

Objetivos:

- Identificación de una fracción subcelular enriquecida en mitocondrias mediante la detección de actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH).
- Estudio de la ultraestructura de mitocondrias y cloroplastos.

MITOCONDRIAS

Introducción:

La mitocondria es el lugar donde ocurre la mayor parte de las reacciones del metabolismo oxidativo en las células eucariotas. Esto es, es el sitio en el cual se realiza la mayor parte de la degradación oxidativa de compuestos como carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, que terminan dando lugar a la generación de energía en forma de síntesis de ATP. La mitocondria es un organelo de morfología y tamaño variables, pero que típicamente tiene una forma elipsoide, de aproximadamente 0,5 μm de diámetro y 1 μm de largo. Las mitocondrias están delimitadas por dos membranas, una membrana externa lisa y una membrana interna extensamente invaginada. El espacio entre ambas membranas se conoce como espacio intermembrana, y las invaginaciones de la membrana interna, que amplían enormemente su área, se denominan crestas (Figura 1). El compartimento interno de la mitocondria es la matriz mitocondrial. Mientras que la membrana externa permite la difusión libre de moléculas de hasta 10 kDa, la membrana interna sólo deja pasar libremente O_2 , CO_2 y H_2O , y posee varios transportadores que controlan el pasaje de diversos metabolitos.

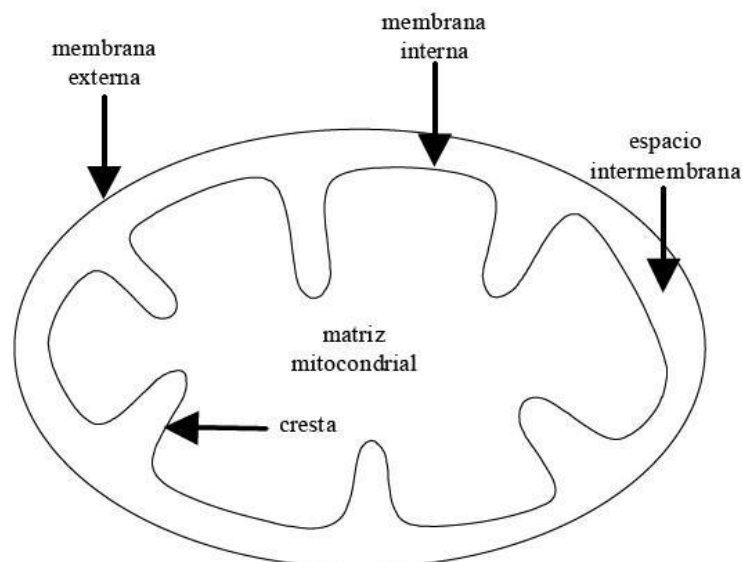


Figura 1: Representación de una mitocondria.

