

0005156000001

P-4-297

0775/98

CB-775/980 00001

7D-1777-1



**Estación Experimental de Aula Dei
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.)
Zaragoza**

TESIS DOCTORAL

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION ESPECTROSCOPICA
DEL CENTRO DE REACCION DEL FOTOSISTEMA II DE
CIANOBACTERIAS**



**Memoria presentada por María Aured Galve, Licenciada en Ciencias, Sección
Químicas, para optar al grado de Doctor en Ciencias**

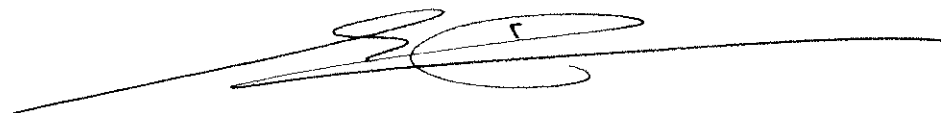
Portada: Esquema de los principales componentes del transporte electrónico fotosintético de cianobacterias

D. Rafael Picorel Castaño, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y responsable del grupo de Fotosíntesis Molecular de la Estación Experimental de Aula Dei,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral **“Purificación y caracterización espectroscópica del centro de reacción del fotosistema II de cianobacterias”**, ha sido realizada por la licenciada **María Aured Galve** bajo su dirección y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Zaragoza, 20 de Enero de 1997

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo. Rafael Picorel Castaño

Dr. Carlos Gómez-Moreno

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR

FACULTAD DE CIENCIAS
50009-ZARAGOZA
(Spain)

Tel. (34)(76)761288

FAX (34)(76)761159

e-mail:
gomezmoreno@msf.unizar.es



Carlos Gómez-Moreno Calera, Catedrático de
Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad
de Zaragoza

CERTIFICA;

que la Tesis Doctoral titulada " Purificación y
caracterización espectroscópica del centro de
reacción del fotosistema II de
cianobacterias", ha sido realizada por la
licenciada María Aured Galve bajo la dirección del
Dr. Rafael Picorel Castaño y bajo mi tutela y
reune, a mi juicio, las condiciones requeridas
para optar al Grado de Doctor en Ciencias

Zaragoza, 20 de Enero de 1997

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma han hecho posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Rafael Picorel, Director de esta Tesis Doctoral, por ofrecerme la oportunidad de trabajar en su grupo donde he contado con todos los medios necesarios para el desarrollo de mi trabajo, por su disponibilidad y ayuda para resolver cualquier problema científico. Su constante interés por el trabajo ha hecho que contara siempre con numerosas ideas y proyectos.

Al Dr. Carlos Gómez-Moreno, porque en todo momento me ha facilitado lo necesario para que mi trabajo saliera adelante.

Al Dr. Juan Manuel Ramírez del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid y al Profesor A. Holzwarth del Max-Planck Institut für Strahlenchemie de Mülheim (Alemania), siempre dispuestos a prestarme su ayuda y en cuyos laboratorios se han realizado algunos de los experimentos detallados en esta Memoria.

A la primera generación de becarios del laboratorio, Guillermo Montoya, Iñaki Ortiz de Zarate y en especial a Miguel Alfonso, gracias a ellos aprendí, entre otras muchas cosas, a distinguir e interpretar todos esos espectros que a primera vista parecían iguales, pero que “realmente no lo eran”.

A las chicas del “labo”, Esme Moliner, Carmen Pérez, Carmen Andrés, Elena Torrado, Marian Pérez y Raquel, porque han sido un gran soporte para mí, tanto en los malos momentos (que haberlos haylos) como en los buenos (que sinceramente han sido muy buenos). La convivencia durante tantas horas con ellas ha creado una gran amistad entre todas nosotras y espero que siempre se mantenga.

A los Doctores Inmaculada Yruela, José Javier Pueyo y André Buche, porque siempre han estado dispuestos a comentar y discutir mi trabajo y a Mariví Ramiro por su gran ayuda en la preparación de los cultivos de esas “celulitas verdes” llamadas cianobacterias, así como a todos ellos agradezco su compañerismo y amistad.

A Mariví López, Yolanda, Gloria, Carmen Pérez (IPE), M^a Angeles, Bego, Aurora (eres un cielo, sigue así), Elena González, Ana Flor, Monona, Rebeca, M^a Carmen Lope, Concha, Fernando, Iñaki, Kepa, Manu, Luis, Alberto, Santos, Paco, Ramzi, Dani, Mohamed, Yamel, Fermín, Sherim, Suleyman, y Jesús Pascual, a todos os quiero agradecer toda la ayuda y amistad que siempre he recibido.

Al Dr. Luis Montañés porque siempre que he necesitado su ayuda o consejo me ha prestado toda su atención.

A mis padres y a mi tía, porque siempre me han apoyado en todo y han llegado a entender que tantas y tantas horas de trabajo han merecido la pena.

A mis hermanos, Macu y Nacho, porque entre risas y bostezos han aguantado durante cuatro años mis explicaciones sobre el “centro de reacción del fotosistema II”.

A Chema que ha sufrido directamente las alegrías y las tristezas que conllevan una Tesis Doctoral, pero que gracias a él, los malos ratos y el cansancio terminaban por convertirse en una sonrisa.

A mis padres y a Chema

ABREVIATURAS

A	Amperio
Abs., OD	Absorbancia
ATP	Trifosfato de adenosina
APS	Persulfato amónico
Å	Angstrong
Bchl	Bacterioclorofila
Bis-Tris	Bis[2-hidroxi-etil]imino-tris[hidroxi-metil]metano
Bpheo	Bacteriofeofitina
BSA	Seroalbumina bovina
β_N	Magnetón de Bohr
C	Carbono
CD	Dicroísmo circular
Chl	Clorofila
cm^{-1}	Número de onda
CMC	Concentración micelar crítica
CP29	Complejo pigmento-proteína de 29 kDa del fotosistema II
CP43	Complejo pigmento-proteína de 43 kDa del fotosistema II
CP47	Complejo pigmento-proteína de 47 kDa del fotosistema II
Cyt	Citocromo
D	Donador primario del centro de reacción bacteriano
D ₁	Proteína D ₁ del centro de reacción del fotosistema II
D ₂	Proteína D ₂ del centro de reacción del fotosistema II
DAS	Espectro asociado al decaimiento de fluorescencia
DCBQ	2,6-diclorobenzoquinona
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1 dimetil urea
DEAE	Dietil amino etil
DM	n-dodecil β -D-maltósido
ΔA	Diferencia de absorbancia
$\Delta \mu H^+$	Gradiente electroquímico de protones
ΔG	Incremento de energía libre
ϵ	Coeficiente de extinción
EDTA	Acido etilén-diamino tetraacético
EPR	Resonancia paramagnética del electrón
F	Proteínas ferrosulfuradas
F _d	Ferredoxina

fs	Femtosegundo
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier
FPLC	Cromatografía líquida rápida para proteínas
H	Proteína H del centro de reacción bacteriano
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
H _o	Campo magnético externo
χ^2	Chi cuadrado
kDa	Kilodalton
L	Proteína L del centro de reacción bacteriano
λ	Longitud de onda
LDAO	Oxido N, N'-lauril dimetil-amina
LHCII	Complejo de antena mayoritaria del fotosistema II
M	Molar
μE	Micro-Einstein
$\mu\text{eq e}^-$	Micro equivalente de electrones
μs	Microsegundo
NADP ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
nm	Nanómetro
OEC	Complejo mínimo que conserva la capacidad de desprender oxígeno
P680	Donador primario de electrones del fotosistema II
P680 [*]	Estado excitado del donador primario de electrones del fotosistema II
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
PC	Plastocianina
Pheo	Feofitina
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
p/p	Peso/peso
PQ	Plastoquinona
ps	Picosegundo
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
PSII _m	Membranas de fotosistema II
p/v	Peso/volumen
Q	Quinona
Q _a	Primera quinona aceptora de electrones
Q _b	Segunda quinona aceptora de electrones
RC	Centro de reacción

RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SERRS	“Surface-enhanced resonance Raman scattering”
SERS	“Surface-enhanced Raman scattering”
SiMo	Silicomolibdato
SPT	“Single-photon-counting”
τ	Tiempo de vida
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina
Tricina	N-tris(hydroximetil) metil glicina
Tris	(Tris)-hidroximetil-amino metano
TX-10	Tritón X-100
u.a.	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
Y_z , Z	Donador secundario de electrones del fotosistema II

INDICE GENERAL

Introducción.....	1
Materiales y Métodos.....	37
Resultados.....	77
Discusión.....	163
Conclusiones.....	185
Bibliografía.....	189

INTRODUCCION

INDICE INTRODUCCION

1. La Fotosíntesis	5
1.1. Importancia de la fotosíntesis	5
1.2. Principales procesos de la fotosíntesis	5
2. Estructuras fotosintéticas	6
2.1. Orgánulos fotosintéticos celulares	6
2.2. Pigmentos fotosintéticos	7
2.2.1. Clorofila <i>a</i> y clorofila <i>b</i>	7
2.2.2. Carotenoides y ficobilinas	9
2.3. La unidad fotosintética	10
3. El Fotosistema II	11
3.1. La antena extrínseca del PSII	12
3.1.1. Antena LHCII	12
3.1.2. Ficobilisomas	14
3.2. Unidad central del fotosistema II	15
3.2.1. La antena interna del PSII	15
3.2.2. Centro de reacción del PSII	17
3.2.3. Proteínas extrínsecas	24
4. Procesos fotofísicos/fotoquímicos	25
4.1. Excitación de las moléculas de pigmentos	25
4.2. Transferencia de la energía de excitación	26
4.3. Separación de cargas en el centro de reacción	28
5. Cianobacterias	29
5.1. Origen y organización estructural de las cianobacterias	29
5.2. El PSII de cianobacterias	30
5.3. Cianobacterias termófilas	31
6. Planteamiento y objetivos del trabajo	32



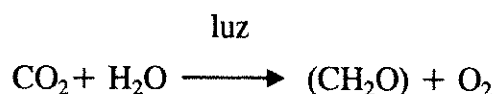
1. La Fotosíntesis

1.1. Importancia de la fotosíntesis

La fotosíntesis podría ser definida como la captura y conversión de la energía solar en biomasa o energía química por los organismos fotosintéticos (plantas, algas y bacterias fotosintéticas) (Hall y Rao, 1981; Govindjee, 1982). Es por tanto, la fuente última de energía de todos los ecosistemas. Los organismos fotosintéticos, junto con los heterótrofos, viven en completo equilibrio en nuestra biosfera. Los organismos fotosintéticos capturan la energía del sol y la usan para producir NADPH y ATP, que emplean como fuentes de energía para elaborar carbohidratos a partir de dióxido de carbono y agua; simultáneamente liberan oxígeno a la atmósfera en el caso de la fotosíntesis oxigénica. Los heterótrofos aeróbicos, por otra parte, emplean el oxígeno así formado para degradar los productos orgánicos ricos en energía, procedentes de la fotosíntesis hasta CO_2 y H_2O , a fin de producir ATP para sus propias actividades. El dióxido de carbono producido en la respiración de los heterótrofos vuelve a la atmósfera y se emplea de nuevo por los organismos fotosintéticos. La energía solar es la que proporciona la fuerza impulsora para efectuar tanto el ciclo continuo del dióxido de carbono atmosférico como el del oxígeno de nuestra biosfera. Debido a esta gran dependencia de la energía solar, los mecanismos de la fotosíntesis plantean, tanto en el pasado como en el presente, uno de los problemas bioquímicos más fundamentales y de ahí su gran importancia en investigación.

1.2. Principales procesos de la fotosíntesis

La reacción neta de la fotosíntesis en las plantas, las algas y las cianobacterias puede escribirse como:



donde (CH_2O) son los hidratos de carbono. La fotosíntesis transcurre en dos fases: procesos unidos a membrana y procesos no unidos a membrana. En los primeros, la clorofila y otros pigmentos de las células fotosintéticas absorben energía luminosa y la transforman en energía química, sintetizando dos productos ricos en energía y en poder reductor, el ATP y el NADPH; simultáneamente, se desprende oxígeno. En los procesos no unidos a membrana, el ATP y el NADPH producidos anteriormente, se emplean para reducir el dióxido de carbono y formar glucosa y otros productos orgánicos en el ciclo de Calvin (Hipkins y Baker, 1984). La

formación de oxígeno y la reducción del dióxido de carbono son, por tanto, procesos separados y distintos.

2. Estructuras fotosintéticas

2.1. Orgánulos fotosintéticos celulares

La fotosíntesis en las algas y en las plantas verdes ocurre en unos orgánulos subcelulares llamados cloroplastos, que son las fábricas de energía más importantes de este tipo de células. La Fig. 1 muestra esquemáticamente el corte transversal de un cloroplasto, observándose así su organización estructural. Al igual que la mitocondria, el cloroplasto está rodeado por una doble membrana. La membrana externa del cloroplasto es permeable a la mayor parte de los metabolitos de bajo peso molecular, mientras que la membrana interna es prácticamente impermeable a la mayoría de las sustancias. Sin embargo, ambas membranas cloroplásticas son muy permeables al CO_2 , sustrato de la síntesis de los hidratos de carbono. El espacio entre las membranas interna y externa se denomina espacio intermembranal. La región acuosa encerrada por la membrana interna se llama estroma. Las enzimas necesarias para catalizar las reacciones en las que el CO_2 se reduce para formar glucosa se localizan en el estroma. Suspendida en el interior del estroma existe una membrana continua denominada membrana tilacoidal, la cual encierra un espacio interno conocido como lumen. La membrana tilacoidal contiene todos los pigmentos fotosintéticos del cloroplasto y todas las enzimas necesarias en las reacciones primarias dependientes de la luz. Esta membrana está muy plegada en un entramado de vesículas aplastadas, con forma de saco, pudiendo disponerse en apilamientos denominados grana o como vesículas individuales que atraviesan el estroma y conectan los grana. Las porciones de la membrana tilacoidal que se localizan dentro de los grana, no estando así expuestas al estroma, se llaman lamelas granales, mientras que las porciones de la membrana tilacoidal expuestas al estroma se conocen como lamelas estromales.

El aparato fotosintético de los procariotas (cianobacterias y bacterias fotosintéticas) se encuentra en estructuras membranosas que se extienden a través de la célula o forman invaginaciones de la membrana celular. Al romper las células fotosintéticas bacterianas aparecen fragmentos de membranas que forman vesículas cerradas de 300 a 500 Å de diámetro. Estas vesículas son denominadas cromatóforos y retienen la mayoría de las actividades fotosintéticas. Las membranas fotosintéticas de cianobacterias se encuentran plegadas en la célula de una forma más o menos compleja. Generalmente estas membranas son denominadas tilacoides.

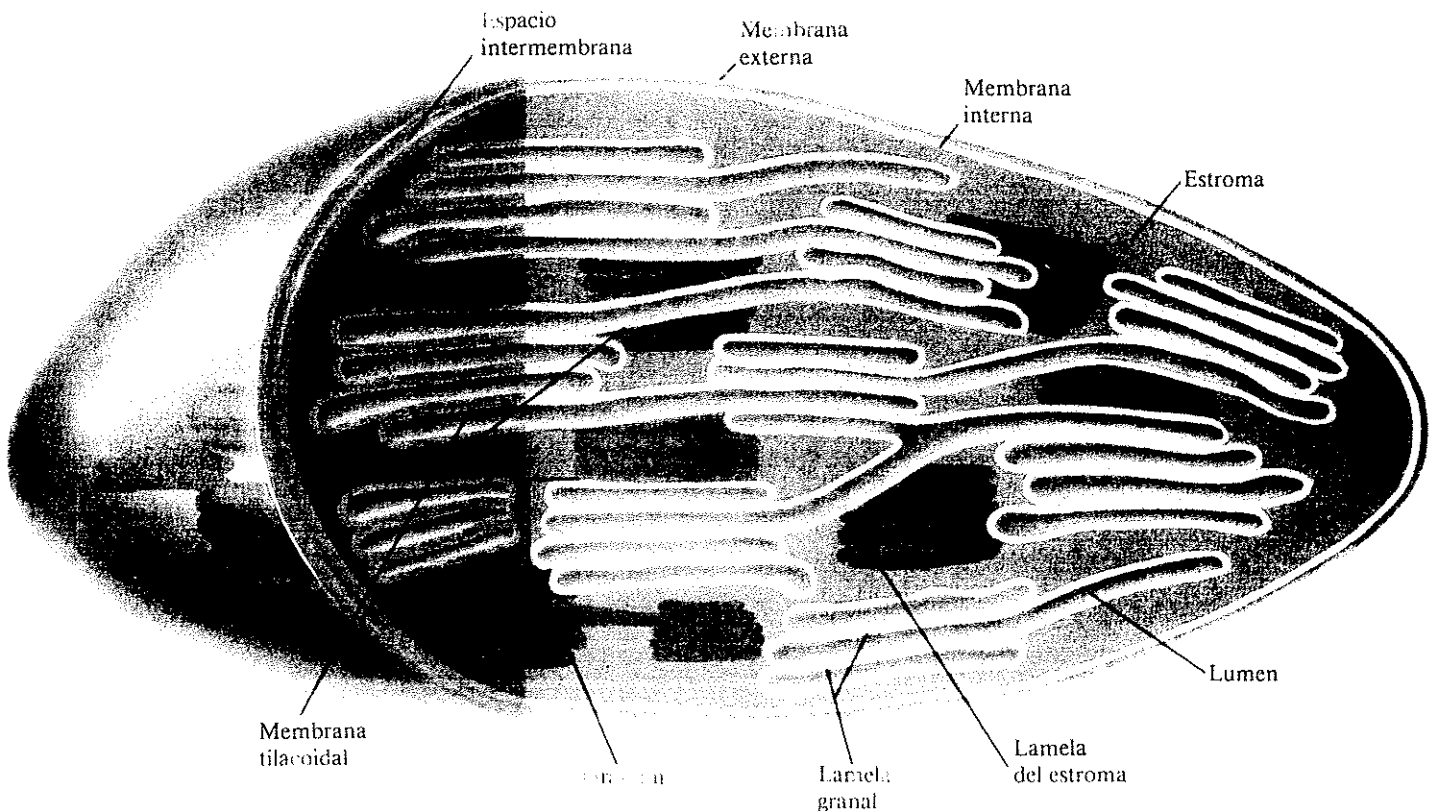


Figura 1: Esquema de un corte del cloroplasto de plantas superiores. Las flechas indican los diferentes componentes.

2.2. Pigmentos fotosintéticos

2.2.1. Clorofila *a* y clorofila *b*

La luz del sol incidente sobre la superficie terrestre abarca la región del espectro comprendida entre 300 y 1150 nm. La capa de ozono absorbe casi toda la radiación ultravioleta del sol (Sauer, 1986), mientras que el vapor de agua y el dióxido de carbono en la atmósfera actúan como filtro impidiendo el paso de radiación de baja energía. La fotosíntesis depende de la absorción de la energía radiante (luz) por parte de los pigmentos fotosintéticos, que se encuentran localizados en las membranas tilacoidales, tanto de las plantas superiores como de las algas y cianobacterias y en las membranas plasmáticas de las bacterias fotosintéticas.

Los principales pigmentos fotosintéticos en las plantas superiores, algas y cianobacterias son la clorofila *a* (Chl *a*) y la clorofila *b* (Chl *b*) mientras que en las bacterias

fotosintéticas son los análogos bacterianos de estos pigmentos, bacterioclorofila *a* (Bchl *a*) y bacterioclorofila *b* (Bchl *b*). La Fig. 2 muestra el espectro de absorción de estos pigmentos en EtOH. Willstätter y Stoll (1913), así como Fischer (1940), resolvieron la estructura química de la Chl como un tetrapirrol con estructura de anillo porfirínico. La Chl *a* tiene sus cuatro anillos de pirrol sustituidos, uno de los cuales (anillo IV) se halla reducido, además tiene también un quinto anillo, que no es un pirrol. Este derivado de la porfirina con cinco anillos, se llama feoporfirina. La Chl *a* posee también, una prolongada cadena lateral isoprenoide, constituida por el alcohol fitol, que esterifica a un grupo carboxilo sustituyente en el anillo IV. Los cuatro átomos de nitrógeno centrales de la Chl *a* se hallan coordinados con un átomo de magnesio.

Los organismos fotosintéticos oxigénicos contienen dos tipos de Chl principalmente. La Chl *a* (que es la única en cianobacterias) está presente en todos los organismos fotosintéticos mientras que la Chl *b*, que posee un grupo aldehído en lugar de un grupo metilo unido al anillo II, sólo está presente en plantas y algas. En la Fig. 3 se representa una comparación entre las estructuras de Chl *a*, Chl *b*, Bchl *a* y Bchl *b*. Otras Chls tales como la Chl *c* o la Chl *d* se pueden encontrar en algas rojas o marrones.

La Chl *a* y la Chl *b* absorben luz en las regiones azul ($\lambda_{\text{max}}=424\text{-}491\text{ nm}$) y roja ($\lambda_{\text{max}}=647\text{-}700\text{ nm}$) del espectro electromagnético. Sin embargo, a causa de que estas Chls difieren ligeramente en su estructura, su absorción máxima no es exactamente la misma.

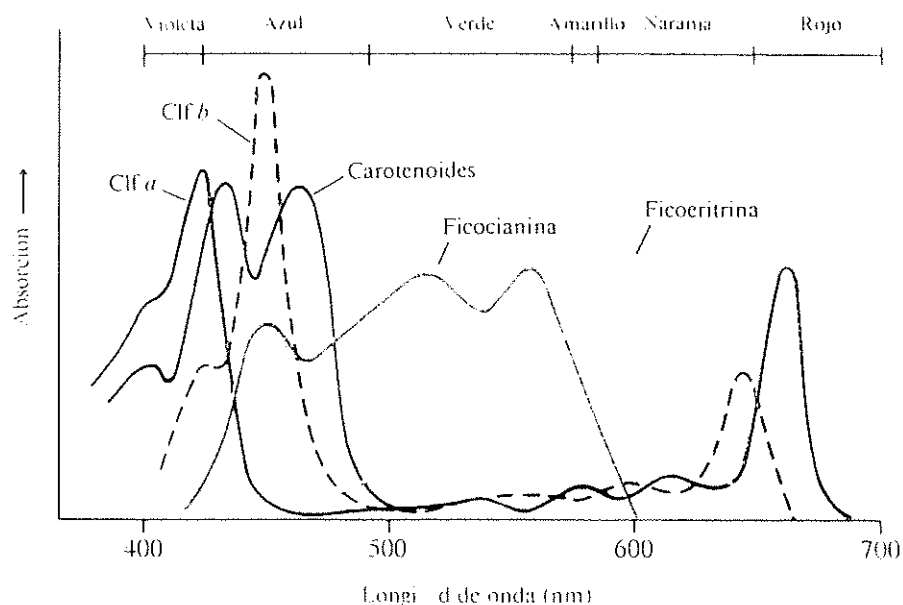
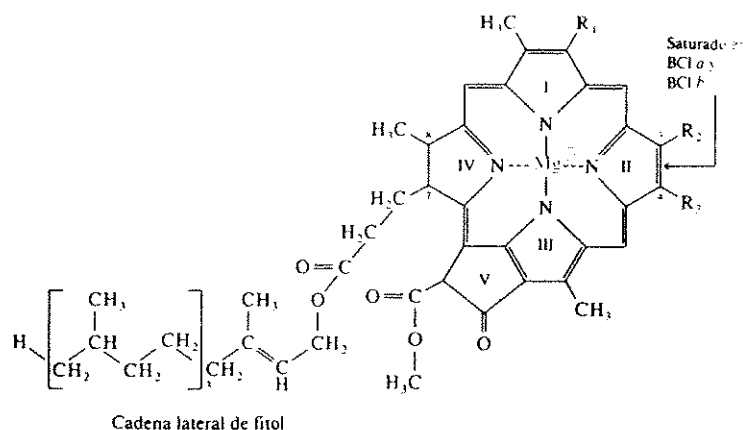


Figura 2: Espectro de absorción de los principales pigmentos fotosintéticos.



Especies de Clf	R ₁	R ₂	R ₃
Clf a	—CH=CH ₂	—CH ₃	—CH ₂ —CH ₃
Clf b	—CH=CH ₂	—C(=O)—H	—CH ₂ —CH ₃
BClf a	—C(=O)—CH ₃	—CH ₃	—CH ₂ —CH ₃
BClf b	—C(=O)—CH ₃	—CH ₃	—CH=CH ₂

Figura 3: Estructura de la Chl. Esta figura muestra una de las posibles distribuciones de los dobles enlaces en la molécula de Chl. La resonancia del sistema de dobles enlaces conjugados hace posibles otras distribuciones.

2.2.2. Carotenoides y ficobilinas

Los organismos fotosintéticos contienen otros tipos de pigmentos además de las clorofilas. Se trata de sustancias que absorben luz, tales como los carotenoides y las ficobilinas. Los carotenoides, que se dividen en carotenos y xantofilas, se encuentran presentes en todos los organismos fotosintéticos. Las ficobilinas, cuyos principales constituyentes son la ficoeritrina y la ficocianina, existen en algunas algas y en las cianobacterias.

Los carotenoides, además de absorber luz, tienen una función protectora del aparato fotosintético. Durante la fotosíntesis, el oxígeno puede convertirse en oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), especie altamente reactiva que puede dañar las estructuras fotosintéticas. Los carotenoides son eficaces absorbiendo energía del $^1\text{O}_2$, transformándolo de nuevo en oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$), de menor energía. La energía absorbida por estos carotenoides se disipa en forma de calor.

El espectro de absorción de estos pigmentos se extiende a lo largo de todo el espectro visible, aumentando así la cantidad de energía lumínica que puede ser absorbida por un organismo fotosintético.

2.3. La unidad fotosintética

Los pigmentos que absorben la luz, situados en las membranas tilacoidales, se hallan dispuestos en conjuntos o agrupaciones funcionales denominadas fotosistemas. Contienen alrededor de 200-250 moléculas de clorofila y unas 50 moléculas de carotenoides. Estas agrupaciones pueden absorber luz sobre el espectro visible completo, pero especialmente de 400 a 500 nm y de 600 a 700 nm. Cada fotosistema está compuesto por un centro reactivo (Duysens, 1961) y una antena. Ambos tipos de complejos son proteínas de membrana que unen clorofilas y carotenoides. La función de las antenas consiste en captar y transferir la energía de excitación procedente de la luz. Es decir, hay transferencia de energía pero no de electrones. El centro reactivo forma el núcleo del fotosistema, en él se produce transferencia de electrones dando lugar a una conversión de la energía física en energía electroquímica (Clayton, 1965). En plantas superiores, algas verdes y cianobacterias, existen dos tipos de fotosistemas, el I y el II. En el fotosistema II (PSII) se produce la fotólisis del agua, mientras que en el fotosistema I (PSI) se genera el poder reductor, es decir el NADPH. El PSI es un complejo multiproteico en forma de trímero (Krauss, 1993) que se localiza casi exclusivamente en las lamelas del estroma. El centro reactivo está formado por un par de moléculas de Chl *a* denominado P700 ya que absorben a 700 nm. El PSII también es un complejo multiproteico (Seibert, 1993) localizado en las membranas granales, cuyo centro reactivo se cree que está formado por un par de Chl *a* que absorben a 680 nm, de ahí su denominación de P680. Asociado al PSII se encuentra el complejo responsable de la fotólisis del agua. Los dos fotosistemas están conectados mediante un transporte electrónico no cíclico que produce la reducción del NADP^+ y un gradiente electroquímico ($\Delta\mu\text{H}^+$), denominado esquema en Z (Fig. 4), sobre el que algunos autores plantean objeciones sugiriendo que bajo ciertas circunstancias la fijación del CO_2 puede ser dirigida únicamente por el PSII, ya que el primer aceptor de electrones (Pheo) posee un potencial redox suficiente como para reducir al NADP^+ directamente (Arnon y Barber, 1990; Greenbaum y col., 1995). Esta asociación entre los dos fotosistemas se da en plantas, algas y cianobacterias, mientras que en bacterias fotosintéticas únicamente se encuentra una unidad fotosintética y el transporte electrónico es preferentemente cíclico (Youvan y Marrs, 1987). Debido a que el presente trabajo se ha llevado a cabo en el fotosistema II, nos centraremos en él describiendo cada uno de sus componentes.

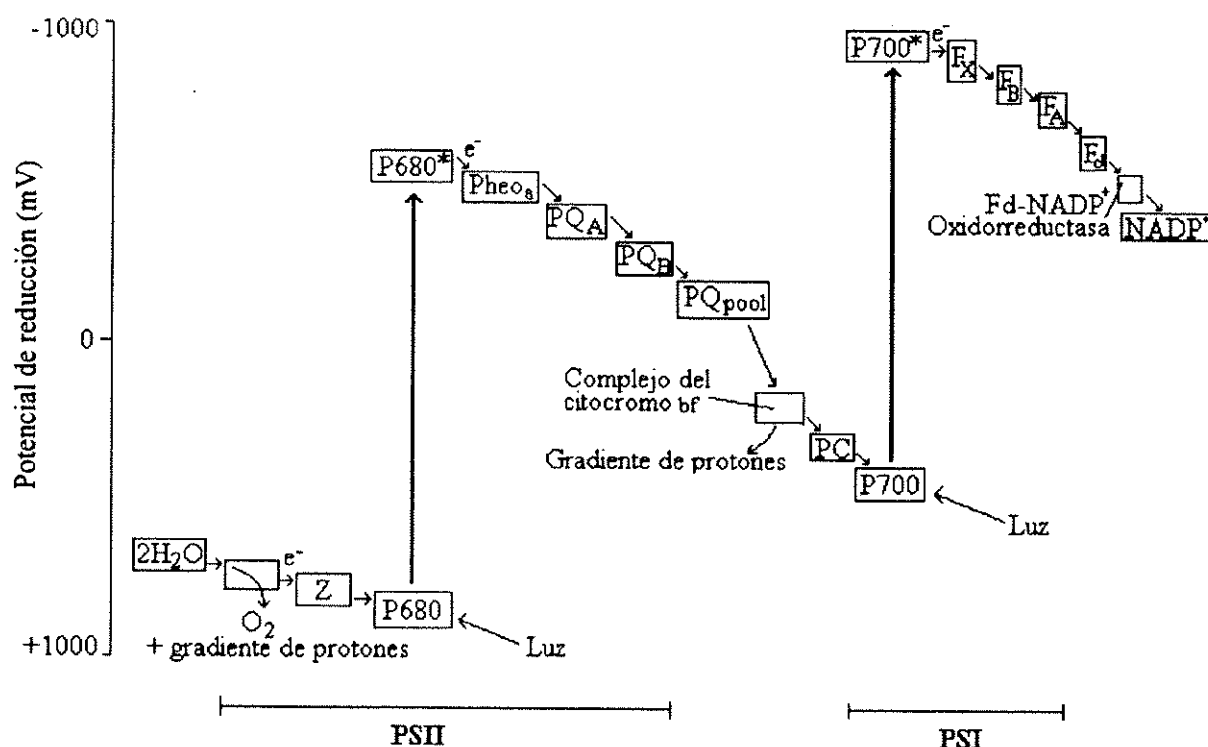


Figura 4: Esquema en Z del transporte electrónico en la fotosíntesis oxigénica. Abreviaturas: Z, donador de electrones a P680; Pheo *a*, feofitina *a*; PQA y PQB, aceptores secundarios de electrones; PQ_{pool}, moléculas móviles de plastoquinona; PC, plastocianina; F_x, F_b y F_a, proteínas ferrosulfuradas transportadoras de electrones; F_d, ferredoxina.

3. El fotosistema II

El fotosistema II puede ser definido como el complejo fotosintético que cataliza la fotólisis del agua y la transferencia fotoinducida de electrones desde el agua a las plastoquinonas (Hansson y col., 1990). Se trata de un complejo de proteínas de membrana que contiene al menos 25 polipéptidos, está presente en todos los organismos fotosintéticos oxigénicos (plantas superiores, algas verdes y cianobacterias) y puede ser dividido en diferentes partes según su funcionalidad. Sus componentes son, la antena extrínseca LHCII, que en el caso de cianobacterias no existe pero en su lugar se encuentran las ficobiliproteínas y la unidad central del PSII o "core-complex". Este a su vez se compone de las antenas intrínsecas, el centro de reacción y las proteínas extrínsecas asociadas al sistema de fotólisis del agua. En la Fig. 5 se muestra un modelo de la membrana tilacoidal donde se representan los distintos complejos que intervienen en los procesos fotosintéticos.

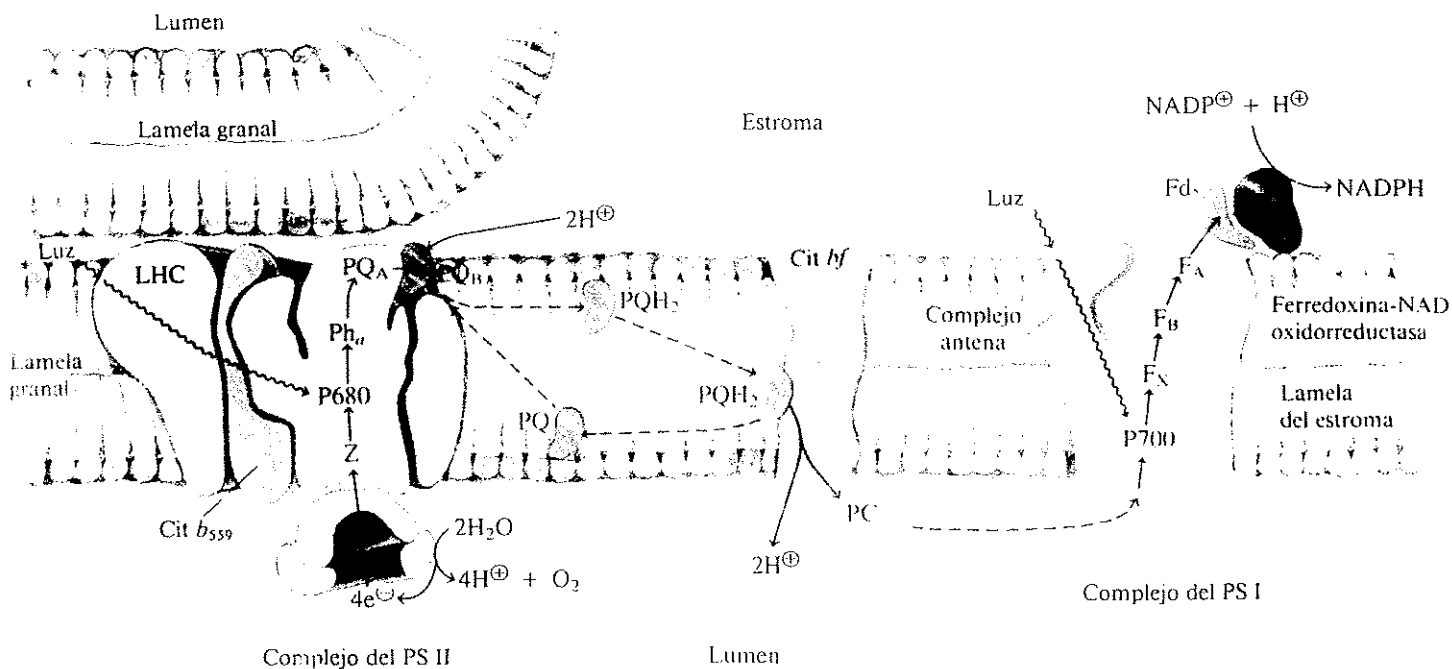


Figura 5: Representación modelo de los componentes de la membrana tilacoidal vegetal que participan en la fotosíntesis.

3.1. La antena extrínseca del PSII

Aproximadamente la mitad de la Chl en plantas superiores y algas verdes está unida a un complejo polipeptídico que une tanto Chl *a* como Chl *b*, este complejo asociado al PSII es el mayor colector de energía en plantas superiores, juega un papel estructural imprescindible en el apilamiento de las membranas tilacoidales y regula la distribución de la energía de excitación entre el PSI y el PSII (Bassi y col., 1990). En cianobacterias este complejo es sustituido por otros complejos pigmento-proteína denominados ficobilisomas.

3.1.1. Antena LHCII

La antena "light-harvesting complex II" (LHCII) consiste en una familia de proteínas con gran homología, de masas moleculares aparentes entre 25 y 27 kDa (Peter y Thornber, 1988), que difieren en sus potenciales de fosforilación. Mientras unas se encuentran más fuertemente unidas, otras están localizadas en la periferia, aunque todas poseen una organización casi idéntica de sus cromóforos (Larsson y col., 1987; Spangfort y Andersson, 1989). Los polipéptidos de la antena LHCII están codificados por genes nucleares (Dunsmuir y

col., 1983). LHCII ha sido aislada por varios procedimientos, utilizando distintos detergentes y técnicas electroforéticas, cromatográficas o de centrifugación en gradiente. El complejo se aisló por primera vez hace unas dos décadas tras la solubilización de cloroplastos con SDS (Thornber, 1976). La muestra obtenida era un monómero con un total de 6 Chl *a* por proteína y una relación Chl *a*/Chl *b* de 1:1 (Kan y Thornber, 1986). Posteriormente se han desarrollado otros métodos de purificación utilizando detergentes menos reactivos como el Tritón X-100 (TX-100) o el *n*-octil- β -D-glucopiranosido, que conducen al aislamiento de LHCII en forma de trímero (Butler y Külbrandt, 1988), compuesto de monómeros muy semejantes. Cada uno de los monómeros tiene un peso molecular de 25 kDa con 8 Chl *a*, 6 Chl *b* y 2 carotenoides (xantofilas). Las dos moléculas de xantofila (principalmente luteína) se sitúan a cada lado de las hélices transmembranales A y B y se encuentran en conformación *all-trans*. Todos estos cromóforos se encuentran unidos de forma no covalente a la matriz proteica, por coordinación del átomo central de Mg a la cadena polar de aminoácidos o a la principal cadena de carbonilos en el interior hidrofóbico del complejo.

La estructura tridimensional de esta proteína se ha determinado por microscopía electrónica en cristales bidimensionales (Külbrandt y Wang, 1991; Külbrandt, 1992; Külbrandt y col., 1994). Dos de sus tres α -hélices se mantienen juntas por pares iónicos formados por residuos cargados que también sirven como ligandos de clorofilas. En el centro del complejo, la Chl *a* está próxima a la Chl *b* para una rápida transferencia de energía y con dos carotenoides que pueden prevenir la formación de oxígeno singlete, además de absorber energía.

En su papel de regulador de la transferencia de energía, la fosforilación de esta cromoproteína de membrana es fundamental. En su forma defosforilada interacciona específicamente con el PSII. Tras la fosforilación por parte de una kinasa activada por altos niveles de plastoquinona reducida (Allen, 1992), se convierte en una fracción "móvil" que se aleja del PSII aumentando su afinidad por el PSI y transfiriendo la energía de excitación a éste.

Existe un número de proteínas minoritarias asociadas a la antena LHCII pero sin ser parte de ella. Entre estas proteínas se encuentran CP29, CP26 y CP24, que poseen una composición polipeptídica y pigmentaria semejante a las subunidades de la LHCII pero con una relación Chl *a*/Chl *b* mayor, siendo ésta entre 2 y 3. Ninguna de estas proteínas puede ser fosforilada. Algunos autores proponen para estas antenas minoritarias una función de "puente" entre la LHCII y el "core complex" del PSII en la transferencia de energía de excitación, disipando en determinadas ocasiones el exceso de energía que llega al centro de reacción y contrarrestando, así, la fotoinhibición (Bassi y col., 1987 y 1990; Camm y Green, 1989).

3.1.2. Ficobilisomas

El aparato fotosintético de las cianobacterias es estructural y funcionalmente similar al de los cloroplastos de algas eucariotas y plantas superiores, la mayor diversidad de los diferentes organismos fotosintéticos se encuentra en los complejos de antena asociados con el PSII.

Las cianobacterias contienen ficobiliproteínas, las cuales se unen formando grandes complejos conocidos como ficobilisomas. Se encuentran asociadas fuertemente al centro de reacción del PSII (Bryant y col., 1985; Glazer, 1985; Morschel y col., 1987) y su función principal es absorber y transferir la energía de excitación al centro de reacción. Las ficobiliproteínas, a diferencia de la antena LHCII, son solubles en agua lo que hace que tanto su purificación como caracterización sea más sencilla. Estas proteínas han sido caracterizadas en detalle por cristalografía de rayos-X (Schirmer y col., 1985 y 1987) y por biología molecular (Glazer, 1987). La combinación de estos estudios han proporcionado un mayor entendimiento de la estructura y función de este tipo de antena.

Los ficobilisomas están compuestos por dos tipos de proteínas, ficobiliproteínas (entre el 85 y 90% de la proteína total) y polipéptidos que actúan de enlace entre ellas. Las ficobiliproteínas pueden ser clasificadas en tres grandes grupos en base a sus propiedades de absorción en el visible: ficoeritrinas ($\lambda_{\text{max}}=490\text{-}570\text{ nm}$); ficocianinas ($\lambda_{\text{max}}=610\text{-}630\text{ nm}$) y aloficocianinas ($\lambda_{\text{max}}=650\text{-}670\text{ nm}$). Todas las ficobiliproteínas se componen de dos subunidades α y β , que se encuentran en cantidades equimolares para formar el protómero ($\alpha\beta$), cada una de las subunidades puede llevar hasta tres cromóforos tetrapirrólicos lineales unidos a la cadena polipeptídica covalentemente o por uniones cisteína tioeter (Glazer, 1985). Actualmente se conoce la estructura primaria de las ficobiliproteínas y sugiere que todas estas proteínas, incluyendo las familias de las subunidades α y β , se derivan de un gen ancestral único.

La mayoría de las ficobiliproteínas se ensamblan formando trímeros ($\alpha\beta$)₃ en forma de disco; las ficocianinas y ficoeritrinas pueden también formar hexámeros de doble disco. El ensamblaje de las ficobiliproteínas para formar ficobilisomas precisa de 5 a 10 proteínas "unión", las cuales interaccionan con las ficobiliproteínas uniéndose a los trímeros/hexámeros por la cavidad central, mediante fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas. Además del papel de ensamblaje, estos polipéptidos producen cambios en las propiedades espectroscópicas de las ficobiliproteínas a las cuales se enlazan, obteniéndose así una transferencia unidireccional de la energía de excitación desde la periferia al centro de reacción del PSII. La luz absorbida por las ficobiliproteínas es transferida predominantemente al centro de reacción con una eficacia mayor al 90%.

3.2. Unidad central del fotosistema II

El "oxygen evolving core complex" (complejo OEC) o unidad central del PSII, puede ser definida como la unidad mínima capaz de producir la separación de cargas, reducir las quinonas y emitir oxígeno como subproducto de la reacción (Ghanothakis y Yocum, 1990; Green y Durnford, 1996). Esta partícula puede ser subdividida en :

- La antena interna del PSII
- El centro de reacción fotosintético (RC)
- Las proteínas extrínsecas

3.2.1. La antena interna del PSII

La antena interna del PSII está formada por dos polipéptidos denominados CP43 y CP47 debido a sus masas moleculares aparentes, calculadas mediante SDS-PAGE no desnaturizante (Camm y Green, 1980). Sin embargo, existen contradicciones entre las masas moleculares aparentes y las reales, pues la secuencia de aminoácidos derivada a partir de la secuencia de los genes cloroplásticos *psbB* y *psbC*, que codifican para CP43 y CP47 (Bricker, 1990), resulta en una masa molecular real de 52 y 57 kDa, respectivamente. Se cree que ambos polipéptidos están formados por 6 α -hélices transmembranales con la presencia de un gran dominio hidrofílico localizado en el lumen, entre las hélices V y VI (Vermaas y col., 1987 para CP47; Chisholm y Williams, 1988 para CP43). Este dominio ha sido utilizado como epitopo para la obtención de anticuerpos monoclonales en el caso de CP47. Comparaciones efectuadas entre la secuencia aminoacídica derivada de CP43 y CP47, realizadas tanto en cianobacterias (*Synechocystis* 6803) como en algas verdes (*Chlamydomonas*) y plantas superiores (espinaca, guisante, maíz y tabaco), mostraron que la homología de secuencia era superior al 72%. Este hecho parece indicar que existe una gran similitud entre las dos proteínas en organismos verdes y que está en concordancia con que la función de ambas es bastante parecida (Bricker, 1990; Kulkarni, 1993).

Esta homología detectada en la estructura primaria de ambas proteínas puede extenderse también a otros niveles como es el caso de los cromóforos. Varios autores han descrito métodos de purificación de estas proteínas utilizando distintos detergentes (van Dorssen y col., 1987; Akabori y col., 1988; Ghanothakis y col., 1989; Alfonso y col. 1994). Parece que ambas proteínas unen solamente los pigmentos Chl *a* y β -caroteno. Sin embargo, la estequiometría de dichos pigmentos está sometida a controversia. Por ejemplo, Barbato y col. (1991) estimaron 9-11 Chl *a* para CP43 y 9-13 para CP47; Akabori y col. (1988) calcularon 11 y 13 Chl *a* para CP43 y CP47, respectivamente; de Vitry y col. (1984), mediante marcaje radiactivo, calcularon unas 20-25 Chl *a* para ambos polipéptidos; en complejos desprovistos de

CP43 (Dekker y col., 1989) se estimaron de 30 a 40 moléculas de Chl *a* por centro de reacción según el contenido de cyt *b*-559 (Dekker y col., 1990). Otros autores, basándose en el contenido de 2 Pheo *a* por centro de reacción, han publicado valores de 17 a 18 moléculas de Chl en el mismo tipo de complejos (Gounaris y col., 1990). Cálculos del número de moléculas de Chl en base a la cantidad de Q_A fotoreducible en complejos OEC, han determinado de 31 a 35 Chl por centro de reacción (van Leuween y col., 1991). Cuando la concentración de proteína se determinó mediante análisis de aminoácidos y se consideró el peso molecular derivado de la secuencia, se obtuvieron 20 Chl *a* y 5 β -carotenos para CP43 y 21-22 Chl *a* y 4 β -carotenos para CP47 (Alfonso y col., 1994).

La función principal de los polipéptidos CP43 y CP47 es la de actuar como proteínas de antena interna del "core complex", siendo intermediarias en la transferencia de la energía de excitación procedente de la antena LHCII y de las antenas minoritarias y dirigida hacia el centro de reacción. Sin embargo, los datos experimentales en la literatura indican que ambas son fundamentales para la formación de un "core complex" estable. Así, se han aislado mutantes de algas verdes y cianobacterias en los que la incapacidad para acumular CP43 produjo un descenso en la síntesis de CP47 y RC (Dzelkalns y Bogorad, 1989; Carpenter y col., 1989). Estas observaciones indicaron un papel estabilizador para esta proteína en el complejo PSII. Sin embargo, otros autores publicaron la existencia de bajas concentraciones de centros de reacción correctamente ensamblados en estos mutantes (Vermaas y col., 1988a). El papel de CP47 en el ensamblaje del "core complex" parece más evidente, pues, es posible eliminar el polipéptido CP43 mediante agentes caotrópicos sin producir grandes alteraciones en la cadena de transporte electrónico del RC, mientras que para eliminar la proteína CP47 se necesitan procesos mucho más drásticos, sugiriendo que entre CP47 y el RC existe una estrecha relación. De acuerdo con esto, al realizar mutaciones dirigidas en los residuos His de CP47 se produjo una total incapacidad del mutante para crecer fotosintéticamente y los niveles de la proteína D1 del RC se vieron afectados (Shen y col., 1993). Experimentos de mutagénesis en *Synechocystis* realizados por Vermaas y col. (1988b) demostraron que CP47 es necesaria para un correcto ensamblaje del "core complex". Según Alfonso y col. (1994), la comparación entre el espectro de absorción y el de excitación de fluorescencia reveló una alta eficiencia de transferencia de energía, para todas las transiciones de la Chl en ambos complejos de antena. Sin embargo, una comparación similar en la región de los carotenoides indicó una mejor transferencia de energía desde el β -caroteno en el caso de CP47 que en el complejo CP43. Peterson y col. (1990) indicaron que la transferencia de electrones a P680 está afectada por la unión de CP47; sugirieron que la fotooxidación de la Tyr-161 del polipéptido D₁ se produce sólo en complejos con CP47. La Tyr-161, también conocida como Y_Z, es el inmediato donador de electrones del P680.

Además de estas dos funciones, parece que CP47 está relacionada mediante alguno de sus dominios hidrofílicos con la proteína extrínseca de 33 kDa, pues se ha comprobado que

ésta protege a CP47 del ataque con tripsina o la previene del marcaje de sus grupos amino por el reactivo específico NHS-biotin (Bricker y col., 1988). Además, trabajos posteriores indican que CP47 estabiliza también la unión del Mn al PSII (Burnap y Sherman, 1991).

3.2.2. Centro de reacción del fotosistema II (PSII RC)

Podríamos definir el centro de reacción del PSII como la unidad mínima necesaria para llevar a cabo la separación de cargas y catalizar directamente la transferencia de electrones desde el agua a una plastoquinona *in vivo*. Este complejo polipeptídico está compuesto por las proteínas D₁ y D₂ (donde la "D" se refiere a "bandas difusas" en SDS-PAGE teñido con Coomassie), por las subunidades α y β del citocromo (Cyt) *b*-559 y por el producto del gen *psbI*. Unidos a estos polipéptidos se encuentran diversos cofactores como quinonas, microelementos (Fe, Mn, Cl y Ca) y pigmentos como Chl *a*, Pheo *a* y β -caroteno. Los polipéptidos D₁ y D₂ son codificados por los genes cloroplásticos *psbA* y *psbD* y tienen un peso aparente de 32 y 34 kDa, respectivamente. Estas dos proteínas poseen una homología funcional y estructural con las subunidades L y M del centro de reacción de bacterias púrpuras (Deisenhofer y col., 1985; Allen y col., 1987a,b; Chong y col., 1991) y proporcionan el soporte proteico necesario para albergar al donador primario de electrones (P680), al aceptor primario de electrones (Pheo *a*), así como a las quinonas Q_A y Q_B. El Cyt *b*-559 consta de dos polipéptidos de 4,5 y 9 kDa de pesos aparentes, denominados α y β , que coordinan el grupo hemo del Cyt, están codificados por genes cloroplásticos (*psbE* y *psbF*) y se encuentran en relación 1:1. Ambos polipéptidos tienen una única región transmembranal en forma de α -hélice y cada uno de ellos contiene un residuo de His que liga el grupo hemo. La estequiometría del Cyt *b*-559 en diferentes preparaciones de PSII es de uno por RC (Miyazaki y col., 1989; Montoya y col., 1991), aunque hay autores que indican la presencia de dos por RC (Shuvalov y col., 1989). Andersson y col., 1990 estudiaron el papel protector del Cyt *b*-559 durante el proceso de fotoinhibición, ya que en centros de reacción de PSII intactos el grupo hemo puede ser oxidado por P680⁺ a través de una de las Chl monoméricas (Buser y col., 1992), para ser reducido a su vez por el "pool" de plastoquinonas; este proceso de oxidación-reducción puede proteger al donador primario P680 frente a la fotoinhibición. Recientemente, Ortega y col. (1988 y 1995) han propuesto que el Cyt *b*-559 puede proteger al PSII contra la inhibición tanto en el lado aceptor como en el donador, por un mecanismo que engloba procesos ácido-base además de procesos redox. También se ha propuesto que el Cyt *b*-559 pueda funcionar como una bomba de protones transfiriéndolos del estroma al lumen (Arnon y Tang, 1988,).

Estructura de los polipéptidos D₁ y D₂ del PSII RC

El heterodímero formado por D₁ y D₂ constituye la parte esencial del complejo. Estas dos proteínas poseen una homología funcional y estructural con las subunidades L y M del centro de reacción bacteriano (Deisenhofer y col., 1985; Allen y col., 1987a y b; Chong y col., 1991) y constituyen el complejo proteico al que se asocian los cofactores que realizan los procesos fotoquímicos primarios. Por analogía con bacterias, se cree que posee una simetría C₂, tanto de los cofactores asociados como de los polipéptidos con respecto a un eje imaginario perpendicular al plano de la membrana. La relación entre el PSII RC y el RC de bacterias púrpuras ha sido investigada (Michel y Deisenhofer, 1988; Deisenhofer y Michel, 1989), sugiriendo que la duplicación de un único gen ancestral ha conducido a este tipo de estructuras heterodiméricas. La estructura tridimensional del centro de reacción de *Rhodospseudomonas (Rps.) viridis* y *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* ha demostrado que la homología entre las secuencias de aminoácidos incluyen residuos claves para la función de estos complejos proteicos. Los polipéptidos L y M están compuestas por cinco α -hélices, localizadas en la bicapa lipídica y denominadas A,B,C,D y E, más una pequeña α -hélice entre C y D (Michel y Deisenhofer, 1988). El porcentaje de estructura secundaria del complejo PSII RC de plantas se ha determinado mediante FTIR (He y col., 1991), dando como resultado unos valores de 67,2% α -hélices, 9,35% hoja plegada y un 11,1% codos, que son similares a los observados para los centros de reacción de *Rps. viridis* y *Rb. sphaeroides*, desprovistos de la proteína H (Allen y col., 1987a; Deisenhofer y col., 1985). Recientemente y tomando como base la estructura determinada mediante difracción de rayos X del centro de reacción de *Rps. viridis* (Fig. 6) se ha modelado una estructura para el centro de reacción del PSII de *Pisum (P.) sativum* (Ruffle y col., 1992; Fig. 7).

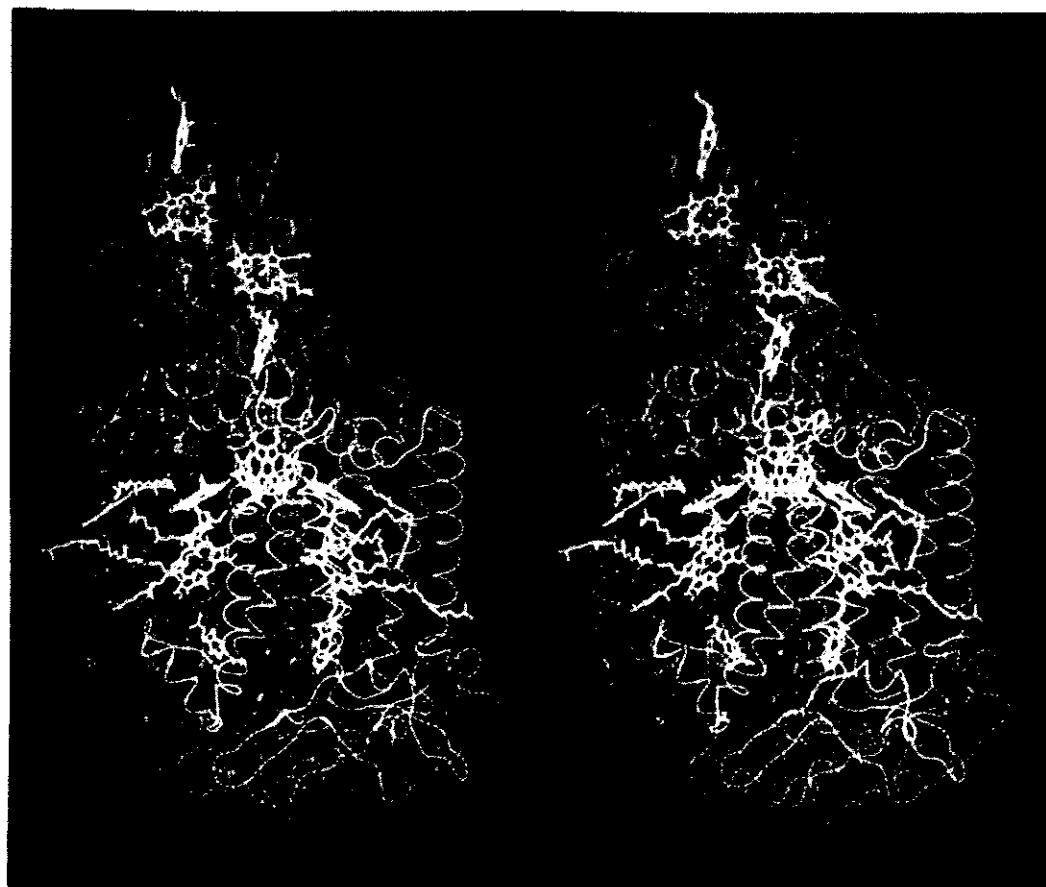


Figura 6: Estructura tridimensional en diagramas de cintas del RC de *Rps. viridis* mostrando las subunidades L, M, H y el citocromo, junto con los pigmentos y cofactores.

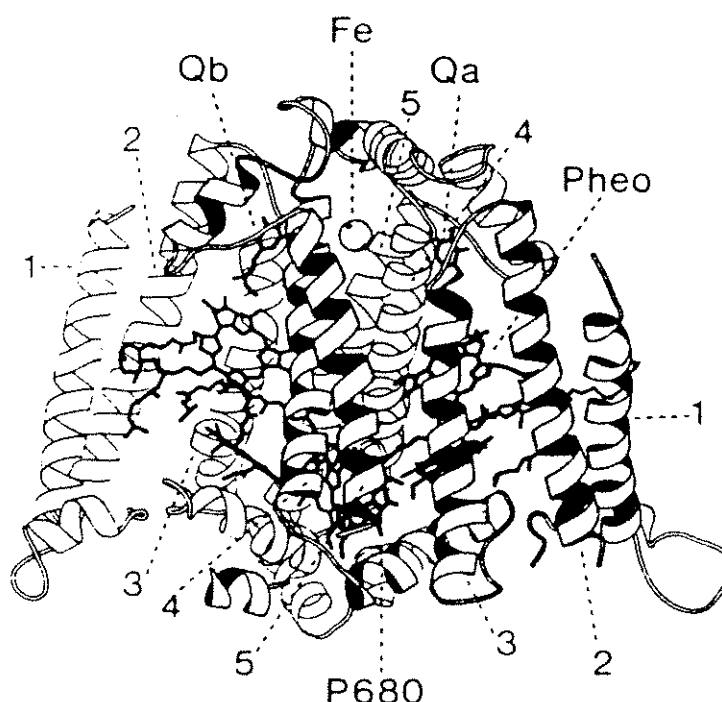


Figura 7: Esquema modelado por ordenador de las proteínas D₁ y D₂ del PSII RC de *P. sativum* a partir de las coordenadas cristalográficas del RC de *Rb. sphaeroides*. Las α -hélices de cada una de las proteínas son numeradas del 1 al 5, junto con los pigmentos y cofactores asociados.

Pigmentos y cofactores del PSII RC

El centro de reacción del PSII fue aislado por primera vez por Nanba y Satoh (1987). La estequiometría de pigmentos de este primer centro de reacción fue de 5 Chl *a*, 2 Pheo *a* y 1 β -caroteno. Este complejo no contenía quinonas ni Chl *b*. Más tarde, Barber y col. (1987) determinaron por absorción atómica que este centro de reacción contenía un átomo de Fe al igual que el centro de reacción bacteriano, pero carecía de Mn. Posteriormente, confirmaron la existencia de este átomo de Fe, mediante técnicas de EPR (Telfer y col., 1988). Sin embargo, estos mismos autores concluyeron más tarde que este cofactor se perdía durante la preparación del complejo. El contenido de pigmentos de esta partícula es aún un tema de controversia, así las primeras preparaciones de RC aislado contenían 4-5 Chl *a* y 1 β -caroteno por 2 Pheo *a* (Nanba y Satoh, 1987; Barber y col., 1987) pero más recientemente, se han aislado preparaciones con un contenido de 6-8 Chl *a* y 2 β -carotenos por 2 Pheo *a* (Kobayashi y col., 1990; Gounaris y col. 1990; van Leeuwen y col. 1991; Montoya y col., 1991). Montoya y col. (1991) propusieron que la diferencia de estequiometrías se debe a una

variación del tiempo de lavado del RC en la columna cromatográfica; un lavado extensivo provocaría la pérdida de 2 Chl *a* y un β -caroteno que estarían hipotéticamente más al exterior del RC. Yruela y col. (1994) pusieron a punto un método de purificación de RC, obteniéndose un complejo de 4 Chl *a*, 1 β -caroteno y 1 Cyt *b*-559 por 2 Pheo *a*. En nuestro laboratorio (Aured y col., 1994; Chang y col., 1994; Pueyo y col., 1995) se ha sugerido que la diferencia de estequiometrías está provocada muy probablemente por la presencia de CP47 contaminante.

Organización de los pigmentos y cofactores del PSII RC

Se piensa que la organización de los pigmentos y demás cofactores del PSII RC es similar a la del RC bacteriano, debido a que las secuencias de los aminoácidos donde se encuentran el donador y aceptor primarios y la zona de Q_A y Fe no hemínico permanecen muy conservados en ambos centros de reacción (Michel y Deisenhofer, 1988).

Los pigmentos del RC bacteriano se encuentran relacionados por una simetría C_2 , formando dos posibles rutas para el transporte electrónico; esto significa que mediante una rotación de 180° alrededor de su eje de simetría se obtiene una organización de pigmentos similar, pero no idéntica. Cada una de las ramas simétricas se denomina A y B; sólo la rama A es fotoquímicamente activa (Allen y col., 1987b). El donador primario, formado por un dímero de Bchl, sería el punto de partida de la transferencia electrónica inducida por la luz y llevada a cabo a través de la membrana. La reacción comienza cuando un fotón de longitud de onda adecuada o su excitón correspondiente inciden sobre el donador primario y éste es llevado a su primer estado singlete excitado, a partir del cual un electrón es transferido a Bpheo_A probablemente a través de una Bchl accesoria. Este proceso ocurre en un tiempo de 3 ps a temperatura ambiente (Fleming y col., 1988; Breton y col., 1986), pero puede ser menor cuando el proceso se realiza a temperaturas próximas a los 0°C . Desde Bpheo_A, el electrón es transferido a Q_A con una vida media de 200 ps a temperatura ambiente (Kirmaier y Holten, 1987; Holzappel y col., 1990). En el transporte de un electrón desde el donador primario hasta Q_A , éste ha atravesado casi toda la membrana. En un tiempo de unos 100 ms el electrón va desde Q_A hasta Q_B , esta última capta dos electrones y dos protones formando Q_BH_2 que se separa del centro de reacción y será sustituida por otra quinona del "pool" existente en la membrana.

La organización del PSII RC se supone que es bastante similar a esta organización bien conocida en bacterias. Además, se ha demostrado mediante espectroscopia Raman que solamente una de las Pheo *a* es reducida tras la separación de cargas y que uno de los grupos carboxilo con los que interacciona el anillo porfirínico pertenece a un aminoácido conservado en el centro de reacción bacteriano (Möene-Loccoz y col., 1989). Además, el estudio de los procesos fotoquímicos primarios en el complejo PSII RC de plantas ha revelado tiempos de

vida para la separación de cargas muy similares al RC bacteriano y la ΔG de la reacción es dominada por el componente entrópico que con un descenso de la temperatura llega a hacerse menos negativo de modo bastante lineal, como sucede en el RC bacteriano (Wasilewski y col., 1989; Mimuro y col., 1988; Booth y col., 1991; Roelofs y col., 1991; Woodbury y Parson, 1984). Por consiguiente, el donador primario del PSII (P680) podría estar formado por un dímero de Chl *a* con el resto de los pigmentos formando dos vías de transferencia electrónica, como en el RC bacteriano. Una diferencia está en que los residuos que actúan como ligandos para las Bchl *a* monoméricas en el caso del RC bacteriano no parecen conservarse en el PSII RC. Además, los donadores de electrones al donador primario son distintos, la Tyr-161 (Z) a P680⁺ en el RC del PSII y un Cyt en bacterias.

El donador primario P680

La estructura de P680 ha sido sometida a gran debate debido a su alto potencial redox en comparación con el PSI y el RC bacteriano, necesario para llevar a cabo el proceso de oxidación del agua en el PSII. Las His que mantienen unidas la Bchl del donador primario en el RC bacteriano, se conservan en el PSII RC (Trebst, 1987; Michel y Deisenhofer, 1988). En un principio se pensó que el P680 era un dímero por la comparación de su espectro diferencial *in vivo* y los espectros de EPR de monómeros y dímeros de Chl *a* en solventes orgánicos (van Gorkom y col., 1974). Por otra parte, Davis y col., (1979) mostraron que las propiedades ópticas, redox y magnéticas de la Chl *a* monomérica podían variar según el solvente utilizado, así, propusieron que P680 era un monómero ligado, cuyas características estaban controladas por el ambiente proteico. Posteriormente, Den Blanken (1983) presentó datos de ADMR que indicaban que el donador primario del PSII tenía una estructura dimérica en su estado fundamental singlete, aunque el estado triplete (producido por la recombinación del estado P680⁺Pheo⁻) se podía localizar en una única Chl *a*. Estos datos fueron posteriormente confirmados por medidas de EPR del complejo PSII orientado en estado triplete (Rutherford, 1986); este estado triplete fue localizado en una Chl *a* monomérica orientada casi paralela al plano de la membrana.

Donadores secundarios de electrones del P680: Z y Mn

La principal diferencia entre los centros de reacción bacteriano y del PSII está en que este último obtiene electrones de la fotólisis del agua mientras que en el RC bacteriano el donador primario recupera su electrón a partir de un citocromo. Los donadores secundarios del P680 son los compuestos denominados Z y D e identificados como la Tyr-161 de D₁ (Debus y col., 1988a; Metz y col., 1989) y la Tyr-160 de D₂ (Barry y Babcock, 1987; Debus y col., 1988b; Vermaas y col., 1988a, b). Aunque Z y D se encuentran en el complejo PSII RC no

hay evidencia de que sean activos en esta preparación aislada. Z está asociado con los cuatro átomos de Mn (conocido como "reloj" de evolución de oxígeno), constituyendo el denominado dominio oxidante del PSII, que cataliza la ruptura del agua y libera electrones que a través de Z reducen al donador primario P680. La función de D no está todavía muy clara, pues sólo reduce al $P680^+$ en condiciones especiales, por lo que se cree que no es el reductor habitual de P680. El complejo tetramérico de Mn es indispensable para la ruptura del agua. En un principio se pensó que la proteína extrínseca de 33 kDa era la responsable de la unión del Mn al RC, pero se demostró que en ciertas condiciones experimentales el complejo seguía desprendiendo oxígeno sin dicha proteína. Posteriormente, autores como Coleman y Govindjee (1987) y Dismukes (1988) estudiaron esta unión, concluyendo que el complejo tetramérico está unido a las proteínas D_1 y D_2 , aunque otros trabajos lo localizan sólo en D_1 (Metz y col., 1985; Metz y col., 1986; Seibert y col., 1989; Tamura y col., 1989; Svensson y col., 1990).

Aceptores de electrones del P680

El aceptor primario de electrones de P680 es la Pheo activa del centro de reacción. Funciona como primer aceptor intermediario en el denominado lado reductor del PSII, integrado por las dos quinonas, Q_A y Q_B y el átomo de Fe no hemínico que se supone localizado entre ellas. La Pheo se encuentra en el espacio intermembranal y es el primer aceptor del electrón procedente de P680 en estado excitado ($P680^*$), produciéndose la separación de cargas que origina el par de radicales $P680^+Pheo^-$. Este cofactor facilita un desplazamiento rápido y efectivo del electrón hacia Q_A , resultando en un estado estable $P680^+Q_A^-$. A partir de comparaciones con el RC bacteriano se ha especulado con el posible papel del residuo Tyr-255 en D_2 , análogo al residuo Trp-250 en M, el cual podría actuar como un puente, facilitando mediante su anillo imidazol la transferencia electrónica entre Pheo y Q_A (Coleman y Youman, 1990). La plastoquinona Q_A está muy próxima al lado estromal de la membrana tilacoidal, una vez que el electrón se encuentra en esta posición, ha atravesado virtualmente la membrana tilacoidal. Akabori y col. (1988) mostraron que la quinona Q_A se pierde del RC durante su purificación y que la absorción a 820 nm desaparece simultáneamente. Hanson y col. (1988) y Mathis y col. (1989) detectaron cambios de absorción a 820 nm con cinética rápida de relajación en centros de reacción extraídos con Tritón X-100, debido a la formación del triplete 3P680 en ausencia de Q_A .

El Fe no hemínico del RC del PSII se supone que está localizado, al igual que en el RC bacteriano, entre las dos quinonas y que se encuentra ligado por cuatro residuos His. Su función en la transferencia electrónica no está del todo clara, pero se ha podido comprobar en el RC bacteriano que en ausencia de este catión divalente, la transferencia electrónica entre Q_A y Q_B se reduce a la mitad y el grado de transferencia de electrones entre Bpheo y Q_A decrece en un factor 20, lo que produce una alteración del rendimiento cuántico de la separación de

cargas. En bacterias fotosintéticas, el Fe no hemínico puede ser sustituido por otros cationes divalentes sin alterar significativamente la actividad (Debus y col., 1986; Kirmaier y col., 1986). En el PSII este átomo metálico se encuentra ligado a un anión de bicarbonato no encontrado en el centro de reacción bacteriano (Govindjee y van Rensen, 1978; El-Shintinawy y col., 1990; Klimov y col., 1995a, b).

El último aceptor del electrón proveniente de P680 es Q_B . Esta quinona se reduce doblemente, como sucede en bacterias, para posteriormente desprenderse del PSII y dirigirse al Cyt b_6f , siendo sustituida por otra quinona del "pool" presente en la membrana tilacoidal. El lugar de unión de esta quinona coincide con el de los herbicidas como DCMU y la atrazina, que inhiben la fotosíntesis interrumpiendo el transporte electrónico. Esta unión es muy sensible al ambiente proteico en el que se encuentra la quinona, por lo que, se han podido aislar mutantes resistentes a herbicidas.

3.2.3. Proteínas extrínsecas

Existen tres proteínas extrínsecas del PSII, de 33, 24 y 17 kDa, aunque en las cianobacterias sólo se encuentra la de 33 kDa. Las tres proteínas podrían estar en una estequiometría de 1:1:1 con el PSII (Enami y col., 1991), aunque recientes medidas utilizando detección inmunológica indican que la estequiometría es de dos proteínas de 33 kDa por cada centro de reacción (Xu y Bricker, 1993). El polipéptido de 33 kDa protege al complejo de Mn y mantiene una configuración que optimiza la eficiencia catalítica de la oxidación del agua; es codificada por el gen nuclear *psbO*. Esta proteína posee un enlace disulfuro esencial para mantener su propia configuración, parece unirse directamente a zonas hidrofílicas de otras proteínas del PSII (Burnap y Sherman, 1991) y puede ser fácilmente desprendido del complejo del PSII mediante tratamiento de las muestras con altas concentraciones de Tris a pH básico (Akerlund y Jansson, 1981), $CaCl_2$ o altas concentraciones de urea (Miyao y Murata, 1984).

