

CURSO DE BIOFÍSICA 2020

**TRANSDUCCIÓN DE ENERGÍA LIBRE
EN SISTEMAS BIOLÓGICOS**

Julio A. Hernández
Sección Biofísica y Biología de Sistemas

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista termodinámico, los organismos vivos son sistemas abiertos que se mantienen aproximadamente en estado estacionario gracias a un flujo permanente de energía libre. La utilización de la energía libre procedente de la energía radiante y/o de los nutrientes tiene lugar gracias a que, en el curso de la evolución biológica, aparecieron sistemas moleculares capaces de mediar el acoplamiento entre dos fuentes, una dadora de energía libre y la otra utilizadora de parte de esa energía para realizar síntesis de moléculas complejas, trabajo mecánico o trabajo eléctrico.

Los procesos de transporte activo a través de las membranas biológicas son ejemplos de sistemas moleculares de transducción de energía libre. Muchos de ellos emplean parte de la energía libre obtenible de reacciones químicas fuertemente exergónicas, como la hidrólisis del ATP, para el transporte contra gradiente de un soluto. En las siguientes secciones se emplea un modelo sencillo de transporte activo para ilustrar los aspectos esenciales de los procesos de transducción de energía libre en los sistemas biológicos.

PROCESO DE TRANSPORTE ACTIVO

Consideraremos el proceso de transporte activo esquematizado en la Figura 1, el que se muestra en el sentido fisiológico de funcionamiento.

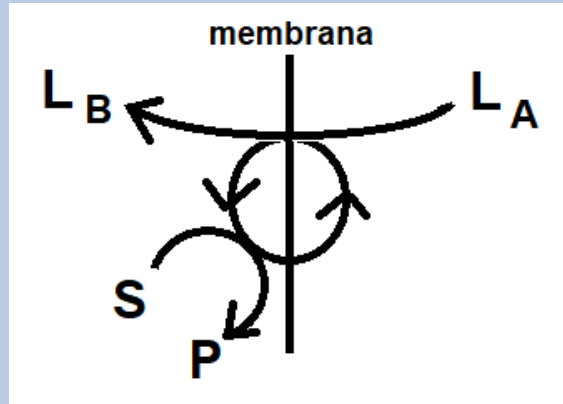


Figura 1

Este proceso de transporte activo de un ligando L entre los compartimentos A y B, acoplado a la transformación de un sustrato S en un producto P, puede describirse y analizarse empleando estos formalismos:

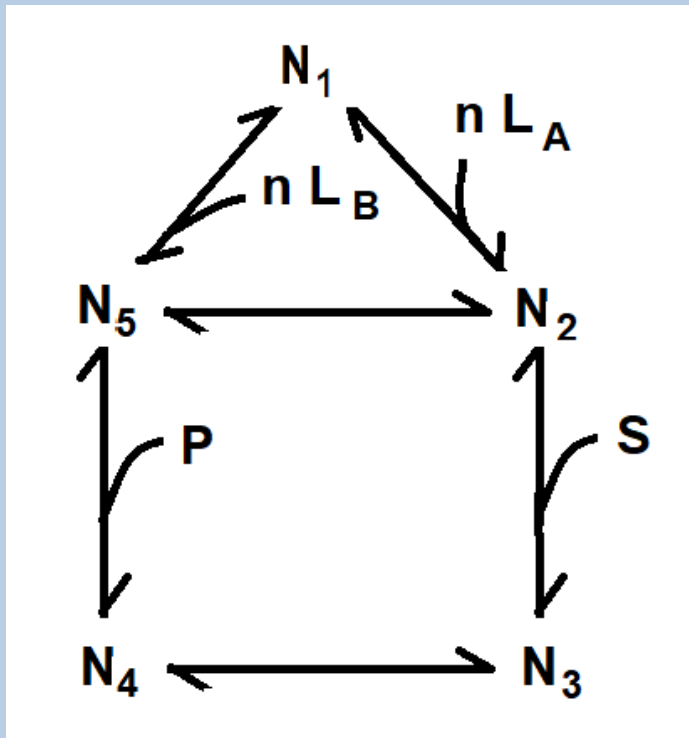
- 1) Termodinámica lineal de procesos irreversibles
- 2) Análisis cinético

Estudiaremos aquí los aspectos esenciales de la transducción de energía libre en procesos de transporte activo empleando el formalismo cinético.