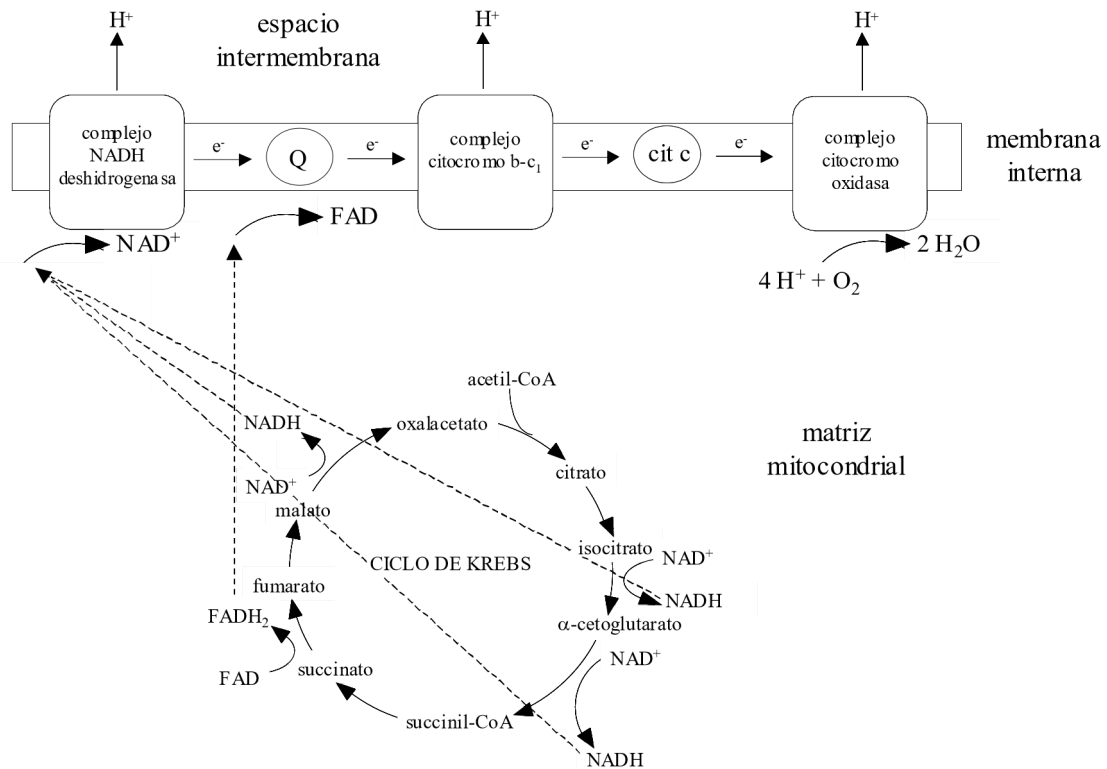


Figura 2: Resumen de las reacciones del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria que tienen lugar en la mitocondria.

En la figura anterior se esquematizan dos de los principales procesos metabólicos que ocurren en las mitocondrias, y que nos van a permitir identificarlas: el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria.

El resultado neto del ciclo de Krebs es la oxidación de un grupo acetilo ($\text{CH}_3\text{-C=O}$) perteneciente a la acetil-CoA a dos moléculas de CO_2 , y en paralelo la reducción de tres NAD^+ y un FAD para dar 3 NADH y un FADH_2 , respectivamente. Todas las enzimas que catalizan las reacciones del ciclo de Krebs se hallan en la matriz mitocondrial, excepto la succinato deshidrogenasa, cuya actividad mediremos, que está inserta en la membrana mitocondrial interna.

En la cadena respiratoria, los electrones de alta energía del NADH y el FADH_2 pasan por sucesivos complejos aceptores de potencial redox creciente, con lo que esta energía se va liberando. En cada complejo se bombean protones hacia el espacio intermembrana, con lo que se establece una diferencia de concentración de H^+ (y de carga) a través de la membrana mitocondrial interna. La energía liberada por el transporte de electrones queda almacenada en forma de un gradiente electroquímico.

Los tres complejos, así como los dos transportadores, que constituyen la cadena respiratoria, están insertos en la membrana mitocondrial interna. Los electrones provenientes del NADH pasan al complejo NADH deshidrogenasa, y de allí pasan a la coenzima Q, una pequeña molécula hidrofóbica, que los transporta al complejo citocromo b-c₁. Los citocromos son proteínas que contienen grupos hemo, en los que un átomo de hierro alterna entre los estados

de oxidación Fe (II) y Fe (III). Existen varios tipos de citocromos, que pueden hallarse formando parte de complejos, o bien aislados, como el citocromo c, que transporta electrones del complejo citocromo b-c₁ al complejo citocromo oxidasa. En este complejo, los electrones llegan a su aceptor final, el O₂, para formar H₂O.

La oxidación del FADH₂ es menos favorable que la del NADH, y sus electrones entran en la cadena respiratoria más adelante, siendo cedidos a la coenzima Q. El FADH₂ está unido covalentemente a la succinato deshidrogenasa, que está inserta en la membrana mitocondrial interna, como mencionamos más atrás.

La succinato deshidrogenasa es una enzima que sólo se encuentra en mitocondrias, y por lo tanto la medición de su actividad puede usarse para detectar la presencia de mitocondrias en una fracción subcelular. Esto se puede realizar utilizando un aceptor artificial de electrones que tenga mayor afinidad por los electrones que el FAD. En el práctico utilizaremos 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP). Este compuesto cambia el color según su estado de oxidación: es azul cuando se encuentra en estado oxidado e incoloro cuando está reducido.

