

Fotofosforilación a 3,3°C y 30°C catalizada, en condiciones aeróbicas, por un transportador de electrones artificial (TMPD).

El pH es 8,0 a ambas temperaturas. Tiempos de reacción: a 3,3°C: 10-20-30-40-50 seg; a 30°C: 15-30-45-60 seg. El curso de la reacción es rectilíneo en todos los casos. La concentración de TMPD que provee el 50% de la velocidad máxima es 60 μM a 30°C y 10 μM a 3,3°C. La concentración de cromatóforos es 5 μg Bchl.ml⁻¹. Este experimento se lleva a cabo con la misma preparación de membrana usada en la Fig. 38, pero con 8 días de almacenamiento en iguales condiciones.

Nótese la diferencia que existe en el curso de la reacción (linealidad) a bajas concentraciones de mediador redox respecto de cuando se usa PMS, ver Figs. 10 y 11.

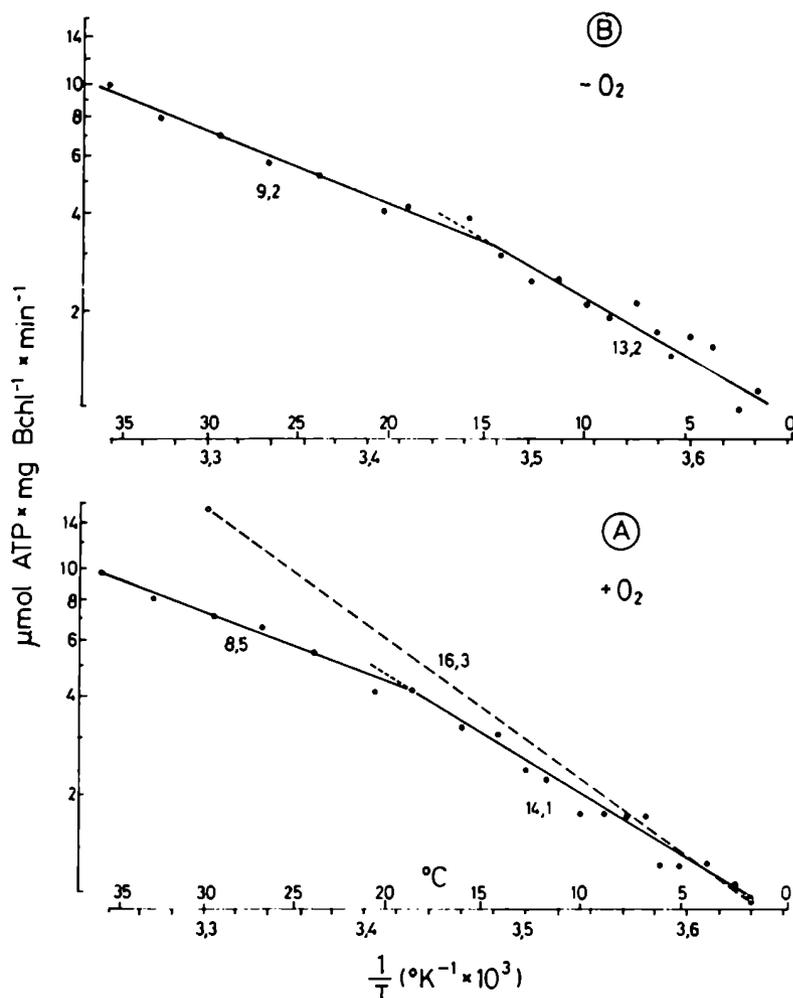


Figura 40

Gráfico de Arrhenius de la actividad de fotofosforilación catalizada por TMPD 50 μM en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

El pH es 8,0 a todas las temperaturas. La preparación cromatofórica es la misma que se usa en la Fig. 39. En todos los casos, los tiempos de reacción son: 10-20-30-40-50 seg.

Las E_a se indican en Kcal.mol⁻¹.

A- La reacción se lleva a cabo aeróbicamente. El símbolo vacío indica, sobre la base de la información de la Fig. 39, cuál debió haber sido la velocidad de la reacción si el sistema estuviera saturado con TMPD también a 30°C, y el trazo punteado, que lo une con los de las temperaturas bajas, sugiere cuál hubiese sido el comportamiento general.

B- La reacción se lleva a cabo en iguales condiciones que en A pero anaeróbicamente. La anaerobiosis se provoca tal como se describe en "Materiales y Métodos". Para ambas condiciones se procede en los demás detalles tal como está descrito en la Fig. 35.

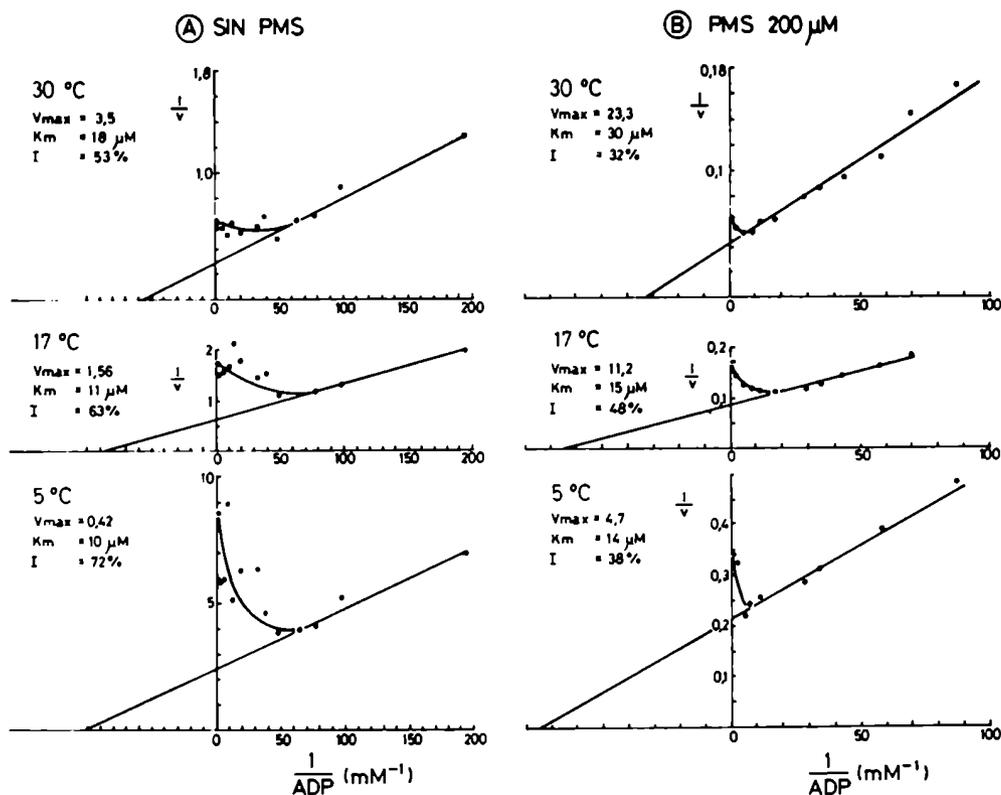


Figura 41

Representaciones de Lineweaver-Burk para ADP variable y P_i 2 mM constante de la reacción de fotofosforilación a diferentes temperaturas. Se estudia en condiciones de transporte de electrones endógeno o mediado por PMS 200 μM .

Las velocidades se expresan en μmol ATP.mg Bchl⁻¹.min⁻¹.

Se indica además, la inhibición por sustrato (%) que presenta la reacción estudiada a 0,9 mM ADP respecto de la V_{max} estimada.

La concentración de cromatóforos es equivalente a 10 μg Bchl.ml⁻¹ y se usa luz roja; ver el espectro de transmisión del filtro en la Fig. 9. La intensidad de la luz es aproximadamente 700 $\mu E.m^{-2}.seg^{-1}$ medida sin el filtro. El tipo de membranas es el descrito en "Materiales y Métodos" (Moo).

A - La reacción se desarrolla en ausencia de catalizadores redox exógenos y el pH es 8,0 para todas las temperaturas.

Los tiempos estudiados son a 5°C: 15-30-60-90-120 seg; a 17°C: 15-30-45-60-90 seg; y a 30°C: 10-15-20-25-30 seg. En todos los casos todo el curso de la reacción es rectilíneo.

B - La reacción se desarrolla en presencia de 200 μM PMS y el pH es 8,7 para las reacciones a 5°C y 17°C, y 8,0 para las estudiadas a 30°C.

Los tiempos estudiados son 10-15-20-25-30 seg para las tres temperaturas. La reacción es rectilínea en todo su curso a 5°C, pero en el caso de las desarrolladas a 17 y 30°C se deben estimar las velocidades iniciales en las reacciones con menos de 50 μM ADP. En ningún caso se observó "lag".

Ver la representación de Arrhenius de las V_{max} y de las v 0,9 mM ADP de este experimento en la Fig. 42. Ver un experimento similar a A 30°C en la Fig. 26.

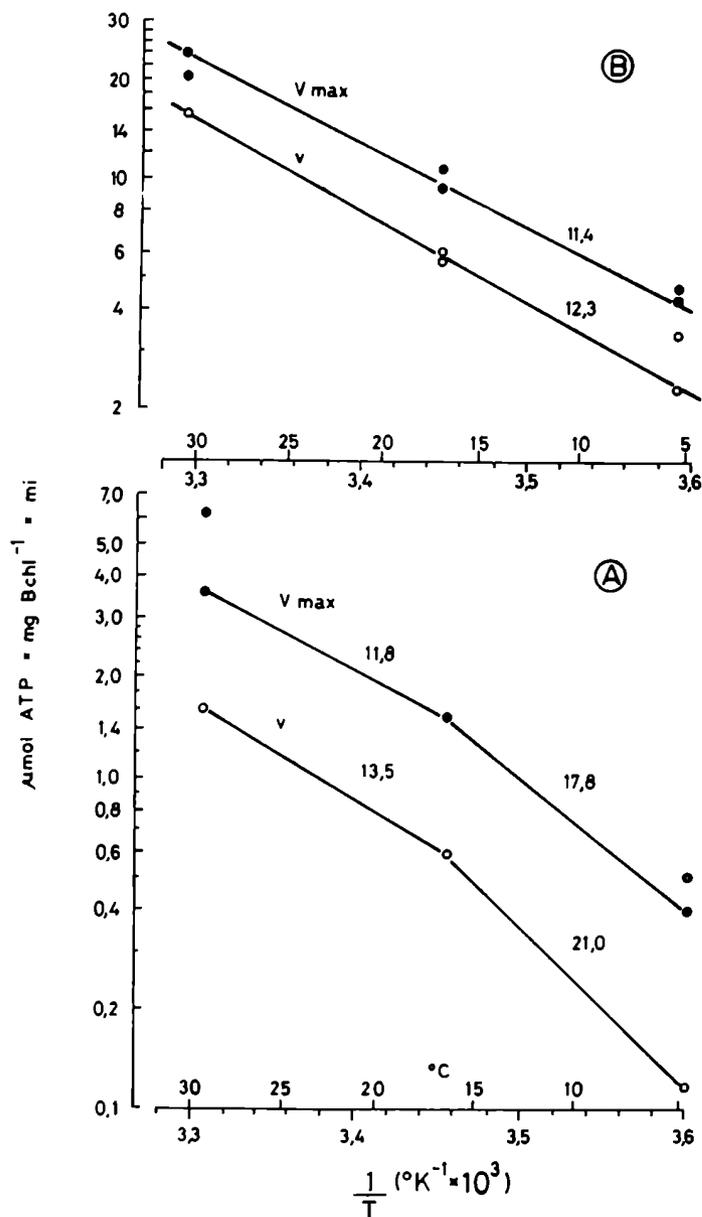


Figura 42

Representaciones de Arrhenius de la reacción de fotosforilación con dos concentraciones de ADP diferentes.

Se consideran las velocidades de la reacción llevada a cabo en condiciones estándar (2 mM Pi y 0,9 mM ADP) (v), o las velocidades máximas aparentes (V_{max}), a partir de gráficas de Lineweaver-Burk variando ADP y manteniendo constante Pi 2 mM. Esta información proviene de los experimentos mostrados en la Fig. 41.

A- Reacción endógena

B- Reacción catalizada por PMS 200 μM

Todas las reacciones se llevan a cabo con luz roja (ver el espectro de transmisión del filtro en la Fig. 9) y la concentración de cromatóforos es equivalente a 10 μg Bchl.ml⁻¹.

Los valores duplicados indican la incertidumbre máxima en la estimación de la velocidad de un mismo experimento.

Las pendientes de las rectas expresan una E_a aparente en Kcal.mol⁻¹.

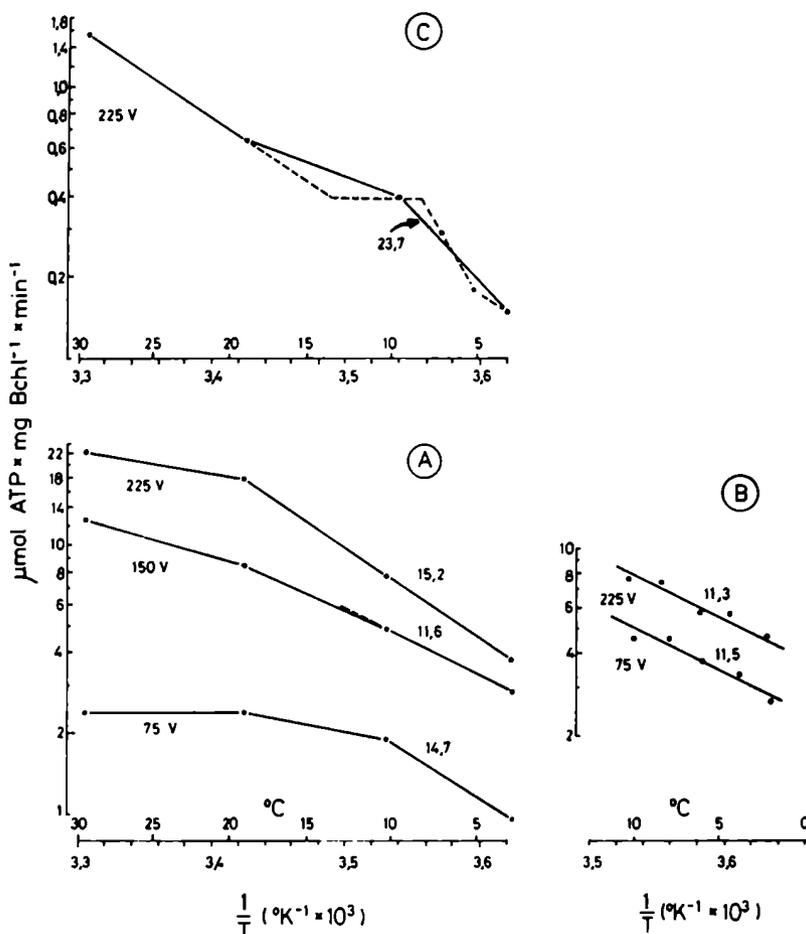


Figura 43

Efecto de la intensidad de luz sobre el gráfico de Arrhenius de la reacción de fotofosforilación mediada por PMS 200 μM .

Se varía la intensidad de luz cambiando la tensión, con un autotransformador "Variac", sobre el sistema de iluminación descrito en "Materiales y Métodos". En A y B, se usa luz roja, ver el espectro del filtro en la Fig. 9. En C la luz no se filtra. La "intensidad de luz" se indica para cada gráfico por medio de la tensión aplicada.

La concentración de cromatóforos es equivalente a 10 $\mu\text{g Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$ en A y C, y a 1 $\mu\text{g Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$ en B.

A y B- La reacción se lleva a cabo en presencia de PMS 200 μM . En ambos casos los tiempos de reacción son: para 2-10 $^{\circ}\text{C}$: 15-30-45 seg -1-2-4-6-8 min y para 20-30 $^{\circ}\text{C}$: 15-30-45 seg -1-1,5-2-3-4 min. A temperaturas menores de 10 $^{\circ}\text{C}$ y con luz alta (225 V) se consideran las fases iniciales (no inhibidas) mientras que con luz baja (150-75 V) se consideran las fases de estado estacionario que se establecen después de aproximadamente 1-2 min para mantenerse luego rectilíneas. A temperaturas altas (20-30 $^{\circ}\text{C}$) todas las reacciones son rectilíneas en todo su curso.

C- La reacción se lleva a cabo en ausencia de PMS. La línea entera muestra el comportamiento aparente, mientras que la punteada es una posible Interpretación, debida a la falta de datos, sobre la base de otros estudios, por ejemplo Fig. 35 a, representación II. Los tiempos de reacción son: para 3-7 $^{\circ}\text{C}$: 15-30-45 seg -1-2-4-6 min; para 9-30 $^{\circ}\text{C}$: 15-30-45 seg -1-1,5-2-3 min. En todos los casos todo el curso de la reacción es rectilíneo.

Las E_a se indican en $\text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.

En A, B y C se usan membranas no congeladas provenientes de células congeladas. Esta preparación también fue usada en la Fig. 37.

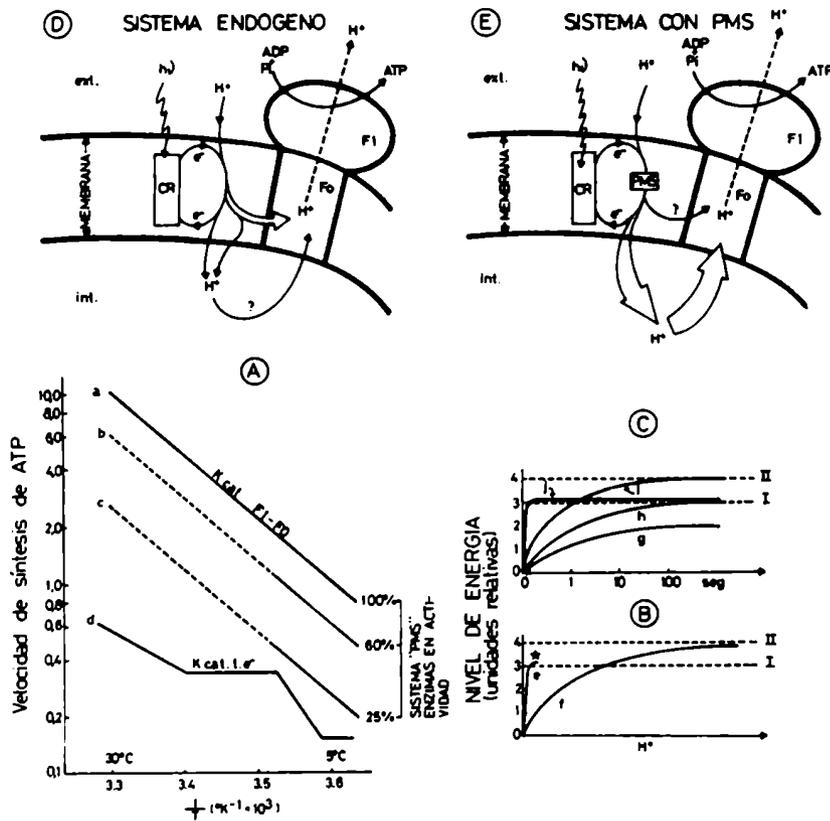


Figura 43 bis

Modelo sobre el mecanismo de acoplamiento endógeno y el del mediado por PMS, teniendo en cuenta los datos cinéticos de esta Tesis.

A- Gráficos de Arrhenius de la síntesis de ATP

a, b y c: Son las representaciones para el sistema mediado por PMS. Las líneas enteras consisten en la información obtenida en este trabajo. Las rectas coincidirían con la dependencia de la temperatura de la constante catalítica (K_{cat}) del factor de acoplamiento (F_1-F_0). a, b y c resultarían del producto de la K_{cat} por el número de factores de acoplamiento activos en el estado estacionario.

d: Representa al sistema endógeno en presencia de oxígeno. Concordearía con la dependencia de la temperatura de la constante catalítica del transporte de electrones a una determinada intensidad lumínica y así con la frecuencia de translocación de "cuantos" al "compartimiento localizado".

B- Comportamiento teórico del nivel de energía del sitio inmediato al activo en función del número de protones translocados por el transporte de electrones fotosintético

e: Sistema endógeno. f: Sistema mediado por PMS

El asterisco en e indica que el sistema endógeno tiene una capacidad de acumulación de H^+ muy limitada.

I: Nivel mínimo de energía necesario para la síntesis de ATP, en el sitio inmediato al activo. II: Nivel máximo de energía acumulable en el cromatóforo.

C- Curso teórico de la energización de la membrana

g, h e i: Sistema mediado por PMS en orden creciente de condiciones que favorezcan el establecimiento de un alto nivel de energía de la membrana.

j: Sistema endógeno

I y II: Igual que en B.

D y E- Esquema del modelo para el sistema endógeno y para el mediado por PMS respectivamente

El grosor de las flechas que representan el flujo de protones sólo tiene importancia relativa en cada gráfico particular.

V. Descripción de un fenómeno de inhibición transitoria en la fase pre-estado estacionario en la actividad ATPásica de cromatóforos. *

V.1 Introducción

El contenido de energía de la membrana parece ser un factor que gobierna la actividad de ATPasa del factor de acoplamiento (51,129). En Rhodospirillum rubrum (195,204,205) y en Rhodopseudomonas capsulata (193,206), tanto la energización por luz como la disminución de la retropresión de H^+ , a través de la adición de un desacoplante, modifican la actividad hidrolítica de la enzima.

También existen otros factores que afectan la actividad de ATPasa de membranas, tales como Mg^{+2} libre (196,204,205) y aniones activantes (194,196).

En el Capítulo III se ha determinado que durante la fotofosforilación a baja temperatura se desarrolla una inhibición irreversible de esa misma reacción, que podría estar inducida por un desbalance entre la acumulación de energía (transducida de la luz) y la disipación provista por la propia reacción de fosforilación (dependiente de la energía de la membrana) a nivel del factor de acoplamiento.

En este capítulo, se estudia con detalle el curso de reacción de la hidrólisis de ATP llevada a cabo por cromatóforos, en especial a bajas temperaturas. La presencia de un complejo comportamiento de pre-estado estacionario y su respuesta a la energización por luz y a la disipación de la energía (acumulada como un gradiente de H^+ , o al menos en alguna forma en equilibrio con aquél) por un desacoplante sugieren que la enzima podría detectar desbalances entre contenidos de energía localizados diferencialmente en el cromatóforo.

V.2 Caracterización inicial

La Fig. 44 muestra el curso de la reacción de la hidrólisis de ATP por cromatóforos. Inicialmente, luego de un "lag" de duración variable, la velocidad de la reacción aumenta, alcanza un máximo y luego disminuye para entrar finalmente en un estado inhibido ("plateau"). Luego de un período (1-3 min) de actividad nula o muy reducida, la hidrólisis aumenta nuevamente para comportarse de manera lineal, sin discernirse oscilaciones (ver en detalle un tramo de esta última fase en la Fig. 50), por un período de hasta por lo menos 40 min según la temperatura. Este último representa el estado estacionario de la reacción. Se ve claramente que todo el

(*) Parte de estas investigaciones fueron realizadas en colaboración con la Lic. L.N. Benzacar.

comportamiento descrito es más conspicuo a temperaturas relativamente bajas. En general, la disminución de la temperatura aumenta la duración del "lag" y la del "plateau". Sin embargo, para diferentes preparaciones de membrana, se necesitan umbrales de temperatura también diferentes (5-20°C) para poder ver el fenómeno con claridad. A temperaturas altas (en general 30-40°C) se detecta sólo una liberación lineal de fosfato.

Estos resultados se obtienen tanto con la fracción de cromatóforos "pesada" como con la "liviana", tal como se pueden separar por un gradiente discontinuo de sacarosa (ver "Materiales y Métodos", 11.2). También es indistinto el resultado si las células provienen de un cultivo en crecimiento exponencial (en fermentador) o de un cultivo tardío que entró ya en el "plateau" de la curva de crecimiento.

Se debe recalcar que parece existir una relación estrecha tanto de la preparación de membranas cromatofóricas como de su envejecimiento con la reproducibilidad de este fenómeno. En efecto, si bien el comportamiento general de la reacción se puede reproducir siempre (estableciendo temperaturas suficientemente bajas), en cambio es mucho más difícil reproducir exactamente las características notables del curso de la reacción, tales como son las velocidades y duraciones de las distintas fases y los tiempos en que cada una de ellas se manifiesta luego del desencadenamiento de la reacción. Es de suponer que variaciones (no controlables) en las condiciones de sonicación pudieran ser algunas de las causas de la irreproducibilidad. En este sentido, se puede señalar que, con algunas preparaciones cromatofóricas, la fase transitoria pre-estado estacionario se repite por más de una vez, mostrándose consecuentemente más de un período de actividad e inactividad de la hidrólisis, ver Figs. 45 A, 46 A y 56.

Para comprobar que la liberación de Pi se debía exclusivamente a la hidrólisis de ATP se realizaron los experimentos que se comentan a continuación.

El mismo curso de reacción se obtiene si la hidrólisis se desencadena con el agregado de cromatóforos (como lo es en la mayoría de los experimentos acá realizados), o si los cromatóforos se preincubaban en oscuridad en ausencia de ATP durante 5-15 min y luego se desencadena la reacción a la misma temperatura (10-30°C) con el agregado de ATP, ver por ejemplo la Fig. 45 A.

En la Fig. 45 B se observa que el inhibidor de la transferencia de energía oligomycin, inhibe casi completamente todas las fases descriptas.

Además, todo el curso de la reacción depende de la presencia de ATP exógeno (Fig. 45 C, D y E). Este experimento se hizo a temperatura alta con la intención de acelerar una eventual liberación de Pi independiente de la presencia de ATP.

Por otra parte, un ensayo preliminar, midiendo la hidrólisis de $ATP^{32}P$, sugiere

una curva de tiempo similar a la detectada midiendo la liberación de Pi colorimétricamente (no se muestra).

Cabe señalar acá que la hidrólisis no enzimática del ATP en las condiciones de reacción, es indetectable en un rango de temperaturas de 20°C a 38°C y por tiempos estudiados de hasta 15 min.

Como se sabe que la presencia de Mg^{2+} libre, incluso en pequeñas concentraciones, inhibe la reacción ATPásica (204) y como dichas concentraciones pueden ser modificadas por el balance nucleótido/cación (204), es que se realizaron los experimentos de la Fig. 46. Relaciones de concentración milimolar de ATP/Mg^{2+} que varían entre 7/1 y 2/4 no tienen influencia sobre la manifestación general del fenómeno. Altas relaciones ATP/Mg^{2+} aumentan la velocidad de hidrólisis, disminuyen la duración de la fase pre-estado estacionario y tienden a reducir la aparición de oscilaciones múltiples (cuando existen) antes de la entrada en el estado estacionario.

Con la intención de contrastar una hipótesis inicial que proponía que el fenómeno depende, por una parte de la integridad del factor de acoplamiento y por otra de una interacción entre aquél y la membrana, se llevaron a cabo dos tipos de experimentos preliminares.

Por un lado, se extrajo la porción F1 del factor de acoplamiento sonicando en presencia de EDTA 1 mM (112). La preparación, que resultó insensible a oligomicina y preferentemente dependiente de Ca^{2+} , características tales del F1 aislado (129, 51), muestra un curso de reacción fundamentalmente rectilíneo desde su desencadenamiento tanto a temperatura alta como a baja, ver Fig. 47*. La mencionada insensibilidad a oligomicina (100 μ M) fue probada preincubando la preparación 10 min en hielo en mezcla estándar de ATPasa salvo por la ausencia de ATP y desencadenando luego la reacción con ATP 2 mM, tanto del tratamiento como del control, a 30°C y estudiándola durante 10 min.

Por otro lado, se estudió la reacción ATPásica, previo un pretratamiento de los cromatóforos con el detergente Tritón X-100 con la intención de desorganizar la estructura de la membrana acoplante, ver la Fig. 48. Concentraciones de hasta 0,2% (v/v) no producen variaciones significativas del comportamiento, aunque sí se observa una prolongación de la duración del "plateau". Sin embargo, concentraciones más altas (0,4%) eliminan la primera fase. No se probaron concentraciones superiores de detergente pues éste interfiere en la colorimetría.

Estos dos resultados sugieren que, en efecto, la existencia de la fase pre-estado estacionario descripta aquí, podría estar relacionada con la forma completa de la enzima (F1-F0) y con una adecuada integridad de la membrana cromatofórica.

(*) En la interpretación de este resultado se debe tener en cuenta que en la preparación enzimática hay presente ATP 2 mM, ver 11.3.

Si se estudia la reacción con ATP disuelto inmediatamente antes del ensayo, se obtienen los mismos resultados ya descriptos.

Por otro lado, experimentos preliminares muestran que el comportamiento típico de la reacción tampoco cambia si se la desencadena en una mezcla de reacción que contenga ADP 50 μ M (concentración equivalente a la que, en general, existe en el momento en que se establece el "plateau").

Estas dos últimas observaciones (no mostradas) se refieren a la posibilidad de que la inhibición ("plateau") se origine a partir de la acumulación de cierto nivel (bajo) de producto (ADP), el que actuaría de alguna manera regulatoria sobre el factor de acoplamiento en su actividad hidrolítica (204,205). Sin embargo, los resultados señalados descartan el mencionado hipotético papel del ADP como causante directo del "plateau".

V.3 Reproducibilidad de la fase pre-estado estacionario luego de una preincubación en condiciones de ATPasa y/o fotofosforilación.

Las evidencias de la reproducibilidad provienen de los siguientes experimentos.

Las membranas cromatóforicas que fueron preincubadas

- 1) en oscuridad en "buffer de sonicación" a 30°C (Fig. 49 F) o
- 2) igual que 1) pero a 10°C (Fig. 49 A)
- 3) o en oscuridad en mezcla de fotofosforilación a 30°C sin PMS (Fig. 49 G) o
- 4) igual que 3) pero con PMS 50 μ M (no se muestra) o
- 5) que sufrieron un "ciclo" de ATPasa en oscuridad hasta el estado estacionario a baja temperatura (Fig. 49 E) o
- 6) un "ciclo" de fotofosforilación mediada por PMS 50 μ M (no se muestra), luego de ser recuperadas por ultracentrifugación a través de un "colchón" de sacarosa 20% (p/v), muestran de nuevo este comportamiento transitorio.

Se encuentra el mismo resultado Fig. 49 C si la membrana se pretrata de la siguiente manera:

- 7) a) Se someten los cromatóforos a un "ciclo" de ATPasa (ya sea en mezcla de reacción estándar o con 2 mM ATP/1 mM Cl_2Mg , obteniéndose los mismos resultados) a baja temperatura hasta el estado estacionario y se los recupera luego por ultracentrifugación.
- b) Los cromatóforos así recuperados se someten a un "ciclo" de fotofosforilación a 30°C con PMS 50 μ M y se los recupera nuevamente por ultracentrifugación.

El control de este experimento es el mostrado en la Fig. 49 B.

Los cromatóforos se preincubaban en mezcla de fotofosforilación con PMS 50 μ M pero en oscuridad, observándose el mismo comportamiento que en el tratamiento (Fig. 49 C).

Estos experimentos muestran que el fenómeno depende del desencadenamiento de la reacción. Es decir, no se agota con un sólo "ciclo" de hidrólisis de ATP. De igual manera, ni el hecho de que la enzima haya recorrido el ciclo catalítico en sentido inverso, ni su enfrentamiento con el estado de alta energía de la membrana, provisto por la luz durante el tratamiento previo de fotofosforilación en presencia de PMS 50 μ M, evitan la reaparición del fenómeno.

Sin embargo, si el pretratamiento por reacción de fotofosforilación transcurre en ausencia de catalizador redox (PMS) no se ha podido detectar la fase pre-estado estacionario, ver Fig. 49 H. Esto resulta difícil de explicar. En este aspecto se contempla la posibilidad de que el sistema global sí cambie "irreversiblemente" sus potencialidades respecto de la aparición de la fase pré-estado estacionario de su actividad ATPásica, si el "ciclo" enzimático de fotofosforilación previo transcurre a baja velocidad y/o con bajo nivel de energía, tal como lo determina la ausencia de PMS en esa reacción.

V.4 Correlación entre la cinética de hidrólisis de ATP y el establecimiento del estado de alta energía del cromatóforo.

Dado que el contenido de energía de la membrana parece gobernar el funcionamiento del factor de acoplamiento (ver Introducción), entonces la etapa de la reacción en condiciones de desequilibrio previa a la entrada al estado estacionario podría estar caracterizada por variaciones de la actividad dependientes del nivel de energía, tal vez como las detectadas en estos experimentos. Estas variaciones podrían estar producidas por una auto-modificación (estimulación) de la actividad catalítica de la enzima a través de la hidrólisis de ATP, que provoca el bombeo de protones hacia el interior del cromatóforo y el consecuente aumento de su nivel de energía.

Se ha investigado esta hipótesis, por un lado comparando el curso de la reacción ATPásica y el de la energización de los cromatóforos mediada por aquella y por otro lado, correlacionando el efecto ejercido por dos agentes exógenos, relacionados con el nivel de energía de la membrana, sobre este comportamiento particular de la cinética de hidrólisis de ATP.

Los factores estudiados son:

- 1) Efecto de la provisión de energización suplementaria a través del transporte de electrones fotosintéticos.
- 2) Efecto de un desacoplante en concentraciones óptimas para estimular la hidrólisis

de ATP y en concentraciones altas que provocan inhibición.

Se estudió de manera paralela la liberación de Pi y el "quenching" de la fluorescencia de la 9-AA (123-125, 51) ambos resultantes de la hidrólisis de ATP.

En la Fig. 50 se observa que el máximo nivel de ΔpH , se establece de manera tal, que la membrana está casi completamente energizada en el momento en que el período de inhibición en la liberación de Pi está por terminar. Sin embargo, el nivel de energía durante la fase de estado estacionario no sufre ninguna variación sustancial y no hay indicación de fluctuaciones en el cambio de ΔpH , paralelas al fenómeno descrito en la hidrólisis de ATP.

No se ha podido explicar de qué manera casi un máximo de "quenching" de la fluorescencia (máximo nivel de energía) puede coexistir con el estado Inhibido de la ATPasa.

Se debe señalar que 10 μM 9-AA no afecta el patrón de cinética de ATPasa, pero sí provoca un efecto inhibitorio del 40% en el estado estacionario.

Los controles que se muestran en la Fig. 50 son coherentes con el criterio aceptado de que el "quenching" de la fluorescencia de la 9-AA refleja la construcción de un gradiente de pH transmembrana. En este sentido, nótese que la adición de oligomicina o FCCP resulta en una recuperación del nivel de fluorescencia original. Esto es el reflejo de una liberación neta de los protones que habían sido previamente translocados al interior de la vesícula cromatofórica. La oligomicina bloquea la actividad translocadora de protones del factor de acoplamiento dependiente de ATP, inhibiendo concomitantemente la hidrólisis. Por su parte el FCCP aumenta la permeabilidad de la membrana a los H^+ .

Por otro lado, la luz (en ausencia de PMS) aumenta, sólo de manera parcial pero reversiblemente, el ΔpH construido por la ATPasa.

Estos experimentos muestran que:

- 1) El rango de tiempo en que varía (aumenta) el nivel de energía (ΔpH) hasta establecer un nivel de estado estacionario, es del mismo orden de aquél en que ocurre todo el comportamiento de pre-estado estacionario en la liberación de Pi.
- 2) En el momento en que se presenta la inhibición de la reacción ATPasa, el nivel de energía de la membrana es alto, aunque inexplicablemente, ni se colapsa el gradiente de protones, cuando está inhibida ni aumenta aceleradamente al reiniciarse la reacción con el comienzo de la fase estado estacionario de la hidrólisis.

V.5 Efecto de la luz sobre el fenómeno de inhibición en la fase pre-estado estacionario

Las Figs. 51, 52 y 53 muestran que la luz afecta la actividad ATPásica tal como

lo han mostrado otros investigadores (147,193,195,198,204-206).

Sin embargo, es interesante notar que la luz afecta la reacción de manera diferente dependiendo del preciso instante en el que se la suministra.

Si la luz se provee en el estado inhibido (Fig. 51 a) la duración de éste se prolonga, luego la velocidad de hidrólisis aumenta y el sistema sufre un segundo fenómeno transitorio repitiendo el patrón inicial de hidrólisis.

A veces, a ese segundo fenómeno le sigue un tren de tres o cuatro fenómenos transitorios que en todas sus características son más pequeños que aquel (Fig. 52 A).

En cualquiera de los casos, el curso de la reacción se reestabiliza en un estado estacionario.

En un experimento similar, cuando la luz se apaga durante el estado inhibido ("plateau"), la velocidad de reacción aumenta inmediatamente, sufre una segunda inhibición transitoria y adopta luego un comportamiento de estado estacionario (Fig. 51 b y Fig. 53 B).

La Fig. 52 B muestra el efecto de un pulso de luz en el estado estacionario. Durante el período en que la luz está prendida no se alcanza a observar ningún efecto, sin embargo luego de apagarla, la reacción se desvía del curso original, reproduciendo un fenómeno similar, aunque no idéntico, al observado en el pre-estado estacionario.

Los estados estacionarios que se establecen luego de un pulso de luz o al dejar la luz prendida, pueden estar inhibidos de 0% hasta un 50% según los experimentos.

Finalmente y de manera más controvertida, si la luz se suministra desde el principio de la reacción, en algunos casos la inhibición transitoria no se observa, la velocidad es mayor y la reacción es lineal por lo menos hasta 8 min, ver Fig. 53 E, sin embargo observar también la Fig. 53 D en la que el comportamiento es diferente. El comportamiento mostrado en la Fig. 53 E evidencia un efecto activador de la luz. Sin embargo, pareciera haber una intensidad de luz óptima para minimizar el fenómeno transitorio y también producir una activación máxima de la reacción (esto no fue investigado detalladamente).

La interpretación de estos datos no es obvia. Es más, se observó que en algunos experimentos, la luz provista en el estado inhibido no alarga dicho estado.

Se puede postular, en principio, que la luz tiene un efecto doble. Aumenta la actividad enzimática a través de algún mecanismo no determinado y por otro lado también la inhibe, probablemente a través de su contribución a la retropresión de H^+ . El efecto inhibitorio se reflejaría, por un lado en un alargamiento del "plateau" y por otro en una velocidad de estado estacionario menor, tanto cuando la luz se mantiene prendida como, a veces, cuando se la apaga durante el experimento.

La posibilidad de una oscilación (actividad-no actividad) en el funcionamiento del factor de acoplamiento al hidrolizar ATP (en oscuridad, al iniciarse la reacción (Fig. 45 A, 46 A y 56), o inducida por la luz en ausencia de PMS (Fig. 52), o en idénticas condiciones pero agregando PMS 5 μM al prender la luz (no se muestra) es sugestivamente apoyada por los resultados encontrados en la Fig. 54. El mero intercalamiento de un período de oscuridad en la segunda fase de la fotofosforilación mediada por PMS a baja temperatura, ver Capítulo III, provoca que el subsiguiente curso de la reacción se torne oscilante, en el sentido de alternar períodos de actividad e inactividad o incluso de síntesis e hidrólisis. Aunque este estudio es preliminar, el comportamiento general fue reproducido con dos preparaciones de membrana diferentes en las siete oportunidades en que se lo provocó.

Nótese que en la Fig. 3 las curvas D y E tienen un desarrollo experimental similar al de la Fig. 54. Sin embargo, aparentemente no se distinguen los mismos resultados. Esto puede ser debido, muy probablemente, a que en la Fig. 3 ni la duración de dichas reacciones, ni la resolución fueron suficientes como para detectar una oscilación. En efecto, se debe notar que la pendiente "global" de las curvas D y E de la Fig. 54 coinciden con la de la segunda fase de la reacción A de la misma figura, tal como ya se mostró en la Fig. 3.

V.6 Efecto de un desacoplante (FCCP) sobre la fase pre-estado estacionario.

La Fig. 55 a y b muestra el efecto de dos concentraciones diferentes de desacoplante. La Fig. 55 a muestra el efecto de una inducción por FCCP, cuando este se provee en diferentes momentos de la reacción. Una concentración óptima de FCCP (2 μM) aumenta la actividad de ATPasa independientemente del instante en que se lo provee y la tendencia es que la fase pre-estado estacionario (tanto el "lag" como el período de inhibición transitoria) desaparece o se atenúa notablemente. A altas concentraciones de FCCP que resultan inhibitorias (10 μM) se obtienen los resultados de la Fig. 55 b. En estas condiciones se observa nuevamente la manifestación de una fase pre-estado estacionario con un período de inhibición transitoria. La reacción recomienza con una velocidad que decae hasta estabilizarse en un estado estacionario que está inhibido entre un 50% y 70% respecto del control sin desacoplante.

Usando las concentraciones óptimas de FCCP, también desaparece la repetición de la fase pre-estado estacionario (oscilaciones sucesivas) en las preparaciones donde ocurre, ver Fig. 56. Sin embargo, también se observa que si se usan concentraciones aunque sólo sean levemente mayores, el fenómeno reaparece.

Cabe señalar que el efecto estimulador de un desacoplante sobre la fase estado

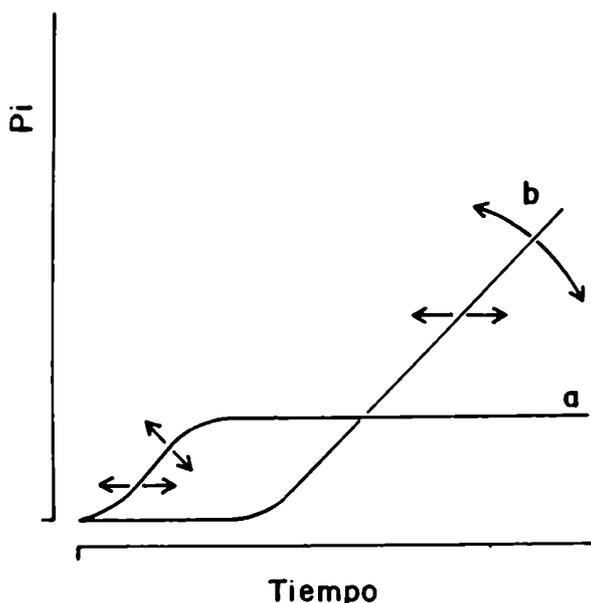
estacionario, titulando con FCCP a los 5 min de haberse desencadenado la reacción, presenta un óptimo de FCCP de alrededor de 2 μM (no se muestra). Este resultado surge de un experimento del cual se muestra una parte en la Fig. 55 a.

Ya se observó en la Fig. 50 que el gradiente de H^+ inducido por la hidrólisis de ATP es disipado inmediatamente por una concentración de FCCP de 10 μM y que el transporte electrónico inducido por la luz tampoco puede reconstruir un gradiente de protones. El desacoplante colapsa la acumulación neta de H^+ y no se establece un $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$.

Por lo tanto, cualquier efecto de la luz, tal como el mostrado en la Fig. 55 b sobre la actividad de Mg-ATPasa, debe estar mediado por algún tipo de interacción entre el sistema de transporte de electrones y el factor de acoplamiento que no sería afectada por el desacoplante en estas concentraciones. Sin embargo dicha interacción también podría ser un gradiente de protones y entonces se puede postular que ese gradiente no está en equilibrio rápido con el espacio osmótico general del cromatóforo dado que este último está comunicado con el exterior a través del desacoplante, es decir, se trataría de un gradiente de protones intramembrana (más localizado).

V.7 Discusión General

Para explicar el curso de la reacción en la fase pre-estado estacionario se podría proponer en un modelo empírico la coexistencia de dos reacciones que liberan P_i , que procederían en el tiempo tal como se muestra en la siguiente figura.



La característica fundamental del modelo consiste en que la reacción (a) se agota luego de un lapso, mientras que la reacción (b) se mantiene constante, dando lugar al estado estacionario observado. Ambas reacciones tendrían un "lag" y velocidades de reacción susceptibles de variabilidad (flechas). Esta variabilidad podría depender tanto de la preparación cromatofórica, como de los diferentes agentes químicos y físicos probados en estos experimentos. Las diferentes combinaciones de las duraciones de los "lag" y de las velocidades respectivas porveerían la aparición, más o menos marcada, de todos los tramos de la "fase pre-estado estacionario".

Sin embargo, los hechos de que todas las fases de la reacción dependen de ATP exógeno y son sensibles a oligomicina, y que el "quenching" de la fluorescencia de la 9-AA (ΔpH) comienza a establecerse desde el desencadenamiento de la reacción, sugieren que la liberación de Pi previa al estado estacionario está relacionada con la hidrólisis de ATP a nivel del factor de acoplamiento, operando de la manera conocida.

En apoyo a esto último, es de notar que en la gran mayoría de los experimentos prácticamente no hay reacción en la fase inhibida "plateau" de manera tal que, si se acepta la hipótesis de los dos procesos liberadores de Pi, la reacción (b) no habría comenzado aún en el período del "plateau" y entonces necesariamente se deberá aceptar que la primera fase de la curva de liberación de Pi (hasta la "inhibición") tiene que representar una actividad de H^+ -ATPasa, pues hay intrusión de H^+ desde un comienzo, tal como se indicó arriba.

De nuevo, aceptando la hipótesis de dos reacciones coexistentes, sería complicado explicar, por un lado, porqué la segunda reacción (curva b) comenzaría sólo luego de un considerable lapso de tiempo de haber finalizado la primera (curva a), y por otro lado, la aparición de una nueva fase "pre-estado estacionario" (que a priori consideraremos homóloga a la inicial) después de un pulso de luz en el "plateau", ya que entonces habría que aceptar que además de reaparecer el fenómeno descrito por la reacción (a), se vuelve a frenar la reacción (b).

A partir de este análisis se consideró como más plausible la hipótesis de que todo el curso de la reacción se cumple a nivel del factor de acoplamiento unido a la membrana fotosintética y que es un mismo sistema enzimático el que pasa por períodos de actividad e inactividad.

No está claro aún, cuál es el grado preciso de participación tanto de los protones "localizados" como de los "quimiosmóticos", en cuanto a intermediarios energéticos, en el funcionamiento de la H^+ -ATPasa reversible ver Introducción 1.2.

Si el fenómeno transitorio descrito aquí, está determinado principalmente por cambios en el contenido de energía de la membrana, la hipótesis quimiosmótica de acoplamiento no puede explicar por sí misma la existencia de dos niveles diferentes de actividad (uno activo y otro inactivo, ver Fig. 50) con un contenido de energía invariante que debería ser supuestamente paralelo al ΔpH observado.

Podría especularse que los protones, ya sean todos o sólo una fracción, son inicialmente bombeados por la ATPasa a un dominio que no está en equilibrio rápido con el espacio osmótico principal. Las bajas temperaturas retardarían aún más dicho equilibrio.

Por lo tanto, podría ser que la inhibición de la hidrólisis ("plateau") fuese producida por una excesiva acumulación de protones en dicho dominio. Se propone que la duración del estado inhibido es proporcional al tiempo requerido para disminuir la concentración local de protones. Las vías de disipación podrían involucrar al espacio osmótico como intermediario o podrían ser "directas" desde la membrana hacia el espacio exterior. Es más, el alargamiento del "plateau" por la luz, podría ser la consecuencia de un aumento de protones en el espacio no-osmótico, prolongando así el tiempo requerido para disminuir esta concentración local de protones a niveles permisivos.

Concentraciones óptimas de FCCP podrían ser capaces de afectar la concentración de H^+ en ambos dominios y en especial manteniendo en su nivel óptimo a los protones localizados. Si éste fuera el caso, altas concentraciones de desacoplante (FCCP 10 μM) no deberían permitir la aparición de protones en concentraciones inhibitorias en el espacio no-osmótico, ver sin embargo que en la Fig. 55 b parece ser así dado que se repite el patrón de inhibición.

Considerando este último resultado, no se puede ofrecer una explicación, a no ser que se imponga una nueva restricción a este modelo de regulación.

Si no fuese la concentración absoluta de los protones localizados en dos dominios diferentes como se propuso arriba, sino en cambio su relación lo que fuera importante, entonces, los resultados con o sin desacoplantes podrían ser explicados suponiendo lo siguiente. Tanto con altas concentraciones (inhibitorias) de FCCP o en ausencia de desacoplante, se observa el "plateau" porque bajo esas condiciones, la relación protones no-osmóticos/protones osmóticos (localizados/no-localizados) ha aumentado substancialmente alcanzando niveles inhibitorios. En ausencia del desacoplante esto ocurre al principio de la reacción, porque el dominio osmótico está inicialmente "vacío" de protones.

Con concentraciones altas de desacoplante esta situación es la consecuencia de una alta disipación de H^+ (supuestamente los protones osmóticos dado que el "espacio

no-osmótico" será insensible a dichas concentraciones del desacoplante FCCP, ver V.6. Sólo con una óptima velocidad de disipación de protones osmóticos (obtenida alrededor de 1-2 μM FCCP) que establezca una óptima relación de protones en ambos dominios, se podría producir una velocidad de hidrólisis óptima y evitar al mismo tiempo el fenómeno transitorio.

Esta suposición de que protones localizados participan en la operación del sistema transductor de energía, está de acuerdo con propuestas similares (22,26,27,28,133).

Por otro lado, es interesante mencionar que se están estudiando diversos modelos de química inorgánica, orgánica y biológica referentes a "reacciones oscilantes" en los que las concentraciones de reactivos y productos no proceden en el tiempo según las leyes cinéticas clásicas (207).

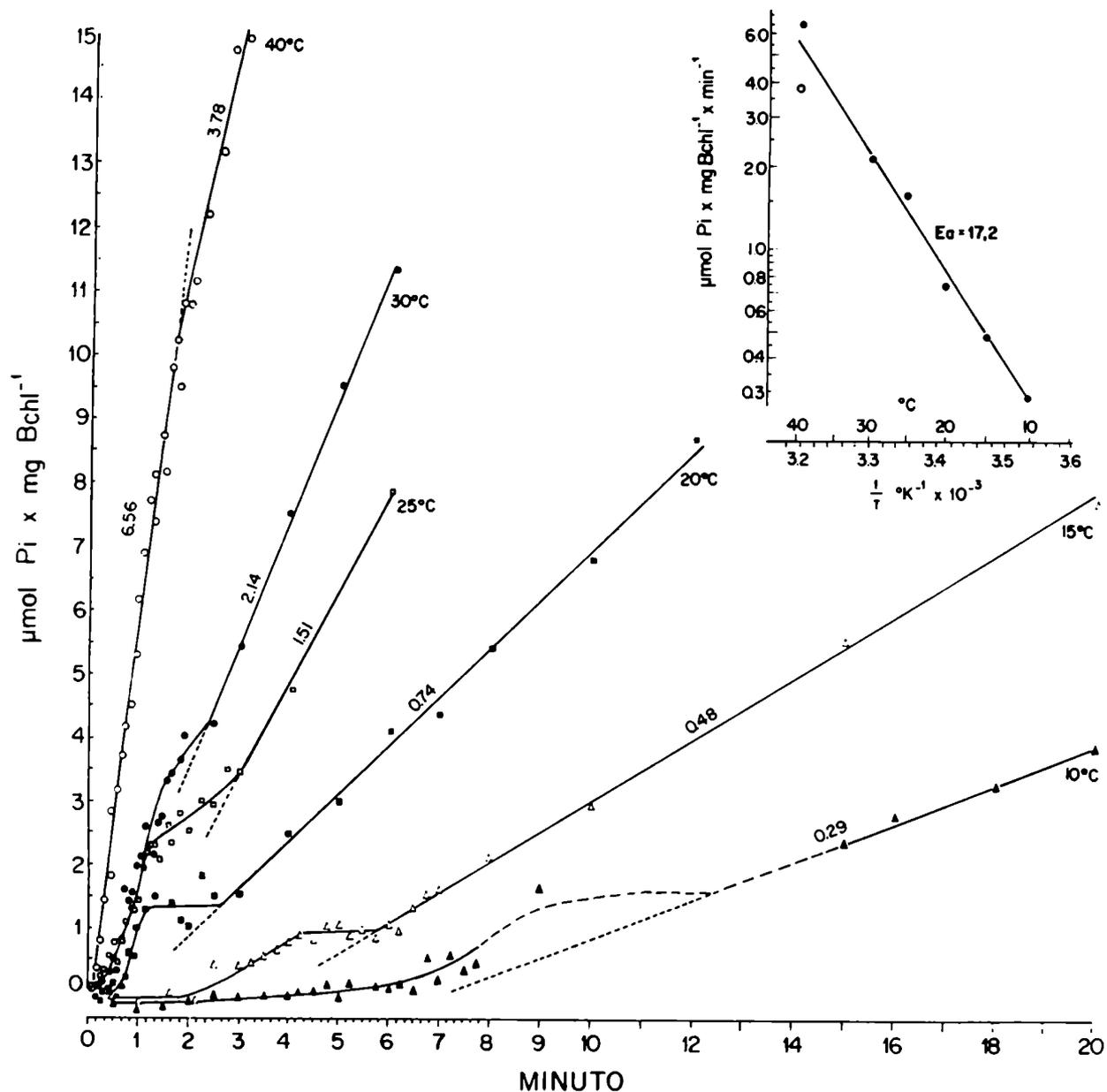


Figura 44

Presencia de un fenómeno de inhibición transitoria en la fase "pre-estado estacionario" en el curso de la reacción ATPásica en cromatóforos, a diferentes temperaturas.

El pH es 8,0 a todas las temperaturas. La concentración de cromatóforos es equivalente a $14 \mu\text{g Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Los gráficos de las reacciones a 10°C , 15°C y 20°C están levemente desplazados hacia abajo por razones de claridad. Con línea punteada se extrapolan las fases de estado estacionario para facilitar la evidencia de la fase inicial. Las reacciones a 10°C y 15°C mantienen su velocidad hasta por 30 min. En el caso de 10°C se propone, con línea punteada, el curso de la reacción en un intervalo en el que falta información. Las velocidades de estado estacionario se expresan en $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg Bchl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Se muestra además un gráfico de Arrhenius de la velocidad de los estados estacionarios. Los dos valores (círculo lleno y vacío) graficados a 40°C son, respectivamente, las velocidades de la primera y segunda fase detectadas en este experimento. La E_a está expresada en $\text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.

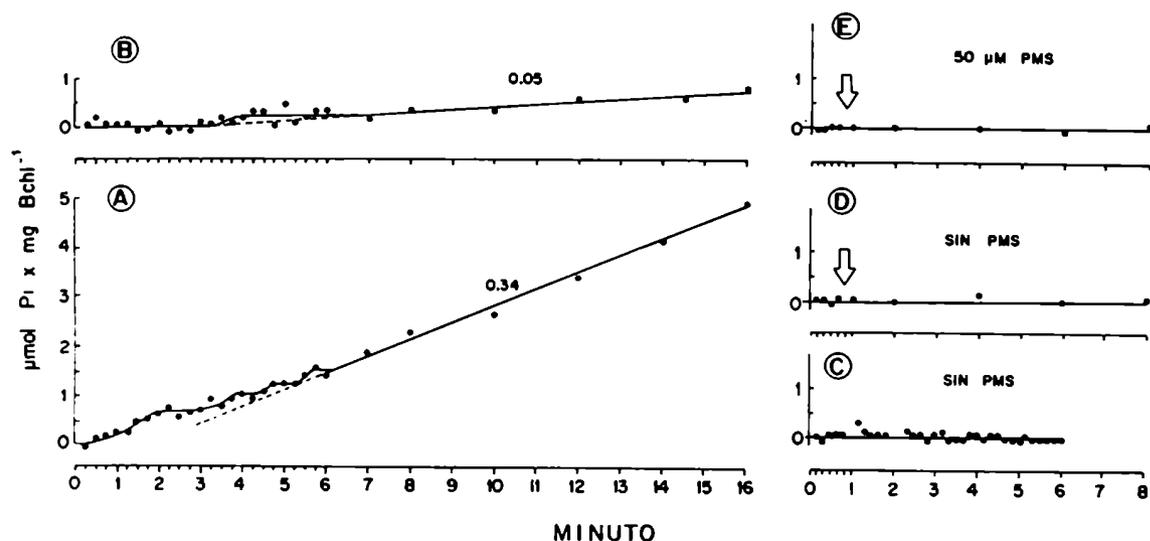


Figura 45

Efecto de un inhibidor de la transferencia de energía (oligomicina) y dependencia de ATP exógeno en el curso de la reacción de la ATPasa.

A y B- Inhibición por oligomicina 10 μM . Se preincubaban los cromatóforos ($27 \mu\text{g Bchl}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $10,5^\circ\text{C}$ durante 10 min en oscuridad en mezcla de reacción de ATPasa sin ATP. El control A, se preincuba en presencia de $1 \mu\text{l MeOH}\cdot\text{ml}^{-1}$ mientras que B se preincuba en presencia de oligomicina (disuelta en MeOH) $10 \mu\text{M}$ (representa $1 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ de mezcla de reacción). En ambos casos, la reacción se desencadena a la misma temperatura, con el agregado de 2mM ATP . La velocidad del estado estacionario se expresa en $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{mg Bchl}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

C, D y E- La medición de Pi se hace incubando cromatóforos ($45 \mu\text{g Bchl}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 31°C en ausencia de ATP. C- La incubación se hace en oscuridad. D- Igual que C hasta los 50 seg, momento en que se prende la luz, manteniéndosela hasta el final del experimento. E- Igual que D, pero todo el experimento transcurre en presencia de $50 \mu\text{M PMS}$.

La flecha indica el momento en que se prende la luz. La reacción se lleva a cabo en una mezcla única y el sistema de iluminación es el descripto para ese caso en "Materiales y Métodos", ver 11.12.

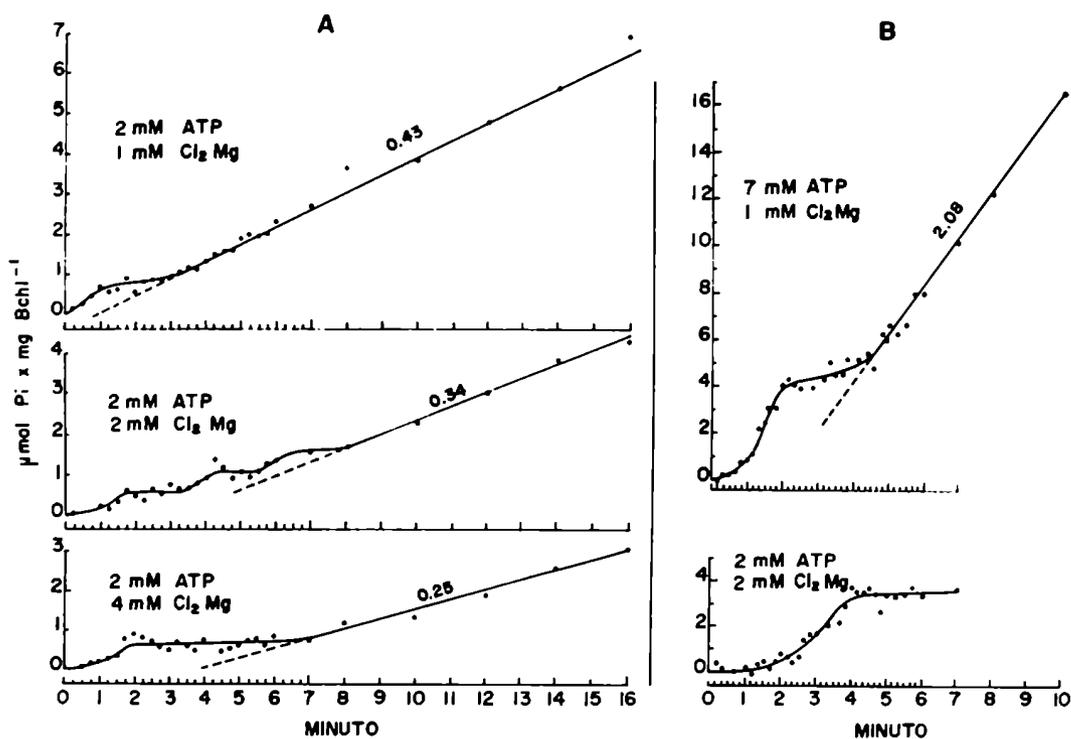


Figura 46

Efecto de distintas relaciones ATP/Mg²⁺ sobre el curso de la reacción ATPásica de cromatóforos.

A y B son dos preparaciones de cromatóforos diferentes. En ambos casos, la concentración de cromatóforos es equivalente a 26 $\mu\text{g Bchl}\cdot\text{ml}^{-1}$.

A- Temperatura = 10°C. B- Temperatura = 5°C.

Los experimentos hechos con cada preparación fueron realizados en el mismo día.

En el caso B (2 mM ATP-2 mM Cl₂Mg) se estudió sólo la primera fase.

Las velocidades se expresan en $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{mg Bchl}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

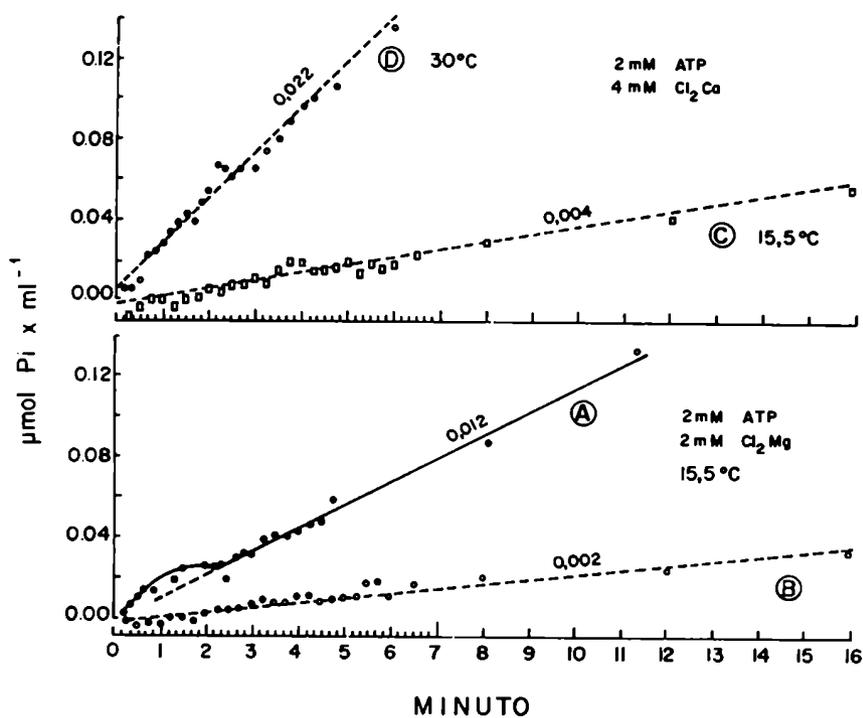


Figura 47

Hidrólisis de ATP llevada a cabo por cromatóforos y por una preparación soluble con actividad ATPásica (F1).

A- La reacción es llevada a cabo por cromatóforos (19 μg Bchl.ml⁻¹) en la mezcla de reacción estándar.

B, C y D- La reacción es llevada a cabo por la preparación soluble libre de membrana (concentración final = 220 μg proteína.ml⁻¹), ver "Materiales y Métodos" (11.3). B se desarrolla en la mezcla de reacción estándar, mientras que en C y D el Cl₂Mg es reemplazado por Cl₂Ca en concentración 4 mM. La línea punteada es, en cada caso, un curso de reacción probable.

En todos los casos la velocidad del estado estacionario se expresa en μmol Pi.ml⁻¹. La E_a estimada a partir de las reacciones C y D es 21,4 Kcal.mol⁻¹.

La reacción D muestra una velocidad idéntica a la registrada para F₁ de Rps. capsulata en (112).

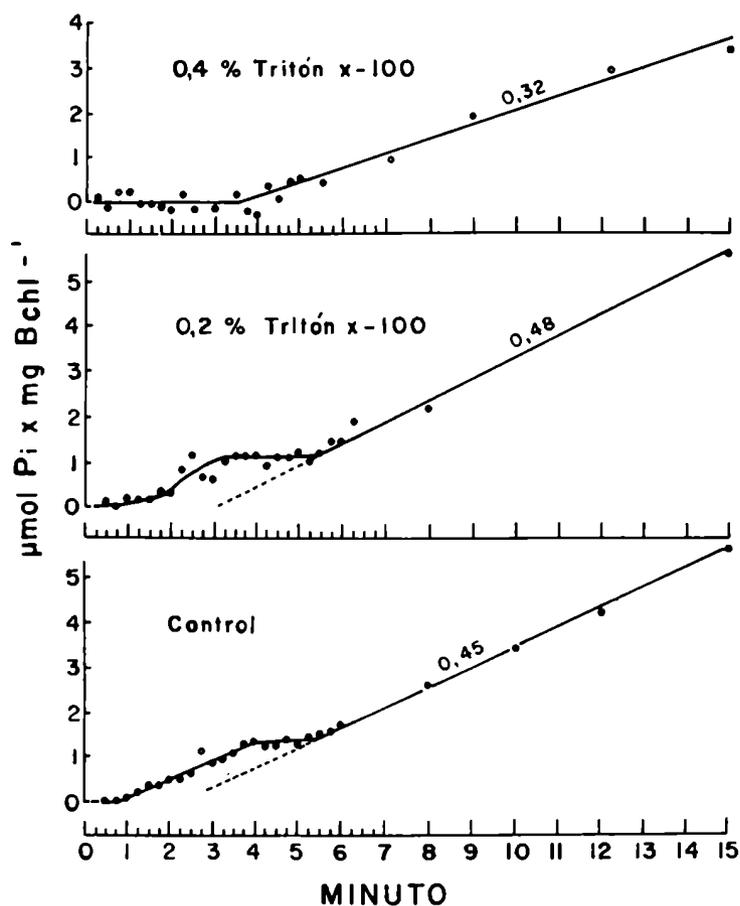


Figura 48

Efecto de un pretratamiento de los cromatóforos con Triton X-100 sobre la reacción ATPásica a 11°C.

Previo a la reacción, se preincubaban los cromatóforos ($0,23 \text{ mg Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$) con las concentraciones (v/v) de Tritón X-100 indicadas en la figura durante 15 min en hielo y oscuridad. Inmediatamente luego del agregado de Tritón X-100, la suspensión de cromatóforos se torna más cristalina. La concentración final de los cromatóforos en la mezcla de reacción es equivalente a $23 \mu\text{g Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$, mientras que la de Tritón X-100 es 0%, 0.02% y 0.04% en cada caso. La velocidad del estado estacionario se expresa en $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg Bchl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

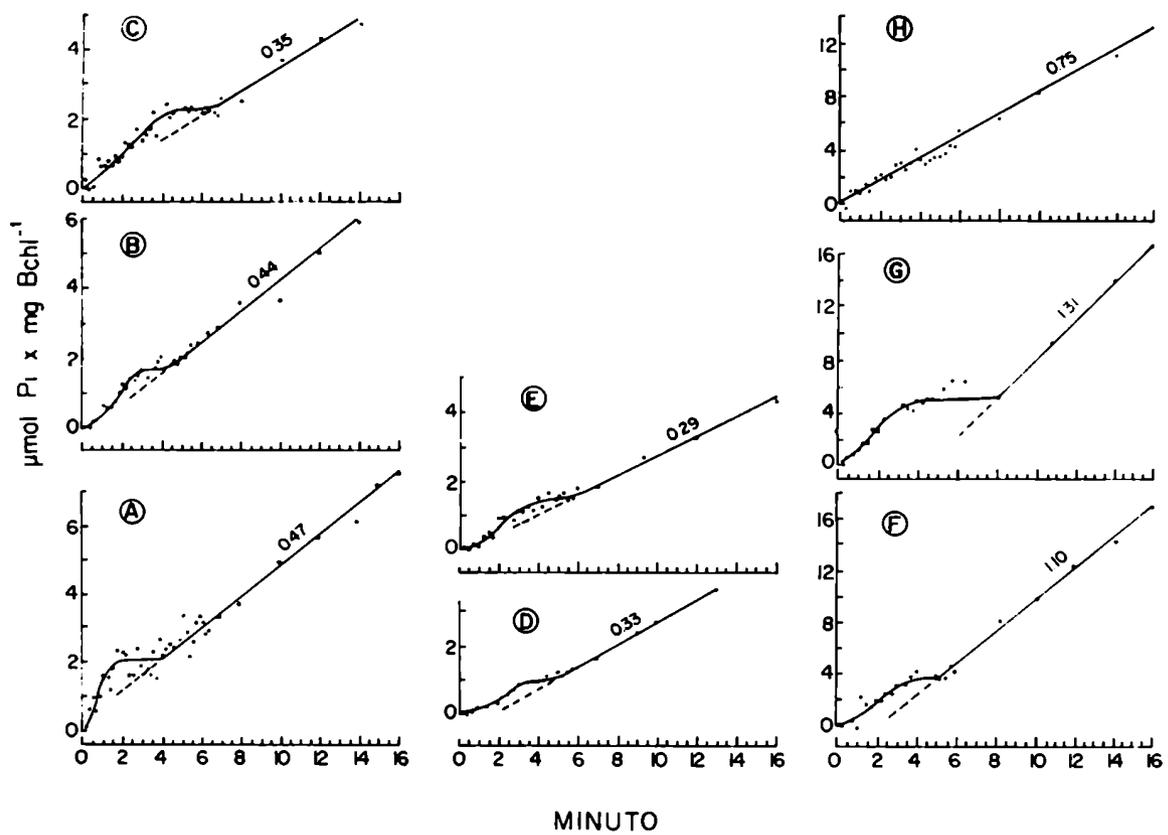


Figura 49

Reproducibilidad de la fase pre-estado estacionario de la reacción ATPasa de cromatóforos luego de una preincubación en condiciones de ATPasa o/y fotofosforilación. Ver la leyenda en la pág. 172.

Figura 49 (Leyenda)

Reproducibilidad de la fase pre-estado estacionario de la reacción ATPasa de cromatóforos luego de una preincubación en condiciones de ATPasa o/y fotofosforilación.

Luego de los diferentes pretratamientos se trasladan las mezclas de reacción al hielo y oscuridad. Los cromatóforos se recuperan por ultracentrifugación a través de 10 ml de un "colchón" de sacarosa 20% (p/v) en "buffer de sonicación" en un rotor 60 Ti a 250.000 g por 60 min. Los cromatóforos se resuspenden en "buffer de sonicación" y seguidamente se llevan a cabo las mediciones de ATPasa. Cada grupo de experimentos se hace en el mismo día. A-B-C, D-E y F-G-H son experimentos hechos con 3 preparaciones de cromatóforos diferentes, respectivamente. Todos los experimentos fueron reproducidos 2-3 veces con 2 preparaciones de cromatóforos diferentes. Las velocidades se expresan en $\mu\text{mol Pi.mg Bchl}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Los pretratamientos en luz se llevan a cabo en forma de un único "pool" en un vaso de incubación tal como el descrito en "Materiales y Métodos" (11.12) y se ilumina de la manera mencionada para ese caso.

A, B y C- La temperatura de reacción a la cual se estudian las diferentes membranas pretratadas es 11°C y la concentración de cromatóforos es equivalente a $20 \mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$.

Pretratamientos:

A- Los cromatóforos se preincubaban en oscuridad en "buffer de sonicación" ($43 \mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$) a 10°C por 10 min.

B y C- Los cromatóforos se preincubaban en oscuridad en mezcla de reacción de ATPasa a 10°C durante 10 min. Luego de ultracentrifugar como se indicó arriba se los incubó en mezcla de reacción de fotofosforilación conteniendo $50 \mu\text{M PMS}$ a 30°C durante 10 min en oscuridad (B) o con luz (500 W) (C). Luego de este tratamiento los cromatóforos son nuevamente recuperados por ultracentrifugación.

D y E- La temperatura de reacción a la cual se estudian las diferentes membranas es 10°C y la concentración de cromatóforos equivalente a $20 \mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$.

Pretratamientos:

D- La reacción se desencadena sin pretratamiento de los cromatóforos.

E- Los cromatóforos fueron preincubados en mezcla de ATPasa durante 6 min en oscuridad a 10°C . Luego fueron recuperados por ultracentrifugación.

F, G y H- La temperatura de reacción a la cual se estudian las diferentes membranas pretratadas es 15°C y la concentración de cromatóforos equivalentes a $8,7 \mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$.

Pretratamientos:

F- Los cromatóforos fueron preincubados en oscuridad en "buffer de sonicación" a 30°C durante 10 min.

G- Igual que F pero en mezcla de fotofosforilación sin PMS.

H- Igual que G pero en presencia de luz.

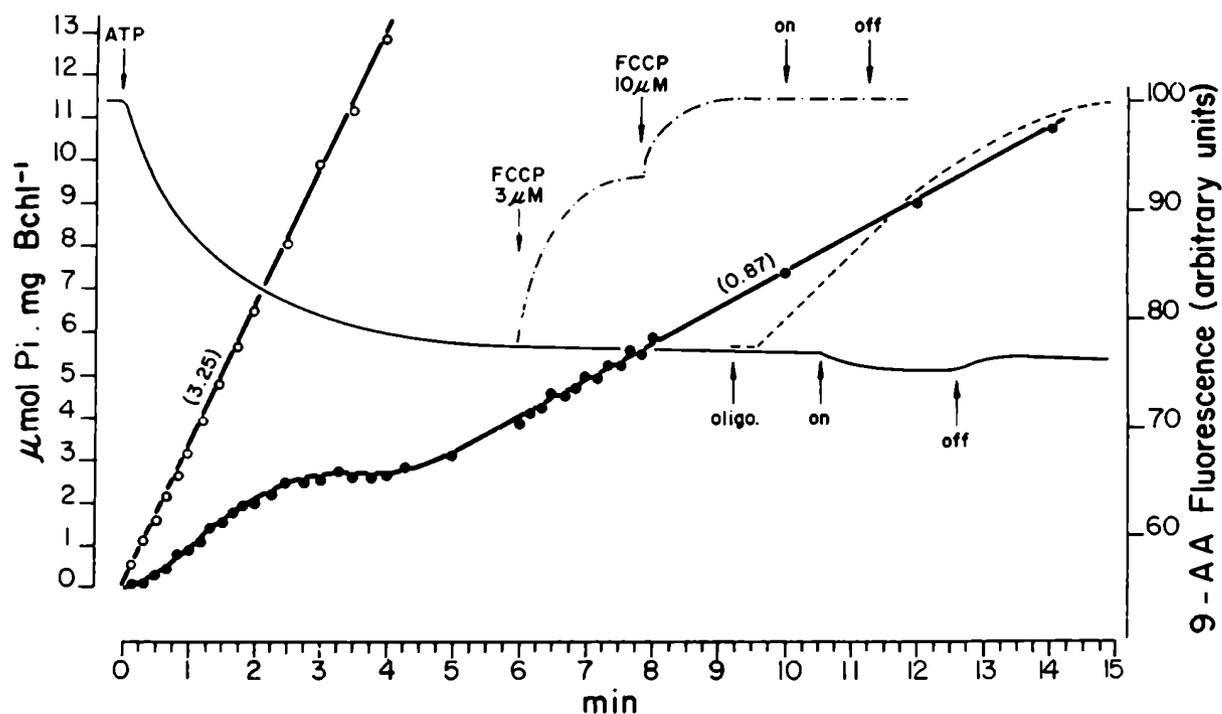


Figura 50

Comparación entre las curvas de tiempo de la liberación de Pi y del "quenching" de la fluorescencia de la 9-AA inducido por la hidrólisis de ATP por la H⁺-ATPasa de los cromatóforos.

Hidrólisis de ATP. La mezcla de reacción es la descrita en "Materiales y Métodos". La reacción se desencadena por el agregado de cromatóforos (20 $\mu\text{g Bchl}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se lleva a cabo a dos temperaturas ($\bullet\text{---}\bullet\text{---}\bullet$ 15°C) y ($\circ\text{---}\circ\text{---}\circ$ 30°C). Los números en paréntesis indican la velocidad de "estado estacionario" de la hidrólisis en $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{mg Bchl}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

"Quenching" de la 9-AA. La composición de la mezcla de reacción es la descrita en "Materiales y Métodos". Donde se indica se inició la reacción con el agregado de ATP 2 mM (—). Se muestra además la respuesta de la adición en dos pasos de FCCP hasta 10 μM (---) y también el efecto, dependiente del tiempo, de oligomicina 10 μM (-----). Donde se indica se prende ("on") y se apaga ("off") la luz actínica. La concentración de cromatóforos es en todos los casos 20 $\mu\text{g Bchl}\cdot\text{ml}^{-1}$. La reacción se lleva a cabo a 15°C.

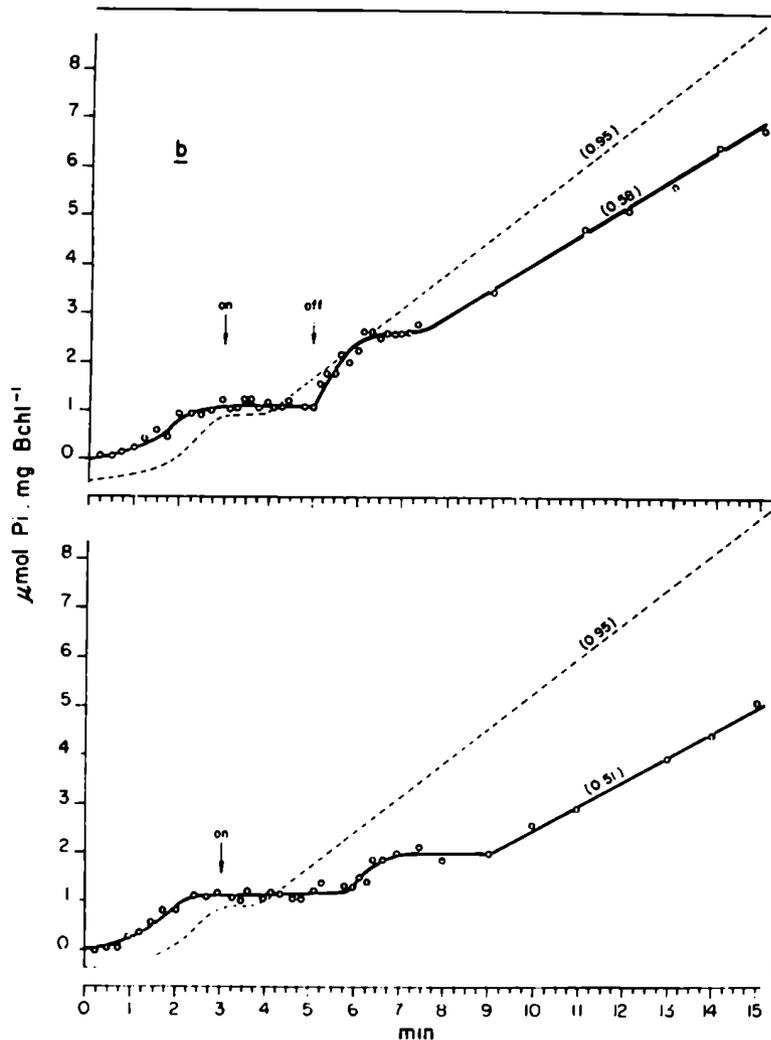


Figura 51

Efecto de la luz sobre la actividad Mg-ATPásica de cromatóforos (1).

a. Efecto de la luz suministrada durante el estado inhibido y mantenida hasta el final del experimento.

b. Efecto de la luz suministrada durante el estado inhibido y apagada antes del final de dicho estado.

En los dos casos la temperatura es de 12°C, y el sistema de iluminación es el descrito para los experimentos medidos con una mezcla de reacción única, ver "Materiales y Métodos" (11.12). La concentración de cromatóforos es equivalente a 30 $\mu\text{g Bchl.ml}^{-1}$.

En ambas figuras las curvas punteadas representan el mismo control de actividad ATPásica desarrollada totalmente en oscuridad y están levemente desplazadas hacia abajo por razones de claridad.

Los números en paréntesis indican la velocidad de "estado estacionario" de la hidrólisis en $\mu\text{mol Pi.mg Bchl}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Donde se indica, se prende ("on") y se apaga ("off") la luz.

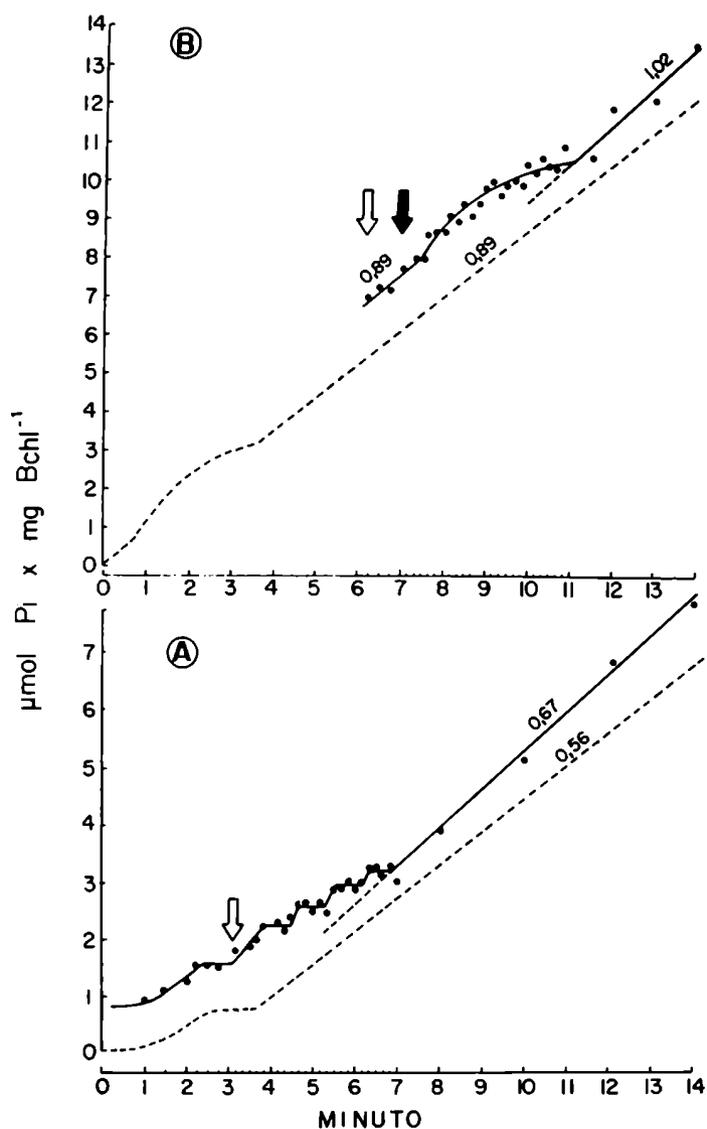


Figura 52

Efecto de la luz sobre la actividad Mg-ATPásica de cromatóforos (II).

A- La reacción ATPásica transcurre en oscuridad hasta que se prende la luz en un momento medio del "plateau".

B- La reacción ATPásica transcurre en oscuridad y en el estado estacionario se provee de un pulso de luz de 1 min.

A y B son dos preparaciones de membrana diferentes y en ambos casos la concentración de cromatóforos es equivalente a $15 \mu\text{g Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$. La temperatura es 15°C y el pH es 8,1. Las flechas blancas y negras indican el momento en que se prende y apaga la luz respectivamente. Las reacciones se llevan a cabo en un vaso de reacción único y el sistema de iluminación es el descrito para ese caso en "Materiales y Métodos", ver 11.12. La línea punteada es el curso de la reacción llevada a cabo enteramente en oscuridad. Las velocidades se expresan en $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg Bchl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Las curvas enteras están desplazadas hacia arriba por razones de claridad.

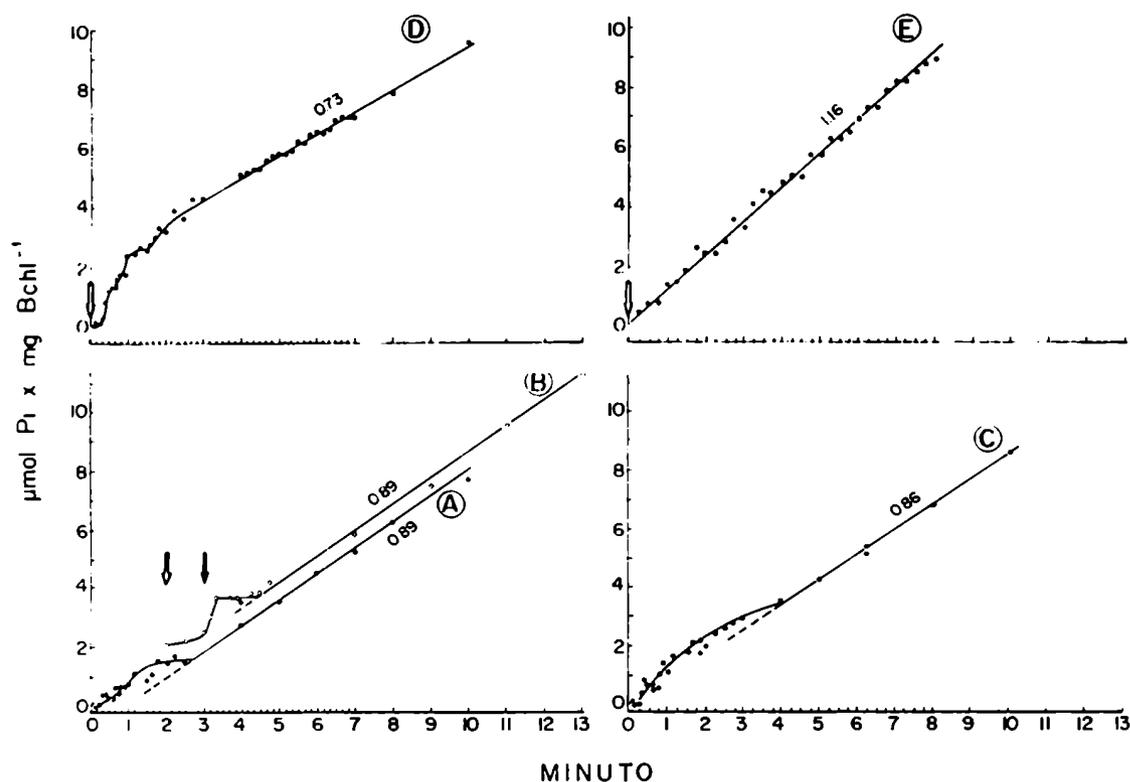


Figura 53

Efecto de la luz sobre la actividad ATPásica de cromatóforos (III).

A, B, C y D- La concentración de cromatóforos es equivalente a $18 \mu\text{g Bchl. ml}^{-1}$ y la temperatura es 22°C . Las cuatro reacciones se hacen en el mismo día con una misma preparación cromatofórica.

E- La concentración de cromatóforos es equivalente a $30 \mu\text{g Bchl. ml}^{-1}$ y la temperatura es 12°C . La preparación de cromatóforos en este caso es diferente a la usada en A-D.

Las flechas blancas y negras indican el momento en que se prende y se apaga la luz respectivamente. La velocidad del estado estacionario se expresa en $\mu\text{mol Pi. mg Bchl}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

A- La reacción se desencadena con cromatóforos y transcurre en oscuridad.

B- La reacción transcurre como en A (sin ser registrada) hasta los 2 min (mitad del "plateau"), momento en que se provee un pulso de luz de 1 min, para posteriormente continuar la reacción en oscuridad. El dibujo está ligeramente desplazado hacia arriba por razones de claridad.

C- Los cromatóforos son preiluminados a 22°C , durante 2 min, en mezcla de reacción de ATPasa sin ATP. Dos segundos antes de apagar la luz se agrega 2 mM ATP y se prosigue la reacción en oscuridad.

D- Igual que A, pero la reacción se desencadena con cromatóforos estando la luz prendida.

E- Como D, pero con otra preparación cromatofórica. Esta reacción pertenece al mismo experimento que las mostradas en la Fig. 51.

En B, C y D cada punto de la curva de tiempo se hace en un tubo de ensayo independiente, mientras que en E toda la reacción es desarrollada en un vaso de reacción único. Para cada uno de los casos, se usa el respectivo sistema de iluminación descrito en "Materiales y Métodos", ver 11.12.

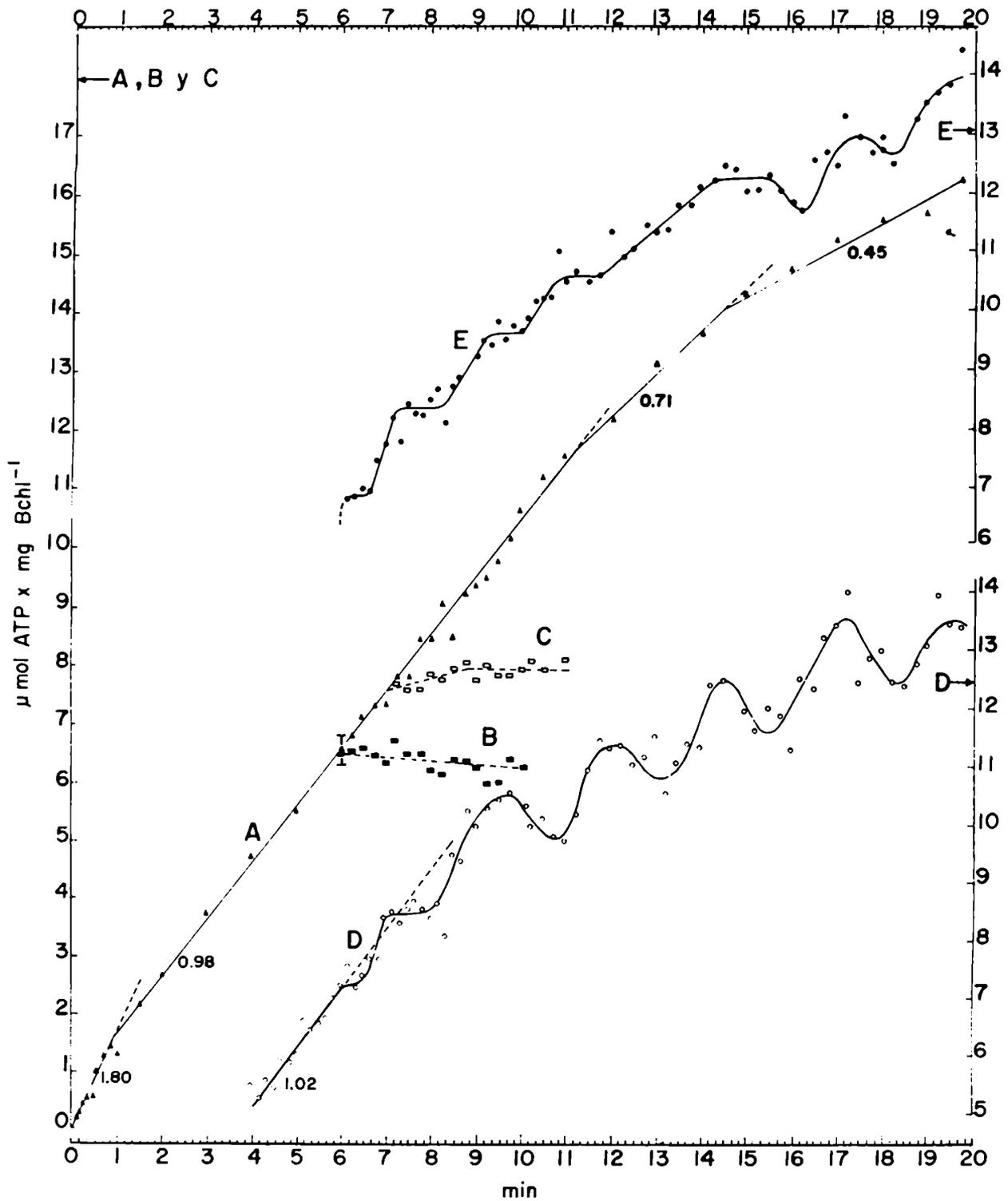


Figura 54

Potencialidad de oscilación del curso de la reacción de fotofosforilación a baja temperatura (3°C). Ver la leyenda en la pág. 178.

Figura 54 (Leyenda)

Potencialidad de oscilación del curso de la reacción de fotofosforilación a baja temperatura (3°C).

A- La reacción se lleva a cabo en condiciones estándar a 3°C y a pH 8,7. Iluminación estándar: 2 bombas de 150 W. En el rango comprendido entre 6 y 10 min la reacción se mide a intervalos de 15 seg. La barra vertical en el min 6 indica la dispersión experimental de 10 ensayos idénticos en tubos ubicados a lo largo de la gradilla de incubación. No se encontró ninguna regularidad de la dispersión en función de la posición en la gradilla.

B, C, D y E- Estas reacciones transcurren como en A hasta los tiempos indicados y seguidamente se interrumpe la luz manteniéndose la incubación a la misma temperatura (3°C) y en oscuridad durante 5 min (sin medir la reacción): "tratamiento de oscuridad". A continuación se reinicia la medición de la actividad a la misma temperatura y de la manera indicada en cada experimento. En los cuatro casos no se consideran, en la escala de tiempo, los 5 min del tratamiento en oscuridad.

B- Igual que A hasta los 6 min. Luego del "tratamiento de oscuridad" se mide la reacción durante 4 min adicionales en oscuridad. Se observa una leve actividad ATPásica.

C- Igual que A hasta los 7 min. Se aplica el "tratamiento de oscuridad" y en el min 4 de ese intervalo se agrega 4 μM FCCP para luego del 5° min reiniciar la iluminación y medición de la reacción durante 4 min adicionales.

D- Igual que A hasta los 4 min. Luego del "tratamiento de oscuridad" se reinician la iluminación y la medición de la reacción durante 16 min adicionales.

E- Igual que A hasta 6 min. Luego del "tratamiento de oscuridad" se reinician la iluminación y la medición durante 14 min adicionales.

Las velocidades se expresan en $\mu\text{mol ATP.mg Bchl}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Para cada reacción se indica la escala correspondiente. Ver comentarios en V.5.

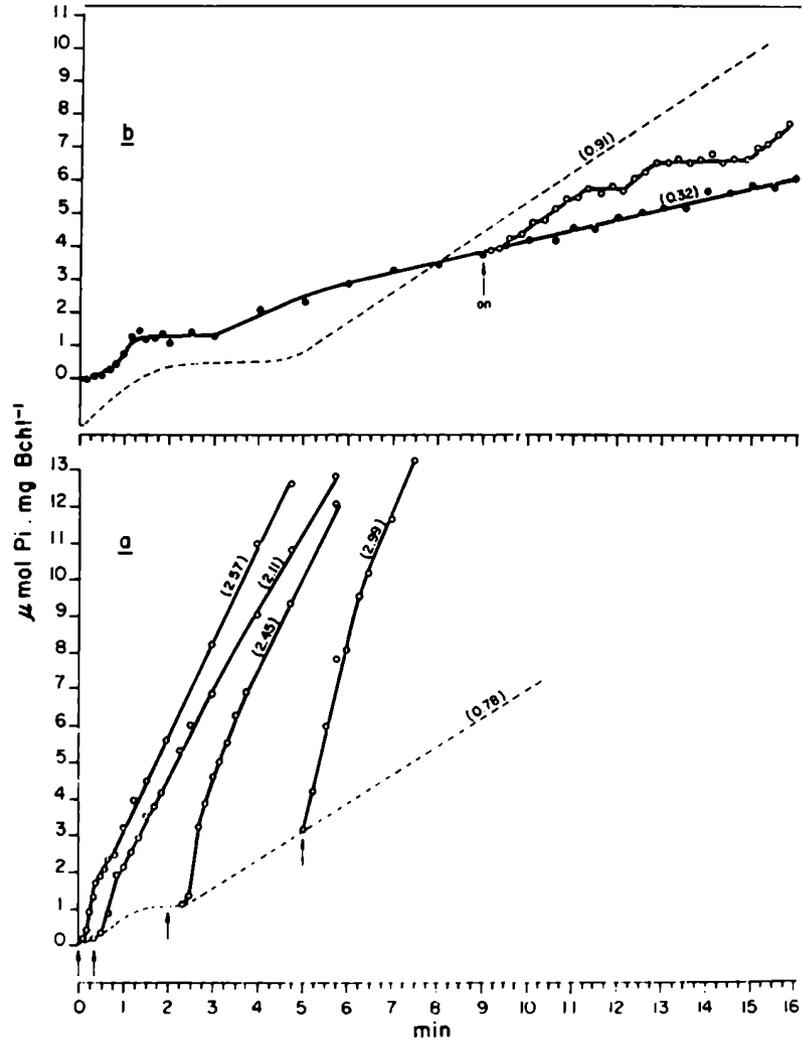


Figura 55

Efecto de un desacoplante sobre la actividad Mg-ATPásica de membrana.

a. Efecto de FCCP 2 μM suministrado en diferentes momentos de la curva de tiempo (flechas verticales). La curva punteada (control) es la actividad ATPásica en ausencia de desacoplante. En todos los casos la reacción se lleva a cabo en oscuridad. La concentración de cromatóforos es 18 $\mu\text{g Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$.

b. Efecto de FCCP 10 μM presente desde el comienzo de la reacción (●—●—●). Donde se indica ("on") se prende la luz y se la mantiene prendida hasta el final del experimento (○—○—○). El sistema de iluminación es el descrito en "Materiales y Métodos" (11,12) para el caso de una mezcla de reacción única. La concentración de cromatóforos es equivalente a 16 $\mu\text{g Bchl} \cdot \text{ml}^{-1}$ y la curva punteada (control en ausencia de desacoplante) fue dibujada desplazada levemente hacia abajo por razones de claridad.

En ambos casos la temperatura es de 15°C. Los números en paréntesis indican la velocidad del "estado estacionario" de la hidrólisis en $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg Bchl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

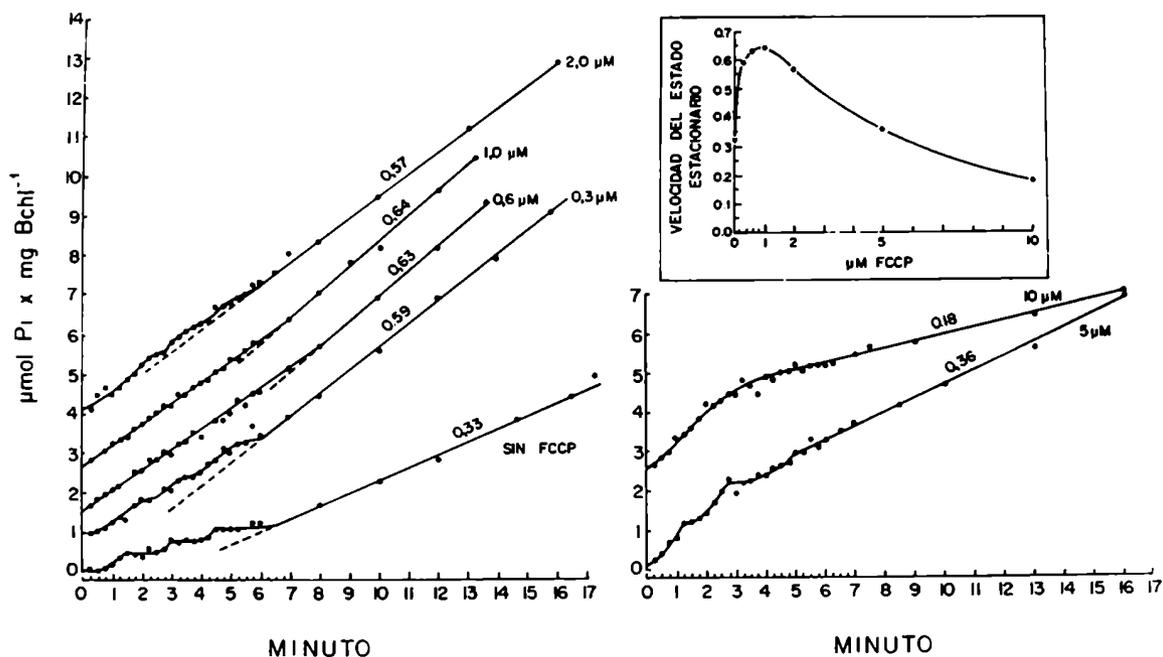


Figura 56

Existencia de un "tren" de fases "pre-estado estacionario" en algunas preparaciones cromatofóricas. Efecto de un desacoplante (FCCP).

La temperatura es 10,5°C y la concentración de cromatóforos es equivalente a 26 μg Bchl.ml⁻¹. Las curvas de tiempo están desplazadas verticalmente por razones de claridad.

En el recuadro interno se grafican las velocidades de los estados estacionarios de este experimento (μmol Pi.mg Bchl⁻¹.min⁻¹) en función de la concentración del desacoplante.

VI Resumen y conclusiones

En esta Tesis se estudia el efecto de la temperatura sobre la reacción de síntesis y de hidrólisis de ATP llevadas a cabo por cromatóforos de la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum. El método de estudio fundamental consiste en el análisis de las curvas de tiempo de ambos tipos de reacción. El modo de registro es discontinuo, midiéndose la incorporación de ^{32}Pi a ADP en el primer caso y determinándose colorimétricamente Pi en el segundo.

Capítulo III

La reacción de fotofosforilación mediada por PMS catalizada por cromatóforos de R. rubrum sufre, a bajas temperaturas (3°C), una inhibición en su curso luego de ca. 1 min de su desencadenamiento. En cambio, a altas temperaturas ($20-30^{\circ}\text{C}$) no se observa ninguna pérdida de la velocidad inicial hasta 3-4 min. De esta manera, a baja temperatura quedan definidas dos fases: la inicial que es rectilínea y tiene una velocidad igual a la pronosticable por la ecuación de Arrhenius con las velocidades correspondientes a las altas temperaturas (ver Capítulo IV) y la segunda fase que es también rectilínea durante varios minutos pero tiene una velocidad aproximadamente igual al 50% de la primera.

Las características de este fenómeno son las siguientes:

- La inhibición está determinada por la baja temperatura pero sólo si los cromatóforos llevan a cabo la reacción de fotofosforilación. Por otro lado, no se debe ni a una desaturación de sustratos ni a una inhibición por producto.
- No es el efecto directo de una acción del PMS a baja temperatura. Este mediador redox sólo facilitaría la velocidad de transporte electrónico cíclico, contribuyendo a establecer así un alto nivel energético en el cromatóforo.
- Una vez producido el fenómeno, el grado de inhibición es irreversible ante una transición a alta temperatura.
- También es irreversible frente a un "lavado" de la membrana recuperándola por ultracentrifugación.
- El hecho de que la primera fase de reacción a baja temperatura sea rectilínea y que antes que se produzca la inhibición, tanto una transferencia a 30°C como una recuperación por ultracentrifugación de los cromatóforos muestra una actividad idéntica a la del control (no inhibida), sugieren que la reacción de la primera fase transcurre sin cambios de ningún tipo. Sin embargo, hay evidencias de que durante la primera fase se producen fenómenos no detectables en la actividad propia de dicha fase pero que son irreversibles frente a una interrupción de la reacción por apagado de la luz, por lo menos a baja temperatura y en tiempos cortos ("Fenómeno acumulativo").

- Se puede retrasar la aparición de la inhibición si se disminuye la intensidad de la luz o si se agregan concentraciones subsaturantes del desacoplante FCCP. Esto ocurre, respectivamente, sin que cambie la velocidad de la fase inicial o disminuyendo sólo de manera parcial. Con intensidades de luz limitantes, con concentraciones de FCCP que inhiben un 50% la velocidad, en ausencia de PMS y en general, en condiciones de desoptimización de la velocidad de reacción no se observa la inhibición estudiada.

- Luego de recuperar los cromatóforos por ultracentrifugación, las membranas pretratadas por haber fotofosforilado a baja temperatura tienen las mismas características cinéticas aparentes (comportamiento hiperbólico) que las membranas control respecto de Pi, siendo la única diferencia un 50% de inhibición en la Vmax. En cambio, la curva de saturación aparente de ADP se transforma en sigmoide mientras que la del control es hiperbólica. También en el caso de ADP la Vmax está un 50% inhibida.

- Las características de saturación de las reacciones de hidrólisis de ATP constitutiva e inducida por concentraciones óptimas del desacoplante FCCP de las membranas pretratadas, se transforman en ligeramente sigmoides, mientras que las de la membrana control son ambas hiperbólicas. Sin embargo, sólo la Vmax de la actividad inducida por el desacoplante en la membrana pretratada queda modificada (30% inhibida).

La interpretación general del fenómeno es que el sistema global de fotofosforilación sufre un cambio funcional irreversible cuando la reacción de fotofosforilación transcurre en condiciones en las que el nivel de energía de la membrana es alto y, según algunas evidencias, probablemente mayor que el necesario para mantener una velocidad máxima de síntesis de ATP.

Se propone que el desbalance entre el "input" de energía y la máxima velocidad de disipación a través de la reacción de síntesis de ATP y la consecuente "sobreenenergización" estaría dado por una diferente dependencia respecto de la temperatura de las reacciones de fosforilación y de transporte de electrones, de manera tal que, en las condiciones experimentales estudiadas, la "sobreenenergización" se producirá sólo a baja temperatura.

Como las características aparentes de saturación de ADP, en el caso de la reacción de síntesis, y de ATP, en el de hidrólisis, son diferentes en los cromatóforos "inhibidos" respecto de los "controles" se sugiere que en el fenómeno de inhibición podría estar involucrado un cambio conformacional irreversible a nivel del factor de acoplamiento.

Para contrastar la hipótesis general de esta investigación, se debería estudiar la dependencia de la temperatura de los parámetros de energización de la membrana: midiendo el cambio de pH externo, la intrusión de H⁺ y fluorimétricamente, el Δ pH

y el $\Delta\psi$ transmembrana. El resultado, de ser coherente con la hipótesis, debería mostrar a bajas temperaturas respecto de altas un mayor tenor de energía de la membrana en relación con la velocidad de fotofosforilación.

Capítulo IV

En este Capítulo se analizan las características de los gráficos de Arrhenius (dependencia de la temperatura) de las reacciones síntesis y de hidrólisis de ATP catalizadas por cromatóforos.

Se estudia la reacción de síntesis en diferentes condiciones de transporte de electrones cíclico. Estas son la condición endógena (ausencia de mediadores redox) y la que surge de la presencia de los agentes redox artificiales PMS y TMPD.

La reacción de hidrólisis en oscuridad se estudia en ausencia y en presencia de concentraciones óptimas de un desacoplante (FCCP) que estimulan entre 2 y 4 veces la actividad.

Para que los gráficos de Arrhenius no reflejasen artificios se determinaron las condiciones óptimas de reacción para todas las actividades a dos temperaturas extremas del rango estudiado, respecto de los parámetros pH, concentración de desacoplante, concentración de mediadores redox y grado de saturación de sustratos. Por otro lado, se tuvo especial cuidado de medir las actividades de manera detallada en las fases de estado estacionario a todas las temperaturas. La gran variabilidad observada en circunstancias en las que no se tienen los recaudos señalados, hace concluir que es sumamente importante un estudio exhaustivo de este tipo para estudiar la dependencia de la temperatura.

Tanto la reacción de hidrólisis constitutiva como la inducida por FCCP no muestran discontinuidades en la pendiente del gráfico de Arrhenius y tiene ambas la misma energía de activación. Así, y en contraposición a propuestas de otros autores, se descarta la existencia de un efecto de transición de fase de lípidos detectable en un gráfico de Arrhenius de la actividad ATPasa. Por otro lado se sugiere que, como la E_a es la misma en ambas reacciones, el paso limitante también sería el mismo y que el estímulo de la velocidad se debería sólo a la eliminación de la retropresión de producto (H^+).

La actividad de fotofosforilación endógena muestra un gráfico de Arrhenius complejo con intervalos de temperatura de muy baja energía de activación. El comportamiento depende tanto de la preparación cromatófórica particular como de su edad y del ambiente redox en que se desarrolla la reacción. Como la actividad de fotofosforilación puede ser estimulada con PMS o TMPD unas 10 veces en cualquier temperatura estudiada, se concluye que las E_a detectadas son las de un paso limitante

a nivel del transporte de electrones y, a su vez, que la capacidad de "turnover" del factor de acoplamiento no es un paso limitante en esas condiciones.

En cambio, las representaciones de Arrhenius de las actividades mediadas por PMS o por TMPD muestran un comportamiento rectilíneo siempre que se usen concentraciones saturantes de los agentes redox.

Se sabe, por la información del Capítulo III que a bajas temperaturas el paso limitante de la fotofosforilación sería el factor de acoplamiento. De manera tal que la energía de activación observada sería la de algún fenómeno limitante a nivel de dicho factor. Sin embargo, al disminuir la velocidad mediante una atenuación de la intensidad de la luz se observa, en un rango estrecho de temperaturas bajas, la misma E_a que cuando la energía no es limitante. Se discute el significado de la igualdad de las dos E_a de ambas condiciones energéticas en comparación con el diferente comportamiento del sistema endógeno, en términos de un distinto mecanismo de acoplamiento según la reacción de fosforilación esté mediada por el sistema endógeno de transporte de electrones o por un sistema transformado por el agregado de un mediador redox que desvía el curso natural de los electrones.

Con los resultados reunidos acá se concluye, de acuerdo con el consenso general de la bibliografía, que la interpretación de los gráficos de Arrhenius está frecuentemente sometida a gran controversia y muy especialmente en casos como los estudiados aquí, donde la actividad enzimática es parte de un sistema acoplado de muchos componentes y dependiente así de numerosos factores.

Capítulo V

En esta parte se estudia el curso de la reacción de hidrólisis de ATP de cromatóforos desde tiempos muy cortos desde su desencadenamiento (5-10 seg).

A temperaturas relativamente bajas, (5°C-20°C) dependiendo de la preparación cromatofórica, la actividad de H^+ -ATPasa de membrana muestra un comportamiento cinético complejo. Inicialmente la reacción muestra un "lag" seguido de un aumento de la actividad, la cual alcanza un máximo para luego disminuir y entrar en un estado inhibido transitorio. Este último dura un tiempo variable de 1-3 min, luego la reacción entra en un estado estacionario caracterizado por un comportamiento lineal.

A temperatura alta (mayor de 30°C) todo este comportamiento pre-estado estacionario está sumamente atenuado o no existe, observándose sólo una velocidad de hidrólisis constante.

La presencia de Mg^{+2} libre afecta la velocidad pero no la aparición del fenómeno. Todas las fases de la reacción son dependientes de ATP exógeno y son sensibles a un inhibidor de la transferencia de energía (oligomicina).

En general, el comportamiento de la fase pre-estado estacionario depende del desencadenamiento de la reacción y puede ser reproducido con membranas que sufrieron pretratamientos de ATPasa o/y de fotofosforilación mediada por PMS. Es decir, no se agota con un "ciclo" de reacción. Sin embargo, cuando el pretratamiento por fotofosforilación ocurrió en ausencia de PMS, no se pudo reproducir luego el comportamiento pre-estado estacionario; no se tiene una explicación obvia para esto.

El fenómeno descrito no se encuentra cuando el factor de acoplamiento está solubilizado (fracción F_1 del complejo) o cuando la membrana es desorganizada por un pretratamiento con un detergente (Tritón X-100 0,4%).

La fase pre-estado estacionario puede repetirse más de una vez presentándose entonces, fases de actividad-inactividad que se suceden en el tiempo amortiguándose hacia un estado estacionario. Esto puede ocurrir luego del desencadenamiento de la reacción en oscuridad o de manera inducida por la luz. Por otro lado, también se tienen evidencias de que pueden existir oscilaciones ("actividad-inactividad" o "síntesis-hidrólisis netas") en el curso de la reacción de fotofosforilación a baja temperatura, luego de un pretratamiento de luz y oscuridad.

Estudios del curso de la energización (medida como el establecimiento del ΔpH transmembrana), establecida por la hidrólisis de ATP, indican que el rango de tiempo en el que se establece el máximo nivel de energía es del mismo orden del lapso en el que transcurre toda la fase pre-estado estacionario de ATPasa, sugiriendo así que las variaciones descritas en la hidrólisis de ATP podrían deberse a efectos regulatorios transitorios determinados por el contenido cambiante de la energía de la membrana.

Por otro lado, las respuestas que provee el curso de la reacción, tanto en la fase pre-estado estacionario como en la estacionaria, al suplemento de energía por el transporte electrónico fotosintético o al colapso parcial o total del estado energizado por el agregado de desacoplantes, hacen proponer, en un modelo tentativo, que la fase previa a la entrada de la actividad en el estado estacionario se ve sujeta a un control por componentes localizadas y delocalizadas del intermediario de alta energía construido por la misma reacción H^+ -ATPasa.



VII. BIBLIOGRAFIA

1. Trebst, A. and Avron, M. (eds.) (1977) Photosynthesis I. Photosynthetic electron transport and photophosphorylation. en Encyclopedia of Plant Physiology. N.S. 5. 730 pp. Springer Verlag, Berlin. Heidelberg.
2. Clayton, R.K. and Sistrom, W.R. (eds.) (1978) The Photosynthetic Bacteria. pp.946. Plenum Press New York.
3. Trebst, A. and Avron, M. (1977) Introduction. pp. 1 en (1)
4. Barber, J. (ed.) (1982) Electron transport and photophosphorylation. Elsevier Biomedical Press.
5. Slater, E.C. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46: 1015.
6. Slater, E.C. (1953) Nature 172: 975.
7. Chance, B. and Williams, G.R. (1956) Adv. Enzymol. 17: 65.
8. Mitchell, P. (1976) Biochem. Soc. Trans. 4: 399.
9. Mitchell, P. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46: 996.
10. Mitchell, P. (1961) Nature 191: 144.
11. Mitchell, P. (1966) Biol. Rev. Camb. Phil. Soc. 41: 445.
12. Mitchell, P. (1974) Biochem. Soc. Trans. 2: 31.
13. Mitchell, P. (1974) Febs Lett. 43: 189.
14. Mitchell, P. (1977) Febs Lett. 78: 1.
15. Crofts, A.R. and Wood, P.M. (1978) Photosynthetic Electron Transport Chains of Plants and Bacteria and their Role as Proton Pumps. Curr. Top. Bioenerg. 7: 175.
16. Jagendorf, A.T. and Uribe, E. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55: 170.
17. Schuldiner, S. (1977) Acid base ATP synthesis in chloroplasts. pp. 416 en (1).
18. Galmiche, J.M. (1977) Post-illumination ATP formation. pp. 374 en (1)
19. Gromet-Elhanan, Z. and Leiser, M. (1975) J. Biol. Chem. 250: 90.
20. Williams, R.J.P. (1961) J. Theor. Biol. 1: 1.
21. Williams, R.J.P. (1974) Febs Lett. 53: 123.
22. Williams, R.J.P. (1978) Febs Lett. 85: 9.
23. Bertina, R.M., Schrier, P.I. and Slater, E.C. (1973) Biochim. Biophys. Acta 305: 503.
24. Baum, H.; Hall, G.S.; Nalder, J. and Beechey, R.B. (1971) en Energy transduction in Respiration and Photosynthesis (E. Quagliariello; S. Papa; C.S. Rossi, eds.). pp. 747. Adriatica, Bari.

25. Higuti, T.; Arakaki, N. and Hattori, A. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 548: 166.
26. Hitchens, G.D. and Kell, D.B. (1982) *Biochem. J.* 206: 351.
27. Venturoli, G. and Melandri, B.A. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 680: 8.
28. Baker, G.M.; Bahtnagar, D. and Dilley, R.A. (1982) *J. Bioenerg. Biomem.* 14: 249.
29. Hong, Y.Q. and Junge, W. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* (1983) 772: 197.
30. Abbott, M. and Dilley, R.A. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 222: 95.
31. Boyer, P.D. (1965) en *Oxidases and related redox systems* (T.E. King, H.S. Mason and M. Morrison) 2: 994. Wiley, New York.
32. Ryrie, I.J. and Jagendorf, A.T. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 3771.
33. Ryrie, I.J. and Jagendorf, A.T. (1972) *J. Biol. Chem.* 247: 4453.
34. Chang, T.M. and Penefsky, H.S. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 2746.
35. Bakker-Grunwald, T. and Van Dam, K. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 347: 290.
36. Van de Stadt, R.J.; De Boer, B.L. and Van Dam, K. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 292: 338.
37. Harris, D.A. and Slater, E.C. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 387: 335.
38. Quagliariello, E.; Papa, S.; Palmieri, F.; Slater, E.C. and Siliprandi, N. (eds.) (1975) *Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation*. Elsevier, Amsterdam.
39. Harris, D.A. and Slater, E.C. (1975) pp. 379. en (38).
40. Boyer, P.D. (1974) en *Dynamics of energy-transducing membranes* (L. Ernster; R.W. Estabrook and E.C. Slater, eds.) pp. 389. Elsevier, Amsterdam.
41. Boyer, P.D.; Smith, D.J.; Rosing, J. and Kayalar, C. (1975) pp. 361 en (38).
42. Boyer, P.D.; Cross, R.L. and Momsen, W. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2837.
43. Boyer, P.D. (1975) *Febs Lett.* 58: 1.
44. Boyer, P.D. (1977) *Trends. Biochem.Sci.* 2: 38.
45. Slater, E.C. (1974) en *Dynamics of energy-transducing membranes*. (L. Ernster, R.W. Estabrook and E.C. Slater, eds.) pp. 1. Elsevier, Amsterdam.
46. Maloney, P.C. (1982) *J. Membrane Biol.* 67: 1
47. Krogmann, D.W. (1977) *Blue-Green Algae*. pp. 625 en (1).
48. Frenkel, A.W. (1970) *Biol. Rev.* 45: 569.
49. Kaplan, S. (1978) *Control and Kinetics of Photosynthetic Membrane Development*. pp. 809 en (2).
50. Pardee, A.B.; Schachman, H.K. and Stanier, R.Y. (1952) *Nature* 169: 282.
51. Baccarini-Melandri, A. and Melandri, B.A. (1978) *Coupling Factors*. pp. 615 en (2).
52. McCarty, R.E. (1977) *Energy transfer inhibitors of Photophosphorylation in chloroplasts*. pp. 437 en (1).
53. Junge, W. (1977) *Physical aspects of light harvesting, electron transport and electrochemical potential generation in Photosynthesis of green plants*. pp. 59 en (1).

54. Frenkel, A.W. (1954) J. Am. Chem. Soc. 76: 5568.
55. Arnon, D.I.; Allen, M.B. and Whatley, F.R. (1954) Nature 174: 394.
56. Fernández Morán, H. (1962) Circulation 26: 1039.
57. Löw, H. and Afzelius, B.A. (1964) Exp. Cell. Res. 35: 431.
58. Kagawa, Y. and Racker, E. (1966) J. Biol. Chem. 241: 2475.
59. Baccarini-Melandri, A.; Gest, H. and San Pietro, A. (1970) J. Biol. Chem. 245: 1224.
60. Johansson, B.C. and Baltscheffsky, M. (1975) Febs Lett. 53: 221.
61. Berzborn, R.J.; Johansson, B.C. and Baltscheffsky, M. (1975) Biochim. Biophys. Acta. 396: 360.
62. Racker, E. (1970) Function and Structure of the inner membrane of mitochondria and chloroplasts. en Membranes of Mitochondria and Chloroplasts (E. Racker, ed.) pp. 127. Van Nostrand Reinhold, New York.
63. Baltscheffsky, M.; Baltscheffsky, H. and Boork, J. (1982) Evolutionary and Mechanistic Aspects on Coupling and Phosphorylation in Photosynthetic Bacteria. pp. 249 en (4).
64. Melandri, B.A.; Baccarini-Melandri, A.; Gest, H. and San Pietro, A. (1971) Studies on resolution of the photophosphorylating systems of the photosynthetic bacterium Rhodospseudomonas capsulata. in Energy transduction in Respiration and Photosynthesis (E. Quagliariello, S. Papa and C.S. Rossi, eds.) pp. 593. Adriatica Editrice, Bari, Italia.
65. Nelson, N. (1977) Chloroplast Coupling Factor. pp. 393 en (1)
66. Bengis-Garber, C. and Gromet-Elhanan, Z. (1979) Biochem. 18: 3577.
67. Oren, R. and Gromet-Elhanan, Z. (1977) Febs Lett. 79: 147.
68. Müller, H.W. and Baltscheffsky, M. (1979) Z. Naturforsch. 34 c: 229.
69. Hoppe, J. and Sebald, W. (1981) en (63).
70. Baltscheffsky, H. and von Stednigk, L.V. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 22: 722.
71. Fisher, R.R. and Guillory, R.J. (1969) Febs Lett. 3: 27.
72. Keister, D.L. and Yike, N.J. (1967) Biochem. 6: 3847.
73. Baltscheffsky, M. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 270.
74. Keister, D.L. and Yike, N.J. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 121: 415.
75. Moyle, J.; Mitchell, R. and Mitchell, P. (1972) Febs Lett. 23: 233.
76. Baltscheffsky, M. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 130: 646.
77. Kell, D.G. and Morris J.G. (1981) Proton-coupled membrane energy transduction: Path ways, mechanisms and control. pp. 339. en (136).
78. Roy, H. and Moudrianakis, E.N. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 68: 464.
79. Harris, D.A. and Baltscheffsky, M. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 86: 1248.

80. Elving, Ph. J. and Graves, B.B.(1980) Activation Energy: Nature, Determination, Significance. en Topics in Bioelectrochemistry and Bioenergetics vol. 3 (G. Milazzo, ed.) pp. 1. John Wiley & Sons.
81. Segel, I.H. (1974) Enzyme Kinetics. Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. 957 pp. John Wiley & Sons, New York.
82. Morris, J.G. (1976) Fisicoquímica para biólogos. 389 pp. Ed. Reverté, España. Trad. de la 2ª edición de E. Arnold Publ. Ltd. (1974).
83. Dixon, M. and Webb, E.C. (1979) Enzymes. pp. 164-182. Academic Press, New York.
84. Atkins, P.W. (1978) Physical Chemistry. 1018 pp. Oxford Univ. Press.
85. Silvius, J.R.; Read, B.D. and McElhanev, R.N. (1978) Science 199: 902.
86. Jain, M.H. and Wagner, R.C. (1980) Introduction to Biological Membranes. 382 pp. John Wiley & Sons, New York.
87. Fourcans, B. and Jain, M.K. (1974) Adv. Lipid Res. 12: 147.
88. Sandermann, H. (1978) Biochim. Biophys. Acta 515: 209.
89. Raison, J.K. (1973) J. Bioenerg. 4: 285.
90. Siñeriz, F.; Farías, R.N. and Trucco, R.E. (1973) Febs Lett. 32: 30.
91. Morrisett, J.D.; Pownell, H.J.; Plumlee, R.T.; Smith, L.C.; Zehner, Z.E.; Esfahani, M. and Wakil, S.J. (1975) J. Biol. Chem. 250: 6969.
92. Esfahani, M.; Rudkin, B.B.; Cutler, C.J. and Waldron, P.E. (1977) J. Biol. Chem. 252: 3194.
93. Kreiner, P.W.; Keirns, J.J. and Bitensky, M.W. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 1785.
94. Mavis, R.D. and Vagelos, P.R. (1972) J. Biol. Chem. 247: 652.
95. Poznansky, M.; Kirkwood, D. and Soloman, A.K. (1973) Biochim. Biophys. Acta 330: 351.
96. Tanford, C. (1972) The hydrophobic effect: Formation of Micelles and Biological Membranes. Wiley-Intersciences Pub, New York.
97. James, R. and Branton, D. (1973) Biochim. Biophys. Acta 323: 378.
98. Hackenbrock, C.R.; Hochli, M. and Chau, R.M. (1976) Biochim. Biophys. Acta 455: 466.
99. Wallace, B.A. and Engelman, D.M. (1978) Biochim. Biophys. Acta 508: 431.
100. Wang, A.Y.I. and Packer, L. (1973) Biochim. Biophys. Acta 305: 488.
101. Griffith, O.H. and Jost, P.C. (1978) en Molecular Specialization and Symmetry in Membrane Function (A.K. Solomon and M. Karnovsky, eds.) pp.31. Harvard Univ. Press. Cambridge.
102. Jost, P.; Griffith, O.H.; Capaldi, R.A. and Vanderkooi, G. (1973) Biochim. Biophys. Acta 311: 141.
103. Grisham, C.M. and Barnett, R.E. (1973) Biochem. 12: 2635.
104. Kimelberg, H.K. and Papahadjopoulos, D. (1974) J. Biol. Chem. 249: 1071.
105. Warren, G.B.; Toon, P.A.; Birdsall, N.J.M.; Lee, A.G. and Metcalfe, J.C. (1974) Biochem. 13: 5501.
106. Steir, A. and Sackman, E. (1973) Biochim. Biophys. Acta 311: 400.
107. Dehlinger, P.J.; Jost, P.C. and Griffith, O.H. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 2284.

108. Pontus, M. and Delmelle, M. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 401: 221.
109. Longmuir, K.J.; Capaldi, R.A. and Dahlquist, F.W. (1977) *Biochem.* 16: 5746.
110. Jain, M.K. and White, H.B. (1977) *Adv. Lipid Res.* 15: 1.
111. Cohen-Bazire, G.; Sistrom, W.R. and Stanier, R.Y. (1957) *J. Cell. Comp. Physiol.* 49: 25.
112. Baccarini-Melandri, A. and Melandri, B.A. (1971) *Methods in Enzymol.* 23: 556.
113. Clayton, R.K. (1963) Absorption Spectra of Photosynthetic Bacteria and their Chlorophylls. en *Bacterial Photosynthesis* (H. Gest, A. San Pietro and L.P. Vernon, eds.) pp. 495. Antioch Press. Yellow Springs. Ohio.
114. Remennikov, V.G. and Samuilov, V.D. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 546: 220.
115. Baltscheffsky, M. (1978) Photosynthetic Photophosphorylation. pp. 595 en (2)
116. Horio, T.; Nishikawa, K.; Katsumata, M. and Yamashita, J. (1965) *Biochim. Biophys. Acta.* 94: 371.
117. Leiser, M. and Gromet-Elhanan, Z. (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 84.
118. Keister, D.L. and Minton, N.J. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 147: 330.
119. Avron, M. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 40: 257.
120. Sugino, Y. and Miyoshi, Y. (1964) *J. Biol. Chem.* 239: 2360.
121. Gould, J.M.; Cather, R. and Winget, G.D. (1972) *Anal. Biochem.* 50: 540.
122. Taussky, H. and Shorr, E. (1953) *J. Biol. Chem.* 202: 675.
123. Casadio, R.; Baccarini-Melandri, A. and Melandri, B.A. (1974) *Eur.J. Biochem.* 47: 121.
124. Schuldiner, Sh.; Padan, E.; Rottenberg, H.; Gromet-Elhanan, Z. and Avron, M. (1974) *Febs Lett.* 49: 174.
125. Pick, U. and McCarty, R.E. (1980) *Methods in Enzymol.* 69: 538.
126. Hauska, G. (1980) *Methods in Enzymol.* 69: 649.
127. Zaugg, W.S. (1964) *J. Biol. Chem.* 239: 3964.
128. Hauska, G. (1977) Artificial Acceptors and Donors. pp. 253 en (1).
129. Gromet-Elhanan, Z. (1977) Electron Transport and Photophosphorylation in Photosynthetic Bacteria. pp. 637 en (1).
130. Hauska, G. (1972) *Febs Lett.* 28: 217.
131. Fasman, G.D. (ed.) (1976) *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. 3rd ed. Physical and Chemical Data. vol. 1. 552 pp. CRC Press.
132. Oelze, J. and Drews, G. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 265: 209.
133. Del Valle-Tascón, S. Van Grondelle, R. and Duysens, L.N.M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 504: 26.
134. Smith, W.R. Jr.; Sybesma, C.; Lithfield, W.J. and Dus, K. (1973) *Biochem.* 12: 2665.
135. Giersch, C. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100: 666.
136. Palmieri, F.; Quagliariello, E.; Siliprandi, N. and Slater, E.C. (eds.) (1981) *Vectorial Reactions in Electron and Ion transport in Mitochondria and Bacteria*. 429 pp. Elsevier-North Holland Biomed. Press, Amsterdam.
137. McCarthy, J.E.G. and Ferguson, S.J. (1981) The relationship of the protonmotive force to the thermodynamics and kinetics of ATP synthesis in bacterial systems.

pp. 349 en (136).

138. Kayalar, C.; Rosing, J. and Boyer, P.D. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 1153.
139. Cantley, L.C. and Hammes, G.G. (1973) *Biochem.* 12: 4900.
140. Avron, M.; Krogmann, D.W. and Jagendorf, A.T. (1958) *Biochim. Biophys. Acta.* 30: 144.
141. McCarty, R.E.; Fuhrman, J.S. and Tsuchiya, Y. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68: 2522.
142. Telfer, A. and Evans, M.C.W. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 256: 625.
143. Portis, A.R.Jr. and McCarty, R.E. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 6250.
144. Portis, A.R.Jr.; Magnusson, R.P. and McCarty, R.E. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64: 877.
145. Schlodder, E.; Gräber, P. and Witt, H.T. (1982) Mechanism of phosphorylation in Chloroplasts. pp. 107 en (4).
146. Johansson, B.C.; Baltscheffsky, M.; Baltscheffsky, H.; Baccarini-Melandri, A. and Melandri, B.A. (1973) *Eur. J. Biochem.* 40: 109.
147. Baltscheffsky, M. and Lundin, A. (1979) Flash-induced increase of ATPase activity in Rhodospirillum rubrum chromatophores. en *Cation Flux Across Membranes* (L. Packer and Y. Mukohata, eds.) pp. 209. Academic Press. New York.
148. McCarty, R.E. and Fagan, J. (1973) *Biochem.* 12: 1503.
149. Weiss, M.A. and McCarty, R.E. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 8007.
150. Andreo, C.S. and Vallejos, R.H. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 423: 590.
151. Vallejos, R.H. and Andreo, C.S. (1976) *Febs Lett.* 61: 95.
152. Oliver, D. and Jagendorf, A.T. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 7168.
153. Marchant, R.H. and Packer, L. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 75: 458.
154. Ferguson, S.J.; Lloyd, W.J. and Radda, G.K. (1975) *Eur. J. Biochem.* 54: 127.
155. Ferguson, S.J. (1977) *Biochem. Soc. Trans.* 5: 1281.
156. Ebel, R.E. and Lardy, H.A. (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 191.
157. Adolfsen, R. and Moudrianakis, E.N. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 425.
158. Kayalar, C.; Rosing, J. and Boyer, P.D. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 2486.
159. Choate, G.L.; Hutton, R.L. and Boyer, P.D. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 286.
160. Hackney, D.D. and Boyer, P.D. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 3164.
161. Kaiser, I. (1980) Der Einfluss der Temperatur auf die Ausbildung des Photosynthese apparatus bei Rhodospirillum rubrum und Rhodopseudomonas sphaeroides. Tesis. 102 pp. Fakultät für Biologie der Albert-Ludwig-Universität zu Freiburg i. Br. Rep. Federal de Alemania.
162. Kaiser, I. and Oelze, J. (1980) *Arch. Microbiol.* 126: 195.
163. Melchior, D.L. and Steim, J.M. (1976) *Ann. Rev. Biophys. Bioenerg.* 5: 205.
164. Ayala, J.; Nieto, M.; Carreira, J. and Muñoz, E. (1976) *Eur. J. Biochem.* 66: 43.
165. Madden, T.D. and Quinn, P.J. (1979) *Febs Lett.* 107: 110.
166. Nishimura, M. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 57: 96.

167. Van Ginkel, G. and Fork, D.C. (1981) *Photobiochem. Photobiophys.* 2: 239.
168. Hochman, J.H.; Schindler, M.; Lee, J.G. and Ferguson-Miller, S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6866.
169. Baccarini-Melandri, A.; Melandri, B.A. and Hauska, G. (1979) *J. Bioenerg. and Biomem.* 11: 1.
170. Keister, D.L. and Minton, N.J. (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 63: 489.
171. Turner, J.F.; Black, C.C. and Gibbs, M. (1962) *J. Biol. Chem.* 237: 577.
172. Sakurai, M.; Nishimura, M. and Takamiya, A. (1965) *Plant Cell Physiol.* 6: 309.
173. Shen, Y.K. and Shen, G.M. (1962) *Scientia Sinica (Peking)* 11: 1097.
174. Kahn, J.S. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.* 98: 100.
175. Holt, S.C. and Marr, A.G. (1965) *J. Bacteriol.* 89: 1402.
176. Boyer, P.D. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46: 957.
177. Baccarini-Melandri, A.; Casadio, R. and Melandri, B.A. (1981) Electron transfer, proton translocation and ATP synthesis in Bacterial Chromatophores. *Curr. Top. Bioenerg.* : 197.
178. von Stedingk, L.V. and Baltscheffsky, H. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 117: 400.
179. Scholes, P.; Mitchell, P. and Moyle, J. (1969) *J. Eur. Biochem.* 8: 450.
180. Cirillo, V.P. and Gromet-Elhanan, Z. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 636: 244.
181. Wraight, C.A.; R.J. Cogdell and Chance, B. (1978). Ion transport and electrochemical gradients in photosynthetic bacteria. pp. 471. en (2).
182. Melandri, B.A. (1977) The High energy state. pp. 358. en (1).
183. Leiser, M. and Gromet-Elhanan, Z. (1974) *Febs. Lett.* 43: 267.
184. Prince, R.C. and Dutton, P.L. (1978) Protonation and the reducing potential of the primary electron acceptor. pp. 439 en (2).
185. Geller, D.M. and Lipmann, F. (1960) *J. Biol. Chem.* 235: 2478.
186. Smith, L. and Baltscheffsky, M. (1956) *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15: 357.
187. Smith, L. and Baltscheffsky, M. (1959) *Biochem. J.* 234: 1575
188. Petty, K.M. and Dutton, P.L. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 346.
189. Gromet-Elhanan, Z. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 223: 174.
190. Good, N.E. (1977) Uncoupling of electron transport from phosphorylation in chloroplasts. pp. 429 en (1).
191. Harris, D.A.; Rosing, J.; van de Stadt, R.J. and Slater, E.C. (1973) *Biochim. Biophys. Acta.* 314: 149.
192. Kozlov, I.A. and Skulachev, V.P. (1977) *Biochim. Biophys. Acta.* 463: 29.
193. Melandri, B.A.; Baccarini-Melandri, A. and Fabbri, E. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* 275: 383.
194. Baccarini-Melandri, A.; Fabbri, E. and Melandri, B.A. (1975) *Biochim. Biophys. Acta.* 376: 82.
195. Edwards, P.A. and Jackson, J.B. (1976) *Eur. J. Biochem.* 62, 7-14.

196. Webster, G.D. and Jackson, J.B. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 503: 135.
197. Hangarter, R.P. and Good, N.E. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*. 681: 397.
198. Slooten, L. and Sybesma, Ch. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*. 449: 565.
199. Kerber, N.L. (1978) Mecanismo de la fotofosforilación en bacterias fotosintéticas-Fotoinhibición por PMS en Rhodospirillum rubrum. Tesis.Fac. Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
200. Kerber, N.L.; Pucheu, N.L. and García, A.F. (1978) *Febs. Lett.* 94 (2): 265.
201. Kerber, N.L.; Pucheu, N.L. and García, A.F. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81: 667.
202. Pucheu, N.L.; Kerber, N.L. and García, A.F. (1979) *Arch. Microbiol.* 120: 283.
203. Slooten, L. and Branders, C. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*. 545: 79.
204. Slooten, L. and Nuyten, A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*. 638: 305.
205. Slooten, L. and Nuyten, A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*. 638: 313.
206. Melandri, B.A. and Baccarini-Melandri, A. (1976) *J. Bioenerg.* 8: 109.
207. Epstein, I.R., Kustin, K.; De Kepper, P. y Orbán, M. (1983) Reacciones químicas oscilantes. *Investigación y Ciencia* (ed. en español de *Sci. Am.*) 80: 82.
208. Baccarini-Melandri, A.; Fabbri, E. Firstater, E. and Melandri, B.A. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 376: 72