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

DIAGRAMA CINÉTICO (1)

El diagrama cinético de la Figura 2 representa al proceso de transporte activo a través de una membrana biológica de un ligando no iónico L acoplado a la reacción química $S \leftrightarrow P$.



N_1, \dots, N_5 : estados intermedios de la enzima

L_A, L_B : ligando en los compartimentos A y B

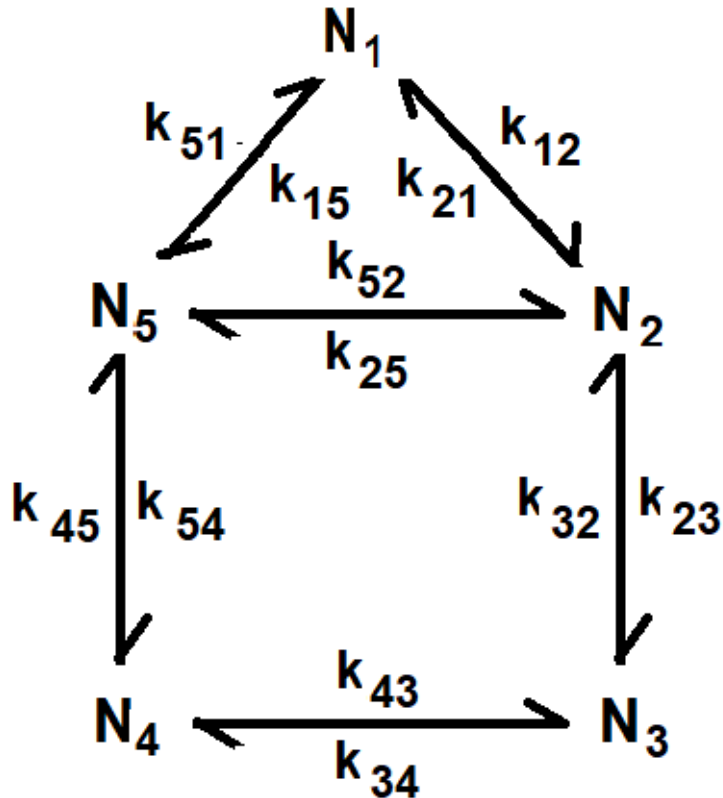
S, P : sustrato y producto de la reacción química acoplada

n : coeficiente estequiométrico molecular (de valor entero positivo)

Figura 2

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

DIAGRAMA CINÉTICO (2)



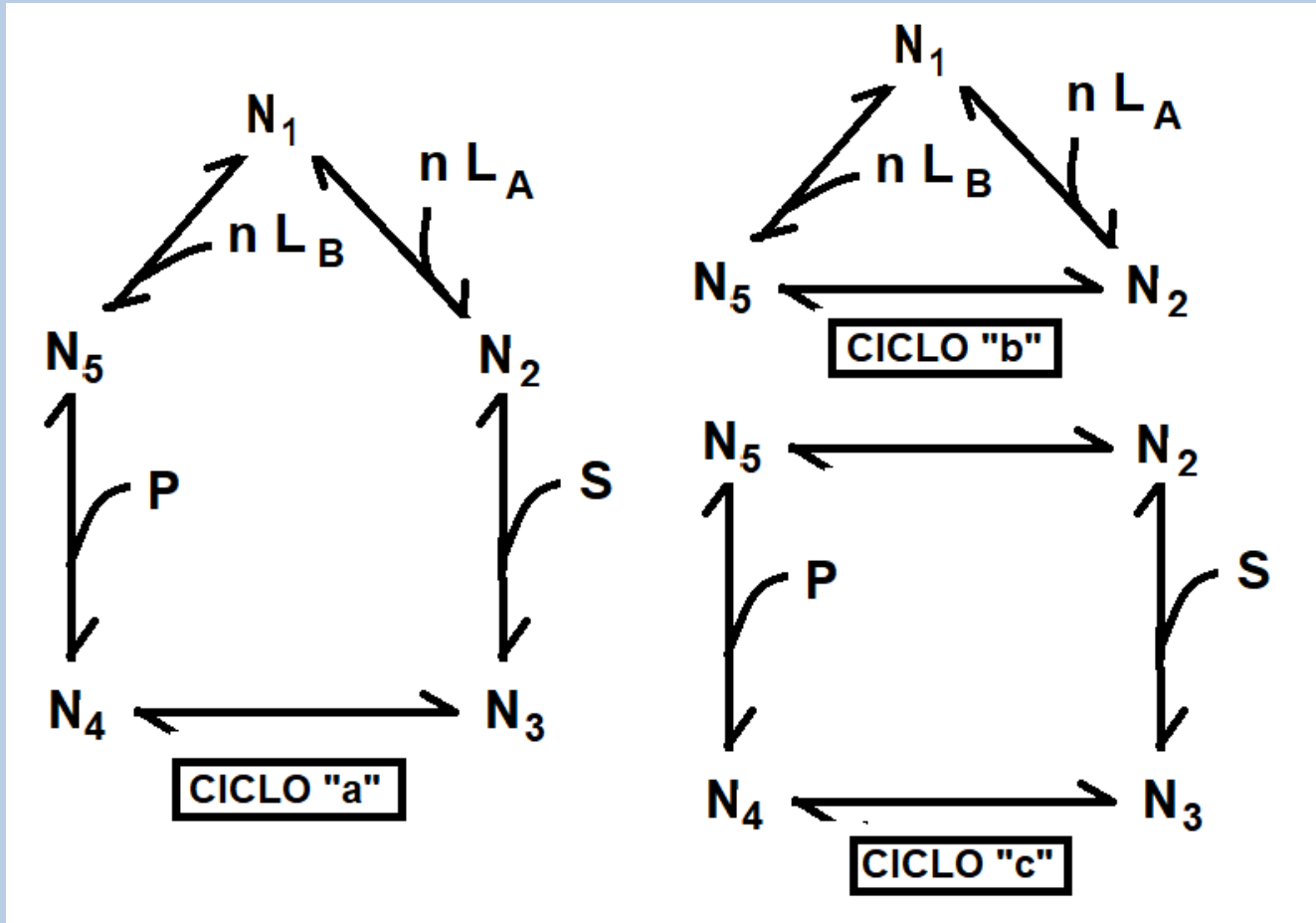
k_{12}, \dots, k_{21} : constantes cinéticas verdaderas que gobiernan las velocidades en cada sentido de la transición correspondiente, definidas según el diagrama.

Nótese que, en el diagrama, los dos sentidos de cada transición están representados por hemiflechas.

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

DIAGRAMA CINÉTICO (3)

El diagrama cinético considerado consta de tres ciclos, a, b y c:



MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

ANÁLISIS DEL DIAGRAMA CINÉTICO EN ESTADO ESTACIONARIO (1)

FLUJOS DE CICLO

La macromolécula transita entre los estados N_1, N_2, \dots, N_5 en forma aleatoria, debido a la agitación térmica. Por ejemplo, una trayectoria posible es, partiendo del estado N_5 : $N_5, N_4, N_5, N_2, N_1, N_2, N_3, \dots$. Su trayectoria puede llevar a la macromolécula a completar ciclos, tanto en el sentido horario como en el antihorario. Consideraremos aquí que el sentido horario es el positivo, criterio que debe aplicarse a todos los ciclos del diagrama.

Existen muchas macromoléculas de la misma especie en la membrana, cada una de ellas experimentando transiciones en forma continua e independiente. Dentro de esa población de macromoléculas, se completarán ciclos en ambos sentidos. Llamaremos flujo de ciclo (J_a, J_b, J_c) a la cantidad de veces que un ciclo se completa en forma neta en el sentido positivo en la unidad de tiempo. Por ejemplo, si en un segundo el ciclo “a” se completa 58 veces en el sentido horario y 47 en el antihorario, J_a valdrá 11 ciclos por segundo.

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

ANÁLISIS DEL DIAGRAMA CINÉTICO EN ESTADO ESTACIONARIO (2)

FLUJOS DE TRANSICIÓN

No haremos aquí una definición formal de flujo de transición. Asumiremos que la población de macromoléculas de enzima presente en la membrana es suficientemente grande para que la ley de acción de masas sea válida. Entonces, por ejemplo, el flujo de transición J_{12} vale:

$$J_{12} = k_{12} L_A^n N_1 - k_{21} N_2$$

En esta expresión, L_A es la concentración de L en el compartimento A, y N_1 y N_2 son las densidades de los estados correspondientes en la membrana (expresadas, por ejemplo, en moles por cm^2). Se debe notar que, en el diagrama de la Figura 2, N_1 y N_2 representan estados intermedios de la macromolécula, mientras que en la ecuación representan valores. La macromolécula de membrana se cuantifica en densidad y no en concentración, por tratarse de un medio bidimensional. Todas las concentraciones del ligando y reactivos, y las densidades de los estados intermedios de la enzima, se mantienen constantes, ya que el proceso se encuentra en estado estacionario.

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

ANÁLISIS DEL DIAGRAMA CINÉTICO EN ESTADO ESTACIONARIO (3)

FLUJOS DE TRANSICIÓN

El flujo de transición J_{21} vale:

$$J_{21} = k_{21} N_2 - k_{12} L_A^n N_1 = -J_{12}$$

Otros ejemplos de flujos de transición:

$$J_{25} = k_{25} N_2 - k_{52} N_5, \quad J_{54} = k_{54} P N_5 - k_{45} N_4, \quad J_{15} = k_{15} L_B^n N_1 - k_{51} N_5$$

Los flujos de transición pueden expresarse en función de los flujos de ciclo.

Por ejemplo:

$$J_{12} = J_a + J_b, \quad J_{23} = J_{34} = J_{45} = J_a + J_c, \quad J_{25} = J_b - J_c, \quad J_{21} = -J_a - J_b$$

Para estas expresiones se ha tenido en cuenta el criterio arbitrario, adoptado arriba, de que los ciclos son positivos en el sentido horario.

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

ANÁLISIS DEL DIAGRAMA CINÉTICO EN ESTADO ESTACIONARIO (4)

EXPRESIONES GENERALES PARA LOS FLUJOS DE CICLO

Las siguientes expresiones generales son obtenibles, por ejemplo, empleando el método de diagramas de T. L. Hill (ver Bibliografía):

$$J_a = F_a [K_{eq} (S/P) (L_A/L_B)^n - 1]$$

$$J_b = F_b [(L_A/L_B)^n - 1]$$

$$J_c = F_c [K_{eq} (S/P) - 1]$$

Para obtener estas ecuaciones se ha asumido que la densidad total de enzima en la membrana se mantiene constante. En las mismas, F_a , F_b y F_c son funciones positivas de las constantes cinéticas y de las concentraciones S , P , L_A y L_B , y de la densidad total de enzima. K_{eq} es la constante de equilibrio de la reacción $S \leftrightarrow P$, definida como $K_{eq} = (P/S)_{eq}$. Como puede observarse, el signo del valor de flujo de ciclo correspondiente está determinado por el término entre paréntesis.

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

ANÁLISIS DEL DIAGRAMA CINÉTICO EN ESTADO ESTACIONARIO (5)

EQUILIBRIO TERMODINÁMICO

En equilibrio $(L_A/L_B) = 1$ y $(S/P) = 1 / K_{eq}$. Por lo tanto, en esta condición, puede comprobarse que los flujos J_a , J_b y J_c valdrán cero, tal cual exige la segunda ley de la termodinámica. En efecto, si así no ocurriera, el sistema estaría experimentando circulación neta de materia en condiciones de equilibrio, una situación que violaría la segunda ley de la termodinámica. La razón de que las expresiones generales mostradas para los flujos sean consistentes con las restricciones termodinámicas es que las mismas fueron deducidas asumiendo el “principio de reversibilidad microscópica” o de “balance detallado”. Al respecto debe consultarse la bibliografía recomendada.

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

ALGUNOS MODOS OPERACIONALES DEL MODELO (1)

Para referirnos a una situación biológica concreta, supondremos por ejemplo que el sistema de transporte del ligando L analizado aquí se encuentra en la membrana plasmática de un microorganismo. El compartimento A sería el extracelular y el B el intracelular. El microorganismo necesita L para su metabolismo y solamente puede obtenerlo de una fuente externa. Por lo tanto, la existencia de un sistema de transporte de L a través de la membrana plasmática del microorganismo resulta fundamental para su supervivencia.

Consideraremos ahora dos modos particulares de funcionamiento del modelo:

- 1) Solamente se encuentra operativo el ciclo “b”.**
- 2) Prácticamente sólo se encuentra operativo el ciclo “a”.**

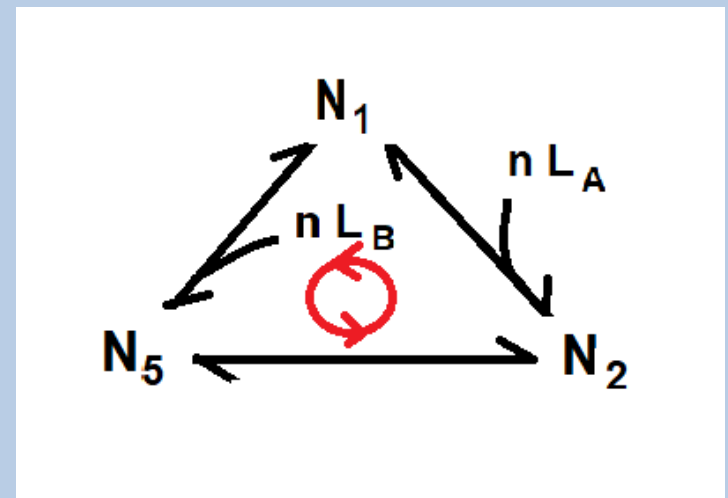
MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

ALGUNOS MODOS OPERACIONALES DEL MODELO (2)

CASO 1) SOLAMENTE SE ENCUENTRA OPERATIVO EL CICLO “b”

Si el sistema opera solamente como el ciclo “b”, lo hará como difusión facilitada, transportando por lo tanto a L únicamente a favor de gradiente. Si la condición inicial es $L_A < L_B$, esto implica que L_B disminuirá hasta que su concentración valga L_A , un valor constante. La figura indica este modo de funcionamiento (en rojo). Para fundamentar este razonamiento, debe tenerse en cuenta que el compartimento A es infinitamente más grande que el B. Puede comprobarse que, en la referida condición, J_b será negativo.

Esta situación puede ocurrir esencialmente por dos razones: el sistema de transporte carece de la porción enzimática acoplada que cataliza la reacción $S \leftrightarrow P$ y/o los metabolitos S y P se encuentran ausentes del medio. En ambos casos, la supervivencia del microorganismo dependerá de que la cantidad de L disponible en el medio extracelular (L_A) sea suficiente.



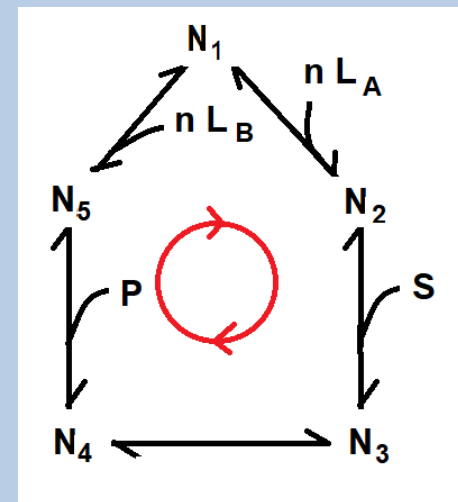
MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

ALGUNOS MODOS OPERACIONALES DEL MODELO (3)

CASO 2) PRÁCTICAMENTE SOLO SE ENCUENTRA OPERATIVO EL CICLO "a"

Si el sistema funciona en forma completa, puede tener un modo de funcionamiento en el que prácticamente solo opere el ciclo "a". Esto ocurriría si las constantes cinéticas que gobiernan la transición entre los estados 2 y 5 (k_{25} y k_{52}) son lo suficientemente pequeñas. Si $L_A < L_B$ y si la fuerza termodinámica de la reacción $S \leftrightarrow P$ es suficientemente grande, ocurrirá transporte de L contra gradiente (esto es, de A a B). La figura indica este modo de funcionamiento (en rojo). Puede comprobarse que, si K_{eq} es suficientemente grande, J_a puede ser positivo aunque $L_A < L_B$ y $S < P$.

Esta situación requiere que el sistema de transporte posea la porción enzimática acoplada que cataliza la reacción $S \leftrightarrow P$ y que los metabolitos S y P se encuentran presentes. En estas condiciones el microorganismo puede sobrevivir, ya que aunque la cantidad de L disponible en el medio extracelular (L_A) sea escasa, puede lograr transportarlo en forma activa hacia el interior y cumplir con sus requerimientos metabólicos.



MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

ALGUNOS MODOS OPERACIONALES DEL MODELO (4)

CASO 2) PRÁCTICAMENTE SOLO SE ENCUENTRA OPERATIVO EL CICLO “a”

“Slippage”

Acabamos de ver que para que el sistema tenga un modo de funcionamiento en que prácticamente solo opere el ciclo “a”, las constantes cinéticas que gobiernan la transición entre los estados 2 y 5 (k_{25} y k_{52}) deben ser lo suficientemente pequeñas. A este tipo de transiciones se las llama “slippage” (deslizamiento o patinaje) implicando que, cuando ocurren, el sistema no logra funcionar con su máxima eficiencia. En nuestro caso, la condición en que el modelo funciona con acoplamiento completo entre la fuente dadora de energía libre (la reacción $S \leftrightarrow P$) y la utilizadora de energía libre (el transporte de L) es cuando opera exclusivamente como ciclo “a”.

¿Por qué a lo largo de la evolución han persistido sistemas de transporte activo dotados de “slippage”? La respuesta a esta pregunta no es inmediata y puede requerir estudios más profundos. Alguna evidencia sugiere que los sistemas que poseen este tipo de transiciones brindan respuestas más robustas a los mecanismos de control de flujos.

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

FLUJOS FENOMENOLÓGICOS (1)

El estudio experimental de un proceso de transporte activo, como el esquematizado en la Figura 1, requiere de la determinación del flujo neto de ligando a través de la membrana (J_L) y de la velocidad de consumo de sustrato (la que llamaremos flujo de la reacción química, J_S). Los flujos J_L y J_S , medibles experimentalmente, constituyen los flujos fenomenológicos del proceso en consideración. El flujo J_L puede, por ejemplo, determinarse midiendo la velocidad de aparición de L en el compartimento B, mientras que el flujo J_S puede medirse como la velocidad de aparición del producto P.

La comprensión mecanística y dinámica de un proceso requiere del diseño y estudio de modelos representativos. Para el caso del proceso de transporte activo esquematizado en la Figura 1, el modelo cinético mostrado en la Figura 2 constituye una propuesta plausible de mecanismo de funcionamiento. El análisis de este modelo permite obtener expresiones cotejables con los resultados experimentales. En nuestro caso, la primera etapa para la aplicación del modelo al estudio del proceso de transporte activo consiste en reconocer en el modelo los pasos responsables de la aparición de L en B y de la aparición del producto P. Tales pasos son las transiciones 5-1 y 4-5, respectivamente (ver Figura 2).

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

FLUJOS FENOMENOLÓGICOS (2)

En virtud de lo antedicho, identificamos el flujo J_S con el flujo de transición J_{45} :

$$J_S = J_{45} = k_{45} N_4 - k_{54} P N_5 = J_a + J_c$$

Cada vez que ocurre una transición del estado N_5 al N_1 , n moléculas de ligando L son liberadas al compartimento B . Por lo tanto, el flujo de ligando J_L vale n veces el flujo de transición J_{51} :

$$J_L = n J_{51} = n (k_{51} N_5 - k_{15} L_B^n N_1) = n (J_a + J_b)$$

El cociente J_L/J_S por lo tanto vale:

$$J_L/J_S = n (J_a + J_b) / (J_a + J_c)$$

En condiciones en las cuales la transición $N_2 - N_5$ es despreciable, los ciclos “b” y “c” prácticamente no ocurren, y sus flujos J_b y J_c valen entonces aproximadamente cero. En estas circunstancias predomina el modo de operación del ciclo “a”, y el cociente J_L/J_S vale por lo tanto n .

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

ALGUNAS PROPIEDADES TERMODINÁMICAS (1)

En el marco del formalismo de la termodinámica lineal de procesos irreversibles se definen dos propiedades:

q : grado de acoplamiento

z : coeficiente estequiométrico fenomenológico

No haremos aquí una definición rigurosa de estas propiedades, solamente mostraremos sus expresiones para el caso del modelo en estudio:

$$q = \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{F_b}{F_a}\right) \left(1 + \frac{F_c}{F_a}\right)}}$$

$$z = n \sqrt{\frac{F_a + F_b}{F_a + F_c}}$$

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

ALGUNAS PROPIEDADES TERMODINÁMICAS (2)

Evaluaremos q y z en dos condiciones límite .

1) Prácticamente sólo se encuentra operativo el ciclo “a”

En esta condición $F_a \gg F_b, F_c$, y por consiguiente q y z valen aproximadamente $q = 1$ y $z = n$.

Entonces, en estas circunstancias ocurre acoplamiento completo entre la fuente dadora de energía libre (la reacción $S \leftrightarrow P$) y la fuente que la utiliza (el transporte de L contra gradiente), tal como se refleja en el valor de q ($q = 1$).

El coeficiente estequiométrico fenomenológico z vale n , el coeficiente estequiométrico molecular. Por consiguiente, la medida experimental del cociente de flujos nos brindará directamente el coeficiente n , tal como se comentara más arriba.

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

ALGUNAS PROPIEDADES TERMODINÁMICAS (3)

2) Prácticamente no ocurre el ciclo “a”

Esta condición requiere que las dos constantes de velocidad de la transición tipo “slippage” sean mucho mayores que las otras. Como consecuencia de esto, $F_a \ll F_b, F_c$, y por consiguiente q vale aproximadamente cero.

En esta circunstancia, el acoplamiento entre la fuente dadora y la fuente receptora de energía libre es prácticamente inexistente ($q = 0$). En la práctica, todo ocurre como si ambos procesos fueran independientes. De esta manera el sistema será, globalmente, puramente disipativo. En efecto, L será transportado en forma neta a favor de gradiente hasta alcanzar el equilibrio (véase modo de funcionamiento predominante bajo forma de ciclo “b”) y la reacción química transcurrirá consumiendo S sin poder aprovecharse la energía libre disponible.

El coeficiente z no valdrá n , y el valor concreto que adquiriera será irrelevante desde el punto de vista de la determinación de parámetros del proceso de transporte.

MODELO SENCILLO DE TRANSPORTE ACTIVO

ALGUNAS PROPIEDADES TERMODINÁMICAS (4)

En general, el proceso de transporte de L descrito por el diagrama de la Figura 2 tendrá un modo de funcionamiento intermedio entre las condiciones límite consideradas. De esta forma, el valor de q se encontrará en el intervalo entre 0 y 1. Cuanto mayor sea el valor de q , mayor será el grado de acoplamiento entre la fuente dadora y la receptora de energía libre. El hallazgo de un valor de q bajo es entonces revelador de que el proceso de transporte activo posee al menos una importante transición de tipo “slippage”.

El valor de z dependerá del grado de acoplamiento del proceso. Para un grado de acoplamiento intermedio, el valor de z será menor que n . En un caso de este tipo, la medida experimental del cociente de flujos (J_L/J_S) valdrá, en general, un número fraccionario. Este tipo de hallazgo es, entonces, también revelador de que la enzima de transporte activo opera con un grado importante de “slippage”.

TRANSDUCCIÓN DE ENERGÍA LIBRE EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

CONSIDERACIONES FINALES

La aparición durante las etapas prebióticas de sistemas moleculares de transducción de energía libre resultó crucial para el origen y evolución de los sistemas biológicos. Ejemplos críticos de dichos sistemas son las enzimas de membrana que median procesos de transporte activo. Estas enzimas son complejas máquinas moleculares cuyo modo esencial de funcionamiento puede, sin embargo, comprenderse mediante la representación y análisis de modelos cinéticos relativamente sencillos.

El éxito de los sistemas moleculares de transducción de energía libre se debió, en definitiva, a haber logrado mediar el acoplamiento de reacciones químicas fuertemente exérgónicas a procesos utilizadores de energía libre, como el transporte de iones contra gradiente. El carácter altamente exérgónico de esas reacciones es crucial, ya que, como puede sencillamente comprenderse observando la expresión para el flujo J_a , una elevada constante de disociación (K_{eq} en nuestro caso) garantiza el mantenimiento de un régimen de transporte activo dentro de un elevado rango de concentraciones del ligando transportado y de los reactivos de la reacción.

TRANSDUCCIÓN DE ENERGÍA LIBRE EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

BIBLIOGRAFÍA

Lectura básica:

Hill, T. L. (1989) *Free Energy Transduction and Biochemical Cycle Kinetics*. Springer-Verlag , New York. Páginas 1-24.

Lectura complementaria:

Nelson, D.L. & M.M. Cox . *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th Edition (2015). Chapter 13: Bioenergetics and Biochemical Reaction Types. Páginas 505-511.