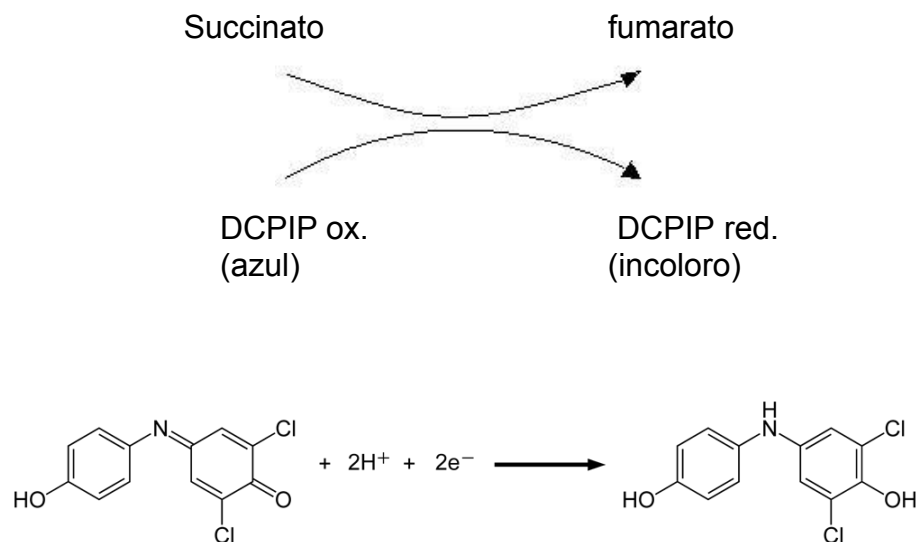


Figura 3: Esquema de las reacciones durante la reducción del aceptor artificial de electrones.

Protocolo de fraccionamiento subcelular para la obtención de mitocondrias (no será realizado en clase):

1. Homogeneización (en frío) de hígado de rata en un homogeneizador Potter-Elvehjem, en buffer Tris-HCl (15 mM) pH 7,4, sacarosa 0,33 M y EDTA 0,025 mM, a 1000 rpm, con 5 incursiones del émbolo.
2. Filtración en gasa del homogeneizado.
3. Centrifugación del filtrado a 800g durante 10 min a 4°C.
4. Se descarta el pellet y se centrifuga el sobrenadante por 10 min a 8200g a 4°C.
5. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en buffer de homogeneización. Se centrifuga igual que en el paso 4).
6. El pellet resultante se resuspende en aproximadamente 0,5 ml de buffer de homogeneización y se guarda a -20° C hasta el momento de usarlo.

CLOROPLASTOS

Introducción:

En algas y plantas superiores, la fotosíntesis ocurre en el cloroplasto. Este organelo posee, al igual que la mitocondria, una envoltura compuesta de dos membranas, una externa y una interna, pero además posee un tercer sistema de membrana, la membrana tilacoidal. Esta membrana forma pequeños sacos aplanados, denominados tilacoides, cuyo lumen es el espacio tilacoidal. Los tilacoides se apilan, formando bloques denominados *grana* (cada bloque en singular es un *granum*). Los grana están interconectados por regiones de la membrana tilacoidal alargadas, denominadas laminillas del estroma, cuyo lumen es continuo con el espacio tilacoidal. El estroma es el espacio interno del cloroplasto que queda por fuera de la membrana tilacoidal (Figura 1).

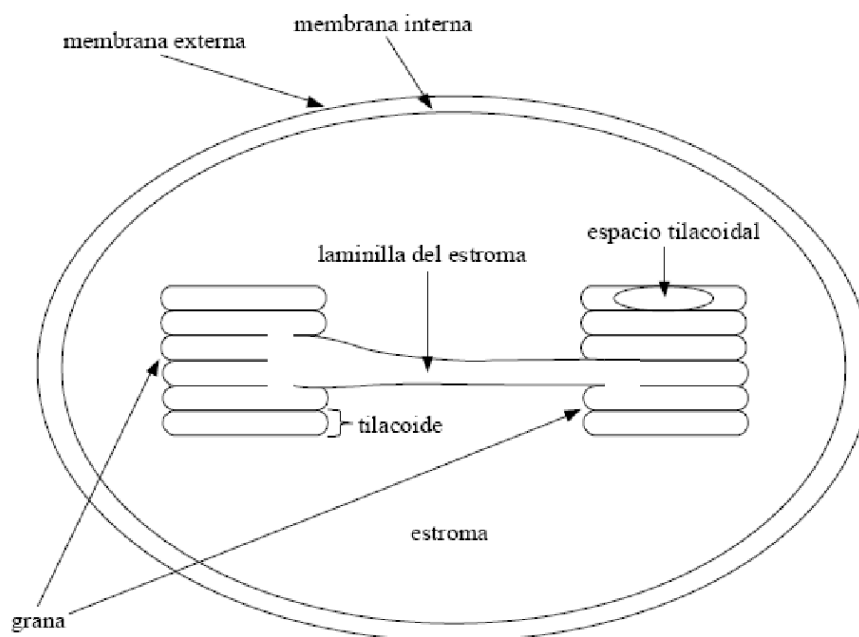


Figura 4: Representación esquemática de un cloroplasto.