Las otras dos proteínas, de 24 y 17 kDa, también son producto de genes nucleares y se extraen del complejo PSII por tratamiento con altas concentraciones de NaCl. En ausencia de estos polipéptidos son necesarias altas concentraciones de Ca^{2+} y Cl^- para mantener la actividad de desprendimiento de oxígeno. La proteína de 24 kDa mejora la unión de Cl^- a su sitio de unión en el PSII. Hasta el momento, se desconoce el anclaje de estas proteínas, pues no se sabe exactamente si se unen a proteínas intrínsecas de membrana del PSII o si tienen puntos de unión con la proteína de 33 kDa (Brudvig y col., 1989).

4. Procesos fotofísicos/fotoquímicos

El complicado proceso de almacenaje de la energía electromagnética procedente de la luz (fotones) por los organismos fotosintéticos, tiene como primer paso la captura de la luz y la transferencia de la energía de excitación. Esto lo realizan los complejos de antena, que transfieren la energía de excitación al centro de reacción donde se produce el proceso fotoquímico. Los elementos involucrados en estos procesos son los pigmentos fotosintéticos, Chls y carotenoides, que se encuentran unidos no covalentemente a los complejos proteicos. Esta transferencia de energía al centro de reacción debe ser rápida pues sino podría disiparse por procesos competitivos como la fluorescencia o procesos no radiativos. De hecho, la transferencia entre pigmentos es rápida (del orden de varios picosegundos) en comparación con el tiempo de vida del estado singlete-excitado (varios nanosegundos), lo que justifica que casi toda la luz absorbida llega al centro de reacción.

4.1. Excitación de las moléculas de pigmentos

Cuando la energía electromagnética es absorbida por una molécula, se produce una redistribución de sus electrones. Normalmente estos electrones se encuentran ocupando orbitales moleculares distribuidos en los niveles de menor energía posible según el principio de exclusión de Pauli. Como consecuencia, en cada orbital no puede haber más de dos electrones y ambos están apareados (los espines de los dos electrones son de signo opuesto). En el momento en que se produce la absorción de un fotón por parte de un cromóforo, uno de los electrones es promovido a un nivel energético superior, si en este proceso el número de espín del electrón no cambia, es decir, los pares de electrones en el orbital molecular tienen spin opuesto, se produce un estado excitado apareado de espín (singlete), mientras que si el número de spin del electrón cambia o lo que es lo mismo, los spines de los electrones en el orbital molecular están alineados, se produce un estado excitado desapareado de spin (triplete) (Birks, 1970). Los estados excitados tripletes tienen un tiempo de vida bastante mayor que los estados excitados singletes y tienen menor energía. La conversión entre los estados singlete y triplete es denominada "cruce entre sistemas".

La probabilidad de que la absorción de un fotón se lleve a cabo es una propiedad cuántica de la molécula; una forma de medir dicha probabilidad es mediante el coeficiente de extinción de la molécula en función de la energía (o longitud de onda). Desde un punto de vista evolutivo, ha sido fundamental para los organismos fotosintéticos desarrollar mecanismos con los que sea posible aumentar la capacidad de absorción de los pigmentos asociados con el centro de reacción. Las proteínas de antena conectadas al centro de reacción pueden realizar

este proceso de dos formas: la primera consiste en incrementar el número de moléculas de antena por centro de reacción, ya que la absorción es aditiva y la segunda en un ensanchamiento de las bandas de absorción, incrementando así la probabilidad de captar fotones de energías diferentes. El ensanchamiento de bandas se produce, incluso, en moléculas aisladas ya que la excitación electrónica puede ir acompañada de transiciones entre niveles de energía rotatorios y vibratorios. Así, para una molécula compleja como la clorofila, el ensanchamiento de las bandas es mucho mayor, ya que gran número de transiciones individuales se suman, resultando una banda continua de energía (sobre 50 nm o más). También influyen otros factores en el ensanchamiento, como las interacciones con moléculas vecinas ya sean del solvente o de la membrana o las interacciones con la matriz proteica; además, estas bandas pueden sufrir desplazamientos en los máximos de absorción debido a efectos eléctricos del medio (Davis y col., 1981; Ward y col., 1984; Maggiora y Maggiora, 1984).

4.2. Transferencia de la energía de excitación

La presencia de sistemas de antena de gran tamaño mejora la captación de energía electromagnética varios cientos de veces, pero al mismo tiempo, impone la condición de que la transferencia de la energía de excitación debe realizarse de forma rápida y eficiente entre las distintas moléculas de cromóforos que integran la antena. Existen diferentes mecanismos por los que se produce este fenómeno: excitones deslocalizados, mecanismo de resonancia inductiva (mecanismo Förster) y otros más complejos.

Un excitón consiste en un electrón deslocalizado y su hueco asociado (hueco formado en el orbital correspondiente al estado fundamental). El excitón más simple se da cuando tanto el electrón como el hueco se forman en la misma molécula o en el mismo cromóforo, es lo que se denomina excitón molecular. Dichos excitones pueden estar localizados, es decir, hallarse restringidos a la región de orbitales moleculares de la misma molécula y pueden estar en estado singlete, donde el momento angular del espín del electrón es igual al que tenía antes de la absorción del fotón, es decir todos los electrones se encuentran apareados, o en estado triplete, donde los electrones se encuentran desapareados. Cuando los cromóforos están muy cercanos unos a otros, las interacciones entre ellos tienden a deslocalizar el electrón. En este caso el excitón reside en un conjunto de orbitales moleculares de todos los cromóforos que participan en la interacción. Los orbitales supramoleculares en los que reside un excitón deslocalizado son diferentes de los propios de las moléculas del cromóforo individual. Este tipo de interacciones, denominadas excitónicas, conducen a desdoblamientos de energía que provoca ensanchamientos de la banda de absorción, e incluso en algunos casos a resolverse en varios componentes (Scherz y Parson, 1984).

La deslocalización de un excitón, en sí misma, no es un ejemplo de transferencia de la energía de excitación porque ésta pertenece a todos los cromóforos que interaccionan, pero este proceso constituye una parte importante del mecanismo por el cual la energía de excitación alcanza los centros de reacción. Además, hay una amplia evidencia de que este fenómeno suceda en complejos de antena fotosintéticos entre grupos de 2,3...7 o más Chls y otras moléculas de pigmentos. Las interacciones son mayores cuanto más parecidas son las moléculas participantes y las energías de sus orbitales (por ejemplo Chl *a* y Chl *b*, donde las energías son similares).

Existen dos mecanismos diferentes mediante los que tiene lugar la transferencia de energía, el mecanismo Dexter o de intercambio y el mecanismo Förster.

El mecanismo Dexter es relevante sólo para moléculas que se encuentran fuertemente asociadas, ya que requiere el intercambio de dos electrones entre los dos pigmentos y por tanto, cierto solapamiento de sus funciones de onda correspondientes. Este mecanismo no parece jugar un papel importante en los procesos de transferencia de energía que tienen lugar en las antenas, aunque podría ser responsable de la transferencia de energía desde los carotenoides a la clorofila (Cogdell y Frank, 1987).

El mecanismo por el cual la energía de excitación va de un complejo de pigmento a otro, recorriendo distancias mayores a 2 nm, es el denominado mecanismo Förster (1965) o de resonancia inductiva. Este mecanismo recuerda a un sistema de péndulos acoplados. La interacción entre un pigmento electrónicamente excitado y sus vecinos en el estado fundamental inicia una transición ascendente en las cercanías del pigmento aceptor a través de una interacción coulombica. En la Fig. 8 se muestra el esquema del mecanismo Förster. El dipolo de transición asociado a la desexcitación de una molécula se encuentra acoplado a una oscilación en simpatía con otra molécula vecina, causando la excitación de esta última. La primera molécula dona su energía de excitación directamente a la segunda. Como en este tipo de interacción participan los momentos inducidos, la magnitud de la interacción decae con el inverso de la sexta potencia de la distancia (d^6), entre el donador y el aceptor. Sin embargo, para la deslocalización de un excitón la energía de interacción cae a d^3 . Debido a esta dependencia de la distancia que presenta la tasa de transferencia de energía, un hecho positivo sería empaquetar densamente los pigmentos dentro de las antenas, reduciendo por tanto, las distancias centro-centro entre los pigmentos vecinos. Pero este empaquetamiento no debe ser demasiado denso ya que puede formarse la configuración denominada "sandwich", que aumentaría la fuerza del oscilador de la banda excitónica de mayor energía lo que produciría un "quenching" de la fluorescencia y por lo tanto una pérdida de la energía de excitación. El mecanismo Förster, aunque es profundamente dependiente de la distancia es, sin embargo, una interacción de larga distancia. Para cromóforos como la clorofila se ha calculado que tiene una distancia de acción entre 8 y 10 nm (Knox, 1977). Este rango no se ha determinado para complejos de pigmentos-proteína con gran cantidad de cromóforos. Un punto importante es

que en todos estos mecanismos de transferencia de energía, el electrón y su hueco asociado se encuentran en orbitales localizados en la misma región del espacio en la molécula o grupo de moléculas. La separación espacial de las cargas no se producirá hasta que la energía de excitación no alcance el centro de reacción.

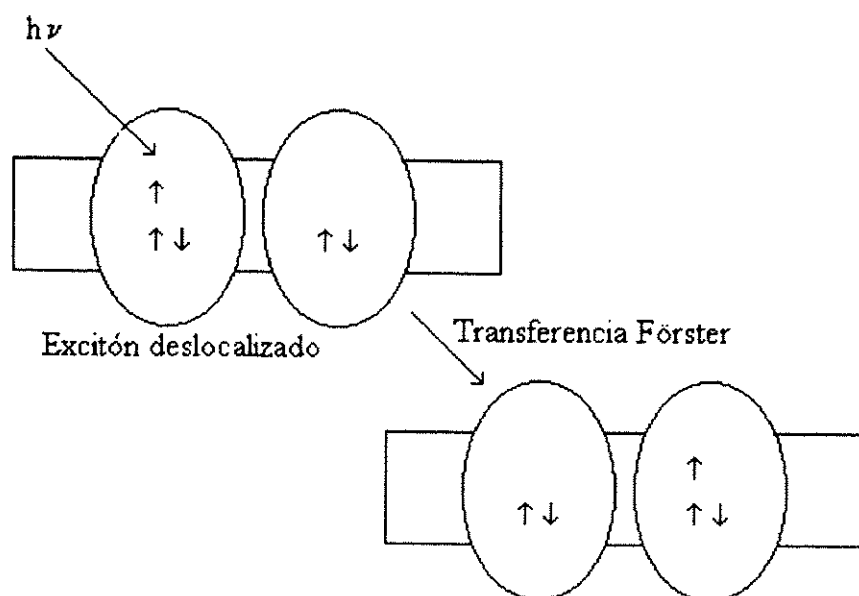


Figura 8: La energía de excitación migra dentro de la antena por el mecanismo de resonancia inductiva.

4.3. Separación de cargas en el centro de reacción

La separación de cargas que se da en los centros de reacción fotosintéticos es una reacción redox, en la cual un electrón del donador se transfiere a un orbital molecular desocupado en la molécula del aceptor. Las moléculas excitadas son mejores donadores de electrones que las no excitadas pues es necesaria menos energía para eliminar el electrón del orbital más energético. Las moléculas excitadas son también buenos aceptores debido al hueco disponible en el orbital fundamental.

Todos los centros de reacción conocidos contienen moléculas de Chl o Bchl que donan electrones tras su excitación, esto significa que existen buenos aceptores de electrones en su proximidad. En todos los casos conocidos el aceptor es o bien otra clorofila (Bchl) o una feofitina (Pheo). Si el aceptor y el donador son el mismo tipo de molécula será difícil conocer si el estado excitado previo a la separación de cargas ocurre en una u otra molécula o si el excitón se deslocaliza entre ambas. Como resultado de la separación de cargas, el electrón y el hueco están por primera vez separados y localizados en espacios moleculares diferentes. Para

evitar que tenga lugar la recombinación del hueco y el electrón, que disiparía la energía y evitaría cualquier posibilidad de almacenarla, el aceptor primario transfiere el electrón rápidamente a aceptores secundarios, siendo reducido el donador primario por donadores secundarios (Parson y Holten, 1986; Kirmaier y Holten, 1987).

5. Cianobacterias

5.1. Origen y organización estructural

A lo largo de la historia, estos organismos han sido denominados de varias formas: cianobacterias, cianofíceas, cianofitas o algas verde-azuladas (Castenholz y Waterbury, 1989). A partir de análisis bioquímicos y de microscopía electrónica, se pudo determinar que las cianobacterias son organismos procariotas, es decir desprovistos de núcleo. En la naturaleza se comportan como algas, poseen Chl *a* y pueden llevar a cabo los procesos fotosintéticos.

Podemos definir las cianobacterias como organismos procariotas fotoautótrofos aeróbicos que pueden combinar las capacidades metabólicas de producción fotosintética de oxígeno y de fijación de nitrógeno. Constituyen el grupo más amplio y diversificado de los procariotas (Stanier y col., 1977) y tienen también como rasgo característico la naturaleza de los pigmentos que constituyen su aparato fotosintético, que posee Chl *a* y ficobiliproteínas como componentes mayoritarios.

Las primeras formas unicelulares y filamentosas, atribuidas a cianobacterias, fueron encontradas en sedimentos rocosos formados hace 3.500 millones de años. Castenholz (1992) concluyó que los fósiles de cianobacterias son extremadamente similares morfológicamente a las cianobacterias actuales, lo que suscita preguntas sobre la velocidad de los procesos de evolución de estos organismos. Fueron los primeros organismos capaces de utilizar el agua como fuente de electrones en la fotosíntesis. Esto supuso un hito crucial en la historia de la vida, ya que fue el origen de la transformación de la atmósfera anaeróbica inicial en la atmósfera aeróbica actual. Muchas cianobacterias también contribuyen en gran medida a la aportación de nitrógeno a los habitat terrestres y acuáticos mediante su capacidad de fijar nitrógeno (Fay, 1981).

En las cianobacterias existen tres tipos de membranas estructural y funcionalmente diferentes (Fig. 9): la membrana externa, la membrana plasmática y la membrana tilacoidal. Las cianobacterias están rodeadas normalmente por glicocálix, enriquecido en carbohidratos, con un aspecto fibroso y cuya función es la de proteger a la célula contra la desecación; en un ambiente líquido también funciona como retardador de la pérdida de solutos. El glicocálix está asociado fuertemente con la membrana externa. Un espacio periplasmático entre la membrana

externa y la plasmática es dividido por una capa de peptidoglicanos creando así dos espacios, interno y externo, con dos funciones distintas. La capa de peptidoglicanos tiene una función protectora y por su rigidez determina la forma de la célula. Las membranas plasmática y tilacoidal comparten muchos complejos supramoleculares, pero los fotosistemas están restringidos a la membrana tilacoidal. Mediante microscopía electrónica se han detectado posibles conexiones entre ambas membranas pero no se observa una continuidad membranar. Muchos autores pensaban que los tilacoides de cianobacterias podían estar físicamente unidos a la membrana citoplasmática, como sucede en el caso de las bacterias púrpuras. Sin embargo, estudios de micrografía de congelación ultrarápida no llegaron a la misma conclusión, atribuyendo los anteriores datos a artefactos en la fijación de la muestra para medidas de microscopía electrónica, debido a la lenta e incompleta estabilización de las membranas.

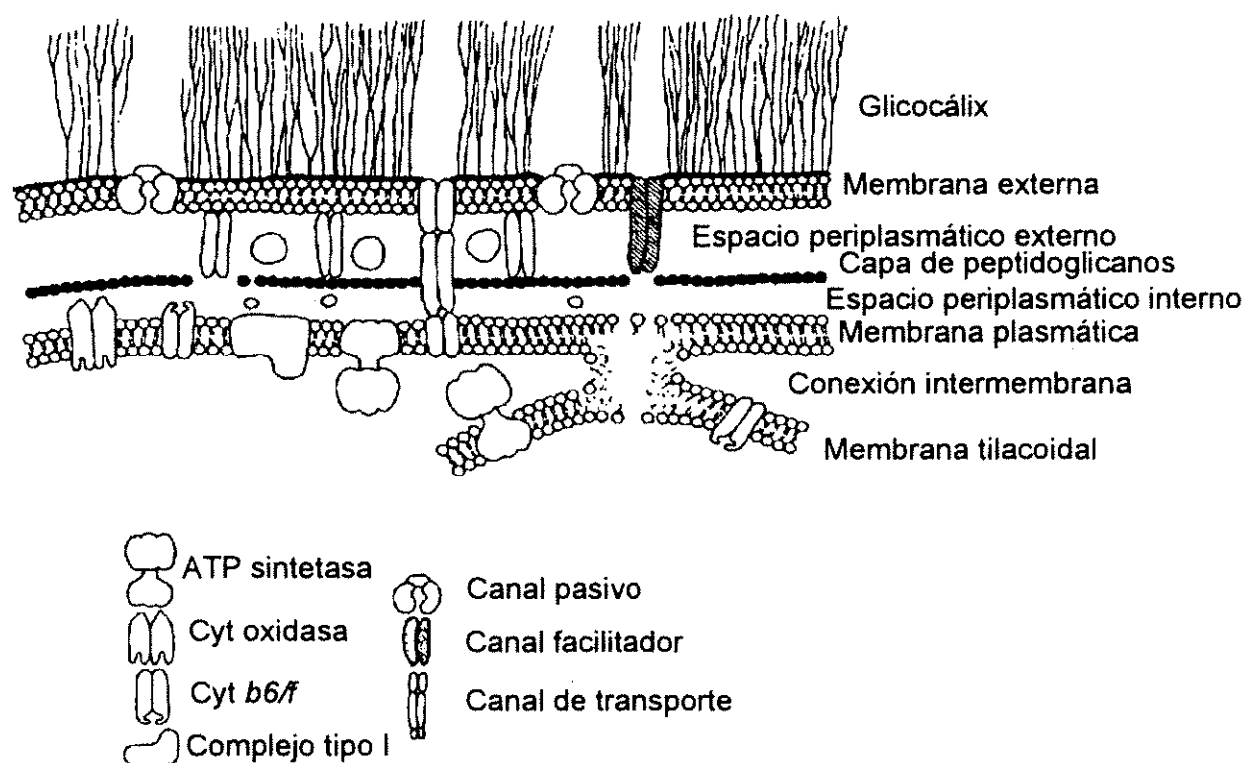


Figura 9: Modelo de la superficie exterior de una cianobacteria.

5.2. El fotosistema II de cianobacterias

El aparato fotosintético de las cianobacterias, como ya se ha comentado anteriormente, se encuentra localizado en las membranas intracitoplasmáticas, denominadas tilacoides (Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Trench, 1982), que son lamelas dispersas en el citoplasma. La organización de los tilacoides varía considerablemente y depende de la especie,

estado fisiológico y condiciones de cultivo, por ejemplo en algunas especies las membranas tilacoidales están ordenadas en capas concéntricas desiguales mientras que en otras se encuentran en forma curvada. Estas estructuras pueden alterarse por carencias de nutrientes como nitrógeno, carbono, fósforo y hierro (de Vasconcelos y Fay, 1974; Miller y Holt, 1977; Stevens y col., 1981; Hardie y col., 1983).

La función, composición y estructura del aparato fotosintético de las cianobacterias es muy similar al de las plantas superiores, poseen dos fotosistemas de composición casi idéntica a las plantas. La Fig. 10 representa un modelo de la disposición de los fotosistemas a lo largo de la membrana tilacoidal de cianobacterias. La mayor diferencia se encuentra en el contenido de los principales pigmentos fotosintéticos: las cianobacterias contienen bilinas mientras que las plantas superiores tienen Chl *b*. Sin embargo, ambos organismos contienen Chl *a* y carotenoides. Las membranas de cianobacterias, libres de ficobilisomas tras los lavados correspondientes, presentan un sistema membranar de composición más simple que los tilacoides de plantas superiores. Mediante la técnica de "cross-linking", llevada a cabo en *Synechocystis* 6803, se pudo obtener un modelo topográfico del PSII de cianobacterias. La composición del complejo responsable de la producción de oxígeno, tanto en plantas como en cianobacterias, consiste en las proteínas de 47 kDa (CP47) y 43 kDa (CP43), D1, D2, la proteína extrínseca de 33 kDa y las dos subunidades, α y β , del Cyt *b*-559. En plantas superiores existen, además, dos proteínas extrínsecas de 24 y 17 kDa, que no aparecen en el PSII de cianobacterias, aunque en éstas aparecen otras dos proteínas extrínsecas de 9 kDa (ó 12 kDa) y el Cyt *c*-550. Tanto plantas como cianobacterias presentan varios polipéptidos de baja masa molecular (≤ 10 kDa) cuyo papel en la oxidación del agua es desconocido por el momento.

5.3. Cianobacterias termófilas

Las cianobacterias termófilas crecen en la naturaleza en aguas termales, cuyos valores de temperatura oscilan entre 40 y 95°C. Las bases físico-químicas de la estabilidad de los compuestos y de las estructuras celulares a estas temperaturas tan elevadas no están bien determinadas. En poblaciones naturales, las máximas velocidades de fotosíntesis se dan a la temperatura óptima de crecimiento (Brock, 1967), mientras que estudios similares realizados en laboratorio parecen indicar que estas velocidades se producen en un rango más amplio de temperaturas, siempre que tengan un tiempo suficiente para la aclimatación. La temperatura óptima puede ser modificada por otros factores externos como la intensidad de luz.

Se ha sugerido que el aparato fotosintético de estas cianobacterias termófilas es el componente más sensible al calor (Brock, 1967), aunque las cianobacterias termófilas muestran altas velocidades de evolución de oxígeno a temperaturas que inhiben completamente dicha

actividad en plantas superiores (Hirano y col., 1981; C. Andrés, Tesis de Licenciatura, 1995). Como se ha indicado, es posible que el primer paso en la inactivación térmica del PSII sea la desnaturalización de la proteína de 33 kDa, con lo que el complejo de Mn queda expuesto y se pierden en el medio, de manera que el sistema pierde la actividad de oxidación del agua. La proteína extrínseca de 33 kDa de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* conserva su conformación activa a temperaturas superiores a 70°C y solamente la empieza a perder a 95°C, mientras que la estructura secundaria de la proteína correspondiente de espinaca se ve notablemente afectada a 50°C (Motoki y col., 1992).

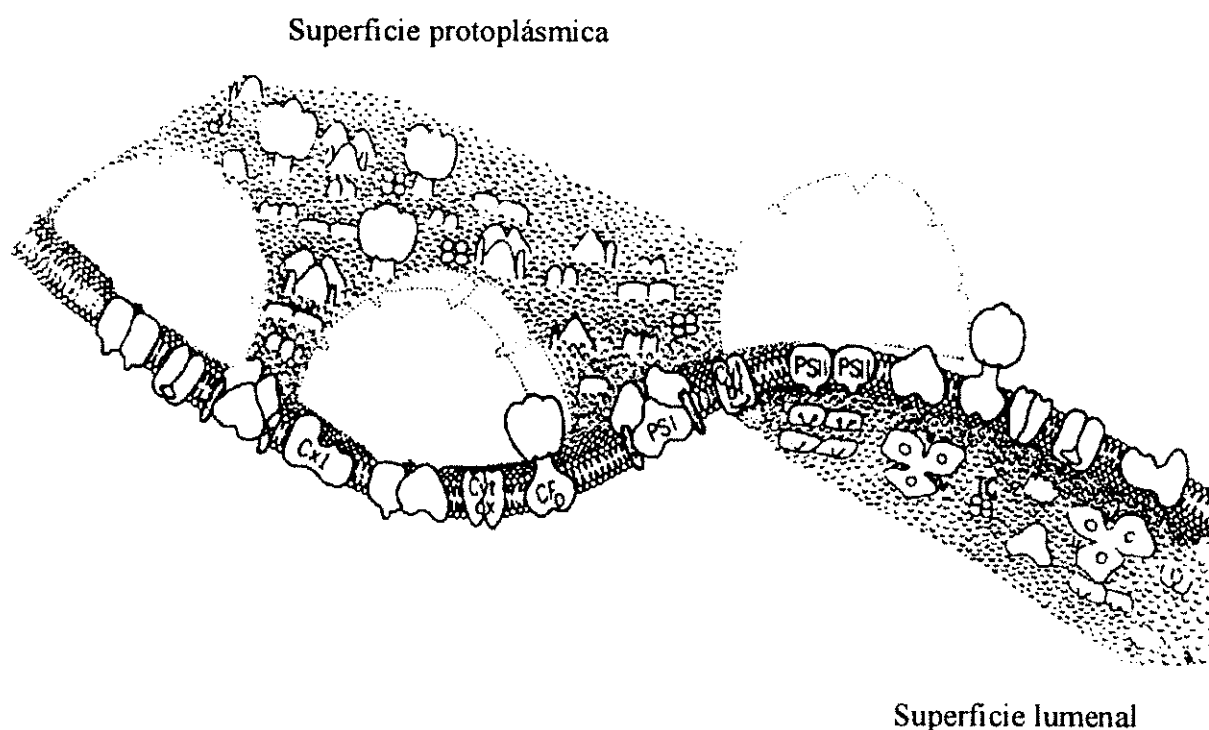


Figura 10: Modelo estructural de las membranas fotosintéticas de una cianobacteria.

6. Planteamiento y Objetivos del trabajo

Existen publicaciones anteriores a este trabajo, referentes a la preparación o purificación de partículas más o menos complejas del PSII de cianobacterias. Binder y col. (1976) fueron los primeros en poner a punto el método de obtención de membranas tilacoidales activas de cianobacterias, el cual ha sido utilizado como base en la mayoría de los trabajos posteriores (Stewart y Bendall, 1980). Más tarde, estos últimos autores (1979, 1981) consiguieron partículas enriquecidas en PSII con una alta actividad de evolución de oxígeno, en las que se llegó a determinar el contenido de Mn y su relación con una posible inactivación

del complejo. Ke y col. (1982) aislaron y caracterizaron ópticamente el complejo OEC del PSII de la cianobacteria termófila *P. laminosum*, concluyendo que esta partícula no sólo conserva toda la fotoquímica del PSII sino que también muestra una alta actividad de evolución de O_2 . Partiendo de membranas tilacoidales, Yamagishi y Katoh (1983) purificaron parcialmente el PSII RC por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida con digitonina y determinaron la composición polipeptídica del complejo aislado. Posteriormente, estos mismos autores determinaron que el complejo no sólo puede llevar a cabo la separación primaria de cargas sino también la estabilización de las mismas (Yamagishi y Katoh, 1985). De esta forma se empezó a conocer de forma más precisa algunas propiedades del PSII RC de cianobacterias pero aún no se había llegado a describir ningún método de purificación.

Bowes y col. (1983) purificaron partículas de PSII de *P. laminosum* utilizando n-dodecil β -D-maltósido (DM) como detergente para estabilizar la actividad del material solubilizado previamente con LDAO. Esta suspensión es centrifugada durante 20 h en un gradiente de sacarosa; la fracción obtenida presenta una actividad de oxígeno del orden de $1.900\text{--}2.400 \mu\text{mol } O_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, y contiene 3-4 átomos de Mn por RC y unas 50 Chl de antena. Otro detergente utilizado en la purificación del complejo OEC fue SB12, el cual proporciona gran selectividad ya que consigue extraer un 95% del PSII (Schatz y col., 1984; Frei y col., 1988).

En 1985, Pakrasi y col. hacen un estudio sobre la organización de proteínas pigmentadas en el complejo OEC de *Anacystis nidulans* R2; un estudio similar fue llevado a cabo en *P. laminosum* (Stewart y col., 1985) y en *Synechococcus* sp. (Sato y col., 1985). Siguiendo en este orden se consiguió determinar las propiedades de la proteína periférica de 34 kDa en *Synechococcus vulcanus* y su intercambio con la proteína extrínseca de 33 kDa de espinaca, consiguiendo así, reconstitución de la evolución de oxígeno (Koike e Inoue, 1985).

Posteriormente, Dekker y col. (1988) purificaron el complejo OEC de *Synechococcus* sp. mediante dos gradientes de sacarosa, llegando a estimar el tamaño, forma y masa de este complejo y discutir el modelo de organización *in vivo* del PSII en cianobacterias. El uso de electroforesis en geles de gradiente de poliacrilamida resolvió la composición polipeptídica del complejo OEC, la espectrofotometría de absorción atómica determinó su contenido en Mn, Ca y Fe y la espectrofotometría UV-VIS sirvió para medir la cantidad de Cyt *b*-559 y plastoquinonas existentes en el complejo (Ohno y col., 1986).

En 1989 se logró una fracción enriquecida en centro de reacción de la cianobacteria *Synechococcus vulcanus* (Ikeuchi y col., 1989) y se identificaron los genes *psbI* y *psbL*. Este centro de reacción mostraba espectralmente un elevado contenido de otras cromoproteínas y se encontraba bastante desnaturalizado ya que su máximo de absorción en el rojo estaba a 672 nm. Este mismo año, Gounaris y col. (1989) obtuvieron también una fracción enriquecida en RC de la cianobacteria *Synechocystis* 6803. El complejo aislado mostraba cambios de absorbancia reversibles, debidos a la acumulación fotoquímica de la

feofitina reducida pero presentaba un elevado grado de impureza; además, al igual que el anterior, el grado de desnaturalización era notable ($\lambda_{\text{max}} = 673 \text{ nm}$). El tema de purificación del centro de reacción quedó paralizado a nivel de publicaciones durante los siguientes años, en los que se consiguió una mejor caracterización del complejo OEC del PSII (Rögner y col., 1990; Nilsson y col., 1992; Kirilovsky y col., 1992), incluso utilizando cromatografías de afinidad con metales inmovilizados como el Cu^{2+} (IMAC), en donde se lograba una mayor separación del PSI y PSII (Ritter y col., 1992). Otro de los objetivos fue llegar a obtener partículas de PSII estables al calor y con altas actividades (Ichimura y col., 1992) e incluso estabilizarlas mediante compuestos orgánicos como el glicerol, previniendo así la disociación de la proteína de 9 kDa y la inhibición de la evolución de oxígeno (Stamatakis y Papageorgiou, 1993).

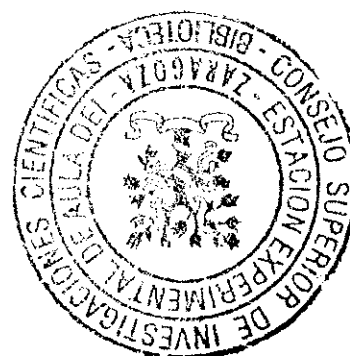
Picorel y col. (1994) consiguieron determinar el estado redox del Fe no hemínico en una partícula del complejo OEC altamente purificada mediante espectroscopia de Mössbauer a 77K. Concluyeron que el Fe no hemínico está directamente involucrado en la transferencia de electrones fotoinducida en el PSII RC, lo cual representa otra diferencia funcional entre el RC bacteriano y el PSII.

Se estudió la distribución de los polipéptidos del PSI y PSII entre las membranas tilacoidales y citoplasmáticas de cianobacterias (Smith y Howe, 1993). Tang y col. (1994) caracterizaron bioquímicamente y espectroscópicamente un nuevo complejo OEC de la cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803 que consistía de cinco proteínas de membrana intrínsecas (CP47, CP43, D1, D2 y citocromo *b*-559), una proteína extrínseca y una proteína desconocida, con una masa molecular de aproximadamente 26 kDa. Además, un análisis químico y funcional, normalizado a 2 moléculas de feofitina, indicaron que este complejo contenía 1 plastoquinona fotoactiva (Q_A), 4 átomos de Mn, 38 moléculas de Chl, 1 Cyt *b*-559, 2 plastoquinona-9 y 9-10 β -carotenos.

Recientemente, se han publicado nuevas preparaciones del PSII RC de *Synechocystis* sp 6803 (Oren-Shamir y col., 1995) con un contenido en pigmentos de 5-7 Chl y 1 Cyt *b*-559 por 2 Pheo, pero en la electroforesis presentada se puede apreciar claramente la existencia de otras cromoproteínas como las antenas CP47 y CP43, invalidando las conclusiones sobre las estequiometrías dadas en este trabajo. Por último, en 1996, Giorgi y col. compararon la separación primaria de cargas en una preparación impura de PSII RC de *Synechocystis* PCC 6803 salvaje y el mutante D1-130 mediante medidas de absorción resuelta en el tiempo en escalas de nano y picosegundos. Estos autores concluyeron que la velocidad de formación del par radical es menor que en plantas e independiente del tipo de residuo D1-130, a pesar de que una mutación de éste puede producir un desplazamiento en el máximo de la banda Q_x de la Pheo, haciéndolo similar al de plantas. Además, el rendimiento cuántico de la

formación del par radical, $P680^+Pheo^-$, en *Synechocystis* salvaje, también menor que en plantas, puede ser incrementado por mutación del residuo D₁-130 de glutamina a glutamato.

El objetivo fundamental seguido durante la realización de esta Tesis Doctoral ha sido la purificación del centro de reacción del fotosistema II de cianobacterias y su posterior caracterización bioquímica y espectroscópica. Estos organismos ofrecen grandes ventajas respecto a plantas para llevar a cabo experimentos de mutagénesis dirigida que pueden ayudar enormemente a elucidar los mecanismos moleculares que tienen lugar durante el proceso fotosintético. Adicionalmente, durante la realización de esta Tesis Doctoral he llevado a cabo algunos trabajos sobre el PSII RC de plantas superiores.



MATERIALES Y METODOS

INDICE MATERIALES Y METODOS

1. Material biológico	41
1.1. Cultivo de la cianobacteria termófila <i>P. laminosum</i>	41
1.2. Cultivo de la cianobacteria <i>Synechocystis</i> 6803	43
1.3. Cultivo de <i>Beta vulgaris</i> (remolacha)	45
2. Fraccionamiento y purificación en cianobacterias	46
2.1. Recolección de células y aislamiento de membranas fotosintéticas	46
2.1.1. Tratamiento con lisozima	46
2.1.2. Sonicación	47
2.2. Purificación del complejo "oxygen evolving core" (OEC)	48
2.3. Purificación del PSII RC de <i>P. laminosum</i>	50
2.4. Repurificación del PSII RC de <i>P. laminosum</i> mediante FPLC	53
2.5. Purificación del PSII RC de <i>Synechocystis</i> PCC6803	53
2.6. Reconstitución del PSII RC de <i>Synechocystis</i> PCC6803 con β -caroteno	53
3. Fraccionamiento y purificación en plantas superiores	54
3.1. Aislamiento de membranas tilacoidales del fotosistema II	54
3.2. Purificación del complejo PSII RC de remolacha	55
3.3. Repurificación del RC de remolacha mediante FPLC	56
4. Técnicas analíticas	56
4.1. SDS-PAGE de proteínas	56
4.2. Análisis de pigmentos	58
4.2.1. Extracción de pigmentos	58
4.2.2. Feofitinización	59
4.2.3. Determinación de citocromo <i>b</i> -559	59
4.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	60

4.3. Medidas de actividad	61
4.3.1. Evolución de oxígeno	61
4.3.2. Complejo PSII RC	63
a. Fotoacumulación de Pheo	63
b. Transporte electrónico secundario	63
4.4. Determinación de los isómeros del β -caroteno por HPLC	64
5. Técnicas espectroscópicas	65
5.1. Espectroscopia de absorción electrónica a temperatura ambiente y a 10K	65
5.2. Espectroscopia de fluorescencia a baja temperatura	66
5.3. Dicroísmo circular (CD)	66
5.4. Espectroscopia "surface-enhanced resonance Raman scattering" (SERRS)	68
5.5. Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo	71
5.6. Espectroscopia de resonancia paramagnética del electrón (EPR)	73
6. Método de desnaturalización reversible con detergentes del centro de reacción de plantas	75

1. Material biológico

En este trabajo se utilizó el siguiente material biológico:

- *Phormidium laminosum*
- *Synechocystis* PCC 6803
- *Beta vulgaris* (remolacha) variedad Monohill

1.1. Cultivo de la cianobacteria termófila *Phormidium laminosum*

En condiciones de esterilidad, el inóculo se introduce en un volumen de unos 250 ml de medio inorgánico D de Castenholz (Castenholz y col., 1970) descrito a continuación. Cuando el crecimiento se considera suficiente se aumenta el volumen de cultivo hasta 10 l en un botellón de esa capacidad con medio D con tricina (Fig. 11). El crecimiento se llevó a cabo durante 18 días con agitación continua y en una atmósfera enriquecida en 5 % de CO₂.

Todos los cultivos se llevaron a cabo en una cámara termostatzada a 45°C (Radiber S.A.). La iluminación se suministró con tubos fluorescentes y la intensidad luminosa incidente sobre la superficie del cultivo fue de 100 - 150 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

En la Fig. 12 se muestran los filamentos celulares de *P. laminosum* a una escala de 0,5 mm.

La composición del medio de cultivo fue la siguiente:

Medio D + Tricina

NTA (Acido nitriloacético)	0,100 g/l
Solución de micronutrientes (*)	0,500 ml/l
Solución FeCl ₃ (0,29 g/l)	1,700 ml/l
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0,060 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,100 g/l
NaCl	0,008 g/l
KNO ₃	0,100 g/l
NaNO ₃	0,700 g/l
Na ₂ HPO ₄	0,110 g/l
Tricina (pH 8,2)	1,080 g/l

(*) Solución de micronutrientes

H_2SO_4 (concentrado)	0,500 ml/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,280 g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,500 g/l
H_3BO_3	0,500 g/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025 g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025 g/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,045 g/l



Figura 11: Cultivo de la cianobacteria termófila *Phormidium laminosum* en cámara termostatzada con iluminación de tubos fluorescentes.

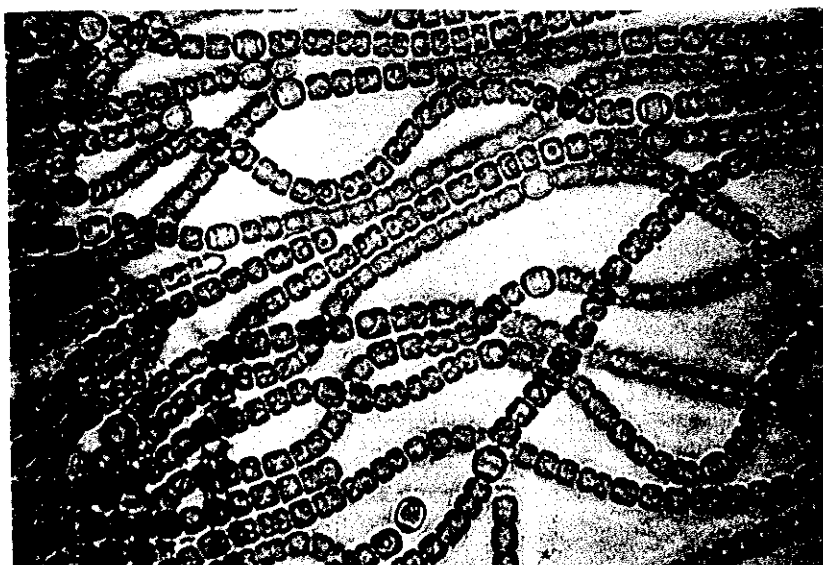


Figura 12: Filamentos celulares de *Phormidium laminosum*

1.2. Cultivo de la cianobacteria *Synechocystis* 6803

Las células de la cianobacteria *Synechocystis* 6803 (Fig. 13) se crecieron también en botellones de 10 l, en el medio inorgánico BG-11 a 25-30°C. El crecimiento se llevó a cabo durante 18 días con agitación continua, en una atmósfera enriquecida en 5% de CO₂ y bajo iluminación de una lámpara "Mazda" (Mazdapar ECO de 120W, extensive flood) con una intensidad de luz de 70-90 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

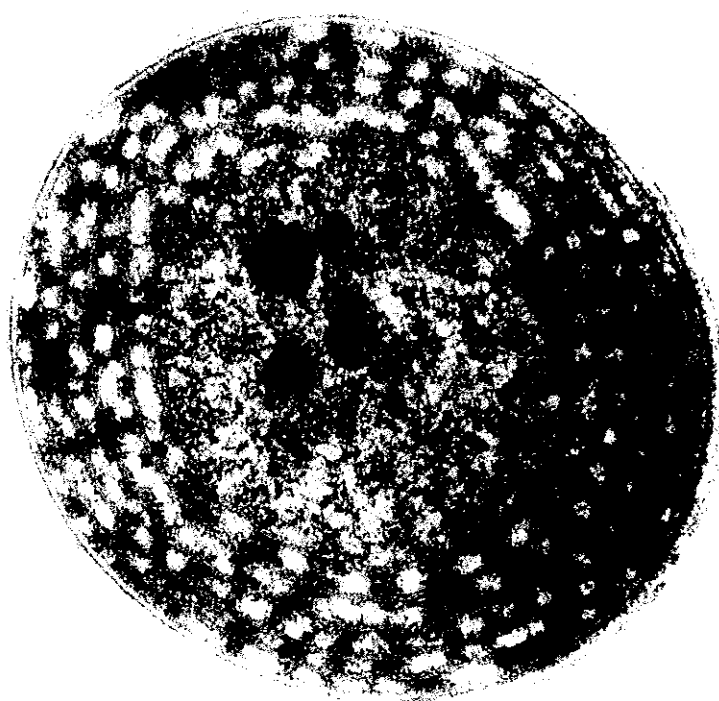
La composición del medio de cultivo fue la siguiente:

BG-11 + Tricina

NaNO ₃	1,500 g/l
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,040 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,075 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,036 g/l
Acido cítrico	0,006 g/l
Citrato férrico anhidro	0,006 g/l
EDTA (disódico)	0,001 g/l
Na ₂ CO ₃	0,020 g/l
Oligoelementos (*)	1,000 ml/l
Tricina (pH 8,2)	0,890 g/l

(*) Solución de micronutrientes

H_3BO_3	2,8600 g/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,8100 g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2220 g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,3900 g/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0790 g/l
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0494 g/l

**Figura 13:** Célula de *Synechocystis* PCC6803

1.3. Cultivo de *Beta vulgaris* (remolacha)

Para obtener el material biológico de partida, las plantas se crecieron en cultivo hidropónico, en cámaras bioclimáticas bajo condiciones controladas:

Intensidad de luz	400 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
Temperatura	24°C
Humedad	80%
Rango del espectro	400-700 nm

El medio de cultivo conocido como solución nutritiva de Hoagland se describe a continuación, para su preparación se parte de las siguientes soluciones madre:

Solución 1

KNO_3	50,55 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	49,30 g/l
KH_2PO_4	27,50 g/l
NaCl	5,85 g/l

Solución microelementos

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,810 g/l
BO_3H_3	2,860 g/l
Na_2MoO_4	0,025 g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,230 g/l
CuSO_4	0,060 g/l

Solución 2

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	218 g/l
----------------------------	---------

Solución de hierro

Secuestrene	14 g/l
-------------	--------



La solución nutritiva se prepara añadiendo 100 ml de solución 1, 50 ml de solución 2, 10 ml de solución de micronutrientes y 60 ml de solución de hierro, todo esto se lleva a 20 l con agua destilada.

Las semillas son tratadas con un fungicida (Benlate, Du Pont) al 0,1% en agua destilada durante 2 h, para posteriormente ser lavadas durante 1 día con agua destilada, eliminando así la capa protectora con la que vienen cubiertas. Una vez que las semillas están lavadas, se colocan en una bandeja con vermiculita (lecho poroso), previamente humedecida con agua destilada y se cubren con este mismo material también humedecido. La bandeja se introduce en la cámara bioclimática, donde la humedad del lecho se mantiene con solución nutritiva de Hoagland diluida 8 veces.

Tras siete días aparecen pequeñas plántulas de las cuales 50 se llevan a cultivo hidropónico en un recipiente de 20 l con solución nutritiva 3/4 y borboteo de aire. Una vez desarrolladas las primeras hojas, las plantas son trasladadas a recipientes de 20 l en los que se colocan 4 plantas por recipiente conteniendo la misma solución nutritiva. Un mes después, se

recogen las hojas de las plantas que serán el material de partida en fraccionamientos y purificaciones.

2. Fraccionamiento y purificación en cianobacterias

2.1. Recolección de células y aislamiento de membranas fotosintéticas

Las células en su fase estacionaria son sedimentadas por consecutivas centrifugaciones de 10 min cada una a 8.000xg y 4°C, utilizando el rotor GSA en la centrífuga refrigerada RC5C (Sorvall, Du Pont Company, Willmington, Delaware). El sedimento final se lava con tampón A [0,5 M sorbitol, 10 mM MgCl₂, 5 mM tampón fosfato (KH₂PO₄/K₂HPO₄), 12,5 mM EDTA y 10 mM Hepes (pH 7,5)], el rendimiento obtenido es normalmente de unos 18-20 g de peso fresco por cada 10 l de cultivo iniciales.

Tras la recolección de células, éstas son resuspendidas y perfectamente homogeneizadas con un homogenizador de teflón en 200 ml de tampón A. A partir de aquí, se siguieron dos procesos diferentes para llegar a obtener membranas tilacoidales. El primero consiste en un tratamiento con lisozima y está basado en el método descrito por Stewart y Bendall (1980) para *P. laminosum*, mientras que el segundo consiste en la ruptura de las células mediante sonicación.

2.1.1. Tratamiento con lisozima

A los 200 ml de suspensión celular se le añaden 0,4 g de lisozima (2 g/l), la mezcla es incubada durante 2 h 30 min a 37°C en un baño de agua SB-16 (Bath Techne, Cambridge, UK) con agitación suave. Al examinar las células en el microscopio durante la incubación, se observa la formación progresiva de esferoplastos como consecuencia de la digestión de la pared celular. La reacción lisozimática finaliza diluyendo los esferoplastos con 600 ml de tampón A sin EDTA y centrifugando a 8.300xg (rotor GSA) durante 10 min a 4°C, quedando los esferoplastos en el sedimento (de color verde) y los ficobilisomas en el sobrenadante (de color azulado). Para la preparación de fragmentos de membrana, el sedimento se resuspende en 800 ml de tampón B hipo-osmótico [10 mM MgCl₂, 5 mM de tampón fosfato (KH₂PO₄/K₂HPO₄) y 10 mM Hepes, pH 7,5] y se homogeneiza hasta romper los esferoplastos. A continuación, la mezcla se centrifuga 6 min a 140xg (rotor GSA) quedando en el sedimento los restos celulares sin romper y el sobrenadante obtenido se centrifuga de nuevo durante 12 min a 12.400xg eliminando, así, parte de los ficobilisomas. El sedimento es lavado

con tampón A y centrifugado a 12.400xg durante 30 min. Por último, el sedimento, que constituye las membranas fotosintéticas se resuspende en el tampón C [25% glicerol, 10 mM MgCl₂, 5 mM tampón fosfato (KH₂PO₄/ K₂HPO₄) y 10 mM Hepes, pH 7,5].

2.1.2. Sonicación

Este método fue puesto a punto como consecuencia de la elevada degradación proteolítica que aparecía en los complejos purificados a partir de membranas tilacoidales preparadas por el método descrito anteriormente, por lo que se decidió utilizar un método de ruptura de células rápido en el que la temperatura se mantuviese a 4°C y así se redujera la actividad de las proteasas. Además de la sonicación, se añadió en todos los tampones 1mM de PMSF como inhibidor de proteasas.

Las células resuspendidas en buffer A con 1 mM de PMSF se sonicán durante 20 min, con pulsos de 10 segundos de sonicación y 10 segundos de pausa a una intensidad de 7 (Ultrasonic Liquid Processor, Sonicator®, Farmingdale, NY). La suspensión resultante se centrifuga a 200xg (rotor GSA) durante 6 min. El sobrenadante se centrifuga a 16.000xg (rotor GSA) durante 150 min. El sedimento, formado por las membranas tilacoidales, se resuspende en tampón C con 1 mM PMSF. Todos los procesos se llevan a cabo a 4°C y en baja intensidad de luz.

Una vez obtenidas las membranas tilacoidales por cualquiera de los dos métodos descritos, se calcula la concentración de Chl total, para lo cual se extrae con acetona al 80%, se sonica durante 2 min en un baño de ultrasonidos (Ultrasons P-selecta) y se centrifuga en una microfuga (microfuge-E, Beckman Instruments, Fullerton, CA) durante 5 min. En el sedimento se encuentra la proteína, mientras que el sobrenadante contiene el extracto al que se le mide la absorción a 663 nm para calcular la concentración de Chl mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Abs}_{663 \text{ nm}} = 82 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times c \text{ (mM)}$$

$$\text{Chl}_T \text{ (mg/ml)} = c \text{ (mM)} \times 1.10^{-3} \text{ l} \times 893$$

Una vez calculada la concentración de Chl, las membranas tilacoidales se almacenan a -80°C.

2.2. Purificación del complejo "oxygen evolving core" (OEC)

Las membranas tilacoidales se lavan con tampón C sin glicerol. Para ello, se diluye la suspensión dos veces con el tampón y se centrifuga a 144.500xg (rotor 45 Ti) durante 30 min en la ultracentrífuga Beckman L8-70M. Este paso se repite una segunda vez para, así, eliminar la mayor parte de la antena extrínseca constituida por las ficobiliproteínas.

Se intentaron varios procesos de purificación hasta llegar al método puesto a punto actualmente en nuestro laboratorio. Entre los distintos intentos se podrían destacar los siguientes:

a.-En un principio se desarrolló el método basado en Bowes y col. (1983) descrito a continuación pero el resultado no fue como se esperaba, pues mediante electroforesis se observó que el PSII obtenido no era muy puro, ya que presentaba contaminación de PSI. En este método, parte de las membranas tilacoidales resuspendidas en el tampón C se solubilizan a una concentración de 1 mg/ml de Chl con el detergente LDAO (0,38%, p/v) durante 40 min a 4°C y se centrifuga a 100.000xg (rotor 70Ti) durante 1 h. El sobrenadante obtenido se carga en un gradiente de sacarosa (15-35%, p/v) conteniendo 10% (v/v) glicerol, 10 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, n-dodecil-β-D-maltósido en una relación detergente/Chl = 20/1 (p/p) y 10 mM Hepes (pH 7,5) y se centrifuga a 125.000xg (rotor 45Ti) durante 22 h 30 min. Tras la centrifugación, la banda inferior del gradiente contiene el complejo PSII, pero como ya se ha comentado no es suficientemente puro por lo que se intentó buscar un nuevo método de purificación.

b.-Posteriormente se siguió el método descrito por Koike y col. (1987), basado en centrifugaciones fraccionales. Las membranas tilacoidales se solubilizan a 4°C con 0,8% (p/v) de LDAO a una concentración de Chl de 2 mg/ml durante 40 min. Una vez concluida la solubilización, la suspensión se centrifuga a 100.000xg (70.1Ti) durante 1 h a 4°C, obteniéndose una fracción no solubilizada (sedimento, Pa) y otra solubilizada (sobrenadante, Sa). Este tratamiento se repite una segunda vez más con el sedimento para lograr así un mayor rendimiento de material solubilizado. El segundo sobrenadante (Sa') es mezclado con el primero y el conjunto se somete a una serie de centrifugaciones fraccionales. Para ello, el material (Sa+Sa') se diluye tres veces con el tampón [25% (v/v) glicerol, 10 mM MgCl₂ y 20 mM Hepes, pH 7,0] y se centrifuga a 180.000xg (rotor 70Ti) durante 1 h a 2°C. Al diluir, la concentración de detergente existente en la suspensión disminuye, ocasionando que algunas proteínas hidrofóbicas se agregen de nuevo y sedimenten tras la centrifugación. Según la bibliografía, el PSI forma agregados más fácilmente que el PSII, por lo que se concluye que este último complejo necesita menos detergente para mantenerse en solución. Con esta centrifugación se intenta conseguir una separación de los dos fotosistemas, de forma que en el sobrenadante (Sb) debe permanecer el PSII. Posteriormente, el Sb es centrifugado a 200.000xg

(rotor 70Ti) durante 22 h y el sedimento resultante (Pc) está enriquecido en PSII, desechando el sobrenadante que contiene carotenoides libres y ficobilisomas.

También se llevó a cabo el mismo proceso pero con una única solubilización inicial, pues se comprobó que la fracción Sa' arrastraba mucha cantidad de PSI.

Para eliminar ficobilisomas (proteínas hidrosolubles) del sedimento, éste es resuspendido en el tampón C sin glicerol y se centrifuga a 180.000xg (rotor 70Ti) durante 4 h, de esta forma, el sobrenadante de color azul contiene ficobilisomas mientras que el sedimento se ve enriquecido en PSII.

Este método tampoco fue el definitivo, pues al utilizar el complejo obtenido como material de partida para sucesivas purificaciones se observó un alto grado de desnaturalización. Así, nos vimos en la necesidad de desarrollar un método diferente con el que poder aislar un complejo OEC más puro y a partir de él intentar la purificación del centro de reacción del PSII. Este proceso de purificación del complejo OEC se basa en la combinación de dos métodos ya descritos, Koike e Inoue (1985) y de Vitry y col. (1991).

c.- El primer paso consiste en eliminar la proteína extrínseca de 33 kDa, favoreciendo así la separación posterior de las antenas internas CP43 y CP47. Tras el lavado de ficobilisomas con la centrifugación descrita anteriormente, el último sedimento se resuspende en el tampón de extracción compuesto por 10% (v/v) glicerol y 0,8 M Tris (pH 8,4), a una concentración aproximada de 2 mg/ml de Chl y se incuba durante 45 min en oscuridad a 0°C. Una vez finalizada la incubación, se centrifuga a 300.000xg (rotor 70Ti) durante 90 min y el sedimento vuelve a ser tratado con el tampón de extracción para poder eliminar mayor cantidad de proteína extrínseca de 33 kDa. El sedimento obtenido de esta segunda centrifugación seguirá los sucesivos pasos de purificación.

Las membranas tilacoidales, sin apenas ficobilisomas ni proteína extrínseca, son solubilizadas a una concentración de Chl de 1 mg/ml con 1% (p/v) LDAO durante 1 h a 4°C. La mezcla resultante se centrifuga a 100.000xg durante 1 h a la misma temperatura. El material solubilizado se carga en un gradiente de sacarosa (5-17,5%, p/v) que contiene 20% (v/v) glicerol, 0,05% (p/v) LDAO, 5 mM MgCl₂ y 20 mM Hepes/NaOH (pH 7,0) y se centrifuga a 100.000xg durante 24 h a 4°C.

La fracción enriquecida en PSII se recoge con cuidado y se carga en una columna (1,5x16 cm) de intercambio iónico gel-TSK Toyopearl DEAE 650s (Toso Haas, Stuttgart, Alemania), equilibrada con el tampón D [0,03% (p/v) DM y 20 mM Tris/HCl (pH 8,0)] más 100 mM NaCl, y se lava a un flujo de 2 ml/min con el mismo tampón hasta que la absorción del eluato sea de OD=0,1 a 670 nm. A continuación, el complejo OEC se eluye con el tampón D con 300 mM NaCl a un flujo de 1 ml/min, recolectando fracciones de 1,5 ml, se

dializa frente a 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) y se congela a -80°C . Todos los tampones utilizados contienen 1 mM PMSF.

2.3. Purificación del complejo PSII RC de *P. laminosum*

Partiendo de los diferentes complejos OEC obtenidos con los métodos descritos, se intentó con éxito purificar el RC de la cianobacteria termófila *P. laminosum*, haciendo numerosas pruebas para conseguir una buena solubilización, paso clave en toda purificación de proteínas de membrana. A continuación comentaré los pasos seguidos hasta llegar al método definitivo, con el que se consigue un centro de reacción puro y nativo.

a.-En un principio se partió del material Pc (descrito en el apartado 3.2.b), enriquecido en PSII. Todos los procesos consistieron en incubación con detergente y agente caotrópico, centrifugación, diálisis en el caso de que el agente caotrópico fuera LiClO_4 y por último, cromatografía de intercambio aniónico. Vamos a comentar los distintos tipos de solubilizaciones:

- 1.-4% (p/v) TX-100, 4 M urea, 30 mM NaCl y 50 mM Tris (pH 7,2), 1 h
- 2.-6% (p/v) TX-100, 6 M LiClO_4 , 30 mM NaCl y 50 mM Tris (pH 7,2), 1 h
- 3.-4% (p/v) TX-100, 4 M LiClO_4 , 30 mM NaCl y 50 mM Tris (pH 7,2), 1 h
- 4.-4% (p/v) TX-100, 2,5 M LiClO_4 , 30 mM NaCl y 50 mM Tris (pH 7,2), 1 h
- 5.-3% (p/v) TX-100, 3 M LiClO_4 , 30 mM NaCl y 50 mM Tris (pH 7,2), 40 min
- 6.-4% (p/v) TX-100, 4 M LiClO_4 , 30 mM NaCl y 50 mM Tris (pH 7,2), 40 min
- 7.-4% (p/v) TX-100, 4 M LiClO_4 , 2% (p/v) taurina, 30 mM NaCl y 50 mM Tris (pH 7,2), 40 min
- 8.-4% (p/v) TX-100, 4 M LiClO_4 , 1% (p/v) taurina, 30 mM NaCl y 50 mM Tris (pH 7,2), 40 min

No se obtuvieron buenos resultados con ninguna de las soluciones, pues con la solución 7, el centro de reacción obtenido estaba totalmente desnaturalizado y con las solubilizaciones 4 y 6 aparecía un centro de reacción contaminado con la antena CP47 e incluso con 5 y 6, se eluyeron fracciones conteniendo solamente CP47 con un alto grado de desnaturalización. La característica general en todas las cromatografías fue la aparición de un gran número de fracciones enriquecidas en β -caroteno.

b.-Partiendo del complejo OEC obtenido según el proceso descrito en el apartado 2.2.c. de Materiales y Métodos, se logró poner a punto el método de purificación del centro de

reacción del fotosistema II de *P. laminosum*. En un principio se siguió la tónica de solubilización en solución, pero al ver que los resultados no eran satisfactorios se intentó solubilizar el material previamente inmovilizado en una columna, obteniéndose así un centro de reacción de gran pureza.

i. Solubilización en solución.

Al igual que en el apartado 2.3.a. de Materiales y Métodos, el proceso llevado a cabo consistió en una solubilización seguida de diálisis o dilución y una posterior cromatografía de intercambio aniónico. Los distintos tipos de solubilizaciones han sido:

- 1.-4% (p/v) TX-100, 4 M LiClO₄, 2% (p/v) taurina, 30 mM NaCl y 50 mM Tris (pH 7,2), 40 min
- 2.-5% (p/v) DM, 4 M LiClO₄, 1,5% (p/v) taurina, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5), 1 h
- 3.-2% (p/v) DM, 2 M LiClO₄, 1,5% (p/v) taurina, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5), 15 min
- 4.-1% (p/v) DM, 2% (p/v) TX-100, 2 M LiClO₄, 1,5% (p/v) taurina, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5), 1 h
- 5.-2,5% (p/v) DM, 2 M LiClO₄, 0,75% (p/v) taurina, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ y 10 mM Bis-Tris (pH 6,5), 1 h

La solubilización en solución produce una total desnaturalización del material, de ahí que se intentara probar la solubilización en columna.

ii. Solubilización en columna.

Este método consiste en la solubilización de la muestra una vez fijada al gel de la columna (Q-Sepharose Fast Flow, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y su posterior elución mediante un gradiente de sal. A continuación se exponen las diferentes formas de solubilización en cuanto a tiempos y detergentes que se llevaron a cabo:

- 1.-4% (p/v) TX-100, 4 M LiClO₄, 1,5% (p/v) taurina, 5 mM CaCl₂, 20 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 200 mM sacarosa y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5), 1 incubación de 10 min
- 2.-4% (p/v) TX-100, 0,03% (p/v) DM, 1,5% (p/v) taurina, 200 mM sacarosa y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5), 1 incubación de 5 min
- 3.-4% (p/v) TX-100, 0,03% (p/v) DM, 1,5% (p/v) taurina, 200 mM sacarosa y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5), 1 incubación de 20 min

- 4.-4% (p/v) TX-100, 0,03% (p/v) DM, 1,5% (p/v) taurina, 200 mM sacarosa y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5), 1 incubación de 40 min
- 5.-8% (p/v) TX-100, 0,03% (p/v) DM, 1,5% (p/v) taurina, 200 mM sacarosa y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5), 1 incubación de 20 min
- 6.-4% (p/v) TX-100, 0,03% (p/v) DM, 1,5% (p/v) taurina, 200 mM sacarosa y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5), 3 incubaciones de 20 min cada una
- 7.-4% (p/v) TX-100, 0,03% (p/v) DM, 1,5% (p/v) taurina, 200 mM sacarosa y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5), 5 incubaciones de 20 min cada una
- 8.-4% (p/v) TX-100, 0,03% (p/v) DM, 1,5% (p/v) taurina, 200 mM sacarosa y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5), 4 incubaciones de 30 min cada una

En estas condiciones, el centro de reacción estaría inmovilizado en el gel de la columna y podría ser, por tanto, más resistente a procesos de desnaturalización.

A continuación explicaré detalladamente el método definitivo de purificación del centro de reacción del PSII de la cianobacteria termófila *P. laminosum*.

Unos 800 mg de Chl del complejo OEC (apartado 2.2.c) son cargados en una columna de intercambio aniónico fuerte Q-Sepharose Fast Flow (1,5x10 cm), previamente equilibrada con el tampón E [0,03% (p/v) DM, 1,5% (p/v) taurina, 200 mM sacarosa y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5)] y se lava con el mismo tampón E a un flujo de 2 ml/min durante 5 min. Cuando la muestra está totalmente fijada al gel, se pasan 20 ml del tampón E con 4% (p/v) TX-100 y tras incubar la muestra (sin flujo) durante 30 min, se vuelven a pasar 20 ml del tampón E con 4% (p/v) TX-100 y se deja incubar durante otros 30 min. Este proceso se repite dos veces más, es decir, un total de 4 incubaciones de 30 min cada una. Una vez terminadas las cuatro solubilizaciones, la muestra es lavada con el tampón E a flujo de 2 ml/min hasta que la absorción del eluato a 280 nm sea menor de OD= 0,1, indicando que se ha intercambiado el TX-100 por DM. A continuación, se aplican 90 ml de un gradiente lineal 60-100 mM MgSO₄ en tampón E a un flujo de 1 ml/min y se recogen fracciones de 0,75 ml cada una. El PSII RC eluye entre 75-90 mM MgSO₄ y a continuación se dializa frente a 20 mM Bis-Tris (pH 6,5), se concentra con un Centricón-100 (Amicón, Beverly, MA) y se congela a -80°C. Se añadió 1 mM PMSF a todos los tampones y se mantuvieron en continua agitación durante 12 h antes de su uso, para obtener una buena solubilización.

2.4. Repurificación del PSII RC de *P. laminosum* mediante FPLC

La preparación de RC del PSII fue posteriormente repurificada mediante una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex-200 HR 10/30 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) con un rango de resolución de 1×10^4 a 6×10^5 de peso molecular, usando un sistema FPLC (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). La columna se equilibró con 20 mM Bis-Tris (pH 6,5) conteniendo 0,03% (p/v) DM, 200 mM sacarosa y 1,5% (p/v) taurina. La muestra (200 ml de 40 mg/ml) se cargó en la columna y fue eluida a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min con el mismo tampón. Todo el proceso se llevó a cabo en la oscuridad y a 4°C.

2.5. Purificación del complejo PSII RC de *Synechocystis* PCC6803

Los métodos de purificación del complejo OEC y del RC del PSII de la cianobacteria termófila *P. laminosum* han sido aplicados a la cianobacteria no termófila *Synechocystis* PCC6803. En el proceso de aislamiento del complejo OEC de *Synechocystis* cabe destacar la diferente distribución de bandas tras la centrifugación en gradiente de sacarosa en comparación con la obtenida con *P. laminosum*. Asimismo, fue necesaria una mayor concentración de detergente para conseguir una buena solubilización del complejo OEC en la columna. No obstante, el método utilizado fue básicamente el mismo que para *P. laminosum*. Se parte de unos 800 mg de Chl de complejo OEC (según 2.2.c) que son cargados en una columna (1,5x10 cm) de intercambio aniónico (Q-Sepharose Fast Flow). Se pasan 20 ml de tampón E con 8% (p/v) TX-100 y se deja incubar durante 40 min, este proceso se repite tres veces más. Tras las sucesivas incubaciones se intercambia el detergente por DM con el tampón E a un flujo de 2 ml/min. Una vez intercambiado, se aplica el gradiente lineal 60-150 mM de MgSO_4 en tampón E a 1 ml/min, eluyendo el RC del PSII a una concentración de 110-130 mM MgSO_4 . El RC es dializado frente a 20 mM Bis-Tris (pH 6,5) y congelado a -80°C. Todos los tampones contienen 1 mM PMSF.

2.6. Reconstitución del PSII RC de *Synechocystis* PCC6803 con β -caroteno

El centro de reacción purificado a partir de *Synechocystis* mediante el método descrito se obtiene prácticamente sin β -caroteno, por lo que se intentó su reconstitución con este pigmento. Para ello se parte de 300 ml de centro de reacción ($\text{OD}_{675\text{nm}}=2,5$) y de β -

caroteno previamente extraído con 90% metanol, llevado a sequedad con N_2 líquido y resuspendido en 2 ml del tampón E ($OD_{470nm}=10$). La mezcla se incuba durante 20 h con agitación suave a 4°C y en la oscuridad. Tras la incubación, el material se diluye con tampón E y se centrifuga durante 3 h a 180.000xg (rotor 70.1Ti). El sedimento obtenido se resuspende en el tampón E consiguiendo así, un RC reconstituido con β -caroteno.

3. Fraccionamiento y purificación en plantas superiores

3.1. Aislamiento de membranas tilacoidales del fotosistema II

El método seguido para la purificación de membranas del fotosistema II (PSII_m) fue básicamente el propuesto por Berthold y col. (1981), con algunas modificaciones indicadas a continuación. Este proceso se fundamenta en la localización preferencial del fotosistema II en las membranas tilacoidales apiladas que forman los grana y en la solubilización preferencial de las membranas estromales con el detergente no iónico TX-100 (Boehringer, Mannheim especialmente purificado para investigación de membranas). Las soluciones tampón utilizadas fueron:

Tampón B1

NaCl	400 mM
MgCl ₂	2 mM
Tricina (pH 8)	20 mM
BSA	0,2 % (p/v)

Tampón B2

NaCl	150 mM
MgCl ₂	5 mM
Tricina (pH 8)	20 mM
BSA	0,2 % (p/v)

Tampón B3

NaCl	15 mM
MgCl ₂	5 mM
Mes (pH 6)	50 mM

Tampón B4

NaCl	15 mM
MgCl ₂	5 mM
Mes (pH 6)	50 mM
Sacarosa	400 mM

Las hojas de remolacha son recogidas y troceadas en pequeñas porciones evitando la desecación del material. Una vez realizado este proceso, el material se pesa y se deposita en un triturador de cuchillas donde se homogeniza en el tampón B1. Este tampón se añade previamente a la homogenización en razón de 2 ml/g de material troceado. Una vez homogeneizado, el extracto crudo obtenido se filtra a través de una capa de papel de filtro Miracloth (Hoechst, Calbiochem). El filtrado se recoge y se centrifuga a 1.500 rpm (rotor

GSA) durante 2 min. El sedimento de la centrifugación compuesto por restos celulares y tejidos sin romper es desechado y el sobrenadante se centrifuga a 10.000 rpm (rotor GSA) durante 10 min. El sobrenadante se descarta y el sedimento, compuesto en su mayoría por cloroplastos, se resuspende suavemente con un pincel en tampón B2. El material resuspendido se centrifuga de nuevo a 10.000 rpm en un rotor SS-34 durante 10 min. El sedimento, formado por tilacoides, se resuspende cuidadosamente en tampón B3.

A este material obtenido se le mide la concentración de Chl total, según el método de Arnon (Arnon y col., 1949) mediante extracción con acetona al 80%. El extracto acetónico se centrifuga en una microfuga para sedimentar los restos de proteína y se mide la absorción del extracto a 645 y 663 nm. La concentración de Chl se estima mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Chl}_T \text{ (mg/ml)} = 20,2 \times \text{Abs}_{645 \text{ nm}} + 8,02 \times \text{Abs}_{663 \text{ nm}}$$

Para conseguir una buena solubilización de los tilacoides, es necesario dejar la concentración de Chl a 3 mg/ml; después se añade TX-100 al 20% (p/v) en una relación de 25 mg TX-100 por mg de Chl. La suspensión es incubada durante 35 min con agitación suave y una vez transcurrido este tiempo se centrifuga a 6.200 rpm en un rotor SS-34 durante 5 min. El sedimento de esta centrifugación, conteniendo restos sin solubilizar, se descarta y el sobrenadante se centrifuga a 40.000xg durante 30 min. El sedimento de la centrifugación, formado por membranas de PSII, se resuspende suavemente en el tampón B4. Se mide la concentración de Chl y la relación de Chl *a*/Chl *b*, lo cual da una idea de la pureza de la preparación de PSII_m.

$$\text{Chl } a \text{ (mg/ml)} = 12,7 \times \text{Abs}_{663 \text{ nm}} - 2,69 \times \text{Abs}_{645 \text{ nm}}$$

$$\text{Chl } b \text{ (mg/ml)} = 22,9 \times \text{Abs}_{645 \text{ nm}} - 4,68 \times \text{Abs}_{663 \text{ nm}}$$

La preparación de PSII_m es congelada a -80°C. Todo el proceso de manipulación se llevó a cabo a 4°C y con baja intensidad de luz para evitar cualquier degradación de la muestra.

3.2. Purificación del PSII RC de remolacha

El aislamiento del PSII RC de remolacha se llevó a cabo según el método de Montoya y col. (1991) con algunas modificaciones. 80 mg Chl de PSII_m de remolacha son diluidas unas 20-30 veces en una solución tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) a 4°C y

centrifugadas a 100.000xg durante 40 min, para así eliminar el tampón B4 en el que estaban resuspendidas. Tras la centrifugación, el material es resuspendido suavemente en 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) y solubilizado con 4% (p/v) TX-100 a una concentración de 1 mg/ml de Chl. La mezcla se incuba durante 1 h y posteriormente se centrifuga a 100.000xg durante 1 h.

El sobrenadante de la centrifugación anterior es fijado en una columna (1,6x16 cm) de gel TSK Fractogel DEAE 650s, previamente equilibrada con 50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 30 mM NaCl y 0,05% (p/v) TX-100 a un flujo de 3 ml/min. La columna se lava hasta que la absorción del eluato es de $OD_{670nm}=0,01$. Una vez lavada la columna, se lleva a cabo el intercambio del detergente por DM con el tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) y 2 mM DM. Una vez sustituido el detergente, la muestra es eluida con 150 ml de un gradiente lineal 30-200 mM NaCl a un flujo de 1 ml/min. El complejo se dializa frente a 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) y se almacena a -80°C.

3.3. Repurificación del RC de remolacha mediante FPLC

El complejo PSII RC de remolacha fue posteriormente repurificado mediante una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superose-6 HR 10/30 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), con un rango de resolución de 5×10^3 a 5×10^6 de peso molecular, usando un sistema de FPLC. La columna se equilibró con el tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) y 0,6 mM DM. 200 ml de muestra a una concentración de 30 mg/ml se cargaron en la columna y ésta fue eluida a un flujo de 0,05 ml/min con el mismo tampón. Todo el proceso se llevó a cabo en la oscuridad a 4°C.

4. Técnicas analíticas

4.1. SDS-PAGE de proteínas

La composición polipeptídica de las preparaciones descritas anteriormente fue determinada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS).

El tamaño del gel utilizado fue de 18 x 16 x 0,75 cm. La electroforesis se llevó a cabo en un aparato de electroforesis vertical (Hoeffer Instruments, San Diego CA) refrigerado a 4°C.

Para la preparación de los geles se parte de las siguientes disoluciones:

Acrilamida 40% (p/v), bisacrilamida 1% (p/v)

Tampón 3 M Tris-HCl (pH 8,9), 0,3% (p/v) SDS

Tampón 0,313 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,3% (p/v) SDS

Persulfato amónico 10% (p/v). Preparado en el momento.

El gel separador está formado por el gradiente de acrilamida 13-22,5% (p/v), preparado como sigue:

	<u>13%</u>	<u>22,5%</u>
40% (p/v) acrilamida	3,5 ml	5,75 ml
3M Tris (pH 8,9)	3,75 ml	3,75 ml
H ₂ O	3,25 ml	0 ml
Urea (8 M)	5 g	5 g
80% (v/v) glicerol	0 ml	0,7 ml

Tras mezclar todos estos compuestos se añadieron a cada una de las dos concentraciones 4 µl de Temed y 32,5 µl de APS al 10% (p/v). Se lleva rápidamente al molde mediante un formador de gradiente, añadiendo al final unos ml de alcohol isopropílico para favorecer la formación de un frente homogéneo. Se deja polimerizar durante 1 h.

El gel concentrador [5% (p/v) acrilamida] está formado por:

40% (p/v) acrilamida	1,5 ml
0,313M Tris (pH 6,8)	4 ml
H ₂ O	6,5 ml

Una vez mezclados todos los compuestos, se añade 7,5 µl de Temed y 125 µl de APS al 10% (p/v) y se vierte sobre el gel separador ya polimerizado. A continuación se coloca el peine para marcar los pocillos y se deja polimerizar durante 30 min.

La muestra (2 µg Chl) es desnaturalizada durante 45 min a temperatura ambiente con el tampón:

250 mM Tris-HCl (pH 8,9)

4% (p/v) SDS

40% (p/v) sacarosa

2% (p/v) β-mercaptoetanol

Relación muestra/tampón de 2/1 (v/v).

Las muestras desnaturalizadas se cargan en los pocillos (37,5 µl) y se deja correr la electroforesis durante 12-14 h a 11 mA por gel. Todo el sistema se encuentra refrigerado a 4°C.

El tampón utilizado para el cátodo y el ánodo está compuesto por:

15,2 mM Glicina

2,47 mM Tris (pH 8,3)

0,01 % (p/v) SDS

Una vez realizada la electroforesis, el gel se retira del molde y se tiñe durante 3 h con Azul de Coomassie 250 R (Sigma) en una disolución con la siguiente composición:

Azul de Coomassie	0,25 g
Metanol	450 ml
Acido acético	60 ml
Agua desionizada	490 ml

Posteriormente, el gel es desteñido con una disolución decolorante compuesta por:

Metanol	250 ml
Acido acético	750 ml
Agua desionizada	1500 ml

El gel es decolorado en esta disolución hasta que el fondo queda claro.

Todos los productos utilizados son de elevada pureza (Bio-Rad, Hercules, CA) y los tampones se preparan con agua desionizada Milli-Q (Millipore Corporation, Bedford, MA).

4.2. Análisis de pigmentos

El análisis llevado a cabo consiste en la determinación cualitativa y cuantitativa de los pigmentos de Chl, Pheo y β -caroteno en los diferentes complejos purificados.

4.2.1. Extracción de pigmentos

Se toman 200 ml de muestra ($OD_{675nm}=1,5$) y se mezclan en un tubo eppendorf con 800 ml de acetona al 100% (concentración final de acetona al 80%). La mezcla se sonica durante 2 min a 4°C y se centrifuga en la microfuga durante 5 min. En el sobrenadante queda el extracto de pigmentos, mientras que en el sedimento se encuentra la proteína y los detergentes. Se recoge el sobrenadante y se realiza el espectro de absorción en un espectrofotómetro Beckman DU-640. Todos los pasos anteriores fueron realizados a 4°C y bajo luz tenue.

El cálculo de la concentración de Pheo en el extracto se realizó usando el coeficiente de extinción $\varepsilon = 6,504 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 535 nm (Montoya y col., 1991) determinado a partir del espectro de absorción del extracto feofitinizado en base a la comparación entre absorbancias en las bandas de Pheo a 666 nm (transición Qy) y 535 nm (transición Qx).

4.2.2. Feofitinización

Tanto la clorofila como la feofitina son dos pigmentos casi idénticos en cuanto a su composición química, con la única diferencia en la presencia de un átomo de Mg central en el anillo tetrapirrólico de la estructura de la Chl que se encuentra ausente en la Pheo. Esta pequeña diferencia conlleva cambios notables en el comportamiento redox y espectroscópico de la Pheo respecto de la Chl. La acidificación de un extracto de Chl provoca la pérdida del átomo de Mg central en el anillo tetrapirrólico, convirtiéndose ésta en Pheo, lo cual es fácilmente comprobable espectrofotométricamente debido a las diferencias espectrales entre ambos pigmentos.

Para feofitinizar totalmente la Chl del extracto de pigmentos del PSII RC, se añaden 8 μl de 1M HCl a 1 ml de muestra, resultando por tanto, una concentración de 8 mM. A partir de este extracto acidificado se calculará la concentración total de Pheo, para lo cual se realiza el espectro de absorción del extracto y se utiliza el coeficiente de extinción $\varepsilon = 49,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 666 nm (Vernon y col., 1960). El proceso se llevó a cabo a 4°C en la oscuridad.

La concentración de Chl total correspondería a la diferencia en Pheo entre el extracto feofitinizado y el no acidificado.

4.2.3. Determinación de citocromo *b*-559

La cantidad de Cyt *b*-559 en el complejo PSII RC se pudo determinar gracias a las propiedades redox de su grupo hemo y a las diferencias espectrales entre los dos estados (oxidado/reducido). Se prepara una disolución 25 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y otra saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. El centro de reacción es diluido en tampón 20 mM Bis-Tris (pH 6,5), de forma que su concentración final sea de 5 $\mu\text{g/ml}$ de Chl ($\text{OD}_{675\text{nm}}=0,4$). En la cubeta se añaden 300 μl del centro de reacción más 24 μl de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ para oxidar totalmente al citocromo *b*-559, se hace la línea base en el espectrofotómetro y a continuación se añaden 10 ml de la disolución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, se agita la cubeta, se cubre con parafilm para evitar que el ditionito se

oxide y se realiza el espectro diferencial reducido menos oxidado. La concentración se calcula utilizando el coeficiente de extinción $\epsilon_{559-575\text{ nm}} = 21\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ en la banda α del Cyt *b*-559 (Garewall y Wasserman, 1974).

4.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La determinación cualitativa de pigmentos se llevó a cabo mediante análisis de HPLC según el método de Tayer y Björkman, 1990. Los pigmentos se extrajeron en 80% de acetona como se describe en el apartado 4.2.1. y la cromatografía se realizó en una columna de fase reversa (4,6 mm x 25 cm) Zorbax® ODS (Du Pont Company, Willmington, Delaware), cuyo empaquetamiento corresponde a uniones de grupos octadecilsilano (C18) con partículas de sílice (Zorbax SIL).

La columna se equilibró con la fase móvil A (acetonitrilo/metanol, 85/15) durante 10 min. La muestra se inyectó y durante 14,5 min más se bombeó la misma fase. Transcurrido este tiempo se aplicó un gradiente lineal de 100% de A hasta 100% de B (metanol/acetato de etilo, 68/32) durante 2 min. Una vez que la fase móvil es 100% de B, ésta fue bombeada durante 30 min. Finalmente la columna fue nuevamente equilibrada con la fase A durante 10 min. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min y la detección se hizo a 415 nm, en donde los tres pigmentos, Chl, Pheo y β -caroteno absorben (Scanning Detector 167, Beckman, Fullerton, CA). Todos los solventes utilizados son de grado HPLC.

Este método no pudo ser utilizado como cuantitativo, pues de momento existen diferencias apreciables al comparar nuestros resultados con los obtenidos en otros laboratorios, por lo que se realizó la cuantificación de pigmentos del RC de cianobacterias en colaboración con el Prof. A. R. Holzwarth (Max-Planck-Institut für Strahlenchemie, Mülheim an der Ruhr, Alemania). En este método, los pigmentos fueron extraídos con 50% de tetrahidrofurano (Merck) y la suspensión se sonicó durante 5 min en un baño de ultrasonidos (Bransonic 220) previamente a ser centrifugados durante 5 min a 3.000 rpm en una centrífuga Beckman TJ-6. La columna utilizada fue Nucleosil-5-C18 (4,6 x 125 mm) (Shimadzu). La detección se llevó a cabo a 420 nm en un detector Shimadzu SPD-6AV.

La columna se equilibró durante 3 min con la fase móvil A (100% metanol). La muestra se inyectó y durante 3 min más se bombeó la misma fase móvil. Después se aplicó un gradiente lineal de 100% de A hasta 100% de B (metanol/tetrahidrofurano, 950/80) durante 5 min. Posteriormente se bombeó la fase móvil B durante 3 min. Para obtener la relación Chl/2 Pheo del complejo PSII RC, se dividió el área relativa bajo los picos de Chl y Pheo y el número resultante fue multiplicado por el factor de calibración 2,38. Este factor se determinó de la siguiente forma: una solución madre de Chl (Sigma) en THF se dividió en dos partes

iguales, una de ellas fue convertida en Pheo mediante adición de ácido clorhídrico, de esta forma las dos soluciones contienen la misma concentración (el error cometido por la adición del HCl es menor al 0,1 %), se reprodujeron las condiciones cromatográficas de los pigmentos de RC y se compararon las áreas de ambos pigmentos. Este método no necesita una determinación previa de los coeficientes de extinción de Chl ni de Pheo.

4.3. Medidas de actividad

Algunas de las partículas aisladas en este trabajo como las membranas tilacoidales y el complejo OEC, conservan la capacidad de desprender oxígeno, característica fundamental del PSII como respuesta a la iluminación. Esta propiedad es de gran utilidad ya que es indicativa del grado de pureza y de la integridad de una preparación. Tras su purificación, el centro de reacción del PSII pierde esta capacidad como consecuencia del desprendimiento del Mn, por esta razón su actividad se determina midiendo otros parámetros.

4.3.1. Evolución de oxígeno

Estas medidas se realizaron mediante técnicas polarográficas, utilizando un electrodo de oxígeno tipo Clark (Fig. 14) acoplado a una cubeta termostatzada con un baño circulante a 24°C. Este tipo de electrodo consta de un cátodo de platino y un ánodo de plata inmersos en un electrolito. Ambos electrodos están colocados en un disco de plástico, el cátodo en el centro de una cúpula y el ánodo en una ranura circular. El sistema químico se encuentra aislado del medio ambiente por una delgada membrana de teflón permeable al oxígeno. La membrana también atrapa una fina capa del electrolito (solución de KCl) sobre la superficie de los electrodos. Generalmente se usa un papel espaciador debajo de la membrana para conseguir una capa uniforme del electrolito entre el cátodo y el ánodo.

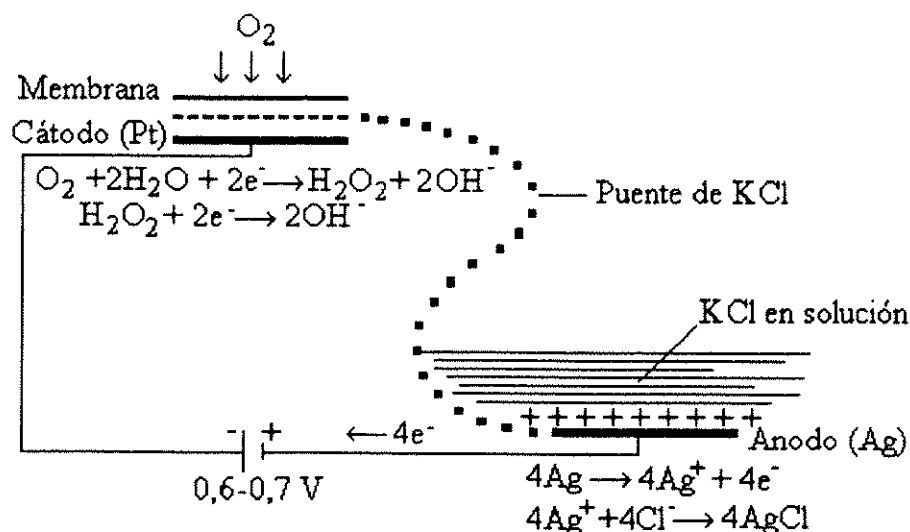


Figura 14: Electrodo de oxígeno tipo Clark.

Cuando se aplica un pequeño voltaje a través de estos electrodos, el platino se hace negativo con respecto a la plata, el flujo de corriente inicial es despreciable y el platino se polariza (adopta el potencial aplicado externamente). Si se incrementa el potencial a 600-700 mV, el oxígeno es reducido en la superficie de platino, inicialmente a H_2O_2 , de esta forma la polaridad tiende a descargarse según los electrones son cedidos al oxígeno (que actúa como aceptor de electrones). La corriente que circula es proporcional al oxígeno consumido por el cátodo y se mide como un voltaje en un registrador.

La fuente de iluminación fue un proyector (Reflecta) que proporcionó una intensidad de luz de $4.000 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Acoplado al electrodo se utilizó un registrador (Linseis) para medir las actividades de evolución de oxígeno.

El tampón de medida fue 10% (p/v) glicerol, 10 mM $MgCl_2$ y 10 mM Hepes (pH 7,0). Como aceptor artificial de electrones se empleó 2,6-diclorobenzoquinona (DCBQ), en una disolución concentrada de 8,9 mg/ml, disuelto en etanol y preparada en el día. La muestra se diluyó con el tampón de medida a una concentración de 5-15 μg de Chl en un volumen final de 3 ml. En el momento de realizar la medida se añadieron 30 μl de la solución concentrada de DCBQ. La concentración final de etanol en la suspensión de medida fue del 0,1%.

4.3.2. Complejo PSII RC

El donador primario del centro de reacción del fotosistema II (P680) es capaz de transferir electrones a una de las feofitinas que actúa como aceptor primario, convirtiendo la energía de excitación en energía química. Esta transferencia de electrones puede ser seguida espectrofotométricamente viendo los cambios de absorbancia inducidos por luz (fotoacumulación de Pheo) en presencia de un donador de electrones artificial. También se puede seguir observando los cambios de absorbancia de un aceptor artificial en presencia de un donador de electrones artificial.

a.-Fotoacumulación de feofitina

La fotoacumulación de Pheo se observó mediante un espectro diferencial de luz menos oscuridad. El espectro se realizó en un espectrofotómetro SLM Aminco DW-2000 (SLM Instruments, Rochester, NY) de doble haz y doble longitud de onda a 4°C. En una cubeta de 1 cm de paso de luz, se añadieron 250 µl del complejo PSII RC a una concentración de 10 µg/ml de Chl, 2 µl de una disolución 0,25 mM de metilviológeno y 2 µl de una disolución saturada de Na₂S₂O₄. La cubeta se cubre con parafilm y se agita para mezclar bien todos los componentes. Una vez homogeneizado se realiza un espectro de 500 a 750 nm que constituye la línea base. A continuación, la cubeta se introduce rápidamente en hielo y se ilumina durante 30 s desde la parte superior con un proyector (Reflecta). La intensidad de luz en la superficie de la cubeta fue de 10.000 µE .m⁻² .s⁻¹. Al finalizar los 30 s de iluminación se registra el espectro, obteniéndose, así, el espectro diferencial luz menos oscuridad.

b.-Transporte electrónico secundario

Las actividades de transporte electrónico secundario en estado estacionario fueron ensayadas usando 0,86 µg/ml de DPC y 40 mg/ml de SiMo como donador y aceptor artificiales de electrones, respectivamente (Barber y col., 1987; McTavish y col., 1989). La reducción de SiMo fue seguida por el incremento de absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro SLM Aminco DW-2000. Las suspensiones del complejo PSII RC fueron diluidas en tampón 60 mM Tris-HCl, pH 8,5, más 0,025% (p/v) TX-100 hasta una concentración de 0,7 µg/ml de Chl y se iluminaron lateralmente con una lámpara acoplada al espectrofotómetro. La luz actínica se filtró a través de un filtro de corte Schott RG665 y otro de calor Schott KG3. La intensidad de luz roja en la superficie lateral de la cubeta de medida

fue de $150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. También fue necesario colocar un filtro de corte Schott BG39 en el paso de luz hacia el fotomultiplicador. La concentración de SiMo reducido en un periodo de iluminación se calculó usando un coeficiente de extinción $\epsilon = 4,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 600 nm (Barber y col., 1987), teniendo en cuenta que para reducir completamente una molécula de SiMo se necesitan cuatro electrones.

4.4. Determinación de los isómeros de β -caroteno por HPLC

La determinación de los isómeros *cis* y *trans* del β -caroteno se realizó en varios complejos proteicos purificados a partir de la cianobacteria *P. laminosum*: membranas tilacoidales, OEC y PSII RC.

Todas las muestras se extrajeron de igual forma en 90% de metanol, se sonicaron durante 2 min y posteriormente se centrifugaron en la microfuga durante 5 min. El sobrenadante fue transferido a otro eppendorf donde se añadieron 100 μl de éter de petróleo. El β -caroteno junto con bastante parte de Chl y Pheo pasaron a la nueva fase, la cual fue recogida con mucho cuidado y se llevó a un nuevo eppendorf. El extracto se llevó a sequedad con N_2 líquido y el residuo seco fue resuspendido en acetona al 80%. Este material fue inyectado en la columna de HPLC, Zorbax ODS, según el método descrito anteriormente en el apartado 4.2.4.

Por otra parte, se repitió la medida en otro cromatógrafo de HPLC (Waters 600, Millennium, Milford, MA) con el detector de Diode-Array 996 y la columna cromatográfica 8NVC18 también de Waters, posibilitando la determinación del espectro de absorción de cada uno de los picos cromatográficos, es decir, de cada uno de los pigmentos que componen el extracto y así, determinar si la aparición de dos picos en el tiempo de elución del β -caroteno se debe a uno o dos isómeros diferentes.

5. Técnicas espectroscópicas

La espectroscopia molecular puede ser definida como el estudio de la interacción de ondas electromagnéticas con la materia. Como consecuencia de esta interacción la materia puede absorber, emitir o dispersar radiación, modificar su índice de refracción, etc.

En fotosíntesis, los procesos originados por las radiaciones luminosas al interaccionar con los diferentes cromóforos unidos a proteínas, son la base de los sucesos fotofísicos/fotoquímicos que tienen lugar en los fotosistemas. Por ello, la utilización de técnicas espectroscópicas es fundamental para caracterizar y comprender el funcionamiento de los diferentes tipos de partículas y complejos cromoproteicos aislados.

A continuación se exponen las técnicas espectroscópicas utilizadas en este trabajo.

5.1. Espectroscopia de absorción electrónica a temperatura ambiente y a 10K

Absorción a temperatura ambiente

Los espectros de absorción de cada uno de los complejos proteicos purificados, según los apartados 3 y 4 de Materiales y Métodos, fueron fundamentales en todos los pasos de purificación, así como una gran ayuda en el estudio de estas proteínas de membrana. Los espectros de absorción en la zona del visible y ultravioleta de la radiación electromagnética se realizaron en un espectrofotómetro de fotodiodos DU-640 (Beckman Instruments, Fullerton, CA) o en un SLM Aminco DW-2000, utilizando cubetas de 1 cm de paso de luz. Los tratamientos espectrales, segundas derivadas, deconvolución en gaussianas, etc. se realizaron mediante el programa GRAMS (versión 386) para PCs (Galactic Industries Corporation, Salem, NH).

Absorción a temperaturas criogénicas (10K)

Los niveles energéticos de los distintos pigmentos localizados en las proteínas de membranas fotosintéticas se encuentran muy poco diferenciados, por lo que las transiciones entre ellos producen solapamiento de bandas de absorción debido a varios componentes. Además, este tipo de transiciones pueden ir acompañadas de transiciones entre niveles de energía vibratorios y rotacionales e incluso estar modificadas por interacciones pigmento-

proteína, pigmento-pigmento y pigmento-solvente, originando espectros de absorción moleculares a temperatura ambiente de gran complejidad.

Para definir mejor los componentes de cada banda de los distintos complejos proteicos purificados, los espectros se realizaron a 10K. Al bajar la temperatura se produce una homogeneización de las transiciones energéticas del sistema, resultando en un estrechamiento de las bandas, favoreciendo así la resolución espectral.

Los espectros de absorción se realizaron en el laboratorio del Prof. A. R. Holzwarth, en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 320 equipado con un criostato para He líquido (Leybold Heraeus). Se utilizaron cubetas de 3 mm de paso de luz y la anchura de rendija fue de 0,2 mm correspondiendo a una resolución espectral de 0,7 nm. Para eliminar el ruido de fondo producido por la luz se colocó un filtro de corte Schott OG515 en la entrada del detector. Las muestras se mezclaron con glicerol al 70% (v/v) de concentración final, consiguiendo así que la muestra se comporte a baja temperatura como un sólido cristalino. Las segundas derivadas y las deconvoluciones por gaussianas de cada uno de los espectros se realizaron con el programa GRAMS.

5.2. Espectroscopia de fluorescencia a baja temperatura

Los espectros de fluorescencia de los distintos complejos proteicos purificados de *P. laminosum* se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro Spex Fluorolag equipado con un recipiente Dewar cilíndrico de N₂ líquido. Las muestras (10 µg de Chl) se mezclaron con glicerol al 70% (v/v) de concentración final en un volumen total de 1 ml y se mantuvieron a 77K en el Dewar.

Para realizar los espectros de emisión de fluorescencia (640-800 nm), la muestra fue excitada a 620 nm y las rendijas de los detectores tanto de excitación como de emisión fueron de 5 nm y se utilizó un filtro de corte a 450 nm acoplado al instrumento. Para llevar a cabo los espectros de excitación (545-730 nm) se fijó la longitud de onda de emisión a 740 nm, las rendijas fueron de 5 nm y el filtro de corte utilizado fue a 450 nm. Estas medidas se realizaron en el laboratorio del Prof. A. R. Holzwarth.

5.3. Dicroísmo circular (CD)

Una molécula es considerada ópticamente activa si la interacción con la luz polarizada a la derecha (R) es diferente a su interacción con la luz polarizada a la izquierda (L). Así, el dicroísmo circular puede ser detectado como una diferencia de absorción $\Delta\epsilon = \Delta\epsilon_L - \Delta\epsilon_R$. Muy pocos cromóforos son intrínsecamente activos ópticamente. La mayoría de la

actividad óptica de los cromóforos proviene de sus interacciones con grupos vecinos distribuidos asimétricamente. La interpretación del espectro de dicroísmo circular es compleja pues una señal de dicroísmo circular indica asimetrías moleculares. Por ejemplo, la Chl monomérica tiene un débil espectro de dicroísmo circular pero interacciones Chl-Chl o Chl-proteína pueden dar señales mucho más intensas.

Una de las principales aplicaciones de los espectros de dicroísmo circular se basa en su sensibilidad a la estructura secundaria de la proteína y por tanto, una técnica muy apropiada para la detección de cambios conformacionales de las mismas. La actividad óptica de las muestras se midió en el laboratorio del Dr. J.M. Ramírez (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid). Estas medidas se realizaron en dos rangos de la radiación electromagnética:

- Dicroísmo circular en el rango del visible
- Dicroísmo circular en el rango del ultravioleta

El manejo de datos se llevó a cabo con los programas SOFT W (J-700 Series) y GRAMS.

Dicroísmo circular en el visible

Mediante esta técnica se determinaron las interacciones excitónicas entre los pigmentos dentro de los complejos proteicos. Las medidas se realizaron en un dicrógrafo JASCO J-720 con lámpara de Xe (Jasco Power Supply 91N) en cubetas de 0,5 cm de paso de luz. Los espectros se llevaron a cabo en el rango de 350 a 750 nm a una velocidad de 50 nm/min. Antes de realizar el espectro se midió la línea base con tampón E [0,03% (p/v) DM, 1,5% (p/v) taurina, 200 mM sacarosa y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5)] que fue sustraída del espectro en presencia de la muestra. La concentración de las muestras fue de 9,65 µg Chl/ml ($OD_{675nm}=0,8$). En la Fig. 15 se muestra el esquema de un dicrógrafo convencional.

Dicroísmo circular en el ultravioleta

A partir de esta técnica se pudo determinar la estructura secundaria de la proteína de cada uno de los complejos. Los espectros se llevaron a cabo en el rango de 200 a 250 nm, a una velocidad de 50 nm/min y fue necesaria la presencia de N₂ en el sistema para evitar la formación de O₃. Las medidas se realizaron en cubetas de 0,1 mm. Antes de realizar el espectro de absorción se calculó la línea base con todos los reactivos químicos excepto la proteína para posteriormente sustraerla del espectro experimental. Las muestras fueron

medidas a una concentración de 9,65 $\mu\text{g Chl/ml}$ ($\text{OD}_{675\text{nm}}=0,8$) y 4,8 $\mu\text{g Chl/ml}$ ($\text{OD}_{675\text{nm}}=0,4$).

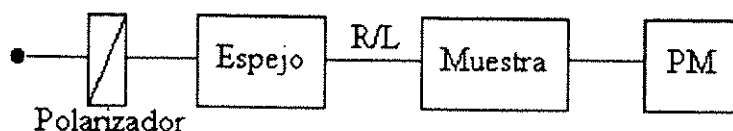


Figura 15: Esquema de un dicrógrafo convencional

5.4. Espectroscopia "surface-enhanced resonance Raman scattering" (SERRS)

El efecto SERRS se produce cuando complejos iónicos, moléculas o cromóforos son adsorbidos en una superficie rugosa de Au, Ag o Cu la cual es excitada mediante un láser que se encuentra en resonancia con una transición electrónica del material adsorbido, proporcionando así un aumento importante de la señal. Estudios pioneros con moléculas de piridina en electrodos de plata anodizados (Fleishmann y col., 1974; Albrecht y col., 1977) consiguieron una mejora de 10^6 veces en la intensidad sobre una señal de dispersión Raman normal.

Las principales ventajas del efecto SERRS incluyen una sensibilidad analítica extrema, selectividad molecular, minimización de la fluorescencia y la variación de la intensidad de las señales con la distancia entre la molécula que origina la señal y el electrodo dando lugar a trabajos topológicos. La concentración de muestra utilizada se encuentra en el rango de la utilizada en espectroscopia de fluorescencia o incluso menor, que contrasta con la alta concentración de muestra necesaria para observar señales Raman. Además, los cromóforos pueden ser seleccionados o discriminados según la longitud de onda de excitación utilizada y no existe interferencia por la dispersión Rayleigh (elástica) ya que la dispersión Raman es inelástica.

La dispersión Raman se produce a partir del dipolo inducido (μ), originado por la interacción del campo electromagnético de la luz (E) con la polarizabilidad molecular (α). La teoría electromagnética propone un incremento del campo electromagnético debido a la adsorción de la biomolécula a una superficie metálica. Las propiedades espectroscópicas de una molécula próxima a una superficie pueden ser modificadas de tres formas:

- 1.-Al polarizarse la superficie, el campo creado produce un aumento del campo electromagnético.

2.-El campo electromagnético polariza la molécula adsorbida, ésta produce vibraciones que crean oscilaciones electrónicas en la superficie, produciendo una radiación que si se encuentra en resonancia con la frecuencia incidente incrementa el campo electromagnético y la intensidad de la luz emitida.

3.-La transferencia de energía de las moléculas adsorbidas produce cambios en los tiempos de vida de los estados excitados.

Esta técnica proporciona una gran información sobre interacciones superficiales, tipos de estructuras químicas que conducen a una mejora en transferencia electrónica, efectos de desnaturalización, procesos redox, actividad enzimática, excitación selectiva de cromóforos y su localización y orientación en la membrana y estados de espín. Todo esto hace que la técnica SERRS sea una herramienta muy útil para el estudio de membranas fotosintéticas y de complejos proteicos aislados a partir de éstas (Picorel y col., 1991; Seibert y col., 1992).

La fuente de excitación utilizada, al igual que en espectroscopia Raman convencional y en resonancia Raman, es un láser. En la mayoría de los casos se emplean láseres continuos de gas tales como Ar^+ o Kr^+ , también se pueden utilizar láseres pulsados para obtener espectros resueltos en el tiempo. La introducción de los láseres de colorantes y muy recientemente los de Titanio-Zafiro han aumentado enormemente las posibilidades de excitación. Existen dos geometrías comúnmente utilizadas en el sistema de iluminación de muestras. En la primera, el haz del láser incide directamente sobre la muestra y la luz dispersada se recoge con un ángulo de 90° con respecto al haz incidente; en la segunda, el haz del láser incide en un espejo, éste lo dirige hacia la muestra con un ángulo de 90° y así la luz dispersada es recogida con un ángulo de 180° con respecto al haz incidente en la muestra (Fig. 16).

La elección del espectrofotómetro y detector es fundamental cuando estas técnicas son aplicadas a moléculas biológicas. La irradiación de la muestra puede provocar una rápida degradación de la biomolécula, aunque tal efecto puede ser minimizado mediante un movimiento de rotación del electrodo. Actualmente, la posibilidad de detección por multicanal reduce también los problemas de fotodegradación.

El aparato utilizado en las medidas fue un triple espectrofotómetro Spex 1877 de fotodiodos (modelo 1460, Princeton Applied Research). La luz fue recogida con una lente de cámara $f/1,2$ con una geometría de 180° . Las medidas se realizaron a diferentes longitudes de onda de excitación proporcionadas por diferentes láseres, Kr^+ (Coherent Radiation Inc., Model Innova 90K, 406,7 nm y 413 nm), Ar^+ (Coherent Radiation Inc., Model Innova 200, 488 nm y 514 nm) y láser de colorantes (Coherent Radiation Inc., Coherent CR-599 Dye Laser, excitado con el láser de Ar^+ a 514 nm para trabajar a 700 nm).

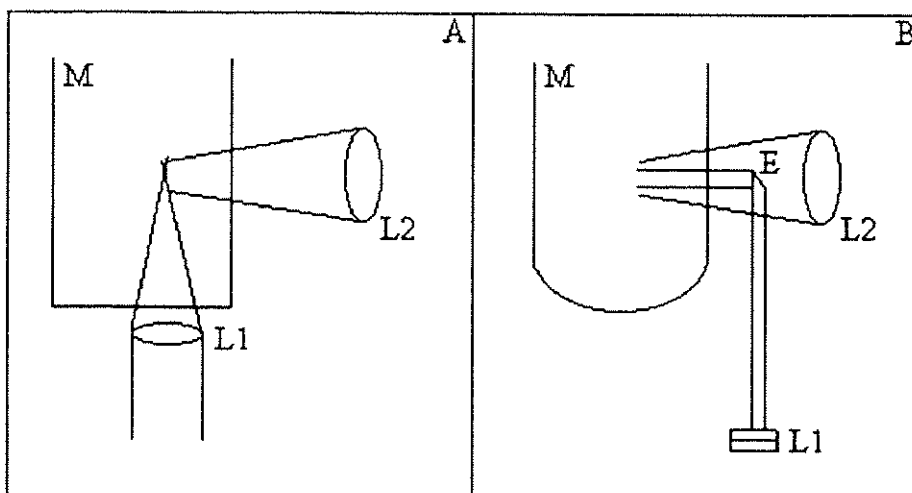


Figura 16: Esquema de la geometría de iluminación en espectroscopia Raman. A: Iluminación a 90° ; B: Iluminación a 180° . Componentes: M, cubeta de muestra; L_1 , lentes que focalizan el haz del láser; L_2 , lentes que focalizan el haz de dispersión Raman; E, pequeño espejo que dirige el haz del láser a la muestra.

Existen varios tipos de superficies de plata activas en SERRS:

- Láminas de plata: pueden prepararse láminas al vacío por deposición de partículas de Ag en una superficie de cuarzo. El grado de recubrimiento de la lámina, temperatura del sustrato cristalino y el grosor de la lámina son parámetros importantes en la actividad SERRS de dichas superficies.

- Coloides de plata: pueden prepararse por reducción de una solución de AgNO_3 con un agente reductor como citrato de sodio o tetrahidruro borato (III) de sodio. Aunque se trate de un procedimiento sencillo, no es muy reproducible y además es imprescindible que el recipiente esté perfectamente limpio, si no la Ag sólida formaría agregados y precipitaría.

- Electrodos de Ag: son preparados sellando un cable o lámina en un tubo de cristal, para ello se usó una resina inerte (Torr seal, Varian). A continuación, la superficie del electrodo es pulida con una suspensión de alúmina en agua, comenzando por el grano más grueso ($5\mu\text{m}$) y finalizando por el más fino ($0,05\mu\text{m}$). La superficie del electrodo tras el pulido presenta una apariencia como la de un espejo. Entonces el electrodo es tratado mediante ciclos de oxidación-reducción en una celda electroquímica. Este proceso produce una superficie rugosa en el electrodo de Ag con partículas de aproximadamente $250\text{ \AA}$ de diámetro. Tras el proceso de anodización del electrodo, éste fue sumergido en una suspensión del

material sujeto de estudio durante un tiempo conveniente y el exceso de material eliminado bien por contacto suave de un papel fino con el extremo del electrodo, permitiendo que el líquido humedezca el papel por capilaridad, o bien, mediante pequeñas sacudidas del electrodo para eliminar el exceso de líquido que se encuentra sobre su superficie. Esta técnica de anodización también se utiliza para los electrodos de láminas de plata por deposición.

El tiempo de inmersión y la concentración de la suspensión determinan el grado de recubrimiento de la superficie. Con el objeto de conseguir una mayor resolución espectral y reducir la fotodegradación de los cromóforos excitados, el electrodo se sumerge en un vaso Dewar con N_2 líquido para tomar los espectros. En nuestros experimentos se utilizaron electrodos de láminas de plata por deposición.

5.5. Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo

La capacidad de producir pulsos de luz intensos de corta duración mediante el uso de láseres, ha proporcionado a los investigadores una herramienta muy útil en el estudio a nivel molecular de la dinámica de procesos ultrarápidos, tanto físicos como químicos, en escalas de tiempo cada vez menores. Las primeras aplicaciones de estos sistemas de cinética rápida fueron en las áreas de fotoquímica y fotofísica, donde fue posible por vez primera estudiar procesos de relajación vibracional o electrónica en rangos de tiempo menores que nanosegundos (ns). El uso de la espectroscopia resuelta en el tiempo se aplicó rápidamente a diferentes sistemas biológicos, contribuyendo de forma espectacular al aumento de nuestro conocimiento a nivel molecular de un amplio rango de procesos biológicos. Así, esta técnica se ha usado para el estudio de la dinámica interna de proteínas, de ácidos nucleicos, interacciones proteína-ácidos nucleicos, transferencia de electrones, etc. El uso de la espectroscopia de tiempo resuelto en fotosíntesis es fundamental para comprender los procesos de transferencia electrónica y de energía. Este hecho es debido a que los rangos de tiempo en los que estos procesos tienen lugar en los centros de reacción y en las antenas son de femto (fs), pico (ps) y nanosegundos (ns). Los experimentos realizados con esta técnica se llevaron a cabo en colaboración con el laboratorio del Prof. A. R. Holzwarth.

Las cinéticas de fluorescencia se llevaron a cabo en un aparato de "single-photon-counting", según el método descrito por Wendler y col. (1987), que permite un tiempo de resolución de 3-4 ps (Fig. 16). La muestra se introdujo en un recipiente refrigerado en oscuridad y recirculando mediante una bomba peristáltica (10 ml/min) a través de una cubeta de medida termostatzada de dimensiones $1,5 \times 1,5 \times 1,5 \text{ mm}^3$ (Fig. 17). Las cinéticas de fluorescencia se midieron a una única longitud de onda de excitación de 660 nm y el tiempo de ventana utilizado fue de 2 ns, proporcionando así una buena resolución para los componentes

de tiempo de vida corto e intermedio. La resolución espectral fue de 4 nm en emisión y se tomaron medidas cada 5 nm. La intensidad de excitación fue muy baja (2-10 mW), estimando que menos de 10^{-8} RCs fueron excitados por pulso con una velocidad de repetición de 800 kHz.



Figura 17: Detalle del sistema láser utilizado para realizar las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo.

Para llevar a cabo las medidas, las muestras se resuspendieron en sus respectivos tampones, el PSII RC en 6 ml de tampón E [0,03% (p/v) DM, 1,5% (p/v) taurina, 200 mM sacarosa y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5)] y el complejo OEC en 10 ml del D [0,03% (p/v) DM y 20 mM Tris/HCl (pH 8,0)] a una densidad óptica de 0,8 en 1 cm de paso de luz, a 675.5 y 674 nm, respectivamente. Todos los experimentos se llevaron a cabo en condiciones anaeróbicas, mediante mezcla con la suspensión de muestra de 5 mM de glucosa, 0,1 mg/ml de glucosa oxidasa y 0,05 mg/ml de catalasa para posteriormente sellar la cubeta. A continuación, la cubeta se incubó durante 10 min antes de realizar las medidas para asegurar un consumo máximo de oxígeno del medio. Las medidas se realizaron a 277K.

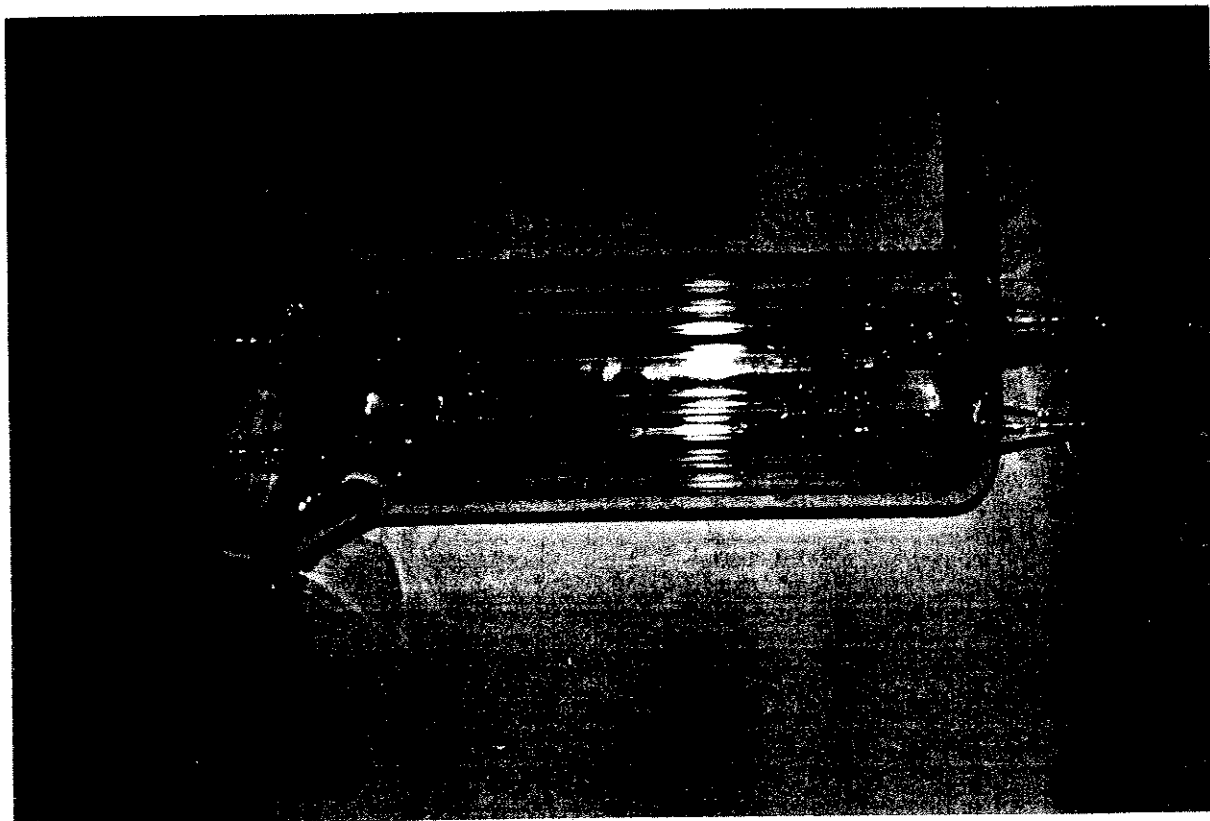
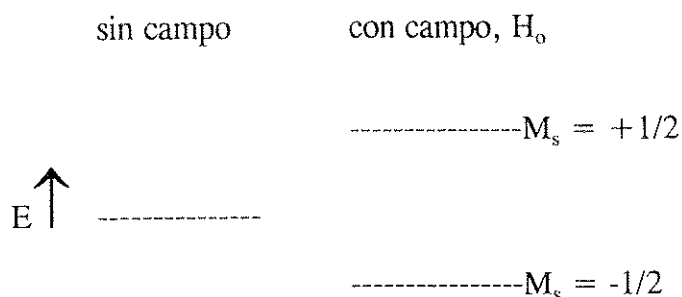


Figura 18: Detalle de la cubeta de medida utilizada en fluorescencia resuelta en el tiempo.

5.6. Espectroscopia de resonancia paramagnética del electrón (EPR)

La técnica de resonancia paramagnética del electrón (EPR) es un tipo de espectroscopia de absorción en la que una radiación con frecuencia de microondas induce transiciones de los espines electrónicos sin aparear. La separación de energías magnéticas es causada por un campo magnético estático. Los electrones sin aparear están presentes en moléculas complejas, radicales libres, estados electrónicos tripletes, etc. En ausencia de un campo magnético externo, el electrón libre puede existir en uno de los dos estados $+1/2$ ó $-1/2$, de igual energía y por lo tanto, está degenerado. Al imponerle un campo magnético estático externo, H_0 , se elimina la degeneración y se produce una precesión del electrón. Se establecen dos niveles de energía:



El estado de menor energía tiene su momento magnético de espín alineado en la dirección del campo magnético y corresponde al número cuántico $M_s = -1/2$. La diferencia de energía entre los dos niveles viene dada por:

$$\Delta E = h\nu = g \beta_N H_0$$

donde β_N es el magnetón de Bohr y g es un factor espectroscópico de separación, su valor es una función del medio circundante al electrón (muy cercano a 2 para un electrón libre). Las transiciones de un estado a otro pueden inducirse sometiendo al electrón a la acción de una radiación electromagnética en el rango energético de las microondas, aproximadamente 10.000 MHz.

Los principales componentes de un espectrómetro EPR (Fig. 19) son una fuente de radiación de microondas de frecuencia constante y amplitud variable, un medio para aplicar las microondas a la muestra, un campo magnético homogéneo y estable para obtener la separación del campo magnético, un campo superpuesto al campo estable para recorrer en forma continua la absorción de resonancia de la muestra, un detector para medir la intensidad del campo de microondas absorbida y un osciloscopio o un registrador gráfico x-y.

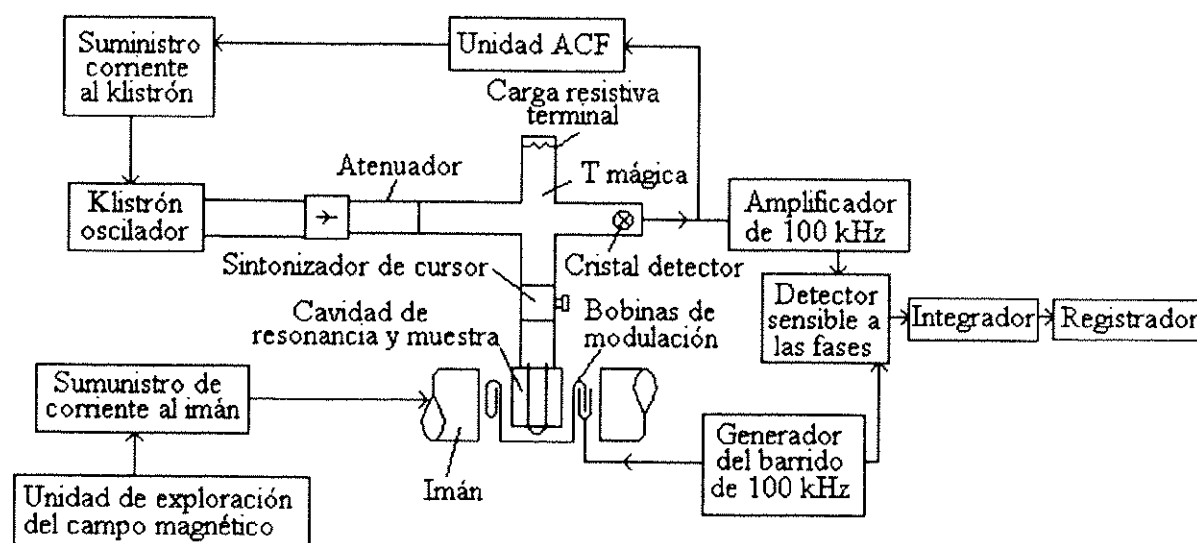


Figura 19: Esquema de un espectrómetro EPR

La espectroscopia de EPR monitoriza directamente los electrones desapareados, siendo muy utilizada, por tanto, en el estudio del transporte electrónico, permitiendo observar los componentes con electrones paramagnéticos separadamente del resto de componentes diamagnéticos. Los estados paramagnéticos de la mayoría de las especies en PSII son

generados mediante iluminación. Esta técnica es extremadamente discriminadora aunque se necesitan concentraciones de muestra relativamente elevadas.

Las medidas de EPR fueron llevadas a cabo en un espectrómetro Varian E-112, que trabaja en la banda X a 4,5K utilizando un criostato de He de flujo constante (modelo ESR-900, Oxford Instruments). El centro de reacción del fotosistema II fue colocado en tubos de cuarzo de 0,3 x 26 cm a una concentración de 0,15 mg/ml. Primero se congeló en N₂ líquido e inmediatamente fue transferido al criostato de He. Cuando la temperatura fue estable a 4,5K, las muestras se iluminaron con un proyector de 150 W para inducir las especies paramagnéticas.

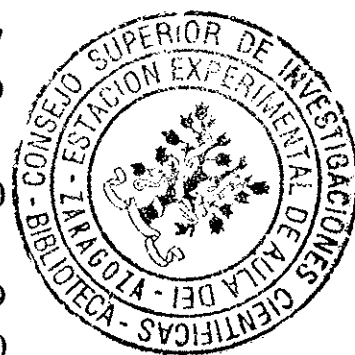
6. Método de desnaturalización reversible con detergentes del centro de reacción del fotosistema II de plantas

Una vez purificado el centro de reacción del fotosistema II de remolacha, éste fue desnaturalizado parcialmente mediante incubación en el tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) más 0,05% (p/v) TX-100. La mezcla se mantuvo a 4°C durante 30 h, momento en que la banda de menor energía del complejo se había desplazado de 675,5 a 671,5 nm. Una vez conseguida la desnaturalización del complejo, se llevó a cabo su renaturalización fijando el centro de reacción a una columna (1,6 x 4 cm) de intercambio aniónico Q-Sepahore Fast Flow, previamente equilibrada con 50 mM Tris-HCl (pH 7,2). La muestra fue lavada con 100 ml del tampón anterior más 2 mM DM a un flujo de 2,5 ml/min y una vez intercambiado el detergente, la muestra fue eluida con 200 mM NaCl y posteriormente dializada contra tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7,2).

RESULTADOS

INDICE RESULTADOS

1. Fraccionamiento del fotosistema II de la cianobacteria	
<i>P. laminosum</i>	81
1.1. Preparación de membranas fotosintéticas	81
1.1.1. Tratamiento con lisozima	81
1.1.2. Sonicación	83
1.2. Propiedades bioquímicas de las membranas fotosintéticas	84
1.2.1. Identificación de pigmentos de membranas tilacoidales	84
1.2.2. Contenido proteico. SDS-PAGE	87
1.2.3. Medida de actividad	88
1.3. Características espectroscópicas de las membranas fotosintéticas	88
1.3.1. Fluorescencia a baja temperatura (77K)	88
1.4. Aislamiento del complejo OEC	89
1.5. Propiedades bioquímicas del complejo OEC	101
1.5.1. Identificación de pigmentos	101
1.5.2. Cuantificación de pigmentos	103
1.5.3. Contenido proteico. SDS-PAGE	104
1.5.4. Medida de actividad	105
1.6. Características espectroscópicas del complejo OEC	105
1.6.1. Espectroscopia de absorción a baja temperatura	106
1.6.2. Espectroscopia de fluorescencia a baja temperatura	107
1.6.3. Dicroísmo circular	109
1.6.4. Espectroscopia "surface-enhanced resonance Raman scattering" (SERRS)	110
1.6.5. Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo	119
1.7. Purificación del complejo proteico PSII RC	120
1.8. Propiedades bioquímicas del complejo proteico PSII RC	126
1.8.1. Identificación de pigmentos	126
1.8.2. Cuantificación de pigmentos	127



1.8.3. Contenido proteico. SDS-PAGE	129
1.8.4. Medidas de actividad	130
1.9. Características espectroscópicas del complejo proteico PSII RC	132
1.9.1. Espectroscopia de absorción a baja temperatura	132
1.9.2. Espectroscopia de fluorescencia a baja temperatura	133
1.9.3. Dicroísmo circular	135
1.9.4. Espectroscopia "surface-enhanced resonance Raman scattering" (SERRS)	137
1.9.5. Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo	145
1.10. Repurificación del PSII RC mediante cromatografía de exclusión en FPLC	146
2. Aplicación a la cianobacteria <i>Synechocystis</i> PCC6803	149
2.1. Reconstitución del centro de reacción con β -caroteno	154
3. Complejo PSII RC de plantas superiores	156
3.1. Purificación del complejo PSII RC	156
3.1.1. Espectros de absorción a temperatura ambiente	156
3.2. Mejora de la preparación del centro de reacción de plantas mediante cromatografía de exclusión de FPLC	157
3.3. Desnaturalización reversible del complejo PSII RC de plantas	159

1. Fraccionamiento del fotosistema II de la cianobacteria *P. laminosum*

1.1. Preparación de membranas fotosintéticas

Se siguieron dos procesos diferentes para llegar a obtener membranas tilacoidales, el primero consistió en un tratamiento con lisozima mientras que en el segundo las células fueron rotas mediante sonicación.

1.1.1. Tratamiento con lisozima

Las células se incuban con lisozima, enzima que cataliza la ruptura hidrolítica de los complejos polisacáridos de las paredes celulares, disolviendo así la pared celular y formándose estructuras esféricas denominadas esferoplastos. El posterior choque osmótico provoca la ruptura de los esferoplastos y tras sucesivas centrifugaciones diferenciales, se seleccionan las membranas tilacoidales.

En la Fig. 20 se puede observar el espectro de absorción de las membranas tilacoidales. La preparación muestra varias bandas en el rango del VIS, una de ellas con el máximo de absorción a 671,3 nm es debida a la transición Q_y de la Chl *a*. La localización del máximo de dicha banda pone de manifiesto la mayor o menor presencia de PSI en las membranas, ya que cuanto más desplazado esté hacia el rojo (~680 nm) mayor es el contenido en dicho complejo. Así, consideraremos una buena preparación de membranas enriquecida en PSII cuando dicha banda tenga un máximo entre 671 y 674 nm. También se observan bandas a 622 nm, debida principalmente a transiciones vibracionales de la Chl y a transiciones electrónicas de las ficobilinas, a 437,3 nm y 417,3 nm, debidas fundamentalmente a las transiciones Soret de la Chl *a* (en cianobacterias no existe Chl *b*). Además de estas bandas, se puede observar una amplia banda a 486,5 nm, producida por los carotenoides asociados a las mismas proteínas.

El rendimiento en la obtención de membranas tilacoidales mediante tratamiento con lisozima es considerable, ya que partiendo de 10 l de cultivo (unos 20 g de peso fresco de células) se obtienen unos 40-50 mg de Chl total, calculados usando el coeficiente de extinción $\epsilon = 82 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para 663 nm y en 80% de acetona.

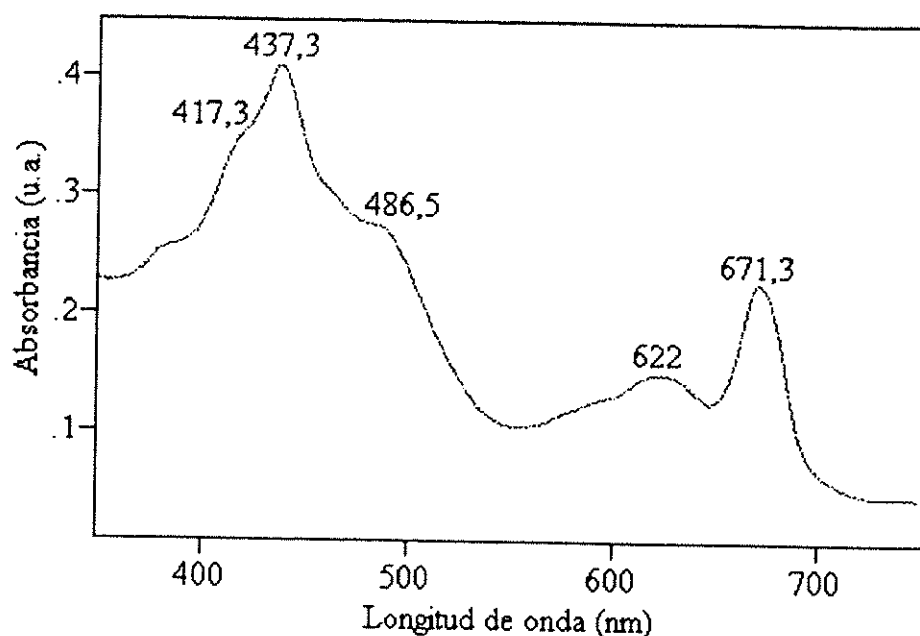


Figura 20: Espectro de absorción electrónica de membranas tilacoidales de *P. laminosum* obtenidas mediante tratamiento con lisozima, en tampón 25% (v/v) glicerol, 10 mM MgCl_2 , 5 mM $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ y 10 mM Hepes, pH 7,5.

La segunda derivada del espectro de absorción de las membranas tilacoidales se muestra en la Fig. 21. Presenta dos componentes bajo la banda de menor energía con mínimos a 680 y 670,5 nm, debidos a la Chl *a* de los complejos de pigmentos-proteínas. También se observan bandas a 491,6 y 460,6 nm, debidas a dos de las transiciones de los carotenoides y a 438,1 y 413 nm, asociadas fundamentalmente a la Chl.

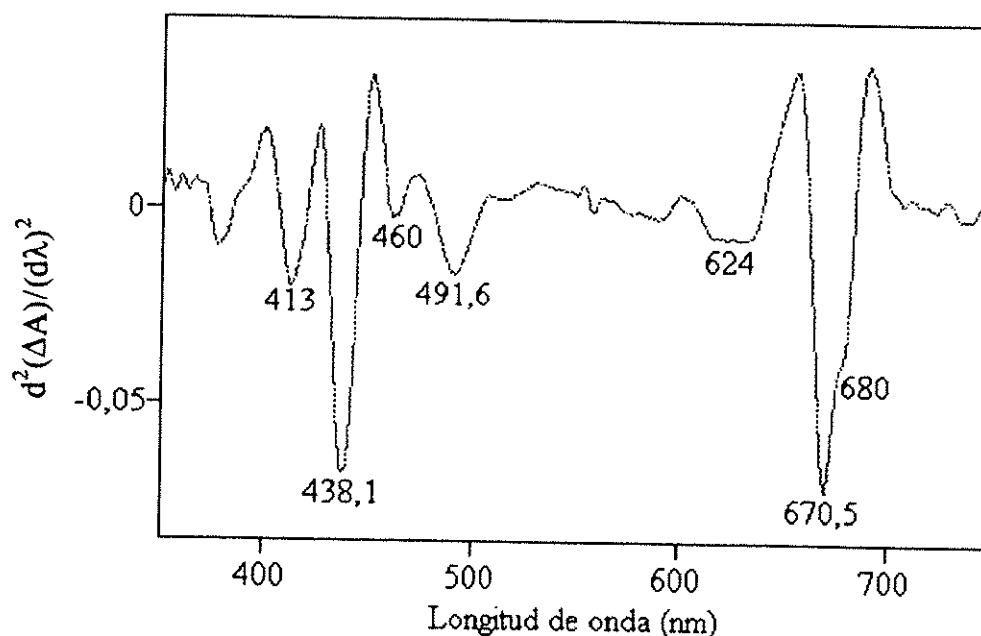


Figura 21: Segunda derivada del espectro de absorción de membranas tilacoidales.

1.1.2. Sonicación

Las células resuspendidas en tampón que contiene sorbitol, $MgCl_2$, EDTA, KH_2PO_4 / K_2HPO_4 y Hepes, pH 7,5 con 1 mM PMSF, se rompen mediante sonicación y tras sucesivas centrifugaciones diferenciales se seleccionan las membranas tilacoidales o membranas fotosintéticas. Se utilizó este nuevo método para reducir la actividad proteolítica activada por la alta temperatura y el tiempo prolongado de incubación, necesarios en el tratamiento con lisozima. Además, cabe destacar el uso del PMSF para reducir aún más la actividad proteolítica.

En la Fig. 22 se muestra el espectro de absorción de las membranas tilacoidales aisladas según este método. Los máximos de absorción son bastante similares a los de la Fig. 20, pero la suspensión presenta mayor turbidez lo que hace que el espectro tenga bastante más dispersión de luz que el obtenido con tratamiento con lisozima. El rendimiento en la obtención de membranas fotosintéticas mediante sonicación de células, es algo menor que el conseguido por tratamiento con lisozima, pues partiendo de 10 l de cultivo se obtiene unos 30-40 mg de Chl total.

Mediante el procedimiento con lisozima se favorece la actividad proteolítica, produciendo una elevada degradación de proteínas, como se puede observar mediante SDS-PAGE de membranas tilacoidales, pero llega a hacerse aún más relevante en los posteriores pasos de purificación. Por este motivo, se decidió romper las células mediante sonicación, reduciendo así la actividad proteolítica que se producía con el método de la lisozima. Por tanto, las posteriores purificaciones se llevaron a cabo partiendo de membranas tilacoidales aisladas mediante sonicación.

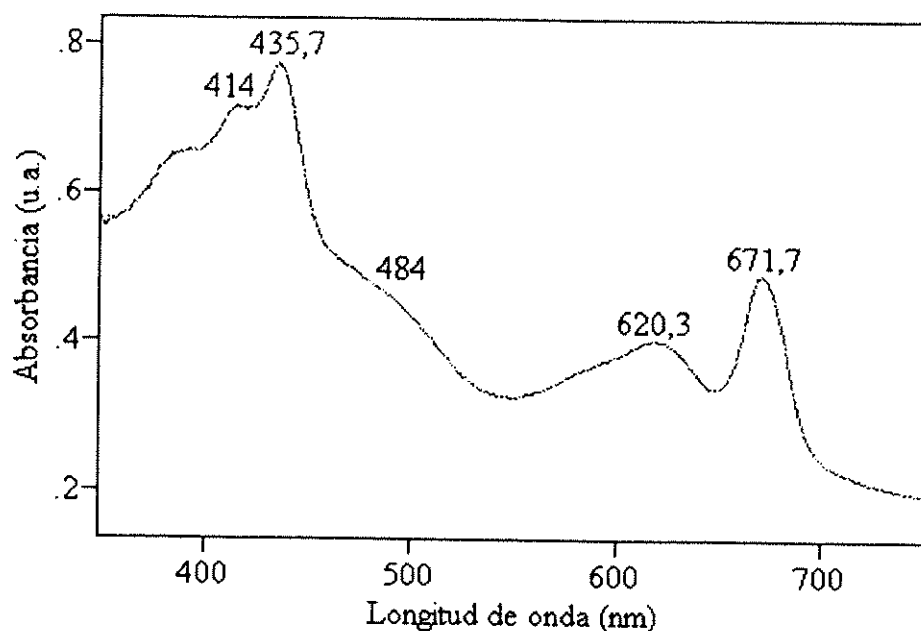


Figura 22: Espectro de absorción electrónica de membranas tilacoidales de *P. laminosum* obtenidas mediante sonicación de células, en tampón 25% (v/v) glicerol, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 y 10 mM Hepes, pH 7,5.

1.2. Propiedades bioquímicas de las membranas fotosintéticas

1.2.1. Identificación de pigmentos de membranas tilacoidales

Mediante el análisis de pigmentos por HPLC se identificaron los principales tipos de pigmentos asociados a las cromoproteínas de las membranas tilacoidales. El método de HPLC usado utiliza como fase móvil los siguientes solventes orgánicos: acetonitrilo, metanol y acetato de etilo. En la Fig. 23 puede observarse un espectro de absorción del extracto de pigmentos de membranas en 80% de acetona, con picos característicos de Chl a 431,6 y 663,6 nm y de β -caroteno a 479,3 nm.

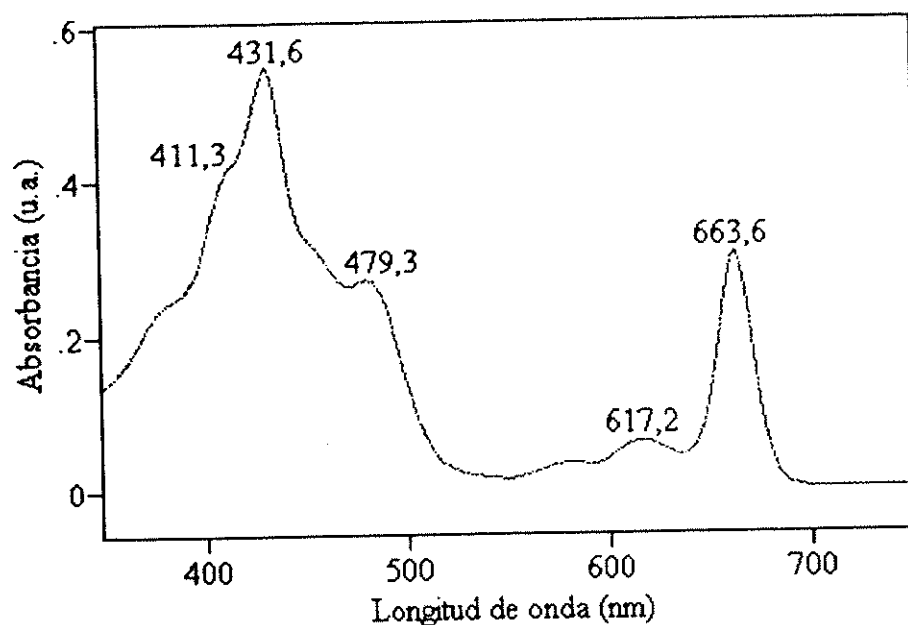


Figura 23: Espectro de absorción electrónica de un extracto acetónico de pigmentos de membranas tilacoidales de *P. laminosum*.

En la Fig. 24 se muestra un cromatograma de los pigmentos separados por HPLC, eluidos en el siguiente orden:

1. Luteína
2. Clorofila
3. Feofitina
4. β -caroteno

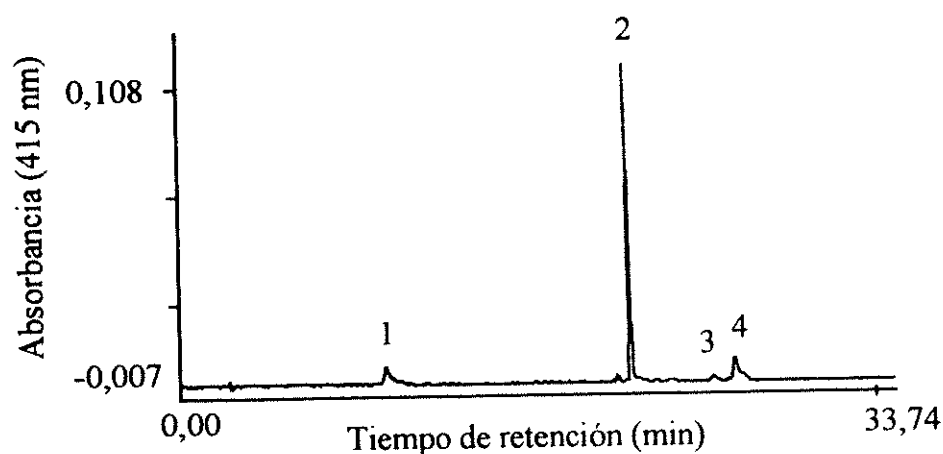


Figura 24: Cromatograma de HPLC de un extracto de pigmentos de membranas tilacoidales de *P. laminosum*.

En el anterior cromatograma no aparece ningún pico debido a las ficobilinas pues se encuentran unidas covalentemente a proteínas, de forma que al extraer los pigmentos en 80% de acetona, éstas permanecen en el sedimento unidas a dichas proteínas. Aparecen dos pequeños picos antes y después del pico de elución de la Chl (2), éstos pueden deberse a una mínima proporción de Chl modificada o degradada.

Mediante un análisis detallado del cromatograma, se observaron dos picos de elución a tiempos próximos pero diferentes (26,2 y 26,5 min), que corresponderían al β -caroteno (Fig. 25). Utilizando un detector de diode-array, se pudo comprobar que los espectros de absorción correspondientes a cada uno de los dos picos de elución presentaban diferencias entre sí (Fig. 26). El espectro de absorción del primer pico de elución (26,2 min) muestra dos bandas a 454,4 y 482,3 nm y un hombro hacia 430 nm mientras que el espectro de absorción del segundo pico (26,5 min) está claramente desplazado hacia el azul con las dos bandas principales a 450,8 y 475 nm y un hombro a 430 nm, además de otra banda a 342,7 nm, característica del β -caroteno en configuración *cis*. Esto indica que el primer pico de elución corresponde al isómero *all-trans* del β -caroteno, mientras que el segundo corresponde a un isómero *cis* del mismo pigmento.

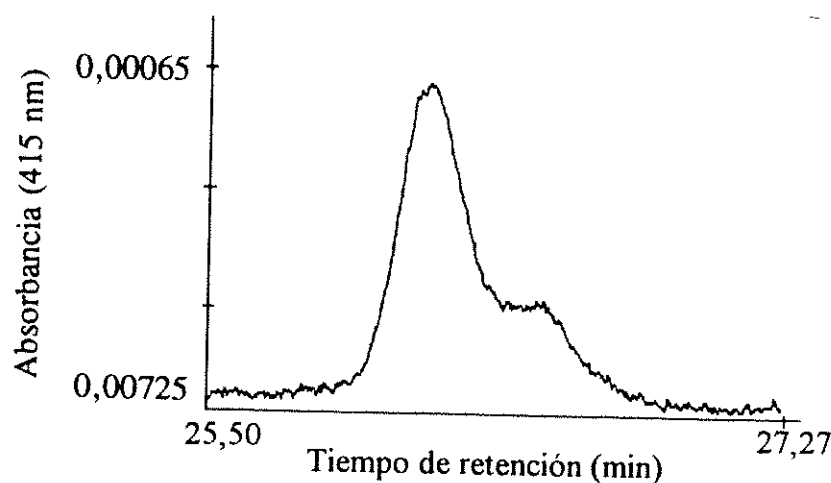


Figura 25: Detalle del cromatograma de HPLC de un extracto de pigmentos de membranas tilacoidales en los tiempos correspondientes al β -caroteno.

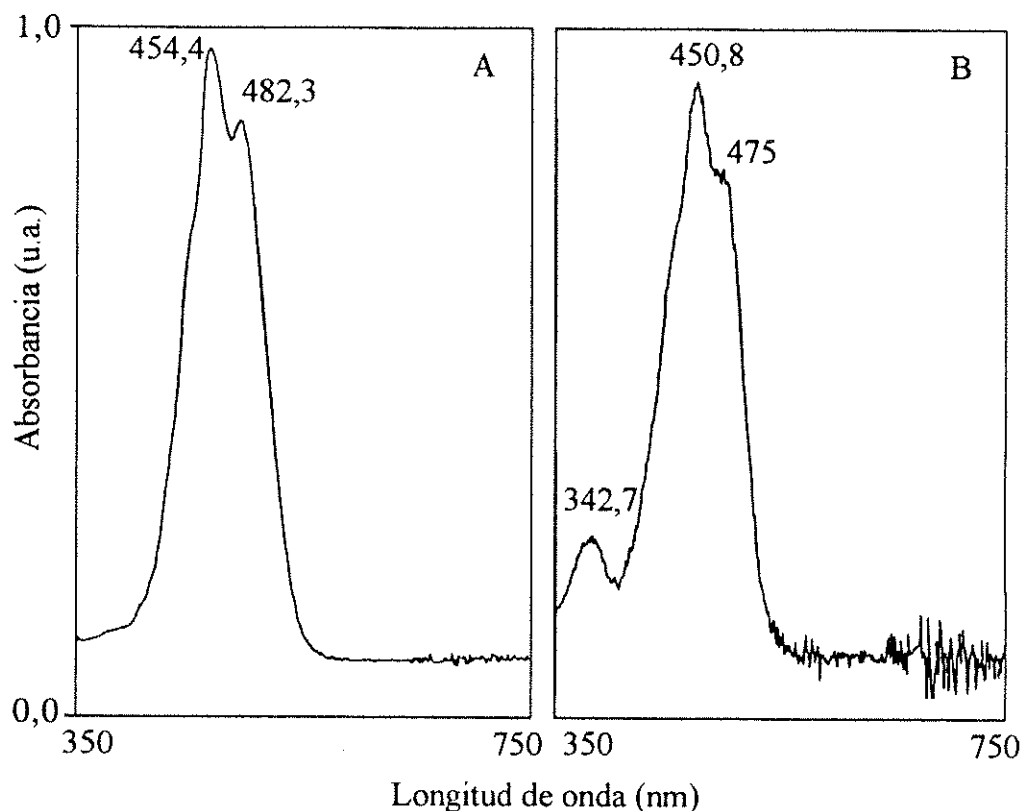


Figura 26: A, espectro de absorción electrónica del primer pico de elución del β -caroteno; B, espectro de absorción electrónica del segundo pico de elución del mismo pigmento.

1.2.2. Contenido proteico. SDS-PAGE

La electroforesis en gradiente (13-22,5%, p/v) de gel de poliacrilamida de la Fig. 27 muestra el contenido proteico de la preparación de membranas tilacoidales. Las principales proteínas que integran este complejo proteico son tentativamente identificadas (en orden decreciente de masas moleculares) como el complejo PSI (120 kDa), las proteínas de 47 kDa (CP47) y 43 kDa (CP43), que forman la antena intrínseca del PSII, D_2 que forma parte del centro de reacción, la proteína de 33 kDa que estabiliza el dominio del Mn responsable de la evolución de oxígeno, D_1 que forma parte del RC y las ficobiliproteínas, que forman la antena extrínseca del PSII. Estos datos se basan en la comparación de las masas moleculares de los polipéptidos que componen las membranas tilacoidales con las masas moleculares de proteínas patrón.

El método de cultivo celular y el de aislamiento de membranas fotosintéticas descritas anteriormente proporcionan un material con una alta relación de PSII a PSI, tal y como puede observarse tanto en base a su espectro de absorción (máximo en la banda del rojo a 671-672 nm) como en base a la electroforesis.

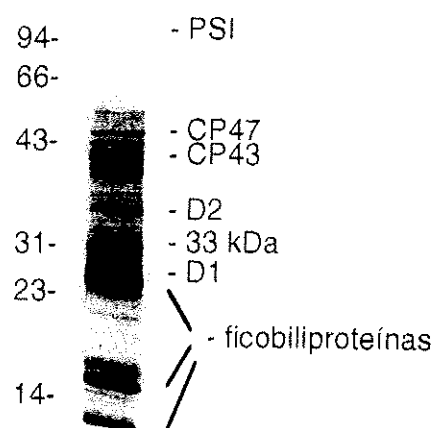


Figura 27: SDS-PAGE en gradiente (13-22,5%, p/v) de poliacrilamida de membranas tilacoidales de *P. laminosum*.

1.2.3. Medida de actividad

Las medidas de evolución de O_2 de la preparación de membranas tilacoidales se determinó mediante la técnica polarográfica del electrodo de oxígeno, utilizando DCBQ como aceptor de electrones. Los valores obtenidos presentan una elevada actividad, $1.003 \mu\text{mol } O_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, lo que hace pensar que hemos aislado un buen material de partida.

1.3. Características espectroscópicas de las membranas fotosintéticas

Además de los espectros UV-VIS de las membranas tilacoidales, que ya han sido comentados al explicar los procedimientos de obtención de las mismas, se han realizado otras medidas espectroscópicas como la fluorescencia a baja temperatura.

1.3.1. Fluorescencia a baja temperatura (77K)

Se realizaron medidas de emisión de fluorescencia a baja temperatura excitando a 620 nm, para poder determinar de una forma cualitativa el grado de enriquecimiento de PSII

frente a PSI. En la Fig. 28 pueden diferenciarse claramente dos picos de emisión de fluorescencia. El pico a 686,7 nm corresponde al PSII mientras que el pico a 719 nm se debe a la emisión del PSI.

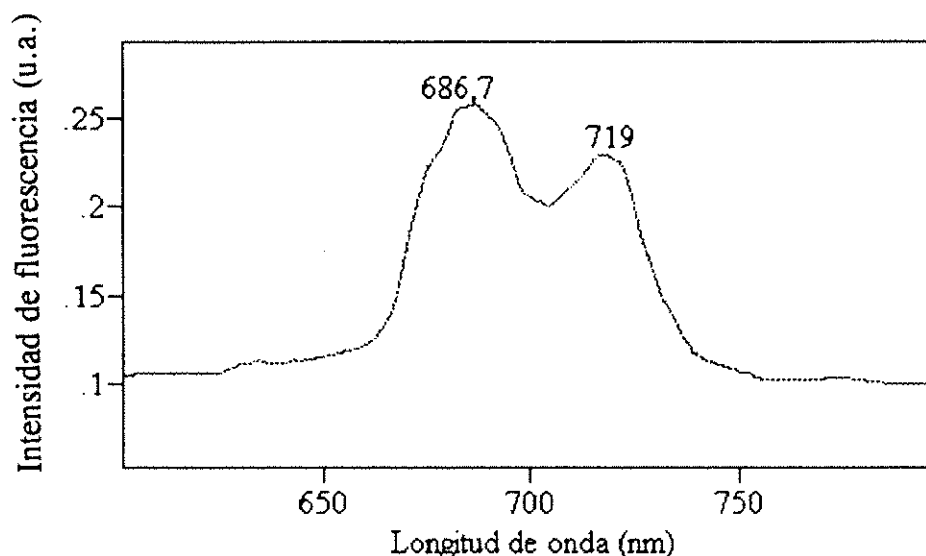


Figura 28: Espectro de emisión de fluorescencia a 77K de membranas tilacoidales de *P. laminosum*. El espectro se realizó con excitación a 620 nm.

1.4. Aislamiento del complejo OEC

La purificación del complejo OEC se llevó a cabo partiendo de membranas tilacoidales. Como ya se describió en el capítulo de Materiales y Métodos, se intentaron varios métodos de purificación y por lo tanto comentaré los resultados obtenidos en cada uno de los procedimientos:

a.- El espectro de absorción a temperatura ambiente de la fracción enriquecida en PSII, obtenida mediante solubilización de las membranas tilacoidales con LDAO y una posterior centrifugación del material solubilizado en gradiente (15-35%, p/v) de sacarosa, se muestra en la Fig. 29, con un máximo de absorción de la banda de menor energía a 676 nm, debida principalmente a la transición Q_y de la Chl. Este máximo aparece desplazado hacia el rojo, indicando la presencia de PSI. El pico a 415 nm está mejor definido que en membranas, esta banda es debida a la transición Soret de la Chl y de otros dos pigmentos asociados al centro de reacción del PSII: Pheo y Cyt *b*-559. La electroforesis de esta fracción muestra cierta contaminación de PSI (banda correspondiente a 65 y 120 kDa). La capacidad de evolución de oxígeno es bastante pequeña, $220 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

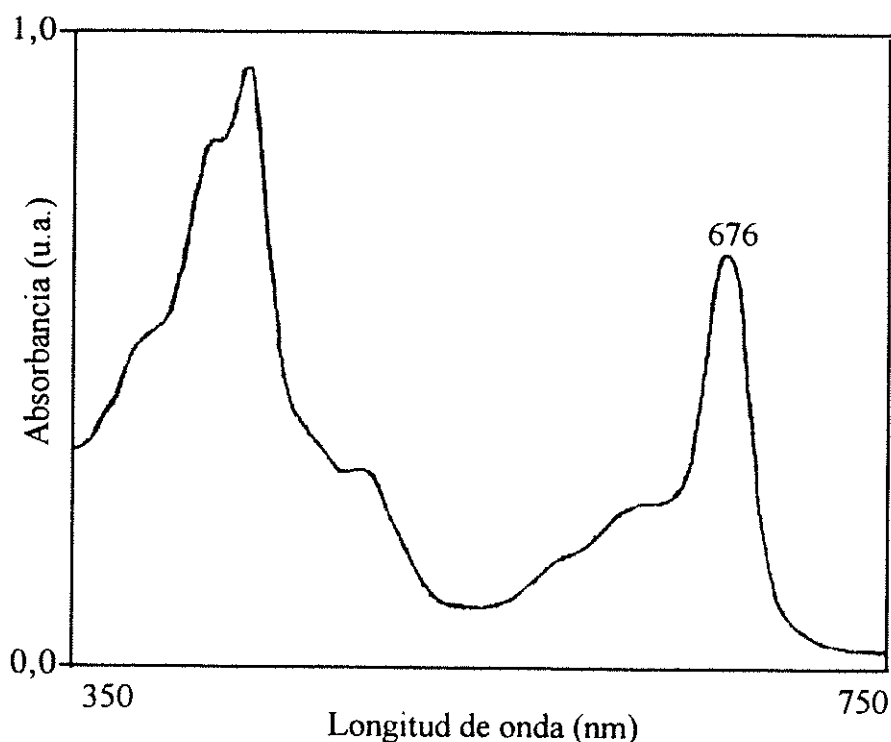


Figura 29: Espectro de absorción electrónica del complejo OEC obtenido mediante una solubilización inicial de las membranas tilacoidales con LDAO y una posterior centrifugación en gradiente (15-35%, p/v) de sacarosa.

b.- El siguiente método utilizado consistió en una serie de centrifugaciones diferenciales del material obtenido tras la solubilización de las membranas tilacoidales con LDAO (apartado 2.2.b. de Materiales y Métodos). Las fracciones obtenidas en cada uno de los pasos fueron seguidas mediante espectroscopia de absorción y fluorescencia, así como electroforesis y medidas de evolución de oxígeno.

En la Fig. 30 se muestran los espectros de absorción a temperatura ambiente de cada una de las fracciones purificadas, en donde puede observarse que a medida que se consigue una mayor purificación, la banda en el rojo va haciéndose más estrecha y la banda de carotenos, a 485 nm aproximadamente, va siendo cada vez menor y su definición mejora con la purificación. En la fracción enriquecida en PSII (Fig. 30H) no se aprecia la pequeña banda a 543 nm, pero sí se puede observar una mejor definición de la banda a 415. Estas dos bandas revelan la presencia de Pheo, un componente característico del centro de reacción del PSII.

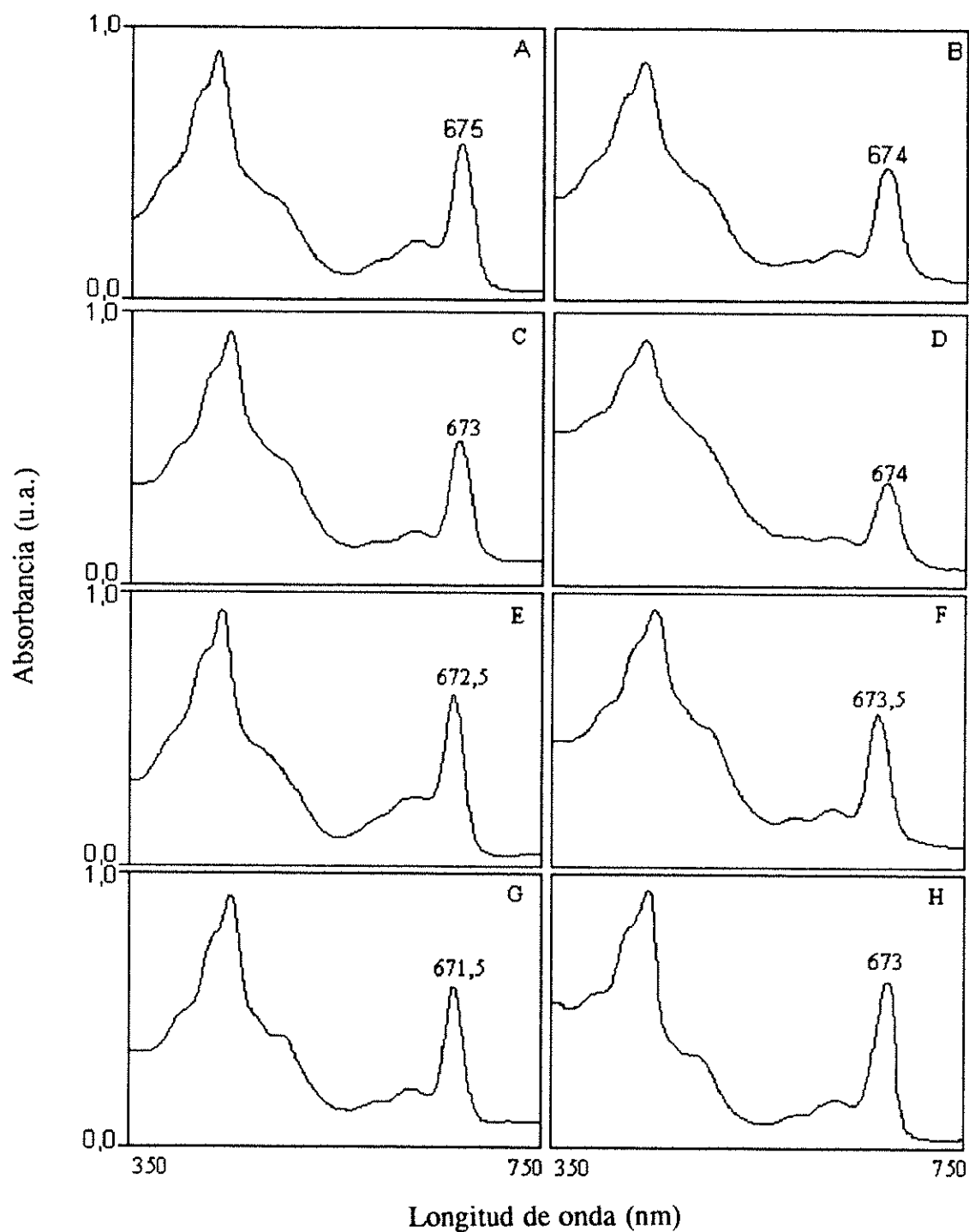


Figura 30: Espectros de absorción electrónica de cada una de las fracciones obtenidas en el proceso de purificación del complejo OEC (Materiales y Métodos 2.2.b). A, Pa; B, Sa; C, Sa'; D, Pa'; E, Sb; F, Pb; G, Sc; H, Pc.

La segunda derivada de dicha fracción (Fig. 31) muestra la existencia de un componente mayoritario en la banda de menor energía a 671 nm, debido fundamentalmente a las clorinas asociadas a las antenas intrínsecas.

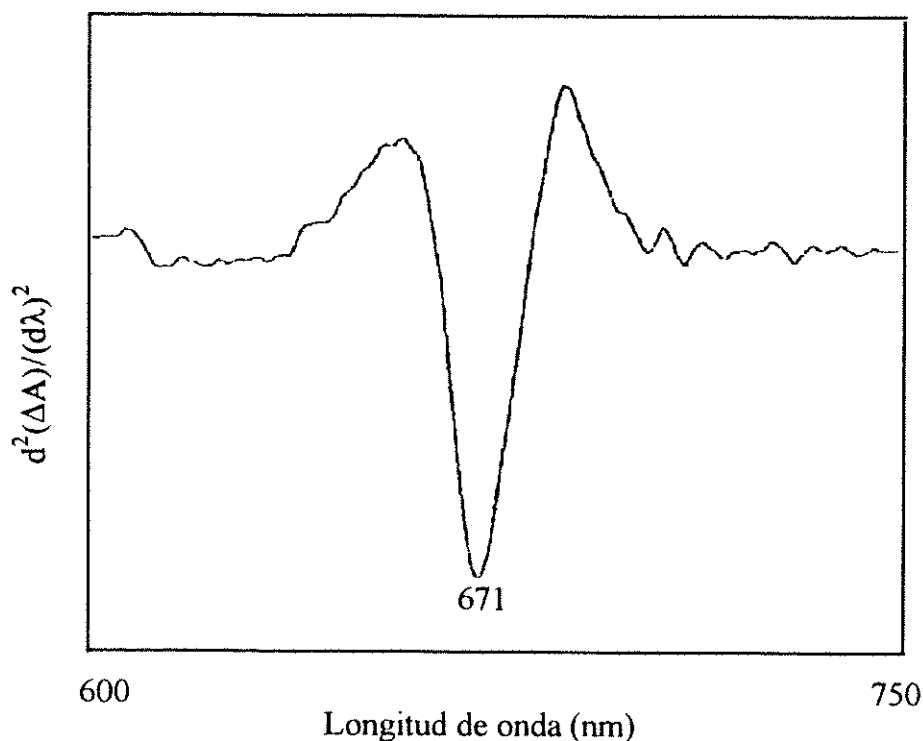


Figura 31: Segunda derivada del espectro de absorción de la Fig. 30H.

Los espectros de emisión de fluorescencia medidos a 77K de cada una de estas fracciones se muestran en la Fig. 32. Mediante esta técnica puede detectarse el grado de contaminación de PSI en cada uno de los pasos de purificación; mientras el PSII emite fluorescencia a 681-685 nm, el PSI lo hace aproximadamente a 725 nm. Esta fue una de las piezas claves para eliminar la segunda incubación con el detergente LDAO, pues con ella se solubiliza parte de PSI como puede apreciarse en las Fig. 32A y 32B. La fluorescencia de la fracción más enriquecida en PSII se muestra en la Fig. 32D con un máximo de emisión a 685 nm y un hombro hacia 695 nm debido a la antena intrínseca CP47.

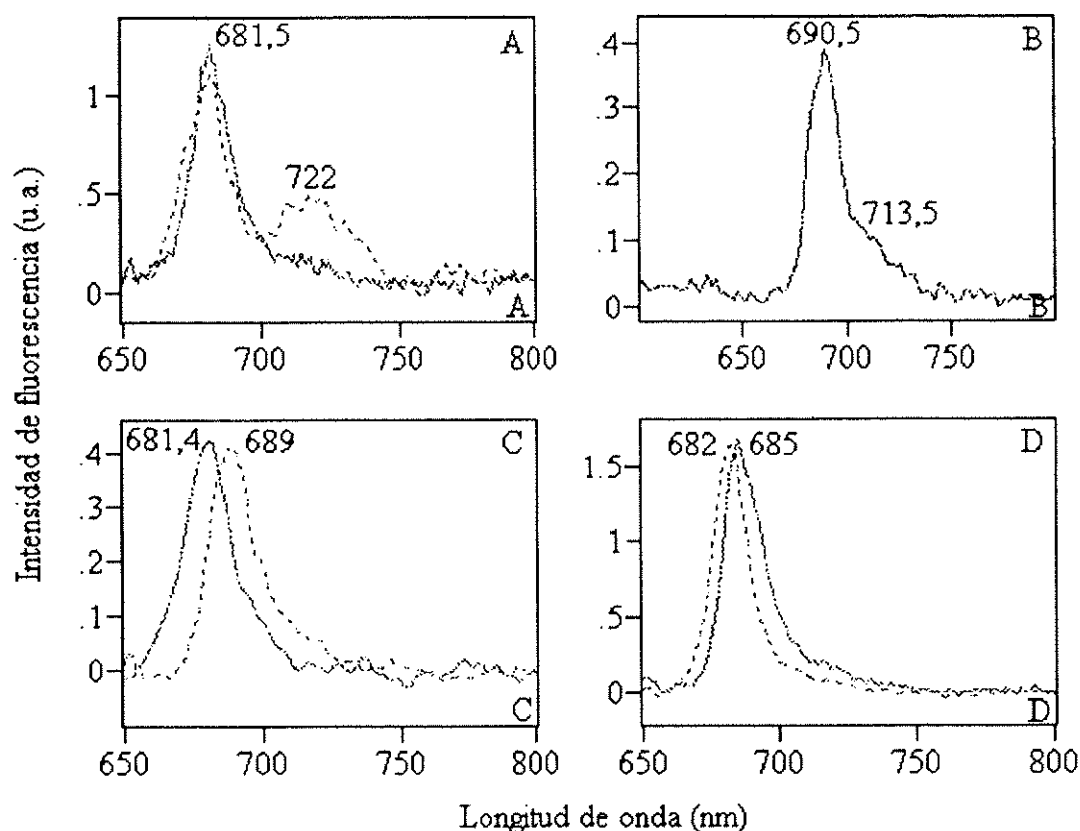


Figura 32: Espectros de emisión de fluorescencia de cada una de las fracciones obtenidas en el proceso de purificación del complejo OEC (Materiales y Métodos 2.2.b). Los espectros se realizaron con excitación a 620 nm. A: línea continua (Sa), línea discontinua (Pa); B: (Sa'); C: línea continua (Sb), línea discontinua (Pb); D: línea continua (Sc), línea discontinua (Pc).

Se midieron valores de actividad de desprendimiento de oxígeno de cada una de las fracciones purificadas:

Fracción	Actividad ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
Sa	113,36
Pa	364,68
Sb	215,91
Pb	343,26
Sc	272,78
Pc	233,26

La electroforesis de cada una de las fracciones también ayudó en la determinación del grado de pureza de cada una de ellas. En la Fig. 33 se observa que el complejo de PSI aparece en su forma dimérica con una banda a unos 120 kDa y en su forma monomérica con una banda a 65-70 kDa, además de apreciarse bandas características del PSII correspondientes a 47 kDa (CP47), 43 kDa (CP43), ~34 kDa (D₂), 33 kDa, ~31 kDa (D₁) y 25-20 kDa (ficobiliproteínas). Estos datos se basan en la comparación de los polipéptidos del complejo con proteínas patrón.

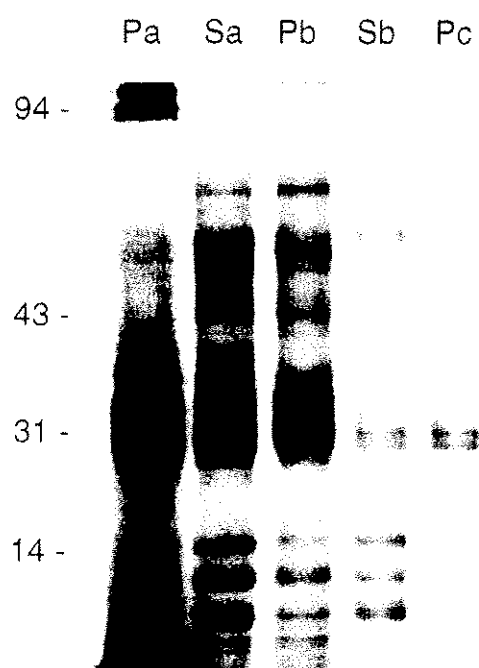


Figura 33: SDS-PAGE en gradiente (13-22,5%, p/v) de poliacrilamida de las diferentes fracciones obtenidas en el proceso de purificación del complejo OEC (Materiales y Métodos 2.2.b) de *P. laminosum*.

c.- Con los procedimientos anteriores no se llegó a obtener una fracción suficientemente enriquecida en PSII por lo que nos vimos en la necesidad de poner a punto un nuevo método de aislamiento del complejo OEC. En este nuevo método, tras la solubilización de las membranas fotosintéticas con el detergente LDAO, la suspensión se cargó en un gradiente (5-17,5%, p/v) de sacarosa y se centrifugó durante 24 h (descrito en el apartado 3.2.c. de Materiales y Métodos). Tras la centrifugación se observaron varias bandas claramente diferenciadas (Fig. 34), que una vez extraídas fueron analizadas cuidadosamente mediante espectroscopia de absorción y electroforesis.

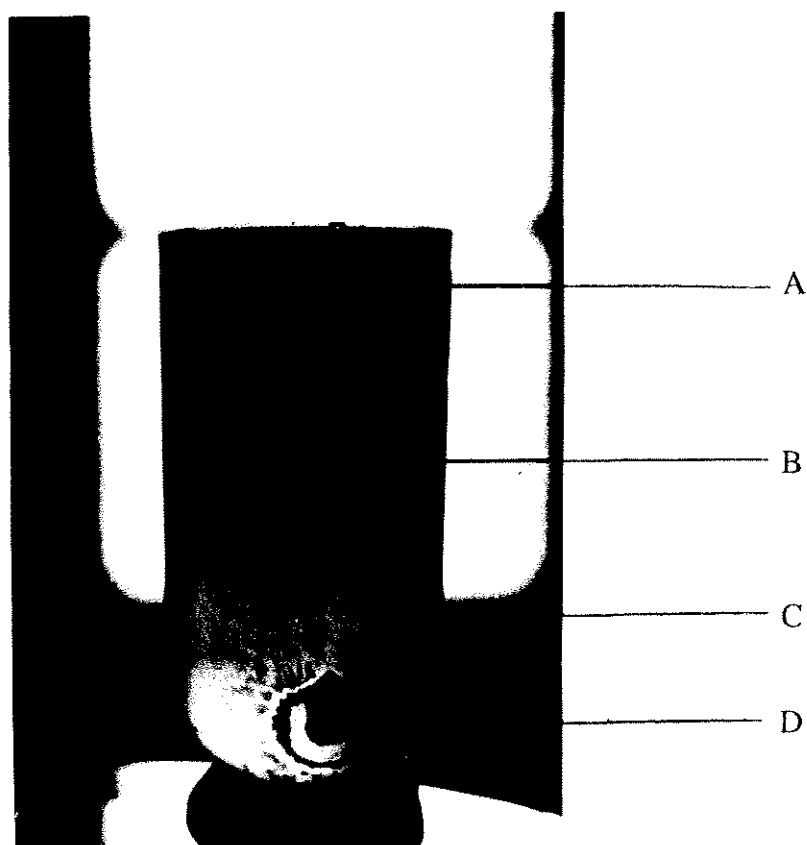


Figura 34: Perfil de las bandas pigmentadas tras la centrifugación en gradiente (5-17,5%, p/v) de sacarosa de membranas tilacoidales de *P. laminosum* solubilizadas previamente con LDAO.

En las Fig. 35 y 36 se observan los espectros de absorción y las electroforesis, respectivamente, de cada una de las fracciones separadas tras la centrifugación en gradiente de sacarosa. La fracción B, la más enriquecida en PSII, se selecciona para continuar el proceso de purificación del complejo OEC. Esta fracción es cargada en una columna de gel-TSK Toyopearl DEAE 650s. Parte de este material no se une a la columna y el espectro de absorción del material eluido correspondería a antena desnaturalizada (Fig. 37).

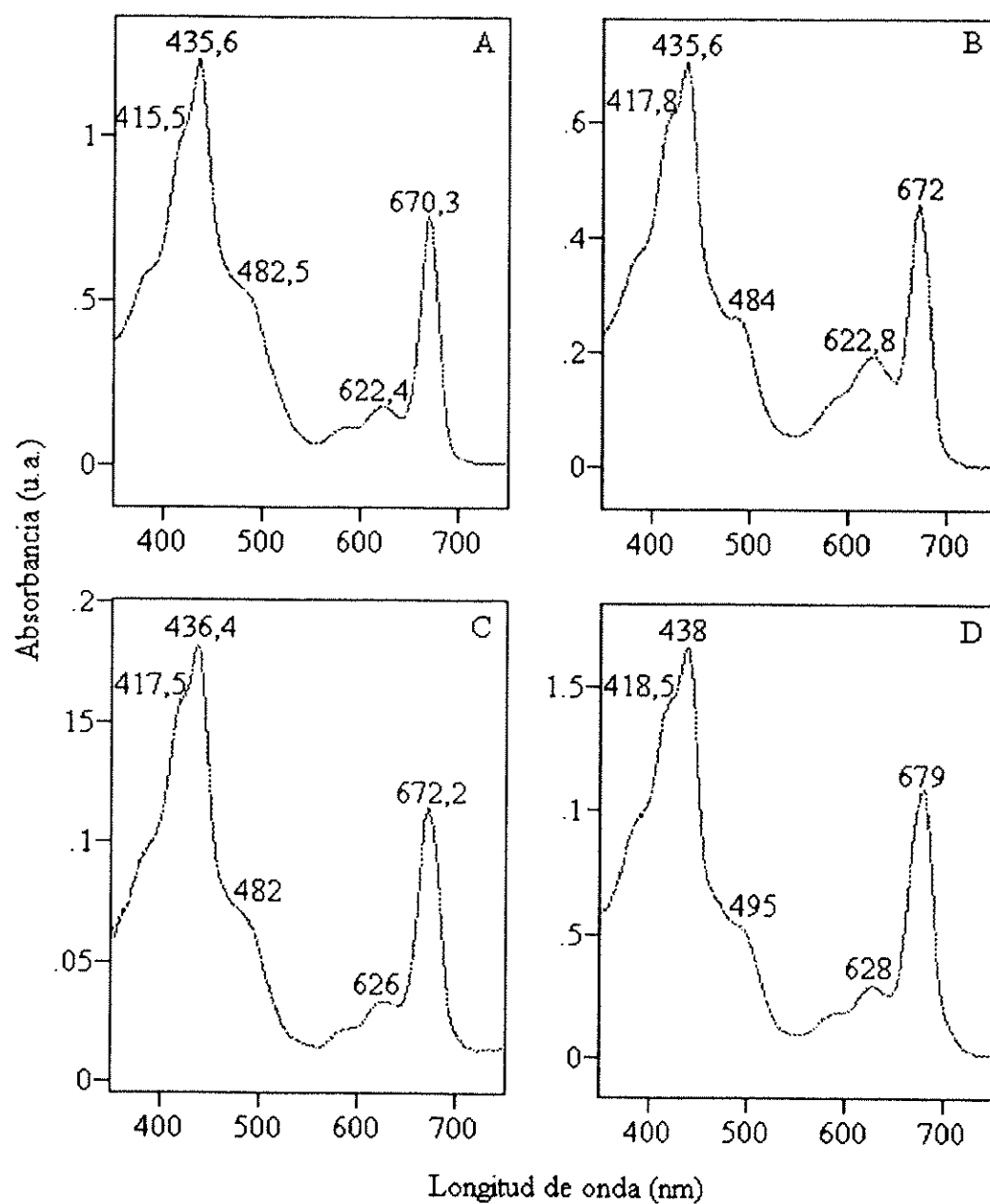


Figura 35: Espectros de absorción electrónica de cada una de las fracciones seleccionadas del gradiente (5-17,5%, p/v) de sacarosa de *P. laminosum* (Materiales y Métodos 2.2.c.).

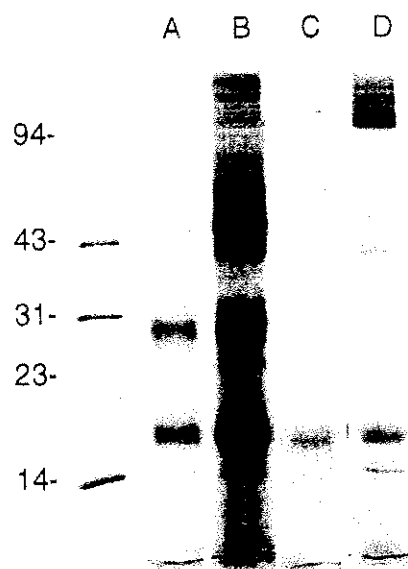


Figura 36: SDS-PAGE de cada una de las fracciones seleccionadas del gradiente (5-17,5%, p/v) de sacarosa (Materiales y Métodos 2.2.c.).

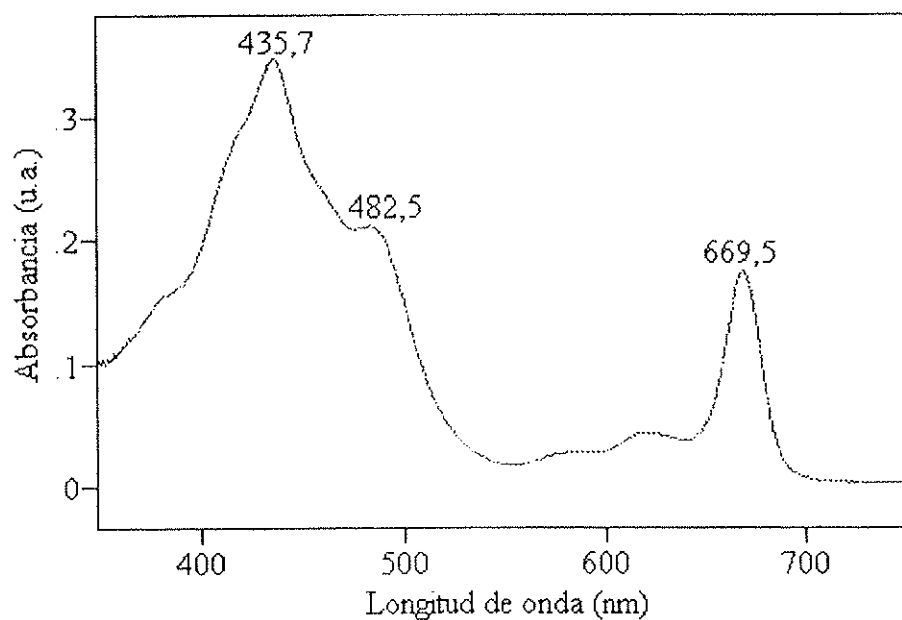


Figura 37: Espectro de absorción electrónico del material no unido a la columna cromatográfica en gel-TSK Toyopearl DEAE 650s.

El material unido a la columna se lava con el tampón compuesto por 0,03% (p/v) DM, 100 mM NaCl y 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), con el que eluyen ficobilisomas con el máximo de absorción en el rojo hacia 600 nm y material enriquecido en carotenoides. En las Fig. 38 y 39 se muestran los espectros de absorción y la electroforesis, respectivamente, de cada una de estas fracciones.

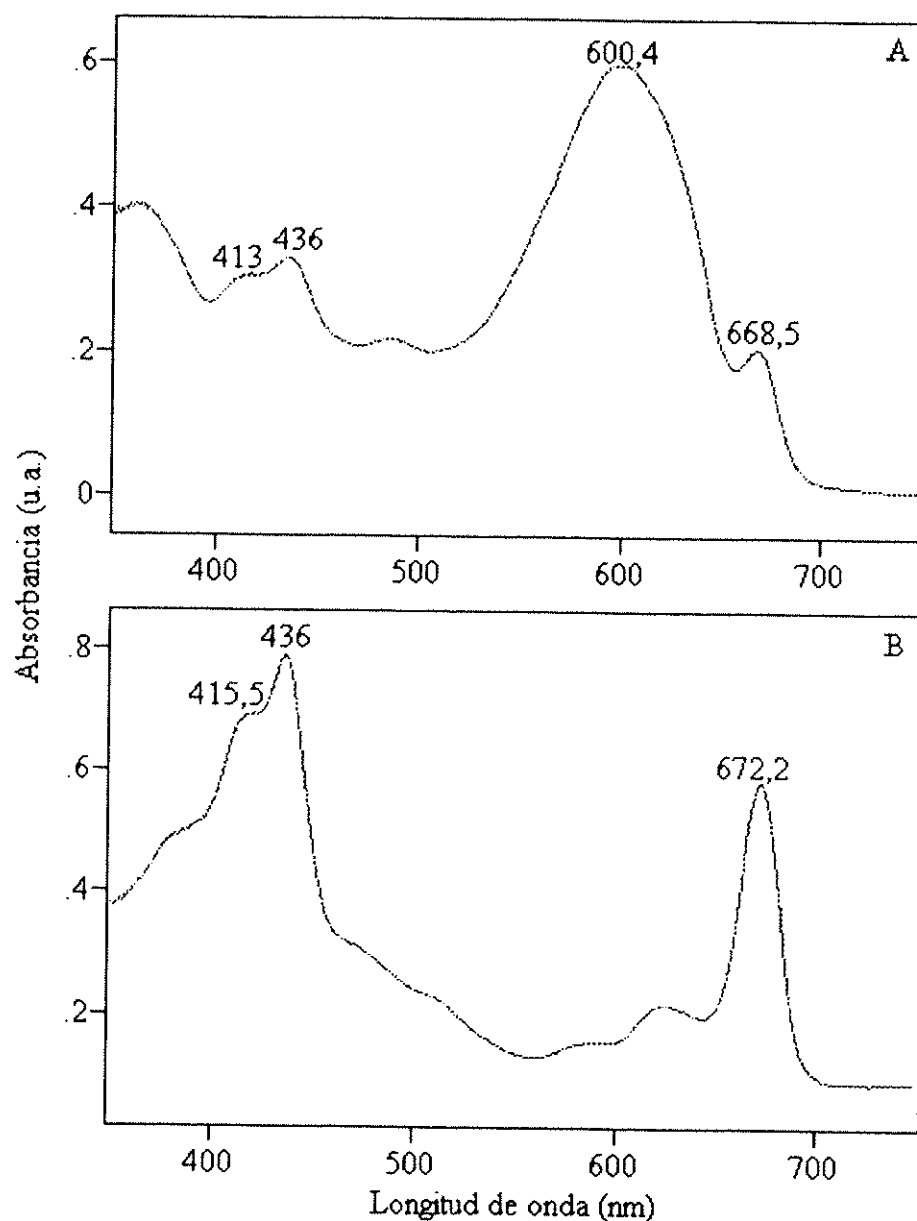


Figura 38: Espectros de absorción electrónica del material eluido durante el lavado cromatográfico. A, ficobilisomas; B, material con alto contenido en carotenoides.

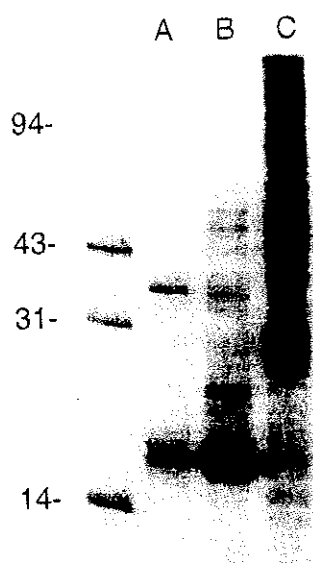


Figura 39: SDS-PAGE del material eluido durante el lavado cromatográfico. A, material que no se une a la columna; B, ficobilisomas; C, material con un alto contenido en carotenos.

Tras el lavado, el material es eluido con 300 mM NaCl y es aquí donde se obtiene la fracción del complejo OEC purificado. En la Fig. 40 se muestra el perfil de elución de dicho complejo.

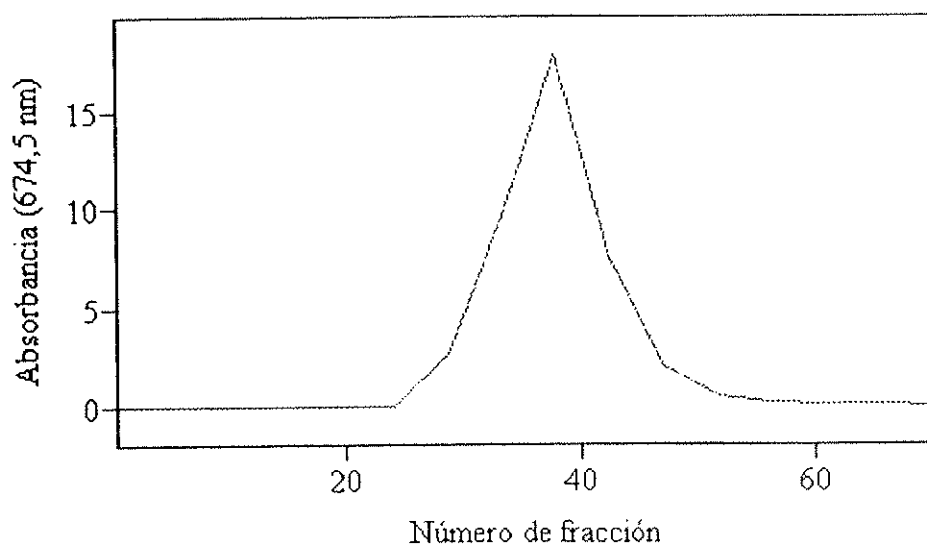


Figura 40: Perfil de elución del complejo OEC en cromatografía en gel-TSK Toyopearl DEAE 650s.

En la Fig. 41 se puede observar el espectro de absorción a temperatura ambiente del complejo OEC obtenido, con máximos a 675, 626, 545, 491, 435,2 y 415 nm. Los máximos a 675 y 435,2 nm se deben a transiciones electrónicas de la Chl asociada a las proteínas antena CP47 y CP43 y al centro de reacción del fotosistema II, mientras que la banda a 626 nm es producida por transiciones vibracionales de la banda de menor energía de dicha Chl. La presencia en el espectro de absorción de una pequeña banda a 545 nm y una clara definición de la banda a 415 nm indicaría la presencia de Pheo, pigmento característico del fotosistema II, mientras que la banda a 491 correspondería a los carotenos.

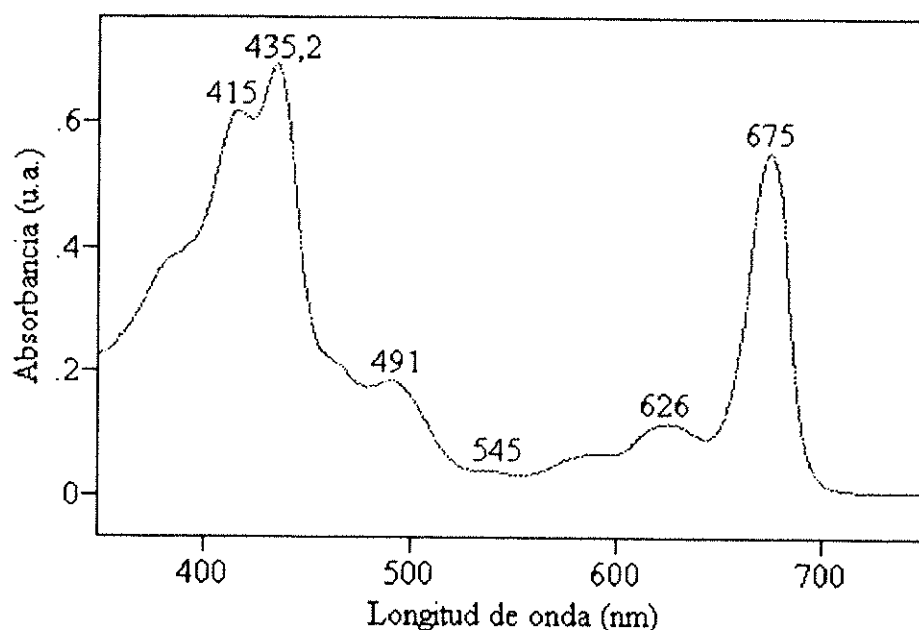


Figura 41: Espectro de absorción electrónica del complejo OEC de *P. laminosum* en tampón 0,03% (p/v) DM y 20 mM Tris/HCl (pH 8,0).

La segunda derivada del espectro anterior (Fig. 42) muestra la existencia de dos componentes mayoritarios a 679,5 y 672 nm, lo que indica la presencia de varios grupos de clorinas bajo la banda principal de menor energía. También se observan mínimos a 540,5 nm, correspondiente a la banda de Pheo, a 494 y 465,5 nm, producidos por dos de las transiciones de los carotenoides en esta región espectral, a 438 nm, producido por Chl y a 413,5 nm, correspondiente a Chl y Pheo.

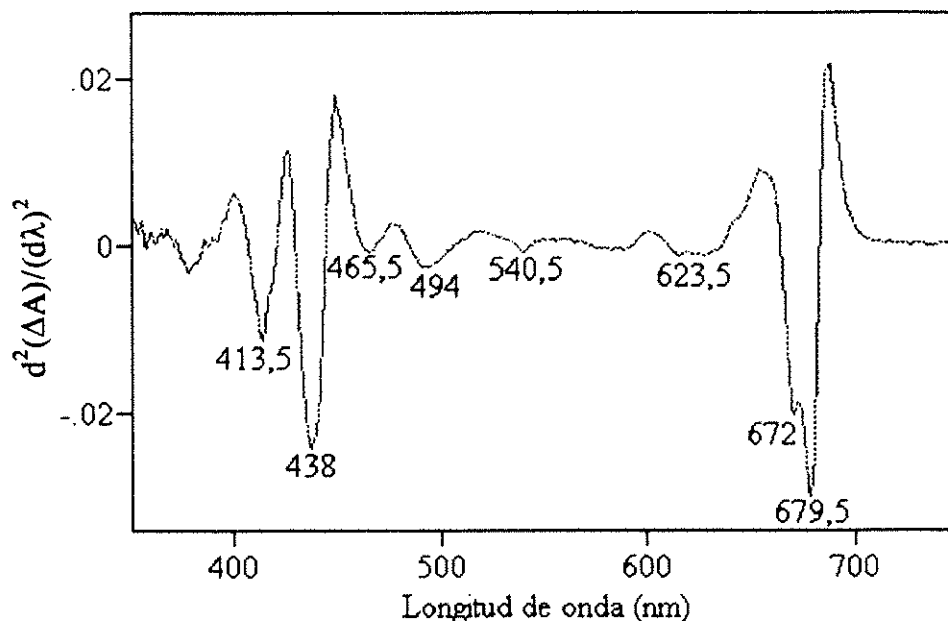
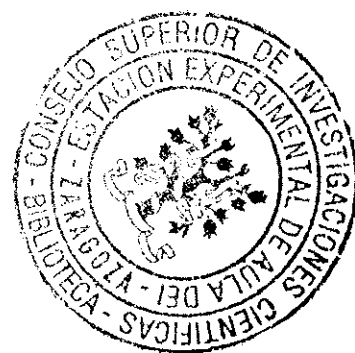


Figura 42: Segunda derivada del espectro de absorción del complejo OEC.

1.5. Propiedades bioquímicas del complejo OEC

1.5.1. Identificación de pigmentos

El análisis por HPLC de los pigmentos del complejo reveló la existencia mayoritaria de Chl (1), Pheo (2) y β -caroteno (3) (Fig. 43). Al igual que en membranas tilacoidales, se observó la aparición de dos picos de áreas diferentes en el tiempo de elución del β -caroteno (Fig. 44). Utilizando un detector diode-array pudo comprobarse que ambos picos corresponden a dos isómeros del β -caroteno. El primer pico, de mayor área, corresponde al isómero *all-trans* mientras que el segundo pico, de menor área, se debe a un isómero *cis*. También aparecen dos pequeños picos antes y después del pico de elución de la Chl (1), éstos pueden ser debidos a Chl modificada o degradada. Hay que resaltar la ausencia del pico correspondiente a la luteína, como cabría esperar en un complejo OEC de alta pureza.



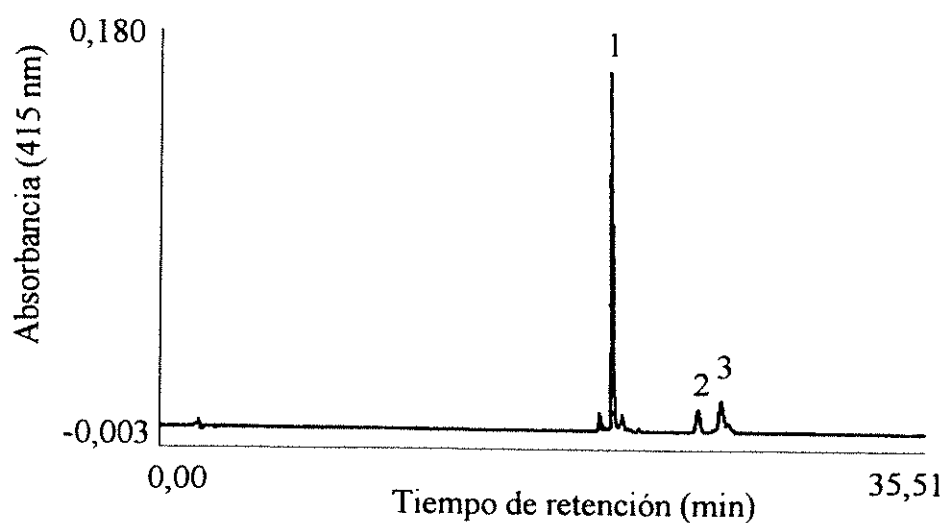


Figura 43: Cromatograma de HPLC de un extracto de pigmentos del complejo OEC de *P. laminosum*.

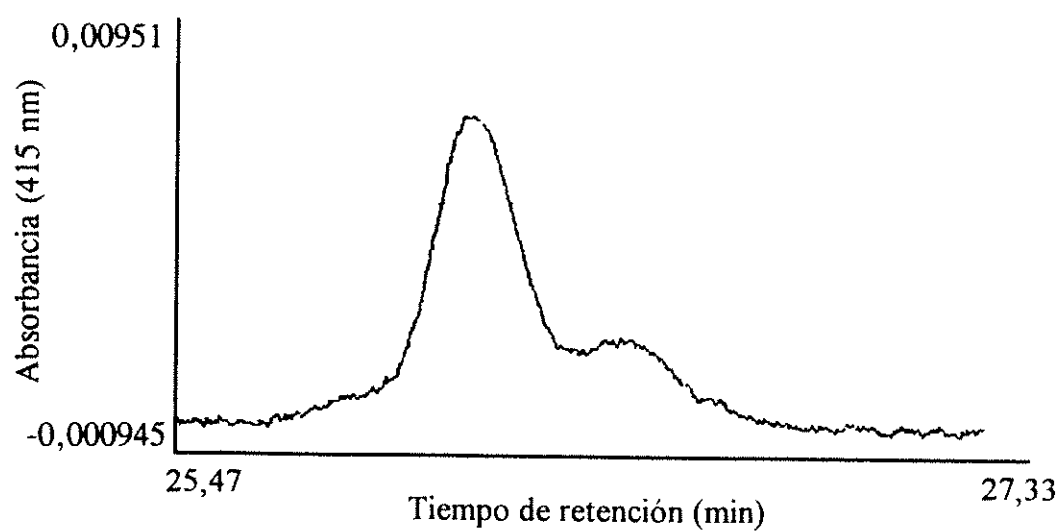


Figura 44: Detalle del cromatograma de HPLC de un extracto de pigmentos del complejo OEC en los tiempos de elución del β -caroteno.

1.5.2. Cuantificación de pigmentos

La cuantificación de pigmentos del complejo OEC se determinó mediante el cálculo de pigmentos totales considerando 1 Cyt *b*-559 por centro de reacción, según el método descrito en el apartado 5.2. de Materiales y Métodos. La relación obtenida de pigmentos totales a Cyt *b*-559 fue de 37,4, por lo que se considera un total de 37-38 clorinas (Chl+Pheo) por 1 Cyt *b*-559. En las Fig. 45 y 46 se muestran el espectro del extracto en acetona y el espectro reducido menos oxidado del complejo OEC, respectivamente.

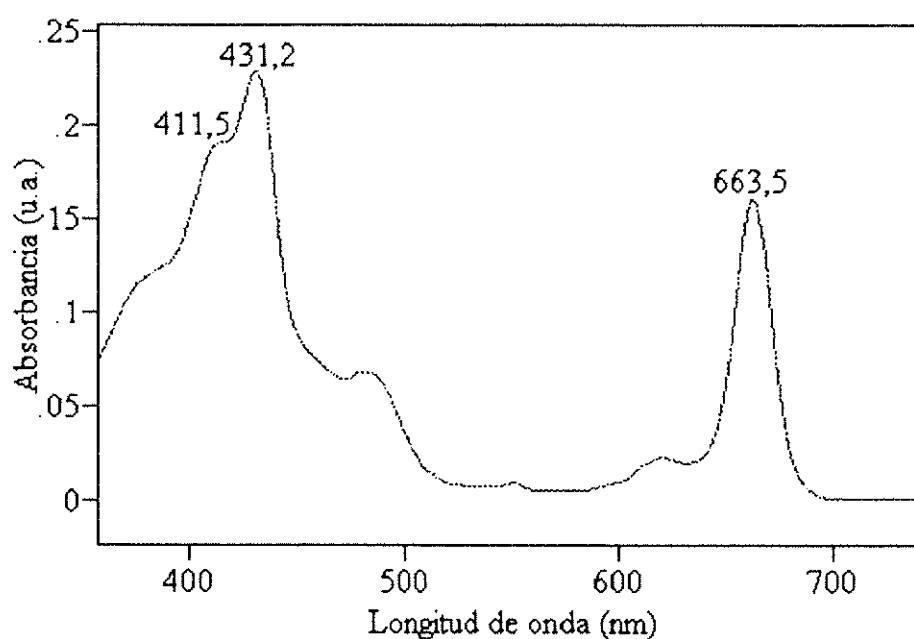


Figura 45: Espectro de absorción electrónica de un extracto acetónico de pigmentos del complejo OEC.

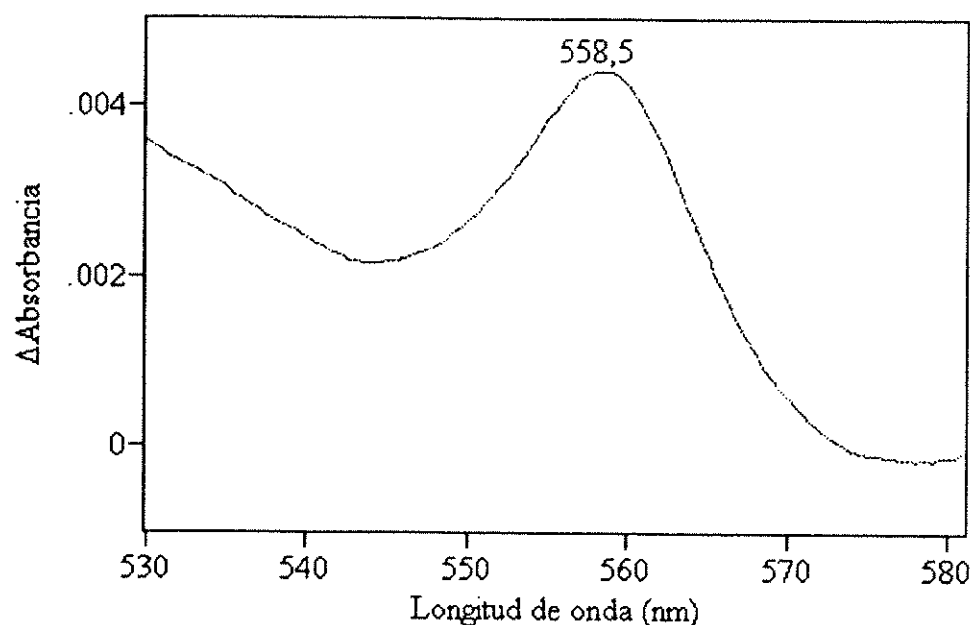


Figura 46: Espectro diferencial ditionito (reducido) menos ferricianuro (oxidado) del complejo OEC.

1.5.3. Contenido proteico. SDS-PAGE

La electroforesis de la preparación del complejo OEC se puede observar en la Fig. 47A. El electroforetograma presenta cinco bandas mayoritarias de proteína, identificadas (por orden de masa molecular decreciente) como 47 kDa (CP47), 43 kDa (CP43), 34 kDa (D₂) y 31 kDa (D₁). En la Fig. 47B se muestra el electroforetograma de una preparación del complejo OEC en la que no se ha utilizado PMSF como inhibidor de proteasas en el proceso de purificación. Así, se observa con gran claridad la aparición de fragmentos de D₁ y de D₂ en la zona de masas moleculares menores a 20 kDa; de hecho las dos bandas de 34,6 y 32 kDa han perdido prácticamente su intensidad, indicativo de una marcada degradación proteolítica.

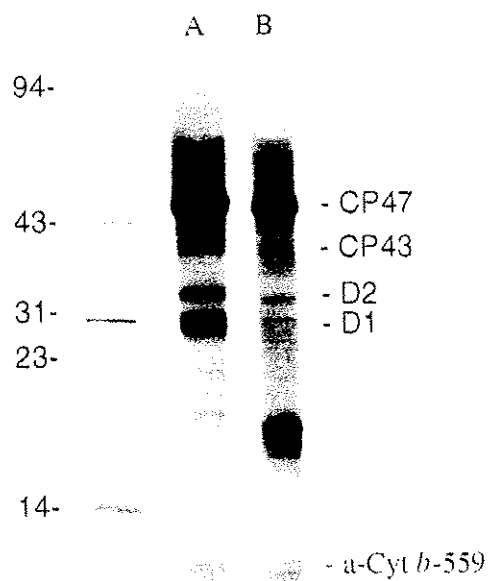


Figura 47: SDS-PAGE en gradiente (13-22,5%, p/v) de poliacrilamida del complejo OEC de *P. laminosum*. A, con PMSF en las soluciones de purificación; B, sin PMSF en las disoluciones de purificación.

1.5.4. Medida de actividad

La actividad de evolución de O_2 del complejo OEC se midió con un electrodo de O_2 , para lo cual el paso anterior a la purificación del complejo, en el que se elimina la proteína extrínseca de 33 kDa, no se llevó a cabo. La actividad se midió utilizando DCBQ como aceptor de electrones, obteniéndose valores de $1.946 \mu\text{mol } O_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ que corresponden a un complejo OEC considerablemente activo.

1.6. Características espectroscópicas del complejo OEC

Además de los espectros UV-VIS del complejo OEC, que ya han sido comentados al explicar los procedimientos de purificación de dichas partículas, se han realizado otras medidas espectroscópicas.

1.6.1. Absorción a baja temperatura

El espectro a 10K del complejo OEC se presenta en la Fig. 48, en donde se observan dos bandas principales con máximos a 671 y 677 nm en la transición Q_y de las porfirinas, aunque parecen intuirse otras bandas minoritarias. La segunda derivada del espectro (Fig. 49) reveló la existencia de al menos dos componentes mayoritarios bajo la banda de menor energía de este complejo, con máximos a 669 y 678 nm.

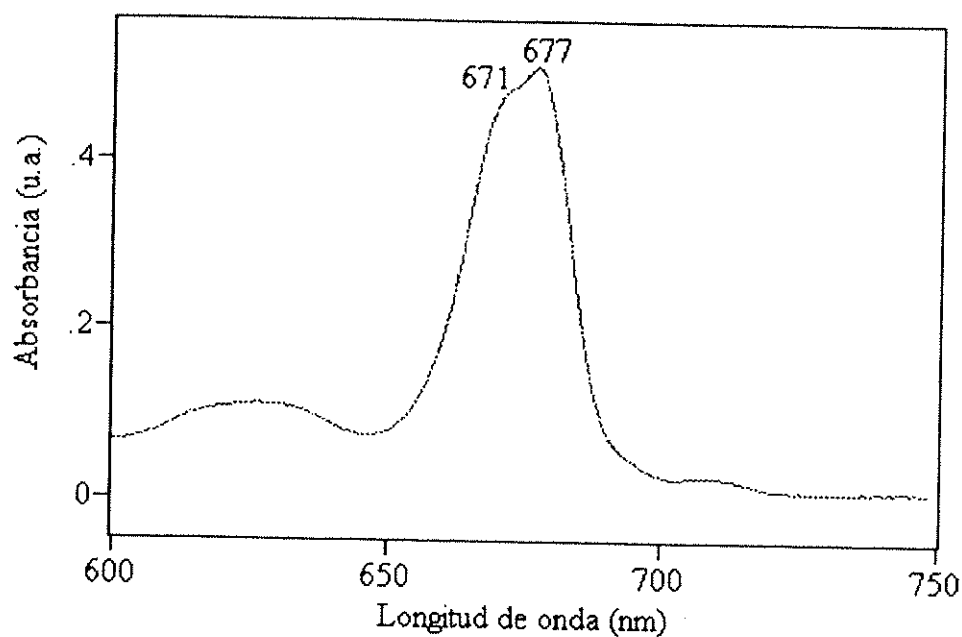


Figura 48: Espectro de absorción electrónica a baja temperatura del complejo OEC de *P. laminosum*. El espectro se obtuvo tras diluir la muestra 3 veces (v/v) con glicerol.

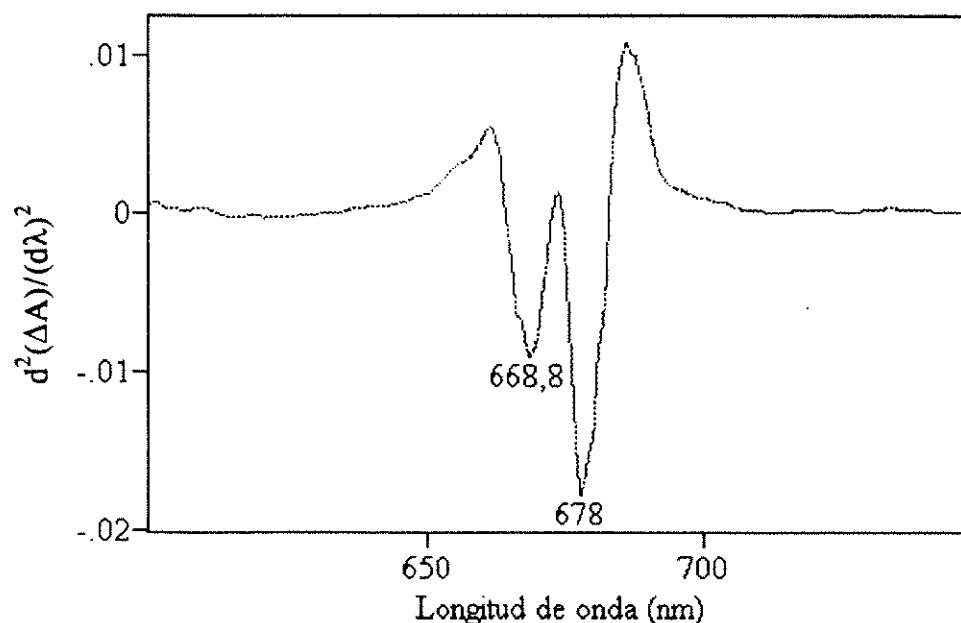


Figura 49: Segunda derivada del espectro de absorción a baja temperatura del complejo OEC.

1.6.2. Fluorescencia a baja temperatura

En la Fig. 50 se observa el espectro de emisión de fluorescencia a 77K del complejo de OEC excitado a 620 nm. Este espectro muestra una banda principal con máximo a 685,8 nm y otras dos bandas de menor intensidad a 719,1 y 744 nm. La banda a 685,8 nm presenta un ensanchamiento característico, debida fundamentalmente a la presencia de otra pequeña banda a 695 nm, originada por la emisión de la antena CP47. La banda a 719,1 nm podría deberse a una pequeña porción de PSI contaminante, mientras que la banda a 744 nm ha sido atribuida a sub-bandas vibracionales de la banda principal de emisión (van Dorssen y col., 1987).

La ausencia de una banda u hombro hacia 672 nm indicaría que no existen clorinas desconectadas, provocadas por la degradación del complejo.

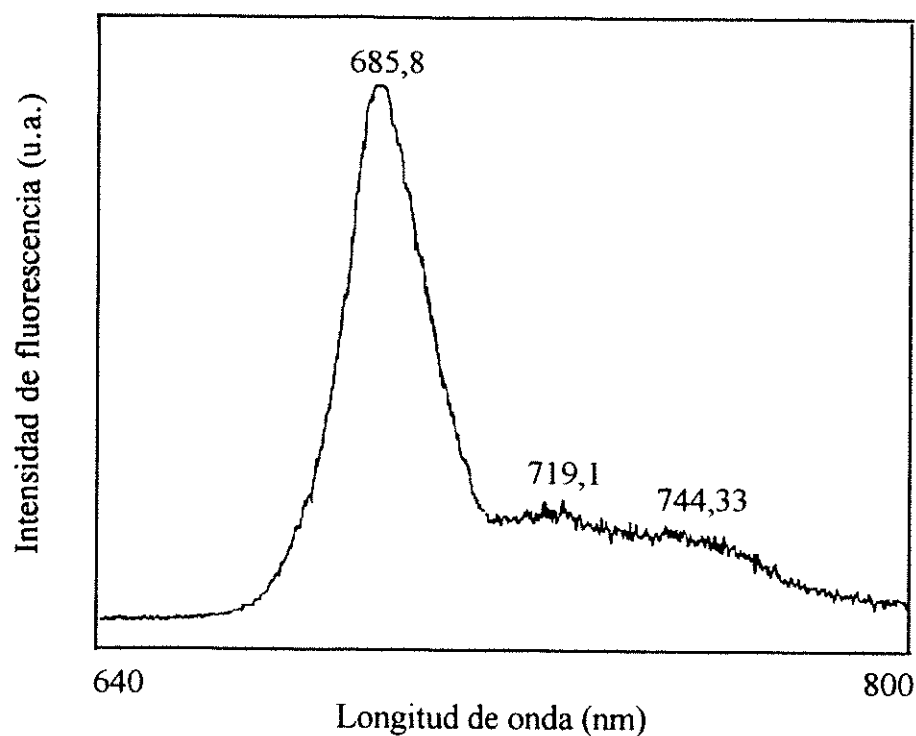


Figura 50: Espectro de emisión a 77K del complejo OEC. El complejo cromoproteico se resuspendió en 0,03% (p/v) DM y 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) y se diluyó 3 veces (v/v) con glicerol.

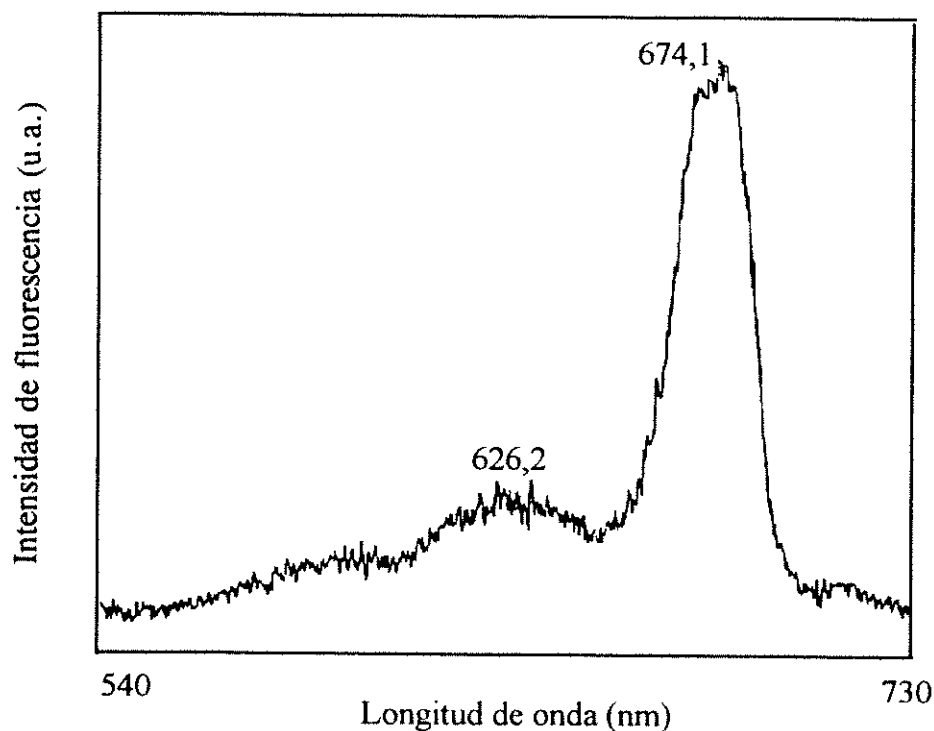


Figura 51: Espectro de excitación de fluorescencia a 77K, detectado a 740 nm, del complejo OEC. El complejo cromoproteico se resuspendió en 0,03% (p/v) DM y 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) y se diluyó 3 veces (v/v) con glicerol.

El espectro de excitación de fluorescencia del complejo OEC detectado a 740 nm se muestra en la Fig. 51, en donde se observa una banda principal a 674 nm y otras bandas adicionales que demuestran que dicho espectro es muy similar al espectro de absorción del complejo OEC. En base a esta similitud se puede concluir, por tanto, que la organización del complejo no ha sufrido distorsiones importantes durante el proceso de purificación.

1.6.3. Dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular del complejo OEC en el rango del VIS realizado a temperatura ambiente se muestra en la Fig. 52. Se observa la existencia de un doblete no conservativo en la banda Q_y con máximo a 669 nm y mínimo a 683 nm; lo que indicaría la existencia de interacciones excitónicas entre algunos de los grupos de Chl presentes en este complejo. Otras contribuciones importantes al espectro aparecen a 432,6 nm, debida a Chl y a 448,1 y 488,7 nm, debidas al β -caroteno.

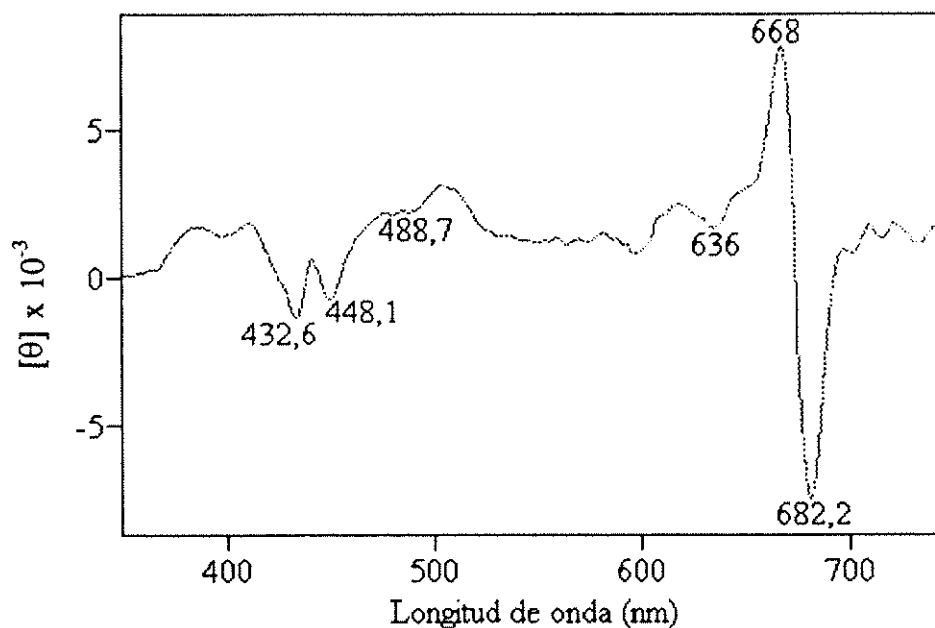


Figura 52: Espectro de dicroísmo circular, en el rango del VIS, del complejo OEC (9,65 μ g Chl/ml) a 4°C en tampón 0,03% (p/v) DM y 20 mM Tris/HCl (pH 8,0).

El espectro de dicroísmo circular realizado en el rango del UV, de 200 a 250 nm, se muestra en la Fig. 53. Con él puede determinarse tentativamente la estructura secundaria de la proteína, que en este caso contiene una alta proporción de α -hélice, ya que el espectro muestra claramente dos picos negativos a 208 y 222 nm, característicos de la estructura en α -

hélice (Greenfield y Fasmin, 1969). La relación entre estos dos picos negativos no es la misma que la de la estructura en α -hélice pura, lo que hace pensar que existen contribuciones de otras estructuras proteicas como láminas- β y enrollamientos al azar.

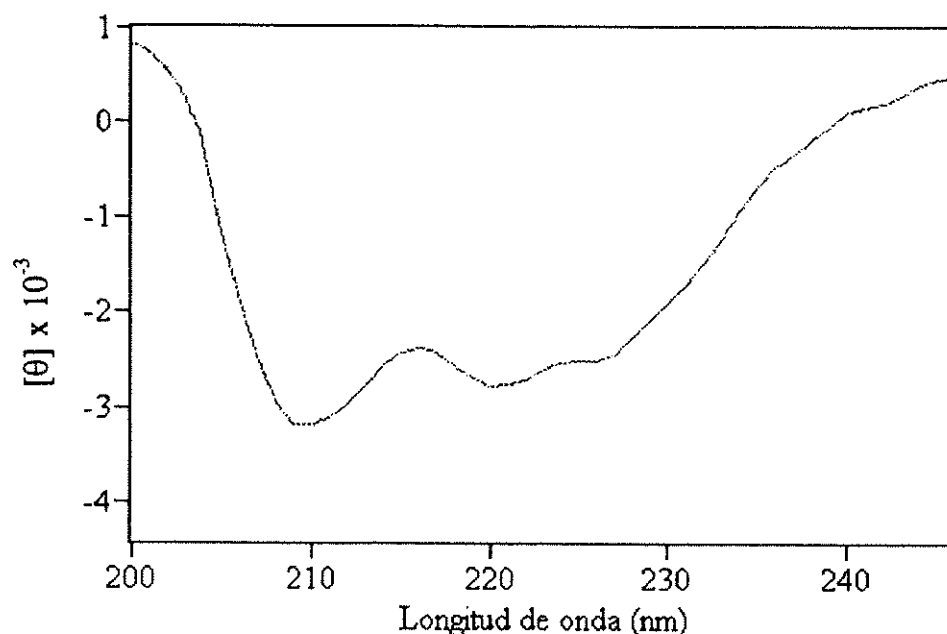


Figura 53: Espectro de dicroísmo circular, en el rango del UV, del complejo OEC (9,65 μ g Chl/ml) a 4°C en tampón 0,03% (p/v) DM y 20 mM Tris/HCl (pH 8,0).

1.6.4. "Surface-enhanced resonance Raman scattering" (SERRS)

Los espectros SERRS de un determinado complejo proteico se llevan a cabo excitando mediante un láser, a una longitud de onda que se encuentra en resonancia con una de las transiciones electrónicas de los pigmentos del complejo proteico. En este trabajo se realizaron diferentes espectros SERRS, en cada uno de ellos se utilizó una longitud de onda de excitación diferente, seleccionando así determinados cromóforos con respecto a otros que quedan discriminados a esa longitud de onda.

La excitación del complejo OEC a 406,7 nm intensifica las vibraciones de todos los pigmentos que existen en dicho complejo, ya que las bandas Soret de la Chl *a*, Pheo *a* y Cyt *b*-559 se encuentran en esta región del espectro de absorción. Además, la molécula de β -caroteno también contribuye significativamente al espectro SERRS a esta longitud de onda de excitación. Al analizar cuidadosamente este espectro (Fig. 54), se observa que en la región de vibración del grupo carbonilo ($C=O$) del anillo V de la porfirina, aparece una banda a 1690 cm^{-1} con un pequeño hombro hacia frecuencias menores. Esta banda a 1690 cm^{-1} indica que

dicho grupo está libre ya que es una banda característica del grupo $C_9=O$ de Chl en solución, mientras que el pequeño hombro hacia $1680-1670\text{ cm}^{-1}$ indica la interacción entre el carbonilo y un residuo proteico u otro grupo porfirínico. La relación de intensidades entre ambas bandas hace pensar que en el complejo OEC existe un mayor número de Chls con el grupo $C_9=O$ libre que de Chls interaccionando con otros grupos del complejo.

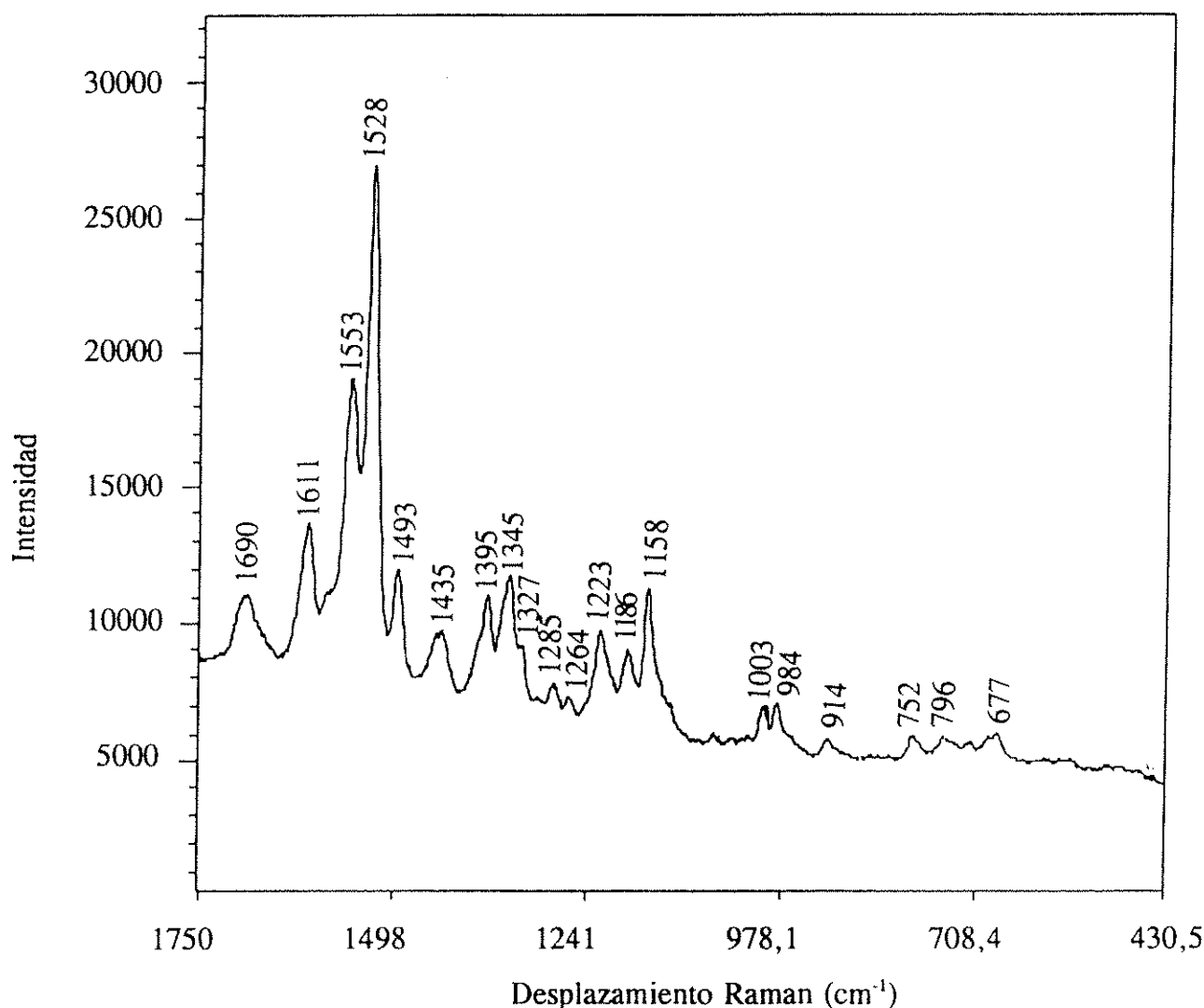


Figura 54: Espectro SERRS del complejo OEC excitado a $406,7\text{ nm}$ con láser de Kr^+ .

Las bandas a 1611 y 1553 cm^{-1} son características de la Chl pentacoordinada, tal y como sucede con la Bchl en el RC bacteriano. Si estas bandas presentaran un desplazamiento de 6 a 12 cm^{-1} hacia la región de menor energía, el Mg^{2+} de la Chl se consideraría hexacoordinado. Las bandas a 1528 , 1158 y 1003 cm^{-1} corresponden a modos vibracionales ν_1 , ν_2 y ν_3 , respectivamente, del β -caroteno. La presencia de un pequeño hombro a 1584 cm^{-1}

indica la existencia de una baja concentración de Pheo en el complejo OEC. Esta conclusión está de acuerdo con los datos estequiométricos de pigmentos, en los que la relación Chl/2Pheo es de aproximadamente 35-36.

La excitación del complejo OEC a 413 nm intensifica, al igual que a 406,7 nm, las vibraciones de Chl *a*, Pheo *a*, Cyt *b*-559 y β -caroteno (Fig. 55). Se trata de un espectro bastante similar al obtenido por excitación a 406,7 nm, de forma que este espectro no nos aporta mucha más información. Puede observarse, sin embargo, que la mayoría de los modos de vibración son intensificados con respecto a los modos del espectro de excitación a 406,7 nm y la relación de intensidad entre modos varía en cierta medida.

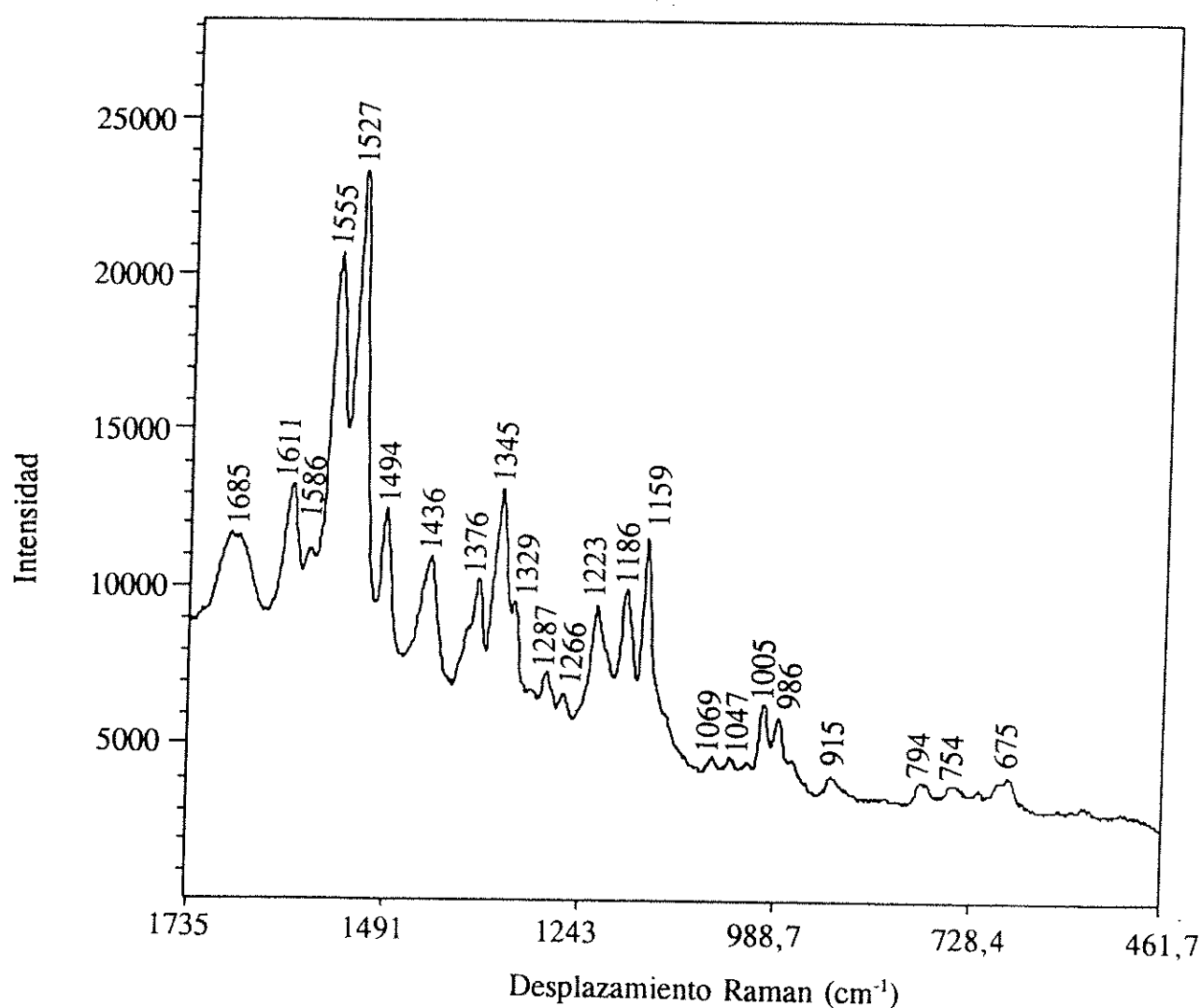


Figura 55: Espectro SERRS del complejo OEC excitado a 413 nm con láser de Kr⁺.

La excitación a 488 nm intensifica la vibración del β -caroteno. En este espectro (Fig. 56) aparecen tres bandas principales a 1529, 1161 y 1005 cm^{-1} correspondientes a los tres modos de vibración principales del β -caroteno, ν_1 , ν_2 y ν_3 , respectivamente. Las frecuencias de estas tres bandas son características de una configuración en *all-trans* del β -caroteno, ya que en un isómero en *cis* el modo ν_1 estaría a frecuencias superiores y las bandas a 1216 y 964 cm^{-1} serían más intensas.

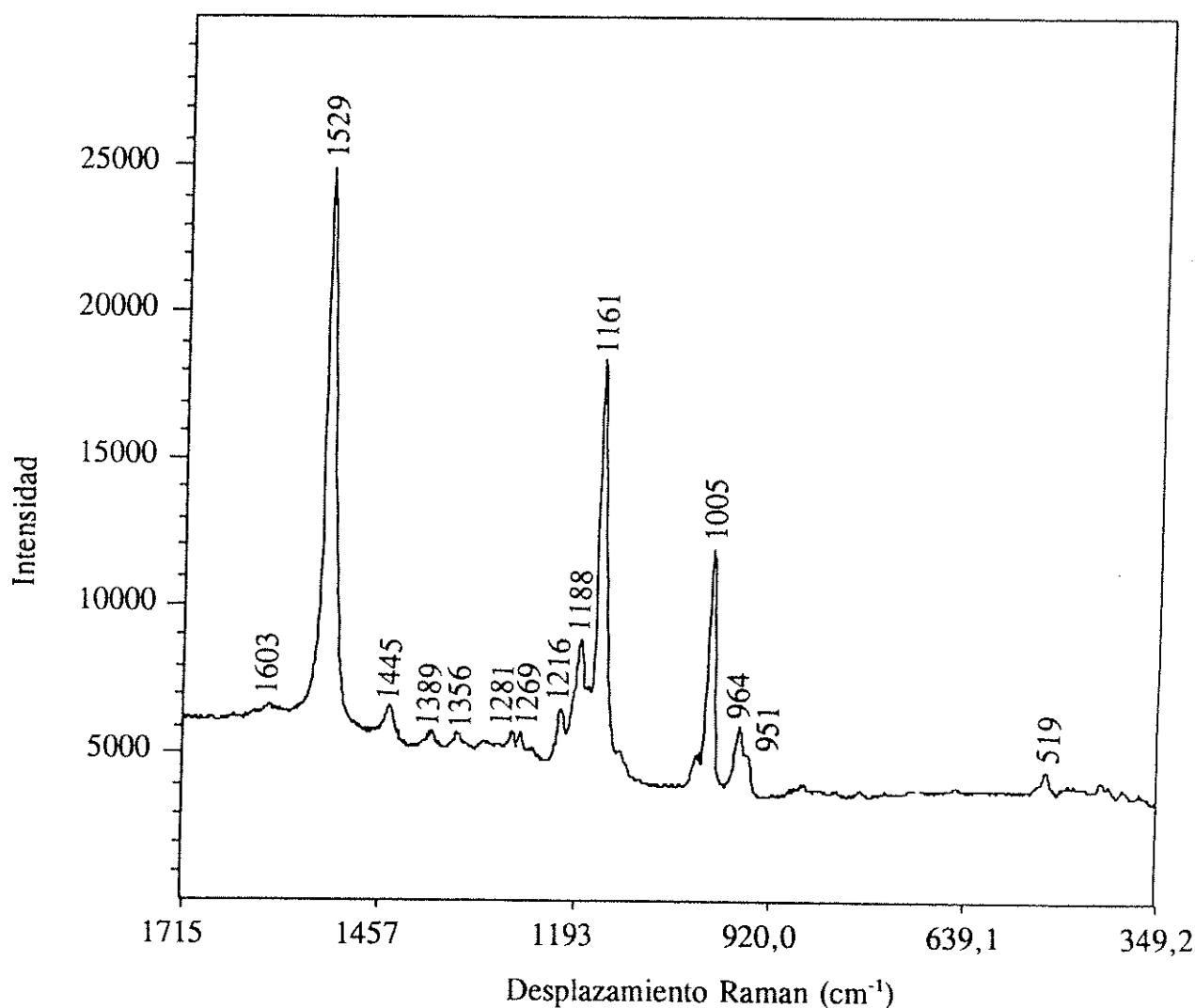


Figura 56: Espectro SERRS del complejo OEC excitado a 488 nm con láser de Ar^+ .

La excitación a 514 nm intensifica también la vibración del β -caroteno. El espectro (Fig. 57) es similar al obtenido por excitación a 488 nm, aunque existen algunas diferencias en cuanto a la relación de intensidad entre las bandas, como la banda a 1160 cm^{-1} que se muestra mucho más intensa en relación al resto de las bandas que en el espectro excitado a 488 nm.

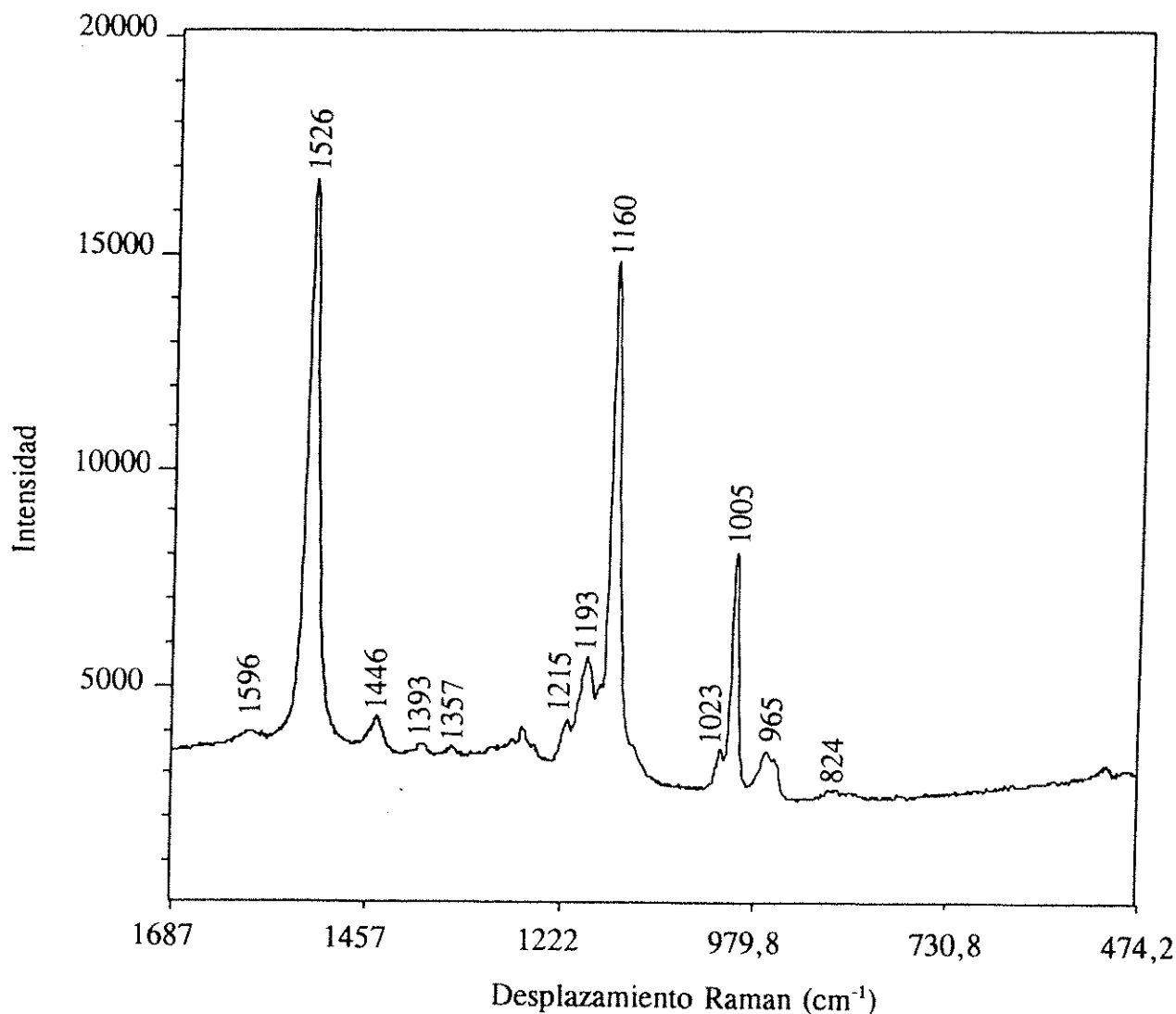


Figura 57: Espectro SERRS del complejo OEC excitado a 514 nm con láser de Ar⁺.

La excitación a 700 nm proporciona información directa sobre los modos vibracionales acoplados a la transición Q_y , la cual juega un papel específico en la transferencia de energía y en la separación de cargas. Se llevaron a cabo dos barridos excitando a 700 nm, uno en la zona de frecuencias medias (1267-649 cm^{-1}) y otro en la zona de altas frecuencias (1706-1127 cm^{-1}), tanto para el complejo OEC (Fig. 58 y 59) como para Chl y Pheo en solución (Fig. 60 y 61). Las principales bandas del complejo OEC corresponden a bandas de modos de vibración de la Chl (1439, 1330, 1289, 1188, 919, 755 y 744 cm^{-1}), aunque las correspondientes a la Pheo (1582, 1345, 1165, 1127, 1092, 895 y 877 cm^{-1}) están ausentes. Estos datos están de acuerdo con la composición de pigmentos del complejo OEC, pues como ya se ha comentado la relación Chl/2Pheo es del orden de 35-36, por lo que es comprensible que el espectro SERRS del complejo OEC excitado a 700 nm sea muy similar al espectro de Chl en solución.

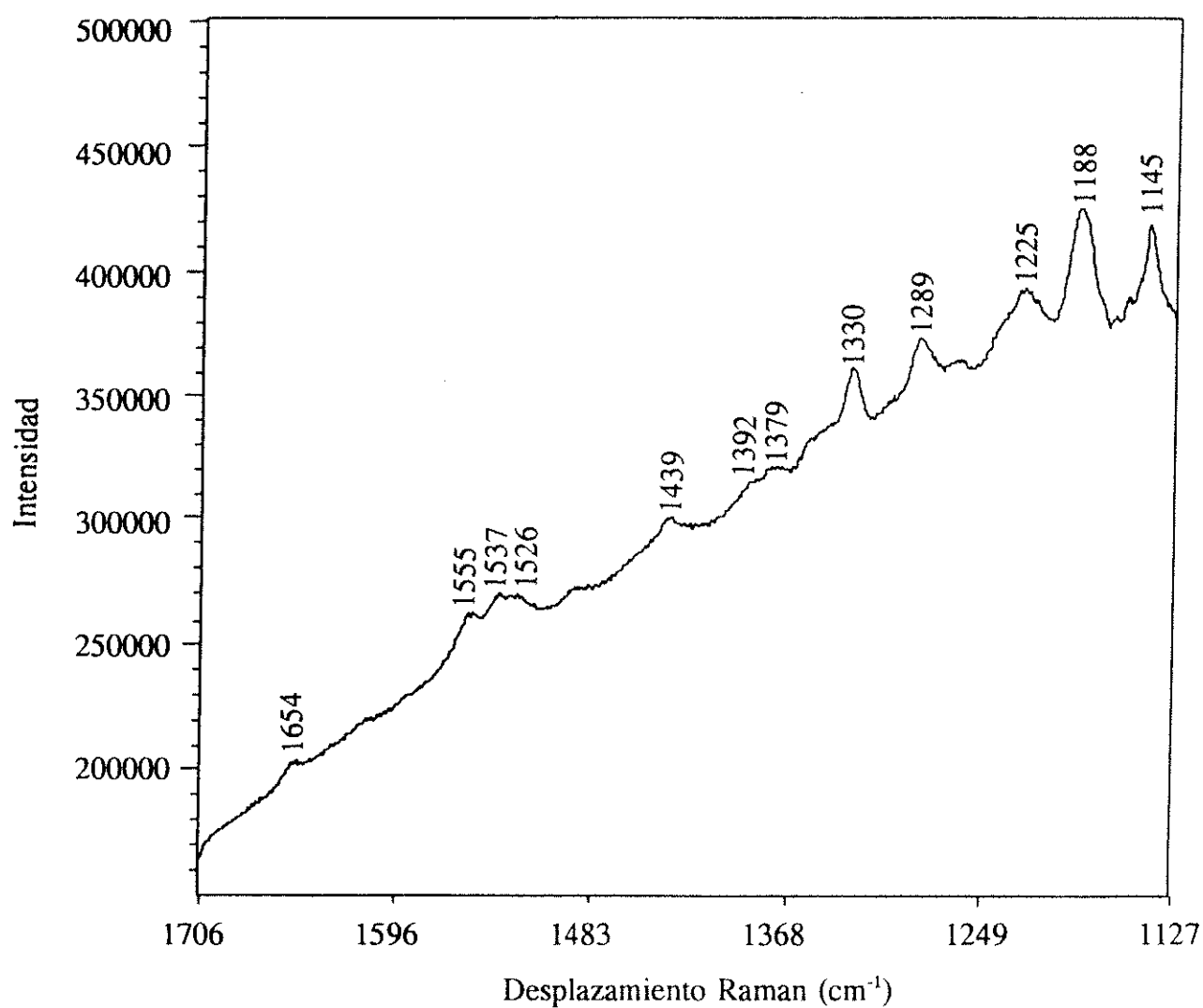


Figura 58: Espectro SERRS a altas frecuencias del complejo OEC excitado a 700 nm.

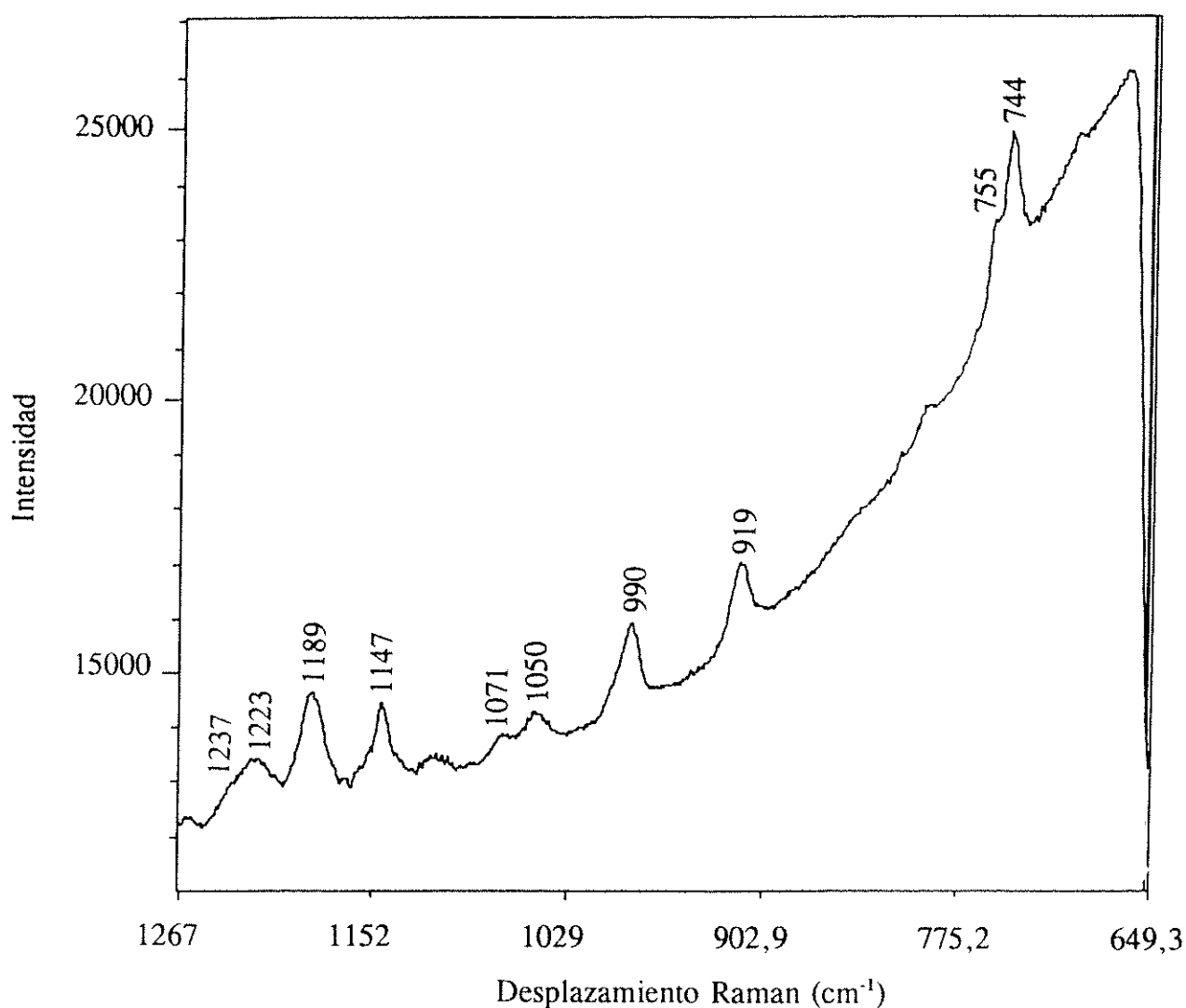


Figura 59: Espectro SERRS en el rango de frecuencias medias del complejo OEC excitado a 700 nm.

La existencia de pequeños desplazamientos entre las bandas del complejo y las de la referencia (Chl en solución), indican la presencia de interacciones Chl-Chl o Chl-proteína en el complejo OEC, inexistentes en el caso de la Chl en solución.

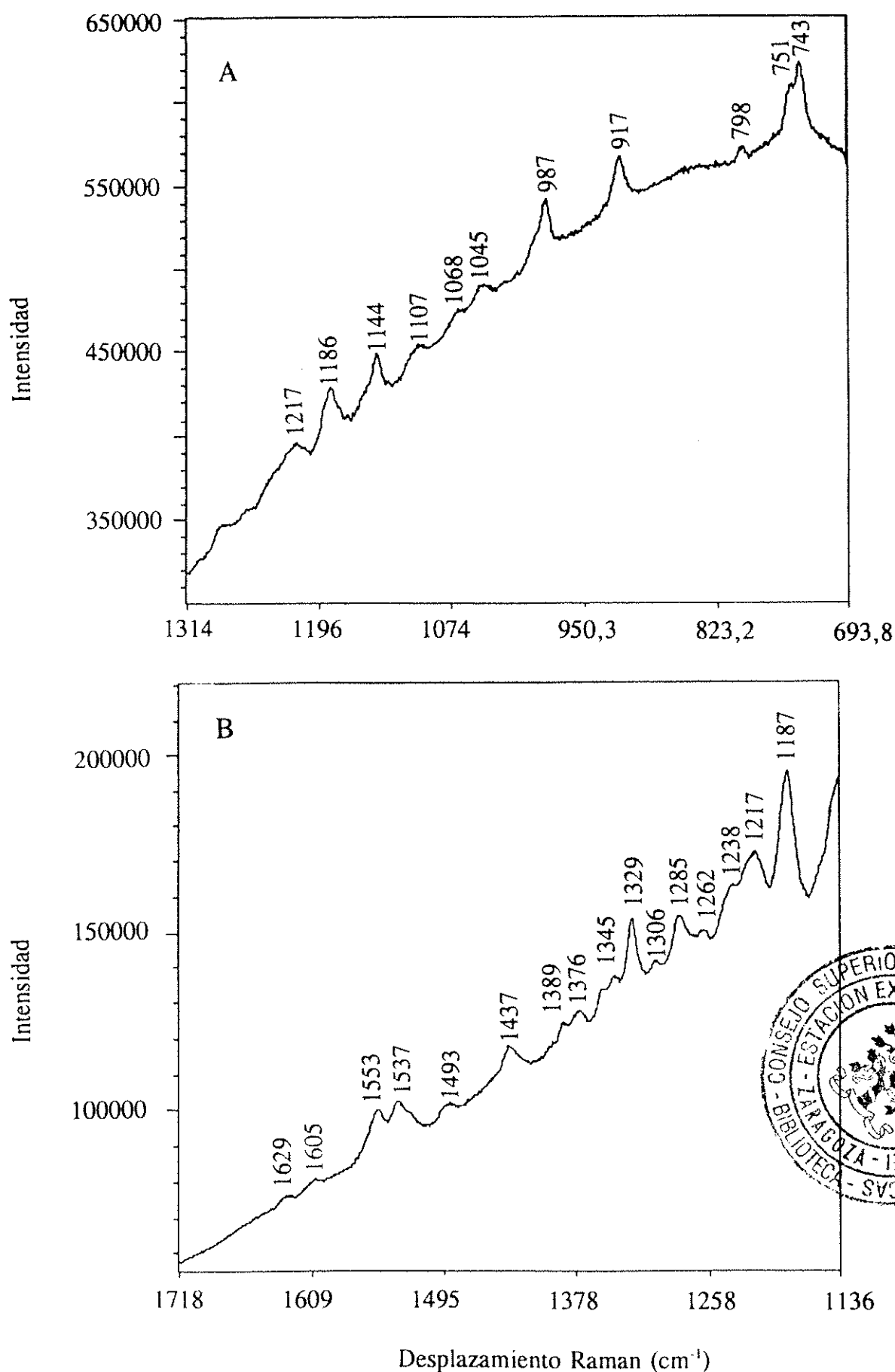


Figura 60: Espectro SERRS a medias frecuencias (A) y a altas frecuencias (B) de Chl en solución excitado a 700 nm.

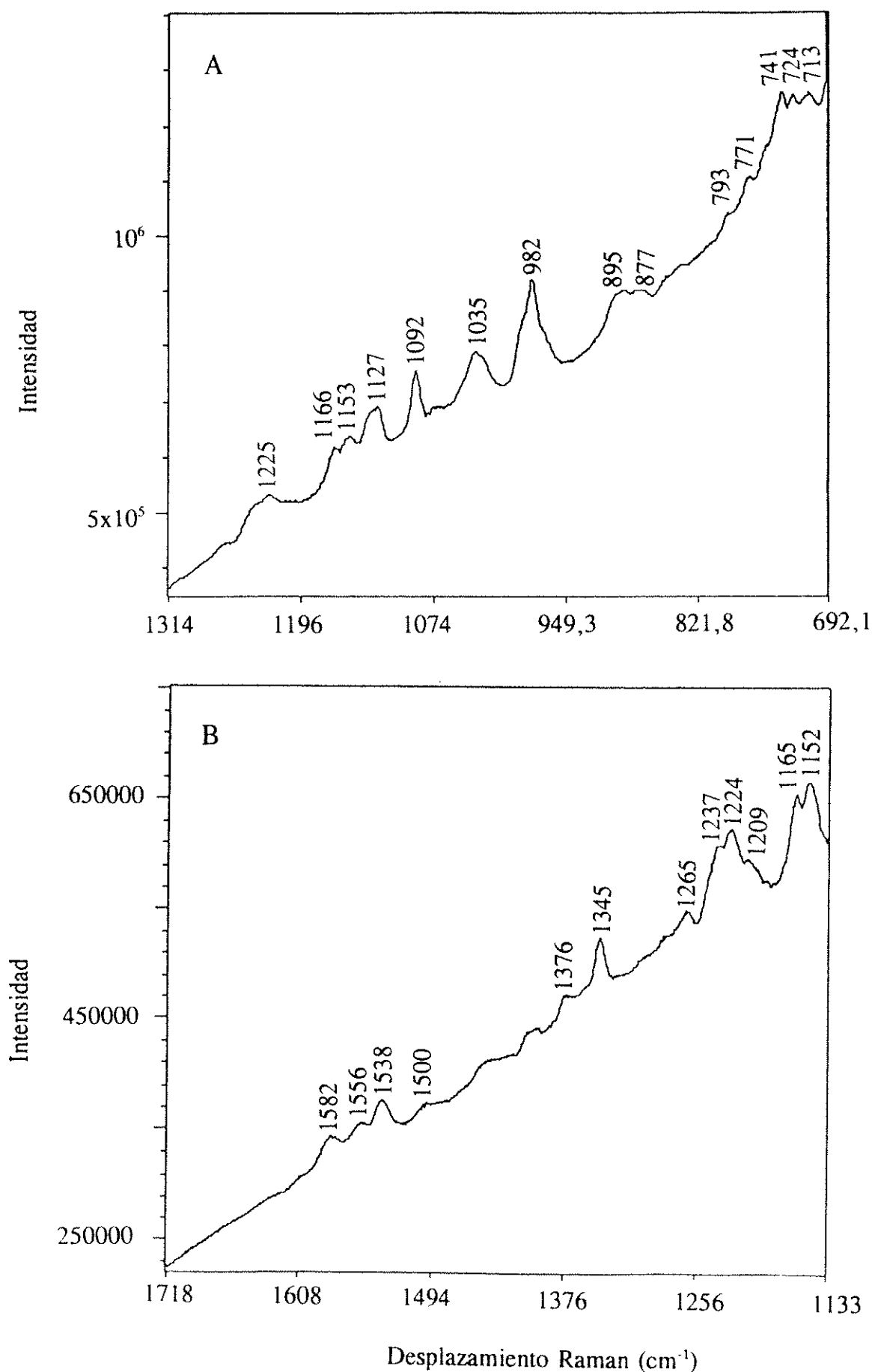


Figura 61: Espectro SERRS a medias frecuencias (A) y a altas frecuencias (B) de Pheo en solución excitado a 700 nm.

1.6.5. Fluorescencia resuelta en el tiempo

La espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo del complejo OEC se determinó en la escala de ps. El análisis de la cinética se realizó individualmente para cada conjunto de datos, encontrando el mejor ajuste de éstos con tres exponenciales. La validez de los ajustes se evaluó mediante los valores de χ^2 , un valor de 1,157 fue considerado como buen ajuste para tres exponenciales con tiempos de vida de 3.628, 534 y 248 ps. Los espectros asociados a cada una de las componentes del decaimiento de fluorescencia pueden observarse en la Fig. 62.

Los dos tiempos de vida más cortos corresponden a transferencia de energía en el PSII intacto, mientras que el componente de mayor tiempo de vida corresponde a alguna distorsión producida en la superficie de la antena.

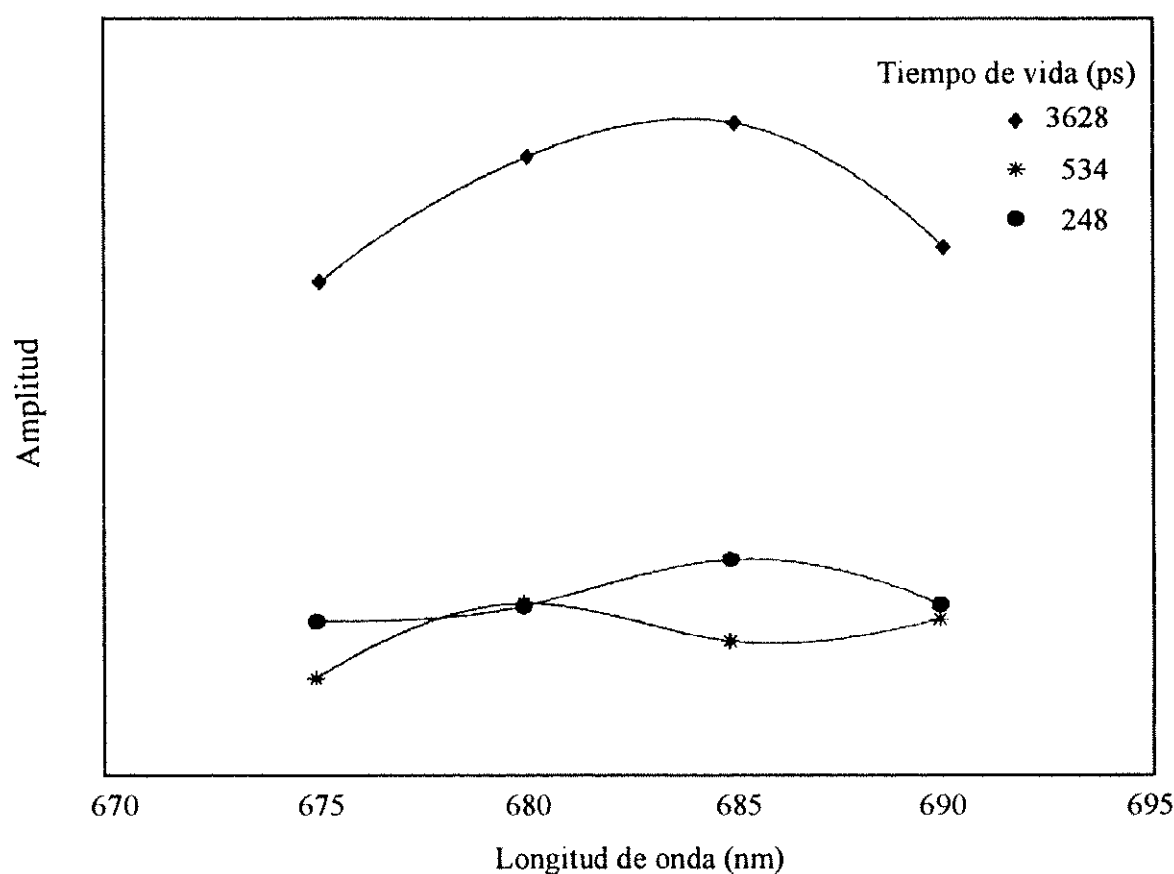


Figura 62: Espectros asociados a cada una de las componentes del decaimiento de fluorescencia (DAS) del complejo OEC. La fluorescencia de emisión resuelta en el tiempo se llevó a cabo excitando a 660 nm a 4°C.

1.7. Purificación del complejo proteico PSII RC

La purificación del centro de reacción del PSII (complejo $D_1/D_2/Cyt\ b-559$) se llevó a cabo a partir del complejo OEC. En un principio se partió del material obtenido tras sucesivas centrifugaciones diferenciales de membranas tilacoidales solubilizadas con LDAO, pero como ya se ha descrito anteriormente, los resultados no fueron los esperados ya que el complejo de RC se obtuvo totalmente desnaturalizado. En la Fig. 63 se muestra el espectro de absorción a temperatura ambiente de una de estas preparaciones de RC, observándose un desplazamiento de la banda de menor energía hacia el azul con un máximo a 669 nm. En las últimas fracciones eluidas en esta cromatografía se obtuvo material enriquecido en β -caroteno, su espectro de absorción se muestra en la Fig. 64.

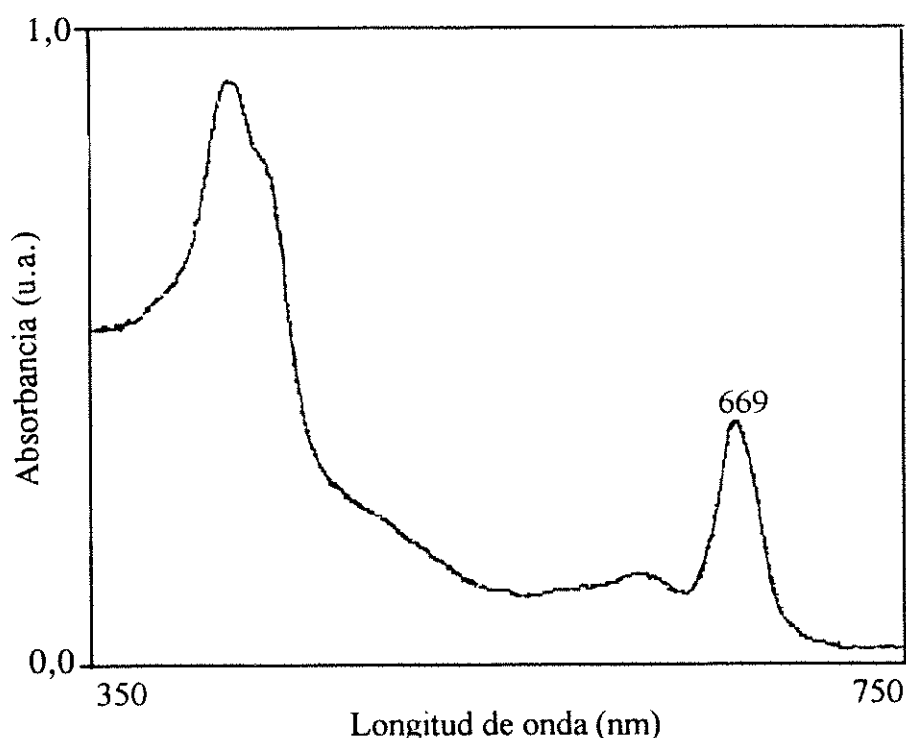


Figura 63: Espectro de absorción electrónica del complejo RC desnaturalizado obtenido según el apartado 2.3.a. de Materiales y Métodos.

Según estos datos y tras mejorar el método de purificación del complejo OEC mediante un gradiente de sacarosa y una posterior cromatografía de intercambio iónico, se intentaron diferentes solubilizaciones del nuevo material. Las solubilizaciones en solución no nos llevaron a mejores resultados, pues el tratamiento con detergente (TX-100 y/o DM) parecía muy destructivo y tras él, la mayoría de la Chl se encontraba como Chl libre desligada de la proteína (Fig. 65).

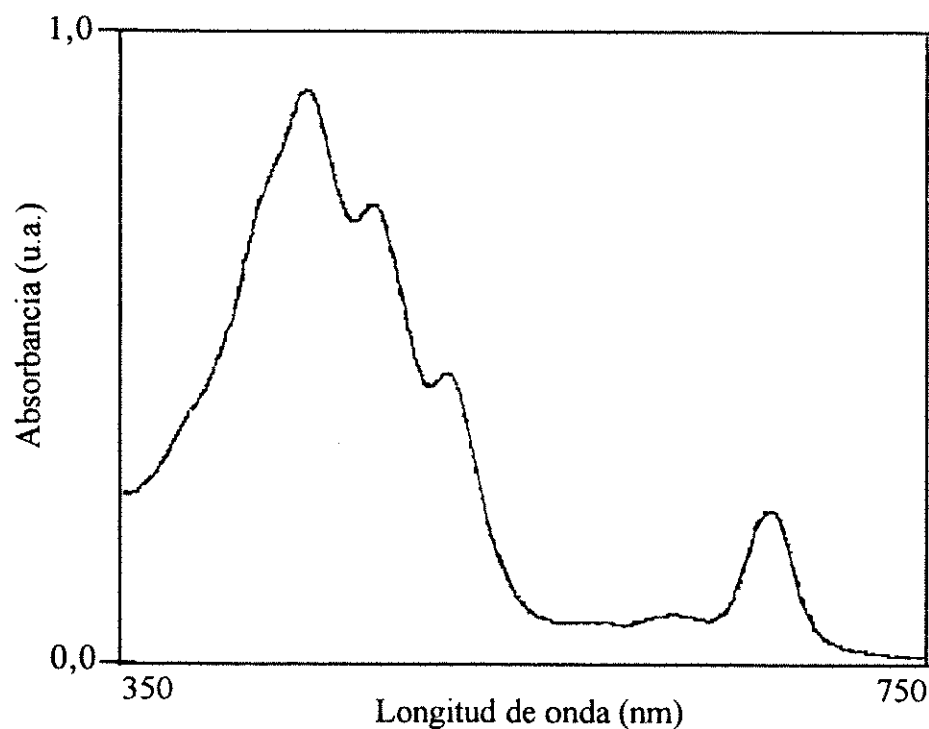


Figura 64: Espectro de absorción electrónica de las fracciones enriquecidas en β -caroteno, según el apartado 2.3.a. de Materiales y Métodos.

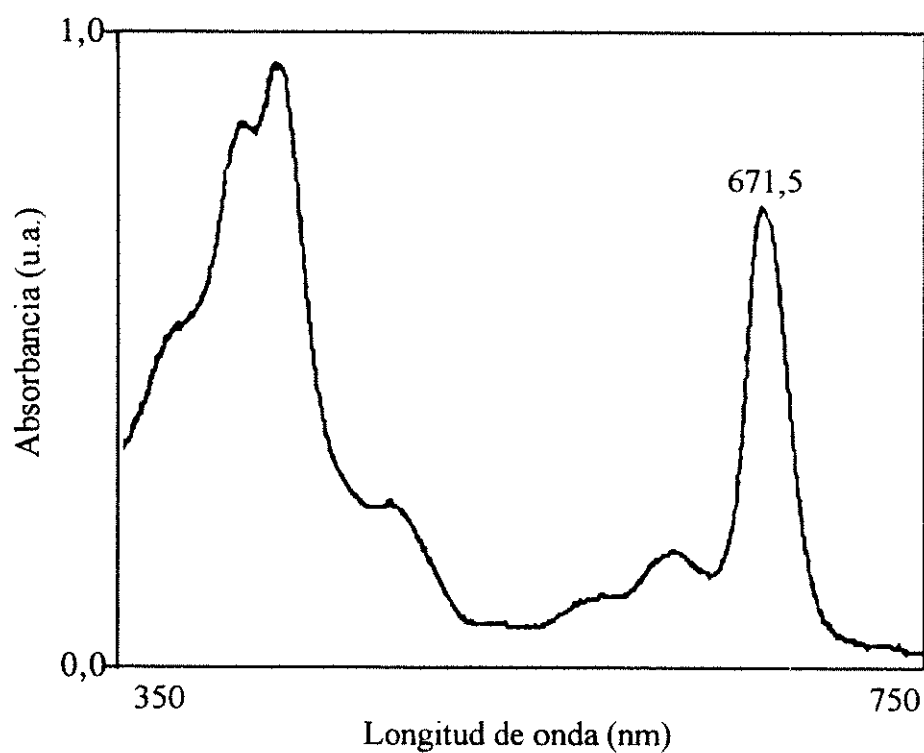


Figura 65: Espectro de absorción electrónica de las fracciones de Chl libre desligada de la proteína, según el apartado 2.3.a. de Materiales y Métodos.

En algunas fracciones de la cromatografía se obtuvieron complejos proteicos con un espectro de absorción muy similar al espectro de la antena intrínseca CP47 (van Dorssen y col., 1987; Alfonso y col., 1994), pero tampoco se encontraron en su estado nativo sino con un alto grado de desnaturalización (Fig. 66). En otras fracciones de la cromatografía se obtuvieron complejos enriquecidos en PSI, con un máximo en la banda del rojo a 677 nm (Rögner y col., 1990, Fig. 67), por lo que se decidió probar la solubilización del complejo OEC en columna.

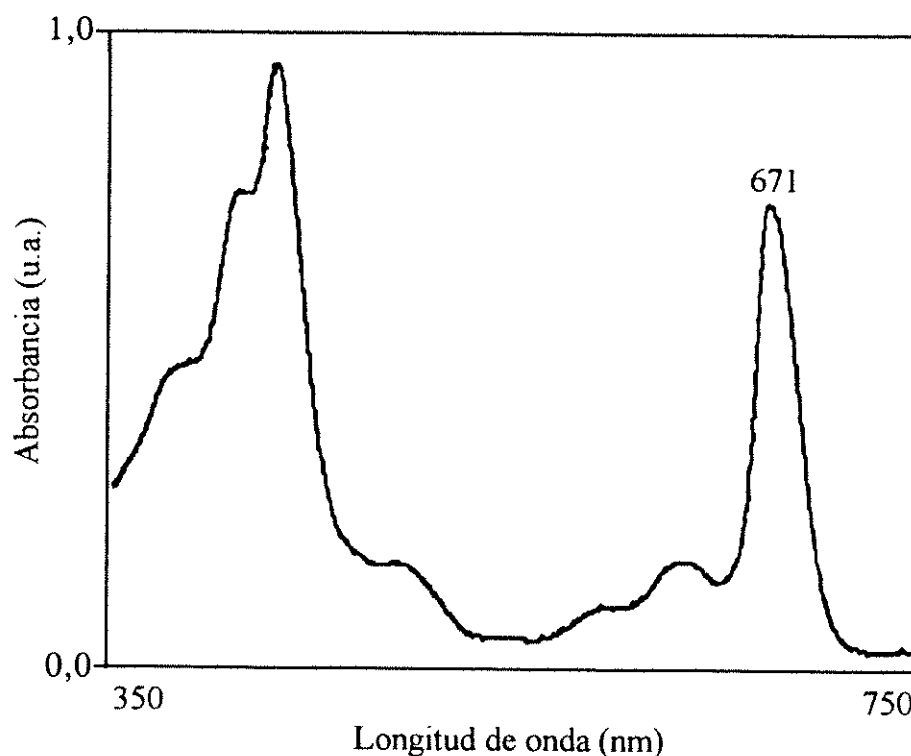


Figura 66: Espectro de absorción electrónica de las fracciones enriquecidas en CP47, según el apartado 2.3.a. de Materiales y Métodos.

Tras sucesivos cambios en las condiciones de solubilización, se llegó a poner a punto un método que consiste en cuatro solubilizaciones consecutivas del complejo OEC inmovilizado en columna con el detergente TX-100, proporcionando un complejo de centro de reacción nativo y con una elevada pureza. Tras cada una de las incubaciones de la muestra inmovilizada en la columna cromatográfica, eluye complejo de antena desnaturalizada, cuyo espectro se muestra en la Fig. 68. Como consecuencia, el material que permanece unido a la columna se va purificando a medida que se suceden las incubaciones.

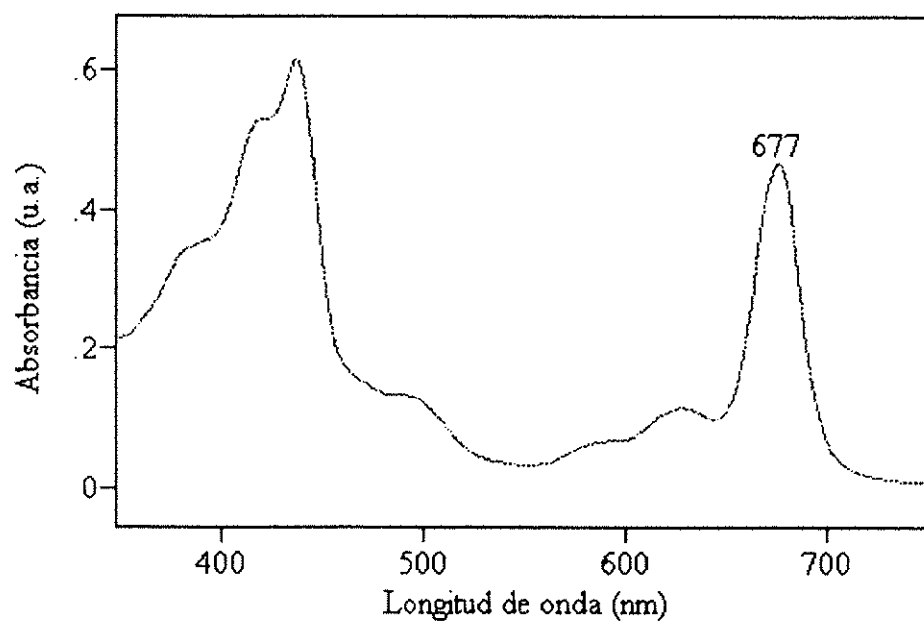


Figura 67: Espectro de absorción electrónica de las fracciones enriquecidas en PSI, según el apartado 2.3.a. de Materiales y Métodos.

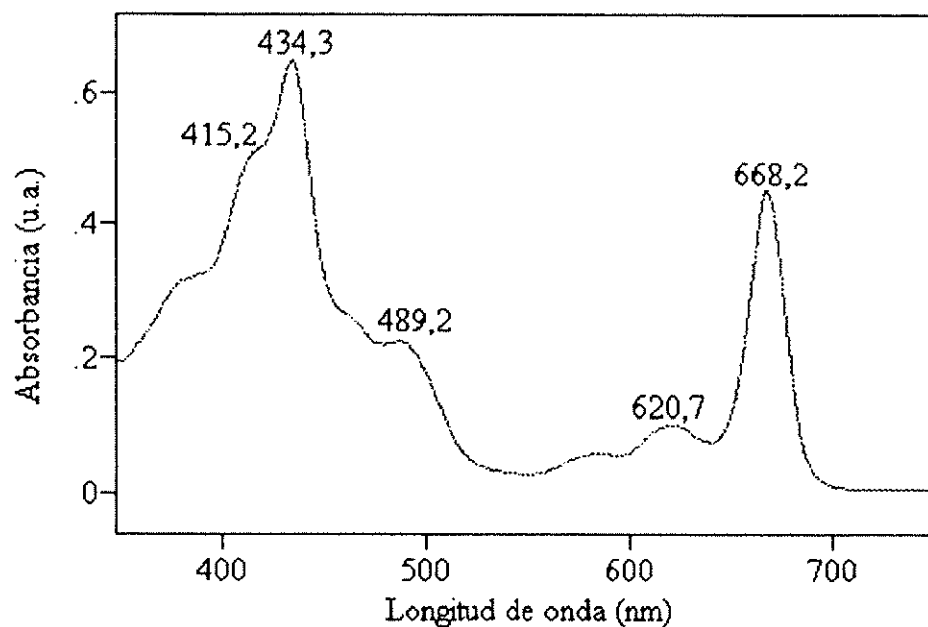


Figura 68: Espectro de absorción electrónica del complejo de antena desnaturalizado, según el apartado 2.3.b. de Materiales y Métodos.

Después de cuatro solubilizaciones y tras intercambiar el detergente TX-100 por DM, el complejo de RC se eluye con un gradiente lineal 60-100 mM de MgSO_4 . El cromatograma de dicha elución se representa en la Fig. 69, con un máximo, que corresponde a las fracciones seleccionadas, con una concentración de 75-90 mM de MgSO_4 .

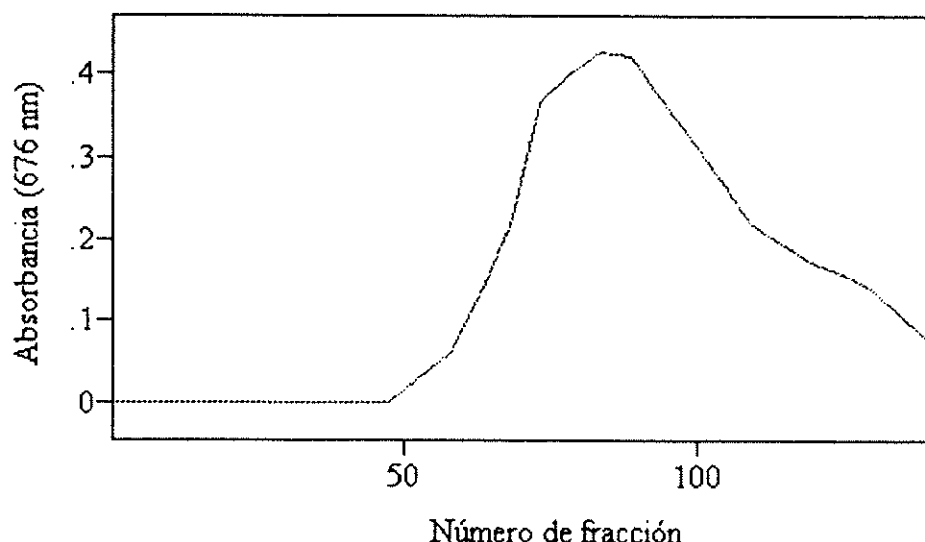


Figura 69: Cromatograma de la purificación del complejo PSII RC de *P. laminosum*.

El espectro de absorción del complejo PSII RC se muestra en la Fig. 70 en donde se observan las bandas características a 676, 623, 539,5, 485, 430,5 y 415,5 nm. El máximo a 676 nm se debe a las transiciones electrónicas Q_y de la Chl y Pheo del centro de reacción del PSII y la banda a 623 nm es producida por transiciones vibracionales de la Chl y Pheo. El máximo a 539,5 nm indica la presencia característica de Pheo y la pronunciada banda a 415,5 es debida a las transiciones Soret de la Chl, Pheo y Cyt *b*-559. Comparando el hombro a 435 nm, asociado a la Chl, respecto a la banda a 415,5 nm en PSII RC y en el complejo OEC, claramente se aprecia un enriquecimiento de Pheo respecto a la Chl en PSII RC. La intensidad relativa de este hombro es una buena indicación de la pureza de la preparación. El máximo a 485 nm es originado por el β -caroteno.

La relación de absorbancias entre la banda a 415,5 nm y la transición Q_y de las porfirinas es similar a la obtenida en plantas superiores ($A_{416}/A_{676} = 1,3-1,4$).

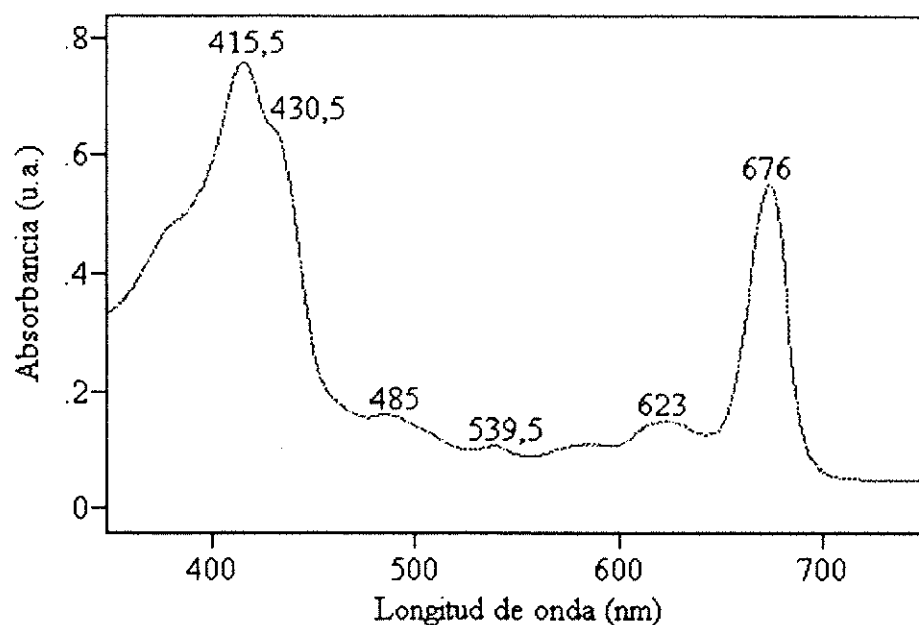


Figura 70: Espectro de absorción electrónica del complejo PSII RC de *P. laminosum* en tampón 0,03 % (p/v) DM, 1,5 % (p/v) taurina, 200 mM sacarosa y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5).

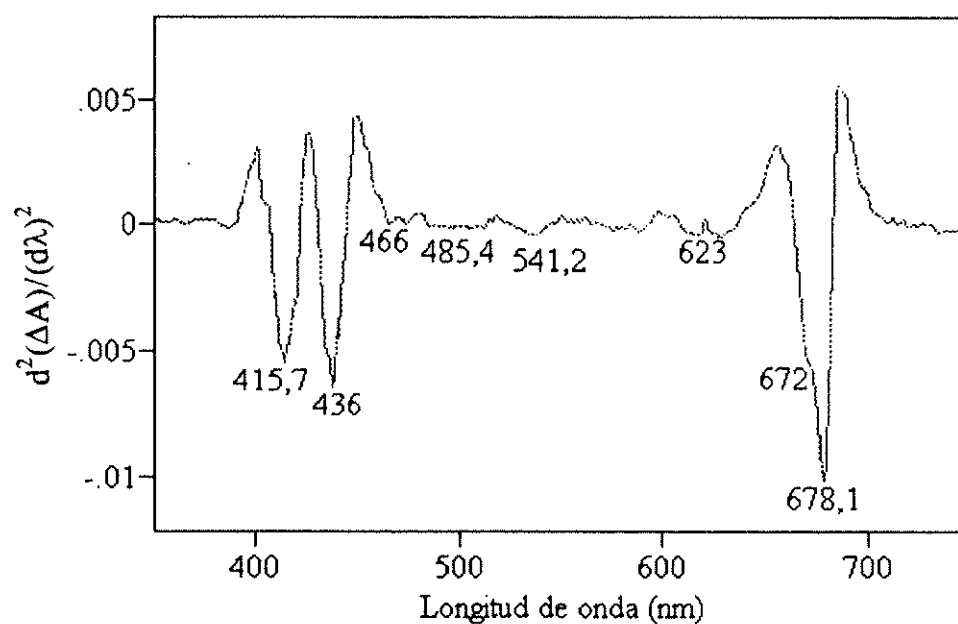


Figura 71: Segunda derivada del espectro de absorción del complejo PSII RC.

La segunda derivada de la preparación del PSII RC de *P. laminosum* (Fig. 71) presenta al menos dos componentes mayoritarios bajo la banda de menor energía, correspondientes al pico negativo agudo a 678 nm y al hombro negativo a 672 nm.

1.8. Propiedades bioquímicas del complejo proteico PSII RC

1.8.1. Identificación de pigmentos

Mediante el análisis del complejo PSII RC por HPLC se pudo determinar la existencia de tres pigmentos, Chl (1), Pheo (2) y β -caroteno (3) (Fig. 72). Los tiempos de retención de cada componente se mantienen para cada uno de los distintos tipos de complejos proteicos cuyos pigmentos han sido identificados con este método cromatográfico.

De igual forma a lo sucedido en membranas tilacoidales y en el complejo OEC, el β -caroteno aparece como dos picos solapados pero diferenciados (Fig. 73). Mediante el uso de un detector de diode-array fue posible caracterizar espectrofotométricamente cada uno de los dos picos. Así, pudo definirse el primer pico en eluir como el isómero *all-trans*, caracterizado por dos máximos a 454,4 y 482,3 nm, mientras que el segundo corresponde a un isómero *cis* con máximos a 342,7, 450,8 y 475 nm. Este isómero podría tratarse del 15-*cis*- β -caroteno, pero se tendrá que confirmar por RMN. Los espectros de absorción de cada uno de los isómeros son exactamente iguales a los obtenidos a partir del complejo OEC (Fig. 44).

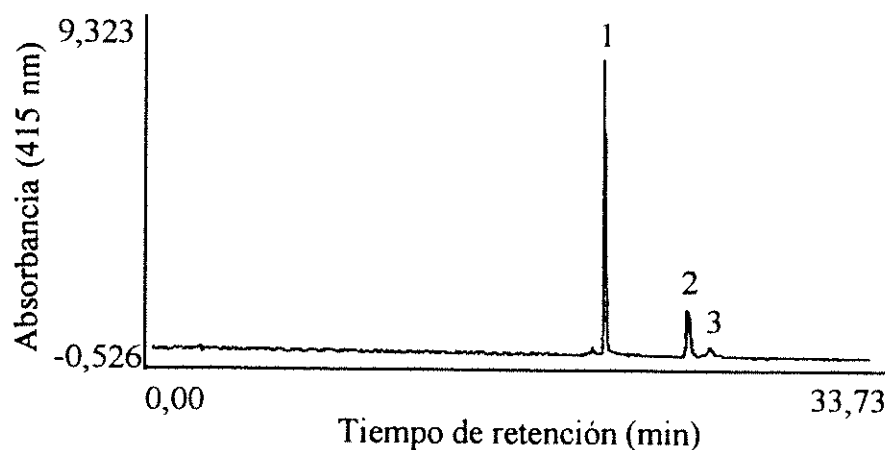


Figura 72: Cromatograma de HPLC de un extracto de pigmentos del complejo PSII RC de *P. laminosum*.

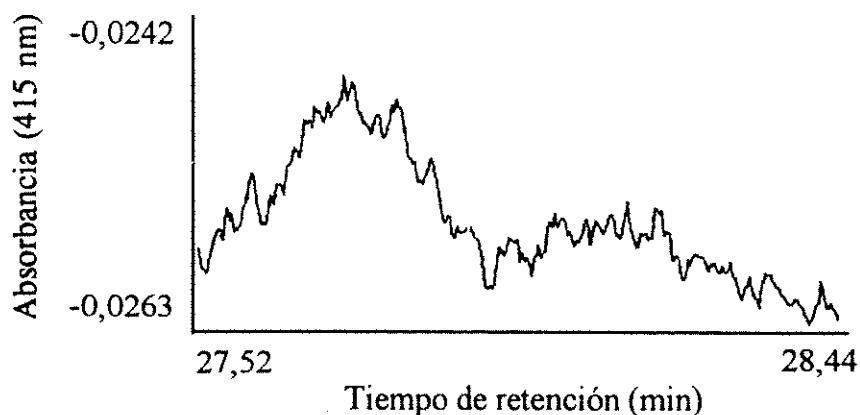


Figura 73: Detalle del cromatograma de HPLC de un extracto de pigmentos del complejo PSII RC en los tiempos de retención correspondientes al β -caroteno.

1.8.2. Cuantificación de pigmentos

En los últimos años, la estequiometría de los componentes del RC de plantas superiores ha sido un tema de gran controversia, por lo que en este trabajo se llevó a cabo la cuantificación de pigmentos de este nuevo complejo de RC de cianobacterias sin fundamentarnos en datos anteriores de plantas superiores. Esta cuantificación se realizó mediante el uso de dos técnicas bien diferenciadas.

i. Método espectrofotométrico

La concentración de Chl más Pheo fue calculada a partir del extracto acetónico tras su feofitinización con 1,5 mM de HCl (Fig. 74B), donde la Chl fue convertida completamente a Pheo, usando el coeficiente de extinción de $49,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 666 nm. La concentración de Chl se calculó como la diferencia entre este valor y el calculado para la Pheo a partir del espectro del extracto acetónico (Fig. 74A), usando $6,504 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinción a 535 nm. Se obtuvo una relación de 6 Chl/2 Pheo.

Por otra parte, a partir del espectro diferencial ditionito (reducido) menos ferricianuro (oxidado) (Fig. 75) y usando el coeficiente $\epsilon_{559-575 \text{ nm}} = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, se calculó la concentración de Cyt *b*-559 en esta preparación. Considerando la existencia de 1 Cyt *b*-559 por centro de reacción y a partir del dato obtenido de concentración de pigmentos totales puede deducirse fácilmente una relación de pigmentos de 6,3 Chl/ 2 Pheo/ 1 Cyt *b*-559, que es muy parecida a la obtenida con el otro método.

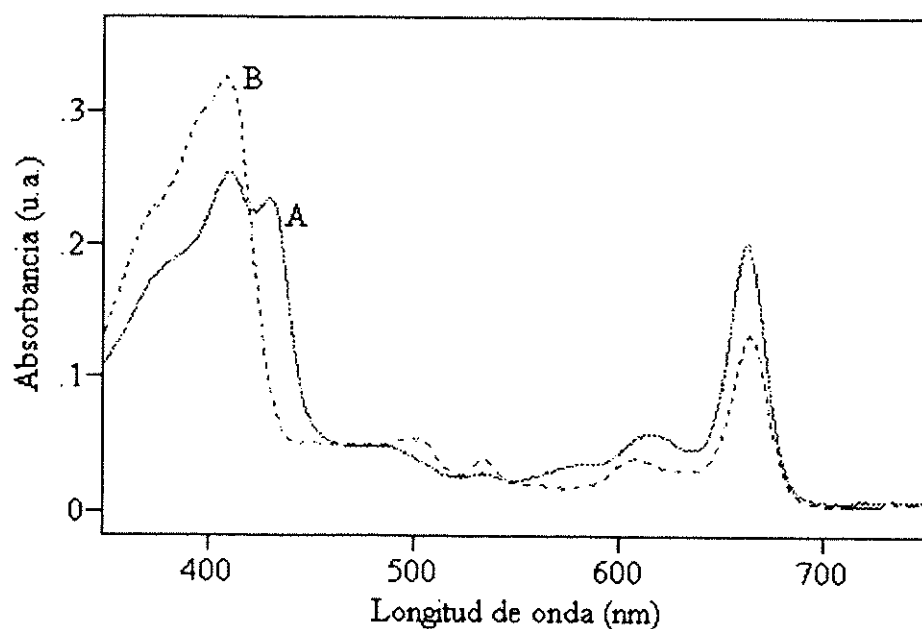


Figura 74: Espectros de absorción electrónica de un extracto acetónico de pigmentos del complejo PSII RC sin feofitinizar (A) y tras su feofitinización (B).

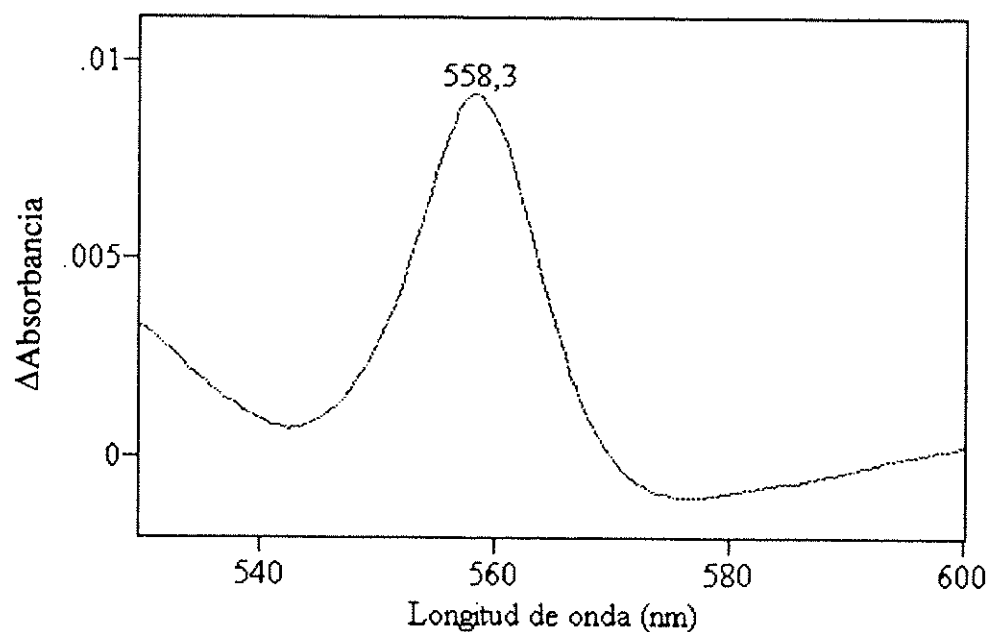


Figura 75: Espectro diferencial ditionito (reducido) menos ferricianuro (oxidado) del complejo PSII RC.

ii. Método de HPLC

En el apartado 5.2.4. de Materiales y Métodos se describe el método de HPLC utilizado para la cuantificación de pigmentos del RC, resultando una relación de 6,5 Chl/2 Pheo.

Los datos obtenidos siguiendo tres métodos diferentes están claramente en la misma línea, por lo que cualquiera de ellos puede considerarse igualmente válido.

1.8.3. Contenido proteico. SDS-PAGE

La electroforesis en gradiente de gel de poliacrilamida de la Fig. 76 muestra el contenido proteico del complejo de RC del PSII. El electroforetograma muestra cuatro bandas de proteína identificadas (por orden de masa molecular decreciente) como heterodímero D₁/D₂, D₂, D₁ y la banda α del Cyt *b*-559. Este complejo muestra una composición polipeptídica similar al aislado a partir de plantas superiores (Nanba y Satoh, 1987; Barber y col., 1987; Braun y col., 1990; Montoya y col., 1991).

Para poder ver claramente el efecto del inhibidor de proteasas, PMSF, se purificó un RC sin utilizar dicho inhibidor en ninguna etapa del proceso, la electroforesis de este complejo mostró una serie de bandas adicionales además de las características de un RC (Fig. 77A). Para determinar el origen de estas bandas adicionales se utilizó la técnica de "Western Blotting" con un anticuerpo desarrollado contra el dominio C-terminal de D₁. De esta forma se observó que las bandas a ~40 kDa y a ~20 kDa no son debidas a contaminaciones sino a agregaciones y degradaciones del polipéptido D₁ (Fig. 77B).

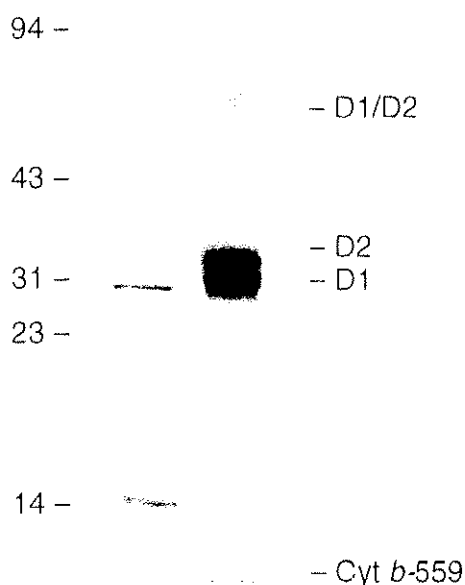


Figura 76: SDS-PAGE en gradiente (13-22,5%, p/v) de poliacrilamida del complejo PSII RC de *P. laminosum*

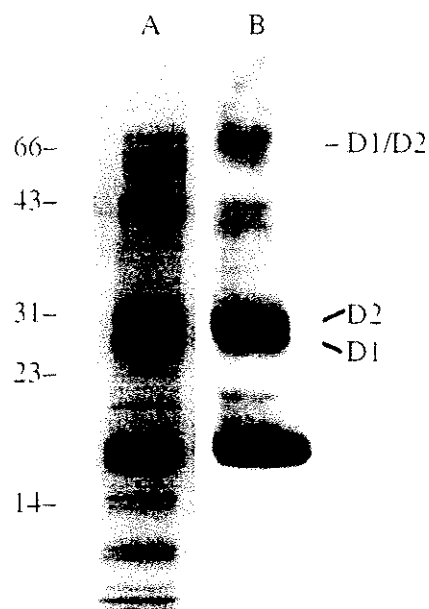


Figura 77: SDS-PAGE en gradiente (13-22,5%, p/v) de poliacrilamida del complejo PSII RC de *P. laminosum* purificado sin PMSF, revelado con Coomassie Blue (A) y con un anticuerpo contra D₁ (B).

1.8.4. Medidas de actividad

La actividad del complejo PSII RC se puede medir en estado estacionario mediante la fotoacumulación de Pheo o mediante el transporte electrónico secundario.

En la Fig. 78 se puede observar que la iluminación continua en presencia de ditionito sódico y metilviológeno indujo en el complejo una decoloración reversible de las bandas a 682 y 542 nm. Aunque estos cambios han sido atribuidos a la acumulación de Pheo reducida por diferentes autores (Nanba y Satoh, 1987; Barber y col., 1987), otros autores han relacionado el cambio a 682 nm con la decoloración de una banda hacia 676 nm adscrita a Pheo, a un desplazamiento de su máximo y a un aumento de la anchura de la banda de P680 inducidos por la iluminación (van Kan y col., 1990; Braun y col., 1990).

Utilizando DPC como donador artificial de electrones y SiMo como aceptor, la velocidad de reducción de SiMo, medida como cambio de absorción a 600 nm, correspondió a la capacidad de transporte electrónico secundario de la preparación de RC de *P. laminosum* (Fig. 79). El valor obtenido de $3.910 \mu\text{eq e}^- \cdot \mu\text{mol Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ fue superior a los datos

previamente publicados para el RC de plantas superiores (Chapman y col., 1988; Montoya y col., 1994).

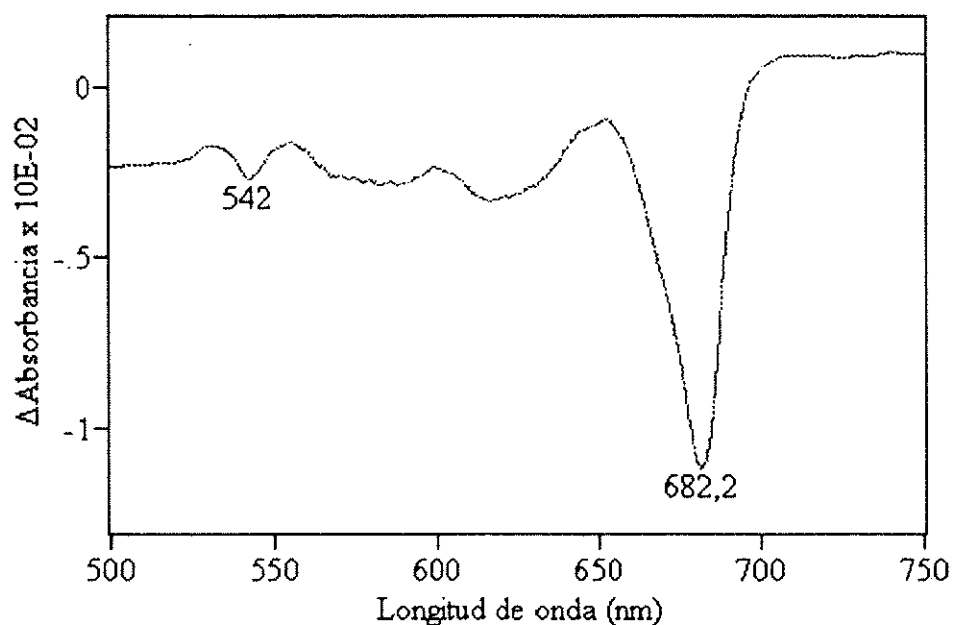


Figura 78: Cambios de absorción inducidos por luz en el complejo PSII RC de *P. laminosum* en el rango espectral de 525 a 725 nm. La medida se realizó en tampón 20 mM Bis-Tris (pH 6,5).

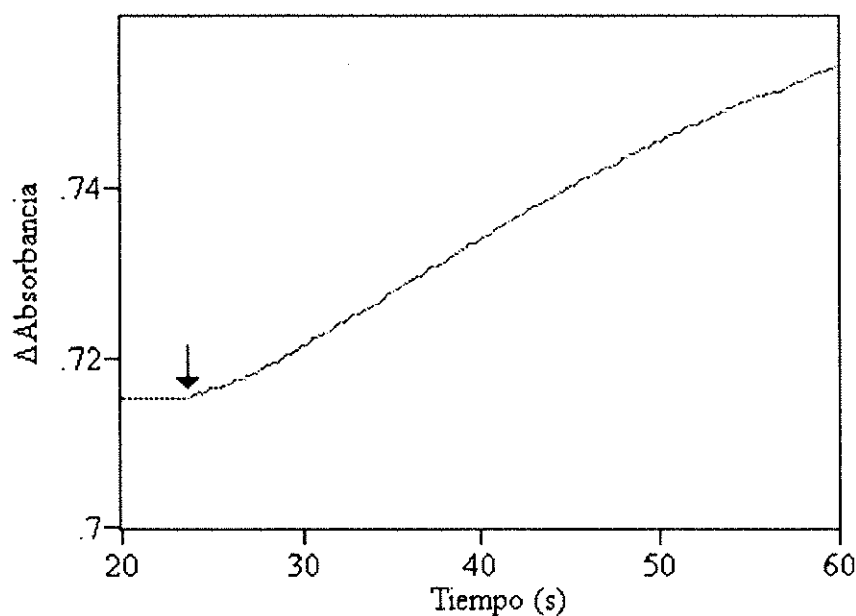


Figura 79: Cinética de reducción de SiMo, medida a 600 nm, catalizada por el complejo PSII RC de *P. laminosum* en presencia del donador artificial de electrones DPC.

1.9. Características espectroscópicas del complejo proteico PSII RC

Además de los espectros UV-VIS del complejo PSII RC, que ya han sido comentados al explicar su procedimiento de purificación, se han realizado otras medidas espectroscópicas.

1.9.1. Absorción a baja temperatura

En la Fig. 80 se muestra el espectro de absorción a 10K del complejo PSII RC en la banda del rojo, correspondiente a la transición Q_y de las porfirinas. El máximo de la banda más intensa está a 677,6 nm mientras que el máximo de la otra banda aparece a 670,7 nm. En la Fig. 81 se muestra la segunda derivada de dicho complejo, en donde se observan tres mínimos a 668,7, 677,7 y 681,1 nm, lo que sugiere que existen al menos tres componentes principales bajo la banda del rojo.

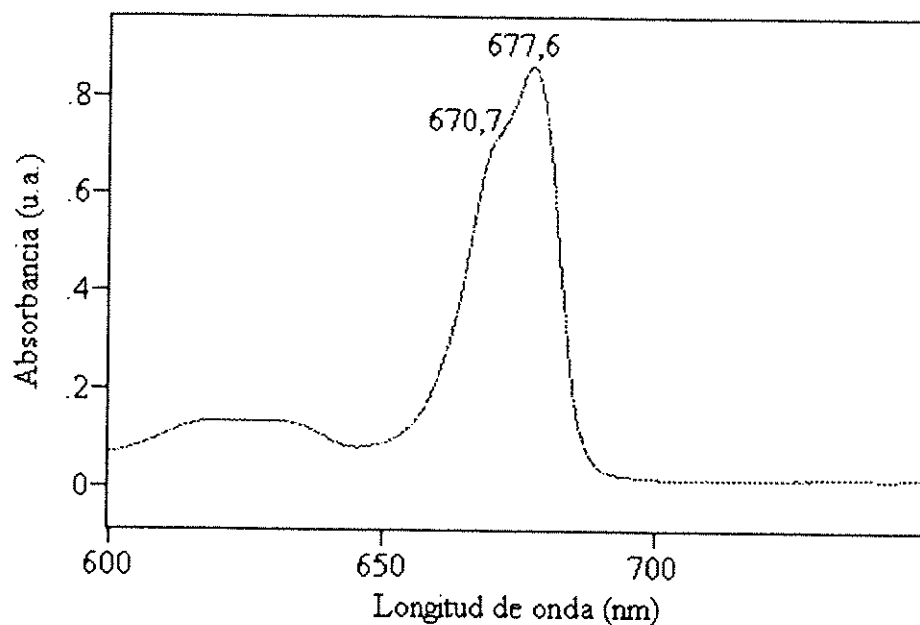


Figura 80: Espectro de absorción electrónica a baja temperatura del complejo PSII RC de *P. lamosum*. El espectro se obtuvo tras diluir la muestra 3 veces (v/v) con glicerol.

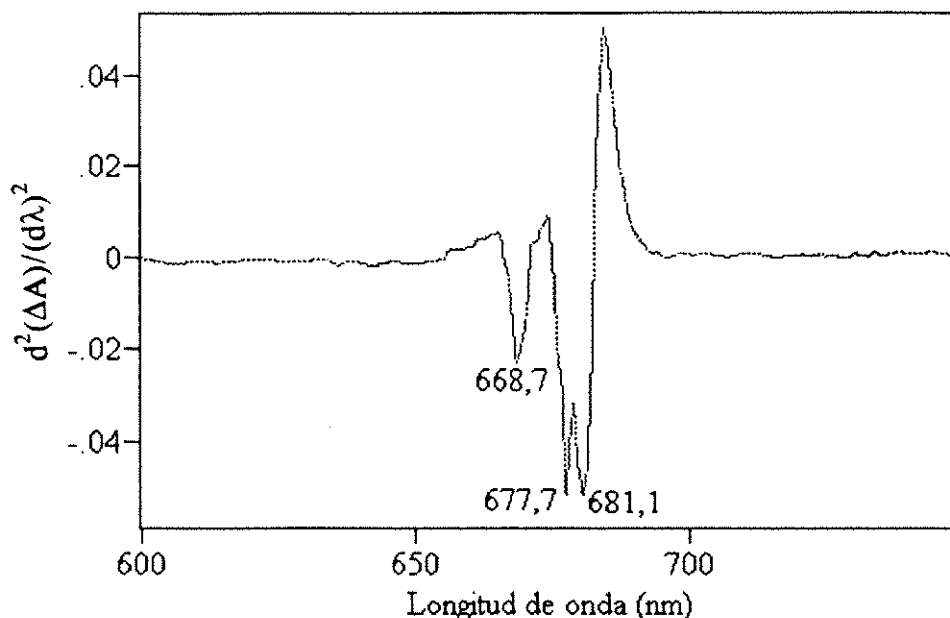
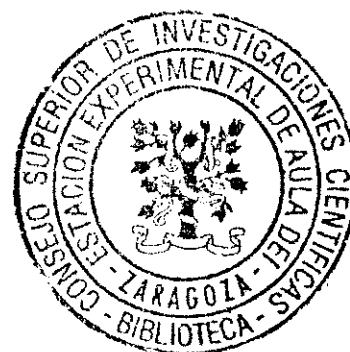


Figura 81: Segunda derivada del espectro de absorción a baja temperatura del complejo PSII RC.

1.9.2. Fluorescencia a baja temperatura

Se realizaron los espectros de emisión y de excitación de fluorescencia del complejo PSII RC a 77K. En la Fig. 82 se muestra el espectro de emisión excitado a 620 nm, en el que se observa una banda principal con máximo a 683,1 nm y otras dos bandas de menor intensidad a 739,8 nm y a 759,5 nm. La falta de una banda definida u hombro a 670 nm y la posición del máximo de la banda principal a 683,1 nm indican que no existen centros de reacción degradados, lo que conllevaría a la aparición de clorinas desconectadas con máximos de emisión hacia 672 nm. Las pequeñas bandas a 739,8 y 759 nm han sido atribuidas a sub-bandas vibracionales de la banda principal de emisión (van Dorssen y col., 1987).



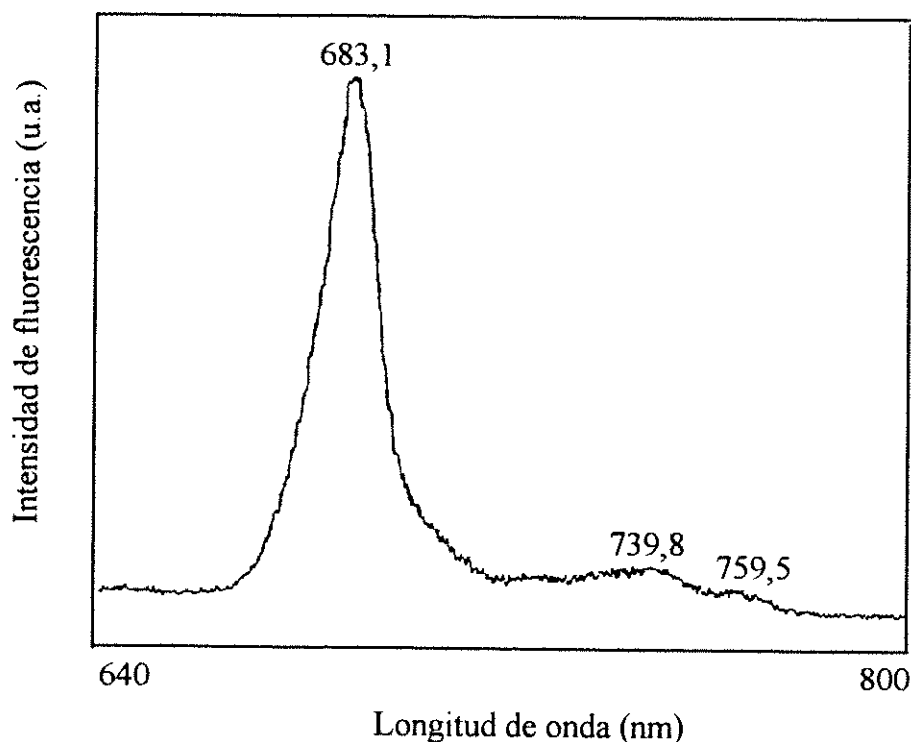


Figura 82: Espectro de emisión a 77K del complejo PSII RC de *P. laminosum*. El complejo cromoproteico se resuspendió en 0,03% (p/v) DM y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5) y se diluyó 3 veces (v/v) con glicerol.

El espectro de excitación detectado a 740 nm se muestra en la Fig. 83, que presenta una banda principal a 675 nm y una banda menor a 626 nm. La comparación entre los espectros de excitación y de absorción nos da idea de la eficiencia en la transferencia de energía entre los distintos cromóforos presentes en estas cromoproteínas. En este caso concreto, la forma del espectro de excitación es similar a la del espectro de absorción e independiente de la longitud de onda de detección pues también fue similar detectando a 695 nm. Todo esto sugiere que existe un buen equilibrio de energía de excitación entre los distintos cromóforos antes de que se produzca la fluorescencia, indicativo de la buena integridad del sistema.

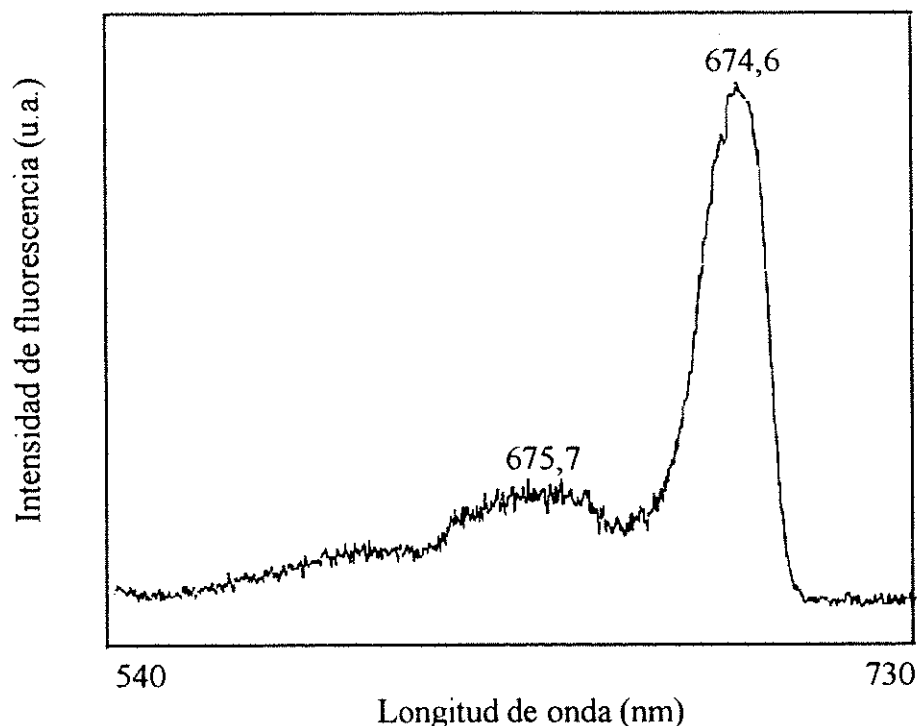


Figura 83: Espectro de excitación a 77K, detectado a 740 nm, del complejo PSII RC. El complejo cromoproteico se resuspendió en 0,03 % (p/v) DM y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5) y se diluyó 3 veces (v/v) con glicerol.

1.9.3. Dicroísmo circular

La actividad óptica del complejo PSII RC viene dada por su espectro de dicroísmo circular. Como se observa en la Fig. 84, en la banda Q_y de las porfirinas aparece un doblete no conservativo, con máximo a 680,4 nm y mínimo a 665 nm. Este espectro es muy diferente al espectro de dicroísmo circular del complejo OEC. El doblete se debe, al menos en parte, a interacciones entre las dos Chls del par especial P680. En el espectro existen también bandas importantes a 419,5 nm, debida fundamentalmente a Chl y Pheo, a 436,8 nm, debida a Chl y a 448,2 nm, producida por el β -caroteno.

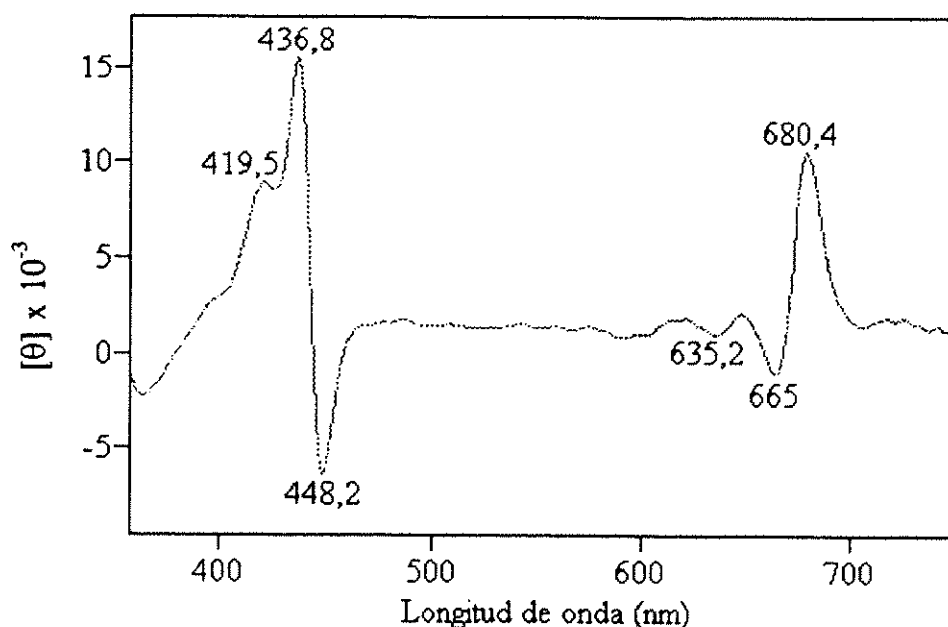


Figura 84: Espectro de dicroísmo circular, en el rango del VIS, del complejo PSII RC (9,65 $\mu\text{g Chl/ml}$) a 4°C en tampón 0,03% (p/v) DM y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5).

La Fig. 85 muestra el espectro de dicroísmo circular en el rango del UV. La forma del espectro es característica de una estructura secundaria mayoritaria en α -hélice, con mínimos a 208 y 222 nm, aunque no se descarta la existencia de otras estructuras como en láminas- β o en enrollamiento al azar.

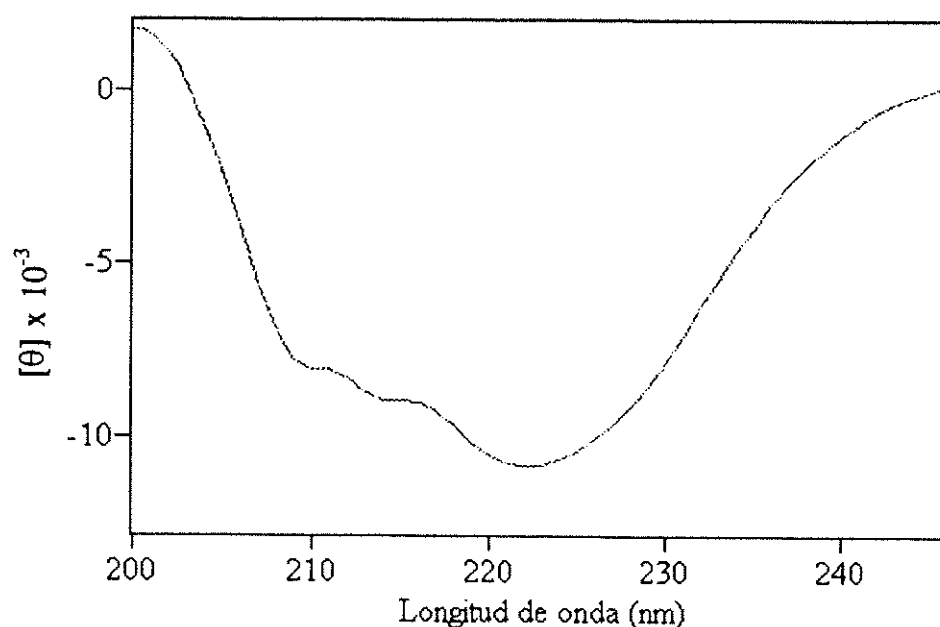


Figura 85: Espectro de dicroísmo circular, en el rango del UV, del complejo PSII RC a 4°C en tampón 0,03% (p/v) DM y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5).

1.9.4. "Surface-enhanced resonance Raman scattering" (SERRS)

Al igual que para el complejo OEC, se llevaron a cabo diferentes espectros SERRS del complejo RC. En cada uno de ellos se excitó a una longitud de onda diferente, para así seleccionar unos cromóforos con respecto a otros.

La excitación del complejo RC a 406,7 nm selecciona todos los cromóforos presentes en el complejo, es decir Chl, Pheo y Cyt *b*-559, ya que la longitud de onda de excitación está en resonancia con la banda Soret de estos cromóforos, e incluso selecciona el β -caroteno (Fig. 86). En la región de vibración del grupo carbonilo, $C_9=O$, del anillo V de las porfirinas, se observan dos bandas a 1701 y a 1677 cm^{-1} .

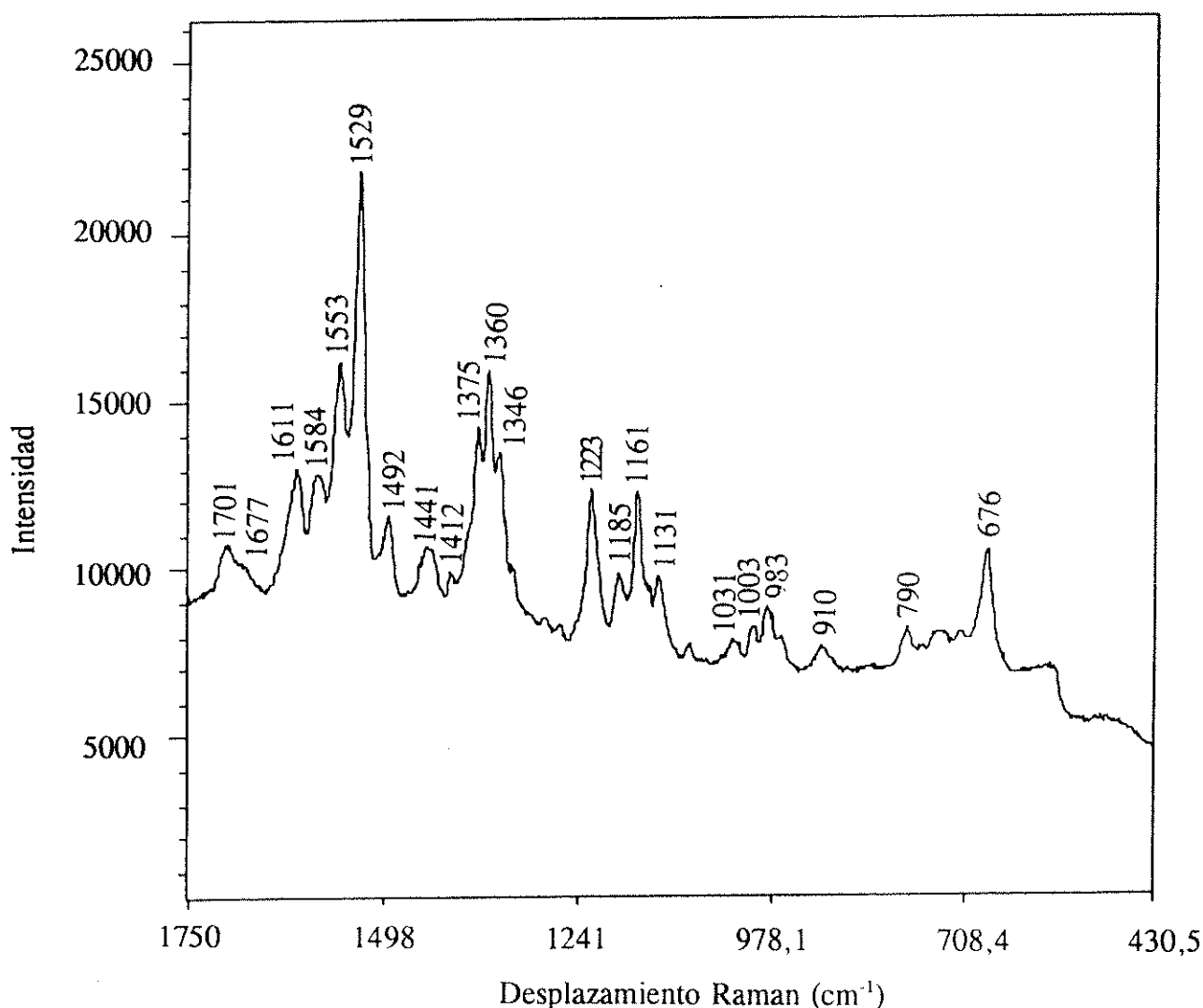


Figura 86: Espectro SERRS del complejo PSII RC excitado a 406,7 nm con láser de Kr^{+} .

La banda a 1701 cm^{-1} es característica de un modo de vibración del grupo carbonilo cuando éste se encuentra libre, es decir, cuando corresponde a Chl que no interacciona con otros grupos, mientras que la banda a 1677 cm^{-1} se debe a vibraciones del carbonilo cuando se encuentra interaccionando con grupos de otra Chl o con proteínas. La relación entre la intensidad de ambas bandas hace pensar que existe un mayor número de Chls libres que en interacción con otros grupos. Al comparar esta región del RC con la del complejo OEC, se observa que en el RC existe mayor relación de Chl asociada a otros grupos que en el complejo OEC.

Las bandas a 1611 y a 1553 cm^{-1} son características de Chl pentacoordinada de igual forma que sucede en bacterias y en el resto de organismos fotosintéticos. Las bandas a 1529 , 1161 y 1003 cm^{-1} se deben a los tres modos vibracionales principales, (ν_1 , ν_2 y ν_3) del β -caroteno. Las bandas a 1584 , 1412 y 676 cm^{-1} son características de Pheo. En este complejo, la relación Chl/Pheo es 6/2, mucho menor que en el complejo OEC y por tanto, los modos vibracionales de la Pheo pueden ser detectados al mismo tiempo que los de la Chl u otros pigmentos. Las bandas a 1584 , 1360 y 676 cm^{-1} corresponden a modos vibracionales del Cyt *b*-559. El modo a 1360 cm^{-1} es un marcador del estado redox de los citocromos, apareciendo a esta frecuencia en su estado reducido y a 1372 cm^{-1} en su estado oxidado.

La excitación del RC a 413 nm intensifica las vibraciones de Chl, Pheo, Cyt *b*-559 y β -caroteno. El espectro (Fig. 87) es similar al obtenido tras excitación a 406,7 nm, pero la intensidad de las bandas es bastante mayor. La banda a 673 cm^{-1} , característica del Cyt *b*-559, aparece mucho más intensa en relación al resto de bandas del espectro. Las intensidades de las bandas a 1360 y 673 cm^{-1} del Cyt *b*-559, se invierten con respecto al espectro excitado a 406,7 nm, lo que prueba la diferente sensibilidad de los distintos modos de vibración, incluso a longitudes de onda de excitación muy próximas.

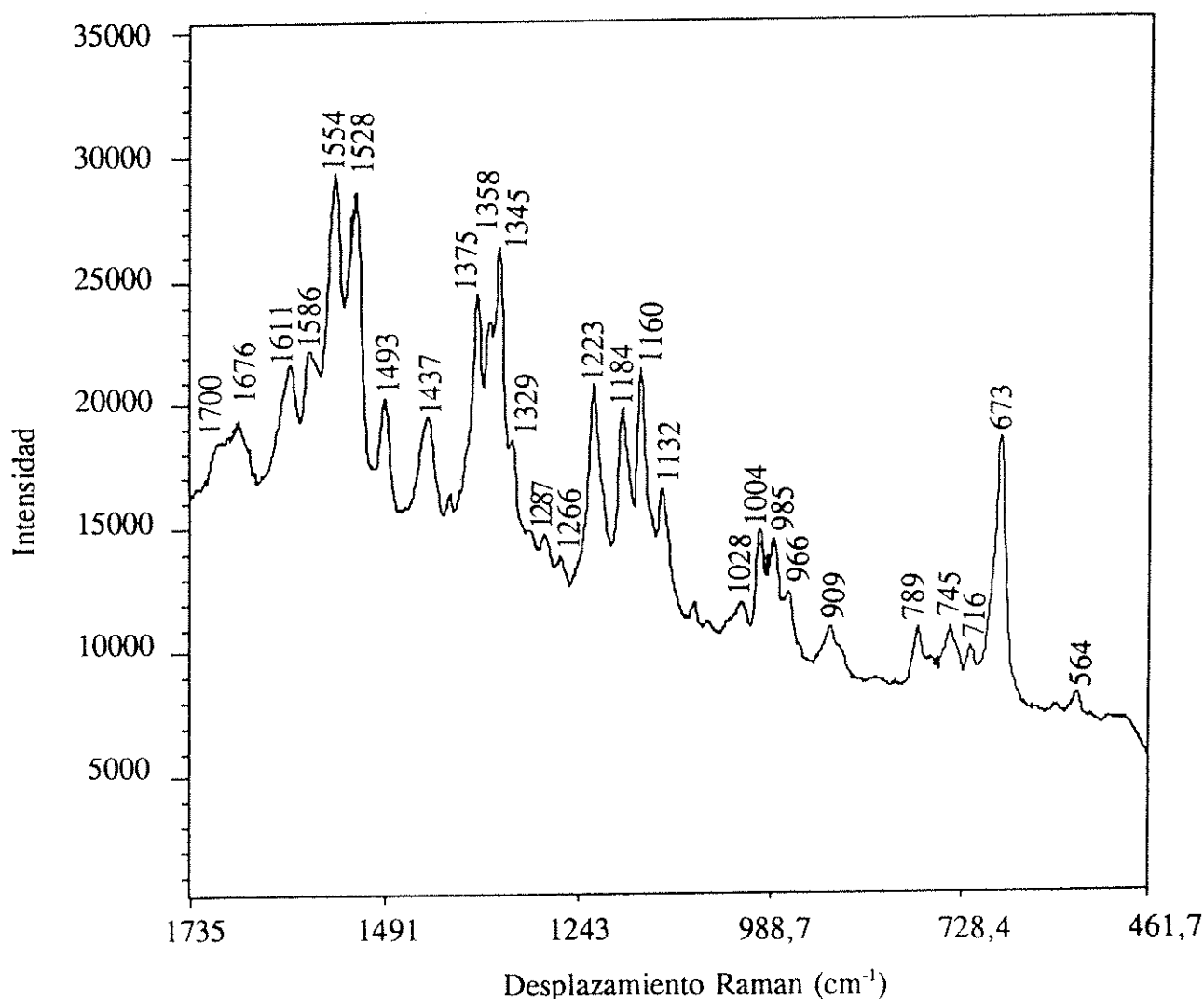


Figura 87: Espectro SERRS del complejo PSII RC excitado a 413 nm con láser de Kr^+ .

La excitación del RC a 488 nm intensifica las vibraciones de los tres modos principales del β -caroteno, ν_1 , ν_2 y ν_3 , que corresponden a las bandas 1530, 1161 y 1005 cm^{-1} , respectivamente. Estas bandas son características del isómero *all-trans* del β -caroteno al igual que sucede en el complejo OEC.

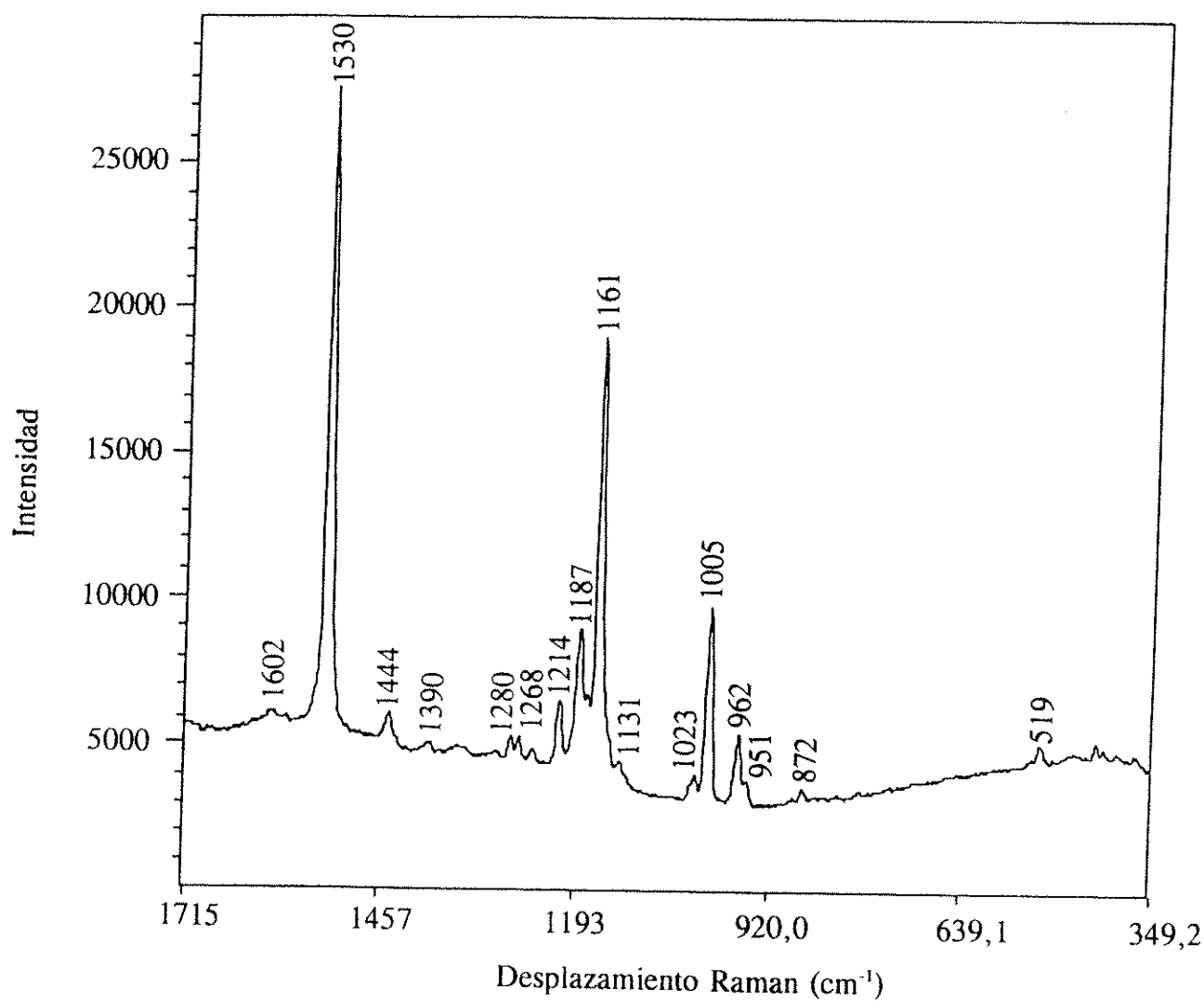


Figura 88: Espectro SERRS del complejo PSII RC excitado a 488 nm con láser de Ar⁺.

La excitación a 514 nm también intensifica las vibraciones del β -caroteno, apreciándose sus tres modos de vibración principales a 1527, 1159 y 1003 cm⁻¹.

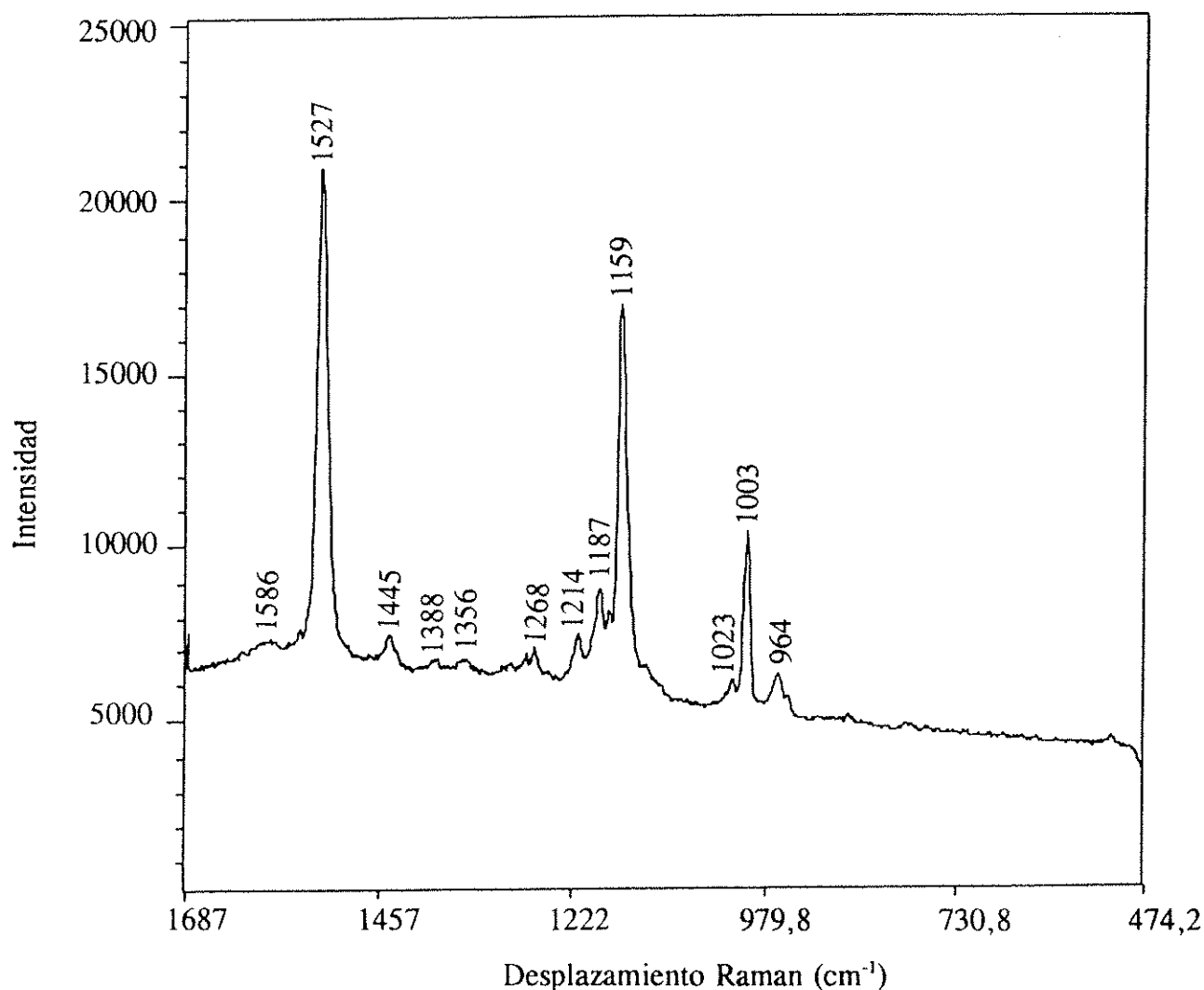


Figura 89: Espectro SERRS del complejo PSII RC excitado a 514 nm con láser de Ar⁺.

La resonancia con las transiciones Q_y ofrece grandes posibilidades de excitación selectiva de los cofactores Chl y Pheo en proteínas fotosintéticas. El espectro SERRS del complejo PSII RC excitado a 700 nm (Fig. 90 y 91) aporta gran información debido al papel específico de la transición $S_0 \rightarrow S_1$ en el proceso fotosintético. Como ya se comentó para el complejo OEC, estos espectros se realizaron en dos rangos de frecuencia, medias (1267-649 cm⁻¹) y altas (1706-1127 cm⁻¹). No fue posible trabajar en el rango de las bajas frecuencias, debido al fondo de fluorescencia que enmascara las señales Raman, a pesar de usar la metodología SERRS.

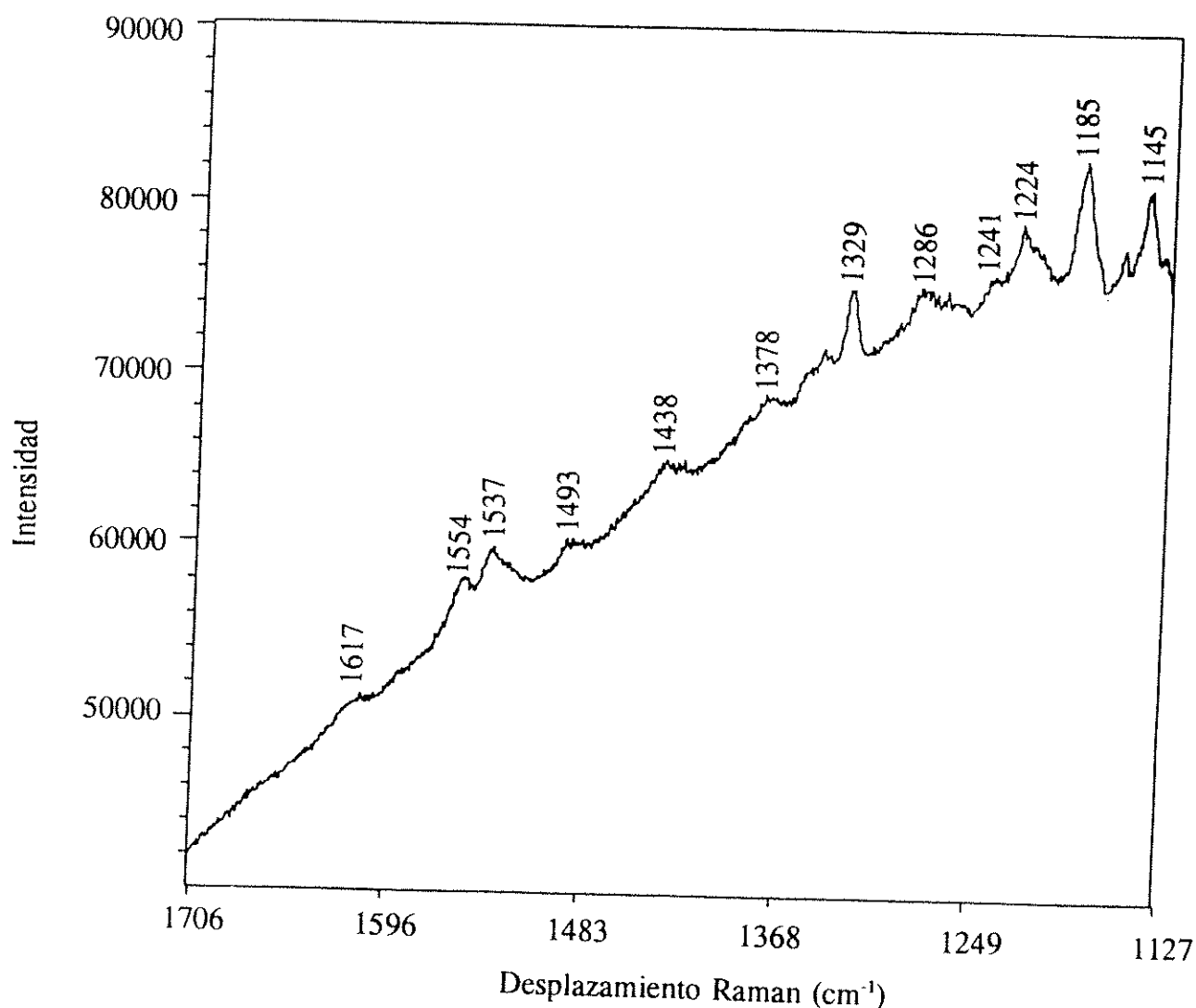


Figura 90: Espectro SERRS en la región de altas frecuencias del complejo PSII RC excitado a 700 nm.

Las principales bandas del complejo PSII RC corresponden a bandas vibracionales de la Chl (1438, 1329, 1286, 1185, 916, 752 y 741 cm^{-1}), aunque también se observa la presencia del espectro de la Pheo como demuestra la aparición de las bandas a 1093 y 1029 cm^{-1} , específicas de este pigmento. En este complejo, la presencia de Pheo se hace detectable pues la relación $\text{Chl/Pheo}=6/2$ es mucho menor que en el complejo OEC, donde la presencia del espectro SERRS de Pheo se hacía indetectable. La intensidad relativa de las bandas también es diferente entre PSII RC y OEC ya que algunas bandas de Chl y Pheo se solapan, incrementando su intensidad en los espectros del complejo PSII RC. Así, la relación de intensidades de las bandas a 987 y 916 cm^{-1} es muy diferente en ambos complejos.

Es interesante destacar que existen pequeños desplazamientos entre las bandas de los modos de vibración del complejo y de las referencias (Chl y Pheo en solución), los cuales

indicarían la existencia de interacciones pigmento-pigmento o pigmento-proteína, que modificarían en cierta medida el comportamiento vibracional de sus grupos. No obstante, estos efectos se detectarían aún mejor en el rango de bajas frecuencias, pero como se indicó anteriormente no fue posible trabajar en dicho rango por interferencias con la fluorescencia.

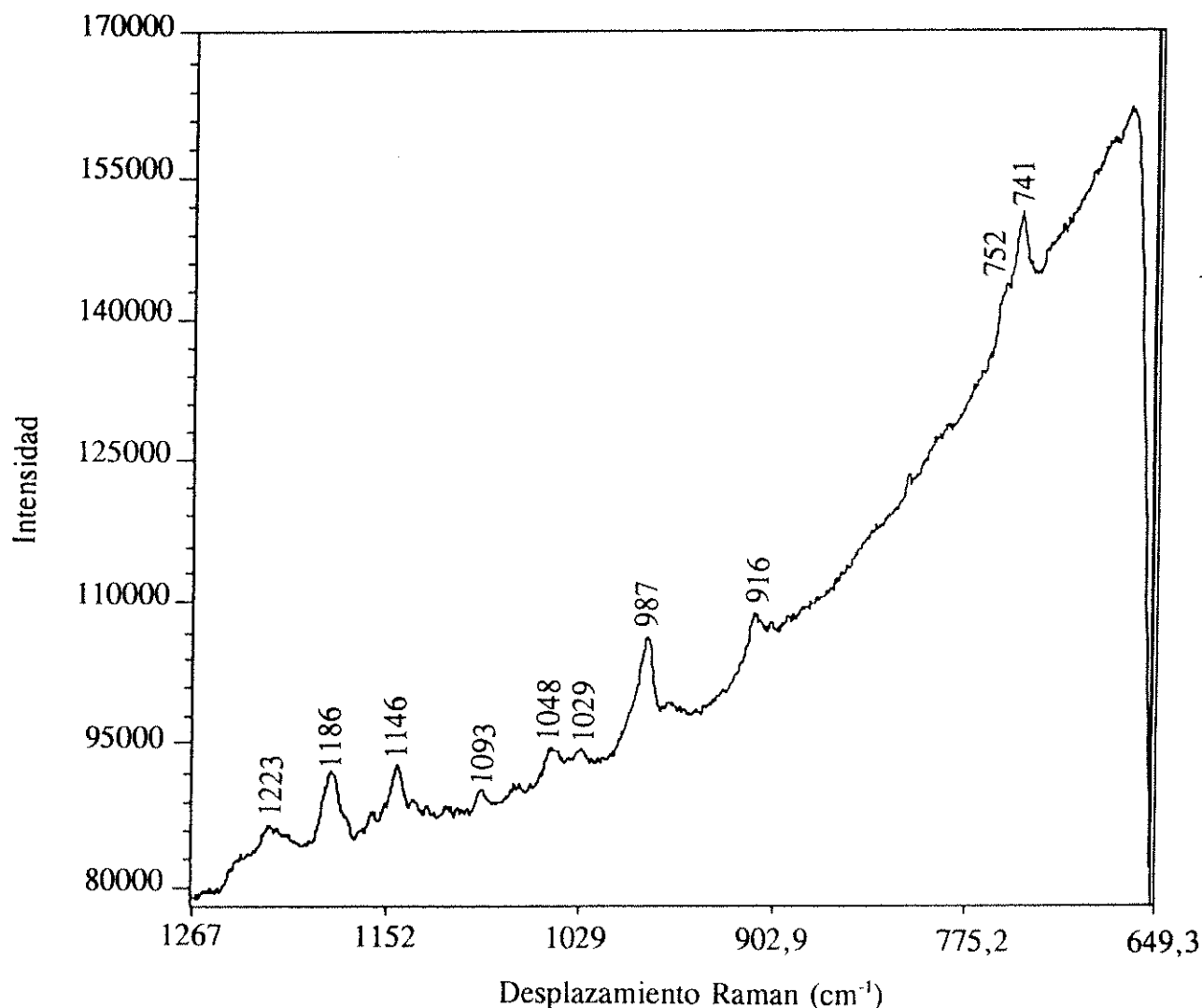


Figura 91: Espectro SERRS en el rango de frecuencias medias del complejo PSII RC excitado a 700 nm.

Mediante SERRS también se comprobó que el PSII RC purificado mantenía su actividad después de ser adsorbido en la superficie metálica. Así, en la Fig. 92 se muestra que al aumentar la intensidad del láser, la banda correspondiente al modo de vibración del Cyt *b*-559 reducido (1360 cm^{-1}) aumenta su intensidad con respecto a las otras bandas. Es decir, a mayor intensidad de luz incidente, mayor actividad de transporte electrónico y por tanto, mayor capacidad de fotoacumulación de Cyt *b*-559 reducido.

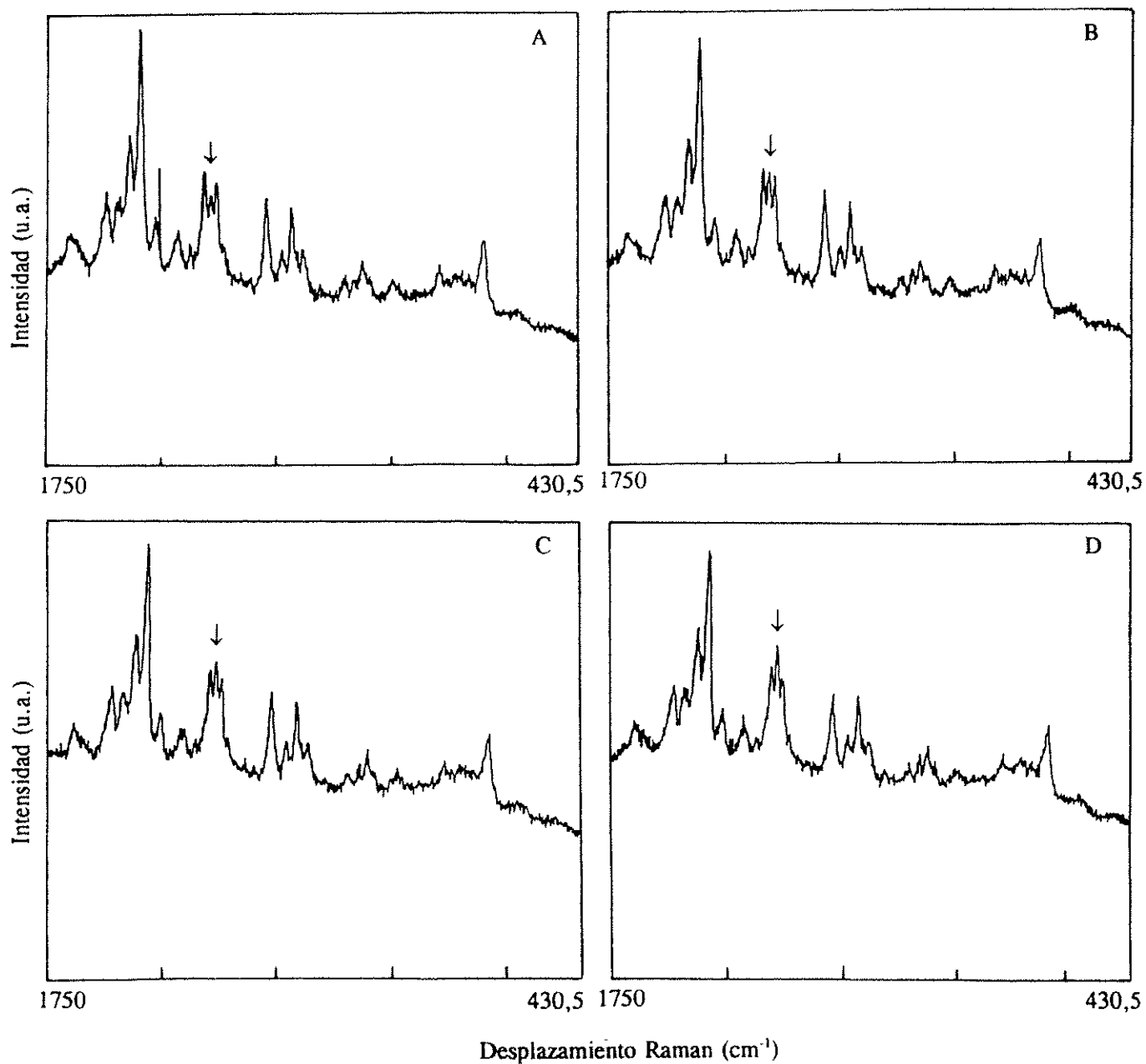


Figura 92: Espectros SERRS en el rango de altas frecuencias del complejo PSII RC excitado a 406,7 nm. La banda a 1360 cm⁻¹ (indicada por una flecha) va intensificándose a medida que aumenta la intensidad de láser.

1.9.5. Fluorescencia resuelta en el tiempo

El proceso fotoquímico más relevante del complejo RC consiste en la separación de cargas entre el donador primario excitado, $P680^*$ y el aceptor primario, Pheo. Como el aceptor secundario, Q_A , no se encuentra en el complejo RC purificado, la correspondiente etapa de estabilización de cargas no puede producirse, dando lugar a la recombinación del par radical $P680^+ Pheo^-$, con la consiguiente emisión de fluorescencia.

La fluorescencia resuelta en el tiempo del complejo PSII RC fue medida con un sistema "single-photon-counting" (SPT), descrito previamente, bajo excitación con láser pulsado a 660 nm. Los decaimientos de fluorescencia medidas a diferentes longitudes de onda de detección se analizaron globalmente como una suma de exponenciales y la calidad del ajuste se evaluó por el valor global de χ^2 .

Los decaimientos de fluorescencia realizadas a 277K se midieron en un rango de longitudes de onda de emisión entre 670 y 690 nm. Para conseguir un buen ajuste fueron necesarios 5 componentes ($\chi^2=1,137$) pues si el ajuste se realizaba con cuatro componentes el valor de χ^2 era algo mayor ($\chi^2=1,248$) y la calidad de dicho ajuste empeoraba. Los tiempos de vida de los cinco componentes fueron $\tau_1=5$ ps, $\tau_2=32$ ps, $\tau_3=168$ ps, $\tau_4=870$ ps y $\tau_5=6,45$ ns. Los resultados se presentan en la Fig. 93 como espectros asociados a los decaimientos de fluorescencia (DAS). El componente más rápido tiene amplitud negativa en la mayoría del rango de emisión y presenta dos mínimos a 677 y 684 nm. Este componente podría deberse a una combinación de un componente asignado a la separación de cargas (3 ps) y otro componente atribuido a la transferencia de energía (5-9 ps). Este proceso de transferencia de energía podría producirse desde algún pigmento más energético como por ejemplo la Chl de 670 nm, hasta algún pigmento que emita a una longitud de onda mayor como el par especial P680. El componente a 32 ps muestra amplitud positiva y dos máximos de emisión en el rango de 675 a 685 nm. Este componente puede ser asignado a transferencia de energía. Los componentes de mayor tiempo de vida, 168 ps, 870 ps y 6,45 ns mostraron un espectro muy similar al del componente de 32 ps pudiendo ser adscritos a una recombinación de cargas del par especial.

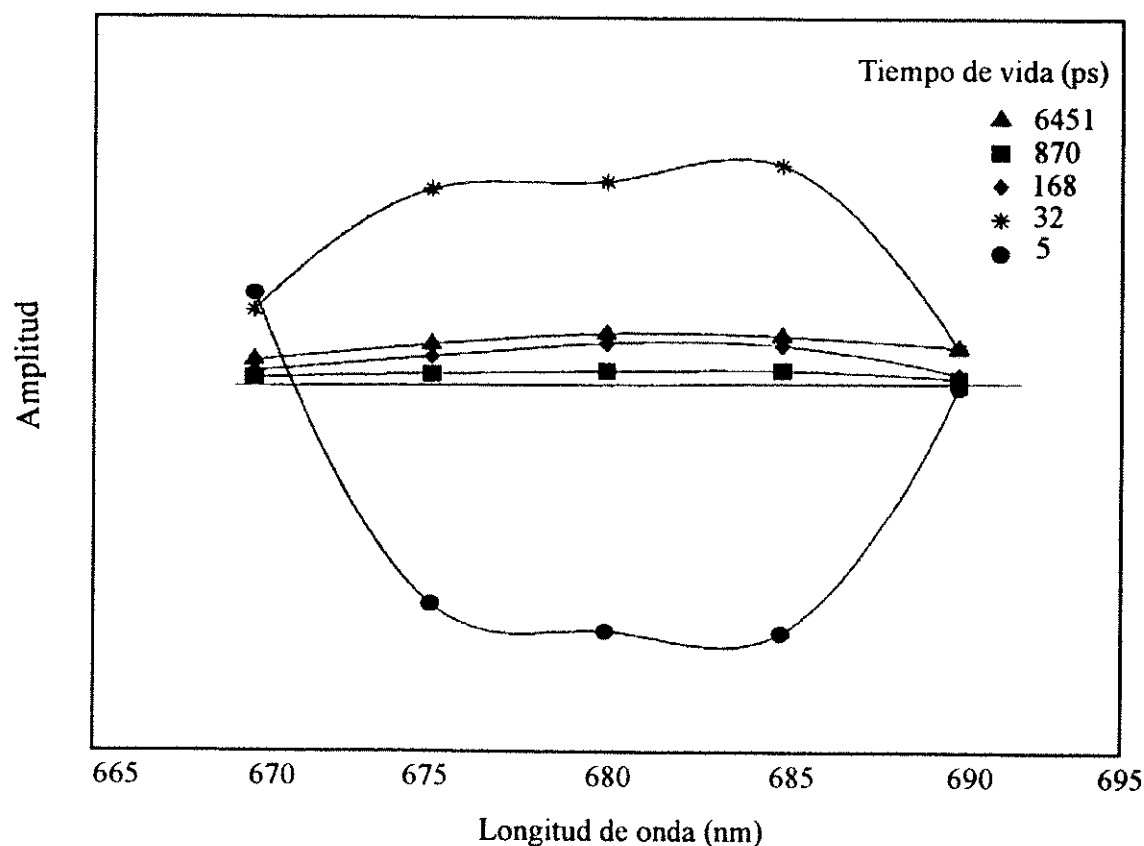


Figura 93: Espectros asociados a los decaimientos de fluorescencia (DAS) de cada uno de los componentes cinéticos. La fluorescencia de emisión resuelta en el tiempo se llevó a cabo excitando a 660 nm.

1.10. Repurificación del centro de reacción del PSII mediante cromatografía de exclusión en FPLC

Esta etapa de purificación fue pensada para eliminar posibles proteínas contaminantes que en ocasiones acompañan al centro de reacción.

Se partió expresamente de una fracción de PSII RC con muchas impurezas, ésta se pasó a través de una columna Superdex-200 HR 10/30 y eluyeron varias fracciones pigmentadas. El perfil de elución se muestra en la Fig. 94 detectando a 676 nm.

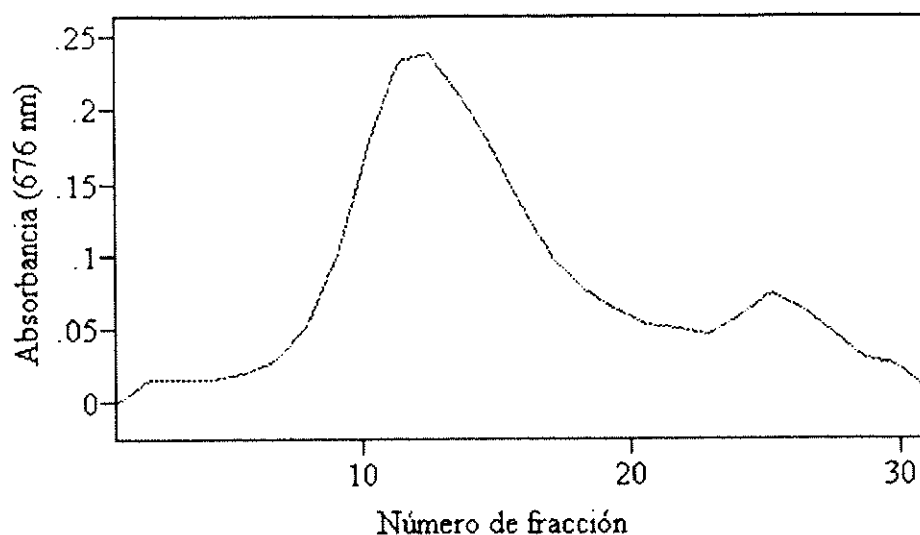


Figura 94: Cromatograma de la repurificación del complejo RC de *P. laminosum*.

Se obtuvieron tres tipos de fracciones diferentes de acuerdo con su contenido proteico. El espectro de absorción de las primeras fracciones (Fig. 95B) muestra la presencia de un elevado contenido proteico en relación con la muestra cargada en la columna (Fig. 95A) tal y como indica la alta absorción a 280 nm. El máximo de absorción de estas fracciones en el rojo se encuentra a 674 nm. Las fracciones intermedias (Fig. 95C), que constituyen el pico principal de elución, muestran un máximo en el rojo a 675,5 nm y un contenido proteico en relación a pigmentos mucho menor que las fracciones anteriores. Las últimas fracciones (Fig. 95D) corresponden al segundo pico de elución, su banda a 415 nm está fuertemente acentuada en comparación con el resto de las fracciones eluidas, indicando un elevado contenido en Cyt *b*-559. Su contenido proteico es también elevado y el máximo de la banda de la transición Q_y de las clorinas se encuentra desplazado hacia el azul, 673,5 nm, indicativo de una desnaturalización parcial de la muestra.

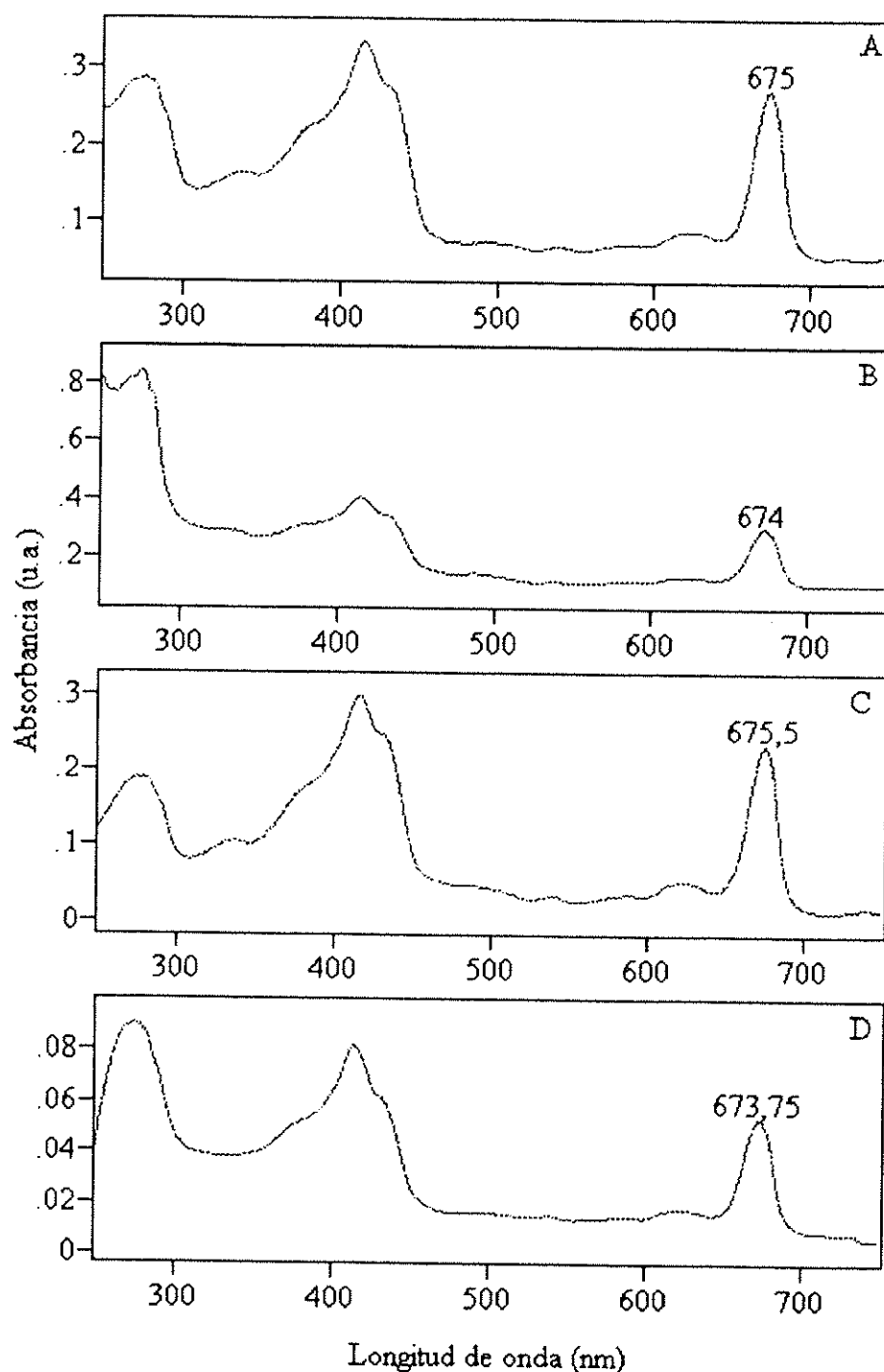


Figura 95: Espectros de absorción electrónica. A, PSII RC antes de ser repurificado; B, primeras fracciones de la cromatografía de repurificación; C, fracciones intermedias o pico principal; D, últimas fracciones.

Una vez examinados los datos, se tomaron las fracciones intermedias como las más puras, ya que la relación entre las bandas a 675 y 285 nm era algo mayor en estas fracciones (1,34) que en la muestra de RC sin repurificar (1,09). Por lo tanto, consideramos que esta etapa purifica la preparación pues el contenido de proteínas contaminantes disminuye. El análisis de las bandas de los electroforetogramas de ambas preparaciones (Fig. 96), nos ayudó

a comprobar que efectivamente la intensidad relativa de ciertas bandas que pueden aparecer en el rango de 39 a 46 kDa, disminuye significativamente al repurificar la muestra mediante la cromatografía de exclusión en FPLC.

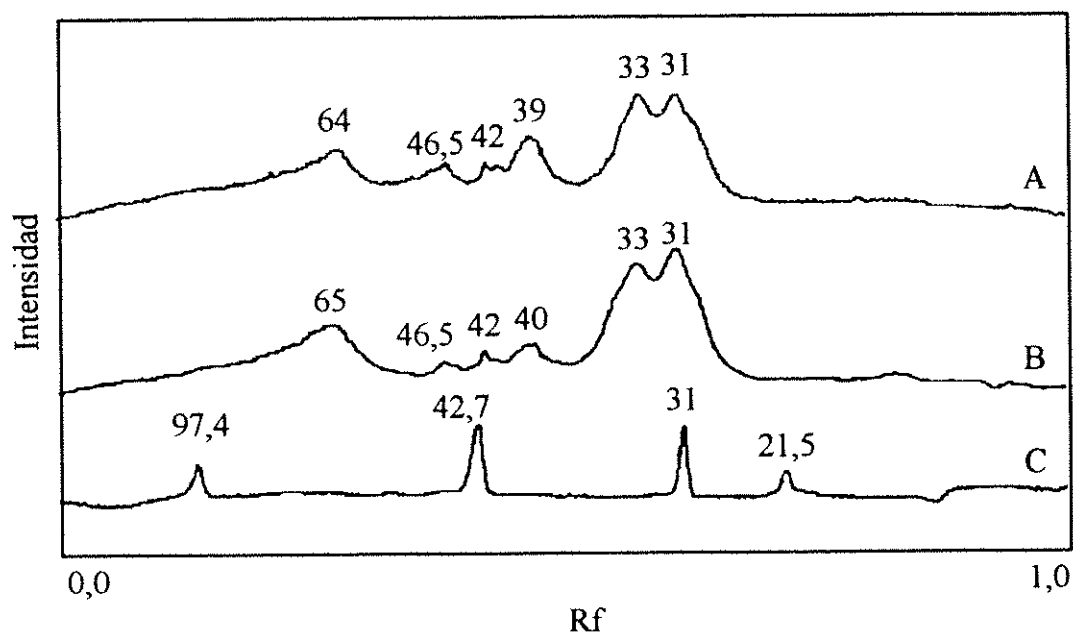


Figura 96: Análisis de los electroforetogramas del PSII RC impuro (A), PSII RC repurificado mediante cromatografía de exclusión en FPLC (B) y marcadores moleculares (C).

2. Aplicación a la cianobacteria *Synechocystis* PCC6803

Una vez puesto a punto el método de purificación del centro de reacción del fotosistema II de la cianobacteria termófila *P. laminosum*, éste fue aplicado a la cianobacteria no termófila *Synechocystis* PCC6803 de mayor interés por sus posibilidades de transformación genética.

Las células de esta cianobacteria se rompieron por sonicación y el proceso de obtención de membranas fue similar al explicado en Materiales y Métodos para *P. laminosum*.

En la Fig. 97 se muestra un espectro de las membranas tilacoidales de *Synechocystis* PCC6803, que presenta claras diferencias con respecto al obtenido con *P. laminosum*. Así, la banda de menor energía está desplazada hacia el rojo ($\lambda=683,5$ nm), existiendo una diferencia del orden de 10 nm entre las dos especies. Además, el contenido en ficobilisomas es mayor como se puede apreciar por la intensa banda a 635,5 nm.

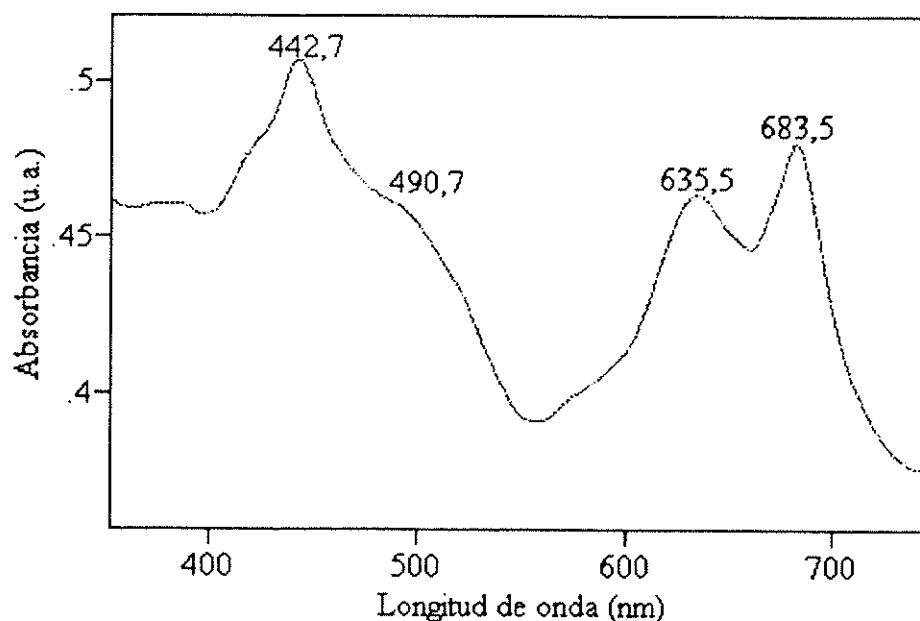


Figura 97: Espectro de absorción electrónica de membranas tilacoidales de *Synechocystis* PCC6803 en tampón 25% (v/v) glicerol, 10 mM MgCl_2 , 5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ y 10 mM Hepes, pH 7,5.

Se midió la actividad de desprendimiento de O_2 de las membranas mediante un electrodo de O_2 , utilizando DCBQ como aceptor de electrones. Los resultados obtenidos, $2.283 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, demuestran que se trata de una preparación muy activa, incluso más que la de *P. laminosum*.

Estas membranas se solubilizan con el detergente LDAO y se centrifugan en un gradiente (5-17,5%, p/v) de sacarosa. Como ya se ha comentado, la distribución de bandas tras la centrifugación en gradiente de sacarosa es muy diferente a la distribución obtenida con *P. laminosum* como se desprende de la comparación de las Fig. 98 y 34.

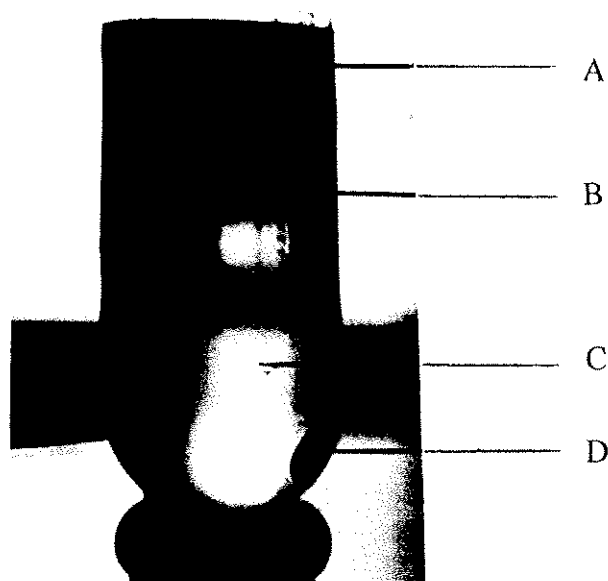


Figura 98: Perfil de las bandas pigmentadas obtenidas tras la centrifugación en gradiente (5-17,5%, p/v) de sacarosa de membranas tilacoidales de *Synechocystis* PCC6803, previamente solubilizadas con LDAO.

Los espectros de absorción de cada una de las fracciones recogidas del gradiente de sacarosa se muestran en la Fig. 99. Las fracciones B y C son muy similares y parecen estar más enriquecidas en PSII que el resto, mientras que la fracción A contiene muchos carotenoides y la D está enriquecida en PSI ya que el máximo de la banda del rojo está a 678,5 nm.

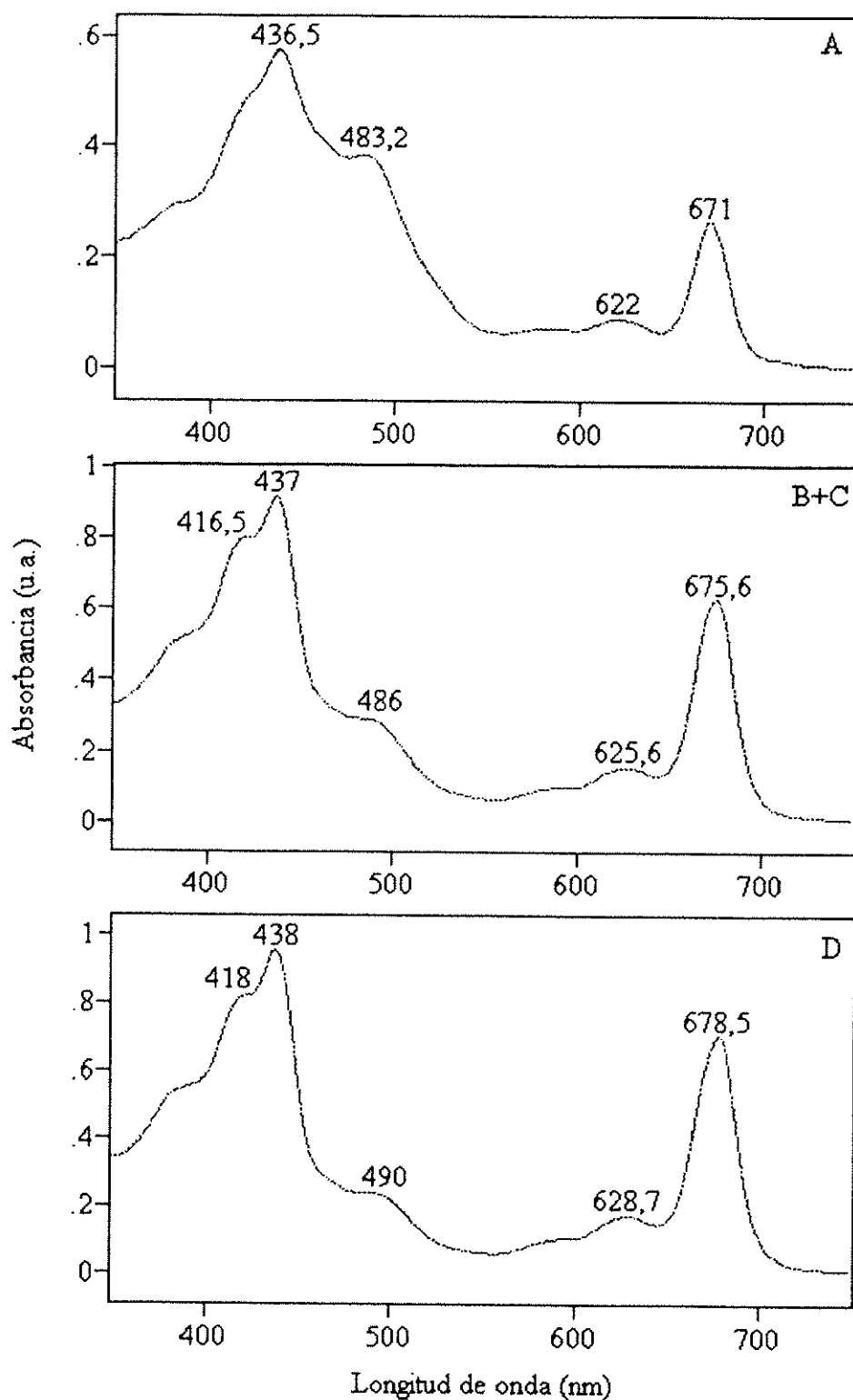


Figura 99: Espectros de absorción electrónica de cada una de las fracciones seleccionadas del gradiente (5-17,5%, p/v) de sacarosa de *Synechocystis*.

Tras la recolección de las fracciones enriquecidas en PSII y posterior cromatografía de intercambio iónico en gel-TSK Toyopearl DEAE 650s, se obtuvo el complejo OEC de *Synechocystis* PCC6803. En la Fig. 100 se muestra su espectro de absorción a temperatura

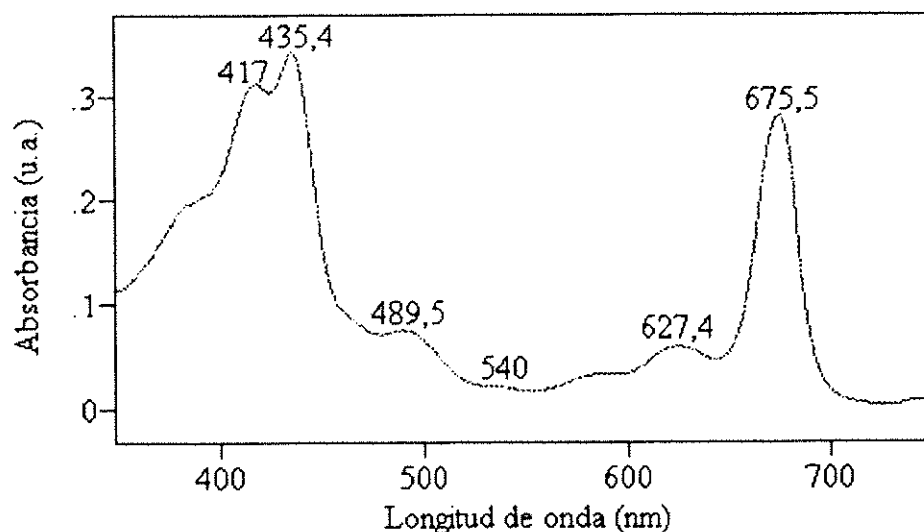


Figura 100: Espectro de absorción electrónica del complejo OEC de *Synechocystis* PCC6803 en tampón 0,03% (p/v) DM y 20 mM Tris/HCl (pH 8,0).

A partir de este material se llevó a cabo el proceso de purificación del centro de reacción, mediante sucesivas solubilizaciones del complejo OEC en columna (apartado 2.3. de Materiales y Métodos). El espectro del complejo PSII RC obtenido se presenta en la Fig. 101, que se caracteriza por las bandas a 675,5, 626, 540, 432 y 415 nm. El máximo a 675,5 nm es debido a las transiciones Q_y de las clorinas del centro de reacción, el máximo a 540 nm se debe a la transición Q_x de la Pheo, el hombro a 432 nm, algo más marcado que en el centro de reacción de *P. laminosum*, es debido a la transición Soret x de la Chl y el máximo a 415 nm es debido a la transición Soret y de la Chl, Pheo y Cyt *b*-559. Es de destacar la casi total ausencia de β -caroteno en esta preparación.

La relación de absorbancias entre las bandas a 415 y 675,5 nm es de 1,3, muy similar a la obtenida en *P. laminosum* y en plantas superiores.

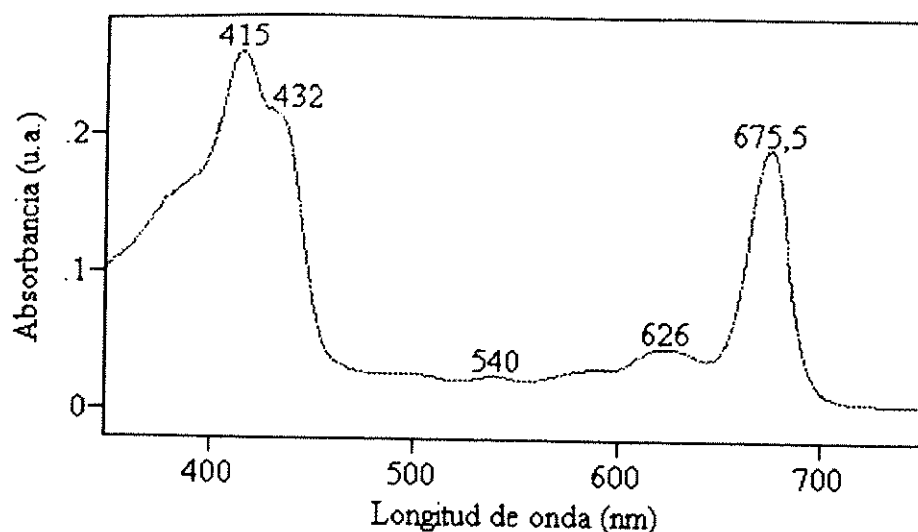


Figura 101: Espectro de absorción electrónica del complejo PSII RC de *Synechocystis* PCC6803 en tampón 0,03 % (p/v) DM, 1,5% (p/v) taurina, 200 mM sacarosa y 20 mM Bis-Tris (pH 6,5).

2.1. Reconstitución del centro de reacción con β -caroteno

El centro de reacción purificado de *Synechocystis* PCC6803 se obtiene prácticamente desprovisto de β -caroteno, por lo que se intentó su reconstitución con este pigmento.

En la Fig. 102 se muestra el espectro de absorción del complejo reconstituido con β -caroteno con bandas a 674, 540,5, 490, 432,5 y 416 nm. Durante el proceso de reconstitución, el centro de reacción ha podido sufrir una ligera desnaturalización como indica el pequeño desplazamiento del máximo hacia el azul, de 675,5 a 674 nm.

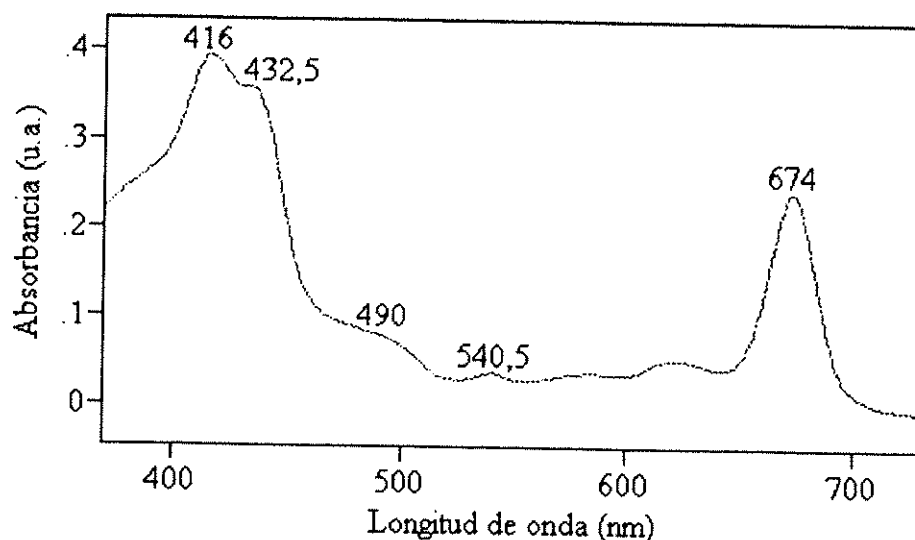


Figura 102: Espectro de absorción electrónica del complejo PSII RC de *Synechocystis* PCC6803 reconstituido con β -caroteno.

En las Fig. 103A y B puede compararse el extracto acetónico del complejo $D_1/D_2/Cyt\ b-559$ tal y como se obtiene por el método de purificación anteriormente descrito y tras su reconstitución con β -caroteno, respectivamente. Se aprecia claramente que la banda a 431 nm está fuertemente influenciada por la concentración de este pigmento.

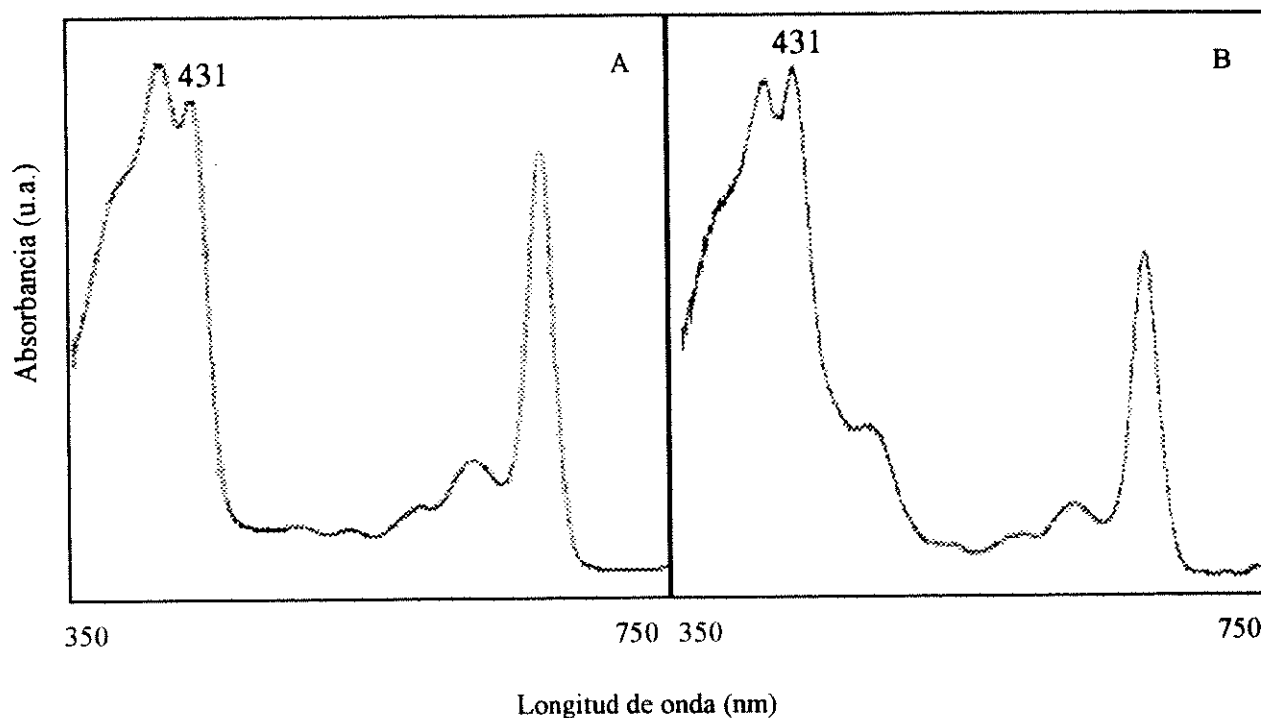


Figura 103: Espectros de absorción electrónica de un extracto acetónico de pigmentos del complejo PSII RC de *Synechocystis* PCC6803 en estado nativo (A) y tras su reconstitución con β -caroteno (B).

3. Complejo PSII RC de plantas superiores

3.1. Purificación del complejo PSII RC

El centro de reacción del PSII se aisló a partir de membranas de PSII de *Beta vulgaris* siguiendo el método de Montoya y col. (1991). La clave en la purificación se encuentra en la solubilización apropiada con detergente y en el tiempo de lavado de la columna.

3.1.1. Espectro de absorción a temperatura ambiente

El espectro de absorción del centro de reacción del PSII se muestra en la Fig. 104. Está caracterizado por bandas de absorción a 675 nm, debida a la transición Q_y de las porfirinas, a 622 nm, producida por las transiciones vibrónicas de la Chl, a 540 nm, debida a la transición Q_x de la Pheo y a 414,5 nm, producida por las transiciones Soret de la Chl, Pheo y Cyt *b*-559. También se aprecia un pequeño hombro a 430 nm, debido a la transición Soret x de la Chl y varias bandas en el rango de 480 a 490 nm, debidas a transiciones del β -caroteno.

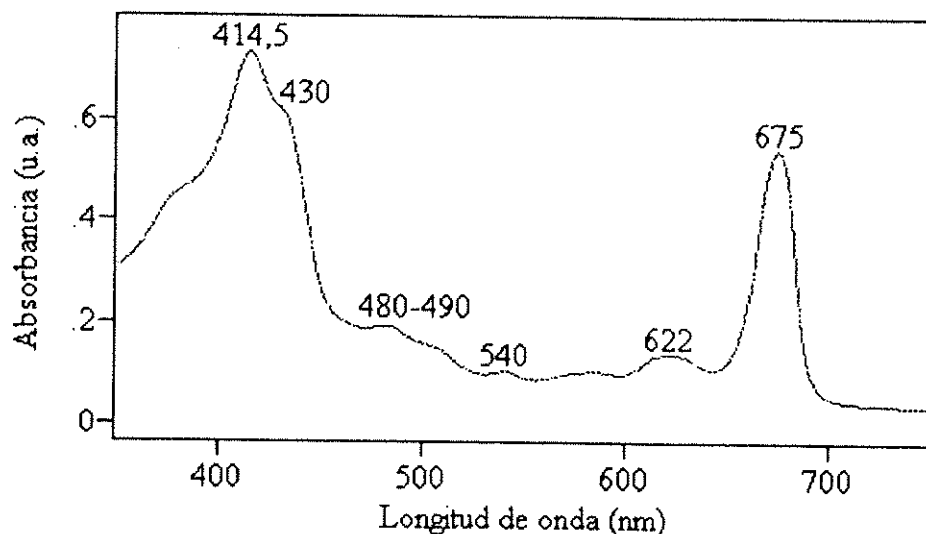


Figura 104: Espectro de absorción electrónica del complejo PSII RC de *Beta vulgaris* en tampón 2 mM DM y 50 mM Tris-HCl (pH 7,2).

3.2. Mejora de la preparación del centro de reacción de plantas mediante cromatografía de exclusión en FPLC

Las preparaciones de PSII RC descritas por varios laboratorios varían sustancialmente en su estequiometría de pigmentos. Esto puede llegar a ocurrir incluso entre preparaciones de un mismo laboratorio. La controversia sobre el número de pigmentos nos hizo pensar que era debido a la existencia de otras cromoproteínas que contaminaban dichas preparaciones, haciendo variar, en consecuencia, el contenido en pigmentos. Para mejorar la preparación estándar de PSII RC de plantas superiores, la sometimos al mismo procedimiento de FPLC descrito anteriormente para *P. laminosum*.

Al someter un centro de reacción estándar de 7-8 Chl a cromatografía de gel filtración en una columna Supersora-6 HR 10/30 se obtuvieron tres tipos de fracciones, cuyo perfil de elución medido a 675 nm se muestra en la Fig. 105.

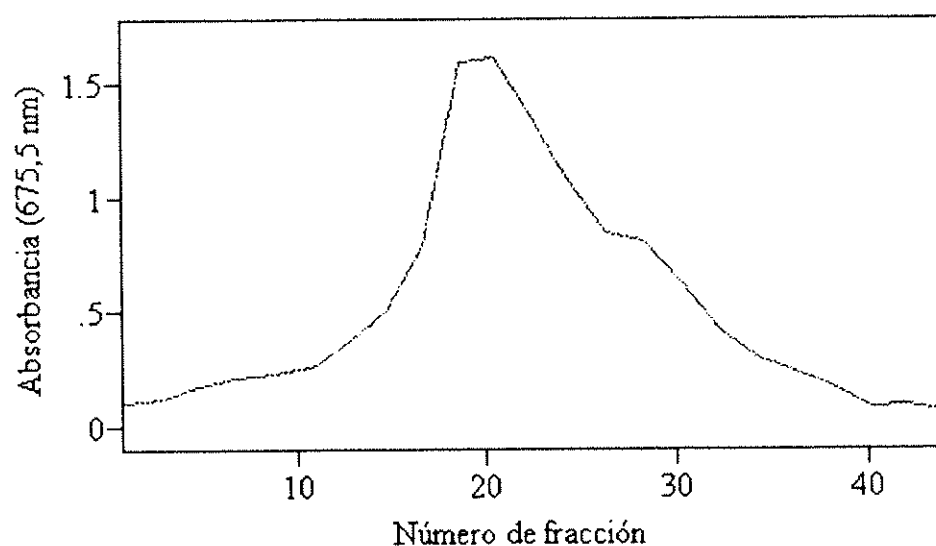


Figura 105: Cromatograma de la repurificación del complejo RC de *Beta vulgaris*.

Las primeras fracciones (Fig. 106A) mostraron un espectro de absorción bastante similar al de la muestra cargada en la columna (figura 101) con un máximo a 675 nm pero con una banda a 435 nm mucho más pronunciada, que correspondería a un contenido en Chl superior. Las fracciones intermedias (Fig. 106B), es decir, las correspondientes al pico principal del cromatograma, mostraron la banda a 435 nm como un hombro y el máximo en la banda de menor energía permaneció a 675 nm, mientras que las últimas fracciones (Fig.

106C) muestran una elevada absorción a 416 nm, debida probablemente a un alto contenido en Cyt *b*-559 y con la banda de la transición Q_y de las clorinas desplazada hacia el azul (673 nm).

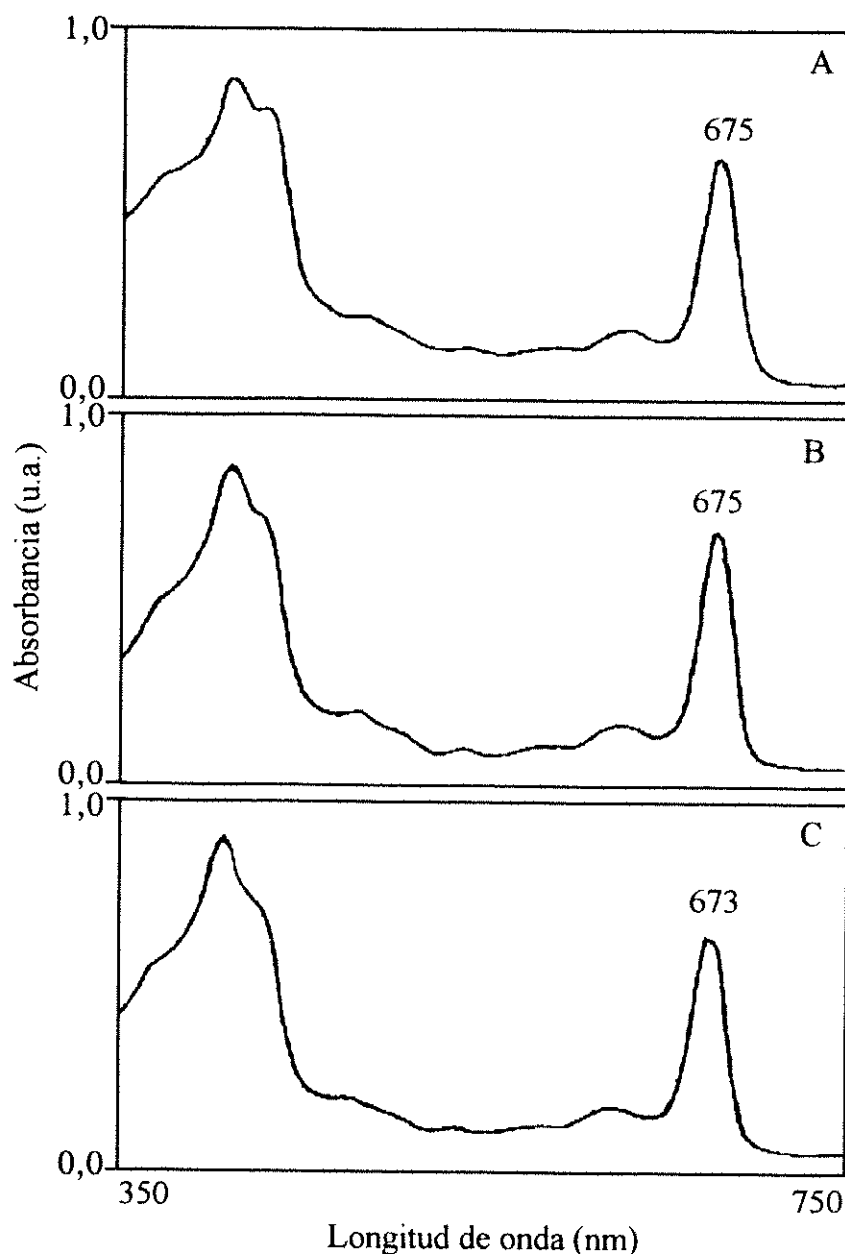


Figura 106: Espectros de absorción electrónica de las distintas fracciones de la cromatografía de FPLC. A, primeras; B, fracciones intermedias o pico principal; C, últimas fracciones.

Estos datos nos indican que las preparaciones estándar de RC de plantas superiores, son heterogéneas, pues se pueden separar mediante cromatografía de exclusión en FPLC en varios tipos de fracciones algo diferentes entre ellos.

3.3. Desnaturalización reversible del complejo PSII RC de plantas

Anteriormente en nuestro laboratorio se había observado que ciertos detergentes provocan una desnaturalización reversible del PSII RC. La incubación del complejo PSII RC con TX-100 modifica la estructura secundaria de la proteína, causando modificaciones espectroscópicas importantes. Tras 30 h de incubación, el máximo de absorción en el rojo se desplazó de 675,5 a 671,5 nm (Fig. 107) y el máximo de emisión de fluorescencia también se vio modificado de 682 a 672 nm. Estos desplazamientos estuvieron acompañados por un incremento del rendimiento de fluorescencia de la Chl, por una disminución de la intensidad de dicroísmo circular en la región del rojo y por una disminución de la actividad de transporte electrónico secundario además de ciertas modificaciones de la estructura secundaria. La segunda derivada de los espectros de absorción durante el curso de la incubación, demostró la pérdida progresiva de la banda a 680 nm (P680). La sustitución de TX-100 por DM hizo que todas las propiedades modificadas volvieran a su valor original (Fig. 108). Se concluyó, por tanto, que todos los cambios observados se debieron a la destrucción del P680 por TX-100 y a su posterior restablecimiento en presencia de DM.

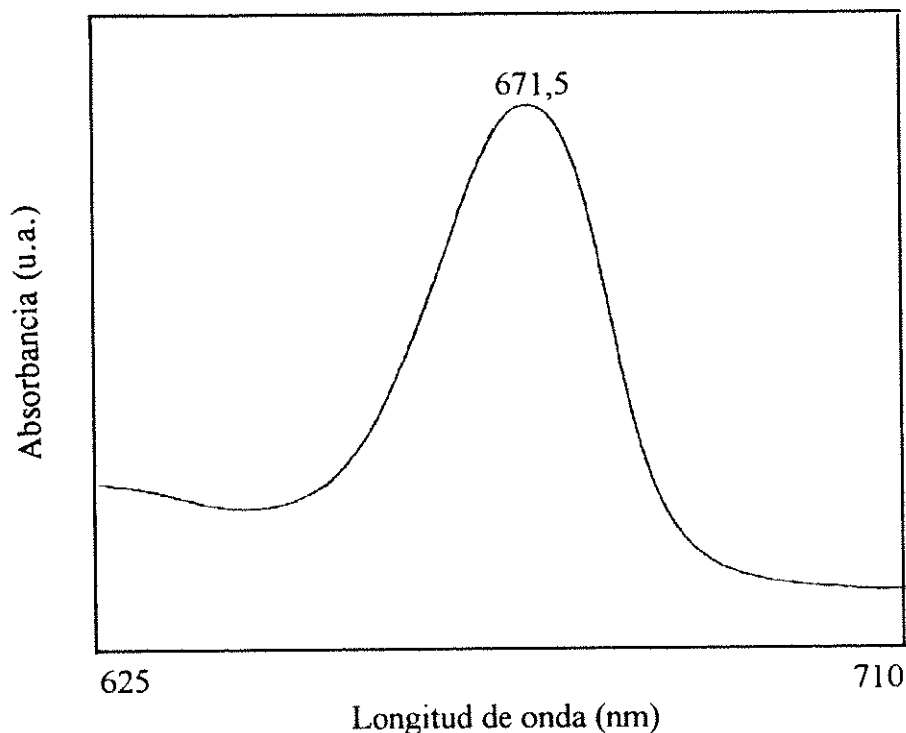


Figura 107: Espectro de absorción electrónica del complejo PSII RC de *Beta vulgaris* tras la incubación del complejo en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,2 y 0,05 % (p/v) TX-100 durante 30 h a 4°C.

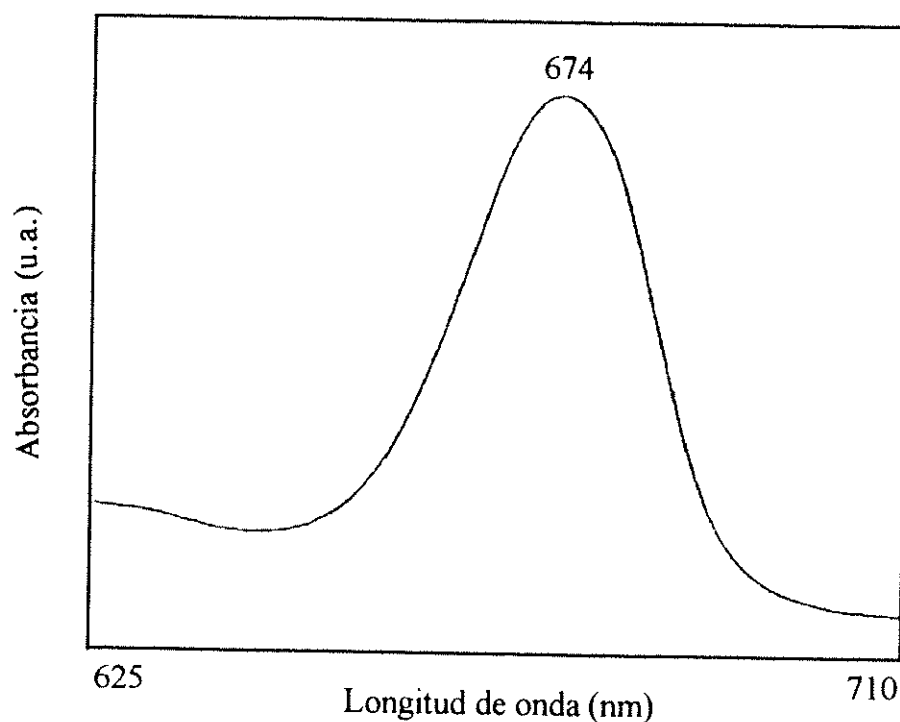


Figura 108: Espectro de absorción electrónica del complejo PSII RC de *Beta vulgaris* después de realizar el intercambio de detergente.

Se decidió continuar con este trabajo usando la técnica de EPR. La señal de EPR ("light-induced spin-polarized triplet") (Fig. 109) es característica de la formación del $^3\text{P680}$ como resultado de la recombinación de cargas entre P680^+ Pheo^- . Esta señal triplete constituye una prueba directa tanto de la estructura como de la función del centro de reacción y también puede ser usado como medida de la concentración relativa de P680. Tras la incubación con TX-100, la intensidad de la señal del $^3\text{P680}$ disminuyó marcadamente pero la sustitución de TX-100 por DM hizo que la señal volviera a ser muy similar a la del PSII RC nativo (Fig. 110), como consecuencia de la reorganización de pigmentos/proteína por efecto de los detergentes.

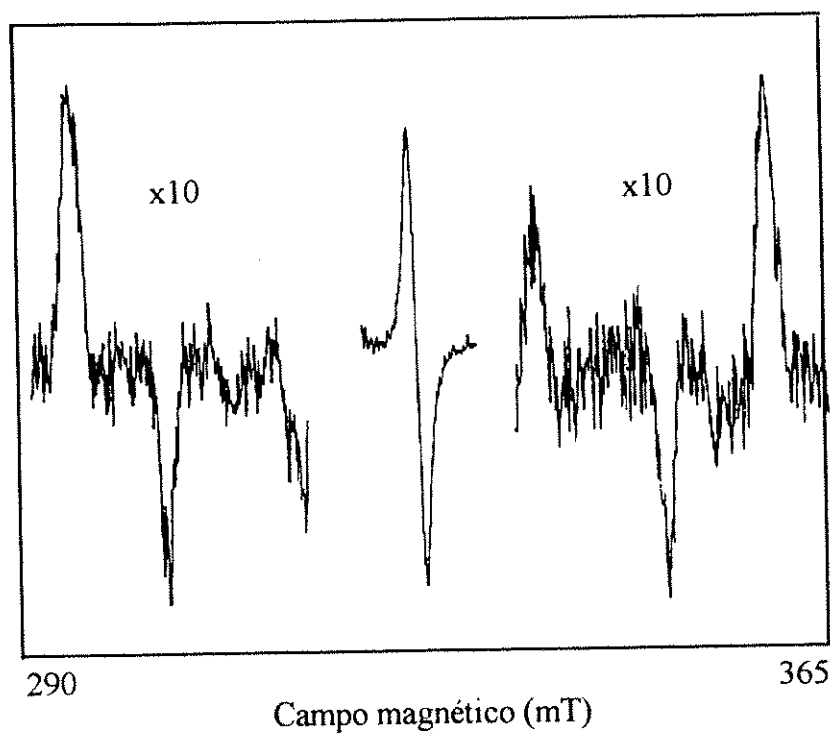


Figura 109: Señal de EPR ("light-induced spin-polarized triplet") del complejo PSII RC de *Beta vulgaris*.

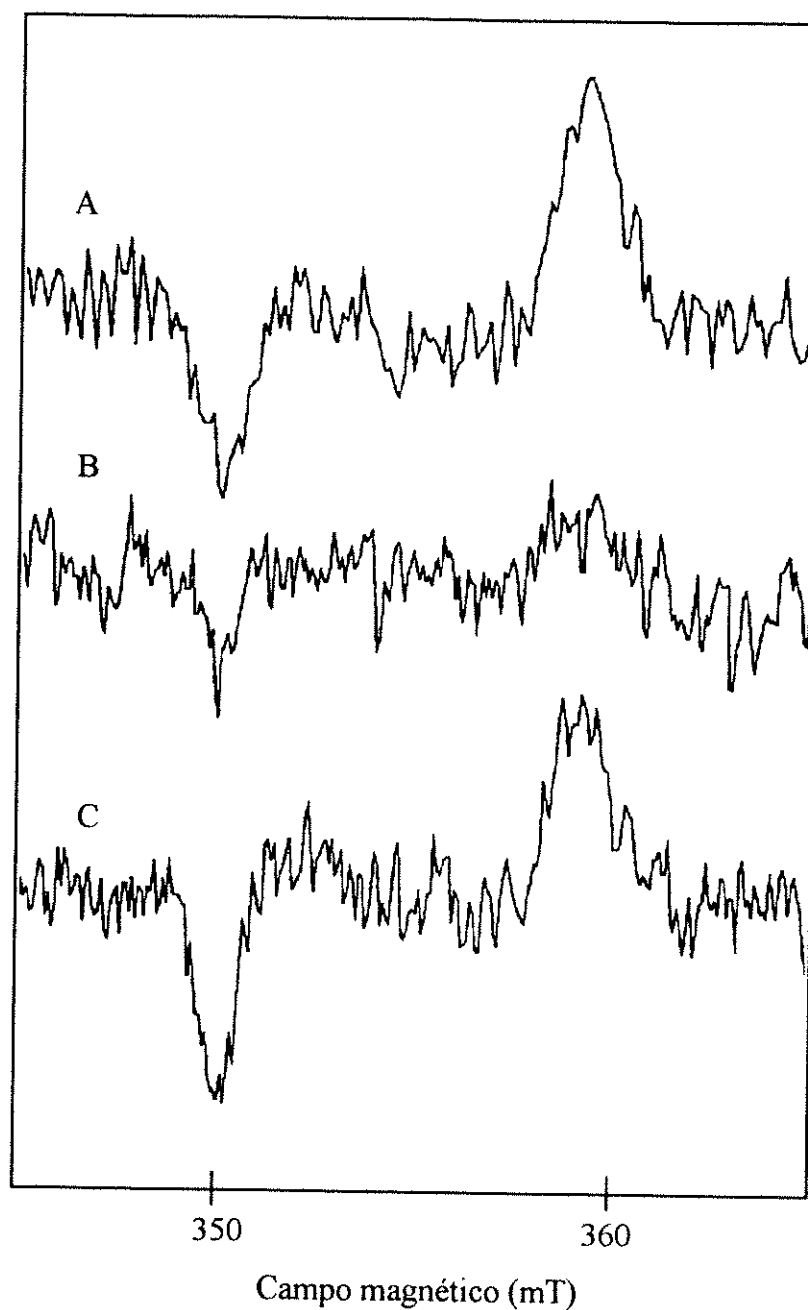


Figura 110: Señal de EPR ("light-induced spin-polarized triplet") del complejo PSII RC nativo (A), tratado con TX-100 (B), renaturalizado con DM (C) en el rango espectral de 345-365 mT.

DISCUSSION

INDICE DISCUSION

1. Purificación de complejos fotosintéticos de la cianobacteria *P. laminosum*: "oxygen evolving core" y centro de reacción del PSII. 167
2. Caracterización espectroscópica de las diferentes preparaciones de *P. laminosum*. 174
3. Aplicación del método de purificación desarrollado a *Synechocystis* PCC6803. 180
4. Repurificación del centro de reacción del PSII de plantas superiores y de *P. laminosum* mediante cromatografía de exclusión en FPLC. 181
5. Desnaturalización reversible del complejo PSII RC de plantas. 182

1. Purificación de complejos fotosintéticos de la cianobacteria *P. laminosum*: "oxygen evolving core" y centro de reacción del PSII

En el presente trabajo se han puesto a punto varios métodos de purificación de diferentes preparaciones fotosintéticas tales como membranas tilacoidales, complejo OEC o la mínima partícula capaz de desprender oxígeno y complejo PSII RC de la cianobacteria termófila *P. laminosum*.

El proceso de aislamiento de las membranas tilacoidales se desarrolló a partir del método descrito por Stewart y Bendall (1980) con algunas modificaciones, como por ejemplo el proceso de ruptura de las células. En el método original las células son tratadas con lisozima a 37°C durante 2 h 30 min, así se consigue disolver la pared celular, formándose estructuras esféricas denominadas esferoplastos. El posterior choque osmótico provoca la ruptura de los esferoplastos y mediante sucesivas centrifugaciones diferenciales, se seleccionan las membranas tilacoidales. Este método favorece la actividad de degradación proteolítica, por lo que se decidió modificar el método de ruptura de las células. Mediante el procedimiento de sonicación a 4°C, tanto la temperatura como el tiempo de incubación disminuyen drásticamente, reduciendo así la actividad proteolítica. Además, cabe destacar el uso de PMSF como inhibidor de proteasas para reducir aún más dicha actividad. Las fracciones de membranas tilacoidales obtenidas mediante este método poseen una alta capacidad para desprender oxígeno ($1.000 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), lo que es indicativo tanto de su pureza como del estado nativo de la preparación. Este paso ha sido de gran importancia en el desarrollo del trabajo, pues las membranas tilacoidales se utilizaban como material de partida para el resto de las purificaciones.

A partir de la preparación de membranas tilacoidales, se siguieron varios métodos de purificación de partículas enriquecidas en el complejo OEC descritos en la bibliografía (Bowes y col., 1983; Koike y col., 1987), pero como ya se ha expuesto, no se consiguieron buenos resultados ya que el material purificado presentaba elevada contaminación de PSI además de una fuerte desnaturalización. Muchos autores describen en sus trabajos este mismo problema (Pakrasi y col., 1985; Rögner y col., 1990; Nilsson y col., 1992; Oren-Shamir y col., 1995). La purificación del complejo OEC está limitada por la separación entre PSI y PSII, ya que las membranas tilacoidales de algunas cianobacterias, como *Synechocystis*, pueden tener un contenido en PSI cinco veces mayor que en PSII. Además, la organización de las membranas tilacoidales en cianobacterias es muy diferente a la existente en plantas superiores. La membrana tilacoidal de plantas contiene todos los pigmentos fotosintéticos del

cloroplasto, está muy plegada en un entramado de vesículas aplastadas y se dispone en apilamientos denominados grana. Las porciones de la membrana tilacoidal que se localizan dentro de los grana, no estando así expuestas al estroma, contienen preferentemente PSII, mientras que las porciones de la membrana tilacoidal expuestas al estroma contienen PSI. Por otra parte, el aparato fotosintético de cianobacterias se encuentra en estructuras membranosas que se extienden a través de la célula o forman invaginaciones de la membrana celular. El PSII no se encuentra localizado en regiones especializadas, por este motivo su purificación es más compleja que en plantas. Además de esta dificultad, tenemos que considerar la elevada actividad proteolítica que presentan las preparaciones obtenidas de cianobacterias, muy superior a la encontrada en extractos de plantas.

El complejo OEC altamente purificado pudo ser aislado siguiendo la combinación de dos métodos ligeramente modificados. El primero de los métodos consiste en la solubilización de membranas tilacoidales con LDAO, seguida de la separación de partículas enriquecidas en PSII mediante gradiente de sacarosa (Koike e Inoue, 1985). Estas partículas necesitan de un segundo paso en el que se purifica el complejo OEC por cromatografía de intercambio iónico (de Vitry y col., 1991).

Una comparación de los datos de actividad de desprendimiento de oxígeno del complejo OEC de *P. laminosum*, descrito en Resultados, con los existentes en la literatura para diferentes cianobacterias, muestran valores similares (Bowes y col., 1983; Picorel y col., 1983) o superiores a los publicados (Koike y col., 1989). La elevada tasa de desprendimiento de oxígeno es altamente indicativa de la estabilidad e integridad del complejo purificado. Asimismo, una comparación del contenido de pigmentos entre el complejo OEC aislado de *P. laminosum* y el aislado por otros autores, muestra un menor contenido de Chl en nuestro caso, pues mientras nuestro complejo mostró un valor de 37 clorinas por centro de reacción, Ichimura y col. (1992) presentaron 45 Chl/ Q_A , Ohno y col. (1986) 50 Chl/4Mn y de Vitry y col. (1991) 40-50 Chl/ Q_A . Pensamos que este menor contenido en nuestra preparación es debido a cierta pérdida de Chl asociada a la antena interna CP43, que se produce en el proceso de lavado cromatográfico durante la purificación del complejo OEC.

La composición polipeptídica del complejo OEC, analizada por SDS-PAGE, es similar a su homóloga de plantas superiores con la única excepción de la ausencia de las proteínas extrínsecas de 24 y 17 kDa, presentes en plantas y algas. Como ya se ha descrito en Materiales y Métodos, fue absolutamente necesaria la utilización de PMSF en todos los pasos de purificación para evitar la fuerte degradación de las proteínas D_1 y D_2 en subunidades de ~20 kDa.

Durante los últimos años, diferentes laboratorios han descrito métodos de aislamiento y purificación del PSII RC de plantas así como algunos intentos de purificación de este complejo a partir de cianobacterias. Todos los métodos requieren el uso de detergentes específicos, ya que se trata de un complejo de membrana. Seibert y col. (1988) y Ghanotakis y col. (1989) describieron la posibilidad de utilizar el detergente no iónico DM para estabilizar el PSII RC, previamente purificado con TX-100. El TX-100 fue utilizado inicialmente como detergente para la extracción y purificación (Nanba y Satoh, 1987). Sin embargo, este detergente influye de forma significativa en las propiedades espectroscópicas del PSII RC, como por ejemplo en los máximos de absorción y de emisión de fluorescencia. La presencia de TX-100, incluso a concentraciones menores a 0,02% (p/v), conlleva desplazamientos espectrales al azul de la banda de absorción en el rojo, además de producir inactivación de la actividad fotoquímica. Estudios sobre el PSII RC tratado con DM (Seibert y col., 1988; Chapman y col., 1988; McTavish y col., 1989) han demostrado que estas preparaciones eran mucho más estables que las mantenidas en presencia de TX-100. La explicación a este hecho reside en la menor CMC (concentración micelar crítica) del DM, lo que reduce las interacciones del detergente con la proteína y los cromóforos, disminuyendo por tanto la inestabilidad de éstos.

En nuestro laboratorio desarrollamos un método cromatográfico de purificación, solubilizando con TX-100 pero manteniendo posteriormente el complejo en DM, de esta forma se consiguió la purificación del RC del PSII de *P. laminosum* y *Synechocystis* 6803 (Aured y col., 1995). Como ya se explicó en Materiales y Métodos, el material de partida para purificar dicho RC fue el complejo OEC, previa eliminación de la proteína extrínseca de 33 kDa mediante tratamiento con 0,8 M Tris a pH básico. Un paso fundamental de nuestro método de purificación es la solubilización del complejo OEC previamente inmovilizado dentro de la propia columna cromatográfica. Este método fue puesto a punto tras sucesivos experimentos con los que se concluyó que la solubilización en solución con TX-100 era muy destructiva, produciendo una extensiva desnaturalización del complejo. Al solubilizar el material inmovilizado en la columna, el detergente actúa sobre la muestra que se encuentra adsorbida al gel, circunstancia que parece inducir mayor estabilidad al material en estudio. Después de cada periodo de solubilización, parte de la antena contaminante es eliminada y por tanto, en las posteriores solubilizaciones el detergente actúa sobre el complejo cada vez más puro.

Existe aún cierta controversia sobre la estequiometría de los pigmentos presentes en el RC del PSII. Así, varios grupos han publicado datos que varían entre 4-12 Chl *a*, 2-3 Pheo *a*, 1-2 β -caroteno y 1-2 Cyt *b*-559 por centro de reacción. Por otra parte el RC bacteriano está asociado con 4 Bchl, 2 Bpheo y un caroteno. Parece ser que tanto el método de aislamiento (Montoya y col., 1991) como el detergente usado (Dekker y col., 1989) para la purificación

del complejo, podrían afectar al contenido final de pigmentos del material obtenido, especialmente de Chl *a* y β -caroteno. Los estudios más recientes en los que el complejo D₁/D₂/Cyt *b*-559 ha sido purificado de forma menos destructiva indican que el material contiene 6 Chl *a*, 2 Pheo *a*, 2 β -carotenos y 1 Cyt *b*-559 (Kobayashi y col., 1990; Gounaris y col., 1990; Montoya y col., 1991) y está desprovisto tanto del átomo de Fe no hemínico y quinonas del lado reductor de electrones como de los átomos de Mn involucrados en la evolución de oxígeno. Sin embargo, este complejo conserva la capacidad para llevar a cabo la separación de cargas.

El análisis del complejo RC de *P. laminosum* aislado durante este trabajo muestra un contenido en pigmentos de 6,5 Chl por 2 Pheo, similar al del RC de plantas superiores (Kobayashi y col., 1990; Gounaris y col., 1990; Montoya y col., 1991). El contenido en Cyt *b*-559 del complejo PSII RC ha sido también un tema de debate. El contenido de este componente ha sido calculado para el complejo aislado de *P. laminosum* y está de acuerdo con los datos aportados por otros autores para plantas (Miyazaki y col., 1989; Nanba y Satoh, 1987; Barber y col., 1987; Braun y col., 1990; Montoya y col., 1991) pero no coincide con los datos de Dekker y col. (1989), Shuvalov y col. (1989) y MacDonald y col. (1994).

SDS-PAGE del complejo PSII RC mostró la presencia de los polipéptidos característicos que constituyen un centro de reacción, es decir el heterodímero D₁/D₂, D₁, D₂ y la banda α del Cyt *b*-559. Según esto, su composición polipeptídica es similar a la del complejo D₁/D₂/Cyt *b*-559 aislado a partir de plantas superiores (Nanba y Satoh, 1987; Barber y col., 1987; Braun y col., 1990; Montoya y col., 1991; van Leeuwen y col., 1992).

Medidas de actividad de transporte electrónico secundario del RC de *P. laminosum* con DPC y SiMo como donador y aceptor de electrones artificiales, respectivamente, dieron valores superiores ($3.910 \mu\text{eq e}^- \cdot \mu\text{mol Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) a los obtenidos para el RC de plantas (1.500 - $3.000 \mu\text{eq e}^- \cdot \mu\text{mol Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). La elevada actividad del PSII RC de *P. laminosum* discrepa de las conclusiones del trabajo de Giorgi y col. (1996), en el que consideran que el rendimiento cuántico de formación del par $\text{P680}^+ \text{Pheo}^-$ del RC de *Synechocystis* salvaje es un 50% menor que el del RC de plantas superiores. Además, nuestros datos de fluorescencia resuelta en el tiempo indican una clara similitud con los datos obtenidos para RC de plantas, indicativo de un rendimiento cuántico similar en ambas especies. Por otra parte, la actividad de la preparación está de acuerdo con la capacidad de reducción de Pheo en presencia de luz, ditionito y metilviológeno. En dichas condiciones fotoreductoras se indujo en el complejo un espectro

característico de la acumulación de Pheo⁻, demostrado especialmente por la aparición de una banda negativa a 542 nm. Una diferencia apreciable entre el espectro de fotoacumulación de Pheo⁻ del RC de *P. laminosum* y de plantas está en el máximo de la banda correspondiente a la transición Q_x de la Pheo⁻. En cianobacterias aparece dicho máximo a 542 nm mientras que en plantas se observa a 544-545 nm. El desplazamiento de dicha banda está de acuerdo con los datos de los espectros de absorción electrónica a baja temperatura de los complejos RC; existen 3 nm de diferencia entre los máximos de la transición Q_x de la Pheo de *P. laminosum* (540 nm) y plantas superiores (543 nm) (Fig. 111). Esta diferencia de 3 nm entre ambas especies también fue observada por Giorgi y col. (1996). Estos autores consiguieron dos mutantes de *Synechocystis* en los que el residuo D₁-130 había sido cambiado de glutamina a glutamato (mutante D₁-Gln 130 Glu), que corresponde a la secuencia en plantas superiores, o a leucina (mutante D₁-Gln 130 Leu). El residuo D₁-130 se cree que está próximo a la Pheo y de hecho demostraron que el residuo D₁-130 afecta a la transición Q_x de dicho pigmento. Los máximos de absorción de esta banda fueron 541,5 nm para *Synechocystis* salvaje, 544 nm para el mutante D₁-Gln 130 Glu y 540 nm para el mutante D₁-Gln 130 Leu. Solamente cuando el residuo en la posición D₁-130 es el mismo que en plantas superiores (mutante D₁-Gln 130 Glu), la banda Q_x de la Pheo se encuentra a la misma longitud de onda que en plantas. Además, el rendimiento de separación de cargas es mayor en el mutante D₁-Gln 130 Glu que en *Synechocystis* salvaje.

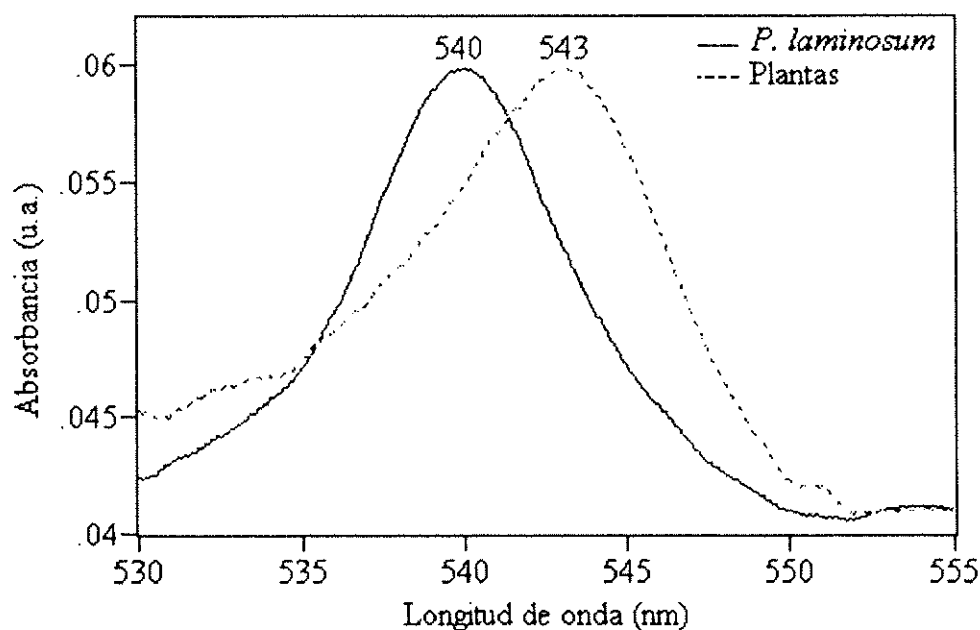


Figura 111: Espectro de absorción a baja temperatura de la transición Q_x de la Pheo de *P. laminosum* y plantas superiores.

Según todos los datos presentados y comentados en la sección de Resultados, consideramos que el objetivo ha sido conseguido, pues hemos obtenido una preparación de gran pureza y altamente activa.

El análisis mediante HPLC establece inequívocamente que los únicos pigmentos presentes en los complejos OEC y RC de *P. laminosum* son Chl, Pheo y β -caroteno. Mediante esta técnica pudo detectarse la presencia de dos formas isoméricas del β -caroteno, *all-trans* y *cis*. Modificando las condiciones de extracción y de HPLC, Bialek-Bylka y col. (1995) sugieren que existe una isomerización de la forma 15-*cis* a la forma *all-trans* producida durante el proceso de análisis. Estos resultados contrastan con conclusiones previas de que el β -caroteno unido al PSII RC se encuentra en configuración *all-trans* y generaliza el concepto establecido a partir de bacterias púrpuras, que los centros de reacción fotosintéticos seleccionan naturalmente la configuración *cis*. La aparición de dos bandas correspondientes a tiempos de retención próximos pero distintos en el cromatograma de HPLC (Fig. 73) podría deberse en principio a la presencia de α - y β -caroteno o a dos formas isoméricas del β -caroteno. Utilizando un detector de diode-array se pudo comprobar que cada uno de los picos de elución era debido a un isómero distinto del β -caroteno. El primero en eluir corresponde al isómero *all-trans* y el segundo a un isómero *cis* pudiendo tratarse del 15-*cis*- β -caroteno, aunque estos datos tendrán que ser confirmados mediante otras técnicas como RMN. Lo que más llamó nuestra atención fue que estas dos configuraciones aparecían en similar proporción en preparaciones con distinto contenido en RC, es decir tilacoides, complejo OEC y PSII RC. Esto nos ha hecho pensar que el β -caroteno presente en cada preparación se encuentra en su forma menos energética y más estable, esto es *all-trans*, pero al llevar a cabo su extracción y cromatografía de HPLC, se produce una isomerización que da lugar a la aparición de las dos diferentes estructuras, *all-trans* y *cis*. Como la columna utilizada se mantuvo en las mismas condiciones para todos los análisis, podemos explicar este hecho como una isomerización producida en similar proporción en las distintas preparaciones de material fotosintético.

En la bibliografía existen diferentes ideas sobre la existencia de dos isómeros del β -caroteno en el complejo RC del PSII nativo. Newell y col. (1991) propusieron que los distintos comportamientos espectrales pueden deberse a diferentes interacciones excitónicas entre dos moléculas de β -caroteno idénticas presentes en el PSII RC, en respuesta a la conformación de la proteína a la que se encuentran unidas. Por otra parte, Ashikawa y col. (1986) concluyeron tras varios estudios que los tilacoides de *Synechococcus vulcanus* poseen un 20% de β -caroteno correspondiente a varios isómeros *cis*. La interpretación más simple para Setlíková y col. (1995) está en que el RC del PSII nativo contiene una forma *all-trans* y una forma *cis* del β -

caroteno, pero durante el proceso de purificación del RC, la forma *all-trans* se pierde preferentemente, provocando un enriquecimiento en la forma *cis*.

Independientemente de la configuración del β -caroteno, al hacer una comparación entre los espectros de absorción de dos preparaciones de PSII RC de *P. laminosum* con diferente contenido total de β -caroteno (Fig.112), se observó que la intensidad relativa de las bandas adscritas al β -caroteno varían con el contenido total de este pigmento. Así, la banda a 486 nm claramente disminuye más rápidamente que la de 508-510 nm. La interpretación más simple a este fenómeno, es considerar que en el PSII RC existen dos tipos de β -carotenos con distintas propiedades espectroscópicas y que uno de ellos, concretamente el que presenta bandas de absorción a longitud de onda menores, se pierde preferentemente. Como consecuencia, el PSII RC con menor contenido en pigmentos se va enriqueciendo con el β -caroteno cuyas bandas se encuentran desplazadas hacia longitudes de onda superiores. Esto se contrasta claramente al hacer la diferencia entre los espectros de dos preparaciones con distinto contenido en β -caroteno, normalizando en la banda Q_x de la Pheo (Fig. 113). Por el momento se desconoce si esta diferencia estructural implicaría también una función distinta para cada tipo de β -caroteno presente en el centro de reacción del PSII.

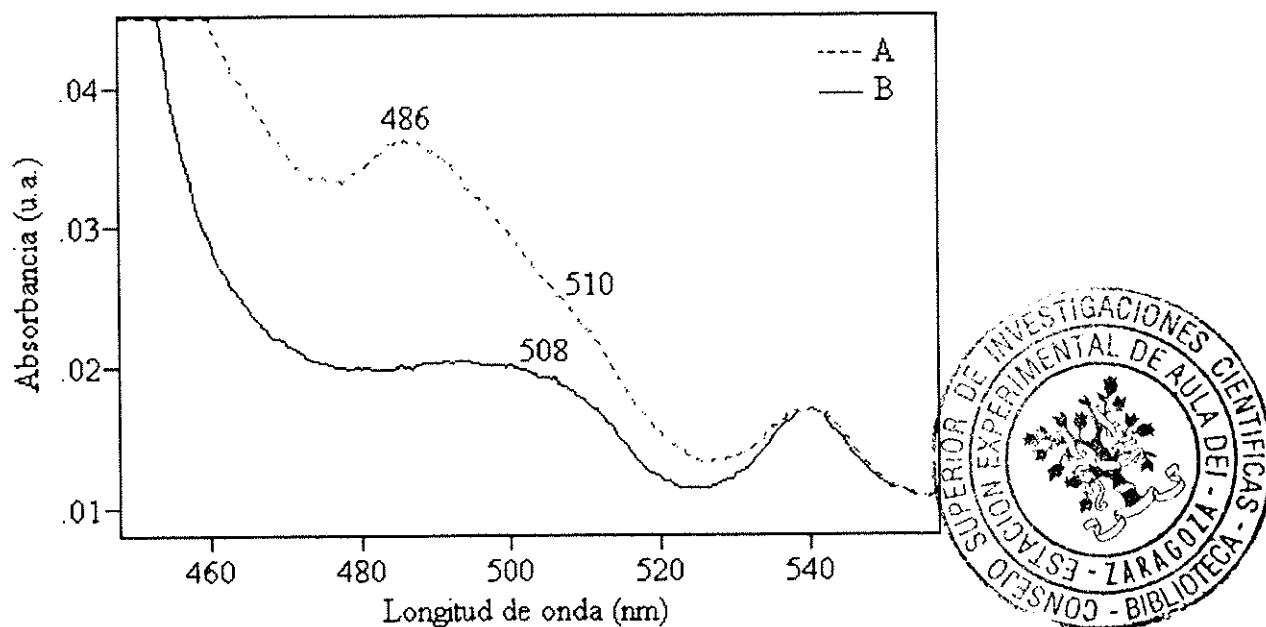


Figura 112: Comparación entre dos espectros de absorción de PSII RC de *P. laminosum* con distinto contenido en carotenos. A, mayor contenido en β -caroteno; B, menor contenido en β -caroteno.

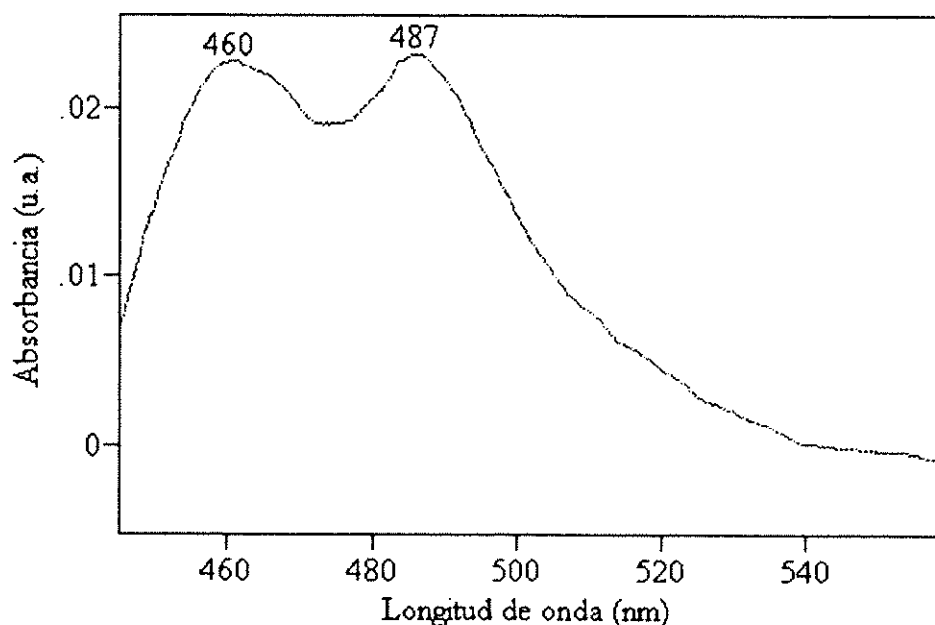


Figura 113: Diferencia entre los espectros de absorción de dos preparaciones de PSII RC de *P. laminosum* con diferente contenido en β -caroteno.

2. Caracterización espectroscópica de las diferentes preparaciones de *P. laminosum*

En base a la caracterización espectroscópica de los complejos purificados a partir de la cianobacteria *P. laminosum* se puede considerar que existe bastante similitud con sus homólogos purificados a partir de plantas superiores.

Espectroscopia de absorción

Según los espectros de absorción de nuestro complejo OEC y de los aislados por Stewart y Bendall (1979), Satoh y col. (1985) y Dekker y col. (1988) para *P. laminosum*, *Synechococcus* sp. y *Synechocystis*, respectivamente, se puede concluir que nuestra preparación presenta un mayor grado de pureza en comparación con el resto de purificaciones de cianobacterias descritas en la bibliografía. Existe una mayor definición de las bandas a 415 nm, producida por la transición Soret de la Chl, Pheo y Cyt *b*559 y a 545 nm, originada por la transición Q_x de la Pheo. La marcada aparición de dichas bandas indica la presencia del complejo D_1/D_2 /Cyt *b*-559, pues la Pheo es característica de este complejo proteico. La relación

entre las bandas a 415 y 675 nm es de 1,13 para nuestra preparación, de 1,20 para el complejo purificado a partir de *Synechocystis* 6803 por Tang y Diner (1994), con el que existe una mayor semejanza espectral y de 1,16 para el mismo complejo purificado a partir de plantas superiores (Montoya, Tesis Doctoral). La banda de caroteno es similar en cuanto a absorbancia en todas las preparaciones. El método empleado para la obtención de este complejo tiene, por supuesto, gran importancia y las muchas variaciones observadas entre las distintas preparaciones descritas demuestran las dificultades para conseguir muestras homogéneas.

El espectro de absorción del complejo PSII RC de *P. laminosum* es similar al de plantas superiores, aunque existe alguna diferencia notable entre ambos como la intensidad de la banda a 485-490 nm debida al β -caroteno. En el complejo de cianobacterias, esta banda es mucho menor que en plantas superiores. La explicación consiste en que durante el proceso de purificación del PSII RC de *P. laminosum* se produce una mayor pérdida de β -caroteno, posiblemente por efecto de los detergentes. Esta disminución de β -caroteno no está asociada a una disminución en el contenido de Chl como proponía Montoya y col. (1993) para el PSII RC de plantas, obtenido tras un prolongado lavado en la columna cromatográfica. La relación entre las bandas a 416 y 676 nm en el RC de *P. laminosum* es similar a la obtenida en el RC de plantas superiores.

Según el espectro de absorción del complejo RC de *P. laminosum*, se puede concluir que la preparación descrita en este trabajo es la más pura conseguida hasta el momento a partir de una cianobacteria. Las otras preparaciones de RC descritas presentan una marcada banda a 435 nm, indicativa de la presencia de Chl contaminante, posiblemente asociada a la antena intrínseca CP47 (Gounaris y col., 1989; Ikeuchi y col., 1989; Oren-Shamir y col., 1995; Giorgi y col., 1996). Además, la composición polipeptídica del complejo aislado por Oren-Shamir y analizada mediante electroforesis (LDS-PAGE) muestra una fuerte banda correspondiente a CP47, de acuerdo con los datos espectroscópicos. La preparación de Setlíková y col. (1995) muestra una marcada banda a 435 nm, así como una fuerte absorción a 280 nm, debida a otras proteínas contaminantes. En nuestra preparación, la banda Q_y de las clorinas aparece a 676 nm, indicativo de un centro de reacción esencialmente nativo. Esta misma banda se presenta en las otras preparaciones a longitudes de onda menores, esto es a 672 nm (Ikeuchi y col., 1989), 673 nm (Gounaris y col., 1989), 674 nm (Oren-Shamir y col., 1995) y 675 nm (Giorgi y col., 1996), llegándose a concluir que en estos complejos parcialmente purificados existen centros de reacción degradados que producen un desplazamiento de la banda de menor energía hacia el azul.

Existe una gran diferencia entre la banda producida por la transición Q_x de la Pheo en el complejo OEC y en el RC del PSII. Esta diferencia se debe a que la Pheo es un pigmento

minoritario en el complejo OEC, debido a la gran cantidad de Chl asociada a las antenas internas CP43 y CP47. Según nuestros datos de cuantificación de pigmentos del complejo OEC, existen 37-38 clorinas por 2 Pheo, es decir por RC. En el RC del PSII la relación Chl/Pheo es bastante menor pues existen 6,0-6,5Chl/2Pheo, de ahí que la cantidad de Chls por Pheo es mucho mayor en el complejo OEC que en el RC del PSII, produciendo en aquél un encubrimiento de la banda Q_x de la Pheo. La diferencia entre las segundas derivadas de los espectros de absorción electrónicos de los complejos OEC y RC se debe a un mayor contenido de complejos pigmento-proteína en el complejo OEC que en el RC. La segunda derivada de las proteínas intrínsecas CP43 y CP47, asociadas al complejo OEC, mostraron la presencia de varios componentes en la transición Q_y de la Chl, a 671 y 682 nm para CP43 y a 670, 676 y 681,2 nm para CP47 (Alfonso y col., 1994). Según estos datos, la segunda derivada del espectro de absorción del complejo OEC se parece más a la antena CP47 que a CP43, confirmandose así, que nuestra preparación ha perdido parte de la antena CP43 durante el proceso de lavado cromatográfico necesario para la purificación del complejo. Además, existe una pérdida importante de absorbancia asociada a la transición Soret x de la Chl en el RC con respecto al complejo OEC. Este dato es totalmente lógico pues está de acuerdo con la pérdida de las antenas internas del complejo OEC para conseguir un RC puro.

El espectro de absorción a baja temperatura del RC del PSII es bastante diferente al de plantas. Presenta una banda nítida a 677,6 nm ausente en el espectro de absorción del PSII RC de plantas. Por el momento no sabemos el significado de esta nueva banda de absorción, aunque estas diferencias espectrales pueden deberse a distintas interacciones pigmentos-pigmentos y/o pigmentos-proteína.

Espectroscopia de fluorescencia a 77K

Por otra parte, los datos de emisión de fluorescencia a baja temperatura del complejo OEC muestran un evidente desplazamiento hacia el rojo en comparación con los datos de Gounaris y col. (1989) y de Oren-Shamir (1995), mientras que el centro de reacción del PSII presenta claras similitudes en relación al centro de reacción de plantas superiores (Yruela y col., 1994; Konermann y col., 1996). Los espectros de excitación de fluorescencia, tanto del complejo OEC como del RC, son muy similares a los espectros de absorción correspondientes. Esto indica claramente que en ambos complejos existe una alta eficiencia de transferencia de energía entre los distintos cromóforos presentes en los complejos y se puede concluir, por tanto, que éstos no han sufrido distorsiones importantes y que, además, existe un excelente equilibrio de la energía de excitación antes de la emisión de fluorescencia.

Espectroscopia SERRS

Respecto a las medidas SERRS, existen bastantes diferencias en cuanto a los complejos OEC y RC. El motivo por el que se realizaron espectros SERRS excitados a distintas longitudes de onda, responde a la estrategia de hacer preferentes unos modos de vibración con respecto a otros y de esta forma, seleccionar ciertos cromóforos discriminando al resto.

Al excitar en la región Soret (406,7 y 413 nm), aparecen dos bandas en la región de vibración del grupo carbonilo $C_9=O$ del anillo V de las porfirinas, a 1700 y a 1675 cm^{-1} . La banda de mayor energía indica que el grupo $C_9=O$ de Chl se encuentra libre mientras que la aparición de la banda a menores energías se interpreta como una interacción de este grupo con la proteína o con otros pigmentos. En los dos complejos, OEC y RC, la banda mayoritaria es la correspondiente a Chl libre, pero hay que destacar que en el RC del PSII, la banda de menor energía, es decir la producida por Chl que está interaccionando, presenta mayor intensidad que en el complejo OEC. De estos datos podemos concluir que en ambos complejos, existe tanto Chl libre como interaccionando, pero esta última se encuentra en mayor proporción en el complejo RC que en OEC. Otra diferencia importante en este espectro es el aumento de las intensidades de los modos vibracionales a 1584, 1223 y 676 cm^{-1} , correspondientes a Pheo. Como ya se ha comentado, en el complejo OEC este pigmento es muy minoritario, lo que hace que su espectro se encuentre enmascarado por el de los otros pigmentos. En el complejo OEC no se detectan tampoco las bandas correspondientes a los modos de vibración del Cyt *b*-559 (1584, 1360 y 676 cm^{-1}), en cambio, en el complejo RC se hacen evidentes. Esto se debe a que el Cyt *b*-559, al igual que la Pheo, se encuentran en mucha menor proporción en el complejo OEC que en RC.

Cuando la excitación se lleva a cabo a 488 ó 514 nm se intensifican las vibraciones de los tres modos del β -caroteno, ν_1 , ν_2 y ν_3 , características del isómero *all-trans* del β -caroteno. Esta conclusión está en desacuerdo con el trabajo de Bialek-Bylka y col. (1995) en el que concluyen que el isómero 15-*cis*- β -caroteno está presente en el PSII RC de espinaca. Para compaginar ambas conclusiones habría que admitir que ocurre una isomerización completa *cis*→*all-trans* inducida por la luz del láser de excitación, algo improbable a 77K. En estos espectros no existe gran diferencia entre los complejos RC y OEC, únicamente la banda correspondiente al modo de vibración ν_2 del β -caroteno se hace más intensa en el complejo OEC que en RC.

Como ya se comentó, la excitación a 700 nm proporciona información directa sobre los modos vibracionales acoplados a la transición Q_y . La principal diferencia entre los espectros del complejo OEC y el RC se encuentran en que el del complejo OEC es similar al espectro de la Chl en solución, mientras que el espectro del RC presenta bandas correspondientes a la Pheo así como modificaciones de la intensidad de las bandas, como consecuencia de solapamientos de algunas bandas de Chl y Pheo. Los pequeños desplazamientos que se producen entre las bandas SERRS de los complejos proteicos y las bandas de las referencias en solución, podrían deberse a la existencia de interacciones pigmento-pigmento y/o pigmento-proteína dentro de los complejos. Tales interacciones podrían hacerse más patentes si pudiésemos obtener espectros SERRS en el rango de bajas frecuencias, algo que no ha sido posible hasta el momento. La presencia de la superficie metálica activa en SERRS redujo drásticamente la fluorescencia pero aún en estas condiciones favorables fue imposible trabajar a bajas frecuencias.

Mediante SERRS también se confirmó que el PSII RC obtenido es fotoquímicamente activo. Así, la señal a 1360 cm^{-1} , marcador del estado reducido del Cyt *b*-559, aumenta con la intensidad de la luz del láser de excitación. Pensamos que el aumento relativo de la señal a 1360 cm^{-1} respecto a las señales de los otros cromóforos e incluso respecto a las otras señales del Cyt *b*-559, es debido a la fotoacumulación de dicho citocromo reducido a partir de la Pheo⁻, como consecuencia de la actividad fotoquímica del RC. Estos datos están en la línea de los resultados obtenidos por Chumanov y col. (1993) y claramente indican que el Cyt *b*-559 es funcional en el centro de reacción purificado. Numerosos trabajos publicados tratan de la funcionalidad del Cyt *b*-559 en el PSII. Barber y col. (1993) proponen un mecanismo en el que el Cyt *b*-559 puede convertirse reversiblemente en sus formas de alto potencial ($E_m = +400\text{ mV}$) y bajo potencial ($E_m = +60-80\text{ mV}$) durante el proceso fotoinhibitorio, distinguiendo entre fotoinhibición producida en el lado donador y la originada en el lado aceptor. La fotoinhibición en el lado donador se produce cuando la velocidad de electrones que abandonan el PSII RC es mayor a la velocidad de donación. Consecuentemente, el tiempo de vida de las especies oxidadas aumenta y los altos potenciales de oxidación de dichas especies provocan daños irreversibles en el PSII RC. Por otra parte, la fotoinhibición en el lado aceptor se produce cuando hay una sobreredución de las quinonas. En este caso, es muy probable que exista una recombinación de cargas entre el par radical $P680^+ \text{ Pheo}^-$, llegando a producirse el estado triplete del P680. Este estado triplete puede interaccionar con el O_2 y formar 1O_2 altamente reactivo. Se sugiere que la forma de bajo potencial del Cyt *b*-559 puede aceptar electrones directamente de la Pheo reducida, protegiendo así al PSII RC contra la fotoinhibición en el lado aceptor. De esta forma, el Cyt *b*-559 pasa a su forma de alto potencial y dona electrones al P680, protegiendo de la fotoinhibición en el lado donador, ya que reduce el tiempo de vida de las especies altamente oxidantes.

Espectroscopia de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular en el visible nos indican la existencia de interacciones excitónicas entre cromóforos presentes en el PSII RC. En el espectro del complejo OEC, la presencia del doblete en el rojo indica un cierto grado de acoplamiento entre algunas Chls presentes en los complejos de antena (CP43 y CP47) mientras que las bandas en el azul se deben a Chl (432,6 y 448,1 nm) y al β -caroteno (488,7 nm). En el espectro de dicroísmo circular del complejo PSII RC aparece un doblete no conservativo en la zona del rojo, debido al menos en parte a interacciones excitónicas entre las dos Chls del P680. El doblete no es conservativo ya que el área integrada de los dos lóbulos espectrales no es igual. Este doblete puede deberse a un solapamiento entre el doblete conservativo producido por dichas interacciones excitónicas y alguna banda de interacción pigmento-proteína que también presente actividad dicroica. Por este motivo, el doblete se muestra no conservativo.

A partir del espectro de dicroísmo circular del PSII RC, podemos concluir que los componentes que intervienen en la interacción excitónica (monómeros del P680), absorben hacia 665 y 680,4 nm que corresponden al mínimo y máximo de los dos lóbulos. El bajo grado de separación excitónica de las bandas del dímero, de acuerdo con la reducida intensidad de la actividad dicroica si se compara con el RC bacteriano, indica que la interacción excitónica del dímero P680, en su estado fundamental, es débil. La estructura dimérica del P680 en estado fundamental parece perderse en estado excitado y especialmente durante el proceso de recombinación de cargas ya que el spin triplete reside preferentemente en una única clorofila.

Los resultados obtenidos mediante la espectroscopia de dicroísmo circular en la región del UV, tanto para el complejo OEC como para el RC del PSII, indican que las proteínas poseen una alta proporción de estructura secundaria en α -hélice, pero no se descarta la existencia de otras estructuras como láminas- β y enrollamientos al azar. Al comparar los espectros de dicroísmo circular en el UV del complejo OEC y RC, parece que existe un mayor contenido en α -hélices en este último, debido a la mayor intensidad relativa de la banda a 222 nm (Greenfield y col., 1969). Estos datos están de acuerdo con otros estudios estructurales. Trabajos de simulación e hidropatía sugieren que las antenas CP47 y CP43 del OEC están formadas por 6 α -hélices transmembranales con la presencia de un gran dominio hidrofílico sin estructuras en α -hélice entre las hélices V y VI, localizado en el lumen (Vermaas y col., 1987; Chisholm y Williams, 1988), que estaría de acuerdo con una menor proporción de α -hélice en OEC respecto a PSII RC. Los resultados del PSII RC presentan bastante similitud con los

obtenidos para el RC de plantas (Montoya y col., 1994) y otras cianobacterias (Oren-Shamir y col., 1995).

Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo

Los resultados obtenidos a partir de la espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo para el centro de reacción de *P. laminosum* indican la existencia de cuatro componentes. El más rápido de 5 ps debido a la combinación de un componente asignado a la separación de cargas (3 ps) y otro debido a la transferencia de energía (5-9 ps). El segundo, de 32 ps, asignado fundamentalmente a transferencia de energía y otros tres componentes más lentos de 168 ps, 870 ps y 6,5 ns debidos a la recombinación de cargas del par especial. La explicación a la observación de varios tiempos de vida puede deberse a diferentes procesos de relajación que sufre el par P680 en distintos estados energéticos. Estos datos no están de acuerdo con el trabajo de Giorgi y col. (1996), en el que mediante el uso de espectroscopia de absorción resuelta en el tiempo concluyen que en el centro de reacción del PSII de *Synechocystis*, la separación de cargas se produce en un tiempo de 20 a 30 ps.

3. Aplicación del método de purificación desarrollado a *Synechocystis* PCC6803

El método puesto a punto para purificar el centro de reacción de la cianobacteria termófila *P. laminosum* pudo ser aplicado a una cianobacteria no termófila, *Synechocystis* PCC6803, con un mayor interés en cuanto a sus amplias posibilidades de transformación genética y a su capacidad de crecer heterotróficamente en glucosa y por tanto, un excelente sistema para realizar experimentos de mutagénesis dirigida. El método de purificación seguido fue esencialmente el mismo que para *P. laminosum* aunque se incrementaron ligeramente tanto la concentración de detergente como el tiempo de incubación en la columna. Quizás estas condiciones algo más drásticas sean las responsables de que el centro de reacción obtenido posea un menor contenido en β -caroteno y un ligero desplazamiento hacia el azul de la banda de menor energía. La pérdida preferencial del β -caroteno respecto a los otros pigmentos del PSII RC sugiere que aquél está más expuesto a la superficie de la matriz proteica y por tanto, más accesible al lavado por efecto del detergente.

Espectralmente existen algunas diferencias entre el RC aislado de *P. laminosum* y el de *Synechocystis*. Como se ha comentado hay una mayor pérdida de β -caroteno en el

proceso de purificación que se aprecia claramente en su espectro de absorción en el que la banda a 485 nm es prácticamente inexistente. Además, la banda correspondiente a la transición Q_x de la Pheo aparece menos marcada que en el RC de *P. laminosum*, mientras que la banda a 435 nm se presenta con mayor intensidad, indicando un mayor contenido de Chl que podría estar asociado a una pequeña contaminación de la antena interna CP47. No obstante, el PSII RC así obtenido puede servir para estudiar las características espectrales/funcionales del mismo, así como de centros de reacción modificados mediante mutagénesis dirigida

El PSII RC sin carotenos pudo ser reconstituido añadiendo β -caroteno, pero a una proporción determinada de centro de reacción. Esto sugiere que existen interacciones específicas entre la matriz proteica y el pigmento. Estudios posteriores tendrán que demostrar que el β -caroteno, así incorporado al centro de reacción, es funcional. Es decir, una incorporación correcta del β -caroteno daría más estabilidad al complejo y protegería contra la fotodegradación como consecuencia de la acumulación de Chl triplete que activaría la formación de 1O_2 , especie de oxígeno claramente destructiva para los sistemas biológicos.

4. Repurificación del centro de reacción de plantas superiores y de *P. laminosum* mediante cromatografía de exclusión en FPLC

Las preparaciones de PSII RC de plantas superiores descritas en la literatura científica difieren significativamente tanto en sus propiedades espectrales como estequiométricas, incluso entre preparaciones de un mismo laboratorio. Dichas diferencias sugieren que tales preparaciones consideradas estándar son de hecho heterogéneas. La utilización de la cromatografía de exclusión de FPLC ha demostrado que este es el caso. Así, mediante dicha cromatografía se obtuvieron fracciones con distinto espectro de absorción y contenido en pigmento. Las fracciones con un mayor contenido en pigmentos mostraban al mismo tiempo mayor intensidad de la banda de absorción a 435 nm, debida únicamente a la Chl, respecto a la banda a 416 nm, adscrita a Chl, Pheo y Cyt *b*-559. Otras fracciones estaban enriquecidas en Cyt *b*-559. Además, las primeras fracciones, normalmente de bajo contenido en pigmentos, mostraron una fuerte absorción hacia 280 nm correspondiente a proteínas. Estas fracciones corresponderían a agregados de mayor peso molecular que el complejo PSII RC, formados por proteínas pigmentadas y otras no pigmentadas contaminantes ya que la relación de absorción 280 nm/416 nm es mucho mayor en estas fracciones. El pico principal de elución con baja absorción a 280 nm y con una banda poco definida a 435 nm constituye el complejo PSII RC puro, tanto desde un punto de vista espectral como proteico. Podemos concluir, por tanto, que este paso cromatográfico adicional, además de servir para demostrar la

heterogeneidad de la mayoría de las preparaciones estándar de RC, permite obtener un complejo extremadamente puro. Sin embargo, el rendimiento de esta cromatografía no es muy alto y por tanto, no es muy apropiado para obtener grandes cantidades de muestra muy pura, necesarias normalmente para llevar a cabo estudios espectroscópicos o cristalográficos.

En ciertas ocasiones las preparaciones de PSII RC de *P. laminosum* no son tan puras como la preparación estándar descrita en la sección de Resultados. En estos casos hemos aplicado también como paso adicional una cromatografía de exclusión por tamaño, como se ha discutido anteriormente. La preparación de cianobacterias parece comportarse de forma similar a la de plantas superiores durante dicha cromatografía. De igual forma que en plantas superiores, se obtuvieron diferentes fracciones con distinto contenido proteico y de pigmentos. El pico principal corresponde al PSII RC puro, las primeras fracciones aparecen contaminadas con proteínas pigmentadas, posiblemente CP47 y no pigmentadas y las últimas fracciones mostraron mayor contenido en Cyt *b*-559.

Aunque de lo expuesto anteriormente se puede concluir que la cromatografía de exclusión por tamaño se puede aplicar con éxito a la repurificación del complejo PSII RC, dicha situación no se puede generalizar para cualquier preparación de proteína de membrana. La presencia de detergente(s) en la muestra modifica significativamente los pesos moleculares de las partículas, induce agregaciones indeseadas, micelas con proteínas desnaturalizadas que tienden a agregarse con pesos moleculares muy diversos, etc. Todo ello hace que frecuentemente los picos cromatográficos no aparezcan tan bien definidos como en el caso de las proteínas solubles, haciendo muy difícil la separación de la proteína objeto de estudio. La utilización de columnas pre-empaquetadas de alta resolución como las usadas es el presente trabajo puede facilitar enormemente dicha tarea.

5. Desnaturalización reversible del complejo PSII RC de plantas

Los datos de EPR dieron un avance importante al trabajo comenzado con anterioridad en nuestro laboratorio, en el que se llevó a cabo un estudio sobre la alteración de las propiedades espectroscópicas del centro de reacción producidas por el efecto de algunos detergentes.

La señal de EPR "light-induced spin-polarized triplet" del complejo RC del PSII es una señal característica atribuida a la formación del triplete $^3\text{P680}$, como resultado de la

recombinación de cargas entre $P680^+$ $Pheo^-$. Esto constituye una prueba directa tanto de la estructura como de la función del centro de reacción, pudiendo usarse también como una medida de la concentración relativa de P680. La aparición y la desaparición de la señal del P680 se considera como una consecuencia de la reorganización de pigmentos inducida por los tratamientos con detergentes. La explicación más sencilla pero no por ello la única posible, consiste en considerar el P680 como un dímero, al menos en su estado fundamental, formado por dos monómeros entre los que existen interacciones. Pequeñas modificaciones de su dominio inducidas por los detergentes, afectarían fuertemente a la orientación y/o distancia de los dos monómeros, tanto entre ellos como con respecto a la matriz proteica, modificando por tanto, sus interacciones y consecuentemente, sus propiedades espectrales/funcionales. Todo esto conllevaría un desorden de la estructura dimérica, con la consiguiente pérdida de P680 y de la señal de EPR, convirtiéndose en dos monómeros de Chl que absorben a 670 nm. La estructura del P680, muy sensible al TX-100, puede ser restablecida por intercambio de este detergente con DM. Es interesante resaltar que este diseño experimental permite la desnaturalización reversible de una proteína tan compleja como el PSII RC, compuesto de varios polipéptidos y múltiples cromóforos. Condiciones más drásticas ocasionarían la desnaturalización irreversible del complejo. La desnaturalización por incubación controlada con TX-100 ha permitido distinguir selectivamente bandas espectrales adscritas a pigmentos específicos y así, caracterizar selectivamente sus propiedades espectroscópicas y funcionales. Esta metodología podría, en principio, ser aplicada a cualquier cromoproteína de membrana.

CONCLUSIONES

A pesar de que existían varios métodos de purificación de OEC de cianobacterias descritos, ha sido necesario la puesta a punto de un nuevo método. Los métodos publicados no dieron resultados totalmente satisfactorios para los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral. Este nuevo método se basa esencialmente en la solubilización con el detergente LDAO, ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y cromatografía de intercambio iónico en columna de gel TSK Toyopearl DEAE 650s.

La presencia del inhibidor de proteasas PMFS en todas las disoluciones usadas durante el proceso de purificación es fundamental para obtener un OEC de calidad. Las cianobacterias objeto de este estudio parecen tener una alta actividad proteolítica.

El OEC obtenido y descrito en Resultados es de gran pureza, como se desprende de sus propiedades espectrales, contenido en pigmentos y análisis de péptidos.

A partir de este OEC se ha obtenido una preparación del centro de reacción del fotosistema II de la cianobacteria *P. laminosum* de gran calidad, que contrasta con las descritas por otros autores en cuanto a actividad, contenido en péptidos y composición de pigmentos. En base a todos estos parámetros se puede afirmar que la preparación descrita en este trabajo es con diferencia la mejor preparación obtenida hasta el momento a partir de una cianobacteria.

Las características espectroscópicas del centro de reacción obtenido de *P. laminosum* son en general parecidas a las que presenta el centro de reacción de plantas superiores, aunque la banda de absorción a 677 nm no aparece en éste último caso.

La actividad del centro de reacción descrito en este trabajo es aproximadamente un 25% más activo que el aislado de plantas superiores. Este resultado contradice conclusiones de otros laboratorios que han propuesto que la actividad del centro de reacción de cianobacterias es la mitad que en plantas.

El proceso de separación de cargas parece tener lugar en el orden de algunos picosegundos, como se desprende de los tiempos de vida de las cinéticas de fluorescencia.

Utilizando los complejos OEC y PSII RC descritos hemos sido capaces de obtener por primera vez espectros de resonancia Raman excitando en la transición Q_y de los pigmentos dentro de los complejos. En el caso del PSII RC, no sólo se observaron las bandas procedentes de la Chl *a* sino que también fueron evidentes las correspondientes a

la Pheo *a*. La utilización de superficies metálicas activas en SERRS permitieron reducir suficientemente el rendimiento de la fluorescencia y, así, obtener espectros vibracionales de los pigmentos unidos a proteínas. Estos resultados abren las puertas a futuros estudios sobre los estados vibracionales que acompañan a la transición Q_y , la cual juega un papel fundamental en fotosíntesis.

Los métodos desarrollados para *P. laminosum* han sido aplicados con bastante éxito a otra cianobacteria, *Synechocystis*, que es muy interesante para estudios de biología molecular. Siguiendo los métodos descritos se podrá aislar el PSII RC de mutantes obtenidos por técnicas de biología molecular con potencial interés en estudios del PSII.

La cromatografía de exclusión resultó ser válida para repurificar el PSII RC, tanto de cianobacterias como de plantas superiores, en caso de que éste se obtenga contaminado a partir de la cromatografía de intercambio iónico. Aunque los picos de elución no se resuelven tan bien como en el caso de proteínas solubles, fue suficiente para obtener fracciones con distinta composición. En todos los casos ensayados, el pico principal correspondía a las fracciones más puras.

Mediante el uso controlado de determinados detergentes, se pueden conseguir desnaturalizaciones reversibles del centro de reacción del fotosistema II. Ello ha permitido la selección de bandas espectrales específicas, aunque *in vivo* estén solapadas con otras bandas espectrales. Esta metodología puede aplicarse, en principio, a cualquier cromoproteína de membrana y ha servido en nuestro caso concreto para caracterizar los efectos de la presencia o ausencia de P680 sobre la actividad y propiedades espectroscópicas del centro de reacción. Asimismo ha servido para concluir que el P680 es un dímero formado por dos monómeros entre los que tienen lugar interacciones excitónicas débiles.

BIBLIOGRAFIA

- Akabori, K., Tsukamoto, H., Tsukihara, J., Nagatsuka, T., Motokawa, O. & Toyoshima, Y. (1988) Desintegration and reconstitution of photosystem II reaction center core complex. I. Preparation and characterization of three different types of subcomplex. Biochim. Biophys. Acta **932**, 345-357.
- Akerlund, H.-E. & Jansson, C. (1981) Localization of a 34.000 and 23.000 Mr. polypeptide to the luminal side of the thylakoid membrane. FEBS Lett. **124**, 229-232.
- Albrecht, M. & Creighton, J.A. (1977) Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. J. Am. Chem. Soc. **99**, 5215-5217.
- Alfonso, M., Montoya, G., Cases, R., Rodríguez, R. & Picorel, R. (1994) Core antenna complexes, CP43 and CP47, of higher plant photosystem II. Spectral properties, pigment stoichiometry, and amino acid composition. Biochemistry **33**, 10494-10500.
- Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H. & Rees, D.C. (1987a) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: The protein subunits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 6162-6166.
- Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H. & Rees, D.C. (1987b) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: The cofactors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 5730-5734.
- Allen, J.F. (1992) How does protein phosphorylation regulate photosynthesis?. Trends in Biochem. Sci. **17**, 12-17.
- Anderson, B., Virgin, I. & Styring, S. (1990) Changes in the organization of PSII following light-induced D₁-protein degradation. Biochim. Biophys. Acta **1017**, 235-241.
- Andrés, C. (1995) Estabilización de la actividad fotosintética de evolución de oxígeno frente a la inactivación térmica. Tesis de Licenciatura, Universidad de Zaragoza.
- Arnon, D. I. (1949) Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidases in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. **24**, 1-15.
- Arnon, D.I. & Tang, G.M.S. (1988) Cytochrome *b*-559 and proton conductance in oxygenic photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 9524-9528.

- Arnon, D.I. & Barber, J. (1990) Photoreduction of NADP by isolation reaction centres of photosystem II: Requirement for plastocyanin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 5930-5934.
- Ashikawa, I., Miyata, A., Koike, H., Inoue, Y. & Koyama, Y. (1986) Biochemistry **25**, 6154-6160.
- Aured, M., Moliner, E., Alfonso, M., Yruela, I., Toon, S.P., Seibert, M. & Picorel, R. (1994) Pigment stoichiometry of the photosystem II reaction center from higher plants. Biochim. Biophys. Acta **1187**, 187-190.
- Aured, M. & Picorel, R. (1995) Isolation and preliminary characterization of a D₁/D₂/Cyt *b*-559 complex from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. In Photosynthesis: from light to biosphere, Mathis, P. (Ed.), vol. I pp 827-830. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Barbato, R., Race, H.L., Friso, G. & Barber, J. (1991) Chlorophyll levels in the pigment binding proteins of photosystem II. A study based on the chlorophyll to cytochrome ratio in different photosystem II preparations. FEBS Lett. **286**, 86-90.
- Barber, J., Chapman, D.J. & Telfer, A. (1987) Characterization of a PSII reaction centre isolated from the chloroplasts of *Pisum sativum*. FEBS Lett. **220**, 67-73.
- Barber, J. & De las Rivas, J. (1993) A functional model for the role of cytochrome *b*-559 in the protection against donor and acceptor side photoinhibition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 10942-10946.
- Barry, B.A. & Babcock, G.T. (1987) Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 7099-7103.
- Bassi, R., Hoyer-Hansen, G., Barbato, R., Giacometti, G.M. & Simpson, D.J. (1987) Chlorophyll-proteins of the photosystem II antenna system. J. Biol. Chem. **262**, 13333-13341.
- Bassi, R. (1990) Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae. Photochem. Photobiol. **52**, 1187-1206.
- Berthold, D.A., Babcock, G.T. & Yocum, C.F. (1981) A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. EPR and electron transport properties. FEBS Lett. **134**, 231-234.

- Bialek-Bylka, G.E., Tomo, T., Satoh, K. & Koyama, Y. (1995) 15-*cis*- β -carotene found in the reaction center of spinach photosystem II. FEBS Lett. **363**, 137-140.
- Binder, A., Tel-Or, E. & Avron, M. (1976) Eur. J. Biochem. **67**, 187-196.
- Birks, J.B. (1970) Photophysics of Aromatic Molecules. Wiley-Interscience.
- Booth, P.J., Crystall, B., Giorgi, L.B., Barber, J. Klug, D.R. & Porter, G. (1990) Thermodynamic properties of D₁-D₂-Cyt *b*-559 reaction centres investigated by time resolved fluorescence measurements. Biochim. Biophys. Acta **1016**, 141-152.
- Booth, P.J., Crystal, B., Ahamad, I., Barber, J., Porter, G. & Kug, D.R. (1991) Observation of multiple radical pair states in photosystem II reaction centres. Biochemistry **30**, 7573-7586.
- Bowes, J.M., Stewart, A.C. & Bendall, D.S. (1983) Purification of photosystem II particles from *Phormidium laminosum* using the detergent dodecyl- β -D-maltoside. Biochim. Biophys. Acta **725**, 210-219.
- Braun, P., Greenberg, B.M. & Scherz, A. (1990) D₁-D₂-Cyt *b*-559 complex from the aquatic plant *Spirodella oligorrhiza*: correlation between complex integrity, spectroscopic properties, photochemical activity and pigment composition. Biochemistry **29**, 10376-10387.
- Breton, J.-L., Martin, J., Mingus, A., Antonetti, A. & Orszag, A. (1986) Femtosecond spectroscopy of excitation transfer and initial charge separation in the reaction center of the photosynthetic bacterium *R. viridis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 5121-5125.
- Bricker, T.M., Odom, W.R. & Queirolo, C.B. (1988) Close association of the 33 kDa extrinsic protein with the apoprotein of CPa 1 photosystem II. FEBS Lett. **231**, 111-117.
- Bricker, T.M. (1990) The structure and function of CPaI and CPaII in photosystem II. Photosynth. Res. **24**, 1-13.
- Brock, T.D. (1967a) Life at high temperatures. Science **158**, 1012-019.
- Brock, T.D. (1967b) Relationship between standing crop and primary productivity along a hot spring thermal gradient. Ecology **48**, 566-571.

- Brudvig, G., Beck, W. & Paula, J.D. (1989) Mechanism of photosynthetic water oxidation. Ann. Rev. Biophys. Biochem. **18**, 25-46.
- Bryant, D.A., de Lorimier, R., Lambert, D.H., Dubbs, J.M., Stirewalt, V.L., Stevens, S.E., Porter, R.D., Tam, J. & Jay, E. (1985) Molecular cloning and nucleotide sequence of the α and β subunits of allophycocyanin from the cyanelle genome of *Cyanophora paradoxa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 3242-3246.
- Budil, D.E., Gast, P., Chang, C.H., Schiffer, M. & Norris, J. (1987) The charge separation in bacterial photosynthetic reaction centers. J. Ann. Rev. Phys. Chem. **38**, 561-583.
- Burnap, L.R. & Sherman, L.A. (1991) Deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC6803 indicates that the Mn-stabilizing protein of photosystem II is not essential for O₂ evolution. Biochemistry **30**, 440-446.
- Buser, C.A., Diner, B.A. & Brudvig, G.W. (1992) Reevaluation of the stoichiometry of cytochrome *b*-559 in photosystem II and thylakoid membranes. Biochemistry **31**, 11441-11448.
- Butler, P.J.G. & Külbrandt, W. (1988) Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex from chloroplast membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 3797-3801.
- Camm, E.T. & Green, B.R. (1980) Fractionation of thylakoid membranes with the nonionic detergent octyl- β -D-glucopyranoside. Plant Physiol. **66**, 428-432.
- Camm, E.T. & Green, B.R. (1989) The chlorophyll *a/b* complex, CP29, is associated with the photosystem II reaction center core. Biochim. Biophys. Acta **974**, 180-184.
- Carpenter, S.D., Charite, J., Eggers, B. & Vermaas, W. (1989) Characterization of site-directed and hybrid *psbC* mutants of *Synechocystis* 6803. In Current Research in Photosynthesis, Baltcheffsky, M. (Ed.), pp 359-363. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Castenholz, R.W. (1970) Schweiz. Z. Hydrol. **32**, 538-551.
- Castenholz, R.W. & Waterbury, J.B. (1989) Oxygen photosynthetic bacteria (sect. 19), Group I. Cyanobacteria. In Bergey's Manual of systematic bacteriology, Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfenning, N. & Holt, J.G. (Eds.), vol. 3, pp 1710-1728. Williams & Wilkins Co, Baltimore.

Castenholz, R.W. (1992) Species usage, concept, and evolution in the cyanobacteria (blue-green algae). J. Phycol. **28**, 737-745.

Chang, H.C., Jankowiak, R., Reddy, N.R.S., Yocum, C.F., Picorel, R., Alfonso, M., Seibert, M. & Small, G.J. (1994) Exciton level structure and dynamics in the CP47 antenna complex of photosystem II. J. Phys. Chem. **98**, 7717-7724.

Chapman, D.J., Gounaris, K. & Barber, J. (1988) Electron transport properties of the isolated D1-D2-Cyt *b*-559 photosystem II reaction center. Biochim. Biophys. Acta **933**, 423-433.

Chisholm, D. & Williams, J.G.K. (1988) Nucleotide sequenc of *psbC*, the gene encoding the CP43 protein from spinach. In Light Energy Transduction in Photosynthesis: higher plant and bacterial models, Stevens, S.E. and Bryant, D.A. (Eds.), pp 327-331. Rockill, Mayland, American Society of Plant Physiologists.

Chong, H.C., El-Kabani, O., Tiede, D., Norris, J. & Schieffer, M. (1991) Structure of the membrane bound protein photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. Biochemistry **30**, 5352-5360.

Chumanov, G., Picorel, R., Toon, S., Seibert, M. & Cotton, T.M. (1993) Photochem. Photobiol. **58**, 757-780.

Clayton, R.K. (1965) Reaction centers of photosynthetic bacteria. Science **149**, 1346-1347.

Cogdell, R.J. & Frank, H.A. (1987) How carotenoids function in photosynthetic bacteria. Biochim. Biophys Acta **895**, 63-79.

Coleman, E.J. & Govindjee (1987) A model for the mechanism of chloride activation of oxygen evolution in photosystem II. Photosynth. Res. **13**, 199-223.

Coleman, W.J. & Youvan, D.C. (1990) Spectroscopic analysis of genetically modified photosynthetic reaction centers. Ann. Rev. Biophys. Chem. **19**, 333-367.

Davis, M.S., Forman, A. & Fajer, J. (1979) Ligated chlorophyll cation radicals: Their function in photosystem II of plant photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4170-4174.



- Davis, R.C., Ditson, S.L., Fentiman, A.F. & Pearlstein, R.M. (1981) Reversible wavelenght shifts of chloropyll induced by a point charge. J. Am. Chem. Soc. 103, 6823-6826.
- Debus, R.J., Feher, G. & Okamura, M.Y. (1986) Iron depleted reaction centers from *Rb. sphaeroides* R-26: characterization and reconstitution with Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} . Biochemistry 25, 2276-2287.
- Debus, R.J., Barry, B.A., Sithole, I., Babcock, G.T. & McIntosh, L. (1988a) Directed mutagenesis indicates that the donor to P680^+ in PSII is tyrosine-161 of the D_1 polypeptide. Biochemistry 27, 9071-9074.
- Debus, R.J., Barry, B.A., Babcock, G.T. & McIntosh, L. (1988b) Site-directed mutagenesis identifies a Tyr radical involved in the photosynthetic oxygen-envolving system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 427-430.
- Deisenhofer, J. Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodopseudomonas viridis* at 3Å resolution. Nature 318, 618-623.
- Deisenhofer, J. & Michel, H. (1989) The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis*. EMBO J. 8, 2149-2169.
- Dekker, J.P., Boekema, E.J., Witt, H.T. & Rögner, M. (1988) Refined purification and further characterization of oxygen-evolving and Tris-treated photosystem II particles from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus sp.* Biochim. Biophys. Acta 936, 307-318.
- Dekker, J.P., Bowlby, N.R. & Yocum, C.F. (1989) Chlorophyll and cytochrome *b*-559 content of the photochemical reaction center of photosystem II. FEBS Lett. 254, 150-154.
- Dekker, J.P., Betts, S.D., Yocum, C.F. & Boekema, E.J. (1990) Characterization by electron microscopy of isolated particles and two-dimensinal crystals of the CP47/ D_1 / D_2 /Cyt *b*-559 complex of photosystem II. Biochemistry 29, 3220-3225.
- den Blanken, H.J., Hoff, A.J., Jongenelis, A.P.J.M. & Diner, B.A. (1983) High-resolution triplet-minus-singlet absorbance difference spectrum of PSII particles. FEBS Lett. 157, 21-27.

- de Vasconcelos, L. & Fay, P. (1974) Nitrogen metabolism and ultrastructure in *Anabaena cylindrica*. I. The effect of nitrogen starvation. Arch. Microbiol. **96**, 271-279.
- de Vitry, C., Wollman, F.A. & Delepelaire, P. (1984) Function of polypeptides of the photosystem II RC in *Chlamydomonas reinhardtii*. Location of the primary reactants. Biochim. Biophys. Acta **767**, 415-422.
- de Vitry, C., Diner, B.A. & Popot, J.L. (1991) Photosystem II particles from *Chlamydomonas reinhardtii*. Purification, molecular weight, small subunit composition and protein phosphorylation. J. Biol. Chem. **266**, 16614-16621.
- Dismukes, G.C. (1988) The spectroscopically derived structure of the manganese site for photosynthetic water oxidation and a proposal for the protein-binding sites for calcium and manganese. Chemica Scripta **28a**, 99-104.
- Dunahay, T.G. & Staehelin, L.A. (1986) Isolation and characterization of a new minor chlorophyll *a/b* protein complex (CP24) from spinach. Plant Physiol. **80**, 429-434.
- Dunsmuir, P.S., Smith, M. & Bedbrook, J. (1983) The major chl *a/b* binding protein of petunia is composed of several polypeptides encoded by a number of distinct nuclear genes. J. Mol. Appl. Genet. **2**, 285-300.
- Duysens, L.N.M., Ames, J. & Kamp, B.M. (1961) Two photochemical systems in photosynthesis. Nature **190**, 510-511.
- Dzelzkans, V.A. & Bogorad, L. (1989) Spectral properties and composition of reaction center and ancillary polypeptide complexes of photosystem II deficient mutant of *Synechocystis* 6803. Plant Physiol. **90**, 617-623.
- El-Shintinawy, F., Xu, C. & Govindjee (1990) A dual bicarbonate-reversible formate effect in *Chlamydomonas* cells. J. Plant Physiol. **136**, 421-428.
- Enami, I., Kaneko, M., Kitamura, N., Koike, H., Sonoike, K., Inoue, Y. & Katoh, S. (1991) Total immobilization of the extrinsic 33 kDa protein in spinach PSII membrane preparations. Protein stoichiometry and stabilization of oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta **1060**, 224-229.

- Fay, P. (1981) Photosynthetic microorganisms. In Nitrogen fixation, Broughton, W.J. (Ed.) vol. I, pp 1-29. Clarendon Press, Oxford.
- Fleischmann, M., Hendra, P.F. & McQuillan, A.J. (1974) Chem. Phys. Letter **26**, 123.
- Fleming, G., Martin, R. & Breton, J.-L. (1988) Rates of primary electron transfer in photosynthetic reaction centres and their mechanism implications. Nature **333**, 90-92.
- Förster, T. (1965) Delocalized excitation and excitation transfer. Academic Press, NY.
- Frei, R., Eckert, H.J., Renger, G. & Bachofen, R. (1988) Preparation and characterization of photosystem II particles from a thermophilic cyanobacterium. Biochim. Biophys. Acta **932**, 258-267.
- Garewall, H.S. & Wassermann A.R. (1974) Triton X-100-4M urea as an extraction medium for membrane proteins. Purification of chloroplast cytochrome *b*-559. Biochemistry **13**, 4063-7.
- Ghanotakis, D.F., de Paula, J.C., Demetriou, D.M., Bowlby, N.R., Petersen, J., Babcock, G.T. & Yocum, C.F. (1989) Isolation and characterization of the 47 kDa protein and de D₁/D₂/Cyt *b*-559 complex. Biochim. Biophys. Acta **974**, 44-53.
- Ghanotakis, D.F. & Yocum C.F. (1990) Photosystem II and the oxygen-evolving complex. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **41**, 255-276.
- Giorgi, L., Nixon, P., Merry, S., Joseph, D.M., Durrant, J., de las Rivas., Barber, J., Porter, G. & Klug, D. (1996) Comparison of primary charge separation in the photosystem II reaction center complex isolated from wild-type and D₁-130 mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. J. Biol. Chem. **25**, 2093-2101.
- Glazer, A.N. (1985) Light harvesting by phycobilisomes. Ann. Rev. Biophys. Chem. **14**, 47-77.
- Glazer, A.N. (1987) Phycobilisomes: assembly and attachment in the cyanobacteria. In Elsevier Biomedical, P. Fay and C. Van Baalen (Eds.), pp 69-94, Elsevier, Amsterdam.
- Gounaris, K., Chapman, D.J. & Barber, J. (1989) Isolation and characterization of a D₁-D₂-Cyt *b*-559 complex from *Synechocystis* 6803. Biochim. Biophys. Acta **973**, 296-301

- Gounaris, K., Chapman, D.J., Booth, P., Crystall, B., Giorgi, L.B., Klug, D.R., Porter, G. & Barber, J. (1990) Comparison of the D₁/D₂/Cyt *b*-559 reaction center complex of photosystem two isolated by different methods. FEBS Lett. **265**, 88-92.
- Govindjee & van Rensen, J.J.S. (1978) Bicarbonate effects on the electron flow in isolated broken chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta **505**, 183-213.
- Govindjee (1982) Photosynthesis. Academic Press, NY.
- Green, B.R. & Durnford, D.G. (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **47**, 685-714.
- Greenbaum, E., Lee, J.W., Tevault, C.V., Bankinship, S.L. & Mets, J. (1995) Nature **376**, 438-441.
- Greenfield, N. & Fasman, G.D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evolution of protein conformation. Biochemistry **8**, 4108-4116.
- Hall, D.O. & Rao, K.K. (1981) Photosynthesis, 3rd edition, Edward Arnold (Ed.).
- Hansson, Ö., Duranton, J. & Mathis, P. (1988) Yield and lifetime of the primary radical pair in preparations of photosystem II with different antenna size. Biochim. Biophys. Acta **932**, 91-96.
- Hansson, Ö. & Wydrzynski, T. (1990) Current perceptions of photosystem II. Photosynth. Res. **23**, 131-162.
- Hardie, L.P., Balkwill, D.L. & Stevens, S.E. (1983) Effects of iron starvation on the ultrastructure of the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. Appl. Environ. Microbiol. **45**, 1007-1017.
- He, W.Z., Newell, W.R., Haris, P.I., Chapman, D. & Barber, J. (1991) Protein secondary structure of the isolated photosystem II reaction center and conformational changes studied by Fourier transform infrared spectroscopy. Biochemistry **30**, 4552-4559.
- Hipkins, M.F. & Baker, N. (1984) Photosynthesis Energy Transduction. A Practical Approach. Oxford University Press.

- Hirano, M., Satoh, K. & Katoh, S. (1981) The effect on photosynthetic electron transport of temperature-dependent changes in the fluidity of the thylakoid membrane in a thermophilic blue-green algae. Biochim. Biophys. Acta **635**, 476-487.
- Holzapfel, W., Finkle, U., Kaiser, W., Oesterhelt, D. & Scheer, H. (1990) Initial electron transfer in the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 5168-5172.
- Holzwarth, A.R. (1991) Ultrafast processes in photosynthetic systems. In Chlorophylls, Scheer, H. (Ed.), pp 1125-1151. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ichimura, T., Miyairi, S., Satoh, K. & Katoh, S. (1992) Preparation and characterization of heat-stable and very active oxygen-evolving photosystem II particles from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. Plant Cell Physiol. **33**, 299-305.
- Ikeuchi, M. & Inoue, Y. (1988) A new photosystem II reaction center component (4.8 kDa protein) encoded by the chloroplast genome. FEBS Lett. **241**, 99-104.
- Ikeuchi, M., Koike, H. & Inoue, Y. (1989) Identification of *psbI* and *psbL* gene products in cyanobacterial photosystem II reaction center preparation. FEBS Lett. **251**, 155-160.
- Kan, K.S. & Thornber, J.P. (1976) The light-harvesting chlorophyll a/b protein complex of *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. **57**, 47-52.
- Ke, B., Inoue, H., Babcock, G.T., Fang, Z. & Doland, E. (1982) Optical and EPR characterizations of oxygen-evolving photosystem II subchloroplast fragments isolated from the thermophilic blue-green alga *Phormidium laminosum*. Biochim. Biophys. Acta **682**, 297-306.
- Kirilovsky, D.L., Boussac, A., Mieghem, F., Ducruet, J.M., Sétif, P., Yu, J., Vermaas, W. & Rutherford, A.W. (1992) Oxygen-evolving photosystem II preparation from wild type and photosystem II mutants of *Synechocystis* sp. PCC6803. Biochemistry **31**, 2099-2107.
- Kirmaier, C., Holten, D., Debus, R.J., Feher, G. & Okamura, M.Y. (1986) Primary photochemistry of iron-depleted and Zn reconstituted reaction centers from *R. sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 6407-6411.

Kirmaier, C. & Holten, D. (1987) Primary photochemistry of reaction centres from the photosynthetic purple bacteria. Photosynth. Res. **13**, 225-260.

Klimov, V.V., Allakhverdiev, S.I., Feyziev, Ya. M. & Baranov, S.V. (1995a) Bicarbonate requirement for the donor side of PSII. FEBS Lett. **363**, 251-255.

Klimov, V.V., Allakhverdiev, S.I., Baranov, S.V. & Feyziev, Ya. M. (1995b) Effects of bicarbonate and formate on the donor side of PSII. Photosynth. Res. **46**, 219-225.

Knox, R.S. (1977) Photosynthetic efficiency and exciton transfer and trapping. Topics in Photosynthesis. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Kobayashi, M., Maeda, H., Watanabe, T., Nakane, H. & Satoh, K. (1990) Chlorophyll a and β -carotene content in the D₁-D₂-Cyt b-559 reaction center complex from spinach. FEBS Lett. **260**, 138-140.

Koike, H. & Inoue, Y. (1985) Properties of a peripheral 34 kDa protein in *Synechocystis vulcanus* photosystem II particles. Its exchangeability with spinach 33 kDa protein in reconstitution of O₂ evolution. Biochim. Biophys. Acta **807**, 64-73.

Koike, H., Hanssum, B., Inoue, Y. & Renger, G. (1987) Temperature dependence of S-state transition in a thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus vulcanus* Copeland measured by absorption changes in the ultraviolet region. Biochim. Biophys. Acta **893**, 524-533.

Koike, H., Mamada, K., Ikeuchi, M. & Inoue, Y. (1989) Low-molecular-mass proteins in cyanobacterial photosystem II: identification of *psbH* and *psbK* gene products by N-terminal sequencing. FEBS Lett. **244**, 391-396.

Konermann, L., Yruela, I. & Holzwarth, A.R. (1996) Pigment assignment in the absorption spectrum of the photosystem II reaction center by site-selection fluorescence spectroscopy. Biochemistry (en prensa).

Krauss, N., Hinrichs, W., Witt, I., Fromme, P., Pritzkow, W., Dauter, Z., Betzel, C., Wilson, K.S., Witt, H.T. & Saenger, W. (1993) Three-dimensional structure of the system I of photosynthesis at 6 Å resolution. Nature **361**, 326-331.

- Külbrandt, W. & Wang, D.N. (1991) Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. Nature **350**, 130-134.
- Külbrandt, W. (1992) Two-dimensional crystallization of membrane proteins. Q. Rev. Biophys. **25**, 1-49.
- Külbrandt, W., Wang, D.N. & Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. Nature **367**, 614-621.
- Kulkarni, R.D., Mueller, V.W. & Golden, S.S. (1993) Nucleotide sequence of *psbB* from *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. Biochim. Biophys. Acta **1173**, 329-332.
- Larsson, U.K., Sundby, C. & Andersson, B. (1987) Characterization of two different subpopulations of spinach light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex (LHCII): polypeptide composition, phosphorylation pattern and association with photosystem II. Biochim. Biophys. Acta **894**, 59-68.
- MacDonald, G.M., Boerner, R.J., Everly, R.M., Cramer, W.A., Debus, R.J. & Barry, B.A. (1994). Biochemistry **33**, 4393-4400.
- Maggiora, L.L. & Maggiora, G.M. (1984) Protonated Schiff's base chlorophyll: A model for P700?. Photochem. Photobiol. **39**, 847-849.
- Mathis, P., Satoh, K. & Hansson, Ö. (1989) Kinetic evidence for the function of Z in isolated photosystem II reaction centers. FEBS Lett. **251**, 241-244.
- McTavish, H., Picorel, R. & Seibert, M. (1989) Stabilization of isolated photosystem II reaction center complex in the dark and in the light using polyethylene glycol and oxygen-scrubbing system. Plant Physiol. **89**, 452-456.
- Metz, J.G., Bricker, T.M. & Seibert, M. (1985) The azido [¹⁴C]atrazine photoaffinity technique labels a 34 kDa protein in *Scenedesmus* which functions on the oxidizing side of photosystem II. FEBS Lett. **185**, 181-195.
- Metz, J.G., Pakrasi, H.R., Seibert, M. & Arntzen, C.J. (1986) Evidence for a dual function of the herbicide-binding D₁ protein in photosystem II. FEBS Lett. **205**, 269-294.

- Metz, J.G., Nixon, P.J., Rögner, M., Brudvig, G.W. & Diner, B.A. (1989) Directed alteration of the D₁ polypeptide of the photosystem II: Evidence that Tyr 161 is the redox component, Z, connecting the oxygen evolving complex to the primary electron donor, P680. Biochemistry **28**, 6960-6969.
- Michel, H. & Deisenhofer, J. (1988) Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II. Biochemistry **27**, 1-7.
- Miller, L.S. & Holt, S.C. (1977) Effect of carbon dioxide on pigment and membrane content in *Synechocystis lividus*. Arch. Microbiol. **115**, 185-198.
- Mimuro, M., Yamazaki, I., Itoh, S., Tamai, N. & Satoh, K. (1988) Dynamic fluorescence properties of D₁-D₂-Cyt *b*-559 complex isolated from spinach chloroplasts. Analysis by means of the time-resolved fluorescence spectra in picosecond time range. Biochim. Biophys. Acta **933**, 478-486.
- Miyao, M. & Murata, N. (1984) Effect of urea on photosystem II particles. Evidence for an essential role of the 33 kDa polypeptide in photosynthetic oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta **765**, 253-257.
- Miyazaki, A., Shina, T., Toyoshima, Y., Gounaris, K. & Barber, J. (1989) Stoichiometry of cytochrome *b*-559 in photosystem II. Biochim. Biophys. Acta **975**, 142-147.
- Moëne-Loccoz, P., Robert, B. & Lutz, M. (1989) A resonance Raman characterization of the primary electron acceptor in photosystem II. Biochemistry **28**, 3641-3645.
- Montoya, G., Yruela, I. & Picorel, R. (1991) Pigment stoichiometry of a newly isolated D₁-D₂-Cyt *b*-559 complex from the higher plant *Beta vulgaris* L. FEBS Lett. **283**, 255-258.
- Montoya, G., Cases, R., Yruela, I. & Picorel, R. (1993) Spectroscopic characterization of two forms of the D₁-D₂-Cyt *b*-559 complex from sugar beet. Photochem. Photobiol. **58**, 724-729.
- Montoya, G. (1993) Caracterización del centro de reacción del fotosistema II. Estudio de una proteína de membrana. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza.

- Montoya, G., Cases, R., Rodríguez, R., Aured, M. & Picorel, R. (1994) Detergent-induced reversible denaturation of the photosystem II reaction center: implications for pigment-protein interactions. Biochemistry **33**, 11798-11804.
- Morschel, E. & Schatz, G.H (1987) Correlation of photosystem II complexes with extrinsic freeze-fracture particles of thylakoids of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Planta **172**, 145-154.
- Motoki, A., Miura, T., Shiazu, T., Kanai, S., Hirano, M. & Katoh, S. (1992) Characterization of the manganese-stabilizing protein from *Synechococcus elongatus*. In Research in Photosynthesis, Murata, N. (Ed.), vol 2, pp 413-416. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Nanba, O. & Satoh, K. (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D₁ and D₂ polypeptides and cytochrome *b*-559. Proc. Natl. Sci. USA **84**, 109-112.
- Newell, W.R., van Amerongen, H., Barber, J. & van Grondelle, R. (1991) Spectroscopy characterization of the reaction centre of photosystem II using polarized light: Evidence for β -carotene excitons in PSII reaction centres. Biochim. Biophys. Acta **1057**, 232-238.
- Nilsson, F., Gounaris, K., Styring, S. & Andersson, B. (1992) Isolation and characterization of oxygen-evolving photosystem II membranes from the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. Biochim. Biophys. Acta **1100**, 251-258.
- Ohno, T., Sayoh, K. & Katoh, S. (1986) Chemical composition of purified oxygen-evolving complexes from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. Biochim. Biophys. Acta **852**, 1-8.
- Oren-Shamir, M., Sai, P.S., Edelman, M. & Scherz, A. (1995) Isolation and spectroscopic characterization of a plantlike photosystem II reaction center from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. Biochemistry **34**, 5523-5526.
- Ortega, J.M., Hervás, M. & Losada, M. (1988) Eur. J. Biochem. **171**, 449-455.
- Ortega, J.M., Hervás, M., De la Rosa, M.A. & Losada, M. (1995) In Photosynthesis: from light to biosphere, P. Mathis (Ed.), vol IV, pp 251-254. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Pakrasi, H.B., Riethman, H.C. & Sherman, L.A. (1985) Organization of pigment protein in the photosystem II complex of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 6903-6907.

Parson, W.W. & Holten, D. (1986) Physical determinants of charge separation process. In Enciclopedia of Plant Physiology, Staehelin, L.A. and Arntzen, C.J. (Eds.), vol. III, pp 338-343. Springer-Verlag, Heidelberg.

Peterson, J., Dekker, J.P., Bowlby, N.R., Ghanotakis, D.F., Yocum, C.F. & Babcock, G.T. (1990) Biochemistry **29**, 3226-3231.

Picorel, R., Holt, R.E., Heald, R., Cotton, T.M. & Seibert, M. (1991) Stability of isolated bacterial and photosystem II reaction center complexes on Ag electrode surfaces. A surface-enhanced resonance Raman study. J. Am. Chem. Soc. **113**, 2839-2843.

Picorel, R., Williamson, D.L., Yruela, I. & Seibert, M. (1994) The state of the iron in the oxygen-evolving core complex of the cyanobacterium *Phormidium laminosum*: Mössbauer spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta **1184**, 171-177.

Pueyo, J.J., Moliner, E., Seibert, M. & Picorel, R. (1995) Pigment content of D₁-D₂-Cyt *b*-559 reaction center preparations after removal of CP47 contaminations: an immunological study. Biochemistry **34**, 15214-15218.

Ritter, S., Komenda, J., Setlíková, E., Setlík, J. & Welte, W. (1992) Immobilized metal affinity chromatography for the separation of photosystem I and II from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. J. of Chromatography **625**, 21-31.

Roelofs, T.A., Gilgert, M., Shuvalov, V.A. & Holzwarth, A.R. (1991) Picosecond fluorescence kinetics of the D₁-D₂-Cyt *b*-559 photosystem II reaction center complex. Energy transfer and primary charge separation processes. Biochim. Biophys. Acta **1060**, 237-244.

Rögner, M., Nixon, P.J. & Diner, B.A. (1990) Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complex from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. J. Biol. Chem. **265**, 6189-6196.

Ruffle, S.V., Donnelly, D., Blundell, T.L. & Nugent, J.H.A. (1992) A three-dimensional model of the photosystem II reaction center of *Pisum sativum*. Photosynth. Res. **34**, 287-300.

- Rutherford, A.W. (1986) How close is the analogy between reaction centre of PSII and that of the purple bacteria ? Biochem. Soc. Trans. 14, 15-17.
- Satoh, K., Ohno, T. & Katoh, S. (1985) Inhibition by ethylenediamine tetraacetate and restoration by Mn^{2+} and Ca^{2+} of oxygen-evolving activity in photosystem II preparation from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. FEBS Lett. 180, 326-330.
- Sauer, K. (1986) Photosynthetic light reactions. Physical aspects. In Enciclopedia of Plant Physiology, Staehelin, L.A. and Arntzen C.J. (Eds.), vol.III, pp 85-97. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Schatz, G.H. & Witt, H.T. (1984) Extraction and characterization of oxygen-evolving photosystem II complexes from a thermophilic cyanobacterium *Synechococcus spec.* Photochem. and Photobiophys. 7, 1-14.
- Scherz, A. & Parson, W.W. (1984) Exciton interactions in dimers of bacteriochlorophylls and related molecules. Biochim. Biophys. Acta 766, 666-678.
- Schirmer, T., Bode, W., Huber, R., Sidler, W. & Zuber, H. (1985) X-ray crystallographic structure of the light-harvesting biliprotein c-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* and its resemblance to globin structures. J. Mol. Biol. 184, 257-277.
- Schirmer, T., Bode, W. & Huber, R. (1987) Refined three-dimensional structures of two cyanobacterial c-phycocyanins at 2.1 and 2.5 Å resolution. A common principle of phycobilin-protein interaction. J. Mol. Biol. 196, 677-695.
- Seibert, M., Picorel, R., Rubin, A.B. & Connolly, J.S. (1988) Spectral, photophysical, and stability properties of isolated photosystem II reaction center. Plant Physiol. 87, 303-306.
- Seibert, M., Tamura, N. & Inoue, Y. (1989) Lack of photoactivation capacity in *Scenedesmus obliquus* LF-1 results from loss of half the high-affinity manganese-binding site. Relationship to the unprocessed D₁ protein. Biochim. Biophys. Acta 974, 185-191.
- Seibert, M., Picorel, R., Kim, J.H. & Cotton, T.M. (1992) Surface-enhanced resonance Raman scattering spectroscopy of photosynthetic membranes and complexes. Meth. Enzymol. 123, 31-42.

Seibert, M. (1993) Biochemical, biophysical and structural characterization of the isolated photosystem II reaction center complex. In The Photosynthetic Reaction Center, Norris, J. & Deisenhofer, J. (Eds.) pp 319-356, Academic Press N.Y.

Setlíková, E., Ritter, S., Hienerwadel, R., Kopecký, J., Komenda, J., Welte, W. & Setlík I. (1995) Purification of a photosystem II reaction center from a thermophilic cyanobacterium using immobilized metal affinity chromatography. Photosynth. Res. **43**, 201-211.

Shen, G., Eaton-Rye, J.J. & Vermaas, W.F.J. (1993) Mutation in histidine residues in CP-47 leads to destabilization of photosystem II complex and to impairment of high energy transfer. Biochemistry **32**, 5109-5115.

Shuvalov, V.A., Heber, U. & Schreiber, U. (1989) Low temperature photochemistry and spectral properties of a photosystem II reaction center complex containing the proteins D₁ and D₂ and two hemes of Cyt *b*-559. FEBS Lett. **258**, 27-31.

Smith, O. & Howe, C.J. (1993) The distribution of photosystem I and photosystem II polypeptides between the cytoplasmic and thylakoid membranes of cyanobacteria. FEMS Lett. **110**, 341-348.

Spangorf, M. & Andersson, B. (1989) Subpopulations of the main chlorophyll a/b light-harvesting complex of photosystem II isolation and biochemical characterization. Biochim. Biophys. Acta **977**, 163-170.

Stamatakis, C. & Papageorgiou, G.C. (1993) Stabilization of photosystem II particles isolated from the thermophilic cyanobacterium *Phormidium laminosum* with glycinebetaine and glycerol. Biochim. Biophys. Acta **1183**, 333-338.

Stanier, R.Y. & Cohen-Bazire, G. (1977) Phototrophic procaryotes: the cyanobacteria. Ann. Rev. Microbiol. **31**, 225-274.

Stevens, S.E., Paone, D.A.M. & Balkwill, D.L. (1981) Accumulation of cyanophycin granules as a result of phosphate limitation in *Agmenellum quadruplicatum*. Plant Physiol. **67**, 716-719.

Stewart, A.C. & Bendall, D.S. (1979) Preparation of an active, oxygen-evolving photosystem II particle from a blue-green alga. FEBS Lett. **107**, 308-312.

- Stewart, A.C. & Bendall, D.S. (1980) Photosynthetic electron transport in a cell-free preparation from the thermophilic blue-green alga *Phormidium laminosum*. Biochem J. **188**, 351-361.
- Stewart, A.C. & Bendall, D.S. (1981) Properties of oxygen-evolving photosystem II particles from *Phormidium laminosum*, a thermophilic blue-green alga. Biochem J. **194**, 877-887.
- Stewart A.C., Ljungberg, U., Akerlund, H. & Andersson, B. (1985) Studies on the polypeptide composition of the cyanobacterial oxygen-evolving complex. Biochim. Biophys. Acta **808**, 353-362.
- Svensson, B., Vass, I., Cedregren, E. & Styring, S. (1990) Structure of donor side components in photosystem II predicted by computer modelling. EMBO J. **9**, 2051-2059.
- Tamura, N., Ikeuchi, M. & Inoue, Y. (1989) Assignment of His residues in D₁ protein as possible ligands for functional manganese in photosynthetic water-oxidizing complex. Biochim. Biophys. Acta **973**, 281-289.
- Tang, D., Jankowiak, R., Seibert, M., Yocum, C.F. & Small, G.J. (1990) Excited-state structure and energy-transfer dynamics of two different preparations of the reaction center of photosystem II: A hole-burning study. Chem. Phys. Lett. **94**, 6519-6522.
- Tang, X-S. & Diner, B.A. (1994) Biochemistry **33**, 4594-4603.
- Telfer, A., Barber, J. & Evans, M.C.W. (1988) Oxidation-reduction potential dependence of reaction centre triplet formation in the isolated D₁-D₂-Cyt *b*-559 complex. FEBS Lett. **232**, 209-213.
- Thayer, S.S. & Björkman, O. (1990) Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. Photosynth. Res. **23**, 331-343.
- Thornber, J. (1986) Biochemical characterization and structure of pigments-proteins of photosynthetic organism. In Enciclopedia of Plant Physiology, Staehelin, L.A. & Arntzen, C.J. (Eds.), vol. 19, pp 98-142. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Trebst, A. (1987) Three-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction centre polypeptides of photosystem II. Z. Naturforsch **42c**, 742-750.

Trench, R.K. (1982) Physiology, biochemistry, and ultrastructure of cyanelle. In Progress in Physiological Research, Round, F.E. & Chapman, D.J. (Eds.), vol. I, pp 257-288 Elsevier Biomedical, Amsterdam, The Netherlands.

van Dorssen, R.J., Breton, T., Plitjer, J.J., Satoh, K., van Gorkom, H.J. & Ames, J. (1987) Spectroscopic properties of the reaction center and the 47 kDa chlorophyll protein of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta 893, 267-274.

van Gorkom, H.J., Tamminga, J.J. & Haveman, J. (1974) Primary reactions, plastoquinone and fluorescence yield in subchloroplast particles prepared with deoxycholate. Biochim. Biophys. Acta 347, 417-438.

van Kan, P.J.M., Otte, S.M.C., Kleherenbriak, F.A.M., Nieveen, M.C., Aartsma, T.J. & van Gorkom, H.J. (1990) Time resolved spectroscopy at 10K of the photosystem II reaction center, deconvolution of the red absorption band. Biochim. Biophys. Acta 1020, 146-152.

van Leeuwen, P.J., Nieveen, M.C., van de Meent, E.J., Dekker, J.P. & van Gorkom, H.J. (1991) Rapid and simple isolation of pure photosystem II core and reaction center particles from spinach. Photosynth. Res. 28, 149-153.

Vermaas, W.F.J., Williams, J.G.K. & Arntzen, C.J. (1987) Sequencing and modification of *psbB*, the gene encoding the CP47 protein of photosystem II, in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. Plant Mol. Biol. 8, 317-326.

Vermaas, W.F.J., Ikeuchi, M. & Inoue, Y. (1988a) Protein composition of the photosystem II core complex in genetically engineered mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. Plant Mol. Biol. 8, 317-326.

Vermaas, W.F.J., Rutherford, A.W. & Hansson, Ö. (1988b) Site-directed mutagenesis in PSII of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803: Donor D is a Tyr residue in the D₂ protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8477-8481.

Vernon, L.P. (1960) Characterization of the spectroscopical properties of photosynthetic pigments. Anal. Chem. 32, 1144-1150.

- Ward, B., Chang, C.K. & Young, R. (1984) Spectral shifts upon reversible modifications of CHO periphenol substituents porphyrin, chlorin and bacteriochlorin. A phenomenological explanation for the red shift of protonated Schiff base. J. Am. Chem. Soc. 106, 3943-3950.
- Wasielewski, M.R., Johnson, D.G., Seibert, M. & Govindjee (1989) Determination of the primary charge separation rate in isolated photosystem II reaction centers with 500-fs time resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 524-528.
- Wendler, J. & Holzwarth, A.R. (1987) Biophys. J. 52, 717-728.
- Woodbury, N.W.T. & Parson, W.W. (1984) Nanosecond fluorescence from isolated photosynthetic reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Biochim. Biophys. Acta 767, 345-361.
- Xu, Q. & Bricker, T.M. (1993) Structural organization of proteins on the oxidizing side of photosystem II: two molecules of the 33 kDa, manganese-stabilizing protein per reaction center. J. Biol. Chem. 267, 25816-25821.
- Yamagishi, A. & Katoh, S. (1983) Two chlorophyll-binding subunits of the photosystem II reaction center complex isolated from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus sp.* Archiv. Biochem. Biophys. 225, 836-846.
- Yamagishi, A. & Katoh, S. (1985) Further characterization of the two photosystem II reaction center complex preparations from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus sp.* Biochim. Biophys. Acta 807, 74-80.
- Youvan, D.C. & Marrs, B.L. (1987) Molecular mechanisms of photosynthesis. Sci. Amer. 256, 42-48.
- Yruela, I., van Kan, P.J.M., Müller, M.G. & Holzwarth, A.R. (1994) Characterization of a D₁-D₂-Cyt *b*-559 complex containing 4 chlorophyll *a*/2 pheophytin *a* isolated with the use of MgSO₄. FEBS Lett. 339, 25-30.