La fotosíntesis es un complejo proceso en el cual la energía de la luz se usa para generar energía química en forma de ATP y poder reductor en forma de NADPH, que se usan a su vez para convertir el CO₂ del aire en carbohidratos, liberándose paralelamente O₂ a partir de agua (en plantas, algas y algunas bacterias). La reacción global de la fotosíntesis es:



Las reacciones de la fotosíntesis pueden agruparse en dos clases, las reacciones fotoquímicas, que ocurren en la membrana tilacoidal y en las que se generan ATP y NADPH, y las reacciones bioquímicas, que comienzan en el estroma del cloroplasto y continúan en el citosol, en las que el CO₂ es convertido en carbohidratos.

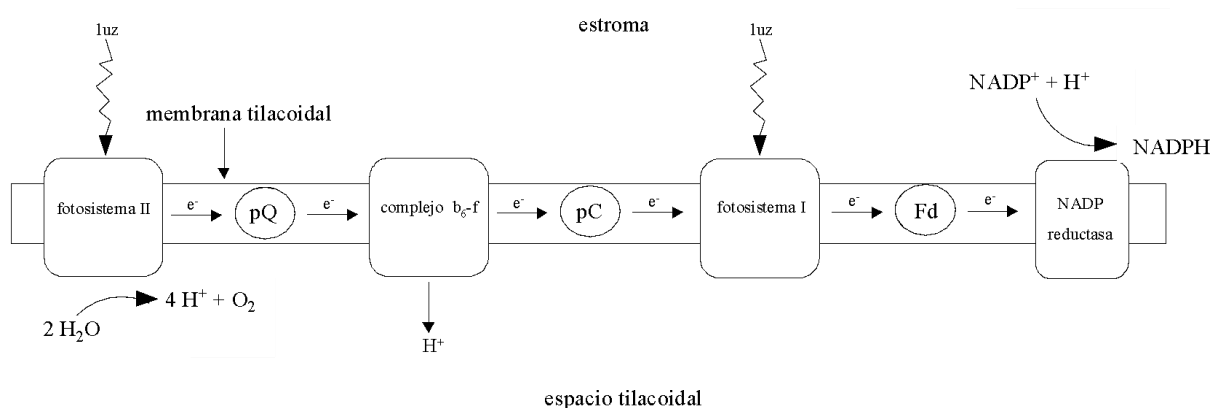


Figura 5: Esquema del camino seguido por los electrones durante las reacciones fotoquímicas.

Las reacciones fotoquímicas, mediante las que se obtiene ATP y NADPH, constituyen un proceso de dos fases, denominado fotofosforilación no cíclica, para distinguirlo de otro proceso, la fotofosforilación cíclica, en el que sólo se genera ATP. En la primera fase de la fotofosforilación no cíclica, la absorción de luz por el fotosistema II le permite remover electrones provenientes del agua y transferirlos a una cadena de transporte, hasta llegar al fotosistema I. Allí, una nueva absorción de luz confiere suficiente energía a los electrones para poder reducir a su aceptor final, el NADP⁺, formando NADPH (Figura 2).

Los fotosistemas son complejos formados por varios polipéptidos y distintos tipos de pigmentos, y en ellos la luz absorbida se utiliza para excitar a un electrón en una molécula de clorofila particular. En el fotosistema II, este electrón es transferido a la plastoquinona, una pequeña molécula análoga a la coenzima Q de la fosforilación oxidativa. Cada electrón transferido por el fotosistema II se repone con uno proveniente del agua, en una compleja reacción cuyo resultado final es la liberación de O₂ a partir de agua. La plastoquinona transfiere electrones al complejo b₆-f, análogo al complejo b-c₁ de la mitocondria, el cual bombea protones dentro del espacio tilacoidal. La plastocianina, una proteína pequeña que contiene un átomo de cobre que varía de estado de oxidación, transporta electrones desde el complejo b₆-f hasta el fotosistema I. Allí, la absorción de un fotón aumenta la energía de estos electrones, que pueden reducir a la ferredoxina, una proteína con un grupo prostético que contiene hierro y azufre. Esta a su vez transfiere los electrones al NADP⁺, en una reacción catalizada por la enzima NADP reductasa. Además de generar NADPH, este proceso de transporte de electrones provoca la acumulación de protones en el espacio tilacoidal, con la consecuente generación de un gradiente electroquímico a través de la membrana tilacoidal, el cual es usado para sintetizar ATP.

En 1937, Robert Hill descubrió que cuando cloroplastos aislados son iluminados en ausencia de CO₂, son capaces de reducir un aceptor artificial, liberando O₂ paralelamente. Este resultado fue una de las primeras demostraciones de que el CO₂ no participa directamente en el proceso que produce O₂, y puede resumirse en la siguiente reacción química, denominada **reacción de Hill**:

