

0429287
CB-429287000001

P-4-264
70-1993-1



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

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACION DEL CENTRO DE REACCION
DEL FOTOSISTEMA II. ESTUDIO DE UNA
PROTEINA DE MEMBRANA**



Memoria presentada por Guillermo Montoya Blanco, Licenciado en Ciencias, Sección Biológicas, para optar al grado de Doctor en Ciencias

R- 8867

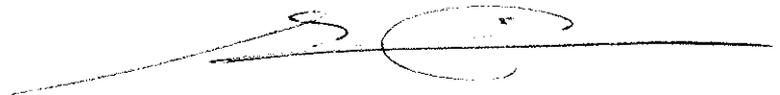
Portada. Esquema modelado por ordenador de las proteínas D1 y D2 del centro de reacción del fotosistema II de *Pisum sativum* a partir de las coordenadas cristalográficas del centro de reacción de *Rhodobacter sphaeroides*. Las α hélices de cada una de las proteínas son numeradas del 1 al 5, junto con los pigmentos y cofactores asociados (Ruffle et al., 1992).

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 "**Caracterización del centro de reacción del fotosistema II. Estudio de una proteína de membrana**", ha sido realizada por el licenciado **Guillermo Montoya Blanco** bajo su dirección y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Zaragoza, 29 Abril de 1993

A handwritten signature in black ink, consisting of a long horizontal line with a large, stylized loop on the right side and a smaller loop on the left side.

Fdo: Rafael Picorel Castaño

Dña. María Luisa Peleato, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral "**Caracterización del centro de reacción del fotosistema II. Estudio de una proteína de membrana**", ha sido realizada por el licenciado **Guillermo Montoya Blanco** bajo su tutela y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Zaragoza, Abril de 1993

A handwritten signature in black ink that reads "María Luisa Peleato". The signature is written in a cursive style and is underlined with a long, sweeping horizontal stroke.

Fdo: María Luisa Peleato

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que de una u otra manera han contribuido a la realización del presente trabajo, y especialmente:

Al Dr. Rafael Picorel Castaño, Director de esta Tesis Doctoral, por su profesionalidad a la hora de dirigir este trabajo y por haberme dado la oportunidad de enriquecer mi formación conociendo otros laboratorios y por haber estado dispuesto en todo momento a comentar, discutir y estimular mi trabajo.

A los Dres. Rafael Cases Andreu, Pablo J. Alonso del Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (CSIC-Universidad de Zaragoza) y a la Dra. Rosalía Rodríguez del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, siempre dispuestos a prestar su ayuda, y en cuyos laboratorios se han realizado algunos de los experimentos detallados en esta memoria.

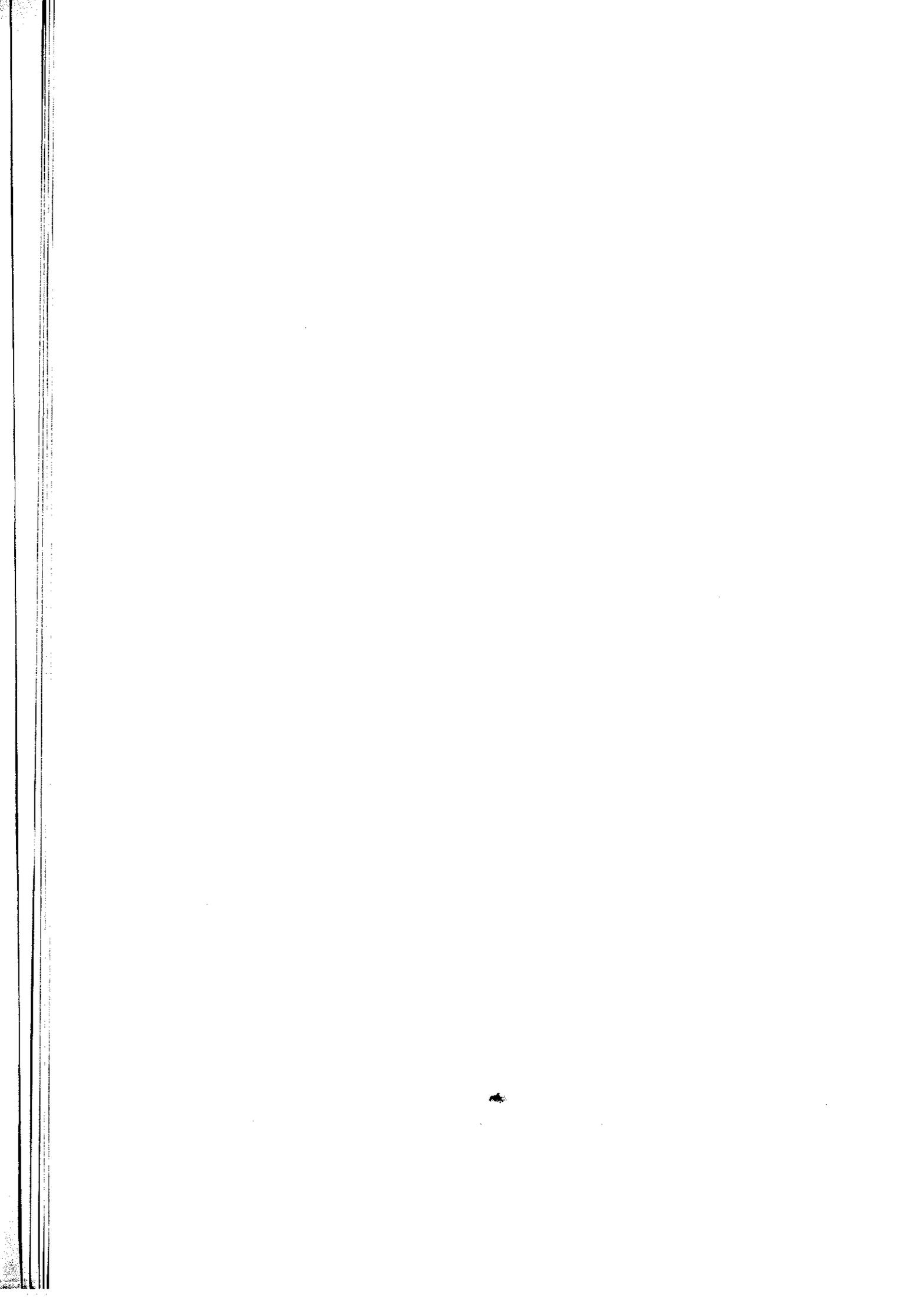
Al Dr. James Durrant del grupo de fotoquímica del Imperial College de Londres por ayudarme a entender el empleo del láser en fotoquímica.

A María Victoria Ramiro, por su siempre eficiente ayuda técnica y tener siempre a punto cualquier material biológico que he utilizado durante mi estancia en este centro.

A Marta Santamaría por haberme apoyado durante toda la realización de esta Tesis Doctoral y además haberme ayudado con la bibliografía de esta memoria.

A mis compañeros de laboratorio (y algunos de piso) Inmaculada Yruela, Iñaki Ortiz de Zarate, Miguel Alfonso, Kamel Gadour, Fernando Morán, Iñaki Iturbe-Ormaetxe y María Aured, por su ayuda en ciertas partes de este trabajo, y por los buenos ratos que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio.

**A mis padres, hermanas y a
Marta**



El único conocimiento absoluto que el hombre puede alcanzar es que la vida no tiene sentido.

-León Tolstói-

ABREVIATURAS

A, O.D.	Absorbancia
ATP	Trifosfato de adenosina
Å	Angstrong
ADMR	Resonancia magnética detectada por cambios de absorbancia
Al	Absorbancia de luz circularmente polarizada a la izquierda
Ar	Absorbancia de luz circularmente polarizada a la derecha
Bchl	Bacterioclorofila
Bis-tris	Bis[2-hidroxi-etil]imino-tris[hidroxi-metil]metano
Bphea	Bacteriofeofitina
BPTI	Inhibidor pancreático de tripsina bovina
BSA	Seroalbumina bovina
CD	Dicroísmo circular
Chl	Clorofila
cm ⁻¹	Número de onda
CMC	Concentración micelar crítica
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
D1	Proteína D1 del centro de reacción del fotosistema II
D2	Proteína D2 del centro de reacción del fotosistema II
DCBQ	2, 6-diclorobenzoquinona
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1 dimetil urea
d.e.	Desviación estandar
DEAE	Dietil amino etil
DM	Dodecil β-D-maltósido
ΔμH ⁺	Gradiente electroquímico de protones
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol

ϵ	Coefficiente de extinción
EDTA	Acido etilén-diamino tetraacético
EPR	Resonancia paramagnética del electrón
EXAFS	"Extended X-ray absorption fine structure"
Φ	Rendimiento cuántico
FWHM	Anchura a la mitad de la altura en el máximo de la banda
H	Proteína H del centro de reacción bacteriano
HEPES	N-[2-hidroxi-etil]piperazine-N'-[ácido 2-etanosulfónico]
I_{50}	Concentración de inhibidor a la cual la mitad de la actividad es eliminada
χ^2	Chi cuadrado
K_b	Constante de Boltzmann
K_{eq}	Constante de equilibrio
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	Proteína M del centro de reacción bacteriano
$\mu eq e^-$	Micro equivalentes de electrones
MES	Acido 2-(N-morfolino) etano sulfónico
NADP+	2'-Fosfodinucleotido de nicotinamida y adenina oxidado
NADPH	2'-Fosfodinucleotido de nicotinamida y adenina reducido
OECC	Complejo mínimo que conserva la capacidad de desprender oxígeno
OGP	Octil β -D glucopiranosido
o-Phe	orto-fenantrolina
P680	Donador primario de electrones del fotosistema II
P680*	Estado excitado del donador primario de electrones del fotosistema II
PEG	Polietilén glicol
PM	Peso molecular
PSI	Fotosistema I

PSII	Fotosistema II
PSII _m	Membranas del fotosistema II
Q _a	Primera quinona aceptora de electrones
Q _b	Segunda quinona aceptora de electrones
RC	Centro de reacción
R _f	Movilidad relativa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SERRS	"Surface-enhanced resonance Raman scattering"
SERS	"Surface-enhanced Raman scattering"
SiMo	Silicomolibdato
τ	tiempo de vida
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina
Tricina	N-tris(hidroxiometil) metil glicina
Tris	(Tris)-hidroxiometil-amino metano
TX-100	Triton X-100
u.a.	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta

INDICE

1.- Introducción

1.1.- Fotosíntesis	2
1.2.- Estructuras fotosintéticas	3
1.2.1.- Clorofila y pigmentos accesorios	3
1.2.2.- La unidad fotosintética	4
1.3.- Captura y transferencia de la energía de excitación	7
1.3.1.- Excitación de las moléculas de pigmentos	7
1.3.2.- Transferencia de la energía de excitación	8
1.3.3.- Separación de cargas en el centro de reacción	10
1.4.- Proteínas de membrana	12
1.4.1.- Purificación de proteínas de membrana	14
1.4.1.1.- Aislamiento de membranas	14
1.4.1.2.- Aislamiento de proteínas de membrana	14
1.5.- El fotosistema II	16
1.5.1.- Antena extrínseca del fotosistema II	16
1.5.2.- Antena intrínseca del fotosistema II	18
1.5.3.- Las proteínas extrínsecas de 33, 24 y 17 kDa	20
1.5.4.- Centro de reacción del fotosistema II	21
1.5.4.1.- Aspectos estructurales. Polipéptidos	21
1.5.4.2.- Aspectos estructurales. Pigmentos y cofactores	22

2.- Materiales y Métodos

2.1.- Cultivo de <i>Beta vulgaris</i>	31
2.2.- Fraccionamiento y purificación	34
2.2.1.- Aislamiento de membranas del fotosistema II.	34
2.2.2.- Aislamiento de "oxygen evolving core complex"	36
2.2.3.- Aislamiento de las antenas intrínsecas de 47 y 43 kDa	37
2.2.4.- Purificación del complejo D1-D2-Cyt b559	38
2.2.4.1.- Intercambio de detergente	39
2.2.4.2.- Tratamiento con polietilenglicol	40
2.2.5.- Electroforesis. SDS-PAGE	41
2.2.5.1.- Determinación del peso molecular	43
2.2.5.2.- Cálculo del punto isoelectrico	44

2.3.-	Análisis químico del complejo D1-D2-Cyt b559	45
2.3.1.-	Extracción de pigmentos	45
2.3.2.-	Feofitinización	45
2.3.3.-	Cromatografía líquida de alta resolución. HPLC	46
2.3.4.-	Cálculo del Cyt b559	47
2.3.4.1.-	Espectro diferencial oxidado menos reducido	47
2.3.4.2.-	Derivado piridín hemocromo	48
2.3.5.-	Determinación de la concentración de proteína	48
2.3.6.-	Análisis de aminoácidos	49
2.4.-	Medidas de actividad	50
2.4.1.-	Medidas de evolución de oxígeno	50
2.4.1.1.-	Inhibición por Cu(II), DCMU y o-fenantrolina	51
2.4.1.2.-	Digestión de tilacoides con tripsina	51
2.4.2.-	Complejo D1-D2-Cyt b559	51
2.4.2.1.-	Fotoacumulación de feofitina	52
2.4.2.2.-	Transporte electrónico secundario	52
2.5.-	Espectroscopia	54
2.5.1.-	Espectroscopia de absorción a temperatura ambiente	54
2.5.2.-	Espectroscopia de absorción a temperaturas criogénicas	54
2.5.3.-	Deconvolución espectral	56
2.5.4.-	Espectroscopia de fluorescencia	57
2.5.5.-	Dicroísmo circular	58
2.5.5.1.-	CD en el rango del visible	58
2.5.5.2.-	CD en el rango del ultravioleta	59
2.5.6.-	Surface-enhanced resonance Raman	59
2.5.6.1.-	Instrumentación	60
2.5.6.2.-	Preparación de la muestra	61
2.5.7.-	Resonancia paramagnética del electrón	62
2.5.7.1.-	Instrumentación	63
2.5.7.2.-	Preparación de la muestra	64
2.6.-	Espectroscopia resuelta en el tiempo	65
2.6.1.-	Espectroscopia de emisión en tiempo resuelto	65
2.6.1.1.-	Instrumentación	65
2.6.1.2.-	Preparación de la muestra	67
2.6.1.3.-	Análisis matemático de los datos	67
2.6.2.-	Espectroscopia de absorción en tiempo resuelto	70

2.6.2.1.- Instrumentación	70
2.6.2.2.- Análisis matemático de los datos	70
2.7.- Tratamiento del complejo D1-D2-Cyt b559 con detergentes	71
2.7.1.- Desnaturalización y renaturalización del complejo D1-D2-Cyt b559	71
3.- Resultados	
3.1.- Aislamiento de tilacoides y membranas del fotosistema II	74
3.1.1.- Propiedades espectrocópicas y moleculares de tilacoides y PSII _m	75
3.1.1.1.- Espectros de absorción electrónica	75
3.1.1.2.- Identificación y cuantificación de pigmentos	77
3.1.1.3.- Contenido proteico. Electroforesis SDS-PAGE	79
3.2.- Purificación del "oxygen evolving core complex" (OECC)	81
3.2.1.- Propiedades espectroscópicas y moleculares del OECC	81
3.2.1.1.- Identificación de las proteínas del OECC	82
3.2.1.2.- Espectro de absorción electrónica	83
3.2.1.3.- Identificación y cuantificación de pigmentos del OECC	85
3.3.- Purificación del complejo D1-D2-Cyt b559	87
3.3.1.- Electroforesis SDS-PAGE	88
3.3.1.1.- Determinación del pI de los polipéptidos del complejo D1-D2-Cyt b559	89
3.3.2.- Espectros de absorción y análisis de derivadas de los complejos RCII _a y RCII _b	94
3.4.- Estequiometría de los cofactores del complejo D1-D2-Cyt b559	97
3.4.1.- Relación clorofila a/feofitina a	97
3.4.2.- Relación clorofila a/ β -caroteno	98
3.4.3.- Relación citocromo b559/centro de reacción	100
3.4.4.- Relación feofitina a/proteína	101
3.4.5.- Análisis de aminoácidos	102
3.5.- Caracterización espectroscópica de los dos tipos de complejos D1-D2-Cyt b559, RCII _a y RCII _b , de <i>Beta vulgaris</i>	103
3.5.1.- Resonancia Raman de los complejos RCII _a y RCII _b	103
3.5.2.- Análisis espectroscópico de la banda en el rojo de las preparaciones RCII _a y RCII _b	107
3.5.2.1.- Espectro de absorción a 77 K de la preparación RCII _a	110
3.5.2.2.- Espectro de absorción a 77 K de la preparación RCII _b	113
3.5.2.3.- Deconvolución en dos componentes de la banda de absorción del complejo D1-D2-Cyt b559	116
3.5.2.4.- Espectros de fluorescencia a 77 K de las preparaciones RCII _a y RCII _b	119

3.5.3.- Actividad de las preparaciones RCIIa y RCIIb del complejo D1-D2-Cyt b559	122
3.6.- Estudio de la separación de cargas en las preparaciones RCIIa y RCIIb	125
3.6.1.- Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo	125
3.6.2.- Espectroscopia de absorción resuelta en el tiempo	128
3.6.3.- Análisis y comparación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia en las preparaciones RCIIa y RCIIb	131
3.7.- Desnaturalización y renaturalización del complejo D1-D2-Cyt b559 de <i>Beta vulgaris</i>	134
3.7.1.- Proceso de desnaturalización	134
3.7.2.- Proceso de renaturalización de las propiedades espectroscópicas del complejo D1-D2-Cyt b559	137
3.7.2.1.- Absorción y Emisión	137
3.7.2.2.- Actividad óptica del complejo D1-D2-Cyt b559	141
3.7.2.3.- Estudio de dicroísmo circular en el UV del complejo D1-D2-Cyt b559	143
3.8.- Purificación de las proteínas de la antena intrínseca CP43 y CP47	148
3.8.1.- Propiedades espectroscópicas y moleculares de las proteínas CP43 y CP47	149
3.8.1.1.- Electroforesis SDS-PAGE	149
3.8.1.2.- Determinación del pI de las antenas CP43 y CP47	150
3.8.1.3.- Espectros de absorción y análisis de derivadas de las proteínas CP43 y CP47	152
3.8.1.4.- Análisis espectroscópico a 4.2 K de la banda Qy de las proteínas CP43 y CP47	156
3.9.- Espectros de dicroísmo circular de las proteínas CP43 y CP47	159
3.10.- Estudio del lado aceptor de electrones del PSII RC. Inhibición por Cu(II)	162
3.10.1.- Inhibición por Cu(II) en membranas del PSII	164
3.10.2.- Prevención de la inhibición por Cu(II) en presencia de Fe(III)	164
3.10.3.- Espectro de EPR del hierro no hemínico del PSII	165
3.10.4.- Localización del lugar de acción del Cu(II) en tilacoides tripsinizados	166
4.- Discusión	
4.1.- Purificación de los complejos de membrana del PSII, OECC, antenas intrínsecas y PSII RC	171
4.2.- Estequiometría de los complejos RCIIa y RCIIb aislados de <i>Beta vulgaris</i>	174
4.3.- Caracterización de los dos tipos de preparaciones D1-D2-Cyt b559 aisladas de <i>Beta vulgaris</i>	176
4.4.- Comparación del proceso de separación de cargas en ambas formas del complejo D1-D2-Cyt b559 de <i>Beta vulgaris</i>	179

4.5.- Desnaturalización y renaturalización del complejo D1-D2-Cyt b 559 inducida por detergentes	182
4.6.- Estudio del dominio aceptor del PSII mediante el uso de distintos inhibidores del transporte electrónico y la caracterización de la inhibición por Cu(II)	186
5.- Conclusiones	189
6.- Bibliografía	192



1.- INTRODUCCION

1.1.- Fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual se produce la conversión de la energía electromagnética en energía química en nuestro planeta. El verdadero origen de la energía libre requerida para la síntesis de los hidratos de carbono está en la energía radiante del Sol que es capturada y convertida en energía química por los organismos fotosintéticos (Hall & Rao, 1981; Govindjee, 1982). Las plantas, las algas, las cianobacterias y algunas bacterias son los únicos organismos conocidos capaces de realizar este proceso. Estos organismos capturan la energía de la luz solar y la utilizan para producir NADPH y $\Delta\mu\text{H}^+$. Este último será usado para sintetizar ATP. Ambas moléculas se utilizarán posteriormente en la conversión del dióxido de carbono atmosférico en hidratos de carbono. Este proceso de conversión de la energía lumínica en energía química ha desarrollado en la mayoría de los organismos que lo realizan (plantas, algas y cianobacterias) la capacidad de producir O_2 como subproducto (Barber, 1976).

Reacciones oscuras y luminosas de la fotosíntesis

Arbitrariamente la fotosíntesis puede dividirse en dos fases. La primera, en la que se realiza la captura de la energía electromagnética y su transducción en energía química ($\Delta\mu\text{H}^+$) y sus equivalentes reducidos (NADPH) (Nicholls, 1987) se denomina habitualmente como reacciones luminosas. En la segunda parte del proceso, las moléculas sintetizadas en la primera parte (ATP y NADPH) se consumen en la reducción del dióxido de carbono en hidratos de carbono en el ciclo de Calvin (Hipkins & Baker, 1986) en la denominada fase oscura, lo cual no quiere decir que este proceso sólo ocurra en ausencia de luz sino que depende de las moléculas sintetizadas en la fase luminosa para poder concluirse. En esta tesis doctoral se ha trabajado con fracciones subcelulares y complejos de cromoproteínas que llevan a cabo las reacciones luminosas del proceso fotosintético.

1.2.- Estructuras fotosintéticas

La fotosíntesis en los eucariotas tiene lugar en orgánulos subcelulares denominados cloroplastos. El cloroplasto está rodeado de una doble membrana, de las que la más externa es altamente permeable a los metabolitos de bajo peso molecular mientras que la más interna es prácticamente impermeable a la mayoría de las sustancias y en donde ciertas proteínas transportadoras se encuentran embebidas. La membrana interna rodea un gran espacio central denominado estroma el cual contiene diferentes enzimas solubles. Suspendeda en el interior del estroma existe una membrana continua denominada membrana tilacoidal la cual delimita un espacio interno conocido como lumen. El lumen de cada tilacoide está conectado con el lumen de otros tilacoides. Las reacciones luminosas se realizan dentro de esta membrana. La membrana tilacoidal está muy plegada en un entramado de vesículas aplastadas con forma de saco que a veces se disponen apiladas formando estructuras denominadas grana .

El aparato fotosintético de los procariotas (bacterias fotosintéticas y cianobacterias) se encuentra también embebido en estructuras membranosas que en estos organismos se extienden a través de la célula o forman invaginaciones de la membrana celular. Cuando las células fotosintéticas bacterianas se rompen se encuentran a menudo fragmentos de membranas los cuales forman vesículas cerradas de 300 a 500 Å de diámetro. Estas vesículas son denominadas cromatóforos y retienen la mayoría de la actividad fotosintética. Las membranas fotosintéticas de cianobacterias se hallan plegadas en la célula de una forma más ó menos complicada. Generalmente estas membranas son denominadas también tilacoides.

1.2.1.- Clorofila y pigmentos accesorios

La luz del sol incidente sobre la superficie de la tierra abarca la región del espectro comprendida entre 300 y 1150 nm. A longitudes de onda mayores el vapor de agua y el dióxido de carbono en la atmósfera actúan como un filtro impidiendo el paso de esa parte de la radiación solar. A longitudes de onda menores la absorción por la capa de ozono y otras moléculas es

esencialmente del 100 % (Sauer, 1986). La fotosíntesis depende de la absorción de la energía radiante del Sol por los pigmentos fotosintéticos que se encuentran asociados a proteínas localizadas en la membrana tilacoidal de plantas y de algas y en la membrana plasmática 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 bacterias fotosintéticas son los análogos bacterianos de estos pigmentos bacterioclorofila a (Bchl a) y bacterioclorofila b (Bchl b). La estructura de las clorofilas se basa en un sistema anular porfirínico, con un átomo de Mg central, que contiene un entramado de dobles enlaces conjugados que absorben la luz. Las clorofilas difieren entre ellas solamente en algunos sustituyentes laterales. Una larga cadena hidrocarbonada denominada "fitol" está esterificada al anillo IV del tetrapirrol. Esta larga cola hidrocarbonada ayuda a la clorofila a "anclarse" en el medio hidrófobo de las proteínas de membrana con las cuales se asocia.

Los organismos fotosintéticos también contienen pigmentos denominados accesorios entre los que se encuentran los carotenoides y las ficobilinas. Además de absorber la luz estos pigmentos tienen una función protectora durante el proceso fotosintético, sobre todo en organismos en los que éste se asocia con la fotólisis del agua en los que el oxígeno puede llegar a convertirse en oxígeno singlete el cual puede dañar bien a los complejos pigmento-proteína o a los lípidos de la membrana tilacoidal (Webb & Green, 1991).

1.2.2.- La unidad fotosintética

Los pigmentos que absorben la luz se localizan en proteínas de membrana las cuales se asocian formando unidades funcionales llamadas fotosistemas en donde la energía de excitación es transferida hasta que es atrapada en un lugar especializado de la unidad para su conversión fotoquímica. Este lugar es denominado centro de reacción (Duysens et al., 1961; Clayton, 1965) el cual está formado por un complejo de proteínas de membrana, moléculas especializadas transportadoras de electrones y moléculas de Chl a que se encuentran en un

ambiente especial y forman el centro reactivo. La mayor parte de la unidad fotosintética sirve como "colectores" de energía electromagnética, los pigmentos que constituyen dicha unidad se asocian en grandes complejos con proteínas y se les suele denominar complejos de antena o proteínas de la antena. El funcionamiento de este tipo de unidades fotosintéticas resulta en una utilización más eficiente de la energía absorbida.

La membrana tilacoidal de plantas, algas y cianobacterias contiene dos tipos de fotosistemas denominados fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII). El PSI es un complejo multiproteico en forma de trímero (Krauss et al., 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 es también un complejo multiproteico (Seibert, 1993) que se localiza principalmente en las membranas granales, el centro reactivo se

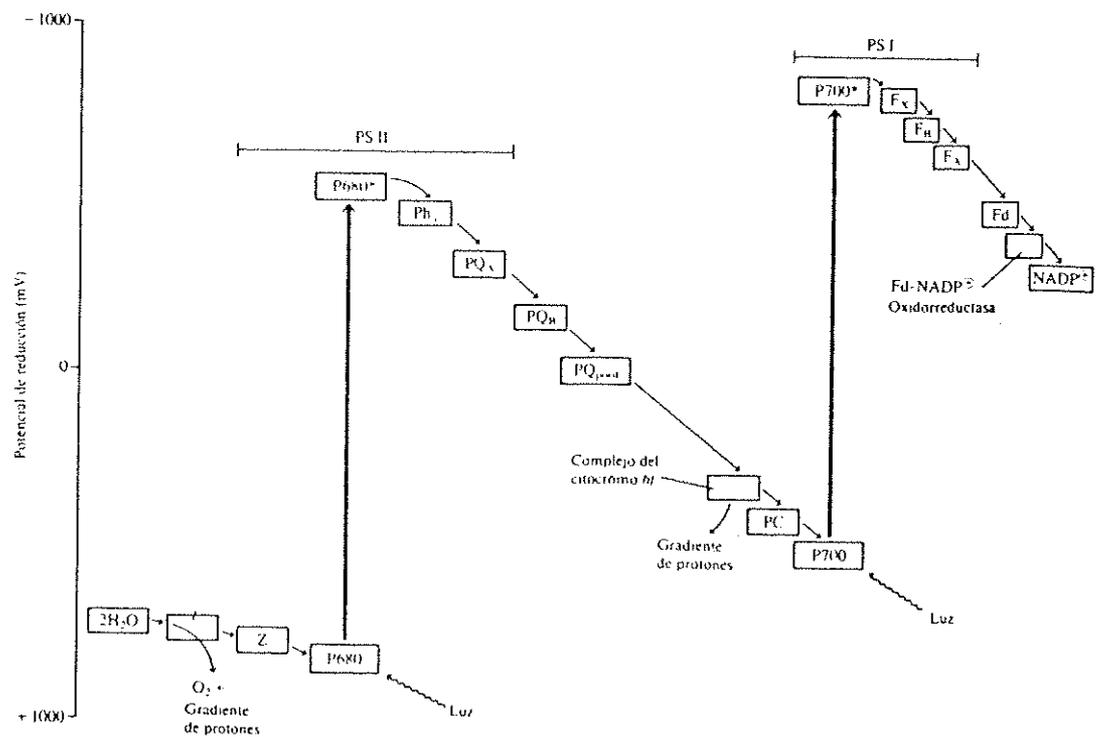


Figura 1.1.- Esquema en Z. El esquema en Z es un modelo ampliamente aceptado en el que se ilustran los cambios en los potenciales de reducción de los componentes del sistema fotosintético de transporte de electrones.

cree está formado por un par de Chl a llamado P680 ya que absorben a 680 nm. Rodeando al PSII se encuentra un complejo de antenas denominado LHCII, aunque hay también un "pool"

móvil que puede transferir energía bien al PSI o al PSII (Allen, 1992 a,b). Asociado a este fotosistema se encuentra el sistema responsable de la fotólisis del agua. Estos dos fotosistemas se encuentran conectados en un transporte electrónico no cíclico que genera la reducción del NADP y un $\Delta\mu\text{H}^+$, es el denominado esquema en Z (figura 1.1) ampliamente aceptado, aunque algunos autores han argumentado diferentes hipótesis en su contra (Arnon & Barber, 1990). Esta asociación de dos unidades fotosintéticas sólo 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 & Marrs, 1987).

1.3.- Captura y transferencia de la energía de excitación

1.3.1.- Excitación de las moléculas de pigmentos

Cuando los fotones emitidos por una fuente de luz son absorbidos por una molécula se da una redistribución de sus electrones. El campo electromagnético asociado con la radiación interacciona con los electrones. Habitualmente estos electrones se encuentran restringidos a ocupar orbitales moleculares de bajo nivel energético, de acuerdo con el principio de exclusión de Pauli. La consecuencia para la mayoría de los electrones es que se encuentran apareados y además solo se encuentran dos de ellos por orbital. Tras la absorción de un fotón por el cromóforo uno de estos electrones es promovido a un orbital que no está ocupado en el estado basal. Lo más probable es que este proceso se realice sin cambiar el número cuántico de spin del electrón promovido, de esta forma se produce un estado excitado singlete mediante este electrón, asumiendo que en el nivel basal ambos tuvieron spines apareados. De esta forma la energía de un fotón es convertida en un incremento de la energía electrónica de la molécula al promover un electrón al orbital del estado excitado (Birks, 1970). La probabilidad de que la absorción de un fotón se lleve a cabo es una propiedad cuántica de la molécula, una medida de esta probabilidad es el coeficiente de extinción de la molécula en función de la longitud de onda (o energía).

Para los organismos fotosintéticos es fundamental desarrollar formas de incrementar la absorción de los complejos de la antena asociada a un centro de reacción. La antena conectada al centro de reacción realiza este proceso principalmente de dos formas: la primera en la que la absorción es aproximadamente aditiva por lo que hay un incremento en la proporción del número de moléculas de la antena por centro de reacción; la segunda el ensanchamiento de las bandas de absorción incrementa la probabilidad de captar fotones de energías que no son absorbidas eficientemente por las moléculas de pigmento aisladas. Hay diferentes mecanismos mediante los que se da este fenómeno para una molécula grande como es la clorofila y el resultado es que muchas transiciones individuales pueden conjuntarse, produciendo una banda continua de energías (normalmente de 50 nm ó más). Interacciones con moléculas vecinas tanto del solvente como de la membrana producen un ensanchamiento mayor. Además efectos eléctricos con el medio proteico circundante pueden producir desplazamientos en

los máximos de absorción influenciando las energías de los estados basal y excitado. Este tipo de efectos son producidos por la polarizabilidad electrónica del momento dipolar debida a la localización de la molécula alrededor de grupos cargados.

1.3.2.- Transferencia de la energía de excitación

La presencia de grandes sistemas de antena mejora la captación de energía electromagnética por el sistema varios cientos de veces, pero a la vez impone la condición de que la transferencia de la energía de excitación debe realizarse de forma eficiente entre las distintas moléculas de cromóforos que integran la antena. Hay diferentes mecanismos mediante los que se da este fenómeno: excitones deslocalizados, mecanismo de resonancia inductiva y otros más complejos (Knox, 1986).

Un excitón consiste en un electrón deslocalizado y su hueco asociado (hueco formado en el orbital correspondiente al estado basal). El excitón más simple se da cuando tanto el electrón como el hueco se forman en el mismo cromóforo y se denomina excitón molecular. El excitón molecular se dice que está *localizado* en el sentido que se halla restringido a la región de orbitales moleculares relacionados dentro de una molécula. Los excitones moleculares pueden estar en estado singlete, donde el momento angular del spin 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 dos electrones se encuentran desapareados. Cuando los cromóforos están muy cercanos unos a otros las interacciones entre ellos contribuyen a deslocalizar el electrón. En este caso el electrón excitado y su hueco asociado descansan sobre 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 de cromóforos individuales cuando están separadas. Este tipo de interacciones, denominadas excitónicas, conducen a "splittings" de energía que ensanchan la banda de absorción o en algunos casos se resuelven en varios componentes (Scherz & Parson, 1984).

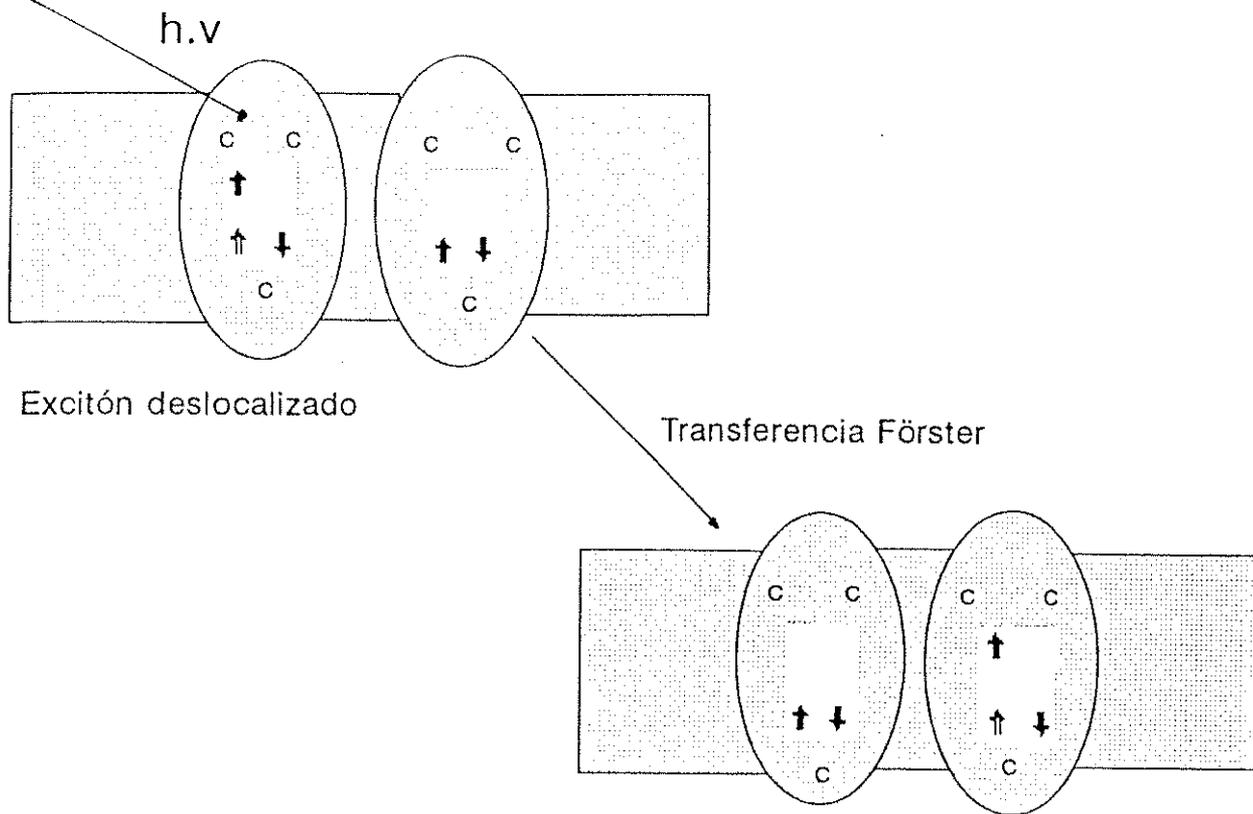


Figura 1.2.- La energía de excitación migra dentro de la antena por el mecanismo de resonancia inductiva. Unos cien pasos de este tipo se dan antes de que la energía de excitación alcance el centro de reacción.

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 amplia evidencia de la ocurrencia de este fenómeno en complejos de antena fotosintéticas. Las interacciones son mayores cuando las moléculas que participan son idénticas, aunque también se puede dar entre moléculas que no son iguales pero sus energías son parecidas (por ejemplo Chl a y Chl b). Este tipo de interacciones son de rango corto y no se extienden a distancias de 10 a 20 nm necesarias para conectar la periferia de la antena al centro de reacción.

El mecanismo por el cual la energía de excitación salta de un complejo de proteína pigmento de la antena a otro a distancias mayores de 2 nm recuerda a un mecanismo de péndulos acoplados y se denomina resonancia inductiva (también conocido como mecanismo Förster; Förster, 1965). La interacción entre un pigmento electrónicamente excitado y sus vecinos en el estado basal inicia una transición descendente de la energía de excitación del grupo excitado acoplada con una transición ascendente en las cercanías del pigmento aceptor a través de una

interacción coulombica (figura 1.2). El dipolo de oscilación asociado a la desexcitación de una molécula se encuentra acoplado a una oscilación en simpatía con otra molécula vecina, causando la excitación de la 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} . Sin embargo para la deslocalización de un excitón la energía de interacción decae como d^{-3} . El mecanismo Förster aunque es profundamente dependiente de la distancia es sin embargo una interacción de largo rango. Para cromóforos como la clorofila tiene una distancia de acción de unos 8 a 10 nm (Knox, 1977). El rango no se ha determinado para complejos de pigmento-proteína con gran cantidad de cromóforos. Hay otros mecanismos que se han propuesto para la transferencia de la excitación a distancias más cortas, en uno de los cuales se propone que el electrón y el hueco son intercambiados a la vez entre la molécula de donador excitado y la del aceptor no excitado. Un punto importante es que en todos estos mecanismos de transferencia de energía, el electrón cargado negativamente y el hueco asociado cargado positivamente se encuentran en orbitales 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.

1.3.3.- 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. La diferencia se da en que esta reacción tiene lugar en el complejo de centro de reacción tras la excitación del complejo. Las moléculas excitadas son mejores donadores de electrones que las no excitadas pues es necesaria menos energía para remover el electrón del orbital más energético. Las moléculas excitadas son también buenos aceptores debido al hueco disponible en el orbital basal. Cual de estos dos papeles predomina en una situación de una molécula excitada depende del ambiente circundante a esta molécula.

En todos los centros de reacción conocidos contienen moléculas de Chl o Bchl y la evidencia indica que estos cromóforos donan electrones tras su excitación, lo que significa la

existencia de buenos aceptores de electrones en su proximidad. En todos los casos conocidos el aceptor es o bien otra clorofila (Bchl) o una feofitina (Bpheo). 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 molécula o en la otra 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 en el espacio y localizados en especies moleculares diferentes. Para evitar que tenga lugar la recombinación del hueco y el electrón en la misma molécula, lo que disiparía la energía y evitaría cualquier posibilidad de almacenarla, el aceptor primario del electrón rápidamente transfiere el electrón a aceptores secundarios y el donador primario oxidado se reduce por donadores secundarios (Parson & Holten, 1986; Kirmaier & Dewey, 1987).

1.4.- Proteínas de membrana

Como se ha señalado en la sección 1.2.2 el aparato fotosintético se compone de pigmentos asociados a proteínas. Estas proteínas además, tienen la característica de encontrarse localizadas en una membrana. Las proteínas fotosintéticas se encuentran rodeadas por los lípidos de la membrana tilacoidal (en plantas, algas y cianobacterias) o celular (bacterias fotosintéticas). Hablando de una forma coloquial se puede decir que las proteínas de membrana tienen su cabeza y sus pies en el agua mientras su cuerpo está rodeado de un líquido viscoso. Como resultado estas proteínas no son solubles en tampones acuosos, para su solubilización se necesita añadir detergentes a la solución tampón. Cuando se utilizan por encima de su concentración micelar crítica (CMC), las moléculas de detergente se hallan unidas a la superficie hidrofóbica de los complejos de proteínas de membrana. Uno de los puntos más críticos en el manejo de proteínas de membrana es el uso de un detergente o mezcla de detergentes adecuados, que reemplacen a los lípidos de la membrana original lo más perfectamente posible, donde "perfectamente" significa que no induzcan un descenso en su estabilidad y ningún cambio en su estructura y/o función.

Las proteínas de membrana se pueden clasificar en tres tipos (Michel, 1991): a) proteínas unidas a la membrana, b) proteínas integrales de membrana y c) complejos de proteínas de membrana.

a) Este tipo de proteínas se hallan unidas a las membranas biológicas solamente por interacciones polares, pueden ser liberadas al medio acuoso frecuentemente mediante lavados con alta concentración de sal, EDTA o soluciones alcalinas. Si una proteína puede ser extraída de la bicapa lipídica por estos agentes se considera que está unida a la membrana y no es una proteína integral de membrana.

b) Las proteínas integrales de membrana son definidas por su insolubilidad en ausencia de detergentes. Dentro de las proteínas integrales de membrana debe diferenciarse entre proteínas que están "ancladas" a la membrana, en las que la mayoría de la proteína sobresale de la membrana, y proteínas en las que la mayor parte de su estructura se encuentra embebida en la membrana. Normalmente las proteínas ancladas en la membrana sólo poseen una única α -hélice

atravesando la membrana, un ejemplo típico es la subunidad H del centro de reacción de bacterias púrpuras fotosintéticas (Deisenhofer & Michel, 1989; Allen et al., 1987a). Las proteínas realmente de membrana son aquellas que tienen múltiples segmentos dentro de la membrana, el ejemplo típico es la bacteriorodopsina en la que se han determinado la existencia de 7 α -hélices (Henderson & Unwin, 1975). La presencia de 5 α -hélices atravesando la membrana tilacoidal en el caso de las subunidades D1 y D2 del PSII RC y L y M, y del RC de *Rhodospseudomonas*

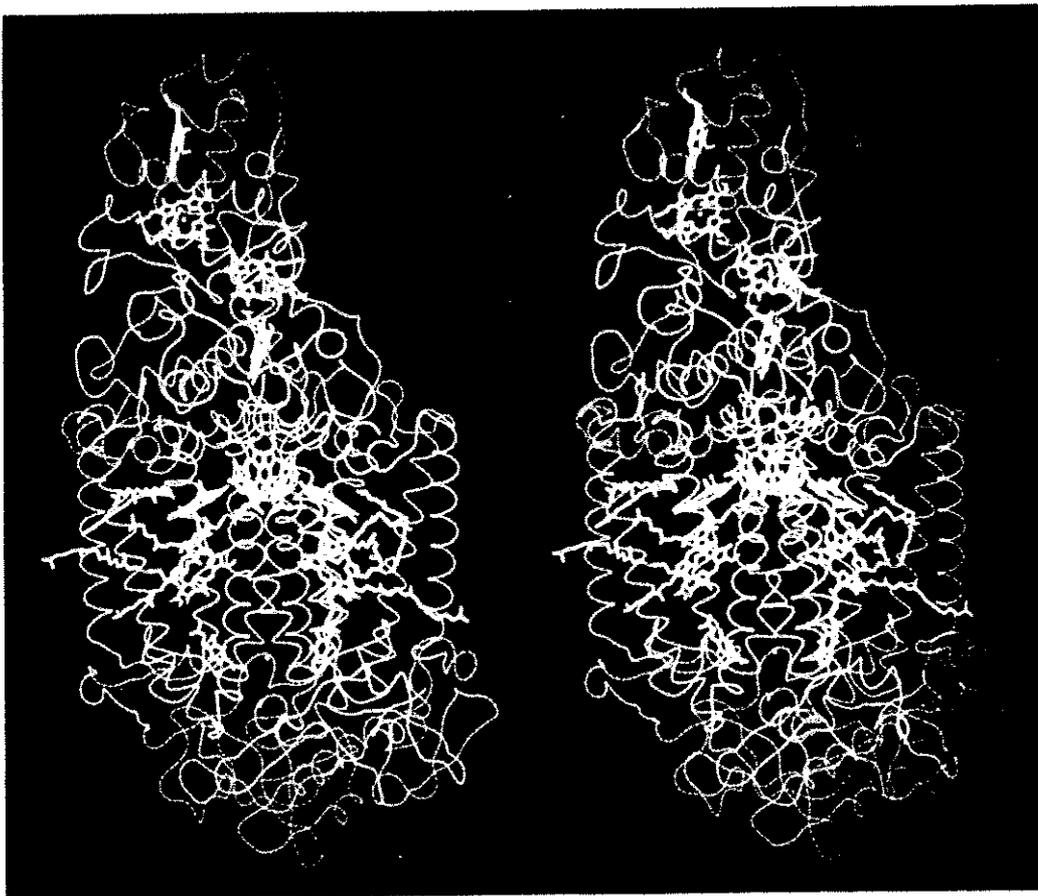


Figura 1.3.- Estructura tridimensional en diagrama de cintas del RC de *Rps viridis* mostrando las subunidades L, M, H y el citocromo, junto con los pigmentos y cofactores.

viridis y *Rhodobacter sphaeroides* (Michel & Deisenhofer, 1988; Allen et al., 1987a) respectivamente, las cataloga dentro de este tipo de proteínas de membrana.

c) Los complejos de proteínas de membrana son complejos multiproteicos que están formados por los dos tipos anteriores. Como ejemplos típicos tenemos la citocromo oxidasa, el PSII, el PSI, la ATPasa, el Citocromo b_6f , etc.

1.4.1.- Purificación de proteínas de membrana

1.4.1.1.- Aislamiento de membranas

Para purificar una proteína de membrana el mejor material de partida es la membrana biológica en la que se localiza y donde se encuentra enriquecida. Una vez más el ejemplo clásico son las membranas fotosintéticas de los diferentes organismos u orgánulos fotosintéticos, las membranas de órganos eléctricos, la membrana de *Halobacterium halobium*, etc. El primer paso es la ruptura de las células por distintos métodos normalmente mecánicos (prensa French, sonicación, choque osmótico, etc). A continuación las membranas son separadas de los restos celulares por centrifugación diferencial y en algunos casos se purifican en un mayor grado después por centrifugación isopícnica.

1.4.1.2.- Aislamiento de proteínas de membrana

Se ha demostrado en algunos casos la ventaja de eliminar las proteínas periféricas de membrana antes de realizar la purificación de la proteína deseada, con los tratamientos indicados antes, aunque estos tratamientos pueden también eliminar proteínas periféricas que están unidas a la proteína integral de membrana en su estado funcional.

La única manera de solubilizar proteínas con grandes dominios hidrofílicos e hidrofóbicos es la adición de detergentes a la solución para cubrir las regiones apolares de las proteínas. Aunque el uso de bajas relaciones de detergente a proteína puede extraer en ciertos casos una proteína específica (Ogrodnik et al., 1988), generalmente la estrategia que se lleva a cabo es la de solubilizar totalmente la membrana y separar posteriormente sus componentes en sus micelas de detergente. Se considera que una proteína de membrana está solubilizada cuando se encuentra en el sobrenadante tras una centrifugación a 100.000 x g durante una hora. Detalles sobre los conceptos de solubilización de proteínas de membrana son descritos por Helenius & Simons, 1974 y Tanford & Reynolds, 1978.

Para la solubilización inicial, los detergentes son seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios: 1) su capacidad para solubilizar una determinada membrana y 2) la

estabilidad de la proteína de membrana una vez aislada en el detergente. Los detergentes con pequeñas cabezas polares tienden a solubilizar mejor las proteínas de membrana que los que tienen cabezas polares más grandes, pero desestabilizan las proteínas en un mayor grado. Para evitar esto lo que se suele hacer es llevar a cabo la solubilización de la membrana con un detergente y la purificación de la proteína con otro más "suave". Dentro de las series homólogas de detergentes, se nota un incremento de la estabilidad de la proteína con una mayor longitud de la cadena alquilo del detergente. Por ejemplo en determinadas condiciones de pH la bacteriorodopsina es más estable en nonil- β , D-glucopiranosido que en octil- β , D-glucopiranosido por un factor de 3 (Michel, 1991). Entre los detergentes con cadena alquilo aquellos con grupos de cabeza cargada (por ejemplo SDS) no son propicios para el aislamiento de proteínas de membrana en estado nativo. Sin embargo se dan algunas excepciones como el centro de reacción del PSI de cianobacterias (Ford et al., 1987). Detergentes zwitteriónicos (por ejemplo LDAO) con colas alquilo apolares se pueden usar con más proteínas pero son todavía demasiado "fuertes" para la mayoría de las proteínas de membrana. Entre los detergentes con cadena alquilo aquellos con una cabeza de poli-oxietileno o un disacárido son los más suaves (por ejemplo, TX-100, DM).

Los métodos de separación para proteínas de membrana son los mismos que para proteínas solubles con la condición de trabajar con tampones con detergente a concentraciones superiores a la CMC. El método más usado suele ser la cromatografía de intercambio iónico aunque otros tipos de cromatografía como la de afinidad o gel filtración son también usados, aunque en el último caso no sea tan frecuente como en proteínas solubles debido a que la presencia de detergente provoca un aumento de la masa de la proteína.

1.5.- El fotosistema II

El complejo del PSII se puede fraccionar bioquímicamente en diferentes partes, la antena, la cual se puede subdividir a la vez en antena extrínseca e intrínseca, el centro de reacción y las proteínas extrínsecas asociadas al centro de reacción que estabilizan el sistema de fotólisis del H₂O.

1.5.1.- Antena extrínseca del fotosistema II

Alrededor de la mitad de la clorofila en plantas verdes y en los tilacoides de las algas verdes está unida a una proteína que contiene tanto Chl a como Chl b, es la antena LHCII. Este complejo funciona como el mayor colector de energía solar y además juega un papel fundamental en el apilamiento de las membranas de tilacoides y en la regulación de la distribución de la energía de excitación entre el PSI y el PSII (Bassi et al., 1990). En cianobacterias este complejo es sustituido por complejos de proteína-pigmento denominados ficobilisomas. La antena LHCII consiste en una familia de proteínas con gran homología de 25 a 27 kDa de peso molecular que difieren en sus potenciales de fosforilación y en su distribución en complejos más fuertemente unidos y otros localizados más periféricamente pero que se caracterizan por una organización idéntica de sus cromóforos (Larsson et al., 1987; Spangfort & Andersson, 1989). El aislamiento de esta cromoproteína se realizó por primera vez hace unas dos décadas tras la solubilización de cloroplastos con SDS (Thornber, 1986). El complejo se aisló en forma monomérica, y se llegó a un consenso general sobre la existencia equimolecular de cantidades de Chl a y Chl b, con un número total de 6 clorofilas por proteína (Kan & Thornber, 1976). El desarrollo de nuevos métodos de purificación basados en la solubilización con detergentes más "suaves" como Triton X-100 y n-octil β,D-glucopiranosido, condujeron al aislamiento de este complejo proteico en forma de trímero (Butler & Külbrandt, 1988), compuesto de monómeros idénticos o muy parecidos (Külbrandt, 1984). Cada uno de los monómeros tiene un peso molecular de 25 kDa con 8 Chl a, 7 Chl b y algunos carotenoides unidos no covalentemente. La estructura tridimensional de esta proteína se ha determinado por

microscopía electrónica en cristales bidimensionales (Külbrandt & Wang, 1991; Külbrandt, 1992)

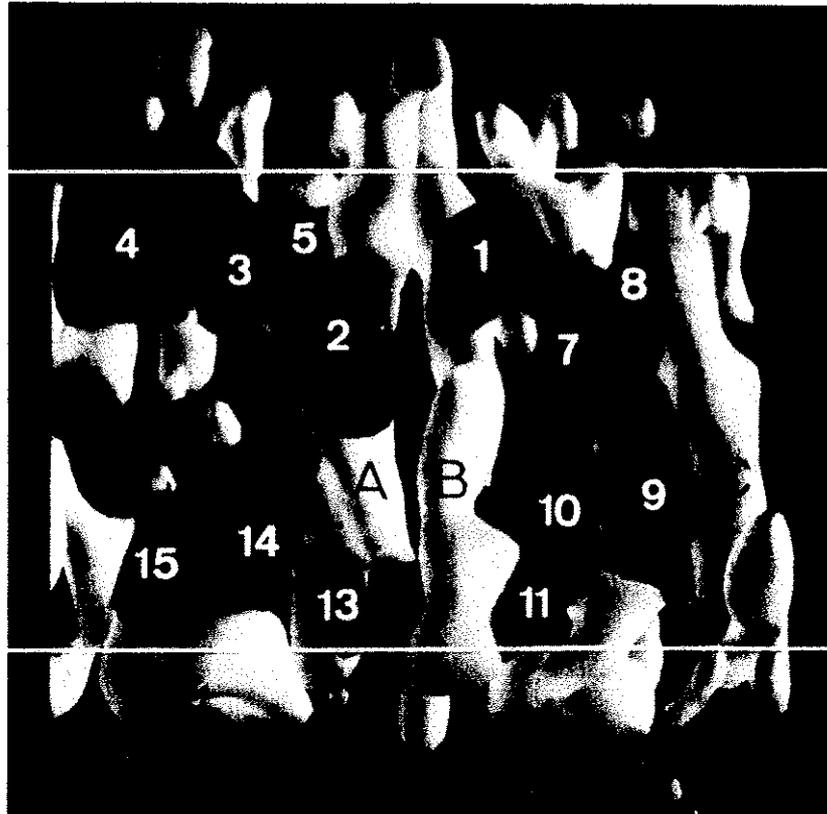


Figura 1.4.- Modelo de la estructura tridimensional de la antena LHCII de *Pisum sativum* a 6 Å de resolución (Külbrandt & Wang, 1991) vista desde su posición insertada en la bicapa lipídica. Las α -hélices se marcan como A, B y C además de las moléculas de clorofila marcadas del 1 al 15. Las clorofilas 6 y 12 se hallan escondidas detrás de la α -hélice B.

Como se ha comentado anteriormente esta antena juega un papel clave en la regulación de la energía entre las dos unidades fotosintéticas en plantas y algas verdes. La fosforilación de esta cromoproteína de membrana es fundamental en este proceso. En su forma defosforilada la LHCII interacciona específicamente con el PSII y la luz recogida por ella es convertida en potencial electroquímico en el centro de reacción del PSII. Tras la fosforilación por una kinasa (Allen, 1983) de un residuo de Thr cerca del amino terminal el complejo proteico abandona el PSII y migra hacia el PSI (Allen, 1992). La fosforilación de proteínas afecta

también a otras proteínas de membrana del cloroplasto y tiene un papel regulador en bacterias fotosintéticas, las cuales poseen diferentes sistemas de antena.

La existencia de algunas proteínas diferentes de la LHCII que también unen Chl b de 29 a 24 kDa ha sido descrita por algunos autores (Ghanotakis et al., 1989; Camm & Green, 1989). Algunos investigadores han propuesto para estas proteínas un papel de conexión entre la antena intrínseca y la antena extrínseca aunque esta hipótesis no está aún confirmada (Bassi, 1990).

1.5.2.- Antena intrínseca del fotosistema II

La antena intrínseca del PSII está formada por dos polipéptidos denominados CP43 y CP47. Ambas cromoproteínas se encuentran estrechamente relacionadas con el centro de reacción del PSII (complejo D1-D2-Cyt b559) que junto con la proteína de 33 kDa asociada al lado luminal del PSII forman el complejo denominado "oxygen-evolving core complex" (OECC). Ambos polipéptidos se cree que están integrados por 6 α -hélices transmembranales y un gran dominio hidrofílico entre la V y VI α -hélices localizado en el lumen. Las proteínas CP47 y CP43 tienen masas moleculares aproximadas de 51 y 46 kDa, respectivamente, y son codificadas por los genes cloroplásticos *psbB* y *psbC* (Bricker, 1990). Estudios del sistema basados en la incorporación de ^{14}C en algas verdes unicelulares, han demostrado que su estequiometría con los polipéptidos que integran el centro de reacción (D1 y D2) es de 1:1:1:1 (de Vitry et al., 1987; Gounaris, et al., 1990). La cantidad de moléculas de Chl a y carotenoides que portan ambos polipéptidos varía según los autores. Así en complejos del PSII desprovistos de la proteína CP43 (contienen solo CP47 más el complejo D1-D2-Cyt b559) (Dekker et al., 1989) se ha estimado que contienen de 30 a 34 moléculas de Chl por centro de reacción según el contenido de Cyt b559 (Dekker et al., 1990) y la cantidad de Qa fotoreducible (Rögner et al., 1991), 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 (Akabori et al., 1988; Gounaris et al., 1990). Cálculos del número de moléculas de clorofila en base a la cantidad de Qa fotoreducible

en complejos de OECC también han sido realizados con el resultado de 31 a 35 Chl por centro de reacción (van Leuween et al., 1992). Consecuentemente se ha estimado que la cantidad de moléculas de Chl a por polipéptido en CP47 es de 19 a 26 (Dekker et al., 1989; Rögner et al., 1991) o de 10 a 13 (Gounaris et al., 1990). El polipéptido CP43 se ha estimado que contiene de 10 a 12 moléculas de Chl a (Rögner et al., 1991) o aproximadamente 15 moléculas (Barbato et al., 1991).

Aunque se conoce poco sobre el papel fisiológico tanto de CP47 como de CP43 ambas parecen ser necesarias para la formación de un complejo del PSII estable. Así se han aislado varios mutantes de algas y cianobacterias en los que su incapacidad para acumular la antena CP43 produjo un descenso en la síntesis de las proteínas CP47, D1 y D2 (Dzelkalns & Bogorad, 1989; Carpenter et al., 1990). Estas observaciones indican un papel para la proteína CP43 de estabilización en el complejo del PSII. En contra de estos mutantes los cuales como consecuencia de su incapacidad de sintetizar las proteínas CP47, D1 y D2 no fueron capaces de sintetizar centro de reacción (Nixon et al., 1991), hay ciertos autores que han publicado la existencia de bajas concentraciones de centros de reacción en mutantes sin la proteína CP43 (Vermaas et al., 1988).

Todos los métodos bioquímicos usados para aislar la proteína CP43 han desembocado en la pérdida de Qa del centro de reacción impidiendo la fotoreducción de la primera quinona (Yamagishi & Katoh, 1985; Akabori et al., 1988; Petersen et al., 1990). Estos datos condujeron a pensar que la proteína CP43 podría jugar un importante papel en la estabilización del "nicho" de Qa. Sin embargo el aislamiento de complejos de OECC sin esta proteína a partir de mutantes de *Synechocystis* PCC6803 que aún conservan la transferencia electrónica entre el donador secundario Z (ver apartado del centro de reacción) y Qa descartan esta hipótesis (Rögner et al., 1991).

La proteína CP47 se sintetiza de forma concertada con los dos polipéptidos principales del centro de reacción D1 y D2, mientras que la síntesis de la proteína CP43 se

realiza de forma independiente. Ambas antenas se acumulan en las membranas apiladas de los tilacoides y necesitan la unión rápida de sus pigmentos durante el proceso de síntesis para poder llevar a cabo de forma correcta su plegamiento. La proteína CP47 es la primera que se ensambla con los polipéptidos del centro de reacción para posteriormente asociarse al complejo la proteína CP43 (de Vitry et al., 1989). Aunque en un primer momento se pensó que la proteína CP47 era el centro de reacción (Nakatani et al., 1984), actualmente se piensa que juega un papel importante en el ensamblaje del complejo del PSII, así por ejemplo parece ser que la proteína de 33 kDa responsable de la estabilización del dominio del Mn, está unida al complejo del PSII mediante la proteína CP47 (Burnap & Sherman, 1991).

1.5.3.- Las proteínas extrínsecas de 33, 24 y 17 kDa

Estas proteínas se encuentran en una estequiometría de 1:1:1 con el PSII RC (Enami et al., 1991). La proteína de 33 kDa protege el complejo del Mn y mantiene una configuración que optimiza la eficiencia catalítica de la oxidación del agua. Es codificada por el gen *psbO* el cual se creía de origen nuclear pero que recientemente otros autores han determinado como un gen cloroplástico (Hallick, 1989). Esta proteína contiene un enlace disulfuro en el interior de la proteína esencial para mantener su propia conformación y su capacidad de reconstituir ciertas preparaciones de PSII con esta proteína (Tanaka et al., 1989). La proteína de 33 kDa se une directamente a las zonas hidrófilas de polipéptidos de membrana del PSII (Burnap & Sherman, 1991). Esta proteína puede ser rápidamente desprendida del complejo del PSII mediante tratamiento de las muestras con altas concentraciones de Tris a pH básico (Akerlund & Jansson, 1981), 1 M de CaCl_2 (Kuwabara et al., 1985) o altas concentraciones de urea (Miyao & Murata, 1984). La mayoría de estos tratamientos liberan también los átomos de Mn en el complejo, aunque ciertos tratamientos en condiciones menos drásticas dejan el complejo del Mn intacto liberando la proteína (Kuwabara et al., 1985).

Los otros dos polipéptidos de 24 y 17 kDa están también asociados con preparaciones que mantienen la actividad de desprendimiento de oxígeno (excepto OECC). Son producto de genes nucleares y son rápidamente liberadas del complejo de PSII por tratamiento de

las muestras con altas concentraciones de NaCl. En ausencia de estos polipéptidos son necesarias altas concentraciones de Ca^{2+} y Cl^- para mantener la actividad de evolución de oxígeno. La proteína de 24 kDa mejora la unión de al menos un Ca^{2+} a su lugar de unión en el PSII mientras que la de 17 kDa mejora la unión de Cl^- a su sitio de unión en el PSII. No se conoce si estos polipéptidos se unen a proteínas intrínsecas de membrana del PSII o si tienen puntos de unión en la proteína de 33 kDa (Brudvig et al., 1989).

1.5.4.- Centro de reacción del fotosistema II

1.5.4.1.- Aspectos estructurales. Polipéptidos

El centro de reacción del PSII purificado está integrado por los polipéptidos D1 y D2 más los dos péptidos que forman el citocromo b559. Este complejo es el que cataliza directamente la transferencia de electrones desde el agua a una plastoquinona en vivo. El PSII tiene varios polipéptidos de pequeño peso molecular adyacentes de los que actualmente no se conoce mucho sobre su función. Como corazón del complejo tenemos un heterodímero formado por las proteínas D1 y D2, las cuales poseen una homología funcional y estructural con las subunidades L y M del centro de reacción bacteriano (Deisenhofer et al., 1985; Allen et al., 1987a,b; Chong et al., 1991) y constituyen el complejo proteico con el que se asocian los cofactores que realizan los procesos fotoquímicos primarios. Se caracteriza por una simetría doble 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 centro de reacción del PSII y el centro de reacción de bacterias púrpuras ha sido investigada (Michel & Deisenhofer, 1988; Deisenhofer & Michel, 1989) sugiriéndose que la duplicación de un único gen ha conducido a este tipo de estructuras heterodiméricas. Las proteínas D1 y D2 son codificadas por los genes cloroplásticos *psbA* y *psbD* respectivamente y tienen un peso molecular de 32 y 34 kDa respectivamente (Delaplaire & Chua, 1979). Aunque se ha encontrado cierta homología con las proteínas L y M del centro de reacción bacteriano ésta no es muy alta (Youvan et al., 1984; Williams et al., 1984). Sin embargo las estructuras tridimensionales de los centros de reacción de *Rps. viridis* y *Rb. sphaeroides* han demostrado que las homologías entre las secuencias de

aminoácidos incluyen residuos claves para la función de estos complejos proteicos. Ambas proteínas están compuestas por cinco α -hélices localizadas en la bicapa lipídica denominadas A, B, C, D y E más una pequeña α -hélice en el lumen del tilacoide entre las α -hélices C y D (Michel & Deisenhofer., 1988). El % de estructura secundaria del complejo D1-D2-Cyt b559 se ha determinado mediante FTIR (He et al., 1991) dando como resultado unos valores de 67.2 % de α -hélice, 9.35 de hoja plegada β y un 11.1 % de codos, los cuales son muy parecidos a los valores para cada uno de los tipos de estructura secundaria determinada para los centros de reacción de *Rps. viridis* y *Rb. sphaeroides* desprovistos de la proteína H (Allen et al., 1987a; Deisenhofer et al., 1985). Recientemente y tomando como base la estructura determinada por difracción de rayos X del centro de reacción de *Rb. sphaeroides* se ha modelado una estructura para el centro de reacción del PSII de *P. sativum* (Ruffle et al., 1992).

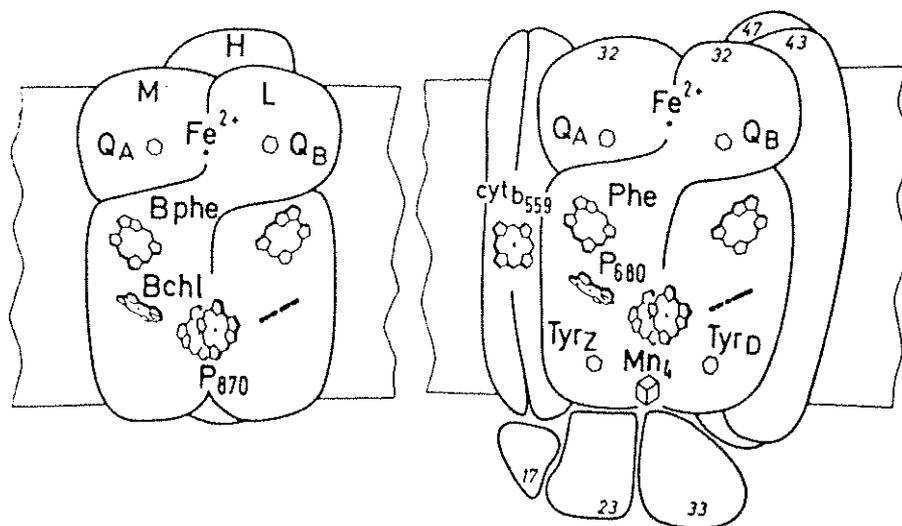


Figura 1.5.- Modelo del complejo D1-D2-Cyt b559 con la proteína de 33, 23 y 17 kDa, el complejo tetramérico del Mn y las proteínas de la antena intrínseca comparado con el centro de reacción bacteriano.

1.5.4.2.- Aspectos estructurales. Pigmentos y cofactores

Pigmentos y cofactores

El aislamiento de la partícula denominada actualmente como centro de reacción del PSII fue aislada por primera vez por Nanba & Satoh, 1987. La estequiometría de pigmentos de

este material fue de 5 Chl a, 2 Pheo a y 1 β -caroteno. No se encontró ninguna plastoquinona, ni tampoco Chl b. Barber et al., 1987 determinaron mediante absorción atómica que el centro de reacción del PSII contenía un átomo de Fe como en el centro de reacción bacteriano pero no tenía Mn. Posteriormente también se demostró la existencia del átomo de Fe en el centro de reacción del PSII mediante espectroscopia de EPR (Telfer et al., 1988), sin embargo ambos autores coincidieron más tarde que este cofactor del centro de reacción del PSII se perdía en las preparaciones del complejo D1-D2-Cyt b559 purificadas como Nanba & Satoh. Se ha encontrado que el complejo D1-D2-Cyt b559 también contiene una molécula de monogalactosil diacil-glicerol por centro de reacción (Murata et al., 1990) especulándose sobre la posible función de estabilización del complejo de esta molécula de fosfolípido. Actualmente hay una fuerte controversia sobre el contenido de pigmentos de esta partícula en la literatura sobre todo en el número de clorofilas, β -caroteno y Cyt b559 que une el complejo.

Organización

Los pigmentos y quinonas del centro de reacción del PSII se piensa que están estructurados en la proteína de forma similar a la del centro de reacción de bacterias púrpuras

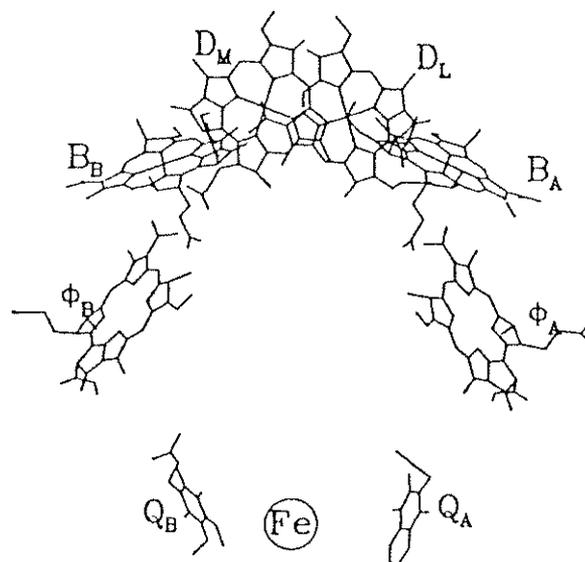


Figura 1.6.- Organización de los pigmentos y el átomo de Fe del centro de reacción de *Rps. viridis*.

debido a que las secuencias de aminoácidos donde se encuentran el donador y aceptor primarios y la zona de Q_a y el Fe no hemínico se encuentran casi totalmente conservadas en el PSII (Michel & Deisenhofer, 1988) (Figura 1.6).

Como se puede observar en la figura 1.6 los pigmentos se encuentran relacionados por una simetría doble formando dos posibles rutas para el transporte electrónico. El donador primario (D), formado por un dímero de Bchl, sería el punto de inicio para una reacción de transferencia electrónica a través de la membrana inducida por la luz. Cada una de las ramas de cofactores se denomina como A y B. Una vez que D es llevado a su primer estado singlete excitado, D^* , por un fotón de longitud de onda adecuada, a partir de este estado un electrón es transferido a $Bpheo_A$ con una vida media de 3 ps (Fleming et al., 1988; Breton et al., 1986). Este cofactor se puede identificar como un aceptor de electrones pues tiene su máximo de absorción ligeramente diferente del de su pareja en la otra rama $Bpheo_B$, gracias al conocimiento de la estructura del cristal se pueden distinguir mediante experimentos de difracción lineal (Knapp et al., 1985; Zinth et al., 1983). La vida media se acorta cuando este proceso se realiza a temperaturas cercanas a 0 K. La naturaleza exacta de esta reacción está actualmente siendo muy estudiada tanto desde el punto de vista teórico como práctico. Una de las principales cuestiones recae en el papel de la $Bchl_A$ accesoria localizada entre D y $Bpheo_A$ (Finkle et al., 1992; Williams et al., 1992). Desde $Bpheo_A$ el electrón es transferido a Q_a con una vida media de 200 ps a temperatura ambiente (Holzapfel et al., 1990; Kirmaier & Holten, 1987). En el transporte del electrón desde D a Q_a , éste ha atravesado casi toda la membrana. En un tiempo de unos 100 μs el electrón va desde Q_a hasta Q_b , que toma dos electrones y dos protones formando Q_bH_2 y entonces se disocia del centro de reacción, siendo su lugar sustituido por otra quinona del "pool" existente en la membrana. Los electrones y protones de Q_bH_2 serán utilizados en crear un $\Delta\mu H^+$ a través de la membrana. Una de las mayores sorpresas de este trabajo fué que aunque el centro de reacción guarda una clara simetría doble, la transferencia electrónica sólo se da en la rama A de los cofactores.

Esta organización parece ser similar en el centro de reacción del PSII, en donde además de las homologías entre ciertos dominios, se ha demostrado mediante espectroscopia

Raman que sólo 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 (Moëne-Loccoz et al., 1989). Además el estudio de los procesos fotoquímicos primarios en el complejo D1-D2-Cyt b559 ha revelado tiempos de vida para la separación de cargas muy similares al RC bacteriano y la ΔG de la reacción es dominado por el componente entrópico que con un descenso de la temperatura llega a hacerse menos negativo de modo bastante lineal, como en el RC bacteriano (Wasilewski, et al., 1989; Mimuro et al., 1988; Booth et al., 1991; Roelofs et al., 1991; Woodbury & 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 las dos vías de transferencia electrónica como en el RC bacteriano. Una diferencia está en que las Chl a monoméricas del centro de reacción del PSII no tienen conservados los residuos que servirían de ligandos.

El donador primario P680

La estructura de P680 es materia de gran debate (Rutherford, 1986) debido a que es único por su alto potencial redox (comparado con el PSI o el RC bacteriano) requerido para llevar a cabo el proceso de oxidación del agua en el PSII. Como ya se ha señalado antes las His con las que se asocian las Bchl del donador primario del RC bacteriano (P870 o P960) se conservan en el PSIIRC (Trebst, 1987; Michel & Deisenhofer, 1988). En un primer momento se pensó que P680 era un dímero por la comparación de su espectro diferencial *in vivo* y los espectros de EPR de monómeros de Chl a, cationes y dímeros en solventes orgánicos (van Gorkom et al., 1974). Por otra parte Davies et al. (1979) mostraron que las propiedades ópticas, redox y magnéticas de la Chl a monomérica podían variar según el solvente usado y propusieron que P680 era un monómero ligado cuyas características estarían 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 basal singlete, pero el estado de triplete (el cual se produce por la recombinación del estado $P680^+Pheo^-$) se podía localizar en una única Chl a. Estos datos fueron confirmados por medidas de EPR de muestras de PSII

orientadas en estado triplete (Rutherford, 1986) donde el triplete se localizó en una Chl a monómerica orientada casi paralela al plano de la membrana. Estos datos coinciden con los mismos experimentos realizados en *Rps. viridis* donde también se ha observado una desigualdad en la distribución de spin del estado triplete del par especial en medidas de EPR en un único cristal (Budil et al., 1987). Esto nos lleva también a la conclusión de que la recombinación del estado $D^+Bp_{heo_A}^-$, que produce el triplete, en esta bacteria reside principalmente en la Bchl del dímero que corresponde a la rama A. Sin embargo, el triplete en *Rb. sphaeroides* está distribuido de un modo más simétrico.

Con el aislamiento de la partícula D1-D2-Cyt b559 (Nanba & Satoh, 1987) quedó claro que había un solapamiento espectral muy fuerte entre todas las moléculas de Chl y Pheo del complejo y que el espectro de absorción de los pigmentos asociados con este complejo era bastante similar a los de los pigmentos asociados con los complejos de antena. No se da un desplazamiento muy marcado hacia el rojo de la banda de P680 respecto a la banda Qy de las Chl accesorias. Esta no es la situación en el caso de bacterias donde la Bchl monomérica asociada con el centro de reacción se diferencia claramente del par especial.

Donadores secundarios de electrones del P680: Z y el reloj del Mn

La principal diferencia entre el centro de reacción bacteriano y el del PSII radica en que este último cataliza 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 denominados compuestos Z y D e identificados como la Tyr 161 de D1 (Debus et al., 1988a; Metz et al., 1989) y la Tyr 160 de D2 (Barry & Babcock, 1987; Debus et al., 1988b; Vermaas et al., 1988). Aunque Z y D se encuentran en el complejo D1-D2-Cyt b559 no hay ninguna evidencia que sugiera que son activos en esta preparación. Ambos aminoácidos están asociados con los cuatro átomos de Mn que forman el denominado "reloj" de evolución de oxígeno constituyendo el también denominado dominio oxidante del PSII, los cuales rompen la molécula de agua liberando los electrones que a través de Z reducirán el donador primario P680. La función de D todavía no está clara, pues aunque puede reducir al P680 sólo lo hace en ciertas

condiciones especiales, y no se cree que sea el reductor habitual de P680. La unión de un complejo tetramérico de Mn es fundamental para el proceso de lisis del agua. En un primer momento se pensó que la proteína de 33 kDa era la responsable de la unión del Mn, pero se demostró que el complejo podía desprender O_2 en ausencia de dicha proteína (Ono & Inoue, 1984; Miyao & Murata, 1984). Parece ser que este complejo tetramérico se une a las proteínas D1 y D2 del centro de reacción (Coleman & Govindjee, 1987; Dismukes, 1988), aunque algunos autores llegan a localizarlos sólo en D1 (Metz et al., 1985; Metz et al., 1986, Seibert et al., 1989; Tamura et al., 1989; Svensson et al., 1990). Sin embargo la naturaleza exacta de sus ligandos es desconocida. Estudios de EXAFS han indicado que átomos como N u O son los mejores candidatos como posibles ligandos del Mn. Esto ha conducido a la sugerencia por algunos autores de diferentes residuos aminoacídicos (Asp, Asn, His, Glu, Gln) como fuentes de estos ligandos. Recientes evidencias bioquímicas relacionan al residuo Asp170 de D1, en el ensamblaje del complejo de Mn (Nixon & Diner, 1992b), así como a residuos de His de la zona (Preston & Seibert, 1991 a,b) y al carboxilo terminal de D1 (Nixon et al., 1992a).

Aceptores de electrones del P680

El aceptor primario de electrones de P680 es la Pheo activa del complejo D1-D2-Cyt b559 y es el primer intermediario del electrón hacia el denominado lado reductor del PSII integrado por las dos quinonas, Q_a y Q_b , y el átomo de Fe no hemínico entre ellas. Este cofactor todavía se encuentra en el espacio transmembranal y es el primer aceptor del electrón donado por P680 desde el estado excitado ($P680^*$), produciéndose la separación de cargas que origina el par de radicales $P680^+Pheo^-$. Este cofactor funciona facilitando un rápido y efectivo desplazamiento del electrón hacia Q_a resultando en un estado estable $P680^+Q_a^-$. A partir de comparaciones con el centro de reacción bacteriano se ha especulado con el posible papel del residuo Trp-255 en D2, 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 & Youvan, 1990).

La plastoquinona Q_a está muy próxima al lado estromal de la membrana tilacoidal, una vez que el electrón se encuentra aquí ha atravesado virtualmente la membrana tilacoidal.

Esta quinona no es fácilmente extraíble aunque se ha reemplazado por ubiquinona, además es difícil de reducir doblemente bajo condiciones fisiológicas (van Gorkom, 1974). Limitaciones probablemente impuestas por el ambiente proteico en el que se encuentra impiden la formación de Q_a^{2-} . El residuo His-213 de D2 se ha propuesto como uno de los posibles sitios de unión para Q_a (Vermaas et al., 1987; Vermaas et al., 1988).

El Fe no hemínico está localizado como en bacterias entre las dos quinonas y se encuentra ligado por cuatro residuos de His. La existencia de este átomo en el PSII fue probada por espectroscopia Mössbauer y de EPR (Petrouleas & Diner, 1986). Su función en la transferencia electrónica no está totalmente elucidada; en bacterias fotosintéticas se puede sustituir por otro catión divalente sin alterar significativamente la actividad (Debus et al., 1986; Kirmaier et al., 1986). Sin embargo la transferencia electrónica entre Q_a y Q_b decrece por un factor de dos en ausencia de un catión divalente (Debus et al., 1986) y el grado de transferencia de electrones entre Bphea y Q_a decrece en un factor de 20, lo que altera el rendimiento cuántico de la separación de cargas reduciéndolo a la mitad. Este átomo metálico del PSII presenta la peculiaridad con respecto al del centro de reacción de bacterias de estar ligado a un anión bicarbonato (Govindjee et al., 1978)

Q_b es el último transportador del electrón proveniente de P680, esta quinona se reduce doblemente como en bacterias para posteriormente desprenderse del PSII y dirigirse al Cyt b6f, siendo sustituida por otra quinona del "pool" de la membrana tilacoidal. El lugar de unión de esta quinona es donde se da la inhibición por diferentes herbicidas como el DCMU y la atrazina, interrumpiendo el transporte electrónico. Parece ser que la inhibición por dichos herbicidas es muy sensible al ambiente proteico en el que se encuentra la quinona. De esta manera se han encontrado mutantes resistentes a herbicidas. Tras la secuencia del gen que codifica para D1 se ha encontrado que la proteína es diferente en un solo aminoácido respecto al salvaje (Hirscherberg & McIntosh, 1983).

El citocromo b559

Esta proteína está formada por dos péptidos de 9 y 4 kDa, denominados respectivamente α y β , que coordinan el grupo hemo del citocromo. Estos péptidos se encuentran en una estequiometría de 1:1 (Widger et al., 1984) y son codificados por los genes cloroplásticos *psbE* y *psbF*. Ambos polipéptidos tienen una única región transmembranal en forma de α -hélice, y cada polipéptido contiene un único residuo de His que liga el grupo hemo (Babcock et al., 1985). La estequiometría de este componente en diferentes preparaciones del PSII parece ser de un grupo hemo por centro de reacción (Miyazaki et al., 1989), aunque hay una fuerte controversia sobre la existencia de uno o dos citocromos b559 *in vivo*. Los últimos trabajos realizados indican la existencia de un único Cyt b559 en membranas tilacoidales donde la manipulación para su aislamiento es mínima (Buser et al., 1992a). El potencial redox de esta hemoproteína es heterogéneo, así en centros intactos capaces de realizar la fotólisis del agua el citocromo b559 se encuentra en su forma de alto potencial, pero se reduce en muestras adaptadas a la oscuridad (Thomson et al., 1989). En PSII RC intactos el hemo puede ser oxidado por $P680^+$ en ciertas condiciones, a través de una de las Chl monoméricas (Buser et al., 1992b), para luego ser rereducido por el "pool" de plastoquinonas. Este proceso de óxido-reducción se ha sugerido como mecanismo de protección del donador primario P680 frente a la fotoinhibición. Aunque también se ha propuesto que este citocromo podría funcionar como una bomba de protones translocando protones al lumen del tilacoide (Arnon & Tang, 1988).

2.- MATERIALES Y METODOS

2.1.- Cultivo de *Beta vulgaris*

Para este trabajo se utilizaron semillas de la planta superior *Beta vulgaris* (remolacha) variedad Monohill donadas por Hilleshög España (Valladolid). Para obtener el material biológico de partida, las plantas se crecieron en cultivo hidropónico, en cámaras bioclimáticas bajo condiciones controladas:

Intensidad de luz	400 μ E. m ² . s ⁻¹
Temperatura	25° C
Humedad	80 %
Rango del espectro	400-700 nm

El medio de cultivo utilizado fué el descrito a continuación, conocido como solución nutritiva de Hoagland. Para su preparación se parte de las siguientes soluciones madre :

Solución nutritiva

Solución 1

100 ml para 20 L

<u>Compuesto</u>	<u>g/L</u>
KNO ₃	50,55
MgSO ₄ .7H ₂ O	49,3
KH ₂ PO ₄	27,5
NaCl	5,85

Solución 2

50 ml para 20 L

<u>Compuesto</u>	<u>g/L</u>
Ca(NO ₃) ₂	218

Solución microelementos

10 ml para 20 L

<u>Compuesto</u>	<u>g/L</u>
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
BO ₃ H ₃	2,86
Na ₂ MoO ₄	0,025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,23
CuSO ₄	0,06

Solución de hierro

60 ml para 20 L

<u>Compuesto</u>	<u>g/L</u>
Secuestrene	14

Las semillas son tratadas con un fungicida (Benlate, Du Pont) al 0.1 % en agua destilada durante dos horas, para posteriormente ser lavadas durante un día con agua destilada, eliminándose la capa protectora con la cual vienen cubiertas. Las semillas ya lavadas se colocan en una bandeja con vermiculita (lecho poroso) previamente humedecida con agua destilada y se cubren con este material también humedecido. La bandeja se introduce en la cámara bioclimática donde la humedad del lecho se mantiene con solución nutritiva de Hoagland diluida a 1/8.

Tras siete días aparecen pequeñas plántulas de las cuales 50 se llevan a hidropónico en un recipiente de 20 L con solución nutritiva 3/4 de la de Hoagland 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 con solución nutritiva de Hoagland y borboteo de aire. Un mes después se recogen las hojas de las plantas que sirven como material de partida para fraccionamientos y purificaciones.



Figura 2.1.- Cultivo de *Beta vulgaris* en cámara bioclimática.



2.2.- Fraccionamiento y purificación

Tomando como material de partida el tejido foliar de la planta, se llevó a cabo un fraccionamiento subcelular para obtener las membranas fotosintéticas, las cuales servirán posteriormente como material de partida para aislar los diferentes complejos cromoproteicos localizados en ellas.

2.2.1.- Aislamiento de membranas del Fotosistema II

El método seguido para la purificación de las membranas de fotosistema II fue básicamente el de Berthold et al. (1989) con algunas modificaciones como se indica a continuación. Este proceso se fundamenta en la localización preferencial del fotosistema II en las membranas tilacoidales apiladas que forman los grana y su solubilización parcial mediante el detergente no iónico Triton X-100 (TX-100) (Boehringer, especialmente purificado para investigación en membranas). Las soluciones tampón utilizadas fueron:

Tampón B1	Concentración	Tampón B2	Concentración
NaCl	400 mM	NaCl	150 mM
MgCl ₂	2 mM	MgCl ₂	5 mM
Tricina (pH=8)	20 mM	Tricina (pH=8)	20 mM
BSA	0.2 %	BSA	0.2 %
Tampón B3	Concentración	Tampón B4	Concentración
NaCl	15 mM	NaCl	15 mM
MgCl ₂	5 mM	MgCl ₂	5 mM
MES (pH=6)	50 mM	MES (pH=6)	50 mM
		Sacarosa	400 mM

Para la solubilización con detergente se partió de una solución madre de TX-100 al 20% .

Las hojas son recogidas y troceadas en pequeñas porciones procurando evitar la desecación del material. Una vez realizado este proceso el material se pesa y se deposita en un "blender" donde se homogeneiza con tampón B1 (2 ml de tampón por g de material). Una vez homogeneizado el tejido foliar se obtiene un extracto crudo, el cual es filtrado una vez a través de una capa de papel de filtro Miracloth (Hoechst, Calbiochem). El filtrado es recogido y centrifugado en una centrífuga Sorvall (Dupont) a 1.500 rpm en un rotor GSA durante 1 minuto para lavar el material y eliminar las partículas mayores. Tras la centrifugación se desecha el sedimento y se recoge el sobrenadante el cual es centrifugado de nuevo a 10.000 rpm en un rotor GSA durante 10 minutos. Una vez desechado el sobrenadante, el sedimento es resuspendido en tampón B2 suavemente con un pincel. El material resuspendido en tampón B2 es centrifugado de nuevo a 10.000 rpm en un rotor SS-34 durante 10 minutos. El sedimento es resuspendido cuidadosamente en tampón B3. Se mide la concentración de Chl (Arnon et al., 1949) del material resuspendido mediante extracción con acetona al 80 % (v/v) a 4 °C. Una vez extraídos los pigmentos, la solución es centrifugada en una centrífuga minifuge (Beckman) para sedimentar los restos de proteína, llevándose a cabo la lectura de absorción de la solución a 645 y 663 nm. La concentración de Chl se estimó mediante la siguiente fórmula :

$$[\text{Chl}] \text{ mg/L} = 20,2 \cdot \text{Abs } 645 \text{ nm} + 8,02 \cdot \text{Abs } 663 \text{ nm}$$

La concentración de Chl en el material resuspendido en B3 se deja a 3 mg/ml y se calcula la cantidad de Chl total que hay en la solución. Tras conocer la cantidad de clorofila total se procede a solubilizar el material, para ello se ha de añadir TX-100 de la solución madre al 20 % en una proporción de 25 mg de TX-100 / mg de Chl. Una vez añadido el detergente, se deja incubar la suspensión durante 30 minutos con agitación. Finalizada la incubación el material es sometido a una centrifugación a 6.200 rpm en un rotor SS-34 durante 5 minutos. El sedimento de la centrifugación compuesto por material no solubilizado es desechado y el sobrenadante centrifugado en una ultracentrífuga L8-70M (Beckman) a 40.000 x g durante 30 minutos. El sedimento de la centrifugación es resuspendido suavemente en tampón B4, y una

vez homogeneizado uniformemente se mide la concentración de clorofila y la relación de Chl a / Chl b, lo cual nos da una idea de la pureza de la preparación de PSII_m.

$$[\text{Chl a}] \text{ mg / ml} = 12,7 \cdot \text{Abs } 663 \text{ nm} - 2,69 \cdot \text{Abs } 645 \text{ nm}$$

$$[\text{Chl b}] \text{ mg / ml} = 22,9 \cdot \text{Abs } 645 \text{ nm} - 4,68 \cdot \text{Abs } 663 \text{ nm}$$

La preparación de PSII_m es entonces congelada a 77 K y almacenada 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.

2.2.2.- Aislamiento del "oxygen-evolving core complex" (OECC)

Este complejo cromoproteico es la partícula mínima del PSII que aún conserva la propiedad de producir O₂ cuando es iluminado. Para su obtención se lleva a cabo una nueva solubilización, esta vez a partir de PSII_m con el detergente Octil -β-D-glucopiranosido (OGP) (Boehringer). Las soluciones tampón a usar durante el proceso son :

Tampón OECC1	Concentración	Tampón OECC2	Concentración
Sacarosa	400 mM	Sacarosa	400 mM
NaCl	500 mM	NaCl	-----
CaCl ₂	10 mM	CaCl ₂	10 mM
MES (pH=6.00)	50 mM	MES (pH=6.00)	50 mM

Las PSII_m son descongeladas y posteriormente diluidas 4 veces en solución tampón B3 (ver método de preparación de membranas del fotosistema II) para ser sedimentadas por ultracentrifugación a 40.000 rpm en el rotor 70 Ti durante 40 minutos. Una vez sedimentadas las membranas fotosintéticas son resuspendidas a 1.5 mg / ml de Chl en tampón

OECC1 más 35 mM de OGP. La adición de detergente se realiza gota a gota y con leve agitación. Esta suspensión se deja agitando durante 15 minutos, y tras la incubación el volumen de solubilización se mezcla con dos volúmenes de tampón OECC1. El material es centrifugado a 40.000 x g durante 90 minutos. Una vez finalizada la centrifugación se recoge el sobrenadante, desechándose el sedimento compuesto en su mayoría por la antena LHCII. El sobrenadante es dializado frente al tampón OECC2 durante 90 minutos, usando una tripa de diálisis (Spectrapore) de 50 kDa de corte molecular. Tras la diálisis la muestra es diluida con OECC2 al 25 %.

La preparación diluida es centrifugada de nuevo a 40.000 x g durante 90 minutos., el sedimento resultante de esta centrifugación constituye el OECC y es resuspendido en tampón OECC2. El complejo proteico es congelado a 77 K y posteriormente almacenado a -80 °C. Todo el procedimiento se realiza a 4 °C y en baja intensidad de luz.

2.2.3.- Aislamiento de las proteínas de la antena intrínseca de 47 y 43 kDa

Para la purificación de estas cromoproteínas de membrana íntimamente relacionadas con el centro de reacción del fotosistema II se toma como material de partida el OECC, pero este complejo será previamente desprovisto de la proteína extrínseca de 33 kDa gracias a su incubación en una disolución con alta fuerza iónica y un pH básico. Para ello se sigue el siguiente proceso :

El OECC es sedimentado a 40.000 x g durante 90 minutos, previa dilución 4 veces de la muestra en tampón OECC2 (ver método de preparación de OECC). Una vez sedimentado el complejo proteico este es resuspendido en tampón 0,8 M Tris-HCl, pH 8,5, a 4 °C e incubado en este tampón durante 30 minutos a 4 °C. Finalizada la incubación la muestra es centrifugada a 35.500 x g durante 30 minutos. El sedimento de la centrifugación anterior es lavado con un tampón 200 mM NaCl, 300 mM sacarosa, 10 mM NaCl, 50 mM MES, pH 6,0, en las mismas condiciones. Finalmente el complejo, desprovisto de la proteína de 33 kDa,

sedimentado en esta centrifugación es resuspendido en un tampón: 0.4 M sacarosa, 10 mM NaCl, 50 mM MES, pH 6,0, a 1,5 mg Chl / ml.

El OECC tratado con Tris a la concentración indicada es incubado con un mismo volumen de una solución al 15 % de β -dodecil maltósido (DM) (Boehringer), 4 M de LiClO_4 , 20 mM Bis-Tris, pH 6,0, durante 10 minutos. Tras la solubilización del complejo proteico la muestra es dializada durante 2 h frente a un tampón 20 mM Bis-Tris, pH 6,0.

El dializado anterior se carga en una columna de DEAE-Fractogel TSK 650 S (Merck) de 1.6 x 6 cm previamente equilibrada con tampón 20 mM Bis-Tris pH 6,0, y 0.05 % de DM a un flujo de 3 ml/minuto. Una vez cargada la muestra, la columna es lavada con el tampón de equilibrado hasta que el eluyente pierde color. En la parte superior de la columna se observa una banda verde. Entonces las cromoproteínas se eluyeron con 90 ml de un gradiente lineal de 0 a 175 mM de LiClO_4 a un flujo de 0.5 ml / minuto. Se recogen fracciones de 2 ml y tras llevar a cabo un espectro de absorción de cada una de las fracciones se reúnen las mejores de cada tipo según su espectro de absorción y se dializan frente a 2 l del tampón 20 mM Bis-Tris pH 6,0 durante 3 h.

2.2.4.- Purificación del centro de reacción del fotosistema II, complejo D1-D2 Cyt b559

El aislamiento del centro de reacción del PS II (PSII RC) se realizó básicamente según Nanba & Satoh (1987) con las modificaciones citadas a continuación. Para el aislamiento de este complejo se llevó a cabo una solubilización parcial de PSII_m, para posteriormente purificar el centro de reacción mediante cromatografía de intercambio iónico.

Se toman PSII_m las cuales son descongeladas en agua a 37 °C durante unos 10 minutos. Una vez descongeladas se mide su concentración de Chl total (ver sección 2.2.1.) y se toman 30 mg Chl en el caso de la preparación RC IIb u 80 mg Chl para la preparación RC IIa. La muestra es diluida de 20 a 30 veces en una solución tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, a 4

°C, para ser a continuación centrifugada a 100.000 x g durante 40 minutos. Tras la centrifugación el material sedimentado es resuspendido suavemente en la solución tampón anterior a una concentración de 1,25 mg Chl / ml. Posteriormente es añadido el volumen apropiado de detergente TX-100 a partir de una solución madre al 20 % quedando la suspensión resultante a una concentración de 1 mg Chl / ml y 4 % de TX-100. La muestra es incubada en estas condiciones durante 1 h tras la cual es centrifugada a 100.000 x g durante otra h.

Se recoge el sobrenadante de la centrifugación anterior, el cual se fija en una columna de DEAE-Fractogel TSK 650 S (Merck) de 1.6 x 16 cm, previamente equilibrada con 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 30 mM NaCl y 0.05 % de TX-100 a un flujo de 3 ml/minuto. La columna es lavada hasta que la absorbancia del eluato sea de 0.01 O.D. a 670 nm en el caso de RCIIa o menor de 0.005 O.D. (a la misma longitud de onda) en el caso de RCIIb. Este proceso de lavado de la columna es largo y dependiendo del tipo de preparación se suelen usar entre 5 y 6,5 L de solución tampón de equilibrado; durante el lavado se observa en el gel la presencia de una banda verde que avanza durante el proceso. Una vez lavada la columna la muestra es eluida con 150 ml de volumen total de un gradiente lineal de 30 a 200 mM de NaCl a un flujo de 1 ml/minuto. Tras realizar el espectro de absorción a las diferentes fracciones recogidas, se reúnen las mejores. Dependiendo del uso al que vaya a ser destinada la muestra se llevará a cabo uno de los siguientes procesos :

2.2.4.1.- Intercambio de detergente

El complejo D1-D2-Cyt b559 ya purificado, pero en una solución tampón con TX-100, es diluido 4 veces con solución tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, y fijado en una columna de DEAE-Fractogel TSK 650 S (Merck) (1.6 x 3 cm). Tras fijar el material, la columna es lavada a un flujo de 2 ml / minuto con 50 ml de solución tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, más 2 mM de β -dodecil maltósido. Una vez sustituido el detergente, el complejo proteico es eluido con 170 mM de NaCl en el tampón de lavado. Se recogen las fracciones adecuadas, fácilmente reconocibles por su intenso color verde, y se mide su espectro de absorción para posteriormente dializarlas frente a tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,2 durante 6 h.

2.2.4.2.- Precipitación con polietilenglicol (PEG)

El proceso seguido fué el desarrollado por McTavish et al. (1989) mediante el cual se consigue retirar el TX-100 y concentrar el complejo proteico. Una vez reunidas las fracciones del complejo ya purificado se le añadieron 0.325 g de PEG (Sigma, pm=3.350) por ml siendo dispersado cuidadosamente con la ayuda de un pincel. Después de 90 minutos de incubación la

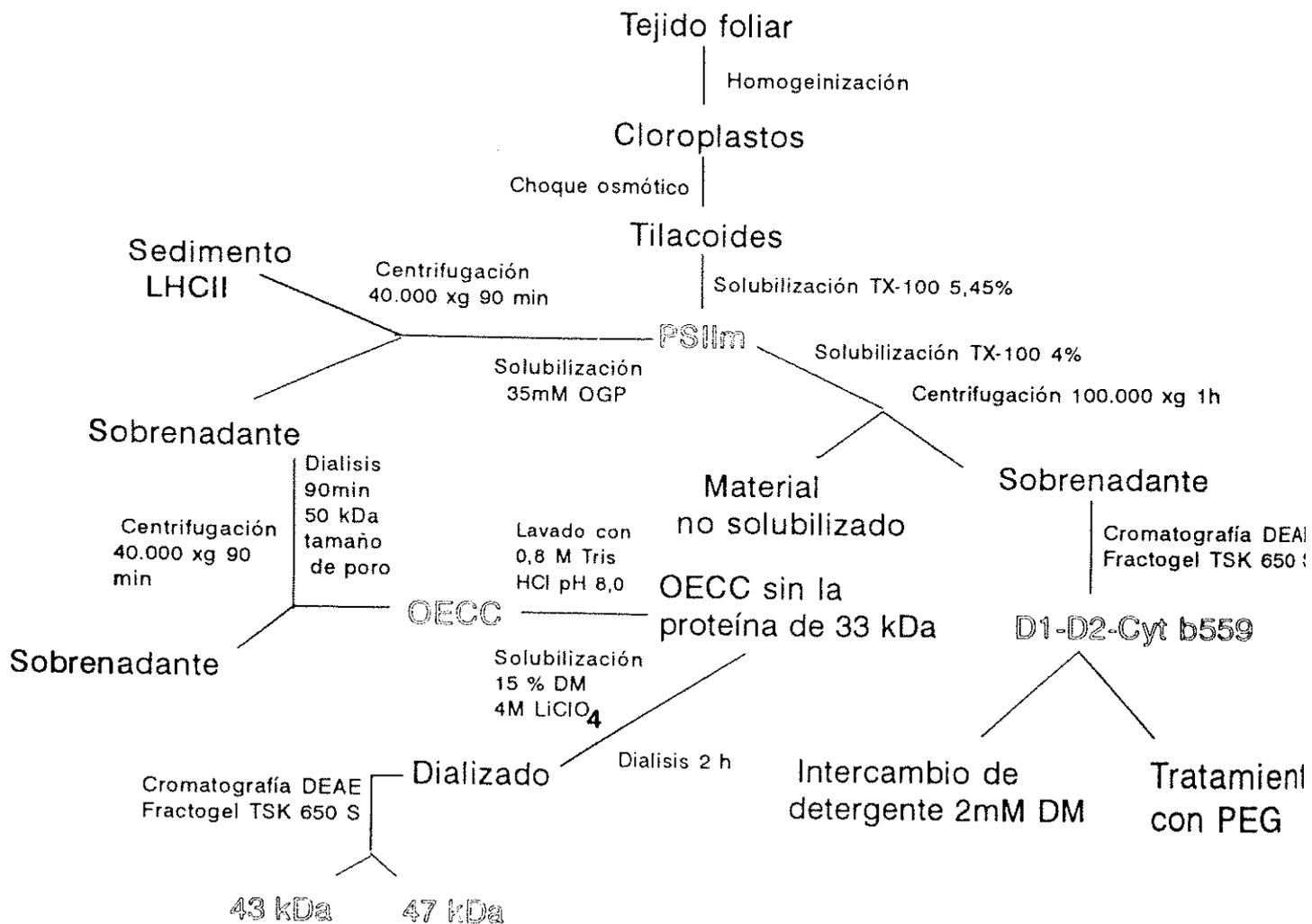


Figura 2.2.- Esquema de los procesos de purificación de PS II_m, OECC, complejo D1-D2-Cyt b559 y de las antenas de 47 y 43 kDa.

suspensión fue centrifugada a 31.300 x g durante 40 minutos. El sedimento fue resuspendido en un pequeño volumen de tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,2. Todos los pasos de purificación fueron llevados a cabo a 4 °C y en oscuridad.

2.2.5.- Electroforesis SDS-PAGE

Se llevaron a cabo geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) (Bio-Rad) siguiendo el método de Laemli (1970) con ciertas modificaciones. Para la preparación del gel se parte de las siguientes soluciones madre :

Acrilamida 30 %, bisacrilamida 0,9 %

Tampón 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Tampón 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

SDS 10 %

Persulfato amónico 10 % (se prepara en el momento de hacer el gel)

Tampón de cubeta :

Depósito del cátodo 0,025 M Tris-HCl pH 8,3

0,192 M Glicina

0,1 % SDS

1mM EDTA

Depósito del ánodo 0,25 M Tris-HCl, pH 8,3

1,92 M Glicina

0,1 % SDS

El porcentaje de acrilamida en el gel separador se varió apropiadamente teniendo en cuenta el peso molecular de la muestra. Así en el caso de PSII_m y OECC el gel separador fué de un 15 % de acrilamida mientras que en el caso de las antenas intrínsecas de 47 y 43 kDa y del complejo D1-D2-Cyt b₅₅₉ el gel fué de un 12,5 % de acrilamida además de contener 6 M de urea.

Solución	15 %	12,5 %
Acrilamida 30 %, bis acrilamida 0.9%	7,5 ml	6,25 ml
Tampón 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	5,0 ml	5,0 ml
SDS 10 %	0,15 ml	0,15 ml
Persulfato amónico 10 %	0,15 ml	0,15 ml
Agua destilada	2,2 ml	3,45 ml
Urea	-----	0,36 g / ml

Se añaden 10 µl de TEMED a la solución y se vierte en el molde rápidamente, para a continuación añadir unos mililitros de alcohol isopropílico para evitar el contacto con el aire y favorecer la formación uniforme del frente. Se deja polimerizar durante 45 minutos.

Para preparar el gel concentrador 5 %, se mezclan en un vaso de precipitados:

Acrilamida 30 %, bisacrilamida 0,9 %	2,5 ml
Tampón 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	5,0 ml
SDS 10 %	0,1 ml
Persulfato amónico 10 %	0,1 ml
Agua destilada	2,3 ml

Se añaden 10 µl de TEMED y se vierte el gel sobre el gel separador después de secar los restos de alcohol isopropílico. Se coloca el peine y se deja polimerizar durante 45 minutos.

El tamaño total del gel es de 18 x 16 x 0,75 cm. La electroforesis se realiza en un aparato de electroforesis vertical (Hoeffer) a una temperatura de 15 °C.

La tinción se llevó a cabo durante 1 h con azul de Coomasie 250 R (Sigma) en una solución con la siguiente composición :

Azul de Coomasie	0,25 g
Metanol	450 ml
Acido acético	60 ml
Agua destilada	490 ml

Posteriormente el gel se llevó a una solución con la siguiente composición:

Metanol	250 ml
Acido acético	750 ml
Agua destilada	1500 ml

Se sumerge el gel en el baño decolorante, cambiando éste cuantas veces sea preciso hasta que el fondo del gel quede claro.

2.2.5.1.- Determinación del peso molecular

El peso molecular de las proteínas que componen las PSII_m, el complejo OECC, así como las proteínas de la antena intrínseca y el centro de reacción se ha calculado en geles de poliacrilamida con SDS mediante el sistema BioImage Milligen (Millipore), utilizando como patrones indicadores de peso molecular las siguientes proteínas: fosforilasa b (97,4 kDa), seroalbúmina bovina (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina de soja (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa) servidas en mezcla para calibración de electroforesis (Bio-Rad).

2.2.5.2.- Cálculo del punto isoeléctrico (pI)

El cálculo del pI de cada uno de los péptidos del complejo D1-D2-Cyt b559 así como de los péptidos de 47 y 43 kDa que componen la antena intrínseca se realizó en un VAX / VMS versión 5.5 (Digital Equipment Corporation) a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína en la librería de secuencias del EMBL en Heidelberg, mediante el uso del programa "Isoelect" dentro del programa "Protein Analysis" del paquete de alineación de secuencias GCG

2.3.- Análisis químico del complejo D1-D2-Cyt b559

La composición química del centro de reacción del fotosistema II así como la estequiometría de sus componentes proteicos y cofactores se determinó mediante las técnicas analíticas expuestas a continuación. Para llevar a cabo este proceso el complejo D1-D2-Cyt b559 una vez purificado fué concentrado con PEG (ver apartado 2.2.4.2) para posteriormente ser sometido a los siguientes análisis.

2.3.1.- Extracción de pigmentos

Para determinar el tipo de pigmentos ligados al complejo D1-D2-Cyt b559 se toma una alícuota de 70 μl de centro de reacción del fotosistema II la cual se mezcla en un tubo Eppendorf con 930 μl de acetona al 100 % a 4 °C y a continuación es sonificado en un baño de ultrasonidos (Selecta) durante 3 minutos para favorecer la extracción. Una vez realizada la extracción, la muestra se centrifugó durante 1 minuto en una centrifuga de mesa (Minifuge, Beckman) para sedimentar las proteínas desnaturalizadas pudiéndose observar en el fondo del tubo un sedimento de color blanquecino. El sobrenadante de color verde es recogido y depositado en una cubeta de espectrofotometría la cual es a continuación sellada para evitar la evaporación del disolvente y se realiza un espectro de absorción a la muestra. Todo el proceso se llevó a cabo a 4 °C en la oscuridad.

2.3.2.- Feofitinización

La feofitina a es un pigmento idéntico en composición química a la clorofila a con la única diferencia de la ausencia del átomo de Mg central en el anillo tetrapirrólico. Este ligero cambio en su composición química conlleva un notable cambio en el comportamiento espectroscópico de este pigmento respecto a la clorofila a. Es conocido que la acidificación de un extracto de clorofila a provoca la pérdida del átomo de Mg central en el anillo tetrapirrólico,

convirtiéndose ésta en feofitina a lo cual es fácilmente comprobable espectrofotométricamente debido a las diferencias espectrales entre ambos pigmentos.

Para feofitinizar totalmente la clorofila a del extracto de pigmentos del complejo D1-D2-Cyt b559 se añade en la cubeta 10 μl de una disolución 600 mM de HCl para hacer en la cubeta una concentración final de 1,5 mM de HCl. La concentración de feofitina total fue entonces determinada usando un coeficiente de extinción $\epsilon = 49,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 666 nm (Vernon et al., 1960). El proceso se llevó a cabo a 4 °C en la oscuridad.

El cálculo de la concentración de feofitina a en el extracto no feofitinizado se realizó usando un coeficiente de extinción $\epsilon = 6,504 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Montoya et al., 1991) determinado a partir del espectro de absorción del extracto feofitinizado en base a la comparación entre absorbancias en las bandas de feofitina a 666 nm y 535 nm. La concentración de clorofila a según este método se puede medir por diferencia en el contenido de feofitina a entre el extracto acidificado y el no acidificado.

2.3.3.- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la medida de la cantidad de clorofila a y β -caroteno en los extractos del complejo D1-D2-Cyt b559 se llevó a cabo un análisis por HPLC según el método de de las Rivas et al., 1990. La extracción de pigmentos se realizó como en 2.3.1. con la salvedad de que la muestra se pasó a través de un filtro Millex de 0,22 μm (Millipore) antes de ser inyectada en el sistema. La cromatografía se realizó en una columna Novapak C₁₈ (Waters) de 100 x 8 mm (4 μm tamaño de partícula) acoplada a un módulo de compresión radial montado en un cromatógrafo Beckman System Gold (Beckman).

La columna fué equilibrada con la fase móvil 1 durante 7 minutos. La muestra fué inyectada y durante 2 minutos más se bombeó la fase móvil 1 para a continuación pasar durante un minuto la fase móvil 2. Finalmente la fase móvil 3 fué bombeada hasta que

Fase móvil 1	proporción	Fase móvil 2	proporción	Fase móvil 3	proporción
Acetonitrilo	7	Acetonitrilo	7	Acetonitrilo	7
Metanol	1	Metanol	0,96	Metanol	0,96
		Agua	0,04	Agua	0,04
		Acetato de etilo	2	Acetato de etilo	8

eluyó el β -caroteno lo cual representa unos 7 ú 8 minutos.

2.3.4.- Cálculo de Cyt b559

La cantidad de Cyt b559 en el centro de reacción del fotosistema II se midió gracias a las propiedades redox de su grupo hemo mediante espectros diferenciales de absorción. La concentración de este componente del complejo D1-D2-Cyt b559 fué determinada también por el derivado piridín-alcalino hemocromo (Appleby, C.A., 1969).

2.3.4.1.- Espectro diferencial

Se prepara una disolución 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$ y otra saturada de $Na_2S_2O_4$, la muestra es diluida en tampón 50 mM Tris-HCl pH, 7,2, de manera que su concentración final sea de 3 μg Chl a / ml. En la cubeta de referencia se añade 1 μl de la disolución de $K_3Fe(CN)_6$ de manera que su concentración final en la cubeta sea de 5 μM , a la cual el Cyt b559 se encuentra totalmente oxidado. Se hace la línea de base en el espectrofotómetro (Beckman DU-64) y a continuación se añaden 10 μl de la disolución saturada de $Na_2S_2O_4$ en la cubeta de referencia, se agita la cubeta y se realiza el espectro diferencial. La concentración fué calculada usando un coeficiente de extinción $\epsilon = 21,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ en la banda α del Cyt b559 a 559 nm (Garewall & Wasserman, 1974).

2.3.4.2.- Derivado piridín-alcalino hemocromo

Este derivado fué preparado tratando 0.76 μg Chl a/ml del complejo D1-D2-Cyt b₅₅₉ con una solución 0,1 N NaOH, 33 % de piridina y 0,27 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,2. Esta mezcla de reacción es depositada tanto en la cubeta de referencia como en la de medida y entonces se toma la línea de base en el espectrofotómetro (Beckman DU-64), para a continuación añadir unos pocos granos de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ a la muestra en la cubeta de referencia y medir el espectro diferencial. La concentración de la hemoproteína se determinó usando un coeficiente de extinción $\epsilon = 23,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ en la banda α a 556 nm.

2.3.5.- Determinación de proteína

El contenido de proteína se ha medido por un método modificado del de Lowry (1951), adaptado a las características de las proteínas de membranas fotosintéticas (Markwell et al., 1981).

Reactivos:

A: 2 % Na_2CO_3 , 0,17 % Tartrato sódico, 1 % SDS en NaOH 0,1 N

B: 4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada

Reactivo de Folin-Ciocalteu.

En el momento de la determinación se preparan los siguientes reactivos:

C: 100 ml A + 1 ml B

D: Folin-Ciocalteu diluido a la mitad con agua destilada.

Patrones:

Se utilizaron soluciones de albúmina bovina (BSA) de diferentes concentraciones preparadas tras dilución de una solución a 1 mg/ml conservadas a -10°C .

Procedimiento:

Se mezclan diferentes cantidades de muestra o patrón (20 a 100 μl , el patrón en tampón de la muestra) con tres ml de C y se añaden de 980 a 900 μl de agua destilada, según corresponda para completar 4 ml. Se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se añaden 300 μ l de reactivo D con agitación y se deja incubar durante 45 minutos y a continuación se mide la absorbancia de la muestra a 730 nm frente al blanco.

Con las absorbancias de las soluciones de albúmina (por triplicado) se construye una curva de calibrado en la que se interpola la concentración de la muestra (dos o tres diluciones por triplicado).

2.3.6.- Análisis de aminoácidos del complejo D1-D2-Cyt b559

Las muestras de proteína se dializaron durante 48 h frente a agua desionizada para ser posteriormente liofilizadas. Todo el manejo comenzando desde la liofilización se llevo a cabo en el mismo tubo. Para cada tubo se añadió 0.5 ml de HCl (Pierce Chemical Co.) y una gota de fenol. Los tubos fueron sellados en vacío y se mantuvieron a 110 °C durante 24, 48, 72, o 102 horas. Los hidrolizados se secaron en vacío y se disolvieron posteriormente en 100 μ l de tampón citrato 0.2 M, pH, 2.2, para a continuación ser centrifugados a 2.000 x g durante 5 minutos. El aminoácido Met se determinó a partir de los hidrolizados en HCl después de su oxidación con ácido perfórmico. El análisis de aminoácidos se llevó a cabo en un analizador Beckman.

2.4.- Medidas de actividad

Algunas de las partículas aisladas del PS II conservan la capacidad característica de este fotosistema de desprender O_2 en respuesta a la iluminación. Esta propiedad resulta muy útil para poder medir la actividad de las partículas de membrana y complejos cromoproteicos aislados. Así se han realizado medidas de actividad de evolución de O_2 en diferentes tipos de partículas aisladas: tilacoides, membranas del fotosistema II y OECC que son indicativas del grado de pureza y de la integridad de la preparación. El centro de reacción del fotosistema II purificado pierde su capacidad de desprender oxígeno al no conservar el "reloj" del Mn, por esta razón la actividad del complejo D1-D2-Cyt b559 se determinó mediante otros parámetros de medida que se expondrán posteriormente.

2.4.1.- Medidas de evolución de oxígeno

El desprendimiento de O_2 se midió por métodos polarográficos en un electrodo de O_2 de Clark acoplado a una camisa de agua circulante conectada a un baño termostatzado a 25 °C. El medio de ensayo para membranas del PS II consistió en 0,3 M de sacarosa, 10 mM de NaCl, 25 mM de tampón MES-NaOH, pH 6,5, y 0,5 mM de DCBQ ó 0,2 mM de silicomolibdato (SiMo), ó 1 mM de $Fe_3K(CN)_6$ como aceptores de electrones. Para los ensayos realizados con $Fe_3K(CN)_6$ el tampón del medio se cambió por HEPES-NaOH, pH 7,0, y la sacarosa se eliminó debido a que su presencia reducía considerablemente la actividad de evolución de O_2 con este aceptor. El medio de ensayo para tilacoides estuvo compuesto por 10 mM de NaCl y 25 mM de HEPES-NaOH, pH 7,0, para los tres aceptores artificiales de electrones. Las fuentes de luz fueron dos lámparas de proyector situadas a ambos lados de la cubeta del electrodo. La luz fué filtrada a través de 9.5 cm de agua. La intensidad de la luz en ambas caras de la cubeta fué de $2.200 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Los aceptores de electrones se prepararon de la siguiente forma: DCBQ fué disuelto en 100 % de etanol de 96°, SiMo en una disolución acuosa al 50 % de DMSO y $Fe_3K(CN)_6$ en agua destilada. Tanto DCBQ como $Fe_3K(CN)_6$ fueron diluidos 1:100 mientras que SiMo lo fué 1:1000. Los aceptores de electrones se añadieron

justo antes de medir la actividad de Hill. En todas las medidas la concentración de Chl fue de 6,66 µg/ml para membranas de PSII y de 19 µg/ml para tilacoides.

2.4.1.1.- Inhibición por Cu(II), DCMU y o-fenantrolina

Membranas del PS II a 6,6 µg de Chl/ml y tilacoides a 19 µg de Chl/ml en tampón 0,3 M de sacarosa, 10 mM de NaCl, 25 mM de MES-NaOH, pH 6,5, y 10 mM de NaCl, 25 mM HEPES-NaOH, pH 7,0, respectivamente, se preincubaron con diferentes concentraciones de cada uno de los inhibidores a 4 °C durante 10 minutos con agitación ocasional. Finalizado el tiempo de incubación la suspensión se calentó hasta 25 °C en un baño termostatzado y se midió la actividad de evolución de O₂.

2.4.1.2.- Digestión de los tilacoides con tripsina

Los tilacoides a una concentración de 19 µg de Chl/ml en tampón 10 mM NaCl y 25 mM HEPES-NaOH, pH 7,0, fueron preincubados con diferentes cantidades de tripsina (10-250 µg) (Sigma, EC3.4.21.4.) durante 3 minutos. La digestión se paralizó mediante la adición de cantidades idénticas de inhibidor de tripsina, BPTI, y se midió la actividad de evolución de O₂. Tanto la tripsina como el BPTI fueron diluídos 30 veces.

2.4.2.- Complejo D1-D2-Cyt b559

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. La reducción de la feofitina, así como el transporte electrónico secundario dentro del complejo puede seguirse espectrofotométricamente bien midiendo los cambios de absorbancia inducidos por luz o usando un donador y un aceptor de electrones artificiales observando la aparición en la mezcla de reacción de este último en estado reducido.

2.4.2.1.- Fotoacumulación de feofitina

El espectro diferencial de luz menos oscuridad fué realizado en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-3000) doble haz / doble longitud de onda a 5 °C en una cubeta de 1 cm de paso de luz. La muestra se iluminó desde la parte superior de la cubeta usando un cable de fibra óptica. La intensidad de la luz en la superficie de la cubeta fué de aproximadamente $2.000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La luz actínica se seleccionó mediante un filtro de corte en el rojo, Schott RG665, y otro para impedir el calentamiento de la muestra, Schott KG3, en la salida de la fibra óptica. Para proteger el fotomultiplicador de la intensidad de luz utilizada se usó un filtro Schott BG39. El complejo D1-D2-Cyt b559 fué diluido a $5 \mu\text{g Chl/ml}$ en tampón 60 mM Tris-HCl, pH 8,5, y a continuación se añadió en la cubeta metilviológeno y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ a una concentración final en la cubeta de $1 \mu\text{M}$ y 5 mg/ml , respectivamente. La muestra se incubó durante unos 2 minutos antes de cada medida.

2.4.2.2.- Transporte electrónico secundario

Las actividades relativas de transporte electrónico en estado estacionario fueron ensayadas usando 1 mM de MnCl_2 y $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de SiMo como donador y aceptor artificiales de electrones, respectivamente (McTavish et al., 1989; Barber et al., 1987). La reducción de SiMo fue seguida por el incremento de absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro de doble haz / doble longitud de onda (Shimadzu UV-3000). Las suspensiones del complejo D1-D2-Cyt b559 fueron diluidas en tampón 60 mM Tris-HCl, pH 8,5, y se iluminaron desde la parte superior de la cubeta con un proyector. 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 (tras ser filtrada) en la parte superior de la muestra fué de $1.200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{cm}^{-1}$, la cual resultó ser saturante para las concentraciones de clorofila usadas. La concentración de SiMo reducido en un periodo de iluminación dado se calculó usando un coeficiente de extinción $\epsilon = 4.8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 600 nm

(Barber et al., 1987), teniendo en cuenta que para reducir completamente una molécula de SiMo se necesitan cuatro electrones. Todas las medidas fueron realizadas a 4 °C.

2.5.- Espectroscopia

La espectroscopia es la rama de la ciencia que se ocupa del estudio de la estructura de la materia mediante su interacción con radiaciones. En fotosíntesis los fenómenos originados por las radiaciones (en el caso de plantas en el rango visible del espectro) son la base del evento fotosintético. El estudio de las proteínas de membranas fotosintéticas necesita el uso de esta "herramienta" para poder comprender tanto su estructura como las funciones que llevan a cabo. Por ello durante el desarrollo de este trabajo se han usado diferentes tipos de técnicas espectroscópicas para caracterizar los diferentes tipos de partículas y complejos cromoproteicos aislados.

2.5.1.- Espectroscopia de absorción a temperatura ambiente

Los espectros de absorción en el rango del visible de cada una de las partículas aisladas se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu 2101-UVPC en un Beckman DU-64 de fotodiodos a 4 °C en cubetas de 1 cm de paso de luz con rendija de 1 nm en el primer caso. Las derivadas de cada uno de los espectros se realizaron mediante el programa de ordenador UVPC.

2.5.2.- Espectroscopia a temperaturas criogénicas

Las transiciones electrónicas de los pigmentos localizados en estas proteínas de membrana se dan entre niveles energéticos muy poco diferenciados, nos encontramos con que la mayoría de las bandas de absorción del espectro visible están compuestas por varios componentes. Además la asociación de dichos pigmentos con la proteína origina un aumento de la anchura de dichas bandas favoreciendo el solapamiento de las bandas del espectro. Para definir mejor los componentes de cada banda en las diferentes partículas los espectros se han realizado a 77 K. El empleo de bajas temperaturas en espectroscopia es una de las herramientas más útiles cuando nos encontramos en presencia de un sistema inhomogéneo. El uso de N₂ o He

líquidos nos facilita el alcance de temperaturas de hasta 4 K. A estas temperaturas se produce una homogeneización de las transiciones energéticas del sistema. Esto se traduce en un estrechamiento de las bandas que en casos determinados puede ir acompañado de una variación en el máximo mejorando finalmente la resolución espectral.

Los espectros de absorción y emisión a 77 K se realizaron en el Laboratorio del Dr. Rafael Cases en el Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA) Universidad de Zaragoza-C.S.I.C. Las medidas de absorción óptica se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Hitachi U-3400 de doble haz equipado con un criostato CTi en cubetas de 0.3 cm de paso de luz.

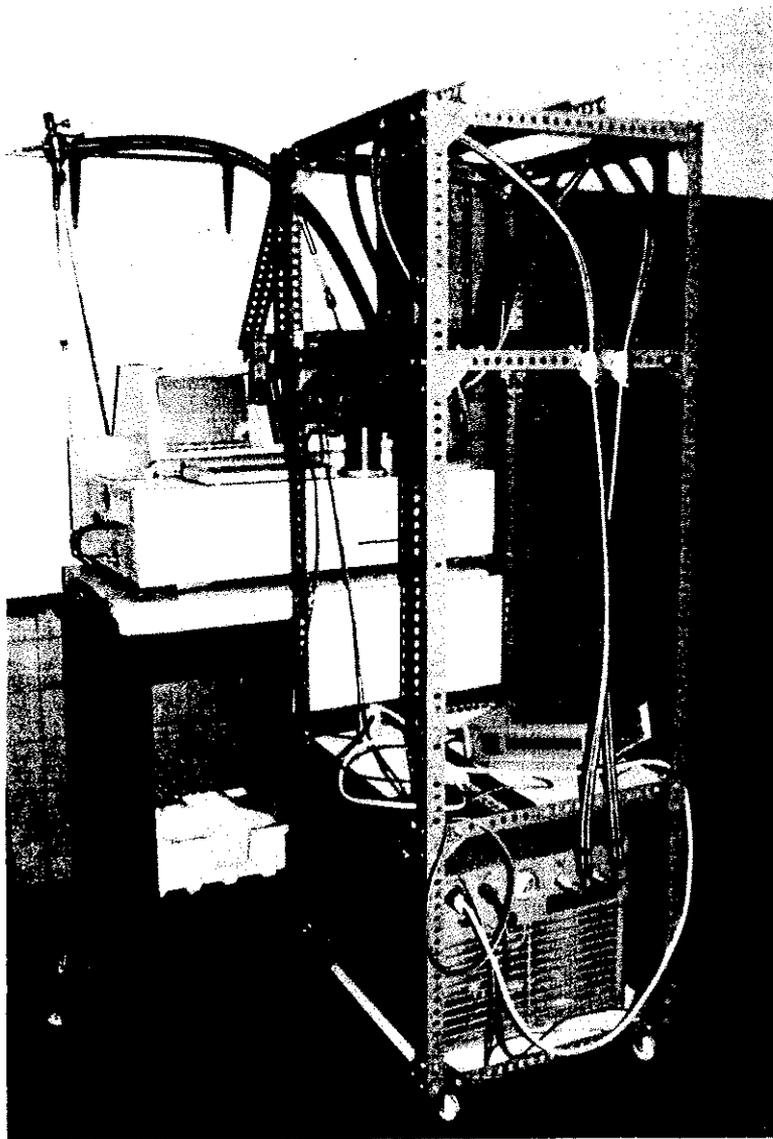
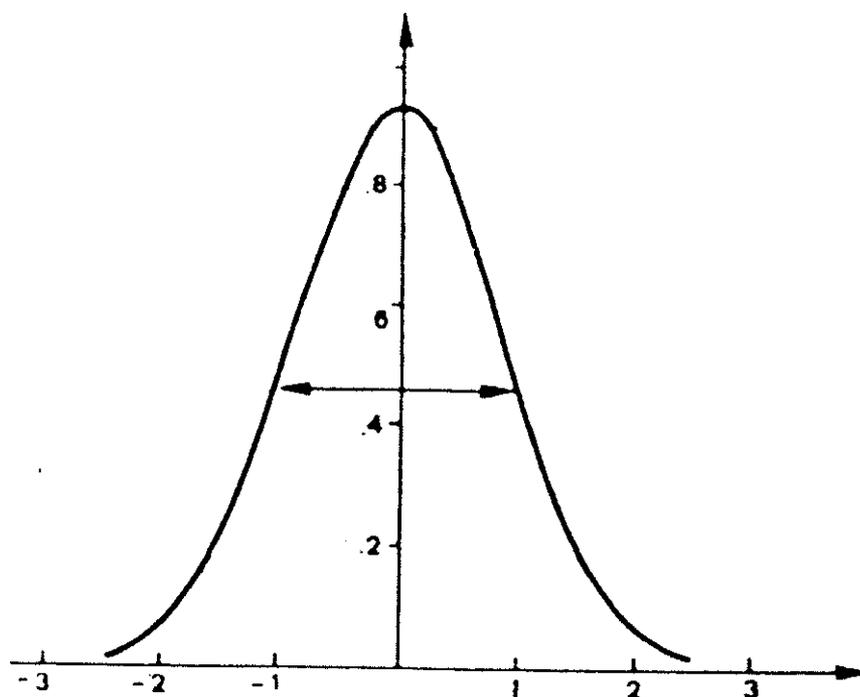


Figura 2.3.- Espectrofotómetro Hitachi U-3400 equipado con un criostato CTi para medir espectros de absorción electrónica a 77 K.

Los espectros de fluorescencia a 77 K se realizaron en un banco óptico con excitación a 422 nm usando como fuente de luz una lámpara de arco de Xenon de 150 Watios de potencia. La longitud de onda se seleccionó mediante un monocromador Bausch & Lomb con una rendija de 0,25 mm. La detección del espectro se llevó a cabo usando un fotomultiplicador Hamamatsu R-928 con una rendija de salida de 0,5 mm en el monocromador de salida Jarrell-Ash. Para llevar a cabo las medidas a bajas temperaturas una parte de la muestra se mezcló con dos partes de glicerol para evitar la formación de hielo en la muestra lo que la convertiría en un cuerpo opaco, se trata de que la muestra al bajar la temperatura se comporte como un sólido cristalino.

2.5.3.- Deconvolución espectral

Debido a que nos estamos ocupando de un sistema que es un material amorfo desde el punto de vista físico, se asume que la contribución dominante a la anchura de línea espectral de las bandas de absorción es de carácter inhomogéneo. Esto quiere decir que la función que mejor se ajustará al tipo de bandas de absorción que podemos encontrar en este material es la función Gaussiana:



$$G(x) = A_0 \cdot e^{-B(x-x_0)^2}$$

$$B = \ln 2 / \delta^2$$

Donde A_0 es la absorbancia en el punto 0, e es el número de Euler, x_0 es la longitud de onda en el punto 0 en nm, y B es el coeficiente en el que δ es la longitud de onda en cm^{-1} .

Por esta razón la deconvolución espectral que se ha realizado durante este trabajo ha sido en gaussianas. La precisión de este método y su aplicación al estudio de cromoproteínas de membrana y a polímeros sintéticos asociados con clorofilas ha sido tratada por varios autores (Katz et al., 1978; Uehara et al., 1988). Previamente a realizar la deconvolución, el espectro experimental fue transformado de longitud de onda en nm a número de onda en cm^{-1} . En las deconvoluciones de la principal banda del rojo del complejo D1-D2-Cyt b559, debido a la mínima contribución de dicha banda a la transición vibrónica a 622 nm, esta banda de mayor energía fue ajustada de forma separada a una única gaussiana y se sustrajo del espectro. La curva experimental resultante se ajustó a 3 ó 4 gaussianas según el tipo de centro de reacción empleado. La bondad del ajuste se evaluó mediante la función χ^2 :

$$\chi^2 = \sum_{n=1} [Y_i - F(x_i)]^2$$

Donde Y_i es la lectura de absorbancia a la longitud de onda x_i en nm y $F(x_i)$ es la función modelada a x_i nm y n es el número de lecturas efectuadas. Todo el ajuste se realizó mediante el programa de ordenador Kaleidagraph para ordenadores Apple McIntosh.

2.5.4.- Espectroscopia de fluorescencia

Para realizar los espectros de emisión en el rojo de las diferentes cromoproteínas aisladas se utilizó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 o un Kontron SFM-25 termostatizados a 4 °C en cubetas de 1 cm de paso de luz, la longitud de onda de excitación fue a 430 nm en la banda Soret de la clorofila a y la detección se hizo con una rendija de salida de 1 nm. El cálculo del rendimiento cuántico (ϕ) de fluorescencia se realizó mediante la integración

del área bajo la banda de fluorescencia gracias al programa de ordenador del aparato. La fluorescencia de triptófano del esqueleto proteico del complejo D1-D2-Cyt b559 se midió con un espectrofluorímetro Hitachi F4500, excitando a 296 nm con una rendija de excitación de 1 nm. La detección se llevó a cabo en el rango de 310 a 380 nm con una rendija de emisión de 2,5 nm. Todas las medidas se realizaron a 4 °C previa normalización de las concentraciones del complejo D1-D2-Cyt b559.

2.5.5.- Dicroísmo circular (CD)

Se define una molécula ópticamente activa cuando interacciona de forma diferente con la luz polarizada a la izquierda que con la luz polarizada a la derecha. Esta interacción diferencial da lugar al fenómeno conocido como dicroísmo. Pocos cromóforos son ópticamente activos y en la mayoría de los casos esta actividad es producida por la interacción con otras moléculas o grupos químicos localizados asimétricamente.

La actividad óptica de las muestras se midió en el Laboratorio de la Dra. Rosalía Rodríguez en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Complutense de Madrid.

2.5.5.1.- CD en el rango del visible

Mediante esta técnica espectroscópica se han determinado tanto las interacciones excitónicas entre los pigmentos dentro de los complejos proteicos. Las medidas se realizaron en un dicrógrafo Jovin-Ybon 4000 en cubetas circulares de 1 cm de paso de luz en el rango del visible. Se midió antes de llevar a cabo el espectro una línea de base con los mismos reactivos químicos excepto la proteína, que fue sustraída del espectro final. La concentración de muestra usada para los espectros en el rango del visible se determinó usando un coeficiente de extinción $\epsilon = 74 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ en la banda del rojo a 675 nm (Dekker et al., 1989). Las medidas se realizaron a 4 °C.

2.5.5.2.- CD en el rango del ultravioleta

Los cambios en la estructura secundaria de la proteína sometida a diferentes tratamientos se realizaron mediante esta técnica. Los espectros se llevaron a cabo en el rango de 200 a 250 nm, la concentración de proteína se calculó mediante el análisis de aminoácidos de la muestra. Todas las medidas se llevaron a cabo a 4 °C en cubetas de 2 mm de paso de luz, antes de medir el espectro se calculó la línea de base con todos los reactivos químicos excepto la proteína para sustraerla del espectro experimental.

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

El efecto SERS ("surface-enhanced Raman scattering") se produce cuando complejos iónicos, moléculas o cromóforos son absorbidos en una superficie rugosa de Au, Ag, o Cu la cual es excitada por un láser. Este efecto había sido ya comunicado por otros autores para moléculas de piridina en electrodos de plata anodizados (Albrecht et al., 1977) consiguiendo una mejora de 10^6 veces en la intensidad sobre una señal de dispersión Raman normal. Interacciones tanto químicas como electromagnéticas entre el material absorbido y el metal contribuyen al fenómeno de aumento de la intensidad de la señal. El efecto SERRS se da cuando la longitud de onda del haz de excitación del láser está en resonancia con una transición electrónica del material absorbido generando un aumento adicional de dicha señal.

Las principales ventajas de ambos efectos SERS/SERRS incluyen: una alta sensibilidad, minimización de la fluorescencia que es uno de los principales problemas en la espectroscopia Raman normal, selectividad molecular y la variación de la intensidad de las señales con la distancia entre la molécula que origina la señal y el electrodo. La concentración de muestra que se usa para este tipo de medidas se encuentra en el rango que se usa en espectroscopia de fluorescencia. Además, los cromóforos pueden ser seleccionados según la longitud de onda del haz láser empleado para la excitación. Generalmente la dispersión Rayleigh no es un problema debido a que la dispersión Raman es inelástica (la dispersión es desplazada

por frecuencias vibracionales). Ambos efectos se producen en la región del espectro que va desde el UV cercano al infrarrojo cercano (NIR).

Tanto SERS como SERRS han sido utilizados en el estudio de pequeñas moléculas, sin embargo el estudio de biomoléculas complejas había estado limitado por varios problemas entre los que sobresale la posible desnaturalización de ciertas macromoléculas producida por su absorción a la superficie metálica del electrodo. La valiosa información que se puede obtener sobre: interacciones de proteínas, efectos redox, excitación selectiva de cromóforos, tipos de estructuras químicas responsables de una mejora en la transferencia de electrones, efectos producidos por la distancia, estados de spin, hacen que esta técnica espectroscópica sea muy apropiada para el estudio de membranas fotosintéticas (Seibert et al., 1992) y complejos proteicos aislados de ellas (Picorel et al., 1991).

2.5.6.1.- Instrumentación

Como en la espectroscopia Raman convencional y en resonancia Raman, un haz láser es usado para excitar los complejos. En la mayoría de los casos se emplean láseres continuos de gas bien de Ar^+ o Kr^+ , aunque también se pueden emplear láseres pulsados con la ventaja en este último caso de la obtención de espectros resueltos en el tiempo. Los métodos más comunes para la iluminación de la muestra son dos: la luz dispersada por la muestra es recogida con un ángulo de 90° respecto al haz de luz incidente, o bien la luz dispersada es recogida con ángulo de 180° respecto al haz del láser incidente ("backscattering").

La elección del espectrómetro y del detector es fundamental cuando se utiliza esta técnica espectroscópica a biomoléculas. La irradiación de la muestra puede conducir a una rápida degradación de la misma, este efecto puede ser minimizado imprimiendo un movimiento de rotación del electrodo en el haz láser aunque el uso de sistemas de detección

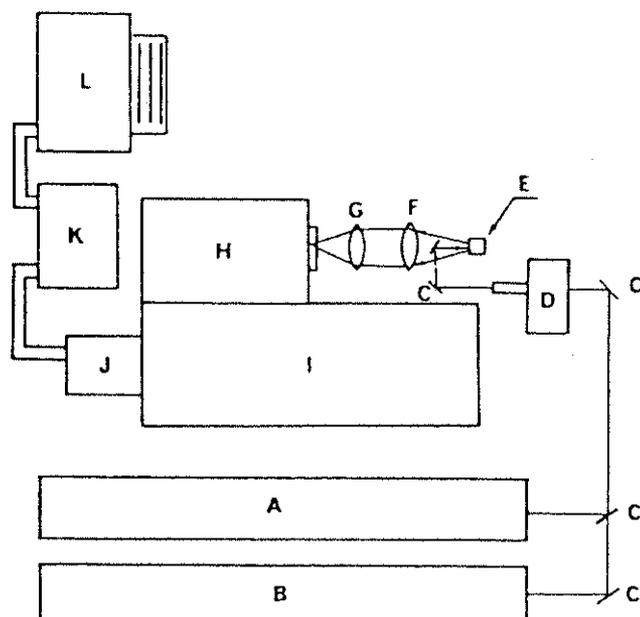


Figura 2.4.- Esquema del espectrómetro SERS/SERRS. A) Ar^+ láser, B) Kr^+ láser, C) espejos, D) monocromador regulable, E) depósito de la muestra, F) lentes de recogida de la luz dispersada, G) lentes para enfocar, H) monocromador del espectrómetro, I) espectrógrafo, J) detector de fotodiodos, K) controlador del detector, L) sistema operativo y ordenador.

multicanal es la mejora más importante. El aparato usado para las medidas fue un triple espectrómetro Spex1877 de fotodiodos (modelo 1460, Princeton Applied Research). La luz fue recogida con una lente de cámara $f/1.2$ con una geometría de 180° ("backscattering"). La fuente de excitación fue un láser de Kr^+ (Coherent 100K).

2.5.6.2.- Preparación de la muestra

Los 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 \AA de diámetro. Láminas con

partículas de Ag se pueden preparar también al vacío por deposición 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 SERS de dichas superficies. Tras el proceso de anodización del electrodo, éste fue sumergido en una suspensión del complejo D1-D2-Cyt b559 y el exceso de material fue eliminado. El tiempo de inmersión y la concentración de la suspensión determinan el grado de recubrimiento de la superficie. Los espectros de SERRS se realizaron a 77 K en un vaso Dewar transparente. Con el objeto de conseguir una mayor resolución espectral el electrodo es entonces sumergido en un vaso Dewar con N₂ líquido para llevar a cabo el análisis espectral.

2.5.7.- Espectroscopia de resonancia paramagnética del electrón (EPR)

La técnica espectroscópica denominada resonancia paramagnética del electrón (EPR) se basa en la detección de electrones desapareados en una muestra por su absorción de la energía de una fuente de radiación de microondas (aproximadamente 10¹⁰ Hz) cuando la muestra está situada en un fuerte campo magnético (aproximadamente 0,3 T).

La gran mayoría de las biomoléculas contienen electrones apareados, pero hay dos clases de moléculas que contienen electrones desapareados y que juegan un papel relevante en los sistemas biológicos, son los radicales libres y los iones de los metales de transición. El electrón posee un momento magnético en virtud de su spin ($S=1/2$). En la presencia de un campo magnético el momento magnético tiene dos posibles orientaciones en diferentes niveles de energía. Estas orientaciones corresponden a las dos posibilidades de spin que tiene el electrón ($S \pm 1/2$). Las transiciones entre los dos estados de spin pueden ser inducidos si una radiación electromagnética de una frecuencia apropiada es aplicada en sentido perpendicular al campo magnético aplicado B_0 . De esta forma la condición básica de resonancia en EPR se define como:

$$h \cdot \nu = g \cdot \beta \cdot B_0$$

donde β es el magnetón de Bohr ($0,92 \times 10^{-23}$ J.T) y g es el factor g del electrón que para un electrón libre es de 2,0023.

2.5.7.1.- Instrumentación

Para campos magnéticos en el rango de 0,3 a 1,2 T la condición de resonancia del spin del electrón se da en el rango de frecuencias de las microondas ($0,9 \times 10^9$ - $3,6 \times 10^9$ Hz, longitudes de onda de 3-0,8 cm). Las microondas son conducidas a través de tubos cuyas dimensiones están en consonancia con las longitudes de onda de las microondas. El tamaño de conducto más usado suele tener una dimensión de unos 3 cm, lo que corresponde a una frecuencia de unos 9000 kHz. Un sistema de este tipo se denomina espectrómetro en la banda X. La cavidad es la parte del aparato en la que la muestra es localizada en medio del campo magnético y en la cual desemboca el tubo desde la fuente de microondas. El campo magnético es *barrido* para encontrar la condición de resonancia y posteriormente la detección es mejorada modulando el campo magnético. La sensibilidad del método es alta y se pueden emplear muestras sólidas o líquidas en volúmenes que van desde 10 a 500 μ l.

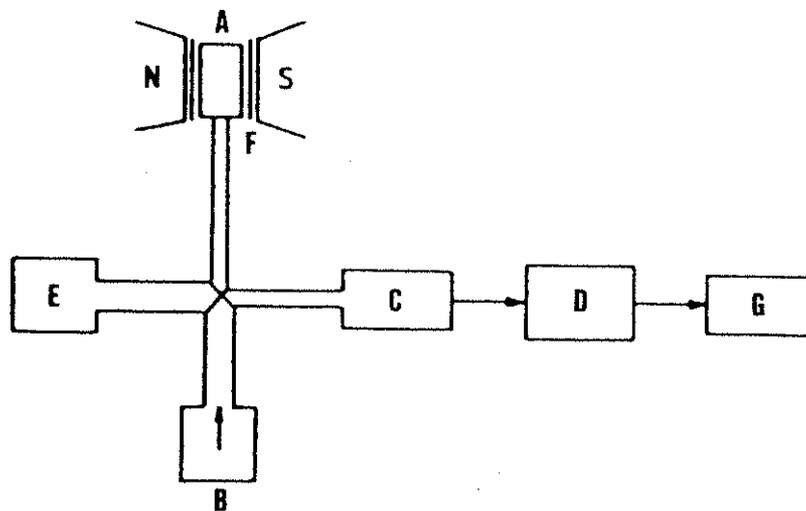


Figura 2.5.- Esquema de un espectrómetro de EPR: A) cavidad, B) fuente de microondas, C) detector, D) amplificador, E) carga, F) cables de modulación y G) ordenador para la recogida de datos.

2.5.7.2.- Preparación de la muestra

Las medidas se realizaron en el Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (Universidad de Zaragoza-C.S.I.C.) en el Laboratorio del Dr. Pablo J. Alonso en un espectrómetro Varian (Modelo E112) operando en la banda X. La muestra se depositó en tubos de cuarzo de 0,3 x 25 cm. La temperatura se controló mediante un criostato de flujo continuo de He (Oxford ESR-900) a 5 K con especial cuidado de mantenerla constante durante la toma de los espectros. Para las medidas de EPR las membranas del PSII se resuspendieron en 0,4 M de sacarosa, 15 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂ y 50 mM de HEPES-NaOH, pH 7,2, a una concentración de 10-12 mg Chl / ml.

2.6.- Espectroscopia en tiempo resuelto

La capacidad de producir pulsos de luz de corta duración mediante el uso de láseres ha proporcionado a los investigadores una herramienta muy útil en el estudio de la dinámica de procesos ultrarrápidos a nivel molecular 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 fué posible por vez primera estudiar procesos de relajación vibracional o electrónica en rangos de tiempo menores que nanosegundos (ns). Rápidamente el uso de la espectroscopia resuelta en el tiempo se aplicó 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, 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 se efectúan en los centros de reacción y en las antenas son de femto (fs) y picosegundos (ps). Los experimentos realizados con esta técnica se llevaron a cabo en colaboración con los laboratorios de los doctores G. Porter y J. Barber en los departamentos de Fotoquímica y Bioquímica, respectivamente, del Imperial College of Science, Technology and Medicine de Londres, Reino Unido.

2.6.1.- Espectroscopia de emisión en tiempo resuelto

2.6.1.1.- Instrumentación

Las cinéticas de fluorescencia resuelta en el tiempo se midieron mediante un aparato de "single-photon-counting" (Booth et al., 1991). El sistema consiste en un láser mode-locked Coherent Antares YAG acoplado de forma sincronizada para amplificar los pulsos a un dye laser con rhodamine 6G en su cavidad. Este sistema produjo un tren de pulsos de 8 ps con una frecuencia de 3,7 MHz. La función de respuesta del instrumento tuvo un FWHM de aproximadamente 100 ps, dando una resolución de tiempo tras la deconvolución de 20 a 30 ps.

Se usó un filtro de corte a 650 nm para eliminar cualquier dispersión del láser. Para las medidas de respuesta del aparato se utilizó un filtro de paso de banda a 615 nm (40 nm FWHM). La longitud de onda de emisión se seleccionó mediante un monocromador Hilger-Watts 0,3 nm y la detección se realizó con un fotomultiplicador Hamamatsu R1564 U01. Las muestras fueron iluminadas a 630 nm con una potencia media de 20-30 mW. Se iluminó un volumen de $0,1 \text{ cm}^3$ de la muestra y menos de 1 en 10^4 centros de reacción presentes en el volumen iluminado fueron excitados por cada pulso del láser. Los experimentos se llevaron a cabo a 277 K y la muestra se agitó en cada una de las medidas. En cada una de las cinéticas se recogieron por encima de 40.000 cuentas en el canal del pico. Las cinéticas se detectaron con una rendija de 6 nm a 682 nm.



Figura 2.6.- Detalle del sistema de láser usado para realizar las medidas de emisión en tiempo resuelto mostrando el mode locked YAG láser y la organización del sistema de compresión de pulsos.

2.6.1.2.- Preparación de la muestra

Para llevar a cabo las medidas, muestras de centro de reacción se resuspendieron en tampón 60 mM Tris-HCl, pH 8.0, más 1 mM de DM a una concentración de 10 µg Chl/ml para RCIIa y 2 µg Chl/ml para RCIIb. Es importante minimizar el grado de agregación del complejo D1-D2-Cyt b559 para garantizar un buen comportamiento de la muestra. Un grado alto de agregación de la muestra es rápidamente observado por un acortamiento de los tiempos de vida de los componentes de la cinética así como por un desplazamiento hacia el azul tanto de la banda de absorción de menor energía como de la banda de fluorescencia del complejo D1-D2-Cyt b559. Este tipo de agregación ocurre por un descenso de la concentración de detergente a 0,2 mM (cerca de la CMC), sin embargo a la concentración de detergente utilizada no se observó agregación de la muestra. Los centros de reacción RCIIa y RCIIb mostraron máximos de absorción en la banda del rojo de 675.5 y 674.5 nm, respectivamente, antes y después de las medidas. Una vez que las muestras fueron descongeladas y resuspendidas en tampón a la concentración adecuada las cinéticas se realizaron inmediatamente. Todos los experimentos se llevaron a cabo en condiciones anaerobias mediante la mezcla con la suspensión de medida de la 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 minutos antes de realizar las medidas para asegurar un consumo máximo del oxígeno del medio. Las medidas se realizaron a 277 K.

2.6.1.3.- Análisis de los datos

Los tiempos de vida fueron calculados basándose en el algoritmo de ajuste de Mardquardt (Mardquardt, D.W., 1963) por reconvolución interactiva, asumiendo una cinética multiexponencial. La calidad de los ajustes fué evaluada usando el criterio reducido de la χ^2 y gráficas de los datos residuales promediados. Las cinéticas de fluorescencia se representaron por una suma de tres o cuatro exponenciales según el ajuste de los datos. Como ya ha sido establecido el 85 % de la fluorescencia a 277 K del complejo D1-D2-Cyt b559 es producida por

la suma de los componentes de la recombinación de cargas, además de un componente de 5 ns asignado a la clorofila desacoplada de la separación de cargas (Crystall et al., 1989). Las cinéticas se calcularon en una escala de tiempo de 560 ps por canal, resultando en una escala total de 280 ns. Estas condiciones ayudan a establecer el tiempo de vida más largo de una forma más precisa que usando una escala más corta. Todas las cinéticas fueron primero analizadas sin restricciones en los parámetros para a continuación analizarlas fijando el valor para el tiempo de vida asignado a la clorofila desacoplada. Los conjuntos de datos obtenidos para cada cinética y tipo de muestra fueron analizados individualmente y posteriormente se analizaron globalmente. En ambos casos los datos ajustaron a tres o cuatro exponenciales según el tipo de muestra. El análisis global de los datos (Knutson et al., 1983) reduce los efectos de la correlación exponencial y mejora la precisión de los parámetros deducidos de los datos experimentales. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia de cada uno de los componentes se calcularon a partir de la integral de tiempo del componente apropiado en la cinética de fluorescencia.

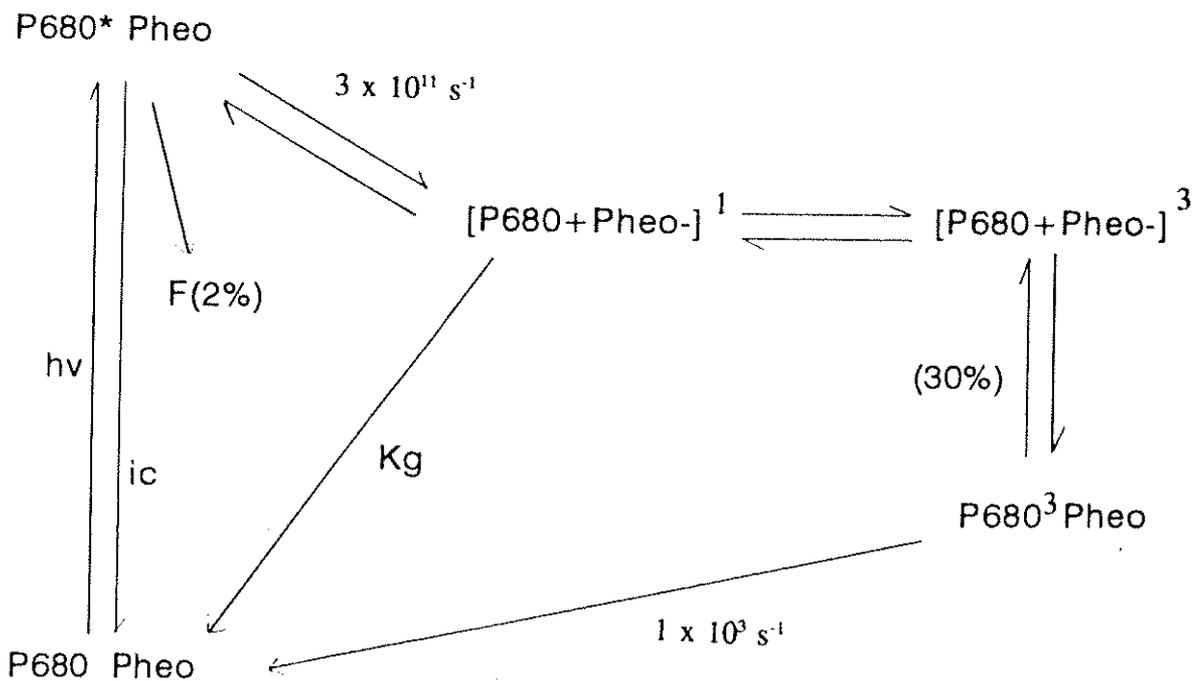


Figura 2.7.- Esquema de la cinética de separación de cargas en el centro de reacción del PSII. Los valores entre paréntesis señalan el rendimiento en porcentaje de cada ruta particular. ic , conversión interna; k_g , grado de recombinación de cargas directamente desde el estado basal; F , fluorescencia (Booth et al., 1990).

Es posible determinar la constante de equilibrio para la reacción primaria de separación de cargas :



A partir de las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo usando el siguiente tratamiento matemático :

$$K = [P680^+Pheo^-] / [P680^*] = A(P^*_i) / A(P^*_e) \quad (2)$$

donde $A(P^*_i)$ y $A(P^*_e)$ son las amplitudes iniciales de las cinéticas de fluorescencia de $P680^*$ antes y en el equilibrio respectivamente. Si el equilibrio en la ecuación (1) decae siguiendo la cinética de una única exponencial con un tiempo de vida, entonces la constante de equilibrio K de la reacción primaria de separación de cargas se puede definir como:

$$K = \int_0^{\infty} \exp(-t / \tau_1) / \phi_1 \int_0^{\infty} \exp(-t / \tau_0) = \tau_1 / \phi_1 \cdot \tau_0 \quad (3)$$

donde τ_1 es el tiempo de vida de la fluorescencia producida por la recombinación de cargas, ϕ_1 es el rendimiento cuántico de la fluorescencia de la recombinación de cargas y τ_0 es el tiempo de vida natural de $P680^*$ el cual ha sido calculado como 19 ns (Booth et al., 1990). La energía libre de la reacción primaria de separación de cargas $\Delta G(P680^*-P680^+Pheo^-)$ se determinó a partir de K mediante la ecuación de Boltzmann:

$$\Delta G = -k_b T \ln K \quad (4)$$

donde ΔG es la energía libre estandar por molécula y k_b es la constante de Boltzmann.

2.6.2.- Espectroscopia de absorción en tiempo resuelto

2.6.2.1.- Instrumentación

Los datos de absorción se determinaron en un sistema de "flash photolysis" compuesto por un láser de N_2 PRA LN1000 para la excitación de la muestra, y un haz de prueba producido por un diodo láser de 35 mW (Mitsubishi ML5415N) a una longitud de onda de 820 nm y se detectó con un fotodiodo (EG&G FN100) conectado a un amplificador casero que portaba un filtro de 4,7 μs y un osciloscopio digital Gould 4071. La longitud de onda de excitación fue de 337 nm, los flashes fueron producidos por el láser de N_2 con una frecuencia de 3 Hz. La duración de los pulsos fue de 800 ps con una energía de 0,45 mJ por pulso. El tiempo de resolución del aparato es limitado por el amplificador. Un filtro de interferencia a 820 nm fue colocado en frente del detector para impedir cualquier interferencia de fluorescencia en la medida. Además para impedir la contribución de fluorescencia a los datos la detección se realizó con un pequeño ángulo rígido. El paso de luz fue de 1 cm y las medidas fueron tomadas como la media de 64 flashes. La preparación de las muestras se llevó a cabo como en 2.6.1.2., y las medidas se realizaron a 277 K.

2.6.2.2.- Análisis de los datos

Las cinéticas de absorción en tiempo resuelto se analizaron básicamente como en el apartado 2.8.1.3. con las modificaciones descritas a continuación. Un tiempo de vida se fijó a 4,7 μs para representar la cinética de P680 en estado triplete mientras los otros parámetros se dejaron correr libres. El tiempo de vida de P680 en estado triplete en la ausencia de O_2 es alrededor de 1 ms (Booth et al., 1991) pero se observa como un componente de 4,7 μs debido al uso del filtro de 4,7 μs en el amplificador. La deconvolución de los datos de absorción fue realizada usando la función de respuesta del aparato dando una resolución de tiempo de 1 ns.

2.7.- Tratamiento del complejo D1-D2-Cyt b559 con detergentes

La purificación de proteínas de membrana requiere generalmente el uso de detergentes para poder extraer estas macromoléculas de su entorno lipídico. Normalmente se solubiliza la membrana con un determinado detergente y posteriormente se purifica la proteína deseada por uno de los métodos habituales (cromatografía, gradientes de sacarosa, cromatoenfoco, etc.). El hecho de que un detergente sea el apropiado para la solubilización de una determinada proteína de membrana no quiere decir que la proteína una vez purificada sea más estable en este detergente (ver sección 1.4). En ciertos casos suele suceder lo contrario, de manera que se necesita realizar un intercambio de detergente en la proteína ya purificada.

2.7.1.- Desnaturalización y renaturalización del complejo D1-D2-Cyt b559

Una vez purificado el centro de reacción del PSII (ver 2.2.4) éste fue desnaturalizado mediante incubación en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, más 0,05 % de TX-100. La suspensión se mantuvo a 4 °C en la oscuridad. Se realizaron espectros de absorción de la muestra a diferentes tiempos de incubación para seguir el proceso de desnaturalización de la cromoproteína. Cuando la banda de menor energía del complejo D1-D2-Cyt b559 mostró un máximo a 671,5 nm el TX-100 se retiró del tampón de incubación intercambiándolo por DM en una pequeña columna (1,5 x 3 cm) de intercambio iónico DEAE-Fractogel TSK 650S (Merck) equilibrada con 50 mM Tris-HCl, pH 7,2. Unos 30 µg de Chl total, fueron cargados en la columna, cuya concentración se midió usando un coeficiente de extinción $\epsilon = 74 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ en la banda de menor energía (Dekker et al., 1989). Una vez que la muestra se fijó en la columna, ésta se lavó con 100 ml del tampón de equilibrado más 2 mM de DM para a continuación eluir el complejo proteico con 150 mM de NaCl en el tampón de trabajo. La muestra fue desalada por diálisis frente a tampón de equilibrado durante 1 h. En caso necesario la muestra se concentró usando una célula de ultrafiltración Amicon equipada con membranas PM 30.

El intercambio de detergente se realizó también mediante ultracentrifugación del complejo proteico a 309.000 x g durante 3 h previa dilución de la muestra 1:7 en tampón 50 mM

Tris-HCl, pH 7,2 (McTavish et al., 1989). El sedimento resultante se resuspendió en el mismo tampón más 2 mM de DM.

3.-RESULTADOS

3.1.- Aislamiento de tilacoides y membranas del PSII

El proceso de purificación conjunta de ambas fracciones subcelulares está basado en el método de Bertold et al. (1989) pero han sido necesarias tanto su adaptación a la especie en la cual se ha realizado este trabajo como su modificación para poder aumentar el rendimiento del aislamiento.

En la tabla 3.1 se recogen los resultados de una purificación de ambas fracciones a partir de 1,5 Kg de tejido foliar. La actividad de evolución de oxígeno en ambas partículas se determinó mediante la técnica del electrodo de oxígeno usando DCBQ como aceptor de electrones. Los niveles de clorofila total, a y b, se midieron espectrofotométricamente usando las formulas de Arnon (Arnon, D., 1949).

Tabla 3.1. Tabla de purificación de PSII_m y OECC de *Beta vulgaris*.

Fracción	Chl a / Chl b	Chl t (mg)	Actividad ($\mu\text{molO}_2/\text{mg Chl. h}$)
Tilacoides	3.56	394	253
PSII _m	2.2	127.77	670
OECC	17.56	2.09	1050

La fracción de tilacoides se obtuvo tras homogeneizar el tejido foliar y obtener cloroplastos, los cuales fueron lisados mediante choque osmótico en tampón B2 (ver apartado 2.2.1). A continuación la fracción tilacoidal se sedimentó por centrifugación a baja velocidad. En este paso eliminamos ya la fracción de proteínas solubles del estroma del cloroplasto quedándonos únicamente con las proteínas intrínsecas de la membrana tilacoidal y las ligadas a ella como por ejemplo la subunidad F1 de la ATPasa, o las mismas proteínas extrínsecas relacionadas con el PSII.

3.1.1- Propiedades espectroscópicas y moleculares de tilacoides y PSII_m

3.1.1.1- Espectros de absorción electrónica

El paso fundamental para la obtención de PSII_m pasa por el uso de detergentes para poder eliminar gran parte de proteínas que se encuentran en las membranas al solubilizar las

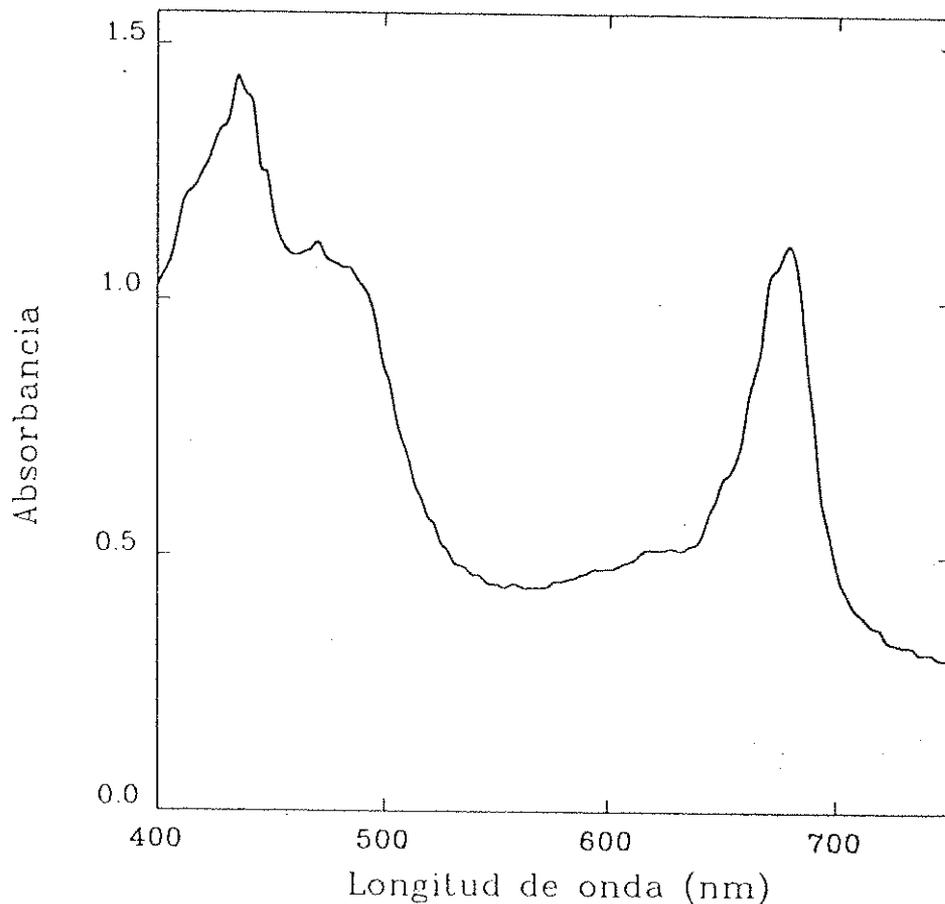


Figura 3.1.- Espectro de absorción electrónica de tilacoides de *Beta vulgaris* en tampón 50 mM MES pH 6,0, 15 mM NaCl y 5 mM MgCl₂.

membranas tilacoidales no apiladas y que interfieren en este estudio como por ejemplo el PSI, el citocromo b₆f, etc. Mediante el uso del detergente no iónico TX-100 se consigue la solubilización parcial de la membrana tilacoidal consiguiendo el aislamiento de la partícula denominada PSII_m que sirve como punto de partida para posteriores purificaciones. En la figura 3.1 se puede observar el espectro de absorción de tilacoides de *Beta vulgaris* tras lisar los cloroplastos. En dicha figura se puede observar la gran dispersión producida por el gran tamaño

de estos fragmentos de membrana. La preparación muestra varias bandas en el rango del visible con máximos de absorbancia a 678.5 nm debida a Chl a, con un hombro en esta banda hacia 650 nm debido a Chl b, y a 435 nm debida a la Chl a y Chl b localizada en las proteínas que integran tanto el PSII como el PSI. El hombro a 650 nm se debe únicamente a la Chl b que está presente en cromoproteínas de la antena, por ejemplo la LHCII. Además de estas bandas se puede observar en la figura una amplia banda hacia 485 nm producida por los diferentes carotenoides asociados a los complejos pigmento-proteína.

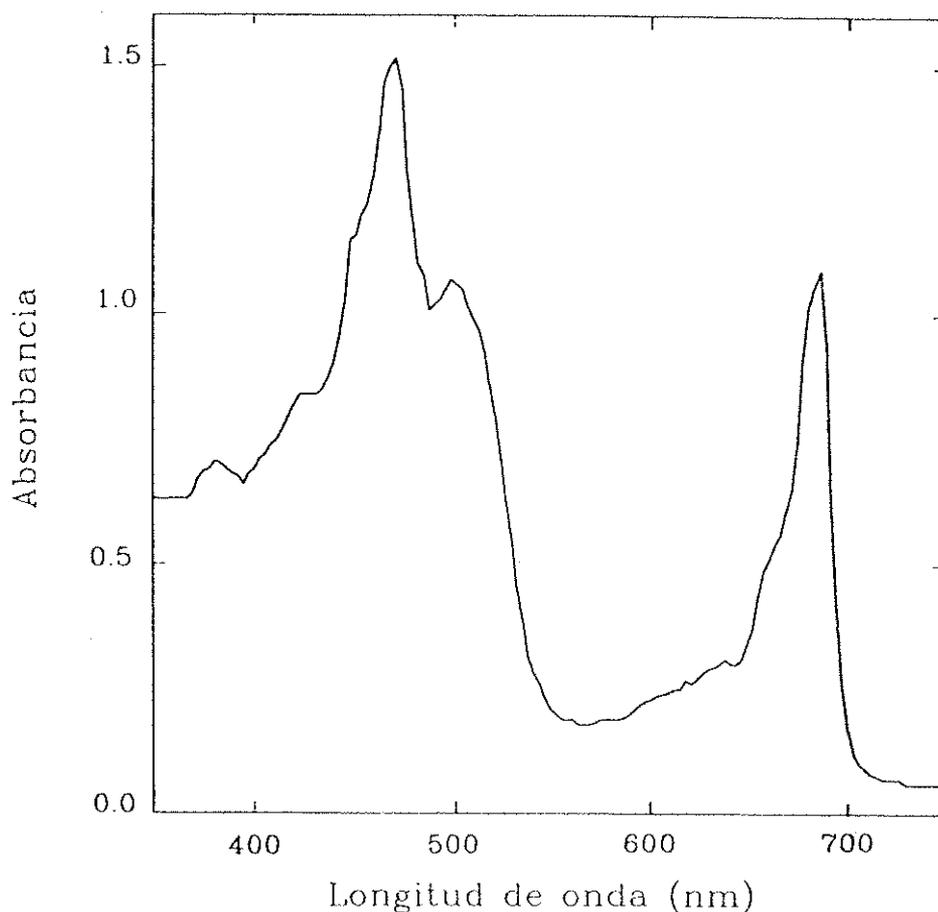


Figura 3.2.- Espectro de absorción electrónica de PSII_m de *Beta vulgaris* en tampón 50 mM MES, pH 6,0, 0,4 M sacarosa, 15 mM de NaCl y 5 mM de MnCl₂.

El espectro de absorción de PSII_m de *Beta vulgaris* se puede observar en la figura 3.2, y se caracteriza por la escasa dispersión en el espectro así como por una mayor definición de las bandas que forman el espectro. La banda del rojo muestra un máximo a 680 nm indicativo de la pureza y estado de la preparación y exhibe de nuevo un hombro hacia 650 nm

originado por la Chl b. El máximo a 430 nm es producido por la banda Soret de ambas clorofilas, mientras que la banda a 500 nm es debida a los carotenoides asociados a las cromoproteínas de la preparación.

La comparación de ambos espectros de absorción junto a la relación de Chl a / Chl b de la tabla 3.1 revelan una disminución del nivel de Chl a respecto a Chl b que indica un enriquecimiento de esta fracción en Chl b la cual pertenece en su mayor parte a la cromoproteína LHCII de la antena del PS II.

3.1.1.2.- Identificación y cuantificación de pigmentos de tilacoides y PSII_m

Mediante análisis de pigmentos por HPLC se identificaron los principales tipos de pigmentos asociados a las cromoproteínas de cada fracción, la diferencia entre los niveles de pigmentos entre ambas preparaciones queda de manifiesto en la tabla 3.2 y en los cromatogramas de la figura 3.3.

Tabla 3.2.- Relación de pigmentos en las fracciones de tilacoides y PSII_m de *Beta vulgaris*.

Pigmento	Tilacoides	PSII _m
Neoxantina	0.062	0.125
Violaxantina	0.125	0.132
Anteraxantina	0.069	0.044
Luteina	0.281	0.367
Zeaxantina	0.275	0.169
Clorofila b	1	1
Clorofila a	3.4	2.0
β-caroteno	0.38	0.148

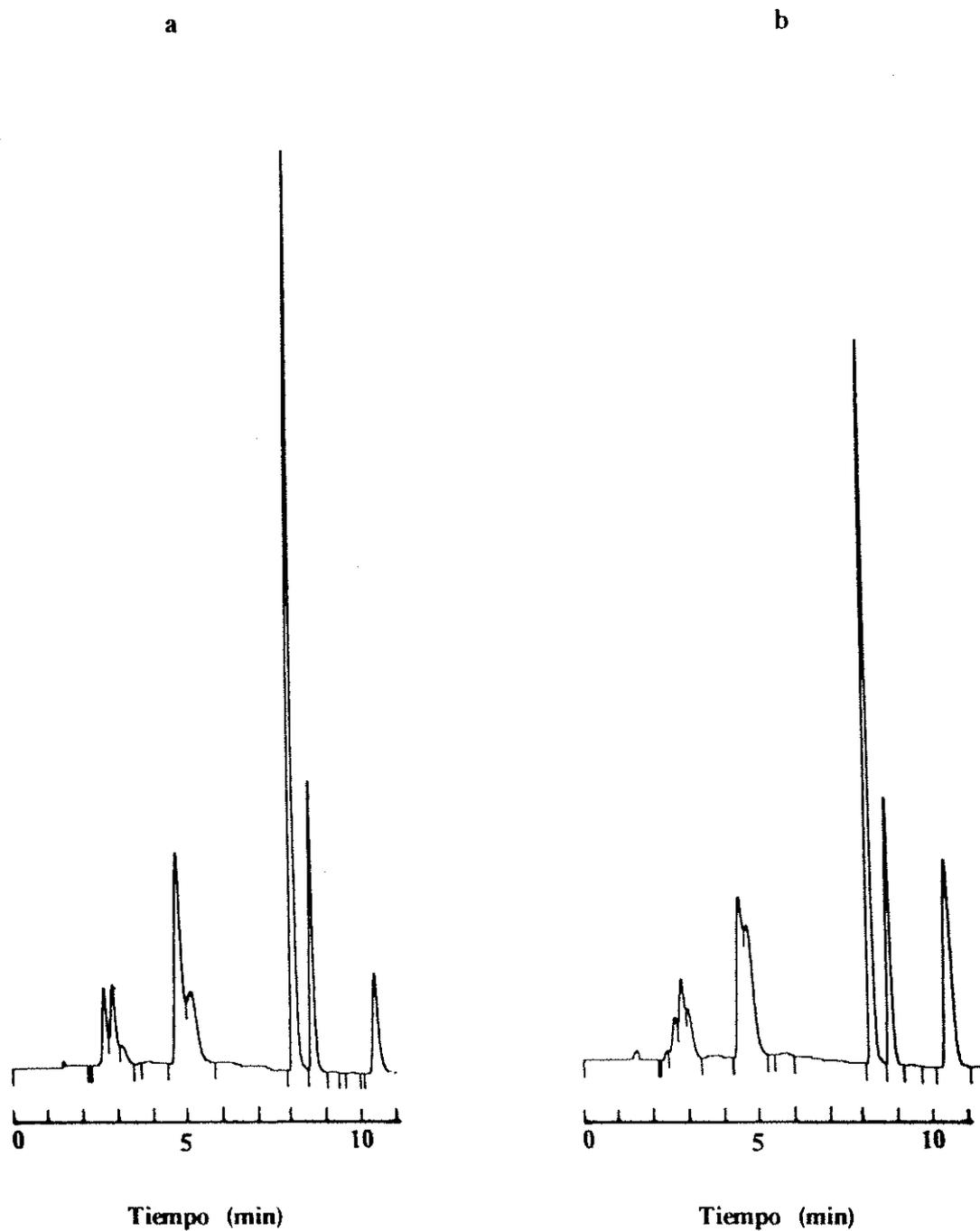


Figura 3.3.- Identificación y separación de pigmentos de tilacoides (a) y PSII_m (b) de *Beta vulgaris* por HPLC.

Las variaciones más importantes que se aprecian de una preparación de membranas a otra se dan en los niveles de β -caroteno y de Chl a, así se puede apreciar un aumento de los niveles de Chl b respecto a β -caroteno en el paso de tilacoides a PSII_m, lo cual se puede

explicar por la pérdida de proteínas (por ejemplo del PSI) que no están relacionadas con el PSII en la solubilización. Por otro lado el descenso del nivel de Chl a con respecto a Chl b se explica por un aumento relativo de la proteína de la antena LHCII rica en Chl b y principalmente asociada con el PSII.

3.1.1.3.- Contenido proteico. SDS-PAGE

La tabla 3.3 recoge los Rf y pesos moleculares de las proteínas patrón utilizadas como marcadores moleculares en electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5 %.

Tabla 3.3.- Movilidad relativa (Rf), PM y log PM de las proteínas patrón obtenidos en gel de poliacrilamida al 12.5 %. Los pesos moleculares de las proteínas componentes tanto de tilacoides como de PSII_m de *Beta vulgaris* se encuentran indicados en la figura 3.5.

Proteína	PM	log PM	Rf
Fosforilasa b	97.400	4,985	0,095
Seroalbúmina bovina	66.200	4,820	0,171
Ovoalbúmina	45.000	4,653	0,304
Anhidrasa carbónica	31.000	4,491	0,519
Inhibidor de tripsina	21.500	4,332	0,742
Lisozima	14.400	4,158	0,914

La figura 3.4 muestra el ajuste por mínimos cuadrados de los diferentes valores de Rf-logPM de las proteínas patrón. A partir de la recta de los marcadores moleculares se determinaron los pesos moleculares de las diferentes bandas de proteína en las dos fracciones de membrana.

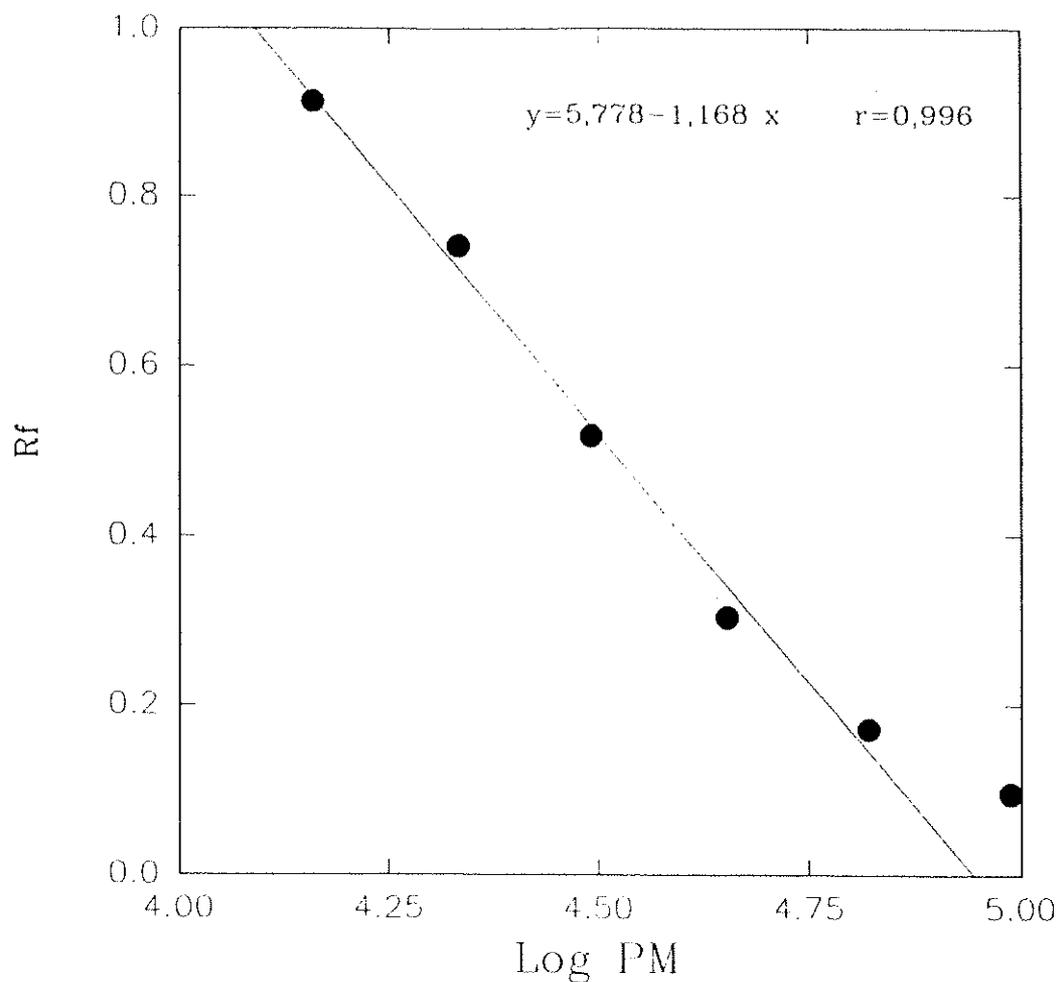


Figura 3.4.- Recta de calibrado del peso molecular de las proteínas componentes de tilacoides y PSII_m de *Beta vulgaris*.

La electroforesis de tilacoides y membranas de PSII_m de la figura 3.5 muestra la diferencia en el contenido proteico de ambas preparaciones. El aislamiento de membranas de PSII nos facilita la posibilidad de trabajar con un material de partida desprovisto de PSI y un gran número de proteínas contaminantes, como se puede observar en los electroforetogramas correspondientes. Así, las proteínas integrantes de las PSII_m son identificadas (en orden decreciente de peso molecular) como las proteínas CP47 y CP43 que forman la antena intrínseca del PSII, D2 que forma parte del centro de reacción, 33 kDa que estabiliza el dominio del Mn responsable de la evolución de O₂, D1 que forma parte del centro de reacción, antena extrínseca del PSII (mayoritariamente LHCII), y las proteínas de 23 kDa y 17 kDa que parecen estabilizar

el aporte de Ca(II) y Cl(I) para llevar a cabo la fotólisis del agua en el proceso de desprendimiento de oxígeno.

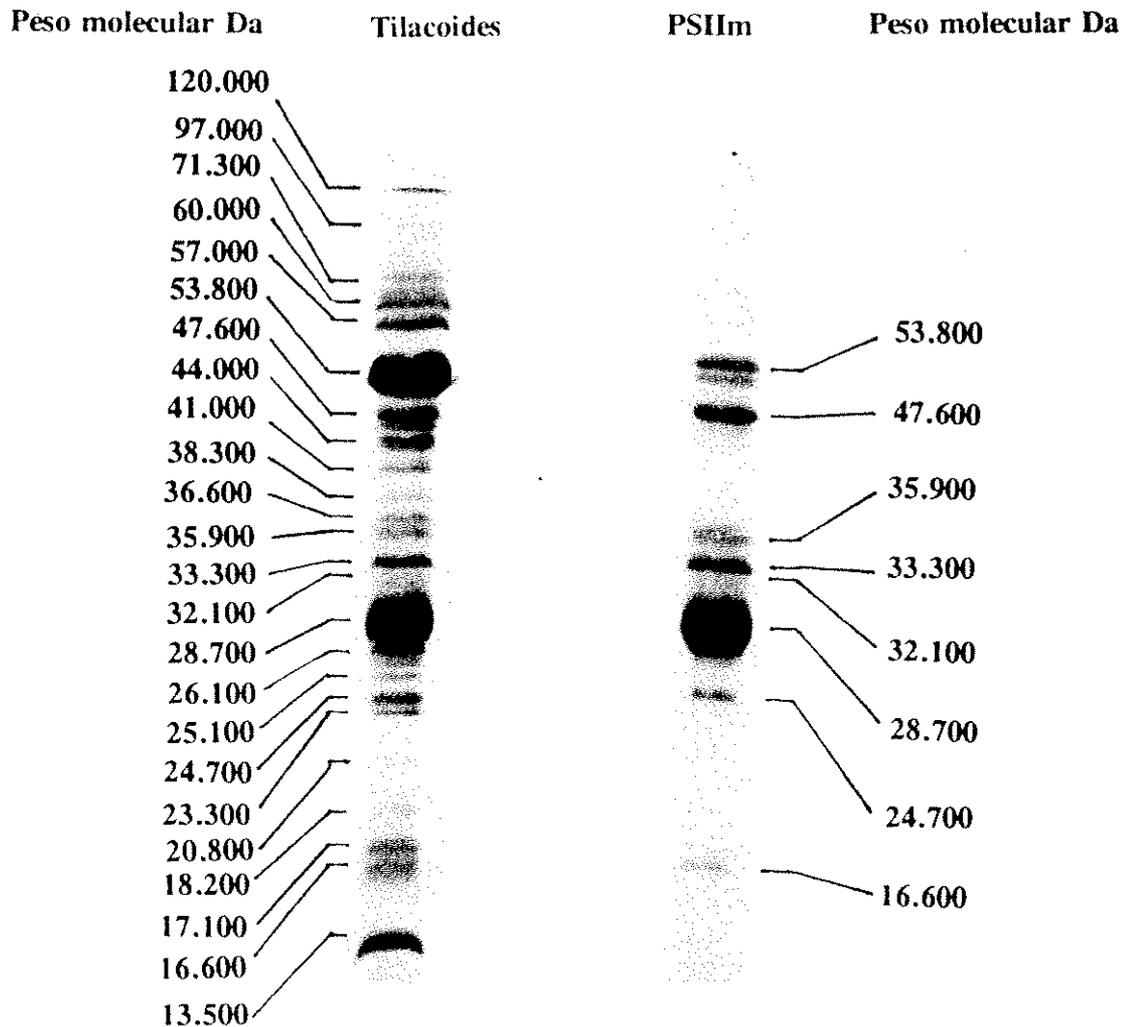


Figura 3.5.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las fracciones de tilacoides y PSII_m de *Beta vulgaris*.

3.2.- Purificación del "oxygen evolving core complex"

3.2.1.- Propiedades espectroscópicas y moleculares del OECC de *Beta vulgaris*.

La purificación del OECC de *Beta vulgaris* se llevó a cabo a partir de PSII_m siguiendo el método de Ghanotakis et al 1986. El OECC es el complejo proteico mínimo del PSII que conserva la capacidad de desprender oxígeno. Como puede observarse en la Tabla 3.1, el OECC es una partícula altamente purificada en PSII.

3.2.1.1.- Identificación de las proteínas del OECC.

La electroforesis de una preparación típica de OECC de *Beta vulgaris* se puede observar en la figura 3.6. El electroforetograma presenta seis bandas mayoritarias de proteína identificadas (por orden de peso molecular decreciente) como CP47, CP43, D2, 33 kDa, D1 y 26,1 kDa. La preparación está casi totalmente desprovista de la antena externa LHCII, aunque aún puede distinguirse una pequeña banda de proteína contaminante a 26.1 kDa. Además en este paso de purificación las proteínas de 23 y 17 kDa son también eliminadas respecto a las PSII_m por lo que es necesario la aportación de ciertas cantidades de CaCl₂ en el medio para favorecer la evolución de O₂ de la partícula.

OECC

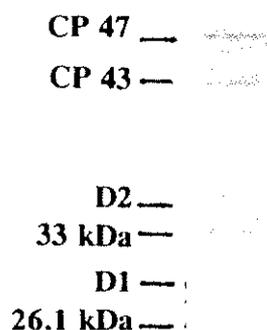


Figura 3.6.- Electroforesis SDS-PAGE al 12.5 % de OECC de *Beta vulgaris*.

3.2.1.2.- Espectro de absorción electrónica y segunda derivada de OECC

El espectro de absorción en el rango del visible muestra diferentes bandas como puede observarse en la figura 3.6, con máximos a 674, 627, 543, 485, 436.5 y 420 nm. Como se puede observar el hombro de Chl b a 650 nm característico de PSII_m ha desaparecido en esta partícula indicando una separación de la antena externa LHCII. Los máximos a 674 y 436.5 nm son consecuencia principalmente de las transiciones electrónicas de la Chl a asociada tanto a las proteínas antena CP47 y CP43 como a la Chl a y Pheo a del centro de reacción del PSII mientras que la banda a 627 nm es producida por transiciones vibrónicas de los pigmentos de la

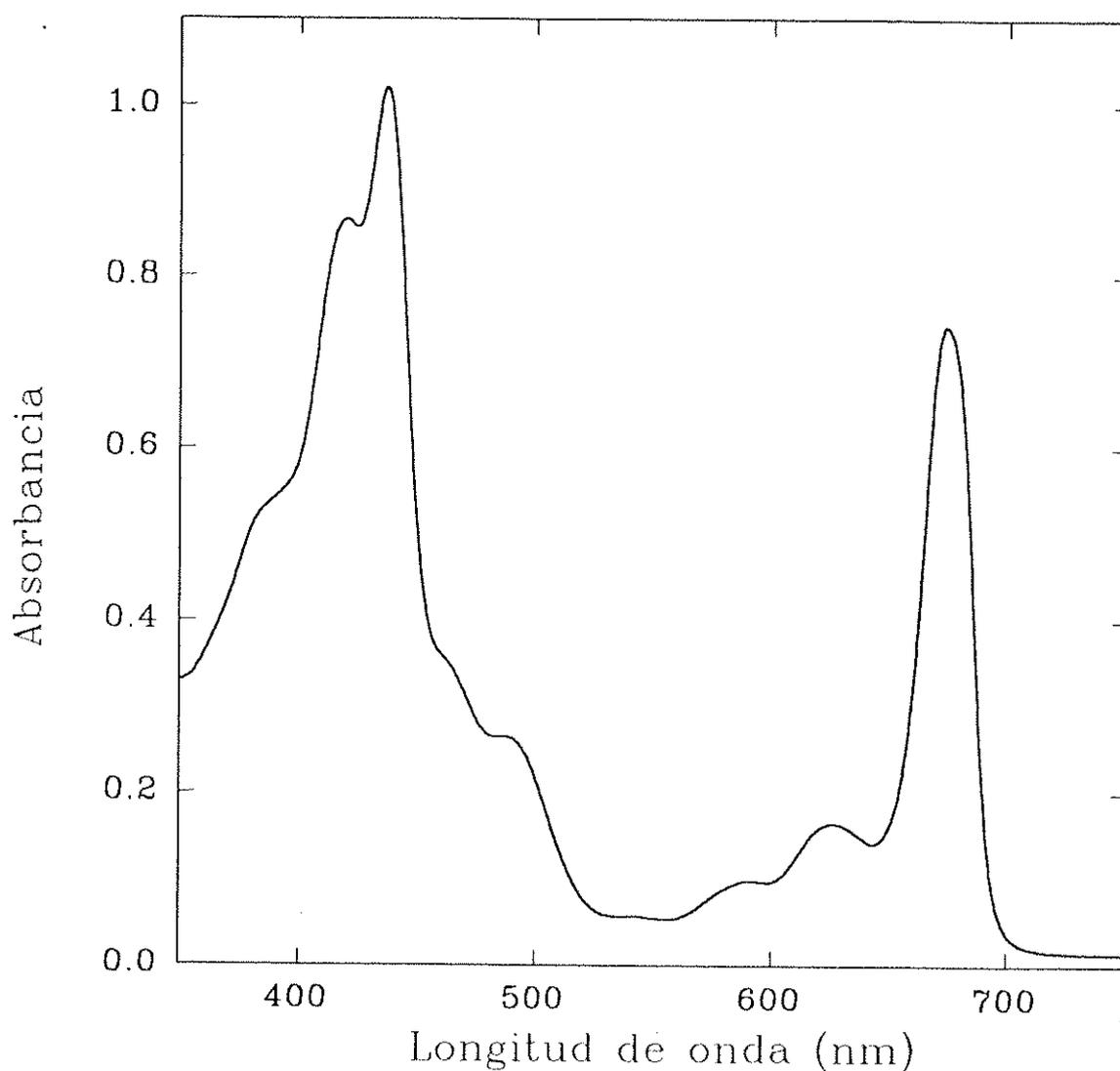


Figura 3.7.- Espectro de absorción electrónica de OECC de *Beta vulgaris* en tampón 50 mM MES, pH6.0, 0.4 M sacarosa y 10 mM de CaCl₂.

banda de menor energía. La presencia en el espectro de absorción de una pequeña banda a 543 nm y una mayor definición de la banda a 420 nm revela la presencia de dos de los componentes característicos del centro de reacción del PSII: el pigmento Pheo a únicamente asociado a este complejo cromoproteico y el citocromo b559, íntimamente relacionado con el centro de reacción. La banda de carotenoides (β -caroteno) es la responsable del máximo a 486 nm. Se puede observar una fuerte disminución de la amplitud de esta banda tras el paso de PSII_m a OECC debido a la pérdida en el proceso de purificación de la mayoría de las proteínas de la antena externa ricas en xantofilas. La segunda derivada del espectro anterior (figura 3.8) mostró la existencia de dos componentes mayoritarias en la banda de menor energía a 681 y 671 nm. El componente a 681 nm se debe probablemente como el donador primario (P680) y a algunos grupos de clorinas de la antena intrínseca, mientras que el componente a 671 nm comprendería a la clorinas asociada tanto a las proteínas CP47 y CP43 como al centro de reacción.

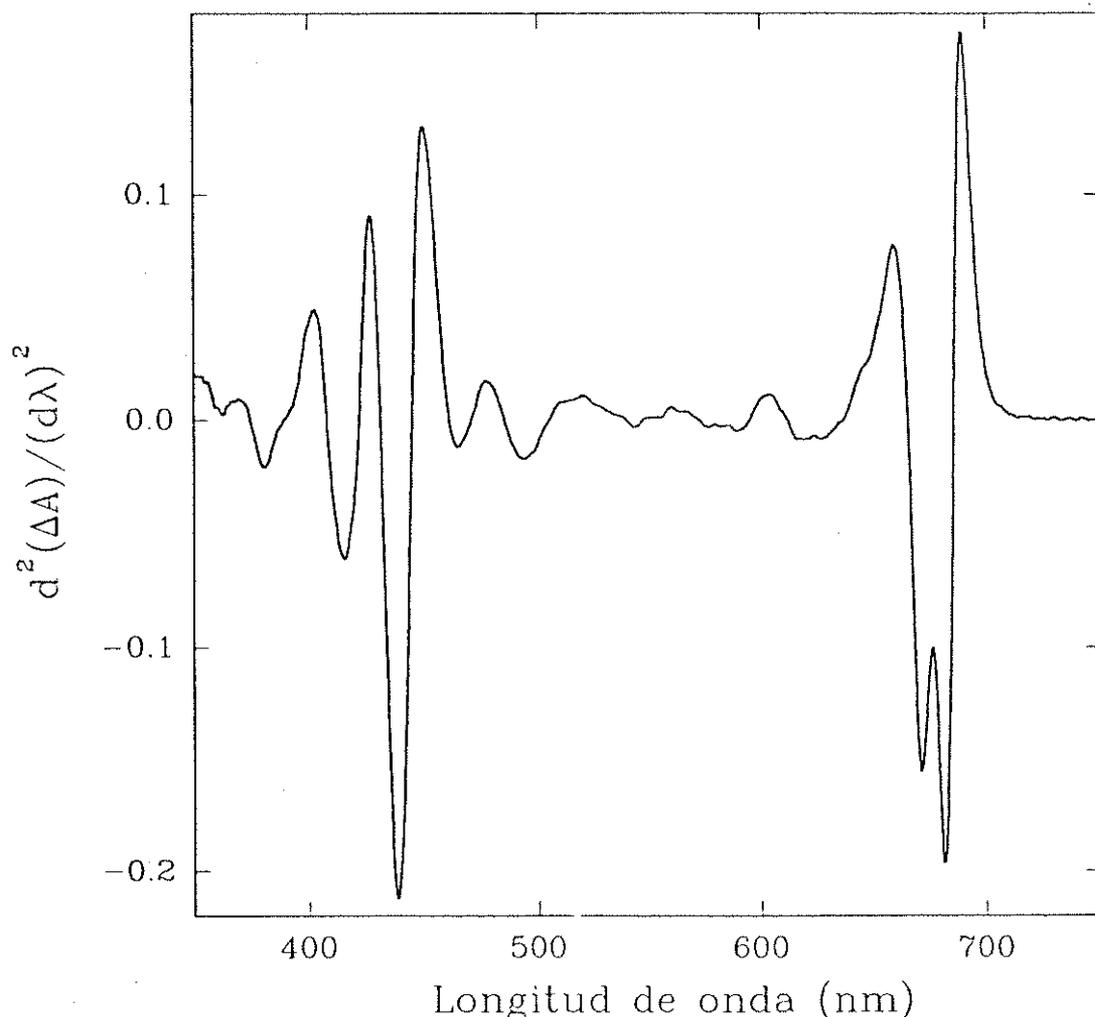


Figura 3.8.- Segunda derivada del espectro de absorción del OECC (figura 3.7)

También se observaron mínimos a 543 nm, correspondiente a la banda de Pheo a, a 465 y 494 producidos por dos de las tres transiciones de los carotenoides en esta región espectral y a 438 producido por Chl a y a 415.5 nm producido por Chl a, Pheo a y por la banda Soret del grupo hemo del citocromo b559 respectivamente.

3.2.1.3.- Identificación y cuantificación de pigmentos del OECC

El análisis de los pigmentos del complejo proteico por HPLC reveló la existencia de trazas de Chl b y diferentes carotenoides como puede apreciarse en la tabla 3.5. Estos pigmentos contaminantes están probablemente asociados con la proteína de 26.1 kDa que aparece en el electroforetograma de la figura 3.6. Los pigmentos mayoritariamente asociados al OECC son Chl a y β -caroteno con notable diferencia sobre el resto.

Tabla 3.4.- Identificación y relación de pigmentos de OECC de *Beta vulgaris*.

Pigmento	OECC
Neoxantina	0,818
Violaxantina	0,234
Anteraxantina	0,148
Luteina	0,46
Zeaxantina	0,706
Clorofila b	1
Clorofila a	20
β -caroteno	4,422

En la figura 3.9 se observa un cromatograma de una de las muestras de OECC.

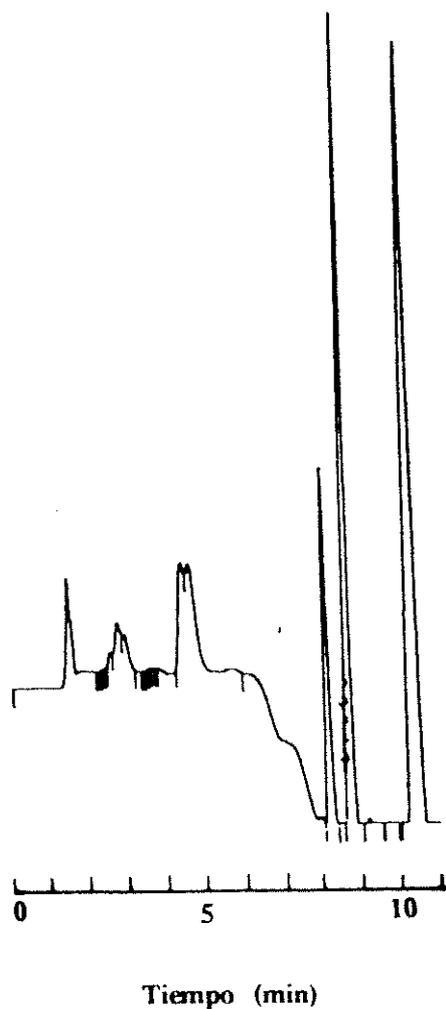


Figura 3.9.- Cromatograma de pigmentos de OECC de *Beta vulgaris*. Nótese el cambio de escala en el minuto 7 para poder mostrar todos los picos del cromatograma.

3.3.- Purificación del complejo D1-D2-Cyt b559

El centro de reacción del PSII, complejo D1-D2-Cyt b559, se aisló a partir de membranas del PSII siguiendo el método de Nanba & Satoh, 1987, con ciertas modificaciones. Este complejo ha sido aislado en plantas a partir de diferentes materiales biológicos (*Spinacea oleracea*, *Pisum sativum*, *Spirodella olighorhiza*) por métodos generalmente similares al anteriormente mencionado (Barber et al., 1987; Braun et al., 1990; Dekker et al., 1990), aunque en algunos el método de purificación ha sido modificado sustancialmente sin producirse ningún cambio en el contenido proteico del complejo (van Leeuwen et al., 1992).

El paso clave en la purificación del centro de reacción del PSII está en la solubilización del material de partida, membranas del PSII con TX-100, así como en el cuidadoso lavado de la columna para eliminar todas las antenas del PSII tanto extrínsecas como intrínsecas. Esta parte final es también clave debido a la íntima relación de la antena intrínseca con el centro de reacción, sobre todo de la proteína CP47 que en los casos de contaminación de la preparación suele estar presente.

Las modificaciones introducidas en el método nos condujo en nuestro caso a purificar dos tipos de centro de reacción que difieren en el número de pigmentos asociados al mismo. De esta forma obtuvimos dos tipos de complejos D1-D2-Cyt b559 (ver sección 3.4 Estequiometría), denominados RCIIa y RCIIb. Mientras el complejo RCIIa contiene 6 Chl a y 2 β -carotenos por 2 Pheo, el complejo RCIIb solamente une 4 Chl a y 1 β -caroteno por 2 Pheo. Esta última estequiometría es similar a la del centro de reacción bacteriano (Michel et al., 1985; Allen et al., 1987b).

En la figura 3.10 se muestra un cromatograma típico de la purificación del centro de reacción del PSII de *Beta vulgaris*. El centro de reacción eluye a una concentración de NaCl de 110 mM aproximadamente, como un único pico a partir de la fracción 22 a la 33.

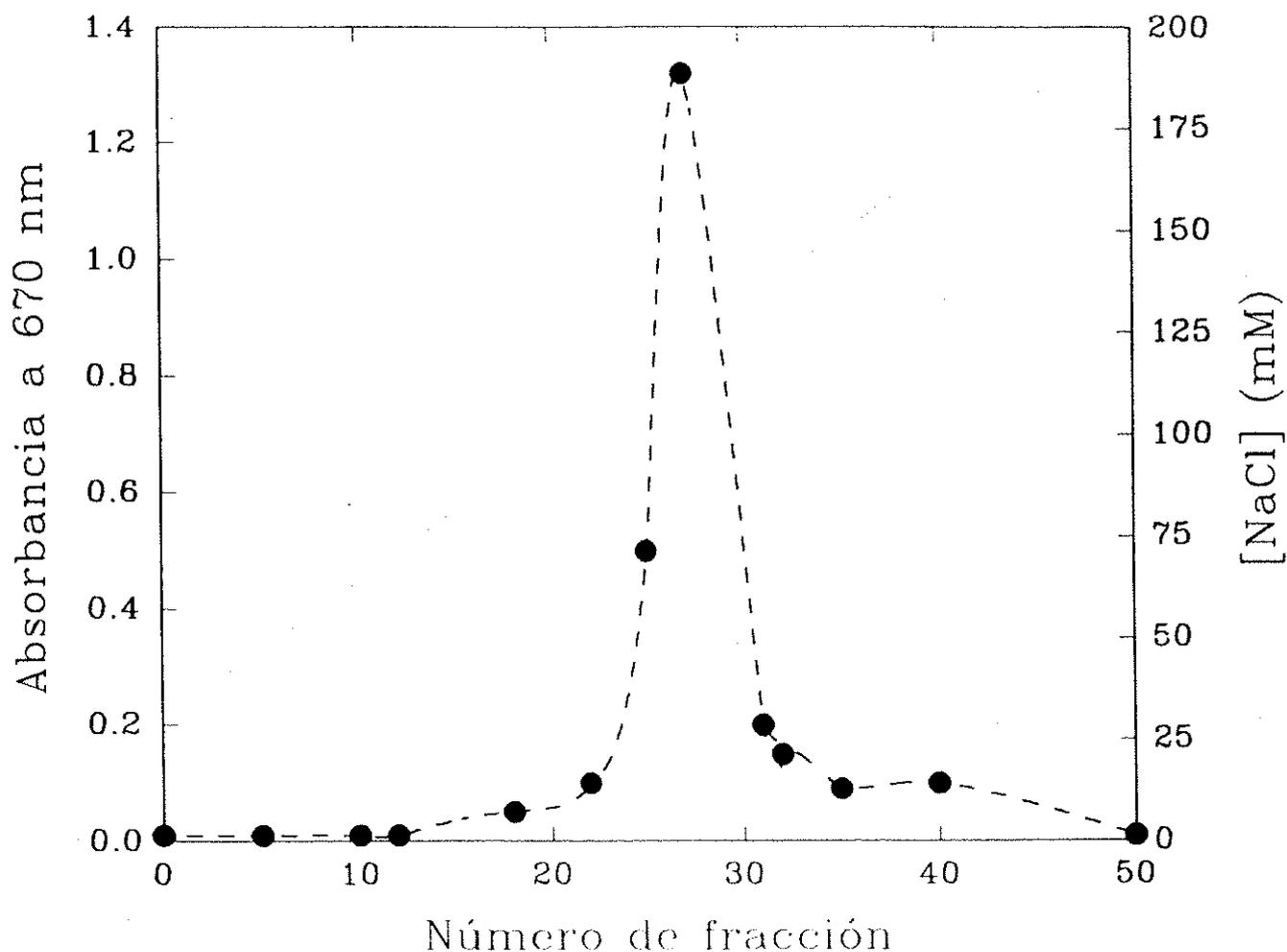


Figura 3.10.- Cromatografía en DEAE-Fractogel TSK-650S para la purificación del complejo D1-D2-Cyt b559. Perfil de elución con gradiente lineal de 30 a 200 mM de NaCl.

3.3.1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

En la figura 3.11 se muestra el perfil electroforético del complejo RCIIa y RCIIb, en donde se distinguen tres bandas principales de pesos moleculares 34.6, 32 y 9 kDa correspondientes a las proteínas D1, D2 y la subunidad α del citocromo b599, respectivamente. Además se distingue una cuarta banda más tenue hacia 66 kDa producida por el heterodimero D1/D2. Ambos complejos muestran una composición polipeptídica similar al aislado de otros organismos (Nanba & Satoh, 1987; Barber et al., 1987; Braun et al., 1990; van Leeuwen et al., 1992).

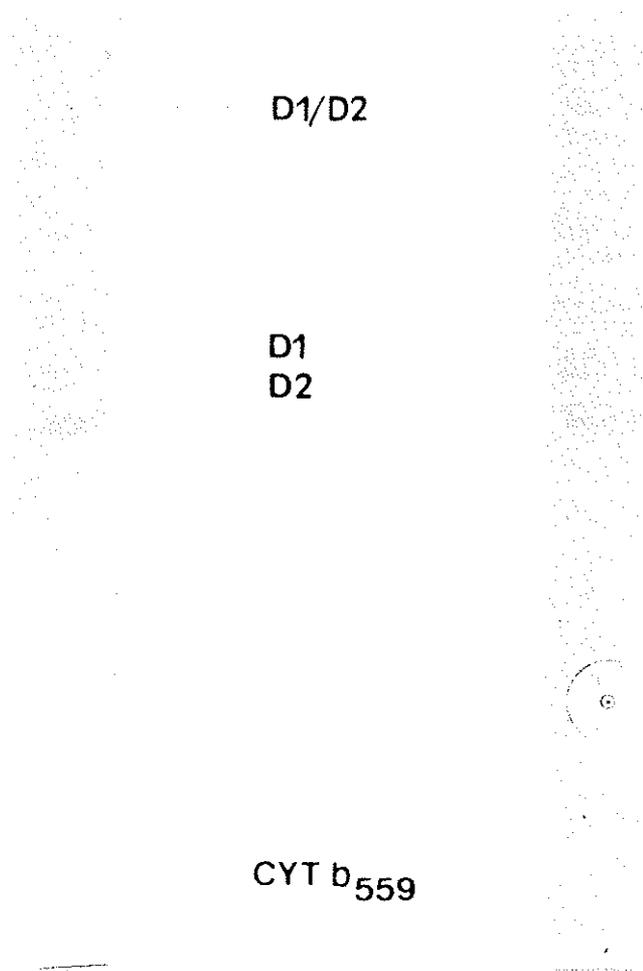
RCII_A**RCII_B**

Figura 3.11.- Electroforesis SDS-PAGE al 15 % con 6 M de urea de los complejos RCII_A y RCII_B de *Beta vulgaris*. Ambos complejos se desnaturalizaron durante 1 h en un tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,2, 2 % SDS, 2 M de urea, 40 mM de DTT y 20 % de sacarosa.

El contenido proteico de ambos complejos es idéntico como puede apreciarse en la figura 3.11 eliminando la posibilidad de que la diferencia en el contenido de cromóforos sea producido por la existencia de distintos polipéptidos.

3.3.1.1.- Determinación del pI de los polipéptidos del complejo D1-D2-Cyt b559

El pI del polipéptido D1 se dedujo a partir de la secuencia de aminoácidos del polipéptido (ver sección 2.2.5.2) obteniéndose un pI de 5,05 a partir de la figura 3.12. Dicho valor es similar a los de otras especies (EMBL, librería de secuencias).

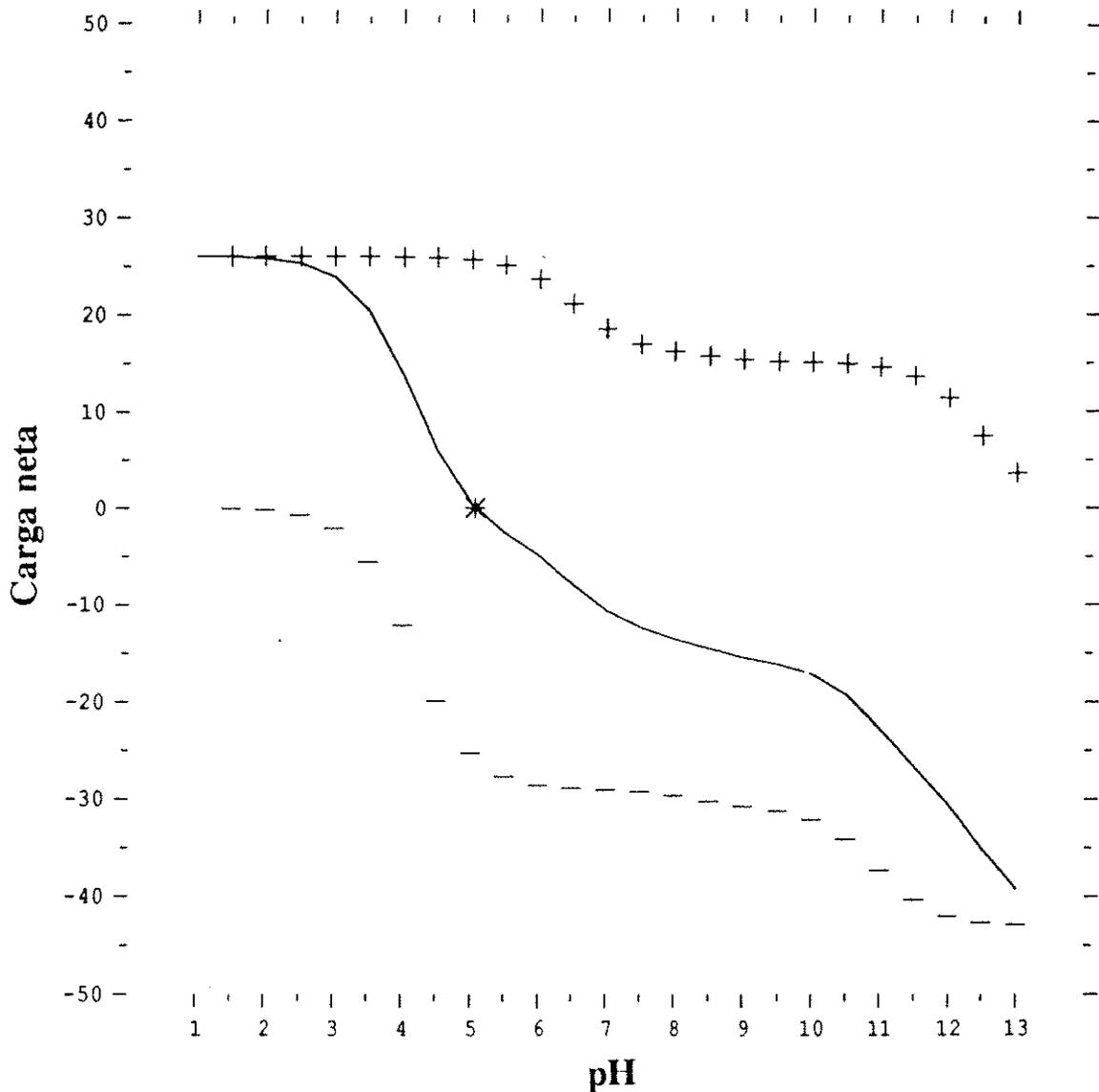


Figura 3.12.- Cálculo del pI del polipéptido D1 del centro de reacción del PSII de *Beta vulgaris*.

En la figura 3.13 se puede observar el cálculo del pI del polipéptido D2 dando un valor de 5.61, muy parecido al de D1 y al de los valores de pI para este polipéptido de otras especies (EMBL, librería de secuencias). Los valores de pI casi equivalentes para ambos polipéptidos están de acuerdo con el alto grado de homología de sus secuencias aminoacídicas que está entre el 85 y el 90 % según las especies (Michel et al., 1988; Youvan et al., 1984; Ruffle et al., 1992).

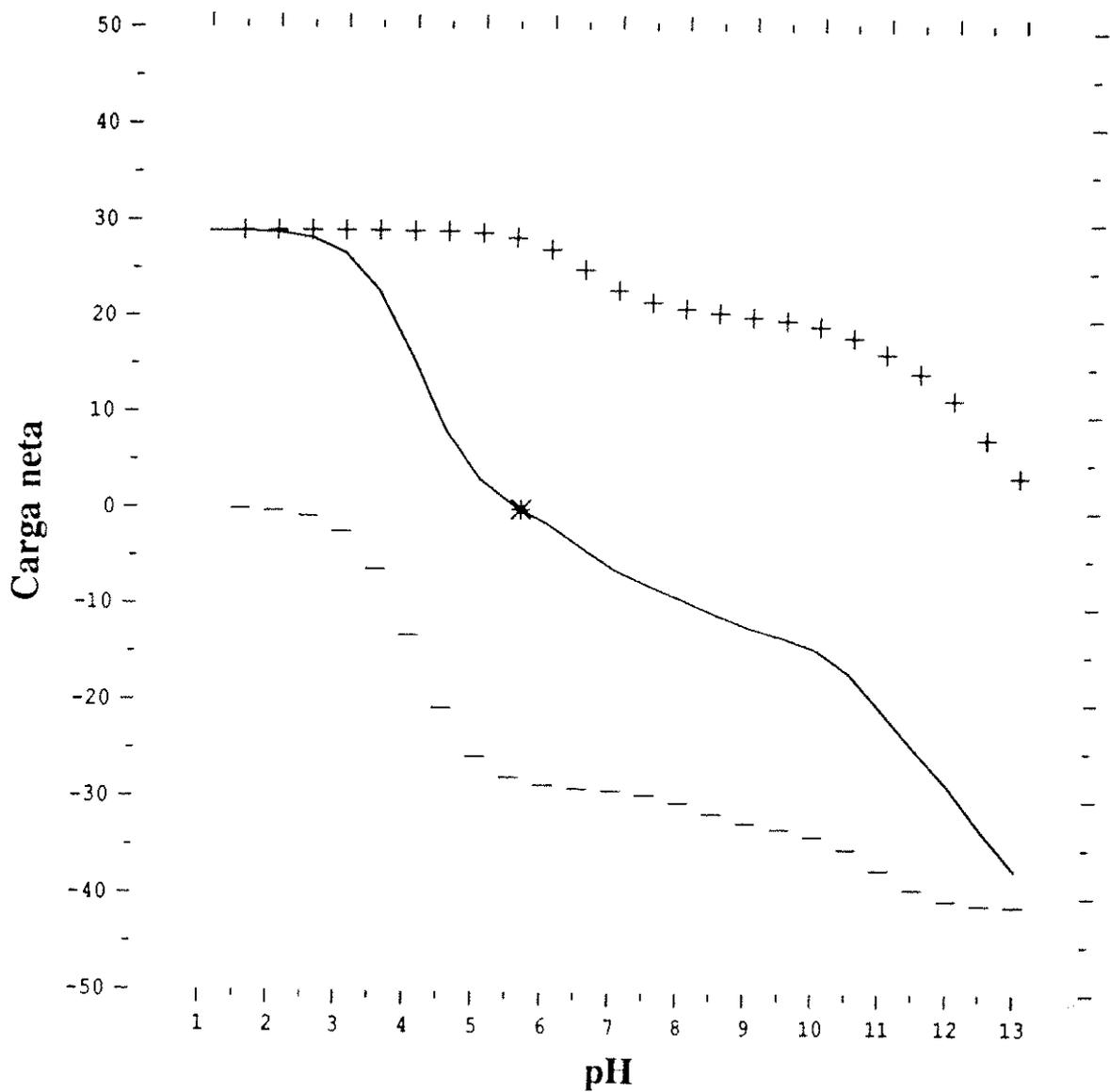


Figura 3.13.- Cálculo del pI para el polipéptido D2 del complejo del centro de reacción del PSII de *Beta vulgaris*.

La determinación del pI también se realizó para los polipéptidos α y β que integran el citocromo b559. En la figura 3.14 y 3.15 se muestran los perfiles del electroenfoque para ambos péptidos presentando unos valores de pI de 4,68 y 11,45 respectivamente,

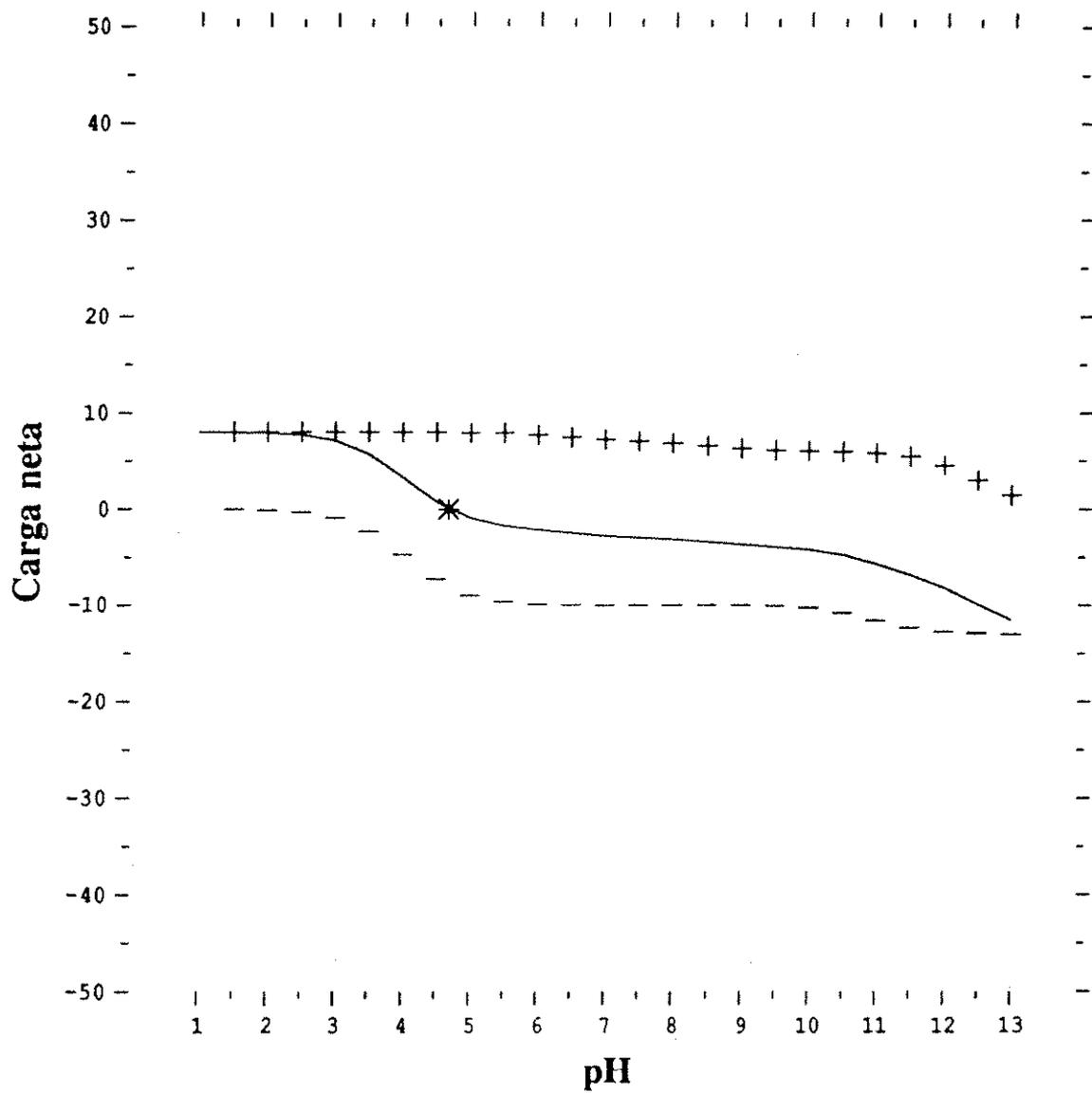


Figura 3.14.- Cálculo del pI para el péptido α del citocromo b559 del centro de reacción del PSII de *Beta vulgaris*.

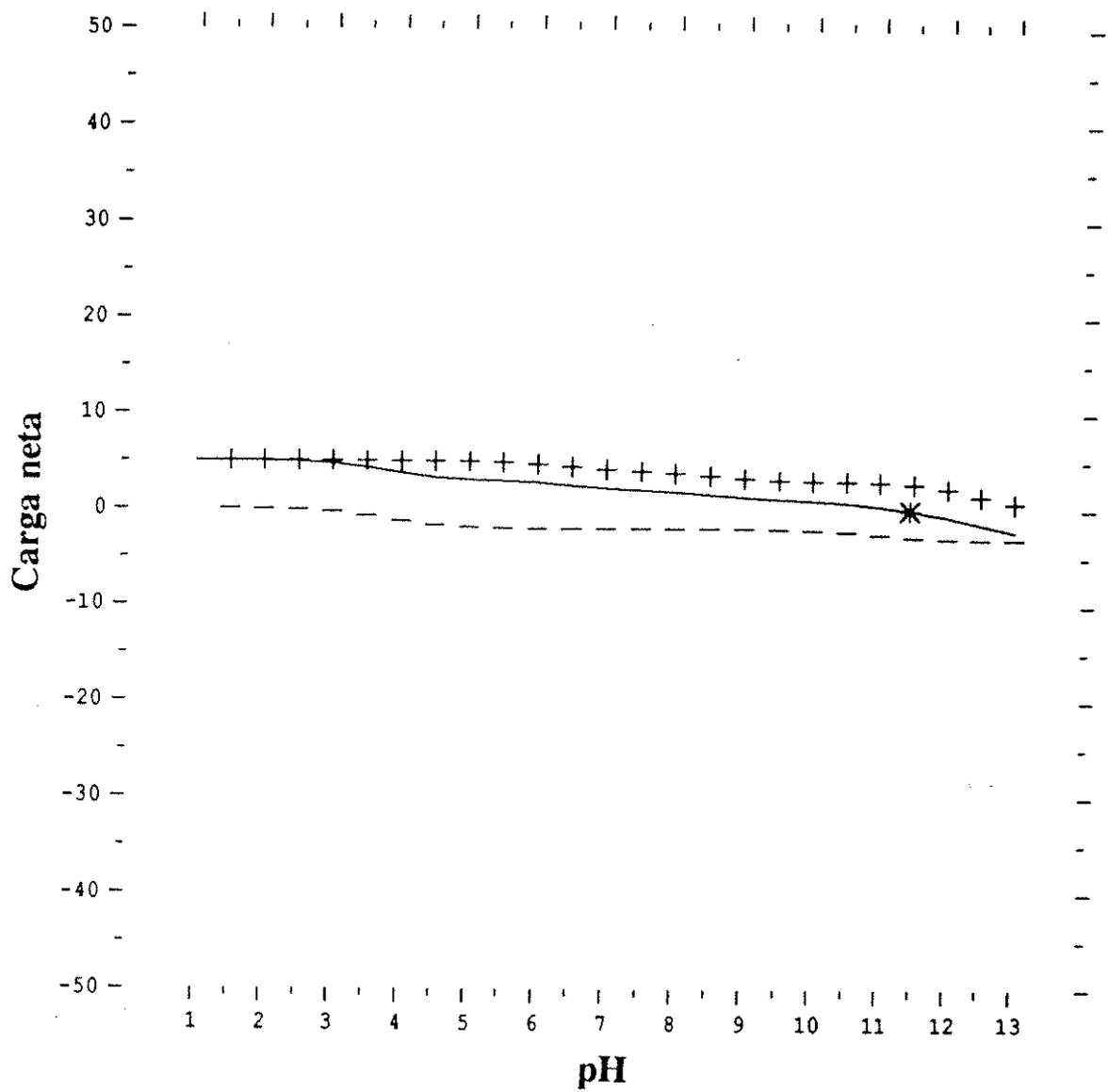


Figura 3.15.- Cálculo de pI del péptido β del citocromo b559 del centro de reacción del PSII de *Beta vulgaris*.

3.3.2.- Espectros de absorción de los complejos RCIIa y RCIIb

Los espectros de absorción en el visible de cada uno de los complejos se exponen en la figura 3.16. Ambos complejos mostraron máximos a 676 y 623 nm, producidos por la transición Qy de Chl a y Pheo a y sub-bandas vibracionales de ambas porfirinas, respectivamente; a 542.5 nm debido a la transición Qx de la Pheo a; a 483 nm originado por el β -caroteno; y a 416 nm debido a Chl a, Pheo a, y la banda Soret del citocromo b559.

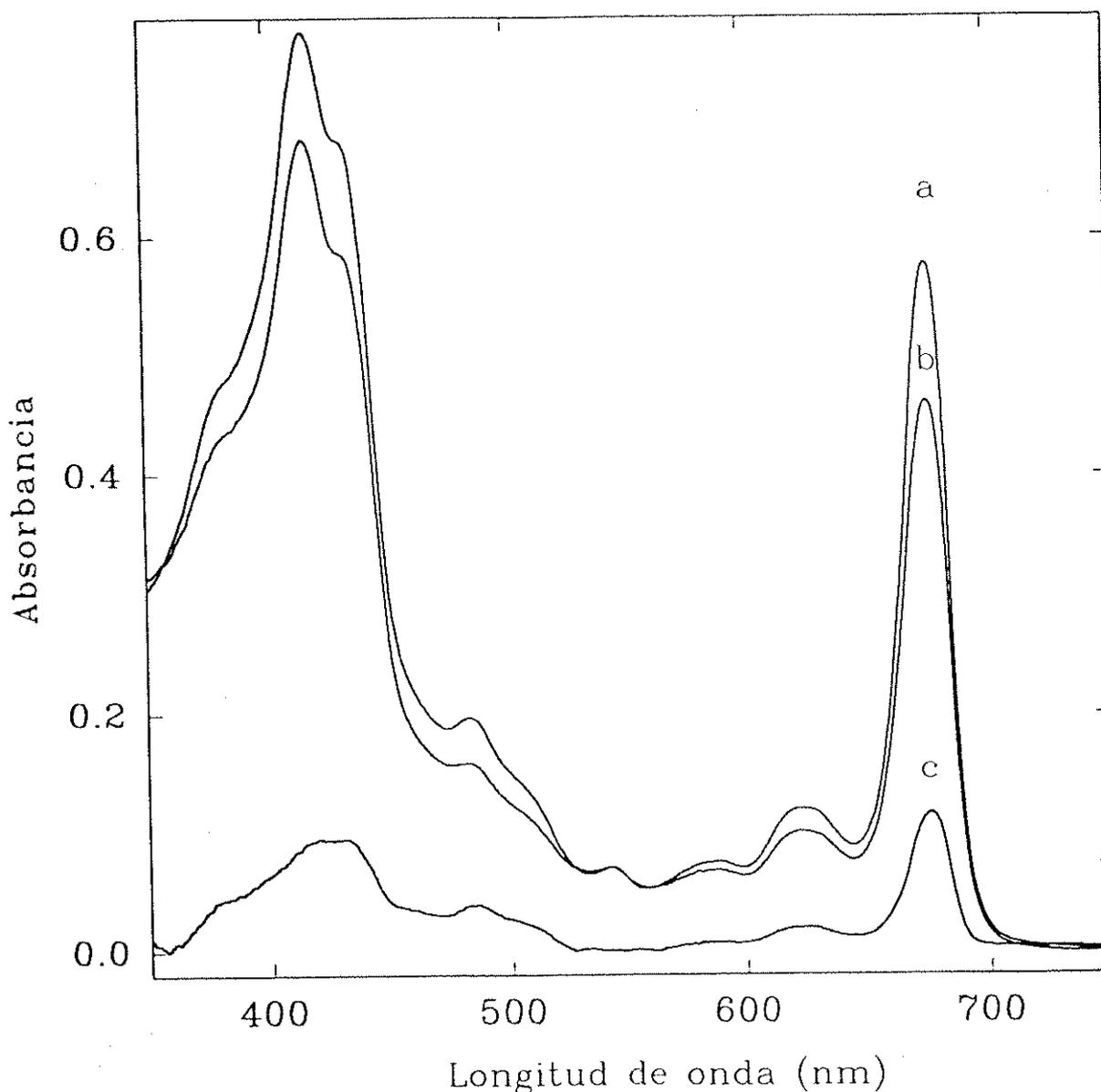


Figura 3.16.- Espectros de absorción electrónica a 4 °C de los complejos RCIIa (a) y RCIIb (b) de *Beta vulgaris* y la diferencia (c) entre ambos espectros normalizados en la banda Qx de Pheo a 542.5 nm. En ambos casos el espectro se realizó en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, y 2 mM de DM.

El hombro alrededor de 435 nm es principalmente debido a Chl a, la intensidad de este hombro es una buena indicación de la pureza de la preparación. En algunos casos el máximo de la banda en el rojo puede desplazarse 0.5 nm hacia el azul. La relación de absorbancias entre la banda a 416 nm y la transición Qy de las porfirinas de cada uno de los complejos fué distinta. Mientras el complejo RCIIa presentó una relación $A_{416}/A_{676} = 1,3$, el complejo RCIIb mostró una relación de 1,48.

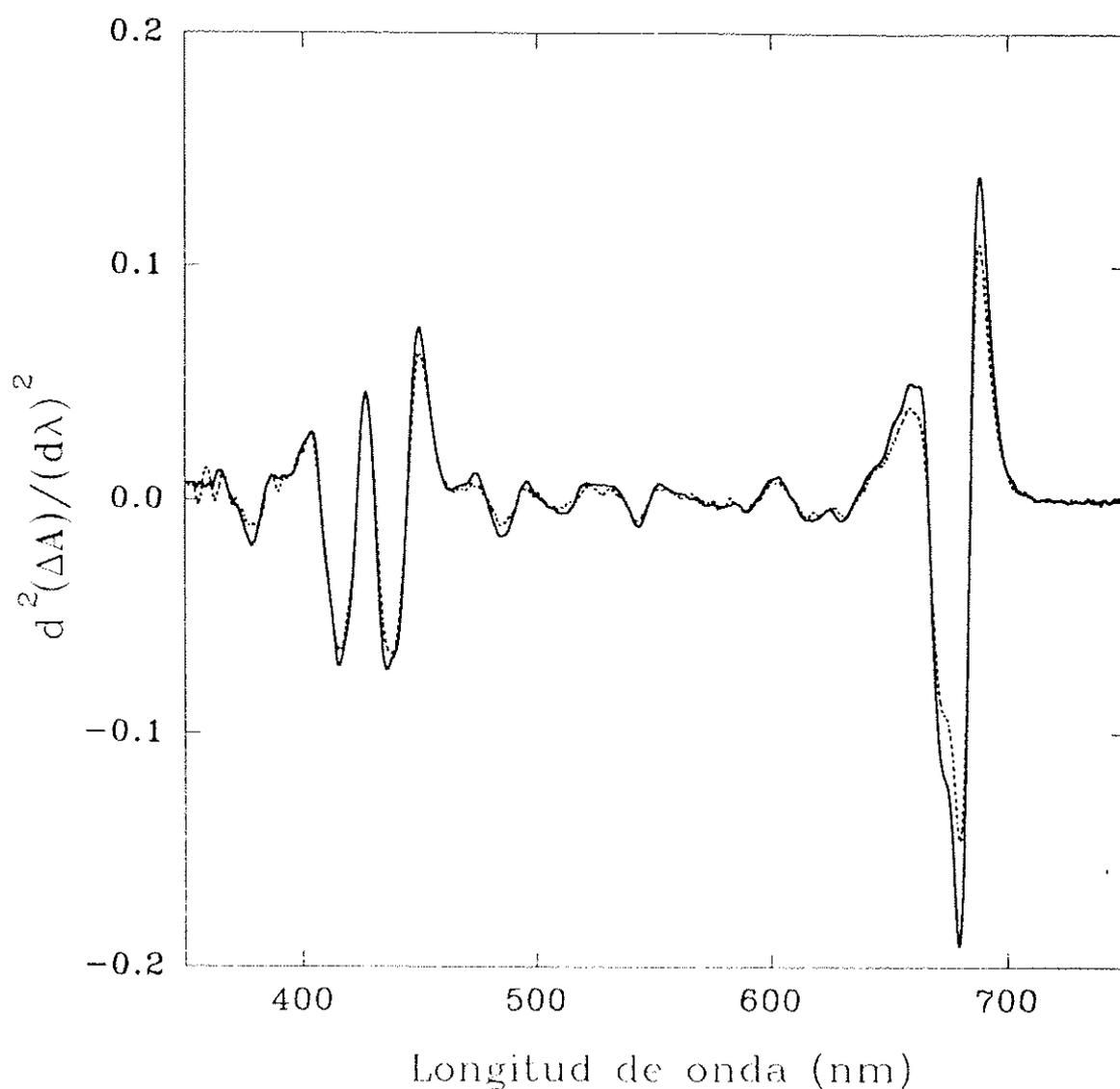


Figura 3.17.- Segunda derivada de los espectros de absorción de las preparaciones RCIIa (línea continua) y RCIIb (línea discontinua) del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris*.

El espectro diferencial entre ambas preparaciones como se muestra en la figura 3.16 esta compuesto claramente por Chl a y β -caroteno, indicando un menor contenido en estos cromóforos en RCI**ib** respecto a RCI**ia** (Montoya et al., 1991). La intensidad relativa de la banda de Chl a a 430 nm fué menor que la producida por la banda Soret del Cyt b559, Chl a y la Pheo a a 415 nm en RCI**ib** respecto a RCI**ia**.

La segunda derivada (figura 3.17) de la preparación RCI**ib** presenta en la zona de las transiciones del β -caroteno un descenso respecto a la preparación RCI**ia**. Además en la segunda derivada de ambas preparaciones del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris* se apreció la existencia de al menos dos componentes bajo la banda de menor energía. Un estudio detallado del espectro de absorción de ambos complejos se realizará más adelante (ver sección 3.5.).



3.4.- Estequiometría de los cofactores del complejo D1-D2-Cyt b559

3.4.1.- Relación Chl a / Pheo a

El análisis de los cofactores de los dos tipos de complejos D1-D2-Cyt b559 se realizó mediante diferentes técnicas analíticas (ver sección 2.3). En la figura 3.18 se puede

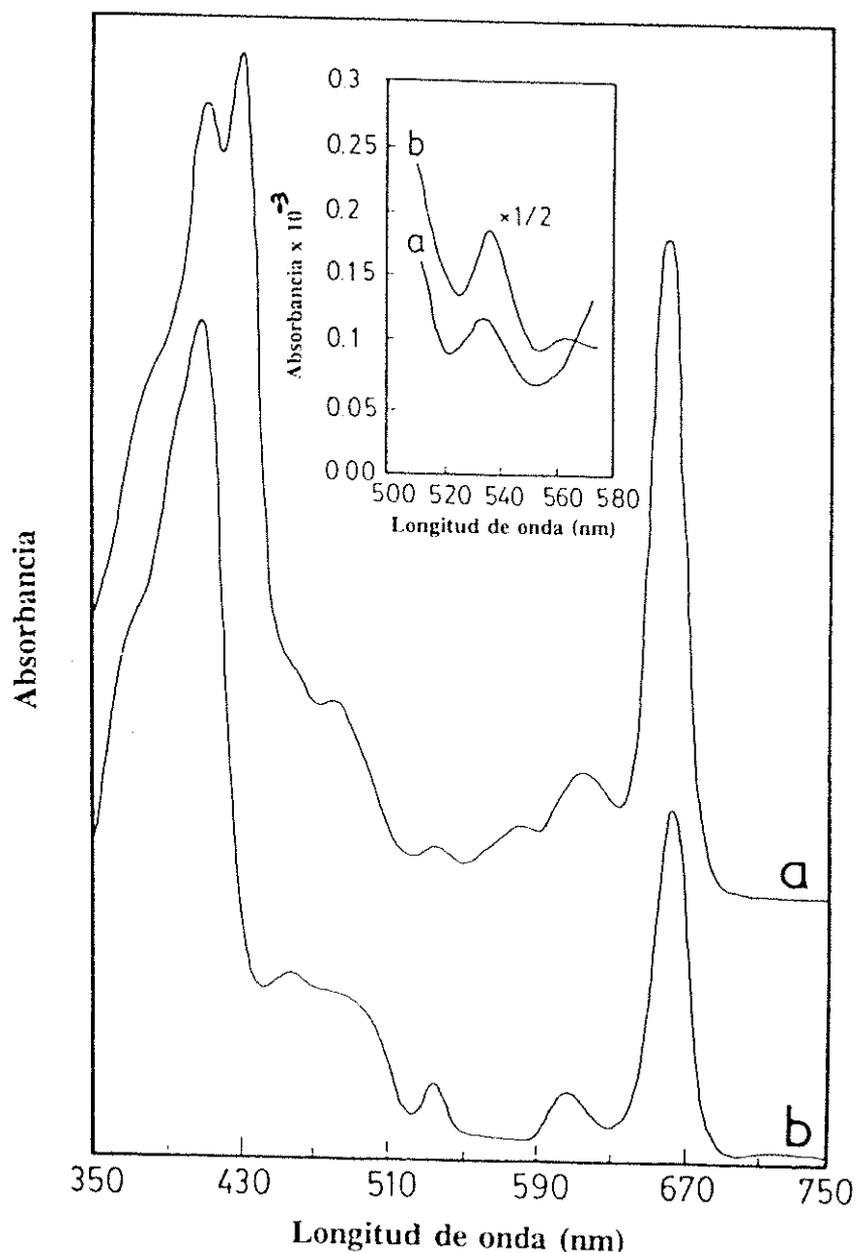


Figura 3.18.- Espectro de absorción electrónica de un extracto acetónico de pigmentos de centro de reacción RCIIa (a). Espectro de absorción electrónica del mismo extracto de pigmentos tras la adición de 1,5 mM de HCl (b). La figura interior representa una magnificación de la región de la banda Qx de la Pheo a. Este espectro fue utilizado para cuantificar el contenido de Pheo a de los extractos no feofitinizados.

observar el espectro de un extracto acetónico de pigmentos (a) y el mismo extracto después de su feofitinización añadiendo 1,5 mM de HCl. La Chl a fue totalmente convertida en Pheo a en estas condiciones ácidas. A partir de estos espectros podemos calcular el contenido en Chl a y Pheo a en nuestras preparaciones de centro de reacción.

3.4.2.- Relación Chl a / β -caroteno

El contenido de Chl a y β -caroteno fue determinado a partir de los cromatogramas de HPLC de los extractos acetónicos de pigmentos del complejo D1-D2-Cyt b559. En la figura 3.19 podemos observar un cromatograma típico detectado a 450 nm. Los picos 1 y 3 eluyen a un tiempo de retención de 8.2 y 9.9 minutos, respectivamente. El pico número 3 es producido por Pheo a y eluye a un tiempo de retención de 6.2 minutos.

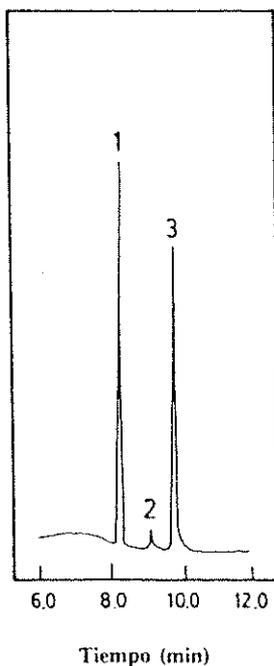


Figura 3.19.- Cromatograma de HPLC de un extracto de pigmentos del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris*. Los picos fueron detectados como Chl a (1), Pheo a (2) y β -caroteno (3).

En la figura 3.20 se muestra un detalle de la diferente cantidad de β -caroteno entre ambas muestras. El espectro de absorción de un extracto acetónico de pigmentos en la región de 440 a 630 nm revela con claridad la diferencia de absorbancias en la zona de 490 nm. La

preparación lavada durante un mayor tiempo, RCIIb (ver sección 2.2.4), presentó un menor nivel de β -caroteno comparada con RCIIa.

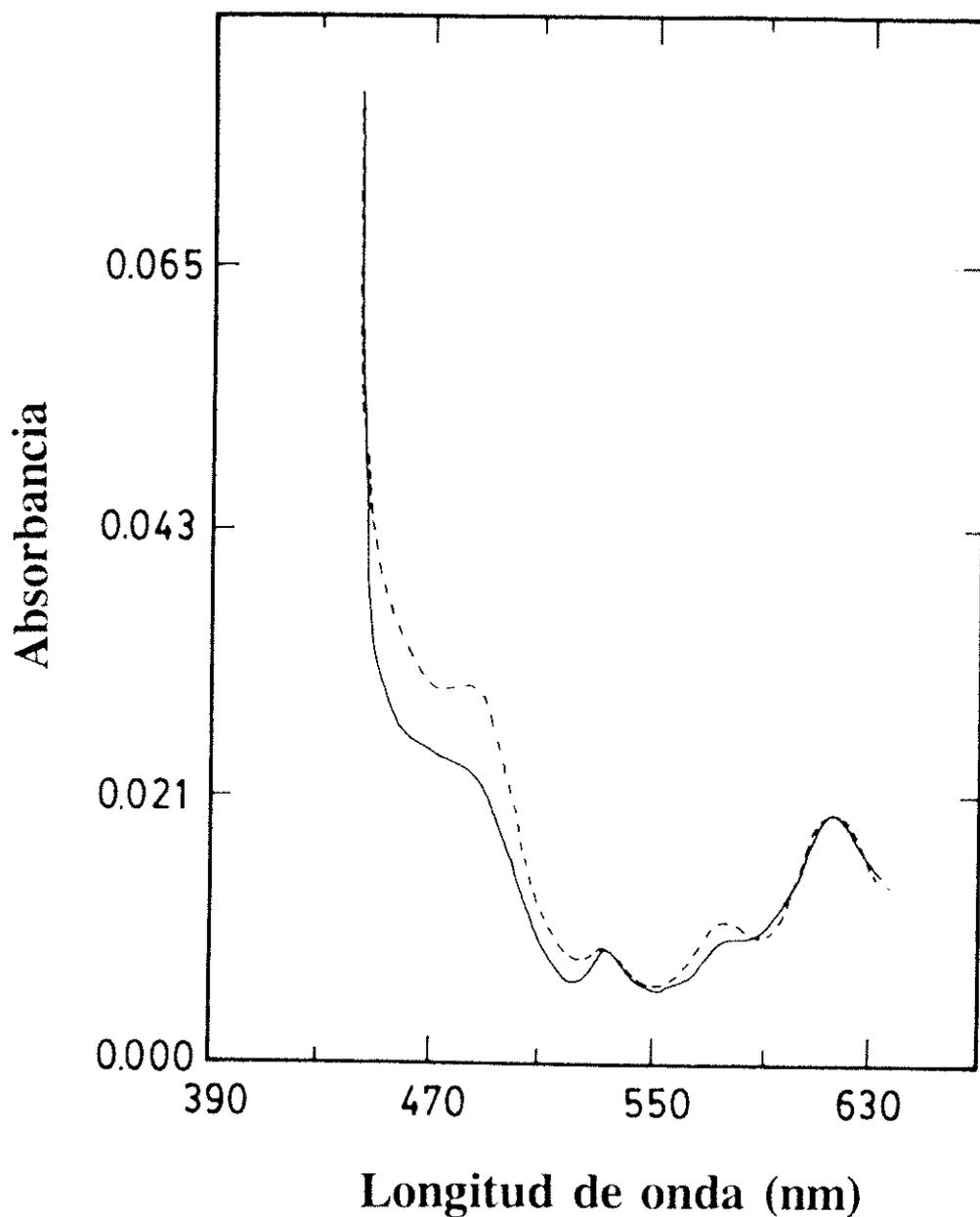


Figura 3.20.- Espectro de absorción electrónica de un extracto de pigmentos de las preparaciones RCIIa (- - -) y RCIIb (—) en el rango espectral de 440 a 630 nm. Los espectros fueron normalizados en la banda Q_x de la Phco a a 535 nm.

3.4.3.- Relación citocromo b559 / centro de reacción

La cantidad de citocromo b559 en ambas preparaciones se determinó tanto a partir del espectro diferencial reducido menos oxidado como del derivado alcalino piridín-hemocromo. El espectro ditionito-reducido menos ferricianuro-oxidado presentó un máximo a 560 nm como puede observarse en la figura 3.21 (a), mientras que el espectro del derivado alcalino piridín hemocromo mostró un máximo a 556 nm, figura 3.21 (b).

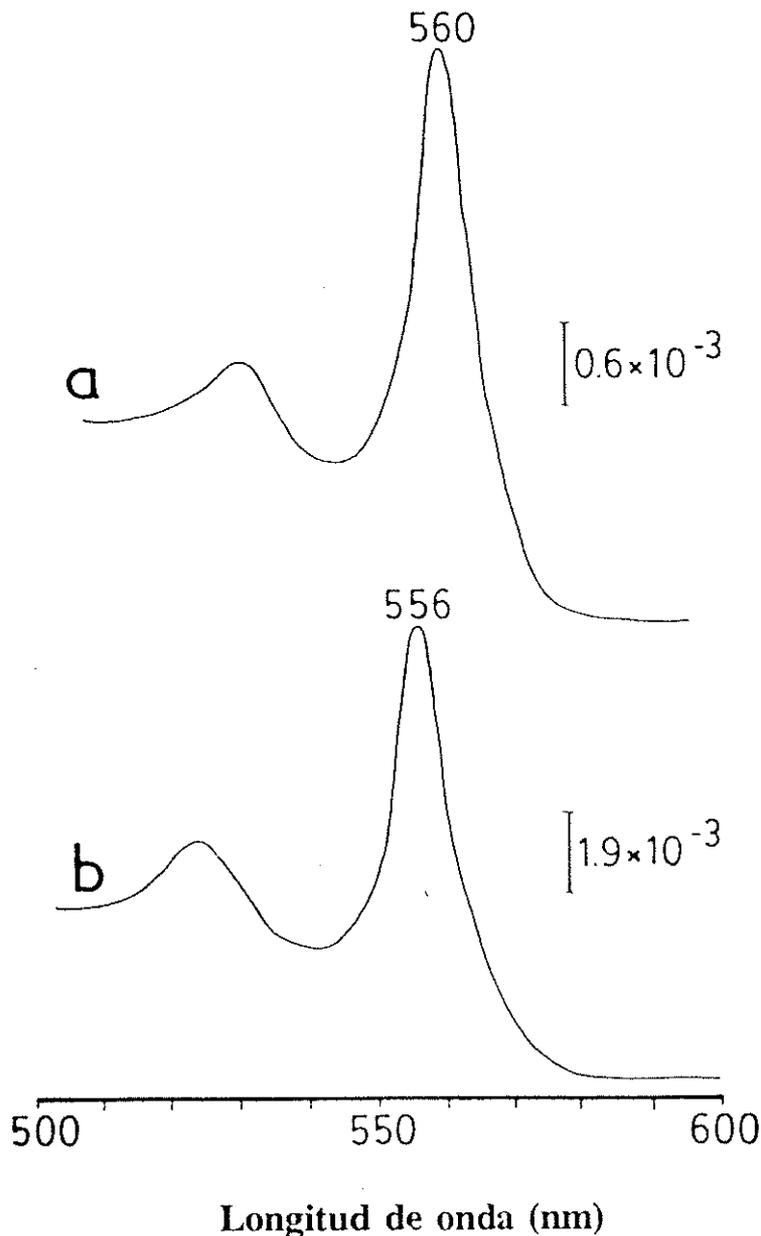


Figura 3.21.- (a) Espectro diferencial ditionito-reducido menos ferricianuro-oxidado y (b) Espectro diferencial del derivado alcalino del piridín hemocromo del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris* en el rango espectral de 500 a 600 nm.

La concentración de Cyt b559 fué similar en ambas partículas e independiente de la fracción de elución obtenida del gradiente lineal de purificación del complejo. La relación fué de un Cyt b559 por RC.

3.4.4.- Relación Pheo a / proteína

La relación Pheo a / proteína se realizó a partir de las concentraciones de este pigmento en las extracciones con acetona y el cálculo de la concentración de proteína en las mismas muestras mediante el método de Markwell et al., 1981. (ver sección 2.3.5). El resultado fué de 2 Pheo a por 80 kDa de peso molecular del complejo (ver tabla 3.5).

Tabla 3.5.- Contenido de pigmentos por 2 Pheo a de las preparaciones RCIIa y RCIIb de *Beta vulgaris*.

	RCIIa	RCIIb
Clorofila a	6,01 ± 0,16	4,11 ± 0,08
Feofitina a	2,00	2,00
β-caroteno	1,63 ± 0,09	0,84 ± 0,01
Citocromo b559	1,14 ± 0,03	1,23 ± 0,12
Feofitina a / 80 kDa proteína	2,03 ± 0,005	2,00 ± 0,005

Los valores representan las medias ± SE, (n=6)

En la tabla 3.5 se resumen los cálculos realizados en estos apartados. La tabla presenta la estequiometría de cromóforos y proteína por 2 Pheo a tanto para RCIIa como para RCIIb. Notables diferencias se pueden observar en el contenido de Chl a y β-caroteno entre ambas preparaciones. Un tercio de la Chl a y la mitad de β-caroteno se han perdido como resultado del

prolongado lavado de la columna con TX-100. En contraste el nivel de citocromo b559 fué independiente del tipo de preparación. Además, la determinación de proteína demostró la presencia de 2 Pheo a por 80 kDa, lo cual encaja con la suma de las masas moleculares aparentes determinadas por electroforesis de D1, D2 y las subunidades del Cyt b559 de las preparaciones RCIIa y RCIIb, lo cual prueba la existencia de 1 mol de complejo D1-D2-Cyt b559 por 2 moles de Pheo a.

3.4.5.- Análisis de aminoácidos del complejo D1-D2-Cyt b559

El análisis de la composición de aminoácidos del complejo D1-D2-Cyt b559 presentó el resultado que se puede observar en la tabla 3.6.

Tabla 3.6.- Relación del contenido en aminoácidos del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris*.

Aminoácido	nmol aa/nmol prot.	Aminoácido	nmol aa/ nmol prot.
Alanina	66,6	Fenilalanina	44,2
Valina	39,9	Isoleucina	36,4
Leucina	64,2	Metionina	17,3
Prolina	N.D.	Arginina	N.D.
Lisina	18,5	Treonina	37,3
Serina	60,0	Tirosina	12,2
Cisteína	N.D.	Glutamina	57,8
Asparagina	58,4	Histidina	N.D.
Triptófano	N.D.	Glicina	125,2

3.5.- Caracterización espectroscópica de los dos tipos de complejos D1-D2-Cyt b559, RCIIa y RCIIb, del centro de reacción de *Beta vulgaris*.

Los espectros de ambos tipos de partículas a 277 K así como su espectro diferencial pueden observarse en la figura 3.16 (ver sección 3.3.2). Un estudio detallado de ambas partículas se ha realizado utilizando espectroscopia de absorción y fluorescencia en estado estacionario a bajas temperaturas así como de resonancia Raman.

3.5.1.- Resonancia Raman de los complejos RCIIa y RCIIb

La diferente composición de pigmentos de ambos complejos D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris* fué evidente en los espectros SERRS (en la Tabla 3.7 se muestra la asignación de las principales bandas SERRS; Picorel et al., 1991; Ghanotakis et al., 1989). La frecuencia de las bandas fué muy similar en ambos espectros (ver figuras 3.22 y 3.23) pero la intensidad relativa de las mismas varió de una preparación a otra.

En el caso de la preparación RCIIb (figura 3.23) las bandas correspondientes a Pheo a, con máximos a 1582, 1228 y 678 cm^{-1} , y a Cyt b559, con máximos a 1582, 1495, 1363, y 678 cm^{-1} , fueron más intensas comparadas con las de los otros cromóforos en el mismo espectro. Sin embargo la intensidad relativa de estas bandas en el complejo RCIIa (figura 3.22) disminuyó en gran medida.

La comparación de ambos espectros de resonancia Raman indica claramente la pérdida de Chl a y β -caroteno en la preparación RCIIb respecto a la RCIIa, debido a esta pérdida de cromóforos en la partícula RCIIb las bandas asignadas a las transiciones de Pheo a y el Cyt b559 son apreciablemente mayores en este tipo de preparación del complejo D1-D2-Cyt b559.

Tabla 3.7.- Asignación de las principales bandas SERRS observadas para el complejo D1-D2-Cyt b559 excitado con láser a 406.7 nm a 77 K (Picorel et al., 1991).

Desplazamiento Raman cm^{-1}	Cromóforo
1685	Chl a y Pheo a
1611	Chl a
1584	Pheo a y Cyt. b559
1554	Chl a, Pheo a y Cyt. b559
1529	β -caroteno
1495	Chl a, Pheo a y Cyt. b559
1436	Chl a y β -caroteno
1387	Chl a y Cyt. b559
1360	Cyt. b559 (forma reducida)
1349	Chl a
1331	Chl a y Pheo a
1224	Chl a, Pheo a y Cyt. b559
1159	β -caroteno
1001	β -caroteno
984	Chl a y Pheo a
967	Chl a
911	Chl a
792	Chl a y Pheo a
744	Chl a y Cyt. b559
672	Chl a, Pheo a y Cyt. b559

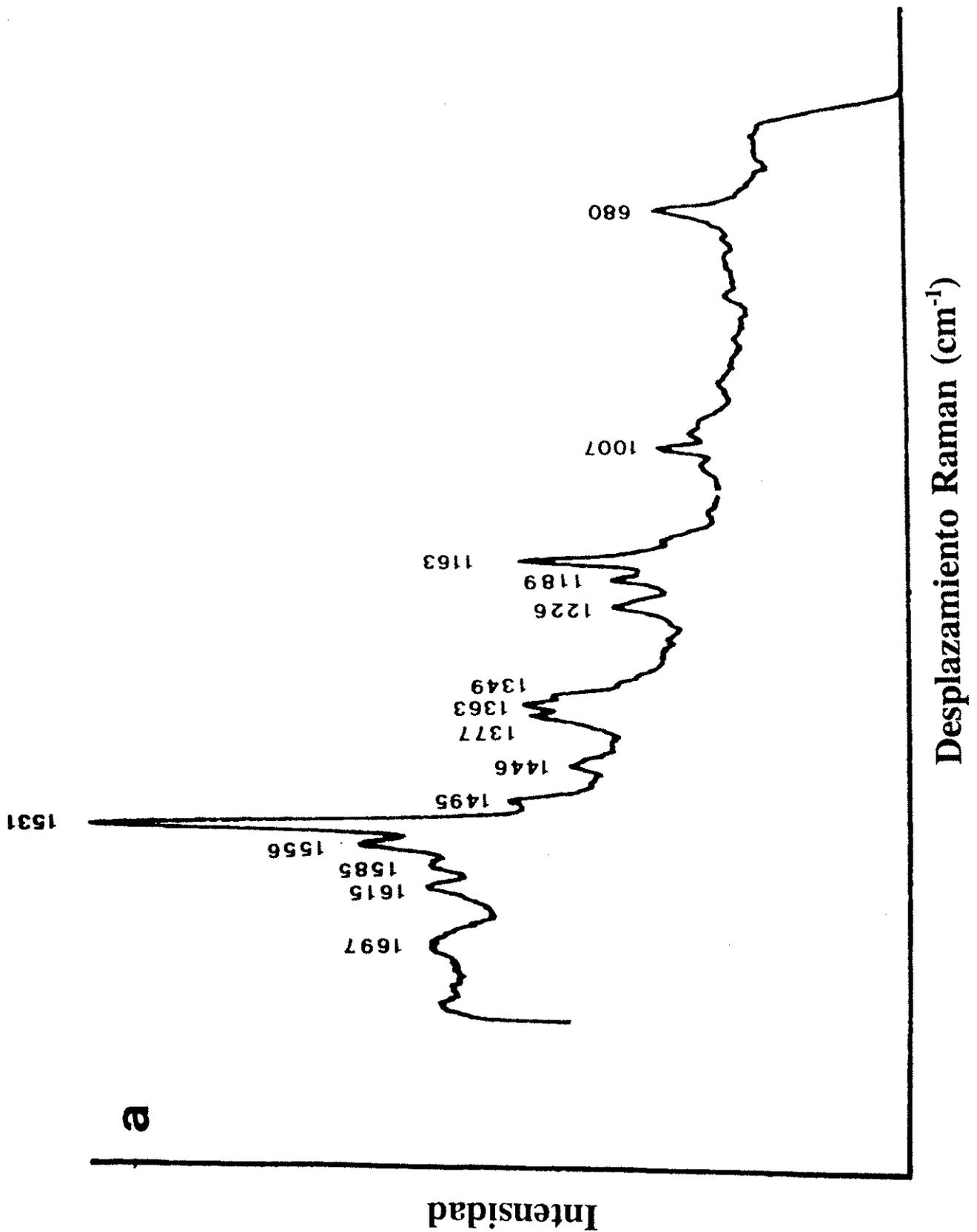


Figura 3.22.- Espectro SERRS de la preparación RCIIa del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris*. La frecuencia de los picos se da en cm^{-1} . Las muestras fueron excitadas a 406.7 nm a temperatura de N_2 líquido con una potencia de 5 mW.

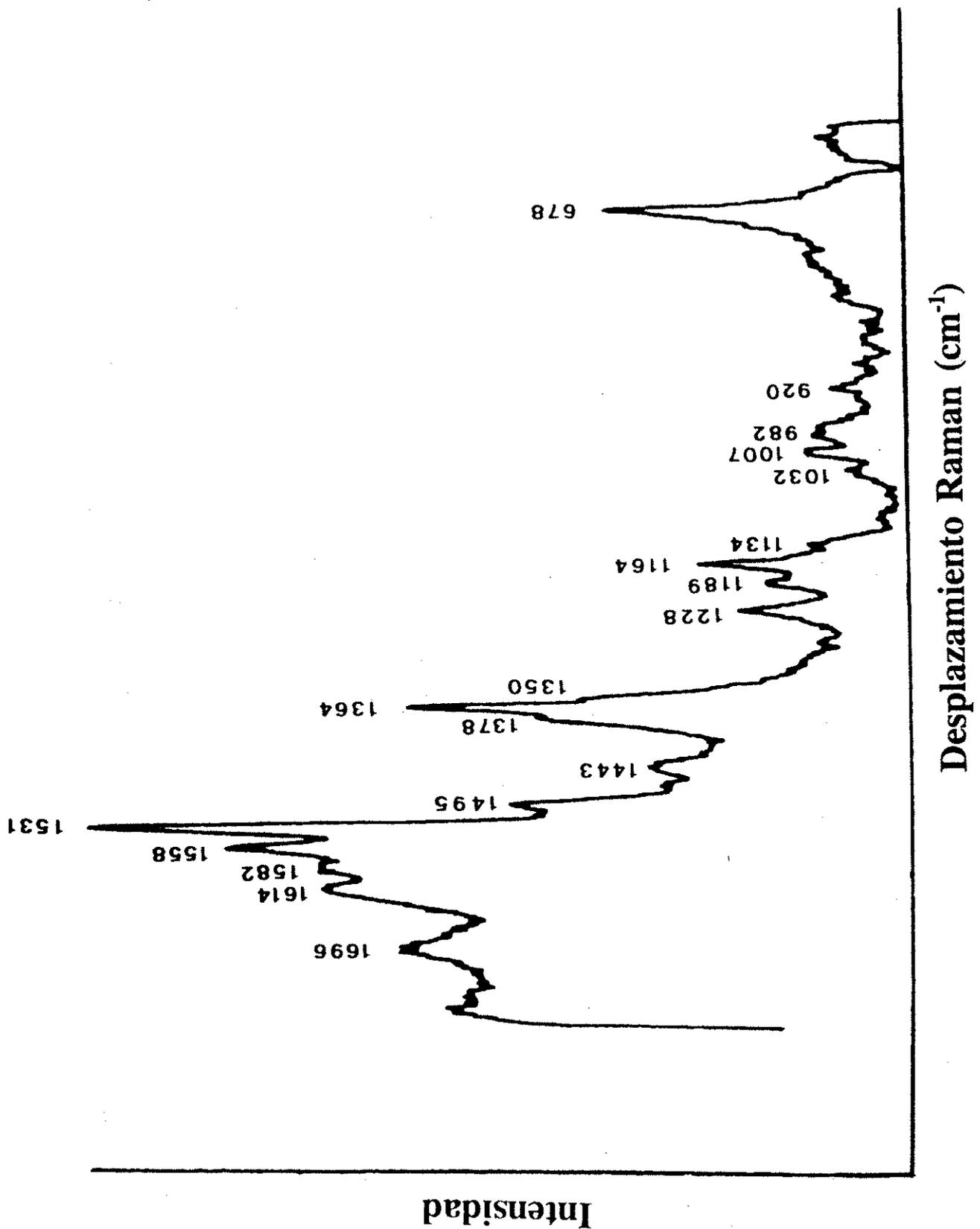


Figura 3.23.- Espectro SERRS de la preparación RCIIb del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris*. La frecuencia de los picos se da en cm^{-1} . Las condiciones experimentales fueron las mismas que en la figura 3.22.

3.5.2.- Análisis de la banda de absorción en el rojo de las preparaciones RCIIa y RCIIb

El estudio de la banda de menor energía de ambas partículas se ha realizado a una temperatura de N₂ líquido (77 K) fundamentalmente porque la definición de la banda era suficiente para poder asignar diferentes componentes dentro de ella, trabajar a temperaturas de He líquido (4.2 K) no ofreció ninguna resolución adicional de la banda y es además bastante más difícil. El análisis de la banda de menor energía del complejo D1-D2-Cyt b559 se llevó a cabo mediante ajuste de los distintos componentes a funciones gaussianas (ver sección 2.5.3).

La figura 3.24 muestra un espectro de la banda de absorción en el rojo de la preparación RCIIa a 277 K del complejo D1-D2-Cyt b559, la segunda derivada de dicho espectro se puede observar en la figura 3.25. La segunda derivada mostró la existencia de un pico negativo agudo a 679,5 nm y una banda negativa menos acusada a 672,5 nm. Este análisis reveló por tanto la existencia de al menos dos componentes espectrales bajo la banda de menor energía de ambos complejos RCIIa y RCIIb (ver sección 3.3.2). Para poder realizar una mejor identificación de los componentes, se realizó la deconvolución en gaussianas del espectro de absorción.

En la figura 3.24 se presenta el ajuste del espectro por cuatro gaussianas con máximos a 680, 671, 670 y 622 nm, esta última banda como se explicó en la sección 2.5.5 se debe a transiciones vibrónicas de todas las porfirinas presentes en el complejo D1-D2-Cyt b559. La anchura total de la banda a la mitad de la altura en el máximo (FWHM) de cada una de las gaussianas fue de 247, 266, y 594 cm⁻¹ para cada una de las componentes en orden creciente de energía. La segunda derivada del espectro ajustado fué comparable a los datos experimentales indicando la bondad del ajuste de la deconvolución. Una relación de áreas de 1.31 entre los componentes de 680/671 fue la única condición impuesta en esta deconvolución. Esta razón refleja la relación de los osciladores de la Chl a y Pheo a (Braun et al., 1990).

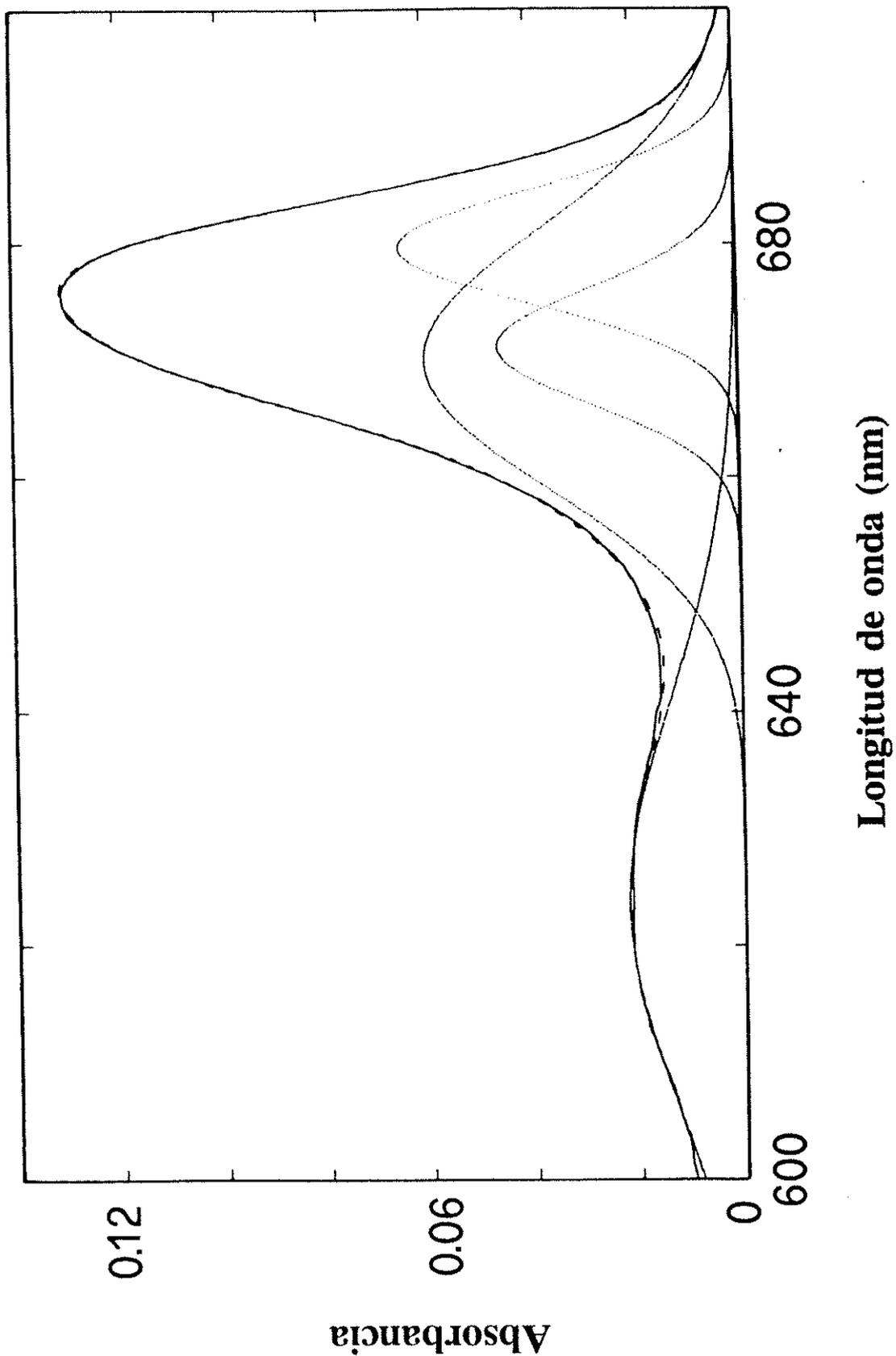


Figura 3.24.- Deconvolución en gaussianas de la banda del rojo de la preparación RCIIa del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris* a 277 K. La línea continua corresponde al espectro de absorción experimental, las líneas punteadas a las componentes resultantes de la deconvolución y la línea discontinua al ajuste de la suma de las gaussianas a los datos experimentales.

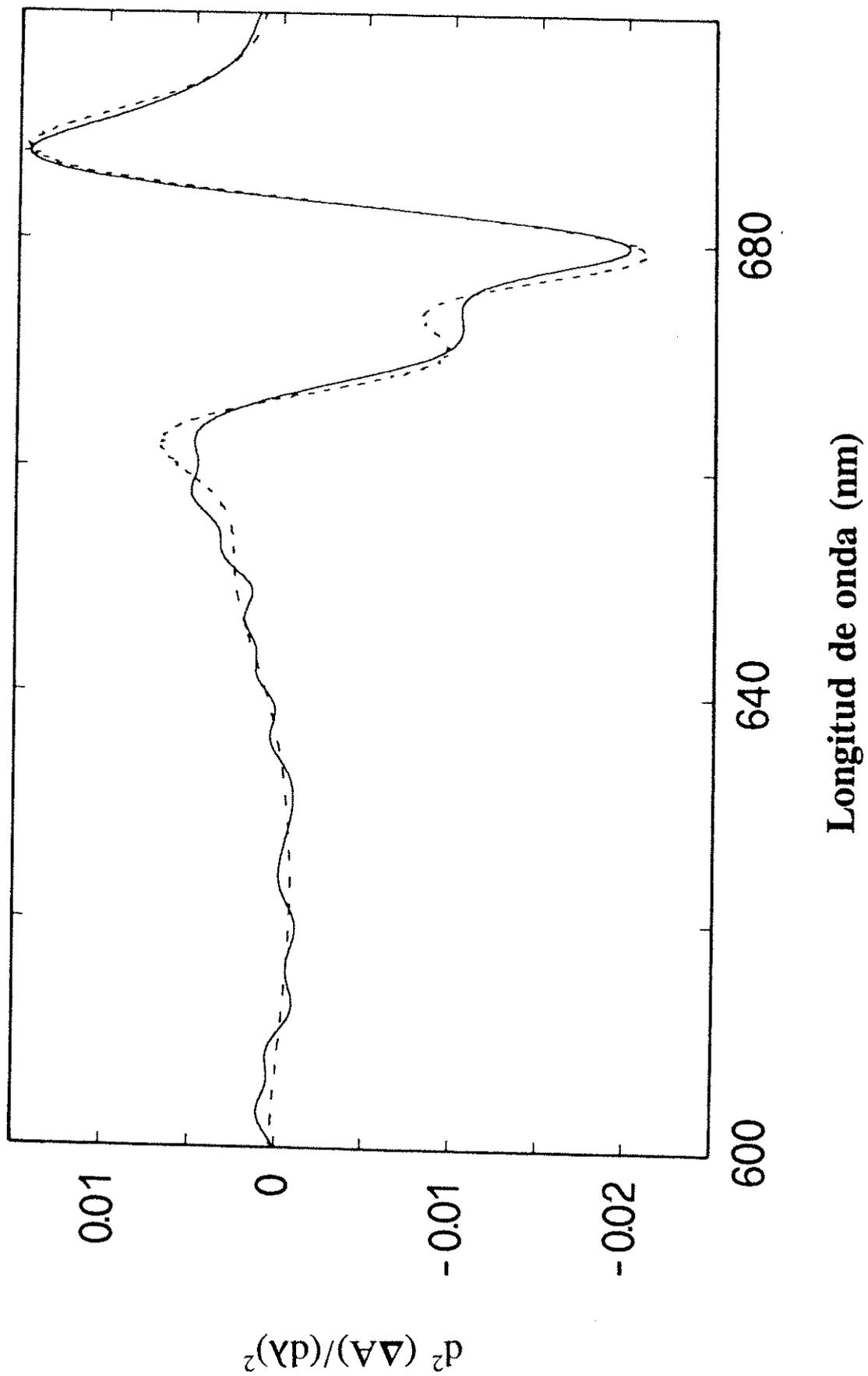


Figura 3.25.- Segunda derivada del espectro de la figura 3.24, la línea continua corresponde a los datos experimentales y la línea discontinua a la segunda derivada calculada a partir de las componentes gaussianas resultantes de la deconvolución de la banda.

Para obtener una mejor resolución espectral y así poder diferenciar mejor las características de ambos tipos de preparaciones del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris*, el resto de este trabajo se realizó prestando más atención a los datos obtenidos a bajas temperaturas.

3.5.2.1.- Espectro de absorción a 77K de la preparación RCIIa del complejo D1-D2-Cyt b559

Como se puede observar en el espectro de la preparación RCIIa a 77 K de la figura 3.26, la banda del rojo mostró claramente la aparición de dos picos separados emergiendo de la transición Qy de las porfirinas. En la misma figura se presenta la deconvolución del espectro en gaussianas y en la figura 3.27 la segunda derivada de dicho espectro. La banda de menor energía de la preparación RCIIa presentó dos máximos a 672 y 678.5 nm, en contraste con el espectro a 277 K el cual mostró un único máximo a 676 nm (ver figura 3.24). La segunda derivada del espectro a 77 K estuvo compuesta también por dos componentes con máximos a 680 y 671 nm.

Tabla 3.8.- Propiedades espectrales y asignación de bandas de la preparación RCIIa del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris*.

λ_{\max} (nm)	FWHM (cm ⁻¹)	Area relativa (%)	Asignación
680	166	26	P680 (2 Chl)
672	189	20	2 Pheo
669.5	452	54	4 Chl accesorias

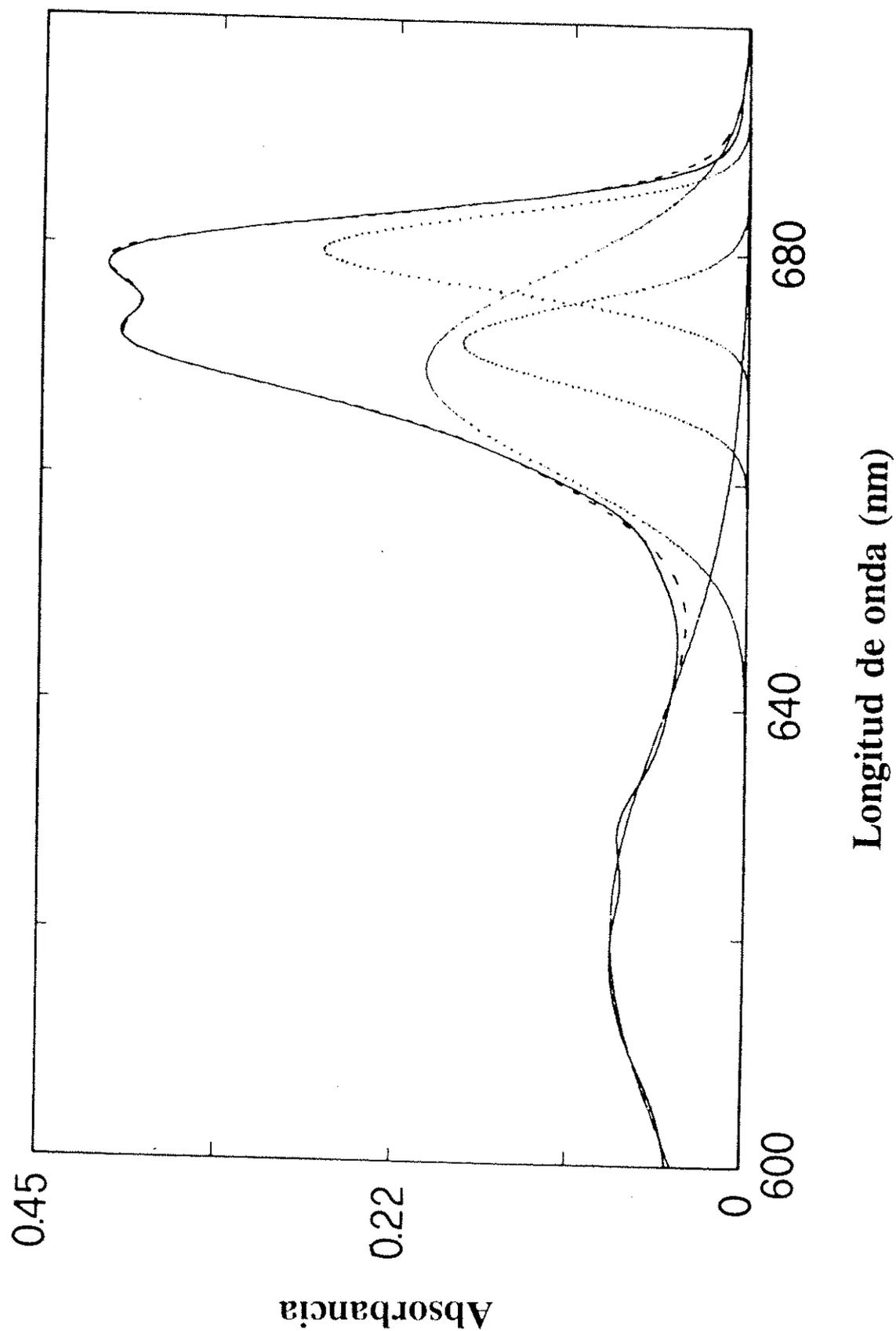


Figura 3.26.- Espectro de absorción electrónica a 77 K y deconvolución en gaussianas de la banda en el rojo de la preparación RCIIa del complejo D1-D2-Cyt b559. El espectro a baja temperatura se obtuvo previa dilución de la muestra añadiendo 2/3 (v/v) de glicerol. (Línea continua) espectro de absorción experimental; (línea de puntos) componentes gaussianas; (línea discontinua) ajuste de la deconvolución efectuada a los datos experimentales.

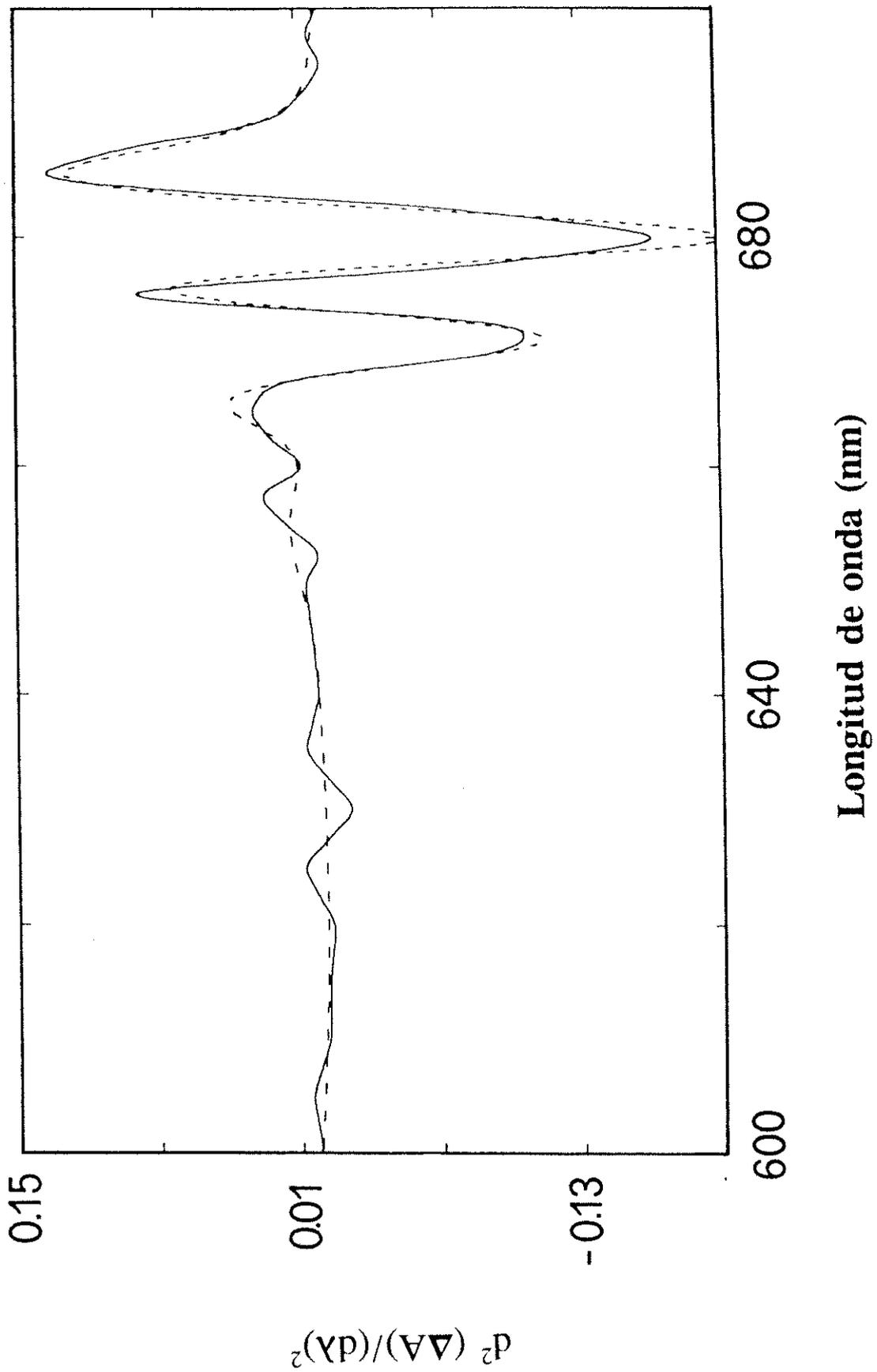


Figura 3.27.- Segunda derivada del espectro de absorción de la preparación RCIIa del complejo D1-D2-Cyt b559. (Línea sólida) segunda derivada obtenida a partir del espectro experimental; (línea discontinua) segunda derivada obtenida a partir de las componentes gaussianas.

La deconvolución en gaussianas del espectro de la banda en el rojo de RCIIa a 77 K mostró la existencia de tres componentes con máximos a 680, 672 y 669.5 nm. La FWHM de cada uno de los componentes fué 166, 189 y 452 cm^{-1} en orden creciente de energía. La comparación entre los valores de FWHM y la separación de energías a 277 y 77 K indicó que la baja temperatura no indujo un desplazamiento de las bandas sino un estrechamiento de éstas.

La segunda derivada del espectro a baja temperatura se ajustó muy bien a la segunda derivada obtenida a partir de las componentes gaussianas simuladas por el ordenador (figura 3.27) lo que verificó de nuevo la bondad del ajuste. Las únicas restricciones impuestas al ajuste fueron de nuevo la relación de áreas de 1,31 entre los componentes de 680/672 (Braun et al., 1990) y la presencia de una banda alrededor de 670 nm (Telfer et al., 1990; van Kan et al., 1990; Braun et al., 1990).

3.5.2.2.- Espectro de absorción a 77 K de la preparación RCIIb del complejo D1-D2-Cyt b559

El espectro a 77 K de la preparación RCIIb se puede observar en la figura 3.28 y mostró dos bandas con máximos a 672 y 678 nm en la transición Qy de las porfirinas. La segunda derivada del espectro (figura 3.29) reveló la existencia de al menos tres componentes bajo la banda del rojo de este tipo de preparación con máximos a 680, 672 y 669 nm. Este último componente no se detectó en la segunda derivada del espectro de la partícula RCIIa (figura 3.29).

La deconvolución de este espectro de absorción presentó la existencia de cuatro curvas con máximos a 680, 672, 669 y 667 nm. La FWHM de cada una de ellas fué de 181, 201, 387, y 618 cm^{-1} en orden creciente de energía. El ajuste entre el espectro de absorción simulado y su segunda derivada se ajustaron bien a los datos experimentales. De nuevo la razón 1.31 entre las gaussianas de 680/672 fué una de las restricciones impuestas en el ajuste así como la existencia de una banda menor a 667 nm correspondiente a un 15 % de

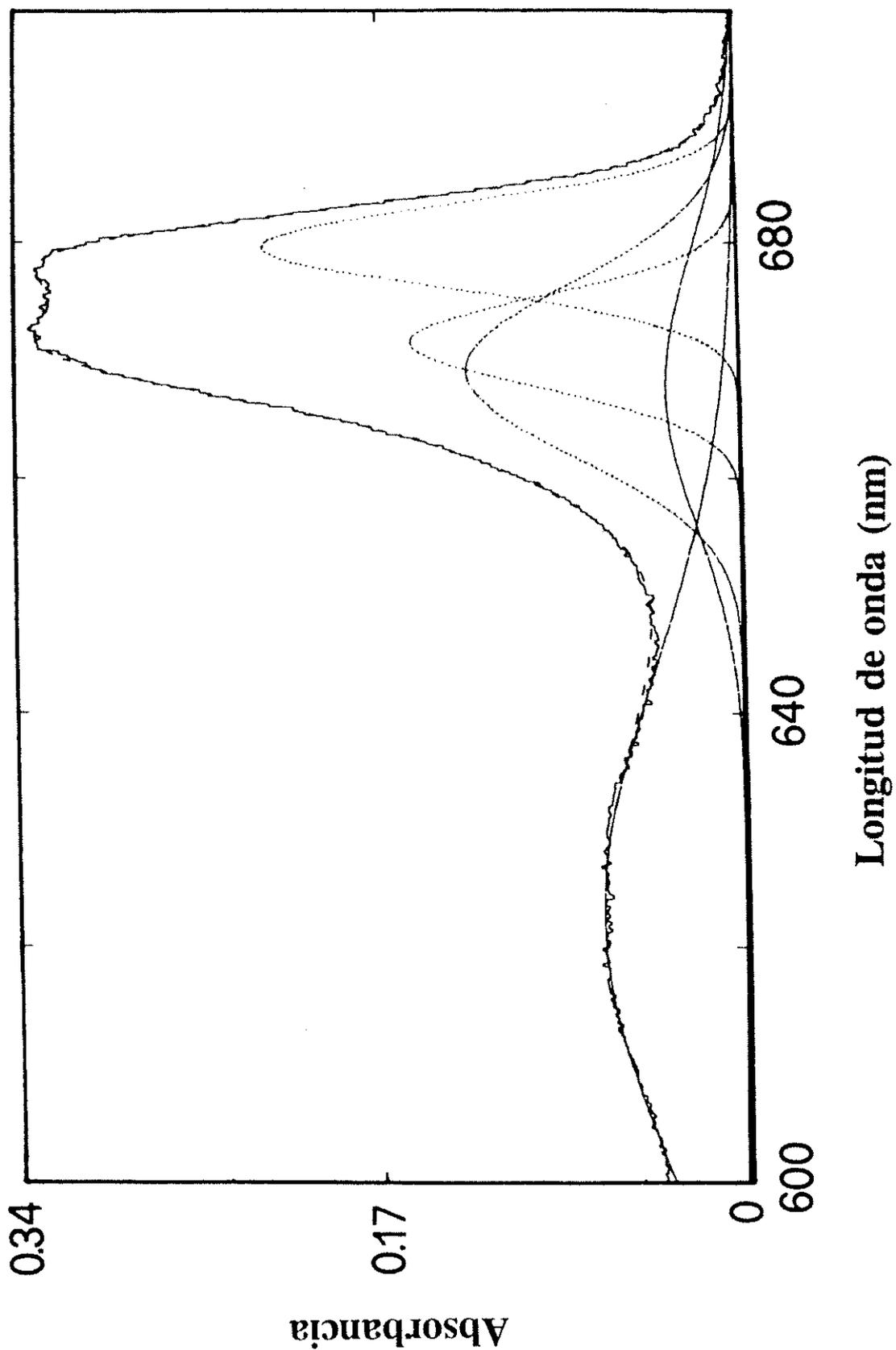


Figura 3.28.- Espectro de absorción electrónica a baja temperatura y deconvolución en gaussianas de la preparación RCIIb del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris*. El espectro se obtuvo tras diluir la muestra 2/3 (v/v) con glicerol. Espectro de absorción experimental (línea sólida); componentes gaussianas resultantes de la deconvolución (línea de puntos); ajuste de los datos simulados con el espectro experimental (línea discontinua).

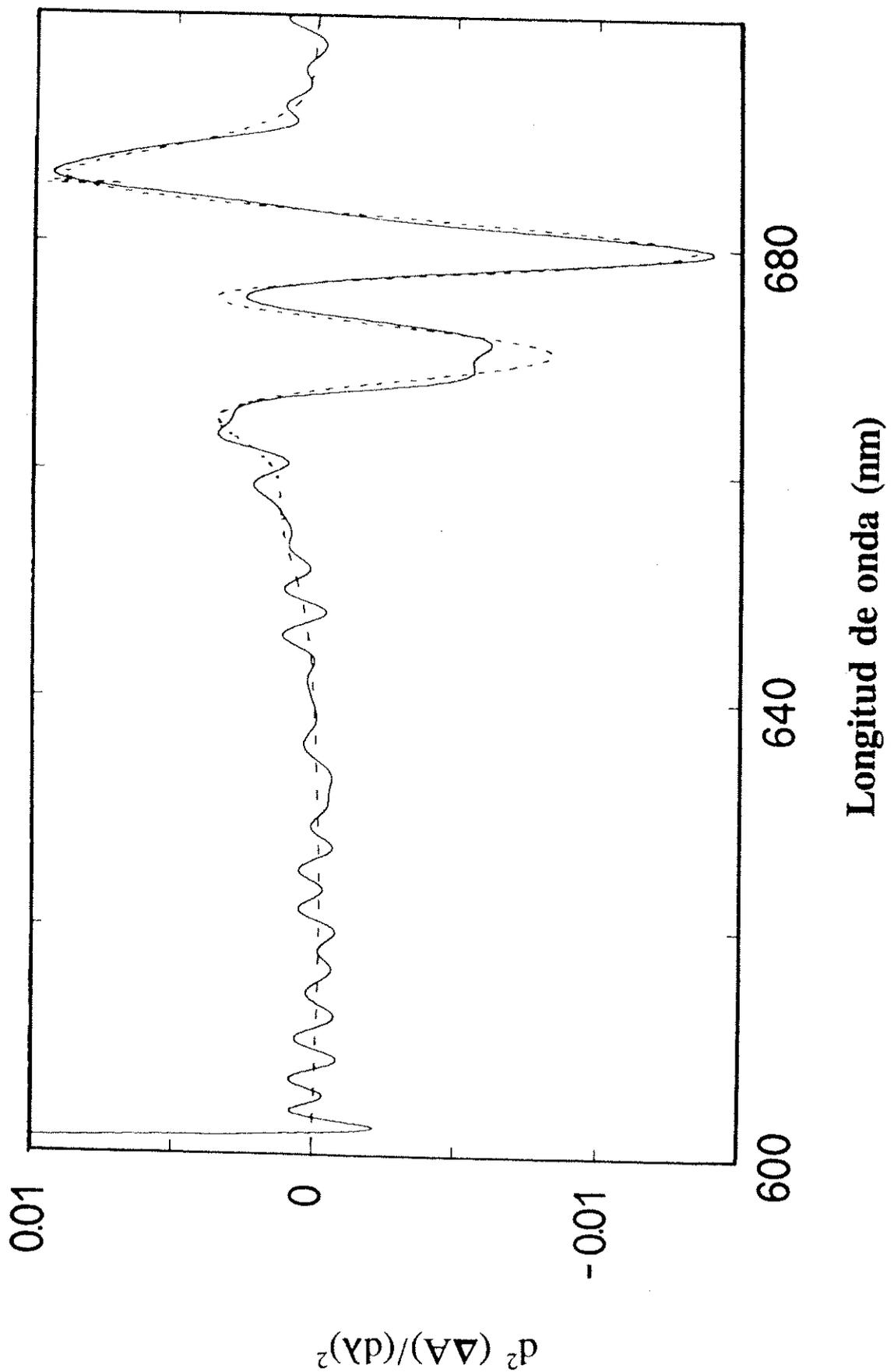


Figura 3.29.- Segunda derivada del espectro de absorción de la preparación RCIIb (figura 3.28). (línea sólida) datos experimentales; (línea discontinua) segunda derivada obtenida a partir de las componentes gaussianas.

desnaturalización del centro de reacción determinada por medidas de fluorescencia y absorción resueltas en el tiempo (ver sección de espectroscopia resuelta en el tiempo).

Tabla 3.9.- Propiedades espectrales y asignación de bandas a 77 K de la preparación RCIIb del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris*.

λ_{\max} (nm)	FWHM (cm^{-1})	Area relativa (%)	Asignación
680	181	29	P680 (2 Chl)
672	201	22	2 Pheo
669	387	34.2	2 Chl accesorias
667	618	14.8	inactivación del RC

La contribución relativa a la absorción total de cada una de las gaussianas bajo la banda de la transición Qy a baja temperatura tanto para RCIIa como para RCIIb se calculó a partir de su área relativa. En la tabla 3.8 y 3.9 se pueden observar estos datos así como algunas características espectroscópicas de ambas preparaciones.

3.5.2.3.- Deconvolución en dos componentes de la banda de absorción en el rojo del complejo D1-D2-Cyt b559

Tanto en el caso de RCIIa como en el de RCIIb se necesitó realizar el ajuste con tres gaussianas para una buena simulación de los datos experimentales. La simulación del espectro experimental con dos gaussianas no fué tan buena como con tres. En la figura 3.30 se muestra el mejor ajuste con dos gaussianas para la preparación RCIIa tomando el máximo a 680 para el componente de menor energía como el único parámetro fijo en el análisis. En estas condiciones el análisis de los datos simulados no encajó tan bien con los datos experimentales.

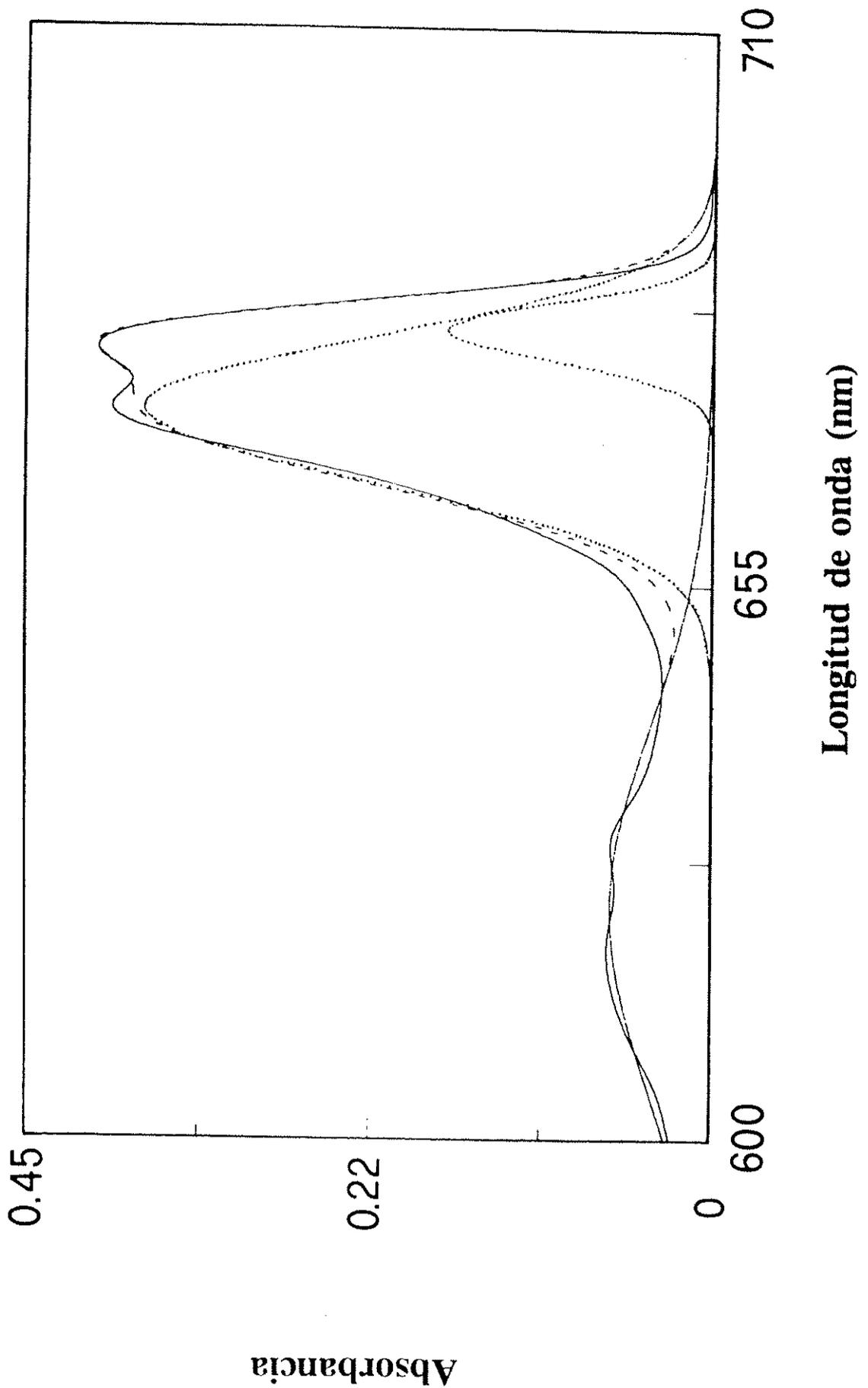


Figura 3.30.- Deconvolución de la banda de menor energía de RCIIa considerando solamente dos componentes. Espectro experimental (línea sólida); componentes gaussianas (línea de puntos); ajuste de los datos simulados a los experimentales (línea discontinua).

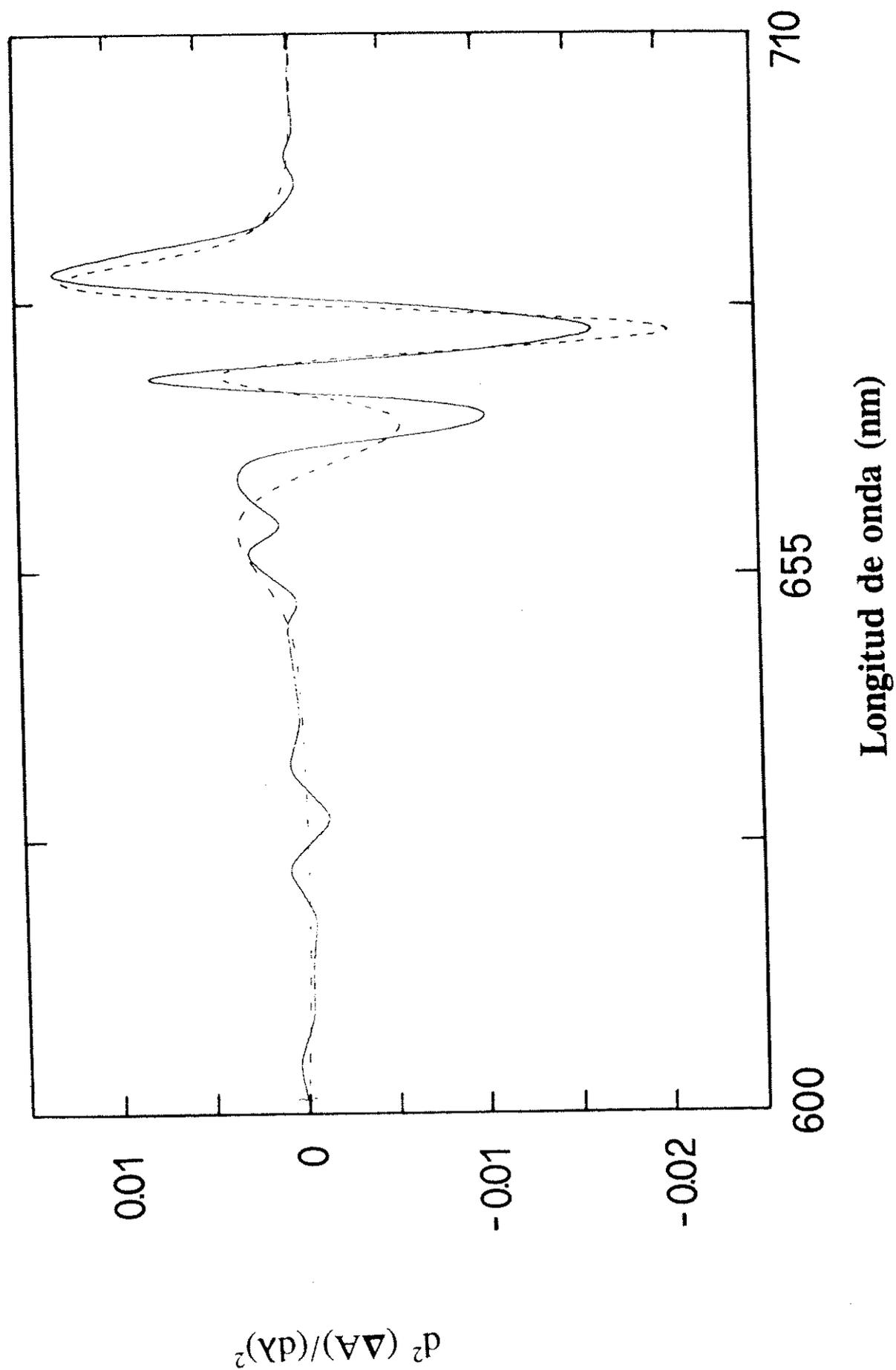


Figura 3.31.- Segunda derivada del espectro experimental de la figura 3.30 (línea sólida) y de los datos simulados (línea discontinua).

Como se puede comprobar en la figura 3.30 uno de los máximos de la banda a 672 nm no puede ser simulado con este ajuste necesitando la existencia de una tercera banda entre ambas componentes para poder marcar el máximo experimental a 672 nm y así ajustar el espectro. Estas diferencias se confirmaron en la segunda derivada de dicho espectro (figura 3.31). Las características espectrales de esta simulación se pueden observar en la tabla 3.10. Los resultados arrojados por el cálculo del área relativa no tienen ningún sentido con el oscilador de las bandas, por esta razón el ajuste más real es el realizado con tres componentes.

Tabla 3.10.- Características espectrales de la simulación con dos gaussianas de la banda en el rojo del complejo RCIIa.

λ_{\max} (nm)	FWHM (cm-1)	Area relativa (%)	asignación
680	156	16	P680 (2Chl)
671	393	84	4Chl y 2Pheo

3.5.2.4.- Espectros de fluorescencia de las preparaciones RCIIa y RCIIb del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris*.

En las figuras 3.32 y 3.33 se observan los espectros de emisión a 77 K de ambas preparaciones. El espectro de RCIIa exhibió una banda principal con máximo a 683 nm mientras que la preparación RCIIb presentó un máximo a 682 nm. La diferencia en el máximo de absorción puede ser producida por la presencia de alguna clorofila desacoplada en RCIIb originada por la degradación de algún centro de reacción (ver componente a 667 nm

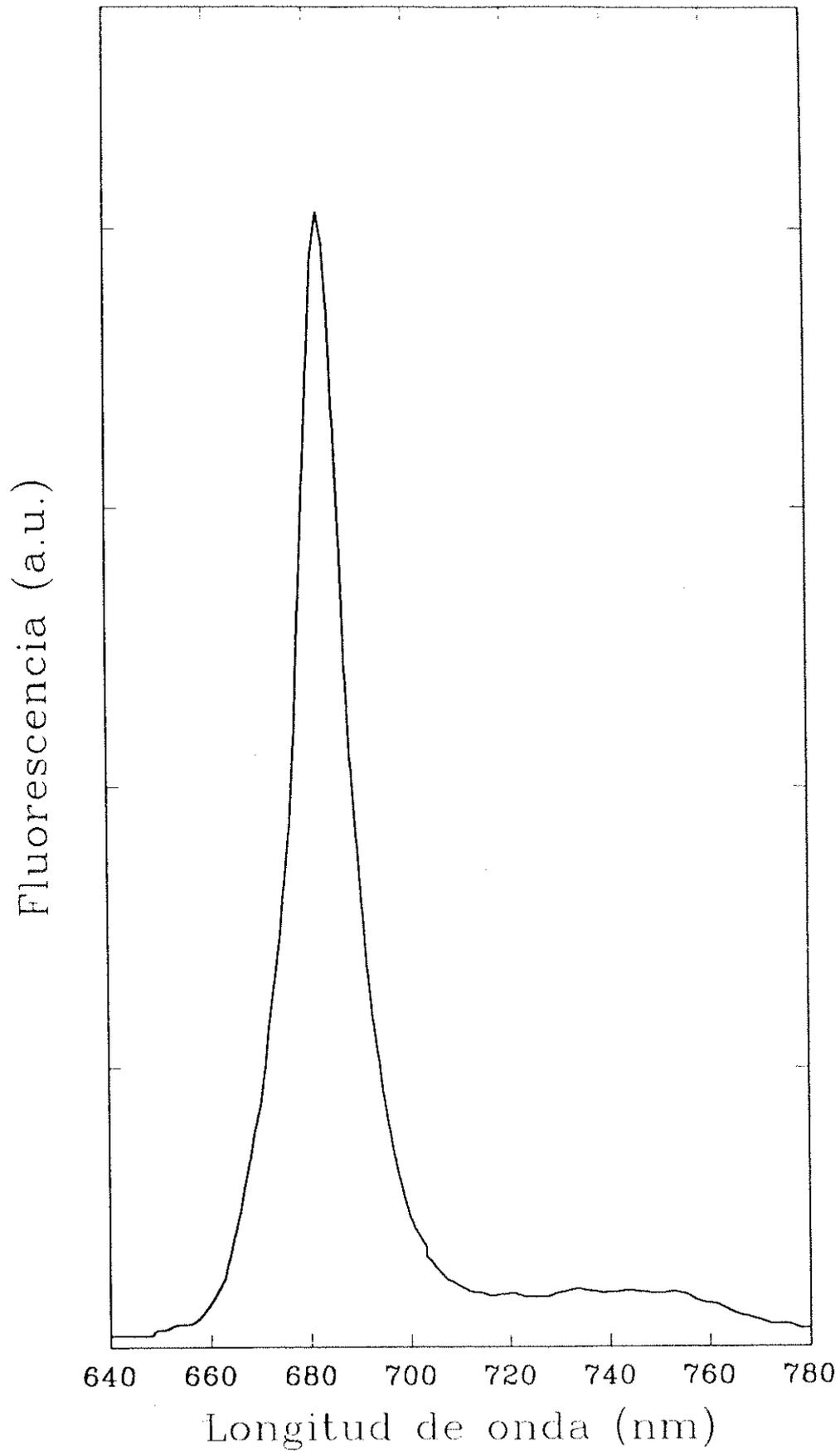


Figura 3.32.- Espectro de emisión a 77 K de la preparación RCIIa. El complejo cromoproteico se resuspendió en 50 mM Tris-HCl, pH 7,2 más 2 mM de DM, y se diluyó hasta un 33% (v/v) con glicerol antes de llevarla al criostato. La muestra se ajustó a una absorción de 0.1 en la banda del rojo a temperatura ambiente.

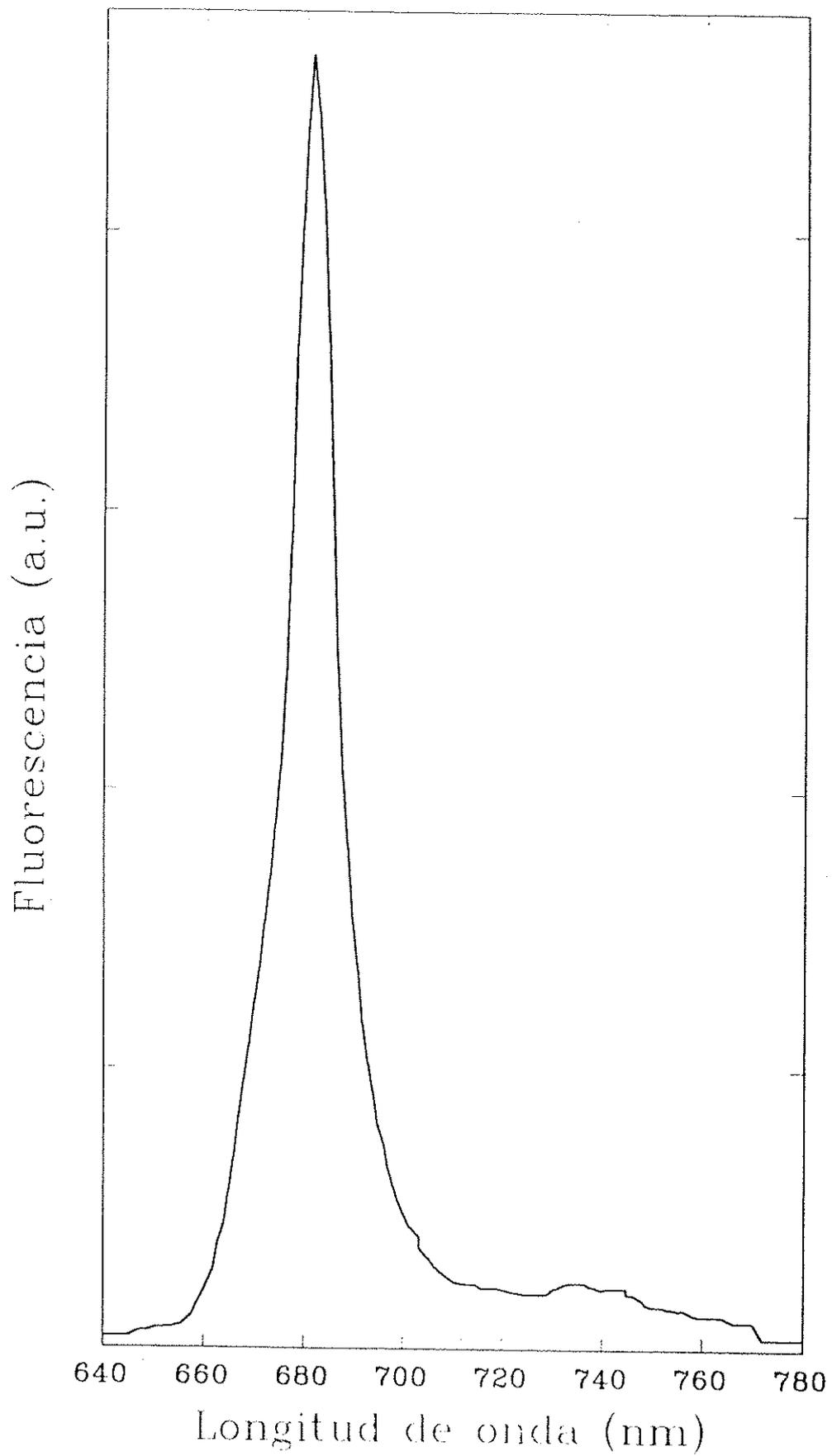


Figura 3.33.- Espectro de emisión a 77 K de la preparación RCIIfb. El espectro se obtuvo en las mismas condiciones experimentales que en la figura 3.32.

en la tabla 3.9). Una pequeña banda se observó también en la región de 740 nm la cual ha sido atribuida por otros autores a una sub-banda vibracional de la banda principal de emisión (van Dorssen et al., 1987).

3.5.3.- Actividad de las preparaciones RCIIa y RCIIb del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris*

La actividad del complejo D1-D2-Cyt b559 se puede medir en estado estacionario de dos formas fundamentalmente, mediante la fotoacumulación de feofitina o mediante el transporte electrónico secundario (ver sección 2.4.2).

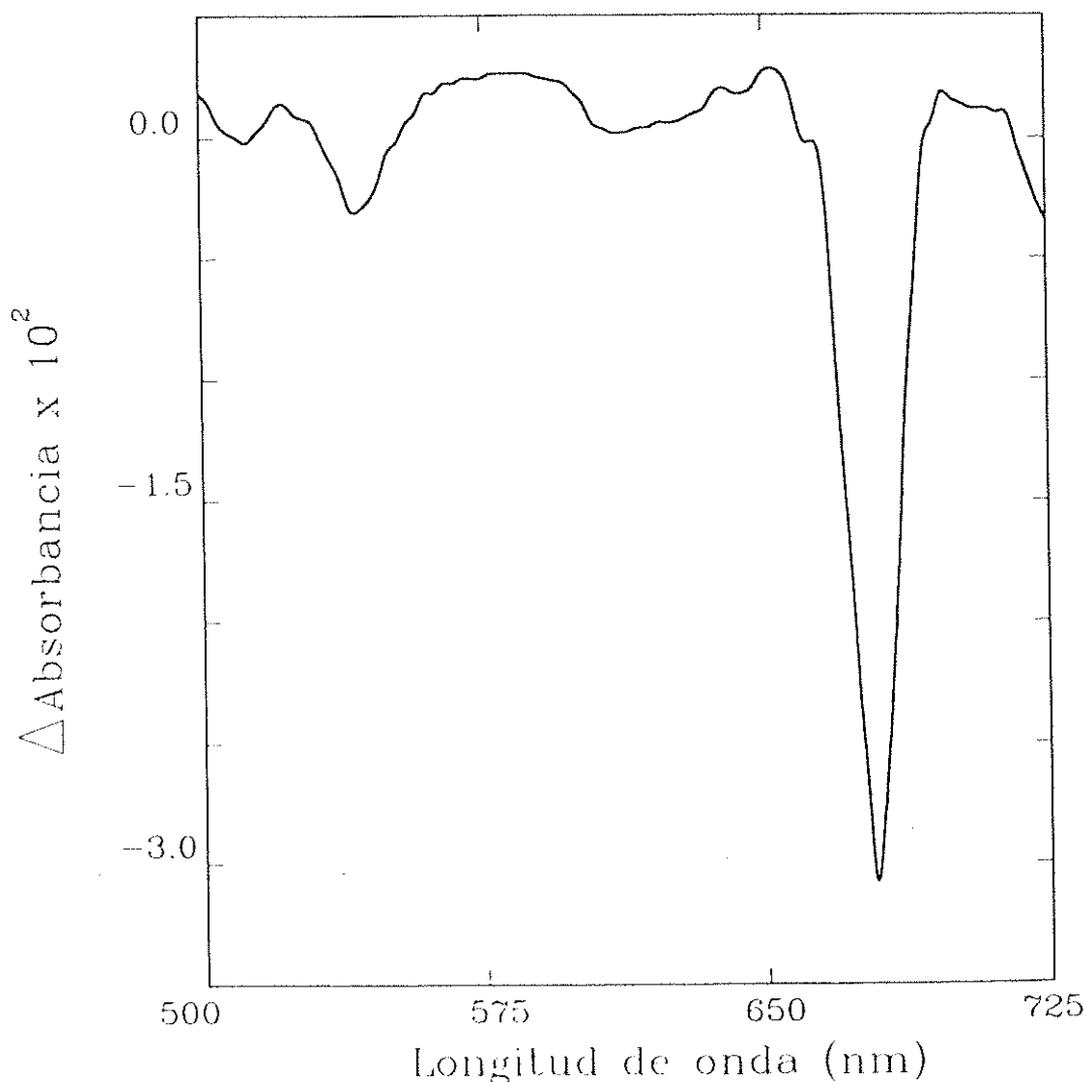


Figura 3.34.- Cambios de absorción inducidos por luz en ambos complejos RCIIa y RCIIb en el rango espectral de 500 a 725 nm. La medida se realizó en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,2,

2 mM DM, 1µM de metilviológeno y 5 mg/ml de ditionito sódico. La cubeta se iluminó lateralmente con una fibra óptica. La intensidad de la luz en la superficie fué de 2.000 µE.m⁻². s⁻¹.

En la figura 3.34 se puede observar que la iluminación continua en presencia de ditionito sódico y metilviológeno indujo tanto en RCIIa como en RCIIb una decoloración reversible de las bandas a 681,5, 544,6 y 515 nm. Este cambio se ha atribuído a Pheo⁻ por algunos autores (Nanba & Satoh, 1987; Barber et al., 1987) pero otros han relacionado esta decoloración a 681,5 nm con la decoloración de una banda hacia 676 nm ascrita a Pheo a y a un desplazamiento y aumento de la anchura de las banda del P680 inducida por la iluminación (van Kan et al., 1990; Braun et al., 1990).

La medida del transporte electrónico secundario en ambas preparaciones presentó ciertas diferencias de actividad entre ellas como se puede apreciar en la tabla 3.11.

Tabla 3.11.- Transporte electrónico secundario en ambos tipos de preparaciones RCIIa y RCIIb del complejo D1-D2-Cyt b559.

Preparación	µeq e ⁻ / µmol Chl . h	µeq.e ⁻ / µmol RC . h	Actividad relativa (%)
RCIIa	2.523	15.138	100
RCIIb	3.181	12.725	84

Para la misma concentración de Chl el centro de reacción RCIIb parece más activo que el RCIIa pero si tenemos en cuenta que el primero tiene dos Chl menos que el segundo entonces en este tipo de medida hay más centros de reacción por Chl en RCIIb que en RCIIa. Al realizar la medida igualando la concentración de centros de reacción en cada preparación el

resultado nos muestra que la preparación RCIIb es un 16 % menos activa que la preparación RCIIa que tiene unos niveles de actividad de transporte secundario de electrones similares a los publicados para otras preparaciones de este complejo (Barber et al., 1987; McTavish et al., 1989).

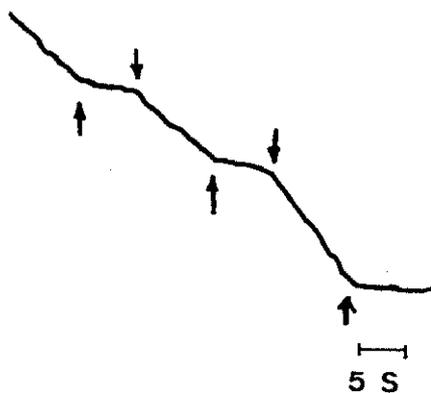


Figura 3.35.- Cinética de actividad de transporte secundario de electrones del complejo D1-D2-Cyt b559. Las flechas en dirección hacia arriba y hacia abajo indican el comienzo y el final de la iluminación, respectivamente. La actividad se midió a 600 nm siguiendo la reducción de SiMo por el aceptor primario Pheo.

3.6.- Estudio de la separación de cargas en las preparaciones RCIIa y RCIIb del complejo D1-D2-Cyt b559.

3.6.1.- Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo

La espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo de las preparaciones RCIIa y RCIIb se determinó en una escala de tiempo de nanosegundos (ns). Las cinéticas de fluorescencia de ambos tipos de centros de reacción pueden observarse en las figuras 3.36 y 3.37. El análisis de las cinéticas se realizó individualmente para cada conjunto de datos buscando el mejor ajuste de los datos a 3 o 4 exponenciales (Booth et al., 1991). La validez de los ajustes se evaluó mediante los valores de χ^2 , valores por debajo de 1.5 con los puntos residuales al azar fueron considerados como buenos ajustes. Ambas partículas mostraron un buen ajuste a 4 exponenciales dando tiempos de vida similares. Para ser capaces de comparar propiamente las amplitudes de los distintos componentes de ambos centros de reacción, todos los conjuntos de datos se reanalizaron globalmente obteniendo un ajuste a cuatro exponenciales con tiempos de vida de 46.1, 14.2, 5.6 y 1.3 ns (Tabla 3.12). La χ^2 para estos ajustes mostró unos valores de 1.24 para la preparación RCIIa y 1.48 para la preparación RCIIb. El análisis global de los datos (Knutson et al., 1983) reduce los efectos de la correlación exponencial y mejora la fiabilidad de

Tabla 3.12.- Tiempos de vida, amplitudes y origen de cada componente en ambos tipos de complejos D1-D2-Cyt b559. Los rendimientos de fluorescencia relativos se calcularon como el producto de las amplitudes y tiempos de vida de varios componentes.

Componente	RCIIa τ (ns)	Rendimiento relativo (%)	RCIIb τ (ns)	Rendimiento relativo (%)	Asignación
F1	46.1	15.9	46.1	4.6	Recombinación de cargas
F2	14.2	15.0	14.2	6.2	Recombinación de cargas
F3	5.6	65.5	5.6	84.0	Chl no funcional
F4	1.3	3.6	1.3	5.2	Sin significado físico en la escala de tiempo de recogida de datos

los parámetros extraídos de los datos. Finalmente con estos tiempos de vida asignados, las cinéticas se analizaron de nuevo para calcular las amplitudes de cada componente.

Como ya ha sido discutido por algunos autores (Booth et al., 1991), los dos tiempos de vida más largos, 46.1 y 14.2 ns, son asignados al proceso de recombinación del par de

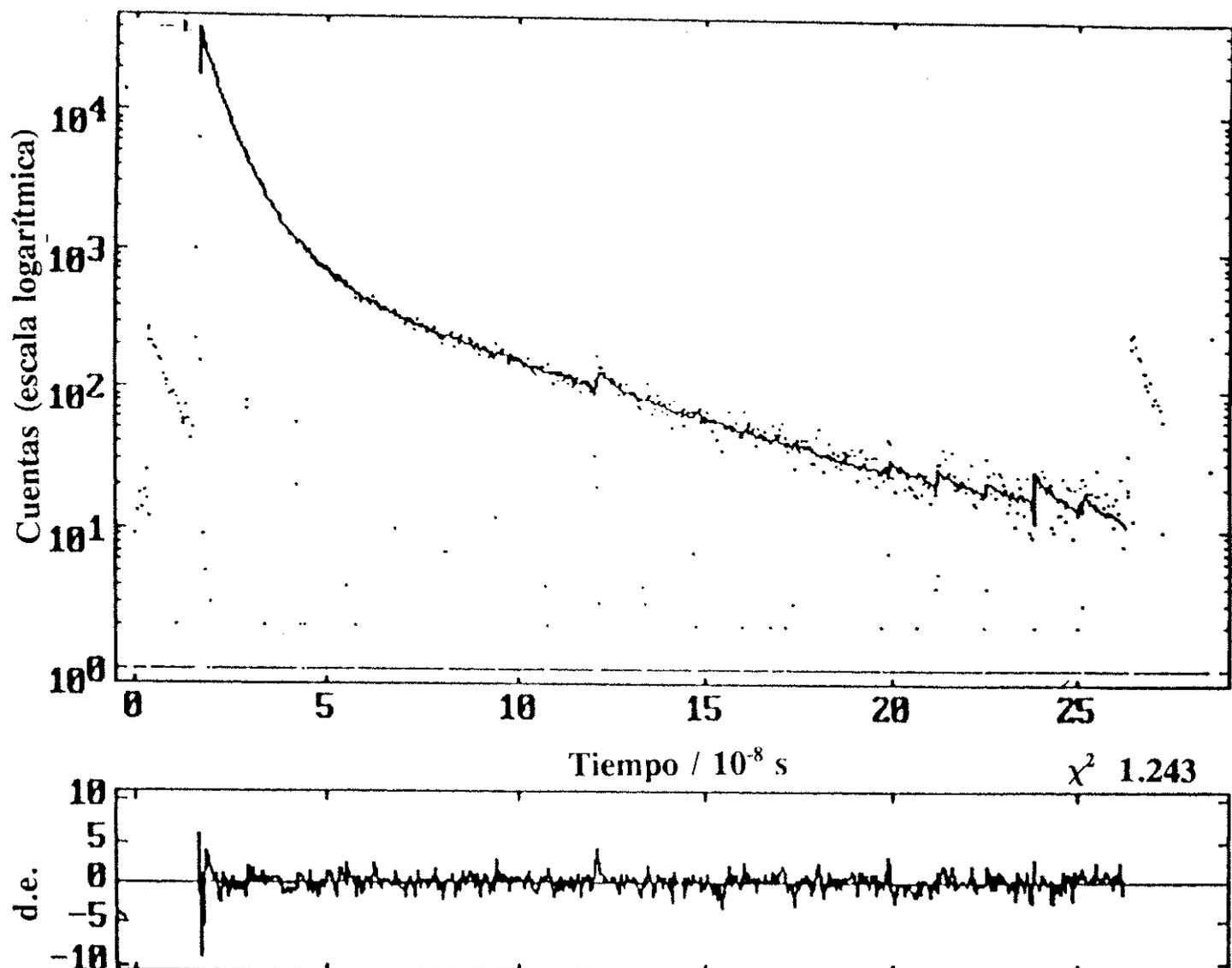


Figura 3.36.- Cinética de fluorescencia de la preparación RCIIa a 277 K medida con una rendija de 6 nm a 683 nm. En la gráfica inferior se representa el valor de χ^2 y los puntos residuales para el ajuste a 4 exponenciales.

radicales $P680^+Pheo^-$, mientras que el tiempo de vida de 5.6 ns es producido por Chl no funcional es decir no acoplada al proceso de transferencia de energía. El tiempo de vida de 1.3 ns no tiene un significado físico demostrable en la escala de tiempo en la cual se realizaron los experimentos. A partir del rendimiento de fluorescencia de los componentes con tiempos de vida más largos y el componente de 5.6 ns es posible estimar el nivel de Chl desacoplada del proceso de transferencia de energía. Los cálculos requieren una medida del rendimiento cuántico de cada preparación del complejo D1-D2-Cyt b559 para compararlo con el rendimiento cuántico de la Chl en dietileter que es 0,32 (Booth et al., 1990).

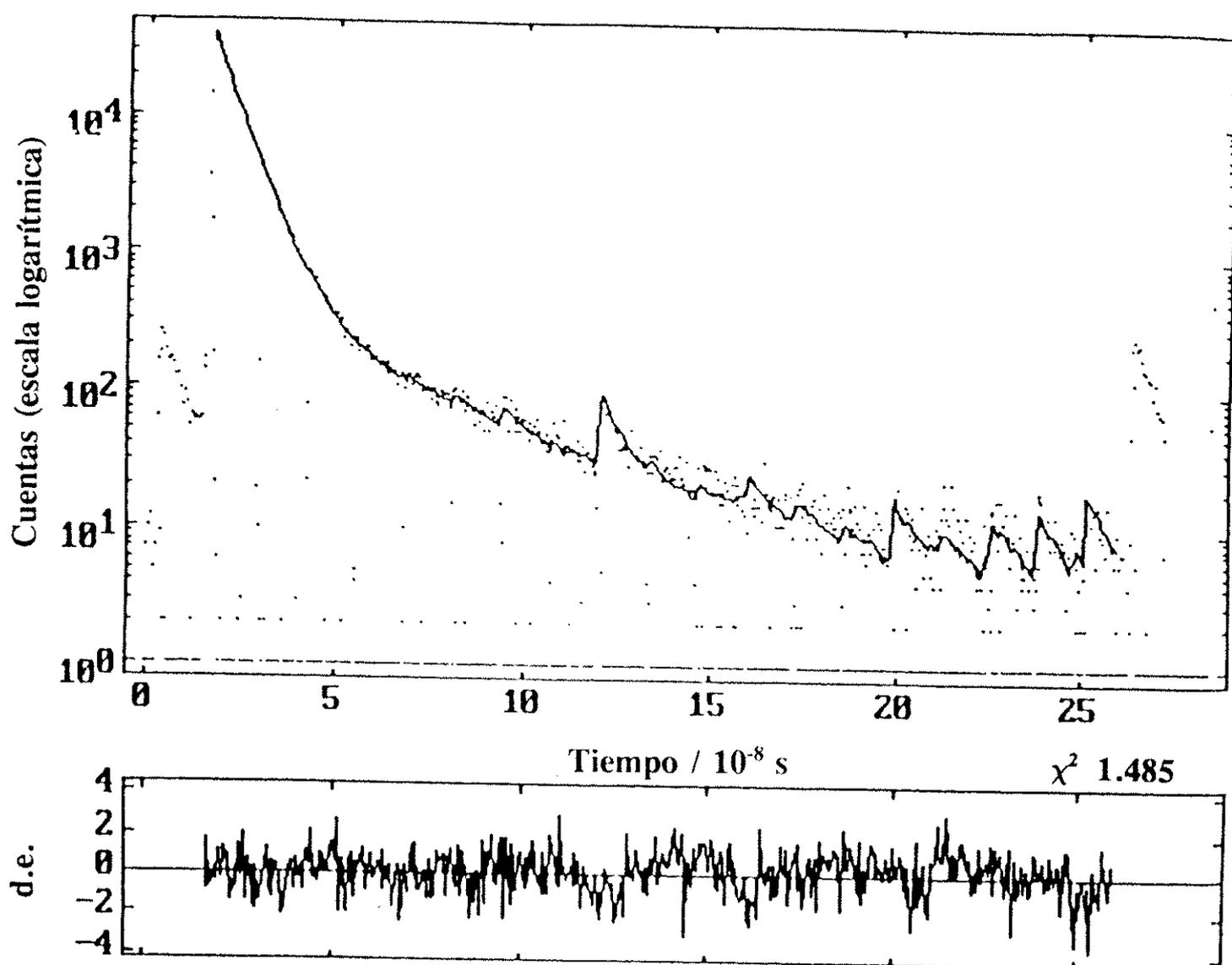


Figura 3.37.- Cinética de fluorescencia de la preparación RCIIB a 277 K medida con una rendija de 6 nm a 683 nm. En el gráfico inferior se muestra el valor de χ^2 y los puntos residuales para el ajuste a 4 exponenciales.

Como se puede observar en la tabla 3.13 los anteriores cálculos indican que la preparación RCIIa y RCIIb contienen como máximo un 8 y un 12 % de Chl desacoplada, respectivamente. Estos cálculos determinan que RCIIb es un 94.5 % activo respecto a RCIIa. Otros autores han realizado medidas de fluorescencia en tiempo resuelto usando centros de reacción aislados y han detectado largos tiempos de vida producidos por la fluorescencia de la recombinación de cargas (Mimuro et al., 1988; Govindjee et al., 1990; Roelofs et al., 1991). Sin embargo en estos trabajos se usaron muestras con bajos rendimientos de fluorescencia de los componentes con largos tiempos de vida (Mimuro et al., 1988) o se prestó atención a los componentes más rápidos de la cinética (Govindjee et al., 1990; Roelofs et al., 1991), originando ciertos desacuerdos en la interpretación de los datos (Govindjee et al., 1988).

Tabla 3.13.- Actividad relativa de las dos preparaciones del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris*, determinada por la medida del % de Chl no funcional (desacoplada de la transferencia de energía) estimada de los datos de la tabla 3.12 y los rendimientos cuánticos de cada preparación.

	RCIIa (6Chl / 2 Pheo)	RCIIb (4Chl / 2Pheo)
Chl no funcional (%)	8	12
Actividad Chl funcional (%)	92	87
Actividad relativa (%)	100	94.5

3.6.2.- Espectroscopia de absorción resuelta en el tiempo

En la figura 3.38 se observan las cinéticas de los cambios de absorción de las preparaciones RCIIa y RCIIb, sometidas a flashes actínicos de 800 ps generados por el láser de N₂. La cinética de ambas preparaciones del complejo D1-D2-Cyt b559 se ajustó a una

exponencial con tres componentes con tiempos de vida de 4.7 ns, 51.5 ns y 4.7 μ s para RCIIa y 3.4 ns, 49.3 ns y 4.7 μ s para RCIIb (ver tabla 3.14). Los componentes de 51.5 y 49.3 ns se asignaron a la recombinación del par de radicales $P680^+Pheo^-$ y el componente de 4.7 μ s al estado triplete de P680, el cual tiene un tiempo de vida real de 1 ms pero en las condiciones en las que se realizó

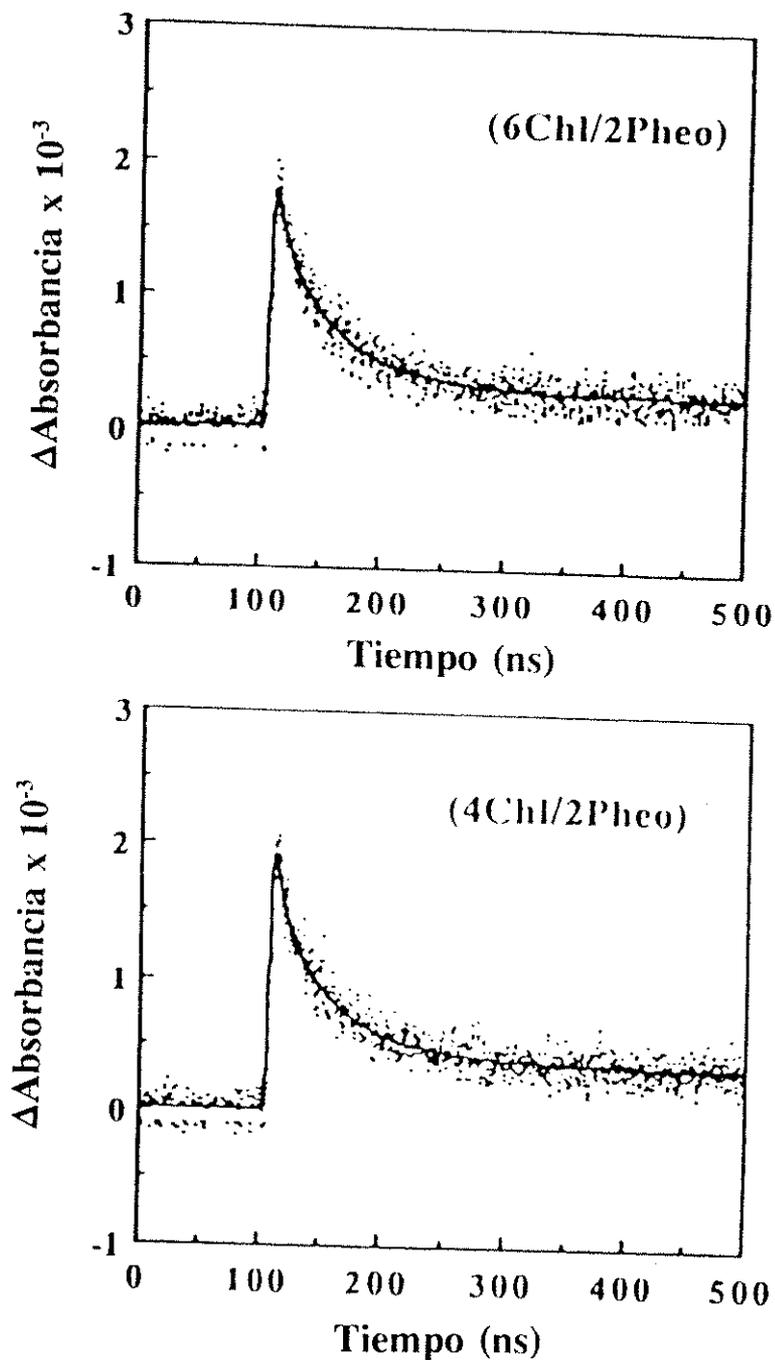


Figura 3.38.- Cinética de los cambios de absorción a 820 nm de las preparaciones RCIIa y RCIIb a 277 K. Los complejos de centro de reacción se encuentran en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, más 2 mM de DM.

Tabla 3.14.- Tiempos de vida de las cinéticas de absorción y origen de cada componente.

Componente	RCIIa	RCIIb	Origen de cada componente
A1	2.4 ± 0.4 ns	3.2 ± 0.3 ns	ver Booth et al. (1991)
A2	15.0 ± 1.8 ns	19.2 ± 6.7 ns	Recombinación del par P680 ⁺ Pheo ⁻
A3	57.4 ± 1.6 ns	58.0 ± 5.2 ns	Recombinación del par P680 ⁺ Pheo ⁻
A4	4.7 μs	4.7 μs	Estado triplete de P680

este experimento está limitado por el paso de banda del filtro electrónico usado (ver Materiales y Métodos) (Durrant et al., 1990). El componente más rápido (3.4 ns) también se ha observado en complejos D1-D2-Cyt b559 de *Pisum sativum* (Booth et al., 1991) y su origen es desconocido.

En la tabla 3.15 se exponen las amplitudes de los componentes asignados al par de radicales P680⁺Pheo⁻ indicando que RCIIb es ligeramente menos activo en realizar el proceso de separación de cargas. Además, durante el curso de estos experimentos, los cuales necesitan flashes repetitivos de luz, se observó que la preparación RCIIb era ligeramente menos estable que la preparación RCIIa.

Tabla 3.15.- Rendimiento relativo del par de radicales P680⁺Pheo⁻ de las preparaciones RCIIa y RCIIb del complejo D1-D2-Cyt b559. *Se consideró un coeficiente de extinción de P680⁺Pheo⁻ a 820 nm de 12,4 mM⁻¹cm⁻¹ (Booth et al., 1991).

Preparación	[Chl] (μg/ml)	[RC] (μM)	Amplitud de A2 y A3 (ΔOD)	*Radical pair [P680 ⁺ Pheo ⁻] (μM)	Par de radicales por RC	Rendimiento (%)
RCIIa	2.67	0.498	0.022	3.56 ± 0.38	0.355	100
RCIIb	2.24	0.625	0.023	2.97 ± 0.29	0.297	84

3.6.3.- Análisis y comparación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia en las preparaciones RCIIa y RCIIb.

El análisis de los rendimientos cuánticos de fluorescencia de ambos tipos de preparaciones con complejos D1-D2-Cyt b559 de *Pisum sativum* se muestra en la Tabla 3.16. Algunos de los centros de reacción de *Pisum sativum* fueron dañados por tratamiento con luz blanca de $500 \mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante 15 minutos a 4°C . Como se puede observar en la Tabla 3.16, el rendimiento cuántico absoluto de fluorescencia de la preparación de centro de reacción de *Pisum sativum* se incrementa cuando es deteriorada mediante el tratamiento con luz. Sin embargo el rendimiento cuántico absoluto de fluorescencia no varió significativamente entre las preparaciones RCIIa y RCIIb de *Beta vulgaris*.

Tabla 3.16.- Rendimientos cuánticos de fluorescencia de distintas preparaciones de complejos D1-D2-Cyt b559. Los centros de reacción aislados de *Beta vulgaris* son comparados con un centro de reacción normal y parcialmente fotodegradado de *Pisum sativum*. Los máximos de fluorescencia fueron 683, 679, 682 y 681.5 nm para las preparaciones de RC de *P.sativum*, RC dañado de *P.sativum*, RCIIa y RCIIb, respectivamente.

Preparación	λ_{max} banda Qy	Rendimiento cuántico absoluto de fluorescencia de las muestras ϕ_f	Rendimiento cuántico absoluto de fluorescencia de la recombinación de cargas $\phi_{\text{cr}}=(F1+F2)\cdot\phi_f$	Rendimiento cuántico de Chl desacoplada $\phi_{\text{fChl}}=(F3)\cdot\phi_f$	Actividad a partir de Chl funcionalmente desacoplada (%)
RC <i>P.sativum</i>	676	0.038	0.016	0.019	94
RC <i>P.sativum</i> dañado	674	0.073	0.013	0.054	83
RCIIa	675.6	0.040	0.012	0.026	92
RCIIb	675	0.048	0.005	0.040	87

Cuando el rendimiento cuántico absoluto de fluorescencia de la recombinación de cargas (ϕ_{cr}) se calculó para cada partícula, se observó que la razón de ϕ_{cr} para el complejo D1-D2-Cyt b559 de *P. sativum* RC/RC dañado fue 1.2 mientras que la ϕ_{cr} para ambas preparaciones de *B. vulgaris* RCIIa/RCIIb fué 2.4. Sin embargo, la razón de la actividad (RC/RC dañado,

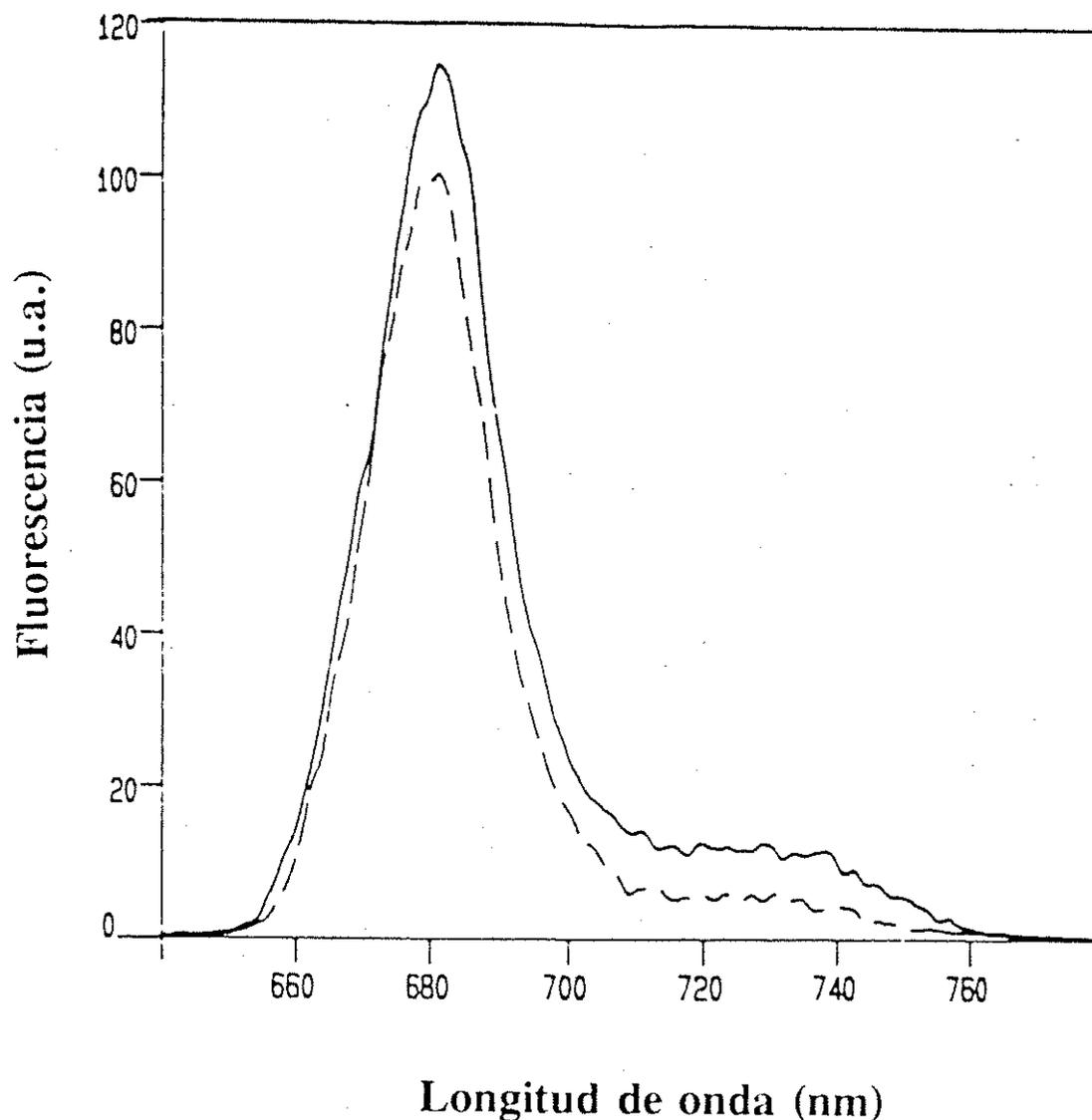


Figura 3.39.- Espectros de fluorescencia a 277 K de las muestras RCIIa (línea sólida) y RCIIb (línea discontinua). La cantidad de centro de reacción en ambas preparaciones fué la misma. Los rendimientos cuánticos absolutos de cada muestra se calcularon a partir de la media de las áreas de 5 espectros de cada muestra. Los espectros se midieron en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, más 2 mM de DM.

Tabla 3.17.- Constantes de equilibrio y ΔG de las preparaciones RCIIa y RCIIb.

	RCIIa		RCIIb	
	F1	F2	F1	F2
Keq	202	62.3	485	149
ΔG (eV)	-0.126	-0.098	-0.147	-0.119

RCIIa /RCIIb) para cada tipo de centro de reacción deducido de la cantidad de Chl desacoplada tuvo aproximadamente el mismo valor de 1.1.

Se determinaron también las constantes de equilibrio así como las variaciones de energía libre de Gibbs para los componentes responsables de la recombinación de cargas de ambas preparaciones RCIIa y RCIIb (46.1 y 14.2 ns). Los datos se resumen en la tabla 3.17 En la figura 3.39 se presentan los espectros de fluorescencia a 277 K a partir de los cuales se calculó el rendimiento cuántico absoluto de fluorescencia de cada preparación.

3.7.- Desnaturalización y renaturalización del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris*

3.7.1.- Proceso de desnaturalización

El proceso de desnaturalización del complejo D1-D2-Cyt b559 de *Beta vulgaris* se

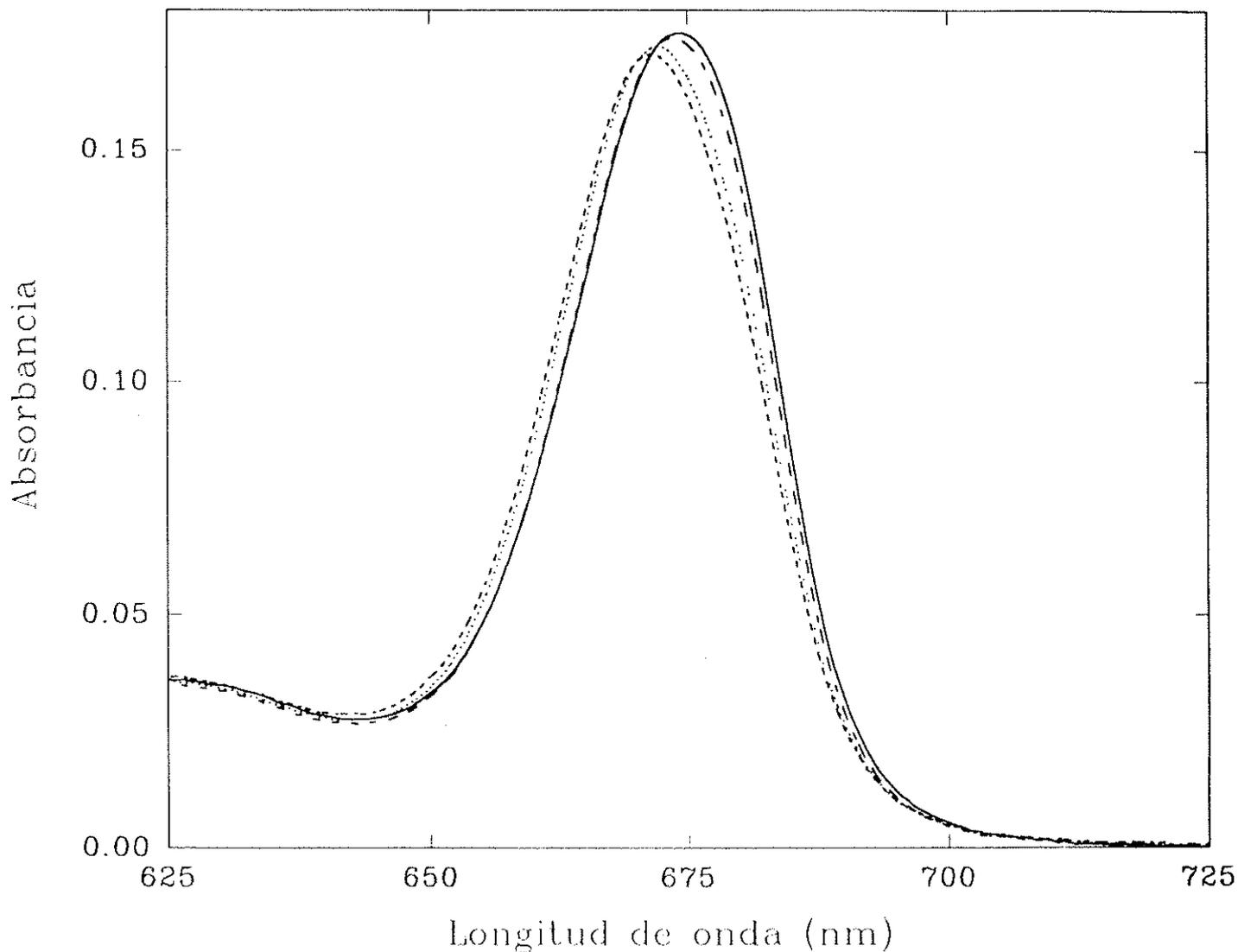


Figura 3.40.- Espectros de absorción en el rojo del complejo D1-D2-Cyt b559 medidos en tiempos sucesivos tras la incubación del complejo en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, y 0.05 % de TX-100. Línea continua: espectro del complejo inmediatamente eluido de la columna (máximo a 675.5 nm); línea discontinua: espectro tras 16 h de incubación (máximo a 673 nm); línea de puntos: espectro tras 20 h de incubación (máximo a 672 nm); línea discontinua corta: espectro tras 23 h de incubación (máximo a 671.5 nm).

realizó como ha sido descrito en la sección 2.9.1. Para este trabajo se utilizaron centros de reacción del tipo RCIIa. El proceso se siguió monitorizando los cambios de absorción y el desplazamiento hacia el azul del máximo de la banda del rojo del complejo D1-D2-Cyt b559 como consecuencia de la estrecha relación entre el máximo de esta banda y la

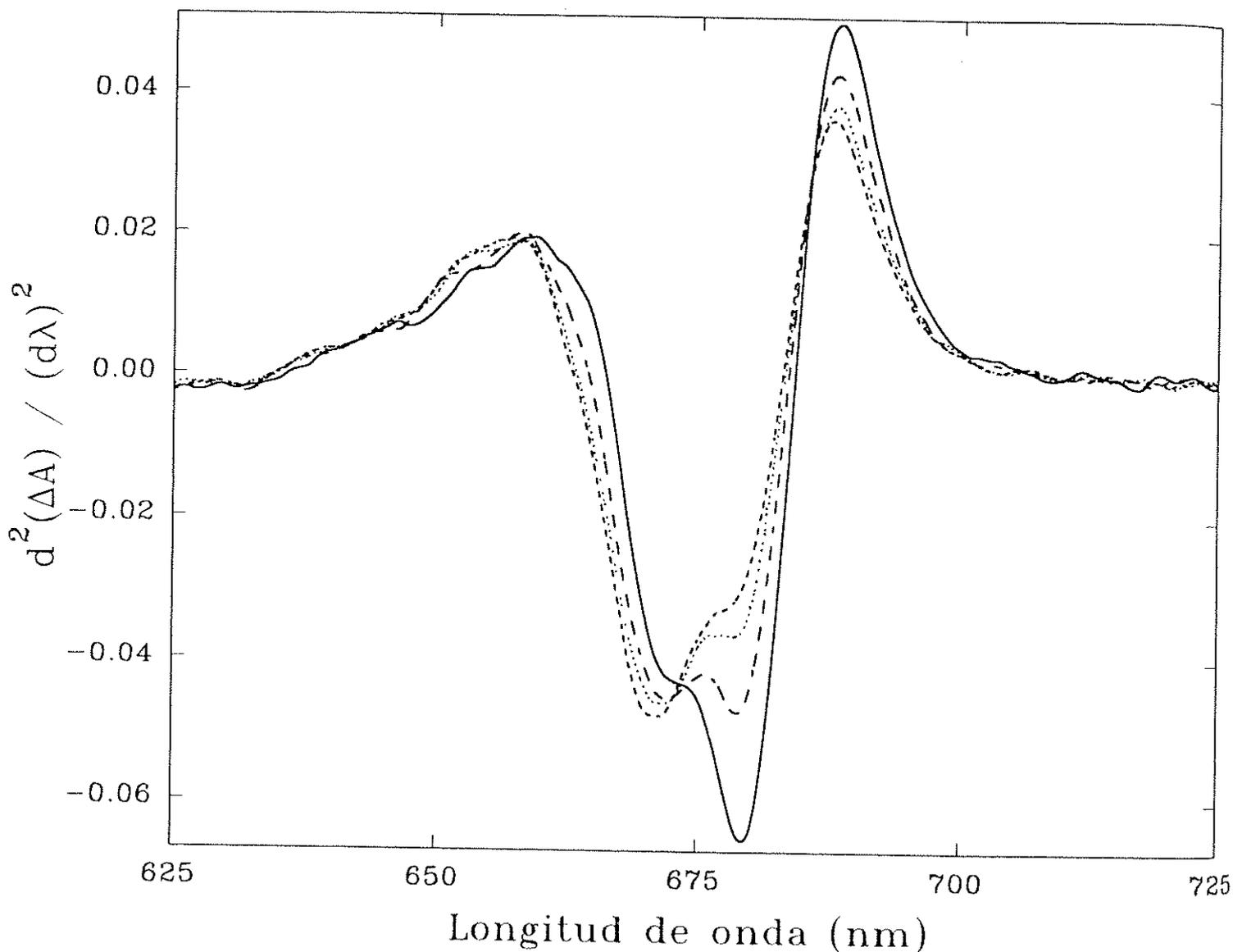


Figura 3.41.- Segundas derivadas de los espectros de absorción electrónica de la figura 3.40 exhibiendo 2 componentes principales con máximos a 679.5 y 671-670. En la figura se puede apreciar la existencia de dos puntos isobésticos a 673.5 y 686 nm.

actividad fotoquímica del complejo (Seibert, 1992; Booth et al., 1991; Braun et al., 1990). En la figura 3.40 se presentan las diferencias entre los espectros de absorción del complejo cromoproteico en la banda de menor energía a distintos tiempos de tratamiento de desnaturalización en TX-100. Los máximos de los espectros fueron 675.5, 673, 672 y 671.5 nm, respectivamente.

El proceso de desnaturalización como se observa en la figura 3.40 se

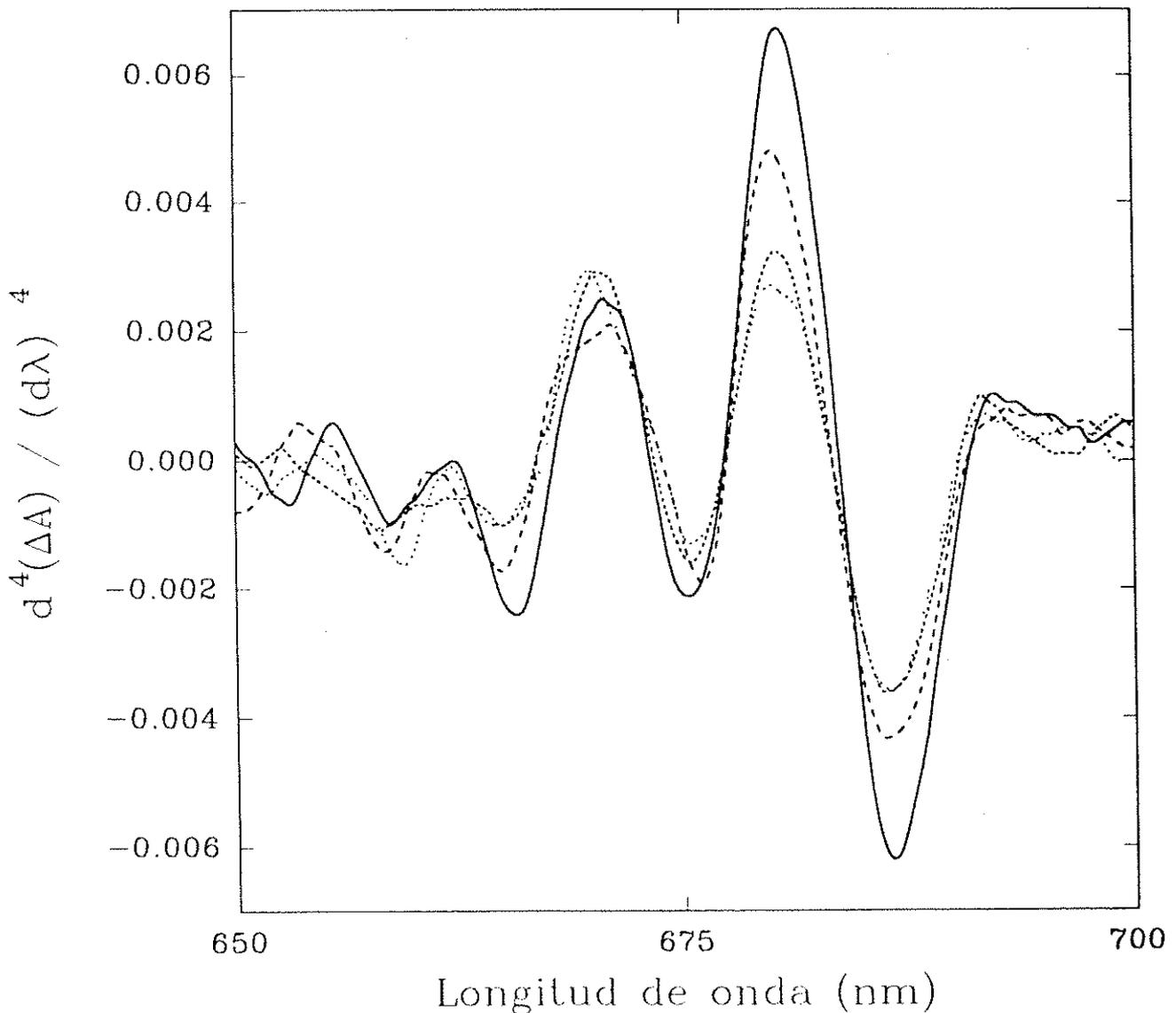


Figura 3.42.- Cuarta derivada de los espectros de la figura 3.40 donde se aprecian claramente los dos componentes principales de la banda Qy y su evolución durante el proceso de incubación con TX-100.

caracterizó además por un ligero descenso en la absorbancia a la vez que el máximo de la banda se desplazó hacia el azul. La segunda derivada de cada uno de los espectros se muestra en la figura 3.41. Como se observa en la figura, la derivada del complejo nativo (675 nm) presenta dos componentes (ver sección 3.3.2), el principal con máximo a 679.5 nm y un hombro alrededor de 672-673 nm. Durante el proceso de incubación el componente a 679.5 nm fué decreciendo mientras que el hombro a 672 nm aumentó su intensidad con el tiempo de incubación presentando un máximo a 671-670 nm. El comportamiento del complejo D1-D2-Cyt b559 durante la incubación con TX-100 puede apreciarse también en la cuarta derivada de los espectros anteriores (figura 3.42) donde se aprecian claramente las dos componentes con máximos a 680 y 670 nm.

3.7.2.- Recuperación de las propiedades espectroscópicas del complejo D1-D2-Cyt b559

3.7.2.1.- Espectros de absorción y emisión

Una vez desnaturalizado el complejo del centro de reacción del PSII, éste se renaturalizó mediante el intercambio de TX-100 por DM (ver sección 2.2.4.1). Las propiedades ópticas del espectro fueron recuperadas tras la sustitución de detergente, como se puede apreciar en las figuras 3.43, 3.44 y 3.45. En la figura 3.43 se muestra el espectro del complejo recién eluido de la columna, antes y después del intercambio de detergente. Como se puede apreciar el complejo recuperó su máximo original a 675 nm. Tanto la segunda como la cuarta derivada confirmaron la recuperación del componente de 680-679.5 nm tras el intercambio de detergente.

Las propiedades de emisión del complejo también se estudiaron durante el proceso de desnaturalización y después del cambio de detergente. Así la emisión producida por los cromóforos asociados a la proteína se incrementó con el tiempo de incubación del complejo en TX-100. En la figura 3.46 se presenta el espectro de emisión del complejo D1-D2-Cyt b559, siendo la intensidad de fluorescencia mayor cuando el máximo de la banda en el rojo del espectro de absorción fué a 671.5 nm.

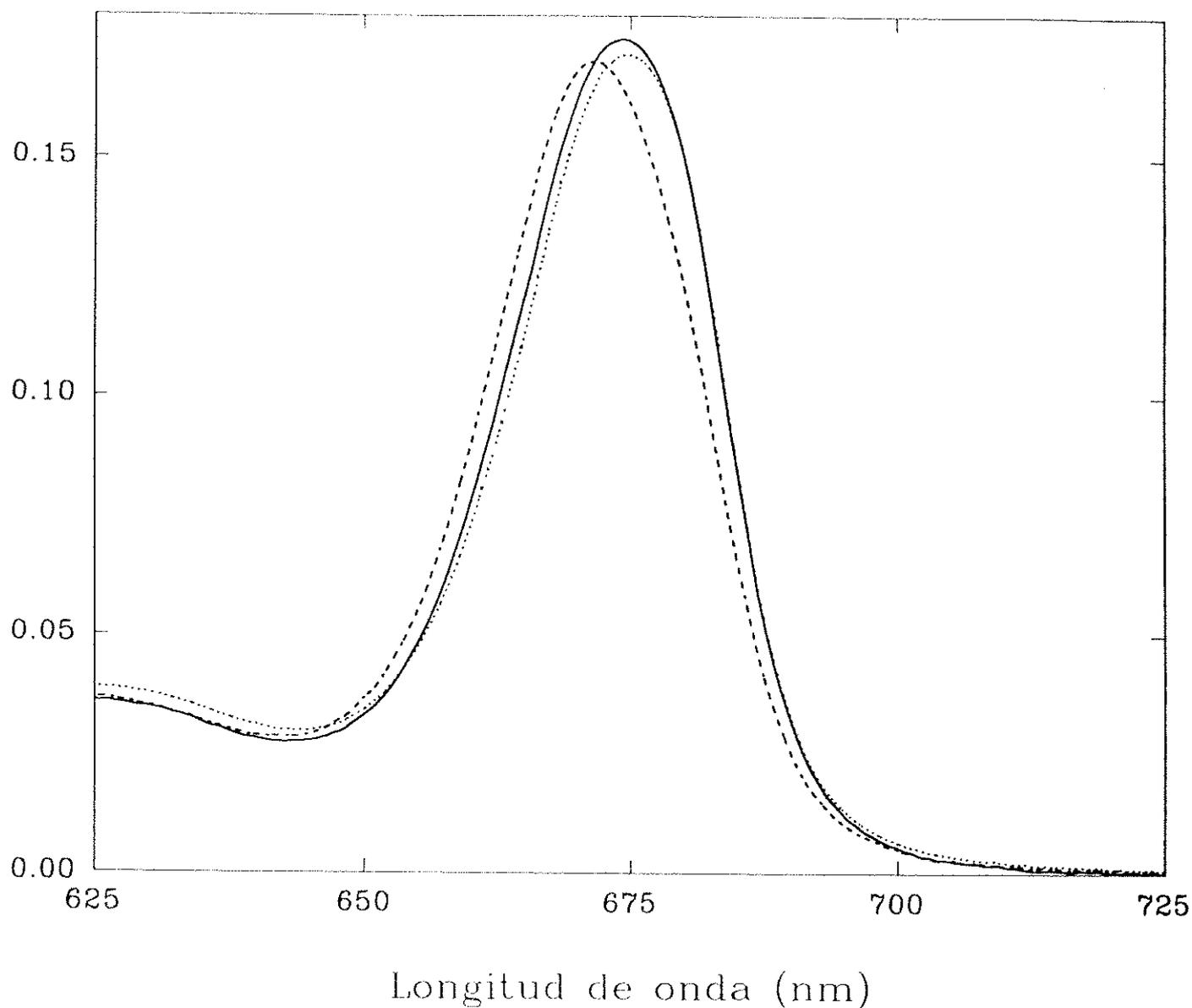


Figura 3.43.- Espectro de absorción electrónica del complejo D1-D2-Cyt b559 después de realizar el intercambio de detergente (línea de puntos). El espectro se compara con el del complejo recién eluido de la columna (línea sólida) y antes de realizar el intercambio de detergente (línea discontinua). Los espectros se realizaron a 4 °C en 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, en 0.05 % de TX-100 a tiempos 0 y 23 h para los dos últimos casos respectivamente y en 2 mM DM para el primero.



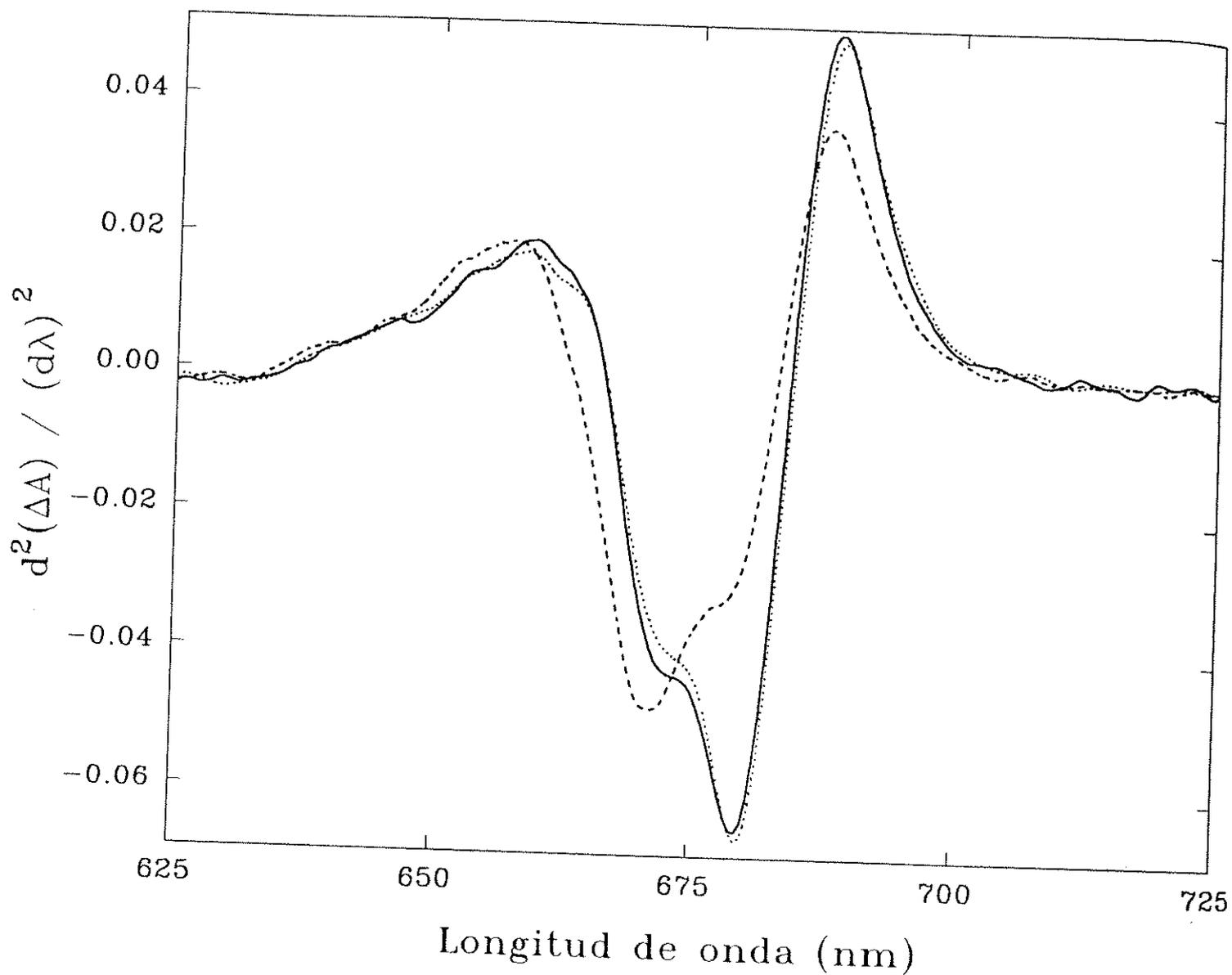


Figura 3.44.- Segunda derivada de los espectros de absorción de la figura 3.43. En la figura se puede apreciar como el componente a 679.5 nm recupera su intensidad inicial. Línea sólida: derivada del espectro original del complejo; línea de discontinua; tras 23 h de incubación en TX-100; línea de puntos: tras el cambio de detergente.

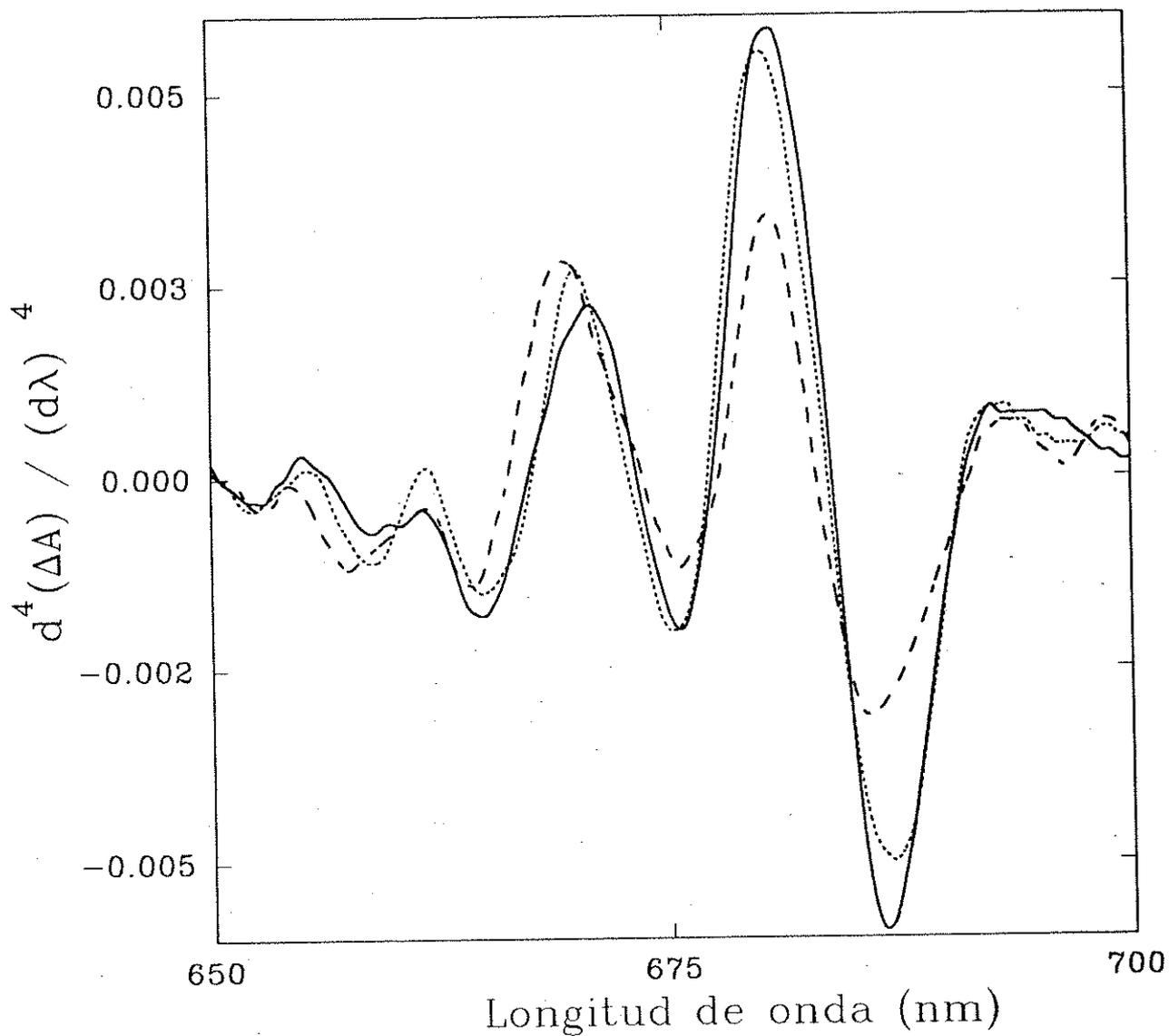


Figura 3.45.- Cuarta derivada de los espectros de absorción de la figura 3.43. Línea sólida: tras la elución del complejo de la columna; línea discontinua: tras 23 h de incubación del complejo en 0.05 % TX-100; línea de puntos: tras intercambiar el detergente.

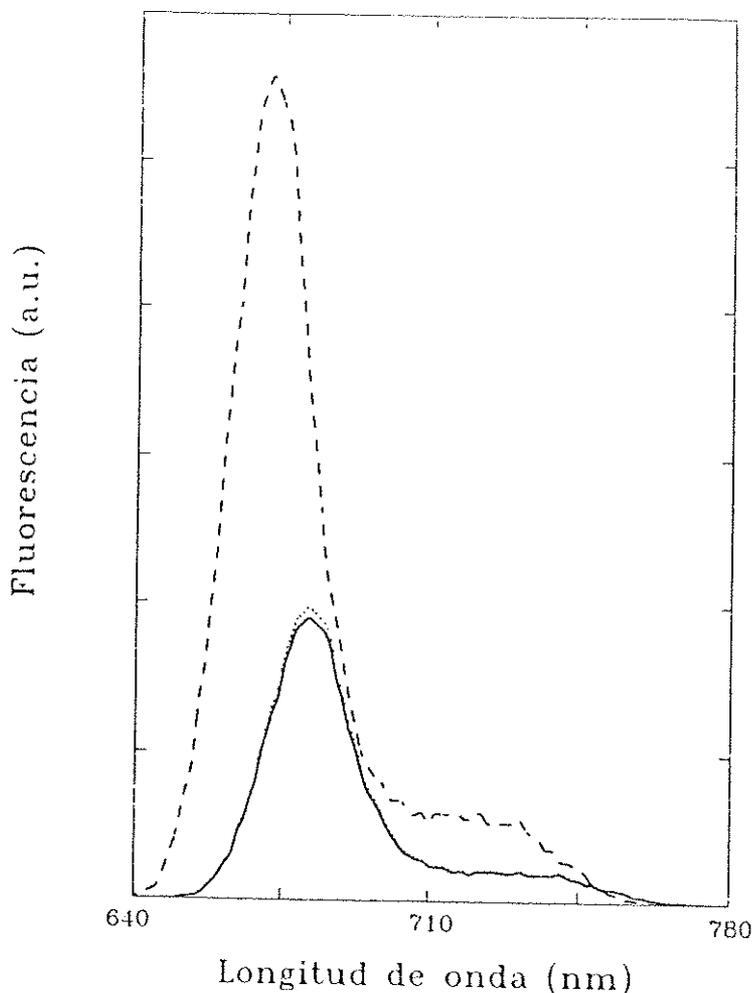


Figura 3.46.- Espectros de emisión del complejo D1-D2-Cyt b559 en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, en las condiciones descritas a continuación. Espectro de emisión del complejo inmediatamente eluido de la columna (línea sólida), tras 23 h de incubación en 0.05 % TX-100 (línea discontinua) y después del cambio de detergente (línea de puntos). Los espectros se realizaron con excitación a 435 nm con una rendija de 1 nm. La cantidad de Chl fué de 1.5 $\mu\text{g/ml}$ en todos los casos.

El aumento en la intensidad de fluorescencia fué correlativo al desplazamiento hacia el azul de la banda Qy del centro de reacción, ambas características se recuperaron tras el intercambio de detergente.

3.7.2.2.- Actividad óptica del complejo D1-D2-Cyt b559

El espectro de CD del complejo D1-D2-Cyt b559 en la figura 3.47 muestra la existencia de un doblete no conservativo en la banda Qy con máximo a 682 nm y mínimo a 666

nm. La evolución de esta banda de CD producida por las clorinas del complejo en la banda Qy se ha seguido durante el proceso de desnaturalización del complejo.

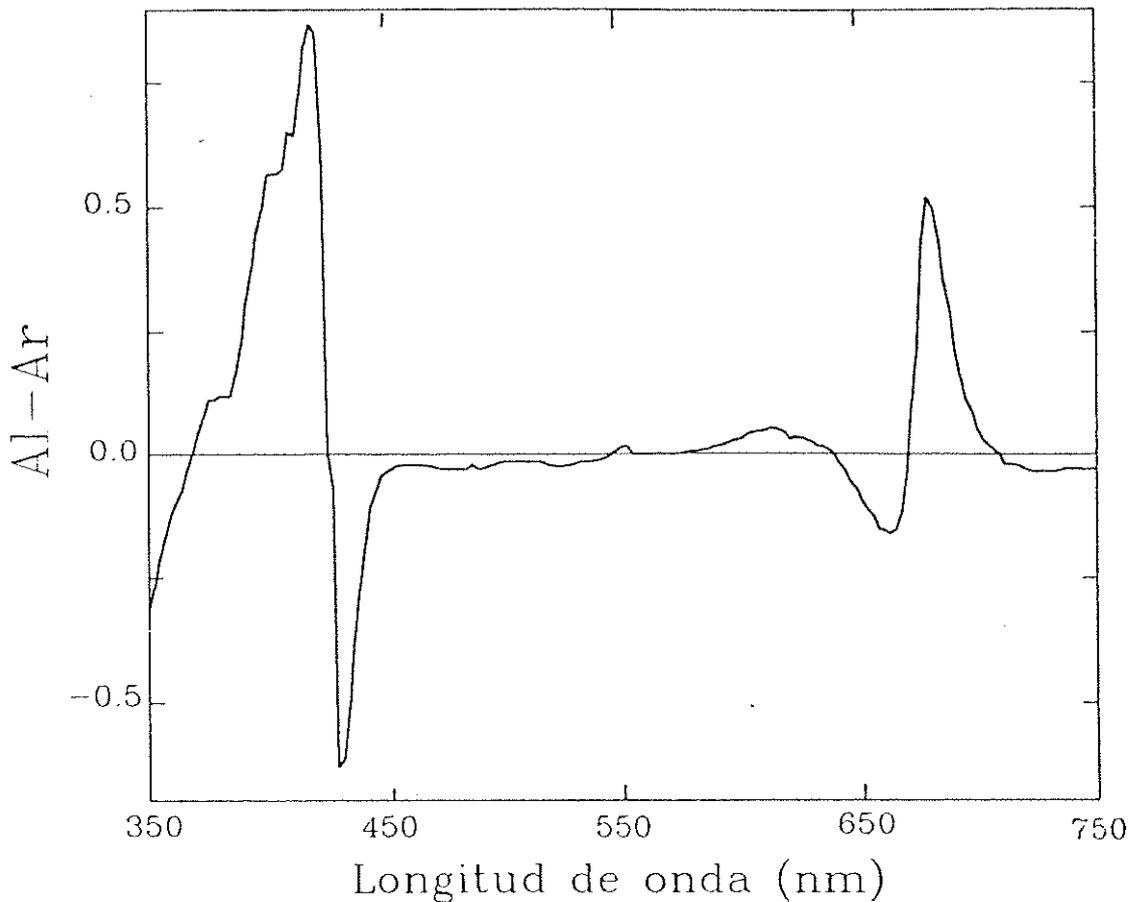


Figura 3.47.- Espectro de dicroísmo circular a 4 °C del complejo D1-D2-Cyt b559 en tampón 50 mM Tris, pH 7.2, más 2 mM de DM. El espectro presentó máximos a 682 y 415 nm y mínimos a 666 y 430 nm.

En la figura 3.48 se puede seguir la evolución de la señal de dicroísmo circular de la banda Qy sometida al tratamiento de desnaturalización y tras el intercambio de detergente comparada con el espectro original del complejo tras eluir de la columna.

Los cambios en las propiedades de absorción y emisión del complejo se reflejaron también en una pérdida de la actividad dicroica de la banda de menor energía. Así, la señal de CD tras 23 horas de incubación en TX-100 fué 4.5 veces menor que la del complejo nativo, lo que demuestra que las especies responsables de la actividad óptica son afectadas por el tratamiento con TX-100. El complejo recuperó prácticamente la intensidad de CD tras el intercambio de detergente.

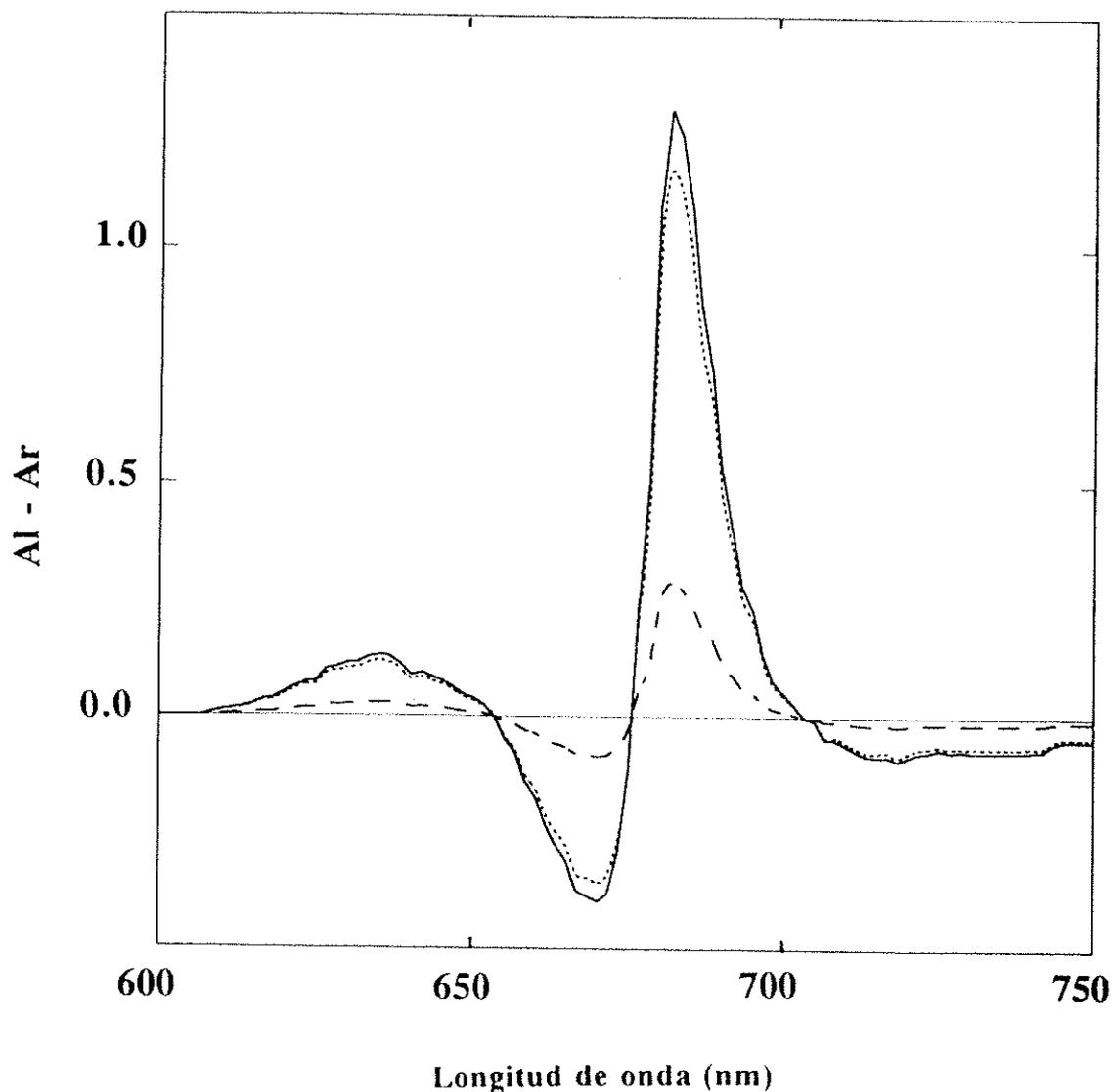


Figura 3.48.- Espectros de CD en la región de 600 a 750 nm del complejo D1-D2-Cyt b559 en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, en las siguientes condiciones: tras su elución de la columna (línea sólida), después de 23 h de tratamiento con TX-100 (línea discontinua) y tras el intercambio de TX-100 por DM (línea de puntos).

3.7.2.3.- Estudio de CD en el UV del complejo D1-D2-Cyt b559

En la figura 3.49 se puede observar la variación de la estructura 2ª de este complejo proteico de membrana durante el proceso de desnaturalización así como en el complejo

renaturalizado. Los espectros se realizaron en el rango de 200 a 250 nm, zona de absorción del enlace peptídico.

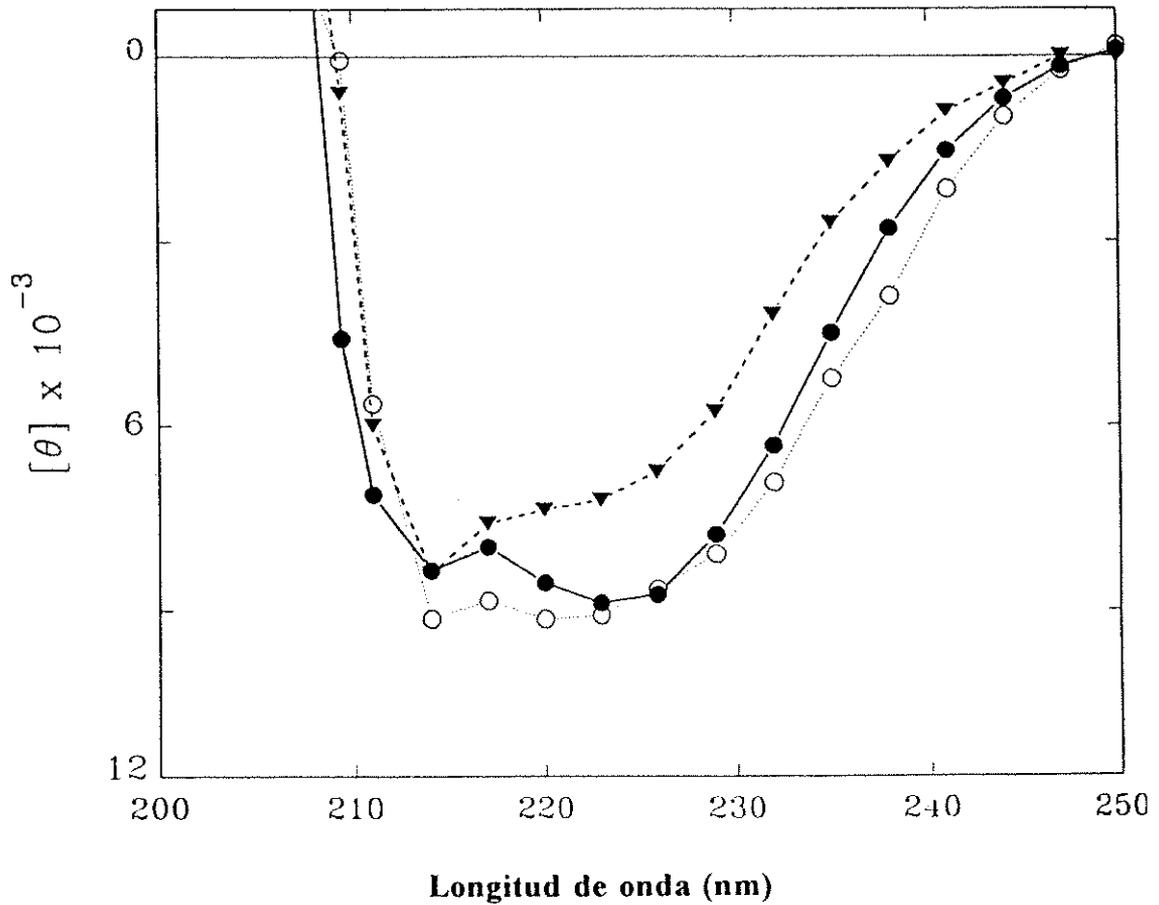


Figura 3.49.- Espectros de absorción de CD del complejo D1-D2-Cyt b559 a 4 °C. (●) Nativo, (▼) tratado con 0.05 % de TX-100 durante 23 h y (○) tras el intercambio de este detergente por DM.

El proceso de desnaturalización distorsiona la estructura de la proteína pero no hasta el grado de desnaturalizarla totalmente, sin embargo este cambio es suficiente para perder gran parte de la actividad del complejo, medida como su capacidad de transporte electrónico secundario del complejo D1-D2-Cyt b559 mediante SiMo y MnCl₂ (ver sección 2.4.2.2). En la tabla 3.18 se resumen las actividades del complejo relacionadas con sus propiedades espectroscópicas. Por otra parte en la figura 3.50 se muestra el espectro de fluorescencia de triptófano del complejo cromoproteico. Como se puede observar la variación de la fluorescencia producida por el tratamiento fué escasa, confirmando que la pérdida de estructura por parte de la proteína fué pequeña. La localización de los residuos de triptófano se da en el RC bacteriano en

la zona hidrofílica de la proteína. La homología de este complejo con las proteínas D1 y D2 del PSII apoya que estos residuos se encuentren situados en una zona similar, lo que indicaría que los cambios estructurales se dan en la zona hidrofóbica de la proteína afectando a P680 que es donde actúa el detergente.

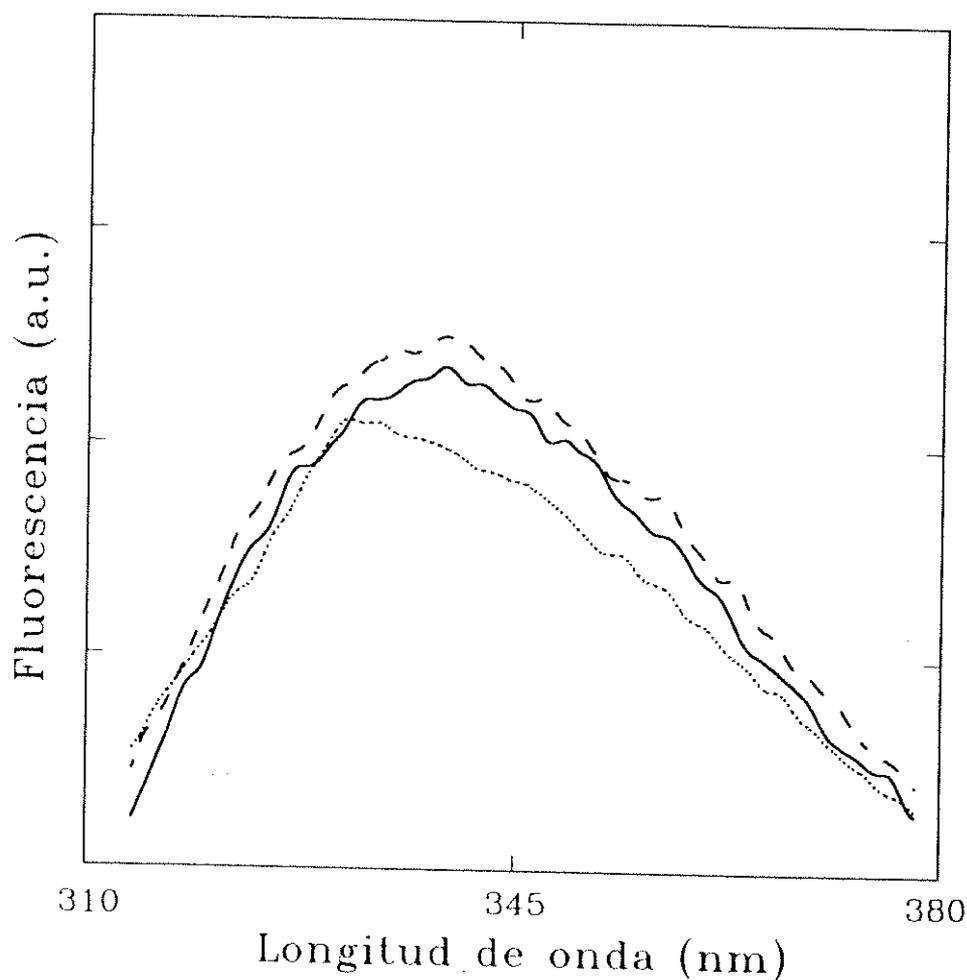


Figura 3.50.- Espectro de fluorescencia de triptófano del complejo D1-D2-Cyt b559. La muestra se excitó a una longitud de 296 nm. (Línea continua) centro de reacción del PSII recién eluido de la columna de purificación; (línea discontinua) tras 23 h de incubación en TX-100 0.05%; y (línea de puntos) después del intercambio de este detergente por 2 mM DM.

La dependencia del máximo de absorción de la banda del rojo del complejo D1-D2-Cyt b559 con respecto al tiempo de incubación en TX-100 se representa en la figura 3.50. El desplazamiento de la banda en el rojo frente al tiempo de incubación se ajusta a una regresión lineal, mientras que el transporte secundario de electrones se ajusta a una regresión exponencial (figura 3.51).

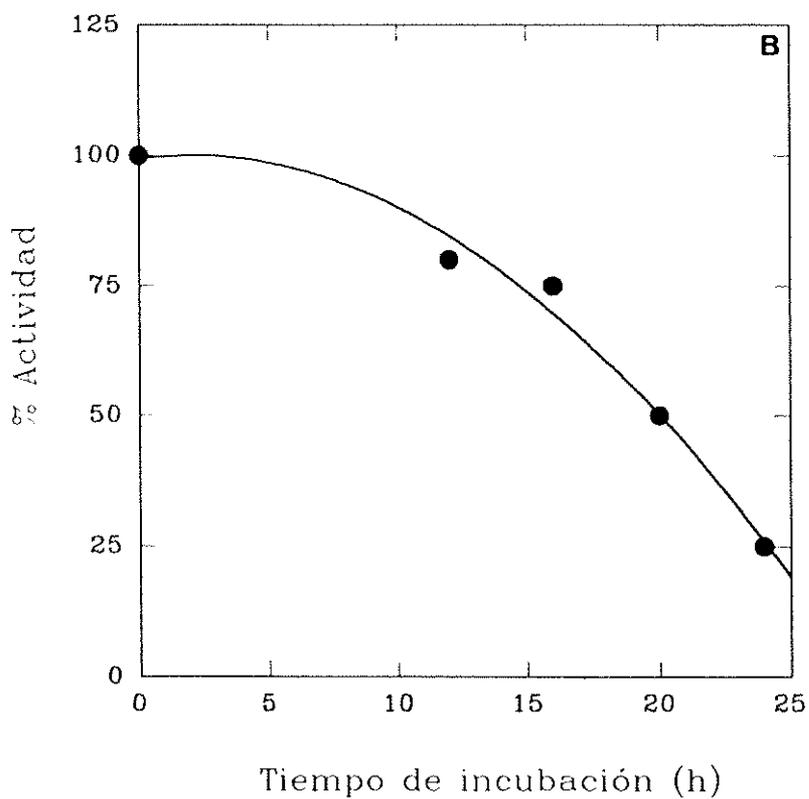
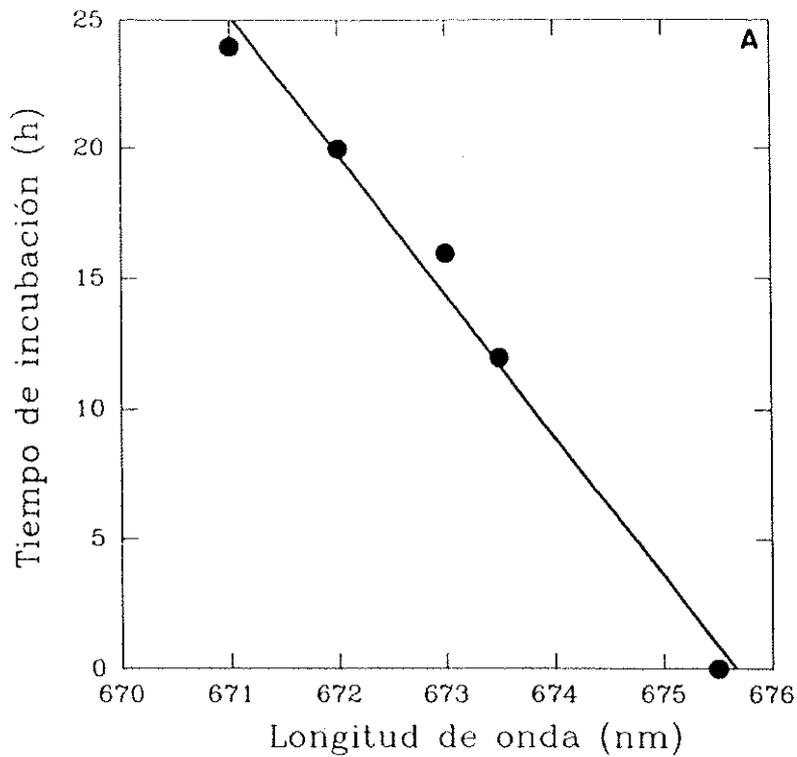


Figura 3.51.- A) Dependencia del máximo de la banda en el rojo del complejo de centro de reacción con el tiempo de incubación de la muestra en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, más 0.05 % de TX-100. La densidad óptica de la muestra fué de 0.1 en la banda del rojo en una cuveta de 1 cm de paso de luz. B) Cambio de la actividad de transporte electrónico secundario de la muestra con el tiempo de incubación.

Tabla 3.18.- Actividad fotoquímica y características espectroscópicas de la banda Qy del complejo D1-D2-Cyt b559. **a)** Recién aislado; **b)** tras 24 h de tratamiento con TX-100; **c)** tras la sustitución de este detergente por DM.

Preparación	λ_{\max} (nm) banda en el rojo	Actividad $\mu\text{eq. e}^-/\mu\text{mol Chl} \cdot \text{h}$	Actividad (%)	Intensidad CD banda Qy a 682 nm (+) (%)
RC nativo a	675.5	2640	100	100
RC TX-100 b	671.5	700	22	20
RC DM c	675	2500	95	92

Los datos de ambas gráficas están de acuerdo con los resultados obtenidos por otros investigadores (Braun et al., 1990; Booth et al., 1991) donde la actividad se había medido por otros métodos como espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo o fotoacumulación de feofitina reducida.

3.8.- Purificación de las proteínas CP47 y CP43 de la antena intrínseca

Las proteínas de la antena intrínseca se aislaron a partir de OECC, para ello se solubilizó este complejo para ser posteriormente sometido a cromatografía de intercambio iónico. El paso clave de esta purificación es la solubilización del complejo proteico la cual se realiza en presencia de una alta fuerza iónica (4 M LiClO_4). Tras solubilizar el complejo y eliminar la mayoría de la sal por diálisis, el dializado se carga en una columna DEAE recogiendo las primeras fracciones del eluato pues la proteína CP43 no se fija a la columna y eluye pura dentro del volumen de columna. Tras lavar el gel con varios volúmenes de columna en los cuales se eluye una proteína que por su espectro y peso molecular coincidiría con la de 26.1 kDa, la proteína CP47 es eluida con un gradiente lineal de LiClO_4 de 0 a 175 mM.

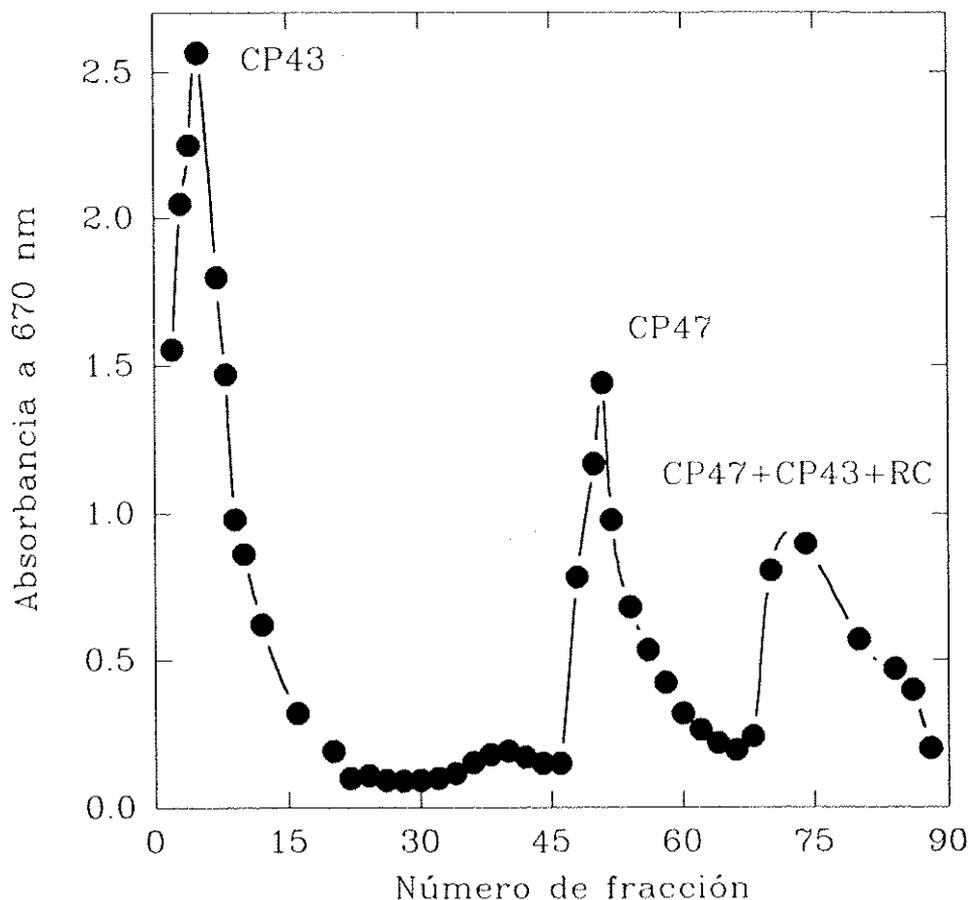


Figura 3.52.- Cromatograma de la purificación de las proteínas de la antena intrínseca de *Beta vulgaris*.

Otro punto fundamental en esta purificación es la previa eliminación en OECC de la proteína extrínseca de 33 kDa, al parecer esta proteína tiene una estrecha relación con la CP47

(Putnam-Evans & Bricker, 1992; Burnap & Sherman, 1991) copurificándose con ella en la cromatografía en caso de no haberse eliminado anteriormente.

3.8.1.- Caracterización de las proteínas CP47 y CP43

3.8.1.1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de 12,5% de acrilamida. Como puede observarse en la figura 3.53 ambas proteínas aparecen como bandas únicas en el gel correspondientes a pesos moleculares de 53.8 kDa y 47.6 kDa. Estos pesos moleculares presentan ciertas diferencias con algunos de los valores publicados para estas proteínas obtenidas

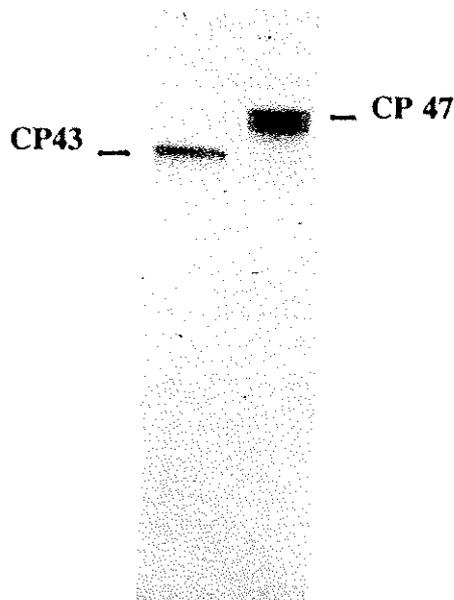


Figura 3.53.- SDS-PAGE al 12,5 % de las fracciones recogidas de la columna de intercambio iónico donde se muestran las proteínas de la antena intrínseca del PSII ya purificadas.

a partir de *Spinacea oleracea* o *Pisum sativum* (Ghanotakis et al., 1989; Barbato et al., 1992) pero son muy parecidos a los publicados para *Chlamydomonas reinhardtii* o *Synechocystis* (de Vitry et al., 1991; Rögner et al., 1991). Es posible que esta variabilidad en los pesos moleculares

entre estas proteínas de diferentes especies pueda ser producida por diferencias en el procesamiento, pero lo más probable es que estas diferencias en la literatura sean originadas por los diferentes tratamientos de desnaturalización a que han sido sometidas. Además hay que tener en cuenta que las proteínas utilizadas como patrones son proteínas solubles y no de membrana, y por tanto el peso molecular de estas proteínas por SDS-PAGE debe ser tomado como un valor orientativo.

3.8.1.2.- Determinación del pI de las antenas CP43 y CP 47

El cálculo del pI para la proteína CP43 fue de 7,17 determinado a partir de la figura 3.54.

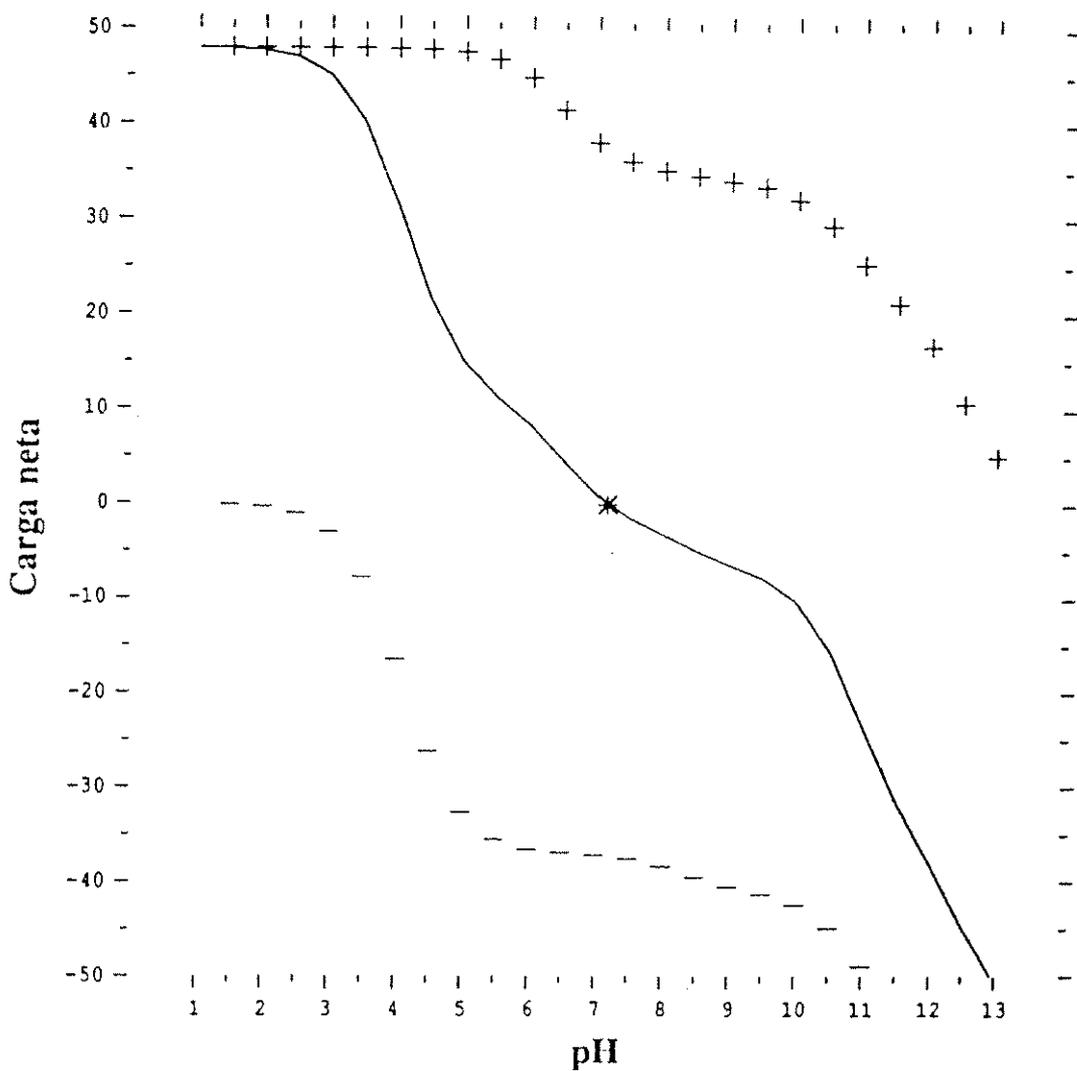


Figura 3.54.- Cálculo del pI de la proteína CP43 de la antena intrínseca del PSII de *Beta vulgaris*.

El cálculo del pI para la proteína CP47 se determinó a partir de la figura 3.55 dando un valor de 6,7.

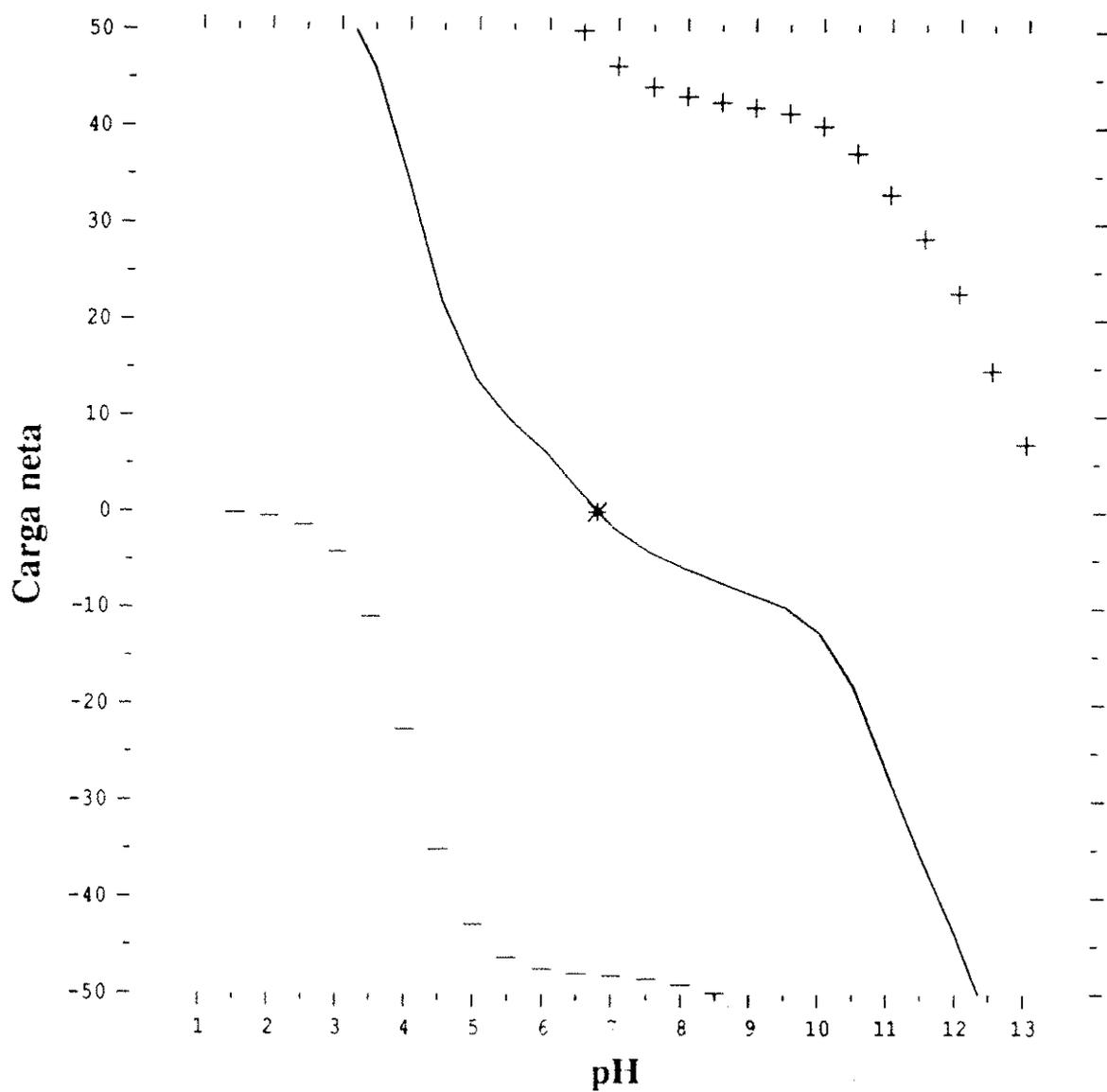


Figura 3.55.- Cálculo del pI de la proteína CP47 de la antena intrínseca del PSII de *Beta vulgaris*.

3.8.1.3.- Espectros de absorción y segundas derivadas de las proteínas CP47 y CP43

El espectro de absorción en la zona del visible de la proteína CP43 de *Beta vulgaris* se muestra en la figura 3.56. Presenta máximos de absorción a 671.5, 626.5, 593.5 y 436 nm. La razón de absorbancias entre la banda Soret y Qy de la Chl a para la proteína pura es $A_{436}/A_{671.5} = 1,51$.

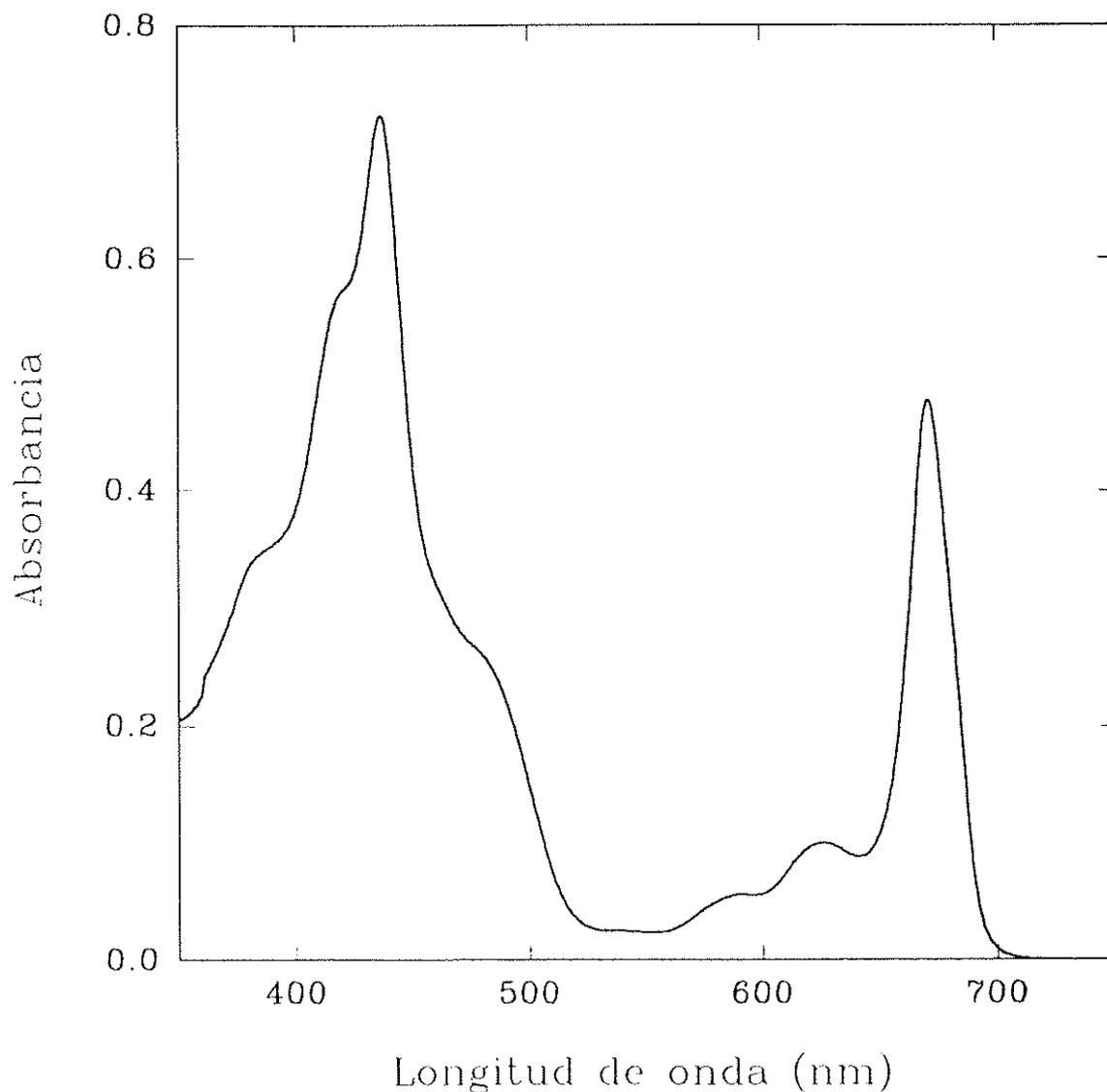


Figura 3.56- Espectro de absorción electrónica de la proteína CP43 de la antena intrínseca del PSII en tampón 20 mM Bis-Tris, pH 6,0, y 0.5% DM.

El espectro exhibe un amplio hombro hacia 480 nm, debido a la absorción de los carotenoides. Los máximos de la proteína coinciden principalmente con las transiciones de la Chl a y el β -caroteno que son los pigmentos que se asocian a esta cromoproteína.

La segunda derivada del espectro de la figura 3.56 mostró la existencia de varios componentes en las bandas de absorción. La existencia de dos componentes en la banda del rojo, uno a 682,5 nm y otro a 670 nm indica la existencia de al menos dos grupos de Chl a diferenciables espectroscópicamente dentro de la proteína. Dos de las transiciones responsables de la absorción del β -caroteno son las que originan los picos a 465 y 490 nm mientras que la banda Soret de la Chl a produce los picos a 437,5 y 415 nm.

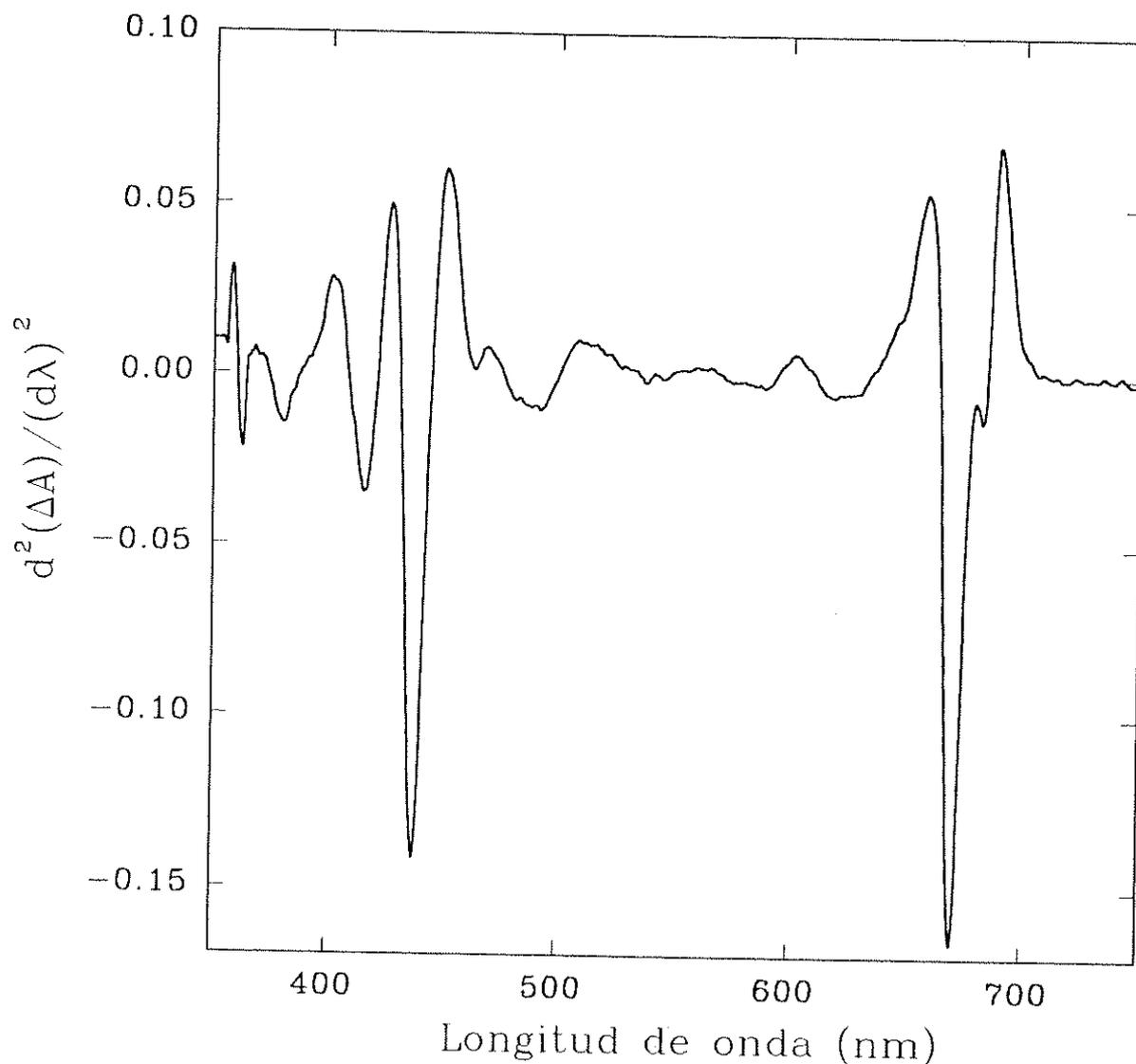


Figura 3.57.- Segunda derivada del espectro de absorción electrónica de la proteína CP43 de la antena intrínseca del PSII.

El espectro de absorción en el visible de la proteína CP47 de *Beta vulgaris* se puede observar en la figura 3.58. Dicho espectro presenta máximos a 674.5, 627, 490 y 437.5

nm. La razón de absorbancias para la proteína pura entre la banda Qx y la banda Qy de la Chl a asociada a la proteína es $A_{437.5}/A_{674.5} = 1,27$.

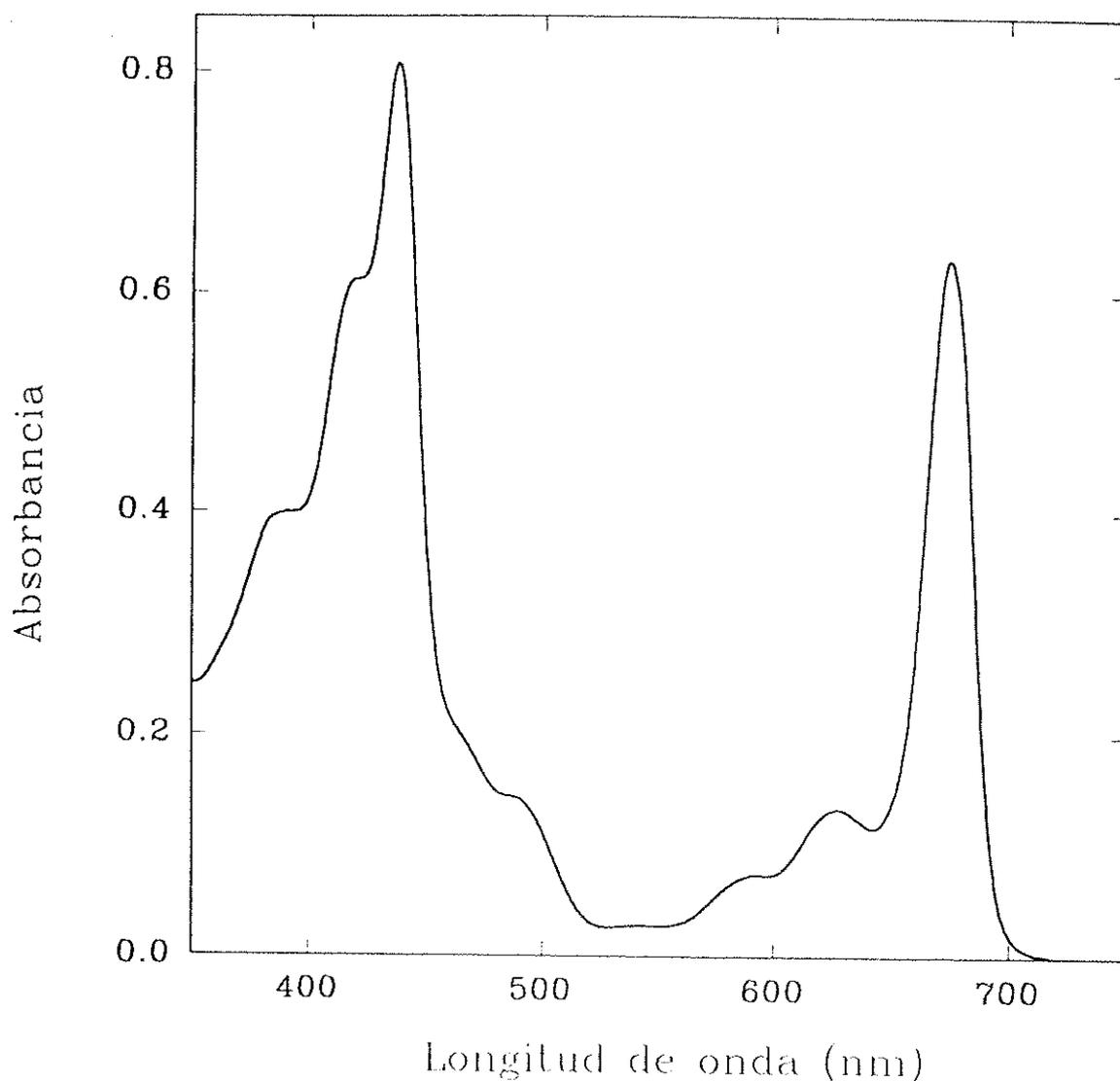


Figura 3.58.- Espectro de absorción electrónica de la proteína CP47 de la antena intrínseca del PSII de *Beta vulgaris* en tampón 20 mM Bis-Tris, pH 6,0, y 0.5 % de DM.

Como se puede apreciar en la figura el espectro de absorción de CP47 resulta muy similar al de CP43 (ver figura 3.56), las mayores diferencias se centran en un desplazamiento hacia el rojo del máximo de absorción de la banda de menor energía de la proteína CP47 respecto a CP43, así como una gran diferencia en el contenido en β -caroteno. Asimismo la relación entre

la banda Qy y la absorbancia a 490 nm en la proteína CP43 es de $A_{671.5}/A_{490} = 2,0$ mientras que esta misma relación en la proteína CP47 es de $A_{674.5}/A_{490} = 4,5$.

La segunda derivada del espectro anterior se muestra en la figura 3.59 y exhibe mínimos a 680.5, 673, 490, 467, 439 y 415 nm.

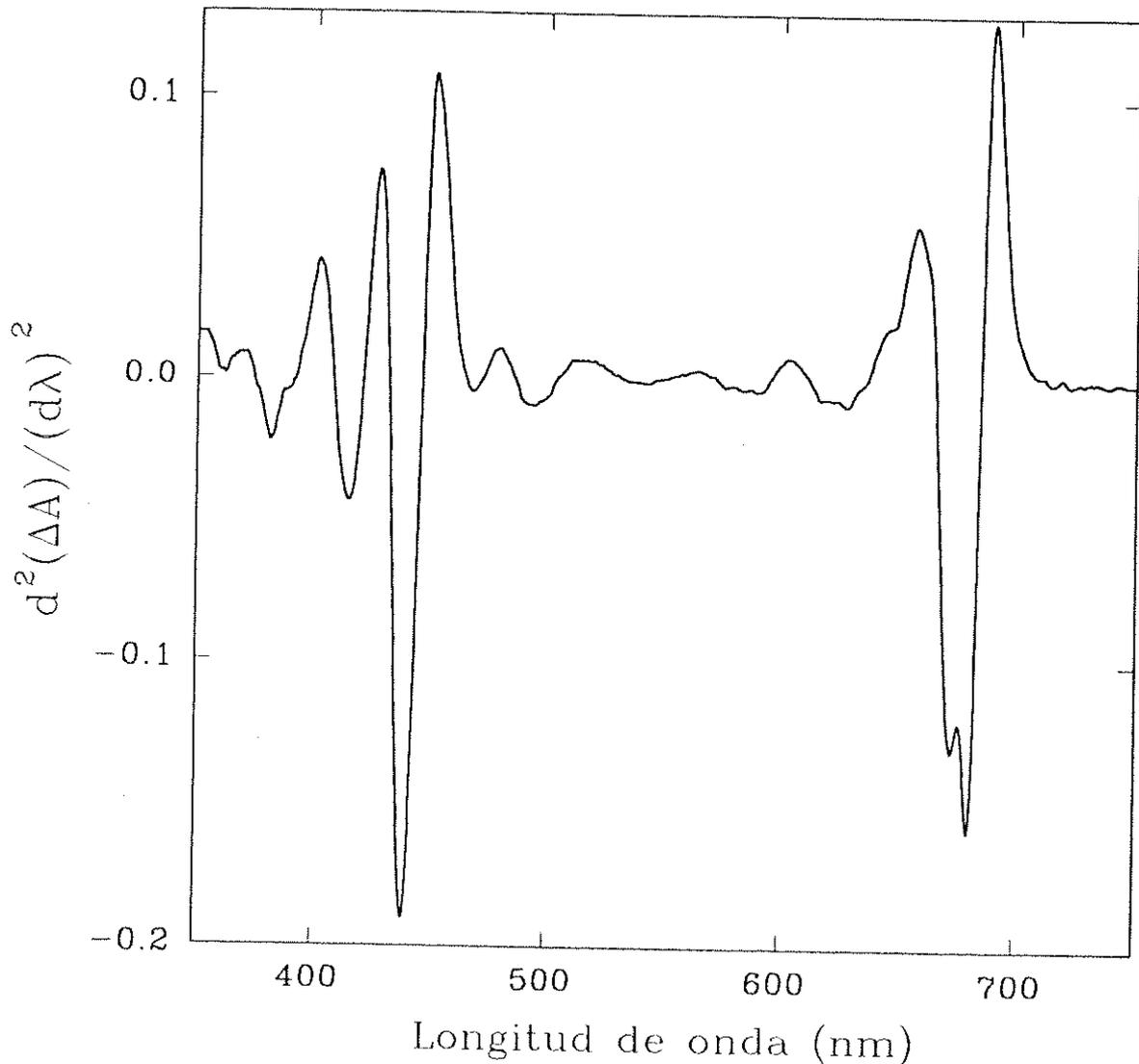


Figura 3.59.- Segunda derivada del espectro de absorción de la proteína CP47 de la antena intrínseca del PSII de *Beta vulgaris*.

Los componentes producidos por la transición Soret de la Chl a muestran un mínimo similar al de la antena CP43 y una relación de amplitudes muy parecida. Además como se puede observar en la figura 3.59 la banda en el rojo de la antena CP47 exhibe también al

menos dos componentes mayoritarios uno a 680.5 y otro a 673 nm como en la CP43, sin embargo la relación de amplitudes es completamente diferente. El componente a 680-682 nm es netamente mayor en CP47 comparado con el de CP43.

3.8.1.4.- Análisis espectroscópico a 4.2 K de la banda Qy de las proteínas CP43 y CP47

El espectro de absorción a 4.2 K de la banda Qy de la proteína CP43 se muestra en la figura 3.60 (nótese que la longitud de onda se da en cm^{-1}), la banda en el rojo presentó un máximo principal a 671 nm y un hombro hacia 682 nm. La cuarta derivada del espectro reveló la existencia de tres grupos de pigmentos principales con máximos a 682.5, 678 y 672 nm. La resolución espectral conseguida al bajar la temperatura nos permite diferenciar en el espectro de absorción la banda a 682 nm que se apreciaba en la segunda derivada del espectro de esta proteína a 277 K (ver sección 3.8.1.3).

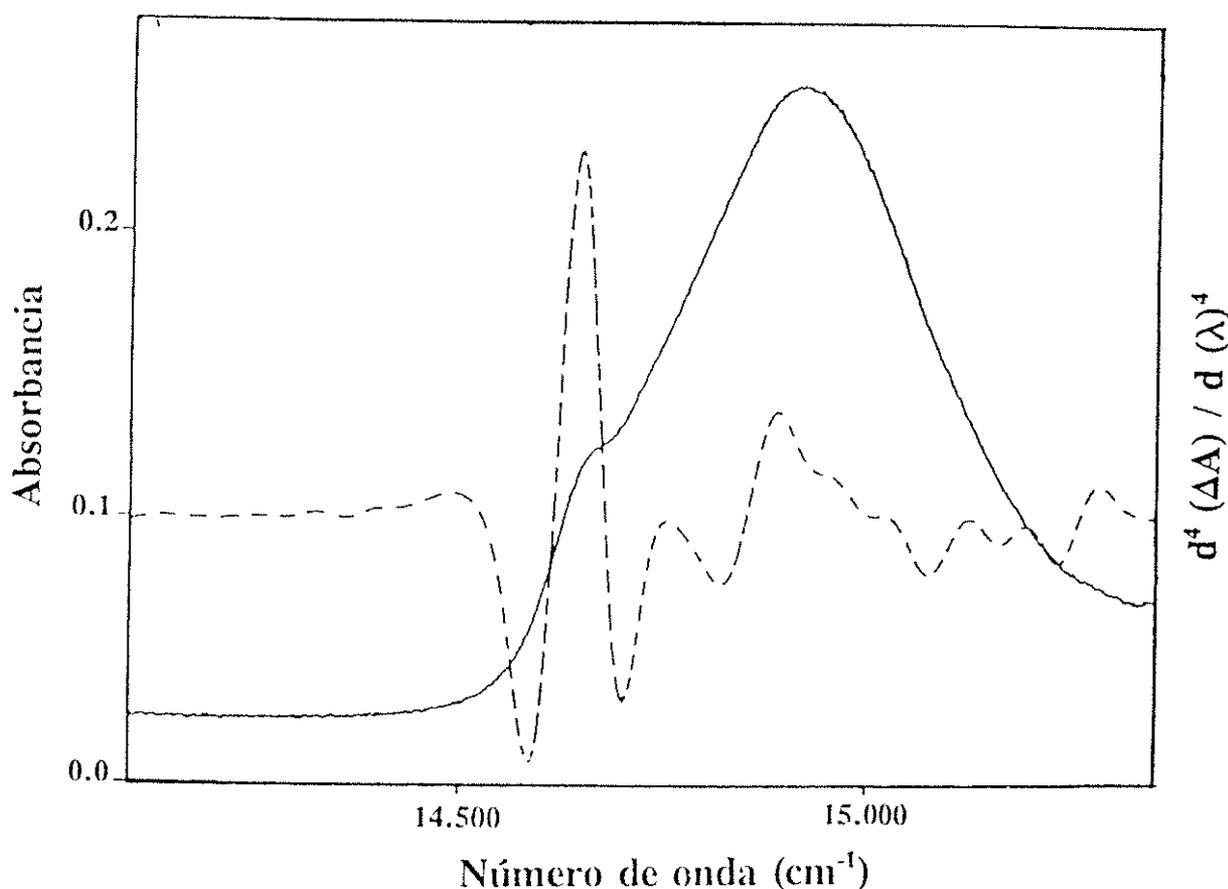


Figura 3.60.- Espectro de absorción electrónica (línea sólida) a 4.2 K de la proteína CP43 en tampón 20 mM Bis-Tris, pH 6,0, más 0.05 % de DM. La muestra fué previamente diluida 3

veces con glicerol. La cuarta derivada del espectro se muestra en la misma figura (línea discontinua).

El espectro de absorción de la proteína CP47 (figura 3.61) en la banda Qy mostró también la existencia de varios componentes producidos por diferentes grupos de clorinas dentro de la cromoproteína. La proteína presentó un máximo principal a 683, 678.5, 670 y 660 nm. La cuarta derivada de dicho espectro confirmó la existencia de estas bandas.

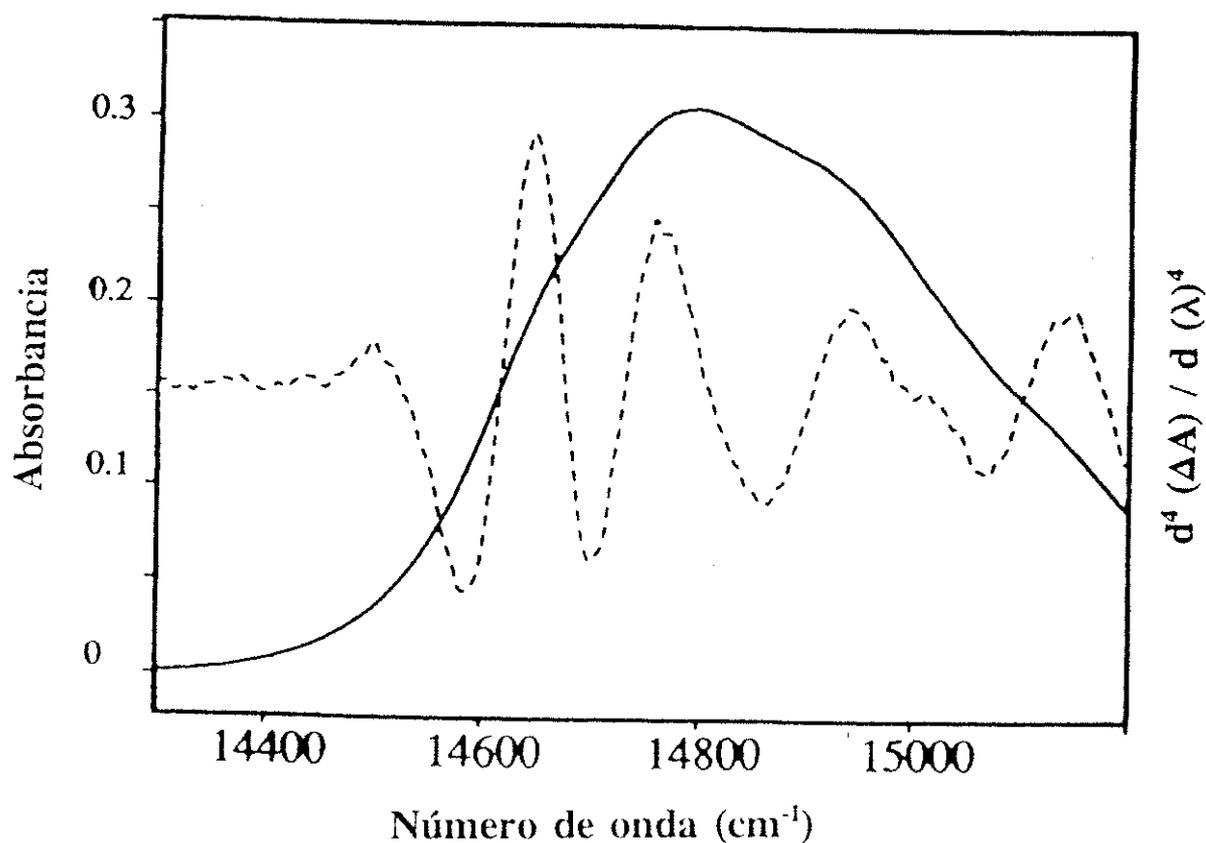


Figura 3.61.- Espectro de absorción electrónica (línea sólida) a 4.2 K de la proteína CP47 en tampón 20 mM Bis-Tris, pH 6,0, más 0.05% de DM. La muestra se diluyó tres veces con glicerol antes de llevarse a cabo la medida. La cuarta derivada del espectro se muestra en la misma figura (línea discontinua).

Como se puede apreciar en ambas figuras la transición Qy de ambas antenas es bastante heterogénea con varios grupos de clorinas que participan en la transferencia de energía al centro de reacción del PSII

3.9.- Espectros de dicroísmo circular de las proteínas CP43 y CP47

Las interacciones excitónicas entre los diferentes grupos de clorinas de cada una de las proteínas han sido estudiadas. En la figura 3.62 se muestra el espectro de dicroísmo circular en el rango del visible de la proteína CP43 que presentó mínimos a 670, 456, y 438 nm y máximos a 405 y 370 nm. No parecen existir fuertes interacciones excitónicas entre los momentos de los dipolos de transición de los distintos grupos de clorinas de la banda Qy de la proteína CP43 como se puede apreciar por la ausencia del típico doblete de CD en la banda negativa a 671 nm. También se observó actividad dicroica de los carotenoides de la proteína

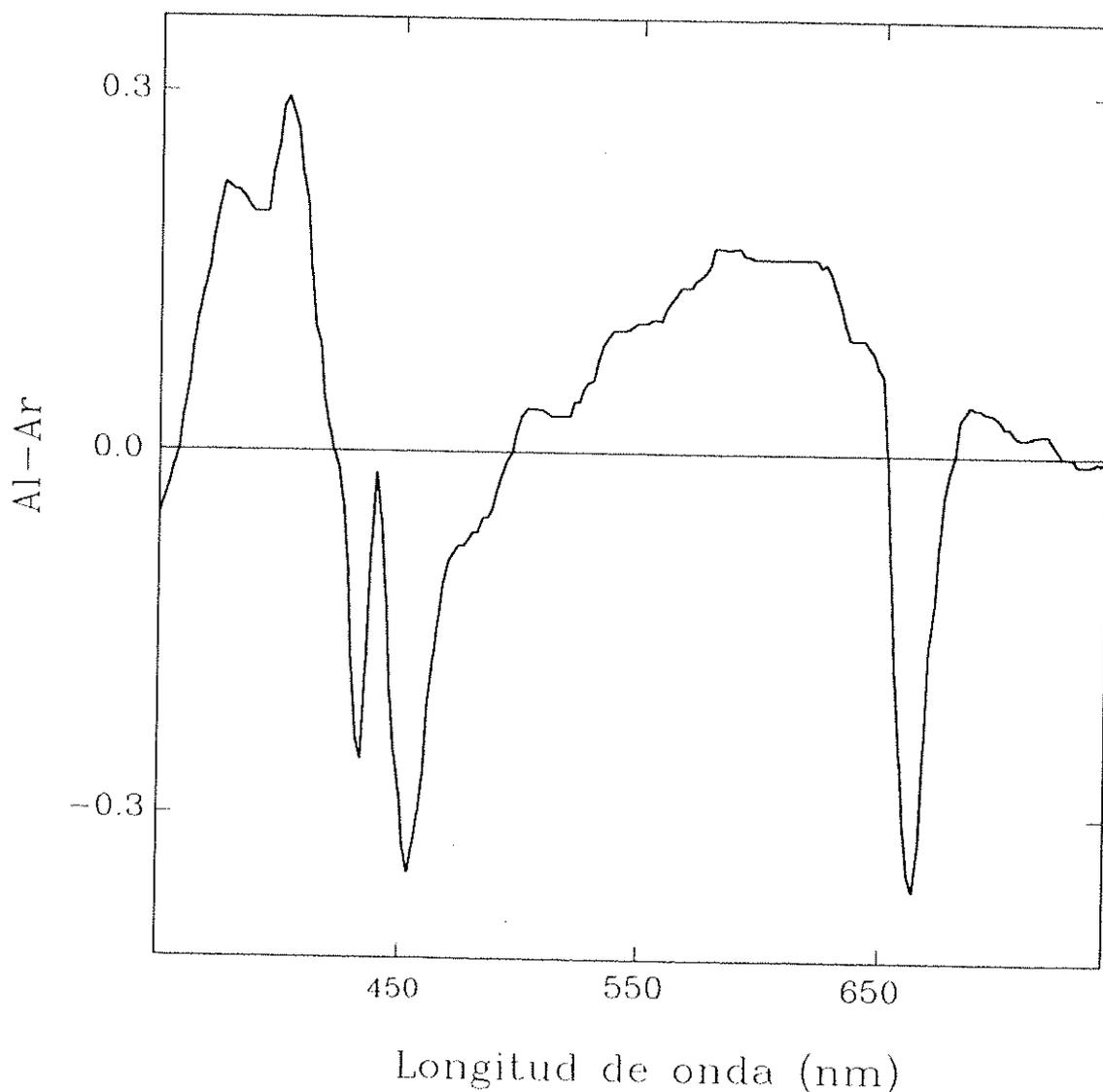


Figura 3.62.- Espectro de CD de la proteína CP43 a 4 °C en tampón 20 mM Bis-Tris, pH 6,0, más 0.05 % de DM.

a juzgar por la actividad dicroica de la banda negativa con máximo en el espectro a 456 nm.

En la figura 3.63 se presenta el espectro de CD de la proteína CP47, que mostró máximos a 664, 404 y 380 nm y mínimos a 678 y 434 nm. La banda Qy mostró la existencia de interacciones excitónicas entre los grupos de clorinas con el punto medio a 675 nm.

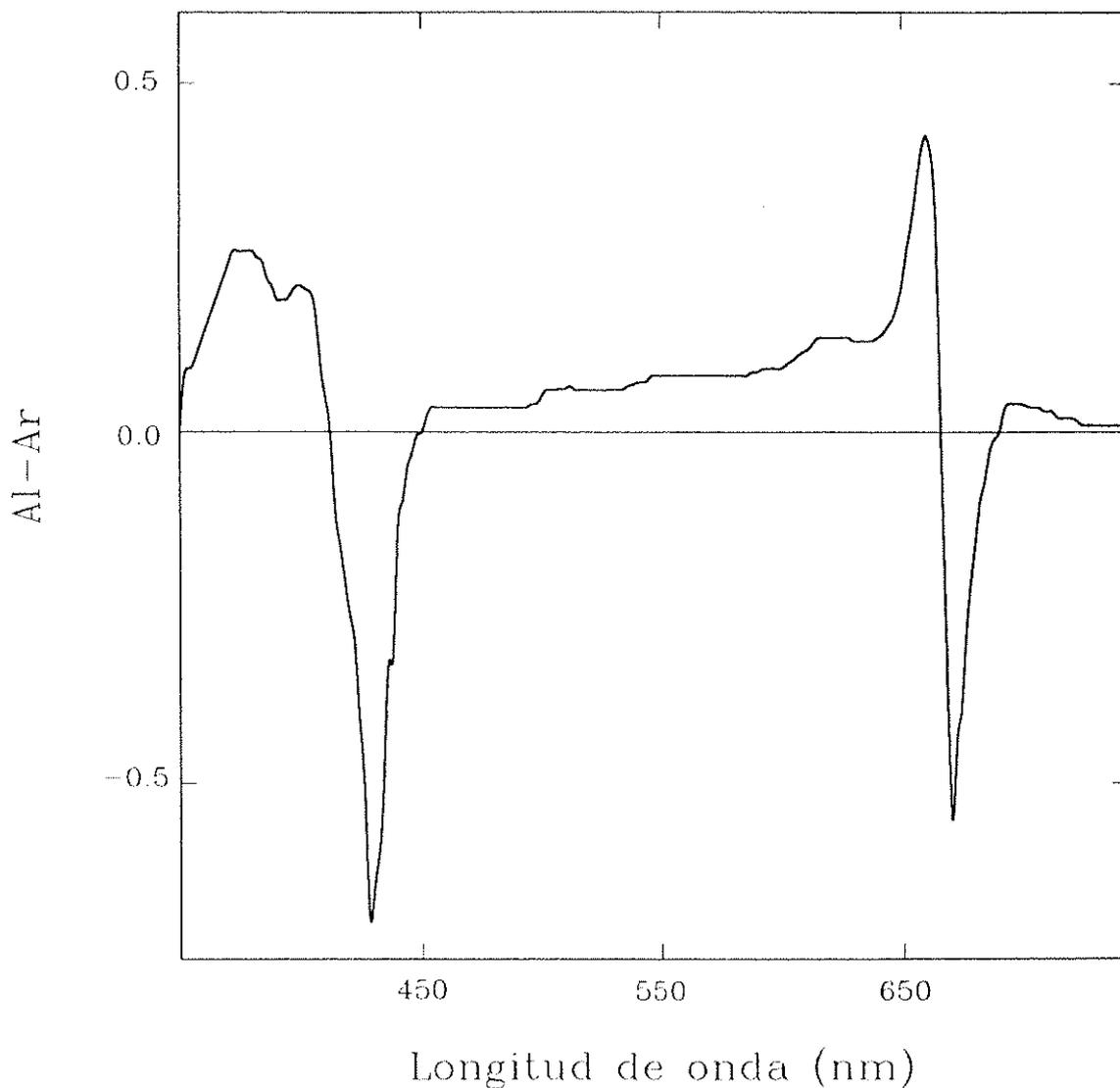


Figura 3.63.- Espectro de CD de la proteína CP47 a 4 °C en tampón 20 mM Bis-Tris pH6,0 más 0.05 % de DM.

El β -caroteno asociado a esta cromoproteína no parece mostrar ningún tipo de actividad dicroica.

3.10.- Estudio del dominio del lado aceptor de electrones del PSIIRC. Inhibición por Cu(II)

Mediante el uso de diferentes inhibidores del transporte electrónico en el dominio reductor del centro de reacción del PSII, se ha caracterizado la inhibición de la actividad de evolución de O₂ por Cu(II) y el sitio de acción de este catión metálico.

3.10.1.- Inhibición por Cu(II) en membranas del PSII

La actividad se expresa como tanto por ciento respecto al control (sin inhibidor) así el I₅₀ se define como la concentración de inhibidor necesaria para reducir la actividad al 50%. La adición de CuCl₂ a una suspensión de membranas de PSII disminuyó la evolución de O₂ en presencia de DCBQ o ferricianuro como aceptores artificiales de electrones presentando unos I₅₀ de 6,6 μM y 20,7 μM respectivamente, mientras que la evolución de oxígeno medida con SiMo como aceptor de electrones se mantuvo constante en presencia de las concentraciones de Cu(II) utilizadas (ver figura 3.64 A).

Para complementar nuestro conocimiento sobre el mecanismo de inhibición del Cu(II) y compararlo, se realizaron curvas de inhibición con otros dos inhibidores bien conocidos del PSII como son el DCMU y la o-fenantrolina (ver Fig 3.64 B y C, respectivamente). Como en presencia de Cu(II) estos inhibidores redujeron considerablemente la actividad de evolución de oxígeno cuando se usaron como aceptores de electrones DCBQ y ferricianuro pero ese no fué el caso en presencia de SiMo. Con DCBQ como aceptor de electrones el DCMU mostró un I₅₀ de 0,05 μM, mucho menor que los correspondientes valores de I₅₀ de 6,6 μM para Cu(II) y 1,6 μM para o-fenantrolina. Cuando se usó ferricianuro como aceptor de electrones el I₅₀ para el DCMU fue 0,32 μM, de nuevo muy bajo cuando se compara con 20,7 μM para Cu(II) y 9,5 μM para o-fenantrolina.



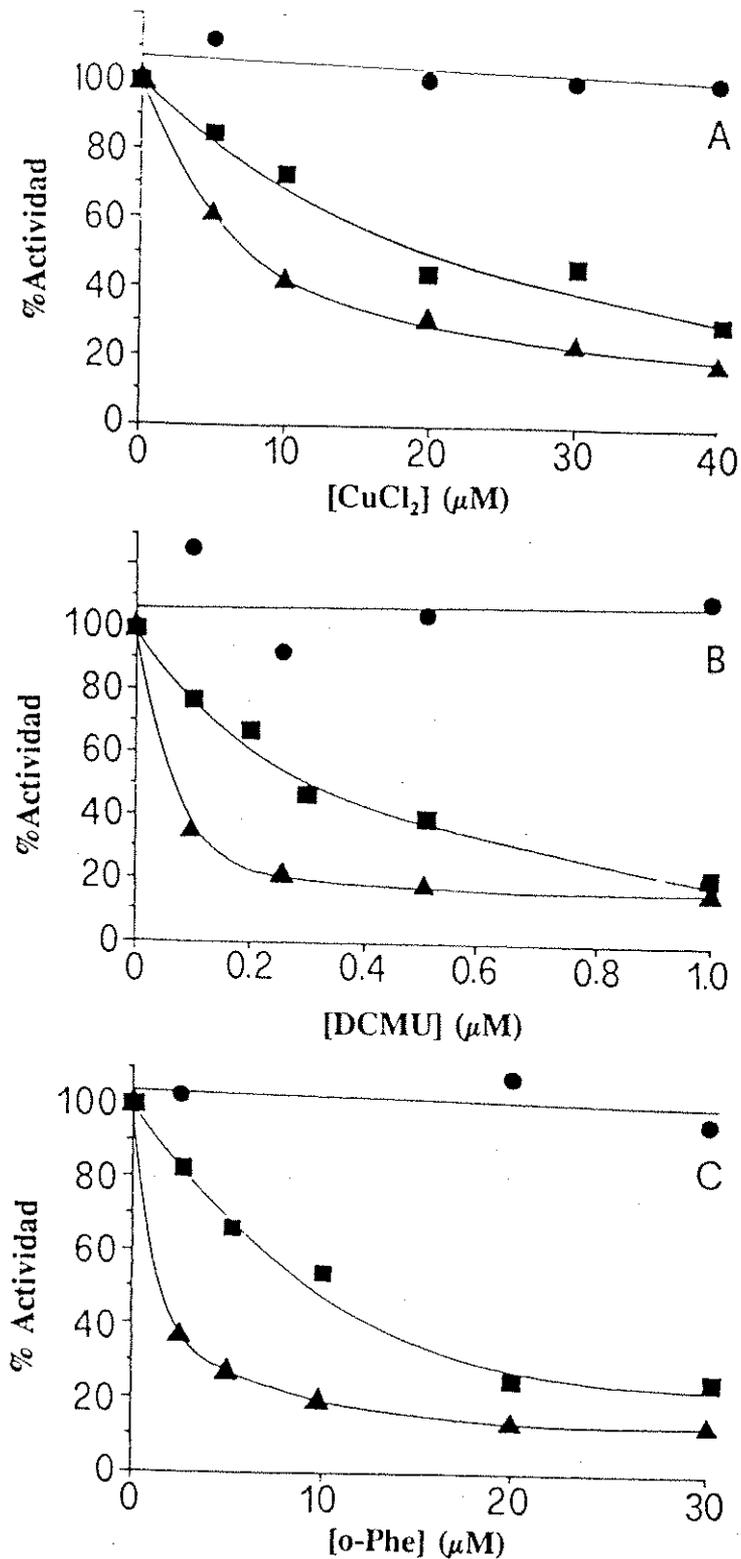


Figura 3.64.- Efecto de $\text{Cu}(\text{II})$ (A), DCMU (B) y *o*-fenantrolina (C) en la actividad de evolución de oxígeno de membranas de PSII de *Beta vulgaris*. La actividad fue medida en presencia de 0,5 mM de DCBQ (▲), 1 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (■) ó 0,2 mM de SiMo (●) como aceptores de electrones. Las actividades (μmol de $\text{O}_2/\text{mg Chl} \cdot \text{h}$) correspondientes al 100 % de actividad fueron aproximadamente 600, 253, y 170 para DCBQ, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y SiMo, respectivamente.

3.10.2.- Prevención de la inhibición por Cu(II) en presencia de Fe(III)

La incubación de membranas del PSII con cantidades cada vez mayores de Fe(III) previno parcialmente la inhibición de la actividad de la evolución de O₂, indicando la posibilidad de una competencia por un punto común de unión. Sin embargo, la adición de aniones bicarbonato, el cual se cree que es un ligando del hierro no hémico del centro de reacción del PSII (Eaton-Rye & Govindjee., 1988; Diner & Petrouleas, 1987) y un efector positivo en la actividad del PSII, no tuvo un efecto protector frente a la inhibición por Cu(II), lo cual sugiere que el ion Cu(II) no se une en el sitio del bicarbonato.

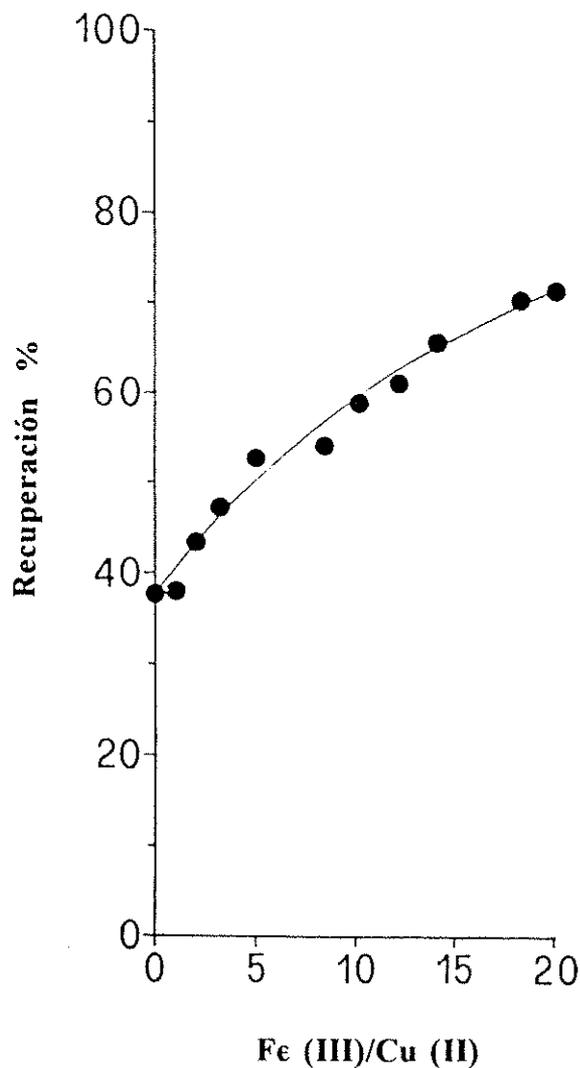


Figura 3.65.- Prevención de la inhibición por Cu(II) mediante la incubación previa de las membranas de PSII de *Beta vulgaris* con FeCl₃ en presencia de 0,5 mM de DCBQ.

El efecto preventivo del Fe(III) sobre la inhibición de Cu(II) podría sugerir que el Cu(II) sustituye al átomo de hierro no hemínico del centro de reacción del PSII durante el proceso inhibitorio.

3.10.3.- Espectro de EPR del hierro no hemínico del PSII

En la figura 3.66 se muestra la región de campos magnéticos bajos de un espectro de EPR de membranas del PSII de *Beta vulgaris* medido a 5 K. Las membranas del PSII fueron preincubadas con una concentración inhibitoria de Cu(II) para posteriormente oxidarse con ferricianuro a 4 °C en la oscuridad. El espectro fue idéntico al obtenido sin Cu(II) donde la banda de $g=8,1$ ascrita al Fe no hemínico (Diner & Petrouleas, 1987) se mantuvo inalterada.

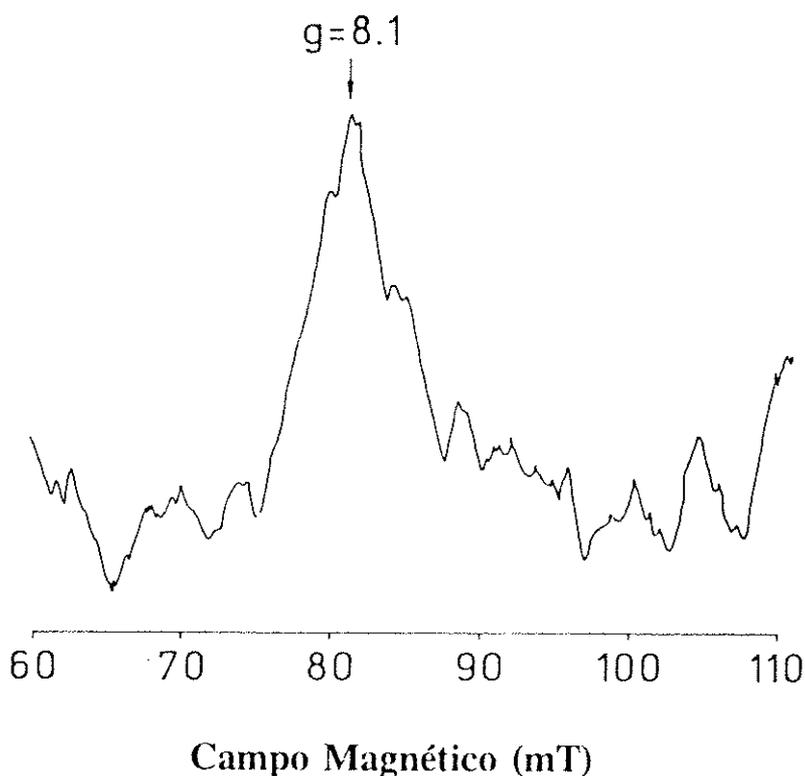


Figura 3.66.- Región de campos magnéticos bajos del espectro de EPR de membranas del PSII de *Beta vulgaris* en presencia de concentraciones inhibitorias de Cu(II). Membranas de PSII a 10 mg Chl / ml se resuspendieron en tampón 50 mM HEPES-NaOH , pH 7,2, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ y 0,4 M de sacarosa. La muestra fué oxidada por la adición de 10 mM de ferricianuro potásico a la muestra después de la incubación de ésta con una concentración de 40 μ M de Cu(II).

El espectro fué tomado a una frecuencia de microondas de 9.195 GHz, frecuencia de modulación de 100 KHz, amplitud modulada de 4,0 Gauss y una potencia de microondas de 100 mW. El espectro de EPR indicó que el átomo de Fe no hemínico no es sustituido por Cu(II), y que además este ión no produjo cambios conformacionales significativos en el dominio del Fe no hemínico.

3.10.4.- Localización del sitio de acción del Cu(II) en tilacoides tripsinizados

Para poder localizar con mayor precisión el lugar de acción de Cu(II), se comparó el efecto inhibitorio de este ión con los de DCMU y o-fenantrolina en tilacoides

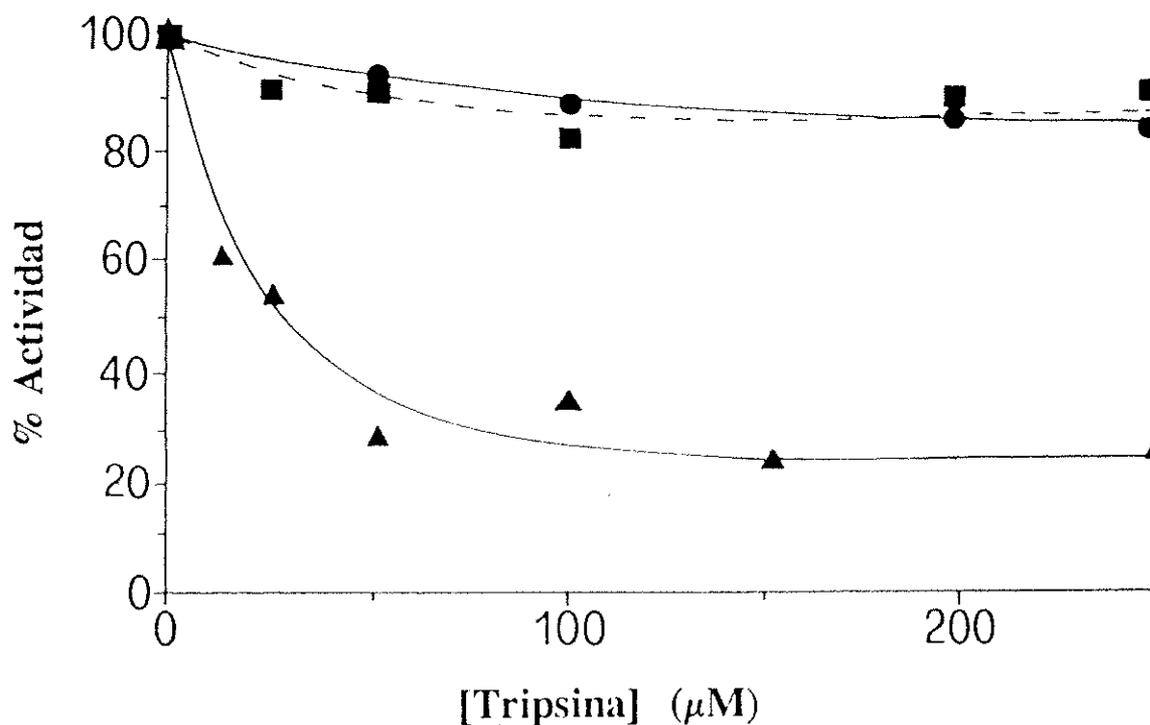


Figura 3.67.- Efecto de la proteólisis parcial por tripsina en la evolución de oxígeno de tilacoides de *Beta vulgaris*. El tratamiento con tripsina se llevó a cabo durante 3 minutos. La actividad se midió (ver sección 2.4.1) en presencia de 0,5 mM de DCBQ (▲), 1 mM de K₃Fe(CN)₆ (■) y 0,2 mM de SiMo (●). Las actividades en μmol de O₂/mg Chl . h correspondientes al 100 % de actividad fueron 265, 128 y 77 para DCBQ, K₃Fe(CN)₆ y SiMo, respectivamente.

control y previamente sometidos a tratamiento con tripsina usando DCBQ, ferricianuro y SiMo como aceptores de electrones. En la figura 3.67 se puede observar el efecto del tratamiento de tripsina durante 3 minutos a temperatura ambiente sobre la actividad de evolución de oxígeno de tilacoides de *Beta vulgaris* usando los diferentes aceptores de electrones. La actividad es dada como tanto por ciento del control (sin adición de tripsina). En presencia de DCBQ se observa una marcada disminución de la actividad de desprendimiento de oxígeno con el incremento de la concentración del enzima, mientras que por otra parte cuando tanto ferricianuro como SiMo fueron utilizados como aceptores de electrones la actividad apenas se vio afectada. Los datos indican que la proteasa ataca preferentemente la zona reductora del PSII, la cual emerge de la bicapa lipídica de los tilacoides, produciendo una destrucción o modificación del lugar con el cual el DCBQ interacciona para tomar electrones. Aparentemente los puntos de reducción de SiMo y ferricianuro no se vieron afectados por el tratamiento con tripsina, lo que supondría que ambos toman electrones de un lugar, dentro de la zona reductora del PSII, diferente al DCBQ. En la figura 3.68 se puede observar la comparación entre el efecto de inhibición del Cu(II), DCMU y o-fenantrolina en la actividad de desprendimiento de oxígeno de tilacoides control y tratados con tripsina usando 1 mM de ferricianuro ó 0,2 mM de SiMo. Las cantidades de tripsina (66,6 µg/ml) usadas corresponden al máximo de inhibición de la evolución de oxígeno en presencia de DCBQ (ver figura 3.67).

Al igual que con membranas del PSII, tanto Cu(II) como DCMU y o-fenantrolina eliminaron la actividad de desprendimiento de oxígeno en tilacoides control en presencia de ferricianuro como aceptor de electrones. El inhibidor más potente fue el DCMU que presentó un I_{50} de 0.2 µM. Los I_{50} mostrados por Cu(II) y o-fenantrolina fueron de 13,7 y 15,3 µM respectivamente. Sin embargo la efectividad del DCMU disminuyó acusadamente después del tratamiento con tripsina como ya ha sido comunicado por otros autores en otros sistemas (Renger, 1976; Dreschler & Neumann, 1989), presentando a la vez un incremento significativo del efecto inhibitorio del Cu(II) y o-fenantrolina como revelan los I_{50} de ambos inhibidores de 5 y 8 µM, respectivamente.

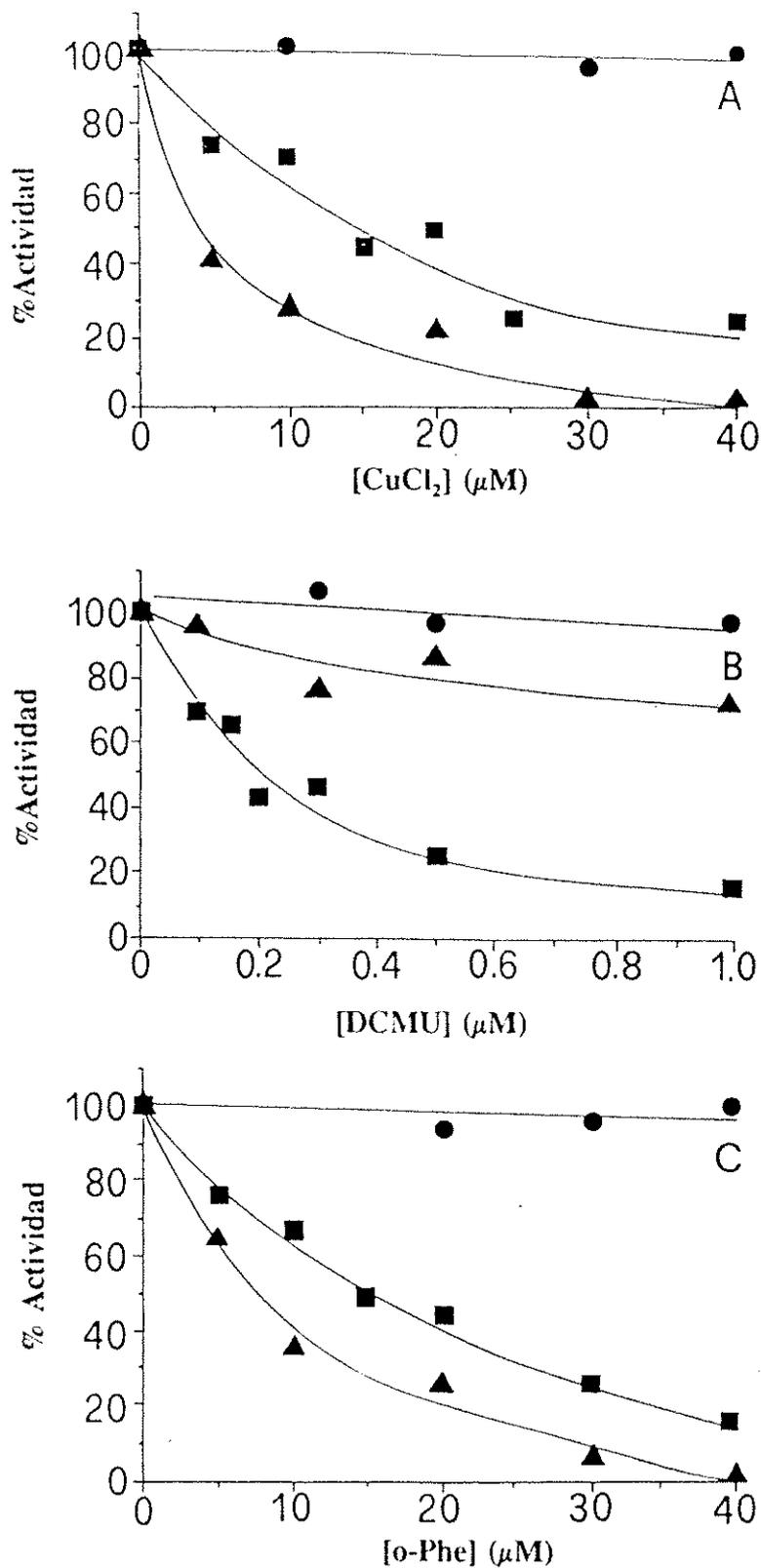


Figura 3.68.- Efecto del ion Cu(II) (A), DCMU (B), y o-fenantrolina (C) en la actividad de evolución de oxígeno de tilacoides control (■) y tratados con tripsina (▲) (66,6 $\mu g/ml$ durante 3 minutos). La actividad se midió en presencia de 1 mM de $K_3Fe(CN)_6$ (■, ▲) y 0,2 mM de SiMo (●). El 100 % de actividad con cada uno de los aceptores son los mismos que los de la figura 3.67. Nótese que el 100 % de la actividad fué la misma para tilacoides control y tratados con tripsina cuando se usó ferricianuro y SiMo como aceptores de electrones.

Los datos muestran que el tratamiento de los tilacoides con tripsina modifican o destruyen el punto de unión de DCMU e incrementa la accesibilidad para el Cu(II) y la o-fenantrolina. Sin embargo ningún efecto producido por el tratamiento con tripsina se observó en la actividad usando SiMo como aceptor de electrones en presencia de DCMU, Cu(II) u o-fenantrolina como inhibidores.

4.-DISCUSSION

4.1.- Purificación de membranas del PSII, OECC, antenas intrínsecas y centro de reacción

Los procedimientos de purificación que se describen en la presente Memoria permiten la obtención tanto de fracciones membranosas altamente enriquecidas en PSII como proteicas. Así por ejemplo se han conseguido fracciones de membranas del PSII con alta capacidad para desprender O_2 (en algunos casos hasta $750 \mu\text{mol de } O_2/\text{mg Chl h}$) lo que es indicativo tanto de su pureza como del estado nativo de la preparación, y ha sido importante a la hora de realizar los estudios de inhibición por Cu(II) . Las modificaciones realizadas con respecto al método de original de obtención de esta preparación han servido para aumentar el rendimiento (hasta 180-200 mg Chl total de una extracción partiendo de 1 Kg de tejido foliar) de este paso de purificación sin afectar la pureza de la fracción. Este ha sido un punto importante en el desarrollo de este trabajo pues esta preparación es la que habitualmente se emplea como material de partida en el resto de purificaciones. Este método se ha desarrollado a partir del método descrito para *Spinacea oleracea* (Berthold et al., 1981).

A partir de esta preparación de membranas del PSII se realizó la purificación del complejo de "OECC". El complejo OECC de *Beta vulgaris* purificado tuvo una composición proteica similar al de *S. oleracea* (Ghanotakis et al., 1986), pero el análisis de pigmentos reveló una mayor pureza en nuestro material. Así, mientras que la relación de Chl a/ Chl b es de 13 en *S. oleracea* en nuestras muestras de "OECC" se ha conseguido mejorar esta relación de pigmentos a 17, medido espectroscópicamente y a 20 por HPLC, lo cual indica una reducción notable de proteínas contaminantes del complejo que portan Chl b como cofactor. Esto puede ser probablemente producido por una mejor solubilización de las PSII_m de *B. vulgaris* eliminando de esta manera una mayor cantidad de LHCII, principal portador de Chl b. Este punto también es apoyado por el enriquecimiento de la preparación en β -caroteno, pigmento selectivamente asociado en el PSII a proteínas integrantes del OECC. El rendimiento de la purificación del OECC de *B. vulgaris* fue óptimo pues se solubilizó casi todo este complejo presente en las PSII_m obteniendo gran cantidad de material.

El OECC se usó para la purificación de las antenas intrínsecas del PSII previa eliminación de la proteína de 33 kDa. La purificación de las antenas CP43 y CP47 mediante este método tiene la ventaja de poder obtener estos dos tipos de proteínas puras en una única cromatografía de intercambio aniónico tras la solubilización del complejo, ahorrándose una cromatografía de intercambio catiónico respecto al método de Ghanotakis et al., 1989. Por otra parte este método se ha desarrollado mediante cromatografía en columna abierta, evitándose el uso del FPLC y las columnas apropiadas para este sistema, que encarecerían el protocolo experimental. El método usado en esta memoria para la purificación de estas proteínas de la antena intrínseca es por tanto sencillo, rápido, barato y de rendimiento apropiado para realizar distintos estudios espectroscópicos con ambas cromoproteínas. Los espectros de absorción a temperatura ambiente para la proteína CP47 son similares a los obtenidos de otras especies (van Dorssen et al., 1987; Ghanotakis et al., 1989) purificadas mediante cromatografía, sin embargo es muy diferente a los espectros para esta proteína obtenidos a partir de geles de electroforesis no desnaturizantes (Delapelaire & Chua, 1979; Camm & Green, 1980). Tanto los máximos como el perfil de los espectros variaron según el sistema de purificación empleado. Así un punto dispar es el nivel de β -caroteno en el espectro de la proteína de CP47 purificada en columna, el cual es bastante inferior que el de la misma muestra purificada por electroforesis en geles no desnaturizantes. Por otra parte, las razones de absorbancia entre las bandas Soret y Qy del complejo pigmento proteína fueron diferentes entre la CP47 purificada por Delapelaire & Chua (1.33) y la purificada por Camm & Green (1.17), indicando diferentes niveles de pigmentos entre ambas partículas. Nuestra preparación de CP43 también mostró diferencias en el nivel de carotenos con las preparaciones de los anteriores autores, aunque menos acusadas que en el caso de la CP47. Sin embargo las razones de absorbancia entre las bandas Soret y Qy de este complejo también fueron diferentes de las purificadas por electroforesis (1.29 para Caam & Green y 1.5 para Delapaire & Chua). Las razones halladas en nuestra preparación coinciden con los valores de Delapelaire & Chua, sin embargo no estamos de acuerdo con su estequiometría de pigmentos. Estas diferencias según el método empleado demuestran la dificultad de conseguir preparaciones homogéneas en este tipo de cromoproteínas de membranas del PSII.

Los espectros a 4.2 K de la banda Qy y sus respectivas derivadas muestran la existencia de diferentes grupos de Chl dentro del complejo cromoproteico involucrados en la transferencia de la energía de excitación al centro de reacción del PSII. El estudio de las distintas rutas de transferencia de energía entre los diferentes grupos de pigmentos de estas antenas están siendo realizadas actualmente mediante espectroscopia de "hole burning" en colaboración con el grupo de G. Small, Ames Laboratory, Iowa. Los espectros de CD en el visible de estas cromoproteínas revelan la existencia de ciertas interacciones excitónicas en la banda Qy de la proteína CP47 mientras que en la CP43 no se da este tipo de interacciones. Esto puede ser debido a la íntima relación de la antena CP47 con el centro de reacción, en la que la interacción entre los pigmentos favorecería la eficiencia de la transferencia de energía al centro reactivo.

Los pesos moleculares de los polipéptidos obtenidos por electroforesis difieren de los determinados para sus homólogos de *S. oleracea* pero resulta similar al obtenido para otros organismos y hace mención al comportamiento anómalo de las proteínas de membrana en SDS-PAGE.

La purificación del centro de reacción del PSII se ha realizado en base al método de Nanba & Satoh, 1987, gracias al cual se han obtenido preparaciones del complejo D1-D2-Cyt b559 de la planta *B. vulgaris*. Mediante las modificaciones al método descritas en esta memoria se han conseguido purificar dos tipos de preparaciones con el mismo contenido polipeptídico pero con diferente contenido de pigmentos. Ambas preparaciones contienen las proteínas D1, D2 y los péptidos α y β del Cyt b559. Los espectros de absorción de ambas preparaciones, denominadas RCIIa y RCIIb, mostraron claras diferencias entre sí con respecto al nivel de β -caroteno y Chl a. Así, RCIIb mostró menores niveles de β -caroteno y Chl a respecto a la RCIIa, lo cual se reflejó en el espectro diferencial entre ambas muestras normalizando las absorciones a 535 nm. Esta región espectral coincide con la transición Qx de la Pheo a, único pigmento que se mantiene constante en ambas preparaciones además de los niveles de citocromo b559. El espectro diferencial de estas dos preparaciones demostró claramente un menor nivel de β -caroteno y Chl a de la preparación RCIIb respecto a RCIIa.

4.2.- Estequiometría de los complejos RCIIa y RCIIb aislados de *B. vulgaris*

Existe una fuerte controversia sobre la estequiometría de los pigmentos que realizan los procesos fotoquímicos primarios en el centro de reacción del PSII. Así, varios grupos han publicado datos que varían entre 4-12 Chl a, 2-3 Pheo a, 1-2 β -carotenos y 1-2 Cyt b559 por centro de reacción. Por otra parte el centro de reacción bacteriano está asociado con 4 Bchl, 2 Bpheo y un carotenoide. Parece ser que el método de aislamiento así como el detergente usado (Dekker et al., 1989) para la purificación del complejo podría afectar el contenido final de pigmentos del material (por ejemplo la cantidad de TX-100 usado en la purificación del complejo), especialmente de Chl a y β -caroteno (Montoya et al., 1991). Los estudios más recientes en los que el complejo D1-D2-Cyt b559 ha sido purificado de forma más suave indican que el material contiene 6 Chl a, 2 Pheo a, 2 β -carotenos y 1 Cyt b559 (Kobayashi et al., 1990; Gounaris et al., 1990; Montoya et al., 1991) y está desprovisto tanto del átomo de Fe no hemínico del lado reductor de electrones como de los átomos de Mn responsables de la evolución de oxígeno. Sin embargo este complejo todavía conserva la capacidad para llevar a cabo la separación de cargas.

Los datos de esta memoria muestran que es posible obtener diferentes estequiometrías de cofactores del complejo D1-D2-Cyt b559 partiendo del mismo material biológico. Variando únicamente el tiempo de lavado de la columna en la purificación del complejo D1-D2-Cyt b559, hemos obtenido dos tipos de centros de reacción, denominados RCIIa y RCIIb. Sorprendentemente la estequiometría de pigmentos de la preparación RCIIb es equivalente a la obtenida para el centro de reacción de bacterias púrpuras y de *Spirodella oligorhiza* (Braun et al., 1990). Por otra parte nuestros resultados contrastan con los obtenidos por Dekker et al., 1989. Estos autores proponen una estructura dimérica del complejo D1-D2-Cyt b559, la estequiometría de pigmentos que ellos obtienen para el complejo D1-D2-Cyt b559 de *S. oleracea* es de 11-12 Chl a y 2 Cyt b559 por 2 o 3 Pheo. Esto induce a pensar debido a la disparidad de estos datos con los del resto de la literatura que algunas preparaciones usadas por otros grupos pueden estar contaminada probablemente por restos de la antena intrínseca del PSII.

Una observación a tener en cuenta es la similitud en el contenido de Chl a entre las primeras preparaciones obtenidas de *S. oleracea* (Nanba & Satoh, 1987; Shuvalov et al., 1989) y *P. sativum* (Barber et al., 1987) y la preparación RCIIb. Todas estas partículas poseen una relación de cofactores similar, con la diferencia de que en la partícula RCIIb de *B. vulgaris* el máximo de absorción de la banda en el rojo está a 675.5 nm, probablemente debido al intercambio de detergente de TX-100 a DM. Parece ser que hay una relación entre la absorbancia del eluato antes de empezar el gradiente de elución de la muestra, la estequiometría de pigmentos y el máximo de absorción en el rojo de la preparación obtenida.

El contenido de Cyt b559 del complejo D1-D2-Cyt b559 ha sido también uno de los principales puntos de debate entre los investigadores del campo. Este dato ha sido cuidadosamente calculado para cada fracción obtenida del gradiente de elución en la purificación del complejo D1-D2-Cyt b559 de ambas preparaciones RCIIa y RCIIb. El contenido de Cyt b559 permaneció constante en todas las fracciones de elución (aproximadamente 1 Cyt b559 por 2 Pheo), lo cual está de acuerdo con los datos aportados por otros autores (Miyazaki et al., 1989; Nanba & Satoh, 1987; Barber et al., 1987; Braun et al., 1990) pero no coincide con los datos aportados por Dekker et al., 1989 y Shuvalov et al., 1989. Por otra parte nuestros resultados no implican que en fracciones menos purificadas del PSII puedan existir dos Cyt b559, aunque los últimos datos sobre el contenido de este polipéptido en tilacoides revelan la presencia de sólo una copia de esta proteína por centro de reacción (Buser et al., 1992a). Consecuentemente, el proceso de purificación del complejo D1-D2-Cyt b559 debe de ser controlado rigurosamente para poder obtener una buena homogeneidad de la muestra. La comparación de los dos tipos de preparaciones del complejo D1-D2-Cyt b559 descritos en esta memoria y los resultados de otros autores (ver secciones 4.5 y 4.6) nos conduce a pensar que la forma modificada RCIIa corresponde a la forma nativa del complejo y que la forma RCIIb es la análoga al centro de reacción bacteriano. El reducido número de pigmentos de RCIIb puede facilitar la caracterización estructural y funcional del complejo D1-D2-Cyt b559.

4.3.- Caracterización espectroscópica de los dos tipos de preparaciones D1-D2-Cyt b559 aisladas de *Beta vulgaris*

En base a las propiedades de los espectros de absorción en la región del visible, de la electroforesis de ambas muestras y del perfil del espectro de absorción diferencial inducido por iluminación, se concluye que la partícula RCIIa de *B. vulgaris* es similar al complejo D1-D2-Cyt b559 aislado de otras plantas (Nanba & Satoh, 1987; Barber et al., 1987; Braun et al., 1990; van Leeuwen et al., 1992). Sin embargo importantes diferencias se han observado en el espectro de absorción del complejo RCIIb comparado con RCIIa a temperatura ambiente. Estas diferencias incluyen una marcada reducción de la absorción producida por el β -caroteno y la clorofila. Estas características corresponden con el menor contenido de Chl a y β -caroteno en RCIIb comparado con RCIIa (Montoya et al., 1991). Aunque algunos autores han propuesto interacciones entre todos los pigmentos del complejo D1-D2-Cyt b559 (Tetenkin et al., 1989), el hecho de que las bandas no se desplacen en los espectros a baja temperatura comparadas con los espectros a temperatura ambiente sugiere que no existen fuertes interacciones entre los cromóforos dentro del centro de reacción del PSII (Montoya et al., 1993). Este punto contrasta con lo que sucede en el centro de reacción bacteriano donde tienen lugar fuertes interacciones excitónicas entre las dos Bchl que forman el par especial.

Considerando los datos de la deconvolución espectral resumidos en las tablas de la sección 3.5 junto con la estequiometría de pigmentos de ambas preparaciones (Montoya et al., 1991), se puede sugerir que la banda a 680 nm está compuesta por 2 Chl a, la banda con máximo a 672-673 nm es debida a 2 Pheo y la banda alrededor de 669-670 nm es originada por las restantes 4 Chl que actúan como Chl accesoria (Montoya et al., 1993). La asignación de 2 Chl a a P680 no significa necesariamente que P680 sea funcionalmente un dímero, podría ser que P680 se comportase como un monómero durante el proceso fotoquímico (van Mieghem et al., 1991; van der Voos et al., 1992). La asignación de pigmentos mencionada en la sección de resultados implica la pérdida de 2 Chl accesorias en la preparación RCIIb, lo cual se confirmó al llevar a cabo la diferencia de los espectros a temperatura ambiente de las dos preparaciones. Por otra

parte la comparación de los espectros de SERRS de ambas preparaciones mostró claramente que la composición de pigmentos de RCIIa es diferente a RCIIb. La relación de los picos asignados a los diferentes cromóforos cambia de una preparación a otra. Las señales asignadas a Pheo y al Cyt b559 (Ghanotakis et al., 1989; Picorel et al., 1991) comparadas con las producidas por el resto de los cromóforos fueron mayores en los espectros de SERRS obtenidos en el caso de la partícula RCIIb que en la RCIIa (Montoya et al., 1993). Esto encaja con un descenso del contenido de Chl y β -caroteno del complejo D1-D2-Cyt b559 de la preparación RCIIb.

Sería lógico pensar que las 2 clorofilas y el β -caroteno que son liberados de la matriz proteica en la columna podrían estar localizados en la parte periférica del complejo proteico. Recientemente, Ruffle et al., 1992, han publicado un modelo de la estructura tridimensional del centro de reacción del PSII basándose en la estructura del centro de reacción bacteriano, e indican el detalle de que dos residuos de His situadas en la superficie de la proteína se encuentran orientados hacia la bicapa lipídica, lo cual es muy extraño en residuos cargados. Esto indujo a los autores a proponer a estas dos His como posibles ligandos de las dos Chl adicionales del PSII respecto al centro de reacción bacteriano. Estas dos Chl podrían facilitar la transferencia de la energía de excitación entre la antena interna, CP47 y CP43, y el complejo D1-D2-Cyt b559.

Algunas diferencias se pueden observar entre la deconvolución presentada en esta Memoria y los datos comunicados por otros autores (Braun et al., 1990; van Kan et al., 1990). Mientras que Braun et al., 1990, sólo resuelven dos componentes mayoritarios bajo la transición de la banda Qy, con máximos a 679 y 672 nm, junto con un componente menor a 669 nm, van Kan et al., 1990, resuelve ocho bandas dentro de la transición Qy asignando las distintas gaussianas a los diferentes pigmentos dentro de la banda. En contraste a lo publicado por los últimos autores, en nuestro caso no se encontró una pequeño componente en el rojo lejano a 683-685 nm atribuida a la banda excitónica de menor energía del supuesto dímero P680. Algunos componentes alrededor de esa longitud de onda han sido también resueltos usando espectroscopia de "hole burning" por Jankowiak, Small, Picorel, y Seibert (datos no publicados) pero podrían

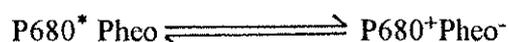
estar originados en una pequeña contaminación producida por la antena interna CP47. Este punto de vista se apoya por el hecho de que la intensidad de esta banda varía de unas preparaciones a otras (van Kan et al., 1990).

La asignación de una gaussiana central a Pheo no está de acuerdo con la interpretación de los datos de "hole burning" (Tang et al., 1990) y los espectros diferenciales de luz menos oscuridad realizados en el complejo D1-D2-Cyt b559 por algunos autores (Namba & Satoh, 1987; Barber et al., 1987) o recientes experimentos de ODMR (van der Voos et al., 1992) que sugieren la presencia de la banda de absorción de la Pheo fotoquímicamente activa a 681-682 nm. Sin embargo estas discrepancias pueden ser explicadas por una decoloración de una banda de Pheo a hacia 676 nm junto con un desplazamiento electrocrómico y un ensanchamiento de la banda alrededor de 680. Recientemente, experimentos realizados mediante espectroscopia de absorción en tiempo resuelto (femtosegundos) no han podido resolver los cambios espectrales que se dan en dicha región espectral (Hastings et al., 1992). Sin embargo, sólomente con nuestros datos no podemos descartar completamente la presencia de una banda producida por Pheo bajo la banda de P680, aunque en caso de existir dicha banda debería tener un coeficiente de extinción mucho menor que éste.

4.4.- Comparación del proceso de separación de cargas en ambas formas del complejo D1-D2-Cyt b559 de *B. vulgaris*

La actividad fotoquímica de los dos tipos de complejos D1-D2-Cyt b559, RCIIa y RCIIb, ha sido estudiada usando espectroscopia de absorción y fluorescencia resueltas en el tiempo, y transporte electrónico secundario. Ambas preparaciones mostraron los mismos componentes tanto en fluorescencia como en absorción en tiempo resuelto y mantuvieron actividades comparables a pesar de su diferente contenido de cofactores. Los rendimientos de la recombinación del par de radicales $P680^+Pheo^-$ fué muy parecida en ambas preparaciones en todos los experimentos. En consecuencia se puede concluir que las dos Chl accesorias y el β -caroteno liberados de la matriz proteica en el proceso de purificación de RCIIb no son fundamentales para el proceso de separación de cargas. El hecho de que el complejo RCIIb contenga 4 Chl y 1 β -caroteno por 2 Pheo nos da una correspondencia directa con el centro de reacción bacteriano (Straley et al., 1973; van der Rest et al., 1974; Deisenhofer et al., 1985).

Sin embargo una diferencia clara entre RCIIa y RCIIb ha sido detectada cuando el rendimiento cuántico absoluto de la recombinación de cargas fué medido mediante espectroscopia de fluorescencia en tiempo resuelto (tabla 3.17). El nivel de recombinación de cargas medido por fluorescencia es demasiado bajo para ser simplemente debido a una pérdida de actividad (tabla 3.17). Esta observación indica un desplazamiento en el equilibrio de la reacción:



hacia la formación del par de radicales en RCIIb. Este hecho es corroborado por el cálculo de las constantes de equilibrio y la ΔG de dicha reacción en ambos tipos de centros de reacción a 277 K (sección de resultados) y es consistente con una reducción en el número de moléculas de Chl asociadas al centro de reacción (en RCIIb hay solamente dos Chl accesorias funcionales para la absorción de energía y su transferencia a P680). Mediante mutagénesis dirigida en el centro de reacción bacteriano se ha obtenido un par especial compuesto por un heterodímero de Bchl y

Bpheo (Kirmaier et al., 1991). Así mismo, se han intentado igualar las regiones de las proteínas L y M en las que descansa el dímero (Taguchi et al., 1992; Stocker et al., 1992) y se han realizado mutaciones en los aminoácidos cercanos al dímero y a las Bchl monoméricas (Williams et al., 1992). Además se han llevado a cabo modificaciones químicas de las Bchls monoméricas (Finkle et al., 1992). Todas estas modificaciones se han realizado en su mayoría en *Rhodobacter capsulatus* aunque también se está empezando a trabajar en *Rb. sphaeroides* pues no se conoce la estructura tridimensional del centro de reacción de *Rb. capsulatus*. Ninguna de estas modificaciones ha conseguido variar la constante de equilibrio de la reacción de separación de cargas (Montoya et al., enviado a Biochem. Biophys. Acta).

A través de estos estudios se ha notado que la forma RCIIb fue más susceptible a la inactivación por luz que la forma RCIIa del complejo D1-D2-Cyt b559. Esta mayor sensibilidad a la fotodesactivación de RCIIb comparado con RCIIa es consistente con los recientes resultados obtenidos por Telfer et al., 1991, en los que una de las moléculas de β -caroteno y alguna Chl accesoria (en partículas D1-d2-Cyt b559 con el mismo contenido en pigmentos que la forma RCIIa) pueden ser fácilmente oxidados por P680+ y ser irreversiblemente decoloradas. La ausencia de alguno o ambos pigmentos provocarían una inactivación por falta de protección frente a altas intensidades de luz.

La actividad de transporte electrónico secundario del complejo RCIIb desde un donador a un aceptor artificial fué alrededor de un 84 % respecto a RCIIa. Este dato es razonable si tenemos en cuenta que la preparación ha sido tratada durante un largo tiempo con TX-100 para su obtención. Además la pérdida de pigmentos también podría afectar la estabilidad de RCIIb.

Considerando los resultados de esta parte de la memoria junto con los del punto 4.3, parece que algunos de los cromóforos asociados con el centro de reacción del PSII no son esenciales para la actividad fotoquímica de esta partícula. Estos cromóforos (2 Chl y 1 β -caroteno) corresponden a los que son liberados de la matriz proteica durante la purificación del complejo RCIIb y podrían corresponder a los que no tienen homólogos en el centro de reacción

bacteriano. En cualquier caso se ha demostrado que se puede aislar un centro de reacción del PSII fotoquímicamente activo con un contenido de pigmentos similar al del centro de reacción bacteriano (Straley et al., 1973; Deisenhofer et al., 1985). Consecuentemente, la presencia de 4 Chl, 1 β -caroteno y 2 Pheo es suficiente para soportar un proceso fotoquímico completo en el centro de reacción del PSII, como en el caso de bacterias. La función exacta de los pigmentos perdidos de la matriz proteica queda como una cuestión a resolver. Si su función es proteger frente a la inactivación y/o facilitar la transferencia de energía entre las antenas intrínsecas y el centro de reacción está aún sin determinar.

4.5.- Desnaturalización y renaturalización del complejo D1-D2-Cyt b559 inducida por detergentes

Debido a las propiedades inherentes de las proteínas de membrana existe un importante vacío en el conocimiento de los procesos de desnaturalización y renaturalización de este tipo de proteínas (Popot et al., 1987; Huang et al., 1981). Un agente común para desestabilizar este tipo de proteínas es la acción del detergente necesario para su solubilización y purificación. Es bien conocida la capacidad de los detergentes para dispersar lípidos y para la solubilización de membranas y proteínas. Normalmente se opta por el uso de detergentes con una CMC relativamente alta en la solubilización de la membrana (Helenius & Simons, 1985) para una vez aislada la proteína pasarla a un detergente con una CMC menor para mantenerla en su estado nativo. Este principio parece seguirse en el caso de los dos detergentes usados en este trabajo. La CMC del TX-100, un detergente ideal para la solubilización de membranas, es 2 veces superior a la del DM, un detergente más "suave". El efecto del detergente parece ser el resultado de la interacción directa de la parte hidrófoba de éste con la zona de la proteína bañada por la membrana.

El efecto negativo del TX-100 sobre el complejo D1-D2-Cyt b559 descrito en esta memoria está de acuerdo con los datos de otros autores (Seibert et al., 1988; Tetenkin et al., 1989; Tang et al., 1991). Sin embargo nuestros resultados muestran que la desnaturalización del complejo por el detergente puede ser reversible bajo ciertas condiciones. Esta reversibilidad se ha comprobado tanto por las características espectroscópicas del complejo ascritas a los pigmentos como por la estructura secundaria de la proteína y a la capacidad para catalizar el transporte electrónico.

Tres grupos principales de pigmentos han sido postulados bajo la banda de menor energía del complejo D1-D2-Cyt b559 (van Kan et al., 1990; Braun et al., 1990; Montoya et al., 1993). El primer grupo con un máximo a 679-680 nm corresponderían al P680 o donador primario; el grupo II con máximo alrededor de 670 nm formado por las Chl monoméricas; y el

grupo III a 672-676 nm sería producido por las dos Pheo. La incubación con TX-100 condujo a una progresiva degradación del componente a P680 mientras que el componente a 670 nm incrementó su proporción en el espectro. Este fenómeno indujo un desplazamiento hacia el azul de la banda de absorción en el rojo, conjuntamente con un incremento del rendimiento de fluorescencia y un desplazamiento hacia el azul del máximo, una disminución de la actividad dicroica de la banda de absorción en el rojo y una reducción de la actividad de transporte electrónico del complejo D1-D2-Cyt b559. Se puede pensar por tanto que la pérdida de P680 da lugar a todos estos fenómenos. La sustitución de TX-100 por DM en el complejo D1-D2-Cyt b559 deteriorado (máximo en la banda del rojo a 671.5 nm) produjo una recuperación de las propiedades espectroscópicas originales así como de la actividad fotoquímica. Consecuentemente, una reorganización del complejo pigmento-proteína ha tenido lugar tras la sustitución del anfifilo.

La reorganización del complejo pigmento-proteína puede explicar los datos de fluorescencia. En el complejo D1-D2-Cyt b559 nativo en el que se da una eficiente transmisión de energía entre la Chl accesoria y P680, el máximo de fluorescencia se da a 683-685 nm. Cuando P680 va siendo gradualmente destruido por la presencia de TX-100 la transferencia de energía no puede darse entre la Chl accesoria y P680, apareciendo un aumento en el rendimiento cuántico de fluorescencia. La desorganización del complejo también puede explicar el descenso de la actividad óptica tras la incubación con TX-100. El doblete de CD de la banda de menor energía se debe principalmente a P680 (Newell et al., 1991), lo que significa que los cromóforos responsables de la señal de CD de la banda en el rojo del complejo D1-D2-Cyt b559 están perdiendo su orientación específica durante la incubación con TX-100. Esta orientación parece recuperarse en un grado tal que permite que el complejo vuelva a ser activo en presencia de DM (ver Tabla 3.18). En esta tabla 3.18 se puede apreciar cómo el descenso en la señal de CD se ve acompañada por un descenso similar en la actividad de transporte electrónico secundario, lo que demuestra que la mayoría de la señal de CD de dicha banda es producida por P680 y no por interacciones excitónicas entre todos los cromóforos dentro del centro de reacción (Montoya et al., enviado a J Biol. Chem).

Los resultados obtenidos mediante espectroscopia de CD en la región del ultravioleta lejano indican que se da una variación en la estructura de la matriz proteica del complejo durante la incubación con TX-100, indicando una modificación de la estructura secundaria en estas condiciones (Fig 3.49). A juzgar por los datos dicha modificación no debe de ser muy amplia, lo que es consistente con el espectro de fluorescencia de Trp del complejo proteico el cual no varía significativamente en presencia de TX-100 con respecto al complejo nativo. El hecho de que el espectro de fluorescencia de Trp en las dos muestras (nativa y desnaturalizada) sea similar podría indicar que el proceso de degradación del complejo inducido por TX-100 no fué muy extensivo y/o que los residuos de Trp no se encuentran presentes en la zona de la proteína donde se produce el cambio. Por otra parte el espectro de fluorescencia de Trp en presencia de DM mostró ciertas diferencias con respecto al del complejo solubilizado en el anterior detergente, las cuales pueden ser ascritas a las distintas propiedades fisico-químicas de ambos detergentes. El hecho de que P680 sea fuertemente degradado sin que se produzca una variación en la fluorescencia de Trp sugiere la ausencia de dicho residuo en el dominio de la proteína que rodea a P680. Modelos de estructura secundaria (Svensson et al., 1990) y terciaria (Ruffle et al., 1992) de la organización de las proteínas D1 y D2 indican que este es el caso.

¿Cómo pequeños cambios en la estructura de la proteína pueden inducir un efecto tan marcado en el componente de 680 nm sin afectar al resto de los cromóforos del complejo D1-D2-Cyt b559 ?. Ello puede explicarse considerando una estructura dimérica para P680 en su estado basal con un cierto grado de interacciones excitónicas. Este dímero podría interaccionar también con algunos aminoácidos del dominio proteico en el cual se asienta. Pequeñas modificaciones en este dominio conducirían a una pérdida de la orientación y de la distancia entre los dos cromóforos, lo que desembocaría en una destrucción de la estructura dimérica y por tanto la señal de CD en el rojo. La destrucción de la estructura dimérica daría lugar a Chl monoméricas y por consiguiente al incremento del componente de 670 nm en el espectro. Por otra parte, las propiedades de la Chl monomérica (componente a 670 nm) y de la Pheo no parecen

verse muy afectadas por el TX-100 a juzgar por la ausencia de alteraciones en sus propiedades espectroscópicas, debido probablemente a su carácter monomérico.

4.6.- Estudio del dominio aceptor de electrones del PSII mediante el uso de distintos inhibidores del transporte electrónico y la caracterización de la inhibición por Cu(II)

El estudio realizado sobre el efecto del Cu(II) en la evolución de oxígeno en membranas de *B. vulgaris* indica que este catión a concentraciones del orden de μM inhibió fuertemente la capacidad de desprendimiento de oxígeno tanto en presencia de DCBQ como de $\text{Fe}_3\text{K}(\text{CN})_6$ como aceptores de electrones. Contrariamente no se observó ninguna inhibición en presencia de SiMo como aceptor de electrones (Yruela et al., 1991). Estos datos descartan que la inhibición por Cu(II) tenga lugar en el sistema de fotólisis del agua (Samson et al., 1988) o en el dominio de la separación de cargas (Hsu & Lee, 1988). Nuestros resultados sitúan al lado reductor del PSII como sitio de la inhibición del transporte electrónico por este ión metálico.

El aceptor de electrones artificial DCBQ toma electrones del "nicho" de Q_b , pero la localización precisa del sitio del cual toma electrones el $\text{Fe}_3\text{K}(\text{CN})_6$ no está todavía claro, sin embargo se piensa que este sitio debe de estar entre la zona de Q_a y Q_b (Diner & Petrouleas, 1987; Drechler & Newmann, 1989). Por otra parte diferentes dominios han sido asignados como donadores de electrones del SiMo, por ejemplo la Pheo a fotoquímicamente activa (Telfer et al., 1990; McTavish et al., 1989), Q_a (Takahashi et al., 1989) o Q_b (Graan, 1986). Debido a la incertidumbre sobre el lugar en el cual el SiMo toma electrones no es posible localizar el sitio de inhibición del Cu(II) usando solamente estos aceptores de electrones y viendo el efecto de este catión sobre la evolución de oxígeno. Aunque la presencia de Fe(III) previno parcialmente el efecto de la inhibición por Cu(II), los espectros de EPR realizados en este tipo de muestras han demostrado que el efecto inhibitorio del Cu(II) no es producido por una sustitución del hierro no hemínico del centro de reacción del PSII por este ión metálico, pues la señal de $g=8.1$ asignada a este hierro se mantiene en muestras inhibidas por Cu(II).

Estos resultados demuestran que la inhibición por Cu(II) se da a nivel del lado reductor del PSII, pero su localización precisa no se puede asegurar, debido a la ambigüedad existente sobre los sitios de acción de los aceptores de electrones. Para resolver este problema se

realizó la comparación de las inhibiciones de DCMU y o-fenantrolina (inhibidores conocidos que actúan sobre Q_b y el hierro no hemínico, respectivamente) con la producida por Cu(II) en tilacoides control y en tilacoides tripsinizados, usando DCBQ, $Fe_3K(CN)_6$ o SiMo como aceptores artificiales de electrones. La razón de usar tilacoides en vez de membranas para esta parte del trabajo es debido a las diferentes características topológicas de estas dos preparaciones. Las membranas del PSII son regiones de doble membrana que provienen de las regiones apiladas de los grana (Dunahay et al., 1984) tras la solubilización de las zonas no apiladas por TX-100. Este tipo de estructuras mantienen las proteínas extrínsecas responsables de la protección del complejo tetramérico del Mn, pero se encuentran expuestas al medio, mientras que la zona reductora del PSII se encuentra entre el espacio de las dos membranas apiladas. En contraste los tilacoides son vesículas cerradas donde el sistema responsable de la fotólisis del agua se encuentra en el interior de la vesícula, fuera por lo tanto del alcance de la proteasa, y el dominio reductor del PSII se encuentra en contacto con el medio. Consecuentemente cualquier modificación en la actividad de evolución de oxígeno viene dado por la digestión proteica realizada por la tripsina en el lado reductor del PSII, el cual está expuesto a la superficie.

La tripsinización de los tilacoides redujo su capacidad de desprendimiento de oxígeno cuando se usó DCBQ como aceptor de electrones, pero permaneció prácticamente constante en presencia de $Fe_3K(CN)_6$ o SiMo. La proteólisis de los tilacoides también redujo drásticamente la eficacia inhibitoria del DCMU, mientras que en estas mismas vesículas tripsinizadas la o-fenantrolina y Cu(II) fueron incluso más potentes inhibidores que en las no digeridas. De estos datos se deduce que el tratamiento de estas vesículas con tripsina destruye o modifica significativamente el "nicho" de Q_b y la zona de unión del DCBQ pero sin distorsionar el lugar de unión del Cu(II) o de la o-fenantrolina. Ello prueba que los sitios de unión de estos dos inhibidores son diferentes al del DCMU y por tanto no están en Q_b . Nótese que el DCMU inhibe en gran medida el flujo de electrones hacia $Fe_3K(CN)_6$ en tilacoides no tripsinizados, en contraste con los tilacoides tripsinizados donde la reducción de $Fe_3K(CN)_6$ apenas se afectó por DCMU.

De esta manera en el modelo que nosotros proponemos para la inhibición por Cu(II) del transporte electrónico del PSII y para los sitios de acción de los aceptores de

electrones, el DCBQ captaría electrones del "nicho" de Q_b , el $Fe_3K(CN)_6$ en algún lugar entre la Pheo a fotoquímicamente activa y Q_b y el SiMo de la Pheo a reducida. Consecuentemente la inhibición por Cu(II) debe tener lugar en algún lugar entre Pheo a y Q_b , es decir al nivel del dominio Pheo- Q_a -Fe del centro de reacción del PSII. Esta hipótesis también está apoyada por el hecho de que los iones metálicos y especialmente el Cu(II) se encuentran ligados en proteínas por grupos atómicos hidrofílicos (O, N), muy abundantes en ese dominio de la proteína.

5.- CONCLUSIONES

El aislamiento de membranas del PSII con alto rendimiento y pureza nos ha permitido usarlas como material de partida para casi todas las purificaciones descritas en esta memoria. Gracias a esta fracción de membrana conseguimos partir de un material altamente enriquecido en PSII. La purificación de OECC nos ha facilitado el aislamiento de las proteínas de la antena intrínseca, aparte de ofrecernos la posibilidad de realizar estudios con la partícula mínima de que conserva todas las funciones más características del PSII: separación de cargas, reducción de los aceptores de electrones y fotólisis del agua. El método de purificación de las proteínas CP43 y CP47 de la antena intrínseca posee la ventaja de purificar ambos polipéptidos en un único paso cromatográfico con rendimientos suficientes para posteriores caracterizaciones bioquímicas y espectroscópicas. El método de aislamiento del complejo D1-D2-Cyt b559 de *B. vulgaris* seguido durante el trabajo de esta memoria nos ha facilitado la obtención de dos tipos de partículas de centro de reacción del PSII, pero para cierto tipo de estudios en los que se necesita gran cantidad de material su rendimiento debe de ser aumentado.

Se han obtenido dos complejos D1-D2-Cyt b559, RCIIa y RCIIb, con diferente contenido en pigmentos. Nuestros datos muestran que se debe de llevar a cabo un riguroso control en la purificación de esta cromoproteína para conseguir preparaciones homogéneas de la misma. Pensamos que la estequiometría de RCIIa corresponde al complejo nativo PSII RC. Sin embargo, el reducido número de pigmentos de RCIIb es muy favorable para realizar estudios espectroscópicos sobre los procesos de transferencia de energía, separación de cargas y caracterización de los cromóforos esenciales en el funcionamiento del complejo D1-D2-Cyt b559.

La caracterización espectroscópica de ambos complejos ha revelado la existencia de tres bandas principales en la transición Qy, con máximos a 680, 672 y 669-670 asignadas a P680, Pheo a y Chl a accesoria, respectivamente. La cuantificación relativa de la superficie bajo las bandas teniendo en cuenta los momentos dipolares de los cromóforos nos ha permitido asignar 2 Chl a al P680, 2 Pheo a a la banda de 672 nm y 4 Chl a accesorias.

El estudio de la separación de cargas en RCIIa y RCIIb ha puesto de manifiesto la diferencia de sus K_{eq} y ΔG de este proceso entre ambas preparaciones. Además se ha comprobado que RCIIb es capaz de realizar el proceso fotoquímico con una eficiencia muy parecida a RCIIa aunque se mostró más inestable a la exposición al láser de excitación, probablemente por su menor contenido en β -caroteno y Chl a.

Se ha demostrado que en ciertas condiciones experimentales es posible desnaturalizar y renaturalizar el complejo D1-D2-Cyt b559. La desnaturalización indujo una serie de modificaciones espectroscópicas y la inactivación del complejo como consecuencia de la destrucción de P680, debido probablemente a un ligero pero significativo cambio conformacional de la cromoproteína. El intercambio del detergente TX-100 por DM revirtió todas las características espectroscópicas y la actividad paralelamente a la reaparición de P680. Estos datos han sido explicados asumiendo una estructura dimérica para el P680, de acuerdo con las conclusiones derivadas de la caracterización espectroscópica del complejo. La metodología desarrollada en este apartado del trabajo puede extrapolarse al estudio de los procesos de desnaturalización y renaturalización en otras cromoproteínas de membrana.

La inhibición por Cu(II) se da en el lado aceptor de electrones en el dominio Pheo a- Qa-Fe del PSII. El hallazgo de un inhibidor de este dominio del PSII RC abre las puertas a una mejor caracterización de los procesos de oxido-reducción que tienen lugar en esta zona esencial del PSII RC.

6.- BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Akabori, K., Tsukamoto, H., Tsukihara, J., Nagatsuka, T., Motokawa, O. & Toyoshima, Y. (1988) Disintegration 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.
- Albrecht, M.G., & Creighton, J.A. (1977) Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. J. Am. Chem. Soc., 99, 5215-5217.
- Allen, J. F. (1983). Antenna systems in photosynthetic organisms. Trends. Biochem. Sci., 8, 369-371.
- Allen, J. F. (1992a) How does protein phosphorylation regulate photosynthesis? Trends. Biochem. Sci., 17, 12-17.
- Allen, J. F. (1992b) Light-harvesting LHCII of higher plants. Biochim. Biophys. Acta. 1098, 275-335.
- 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.
- Appleby, C. A. (1969) Electron transport systems of *Rhizobium Japonicum* II. *Rhizobium* haemoglobin, cytochromes and oxidases in free-living (cultured) cells. Biochim. Biophys. Acta, 172, 88-105.
- Arnon (1949) Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidases in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24, 1-15.
- Arnon, D. J. & Tang, G. M. S. (1988) Cytochrome b559 and proton conductance in oxygenic photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 9524-9528.
- Arnon, D. I. & Barber, J. (1990) Photoreduction of NADP by isolated reaction centres of photosystem II: Requirement for plastocyanin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 5930-5934.
- Babcock, G. T., Widger, W. R., Cramer, W. A., Oertling, W. A. & Metz, J. G. (1985) Axial ligands of chloroplast cytochrome b-559: Identification and requirement for a heme-cross-linked polypeptide structure. Biochemistry 24, 3638-3645.
- 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. (1976) Topics in Photosynthesis. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- 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.

- 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. (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-environmental photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. EPR and electron transport properties. FEBS Lett. **134**, 231-234.
- Birks, J. B. (1970) Photophysics of Aromatic Molecules. Wiley-Interscience.
- Booth, P. J., Crystall, B., Giorgi, L. B., Barber, J., Klug, D. R. & G., P. (1990) Thermodynamic properties of D1-D2-Cytochrome b-559 reaction centres investigated by time resolved fluorescence measurements. Biochim. Biophys. Acta, **1016** 141-152.
- Booth, P. J., Crystall, B., Ahmad, I., Barber, J., Porter, G. & Klug, D. R. (1991) Observation of multiple radical pair states in photosystem II reaction centres. Biochemistry **30**, 7573-7586.
- Braun, P., Greenberg, B. M. & Scherz, A. (1990) D1-D2-Cytochrome b559 complex from the aquatic plant *Spirodela 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. (1990) The structure and function of CPaI and CPaII in photosystem II. Photosynth. Res. **24**, 1-13.
- Brudvig, G., Beck, W. & Paula, J. D. (1989) Mechanism of photosynthetic water oxidation. Annu. Rev. Biophys. Biochem. **18**, 25-46.
- 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. (1992a) Reevaluation of the stoichiometry of Cytochrome b559 in photosystem II and thylakoid membranes. Biochemistry, **31** 11441-11448.
- Buser, C. A., Diner, B. A. & Brudvig, G. W. (1992b) Photooxidation of cytochrome b559 in oxygen evolving photosystem II. Biochemistry, **31** 11449-11459.
- Butler, P. J. G. & Kulbrandt, 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. L. & Green, B. R. (1980) Fractionation of thylakoid membranes with the nonionic detergent octyl- β -D-glucopyranoside. Plant Physiol. **66**, 428-432.
- Camm, E. L. & Green, B. R. (1989) The chlorophyll a/b complex CP29 is associated with the photosystem II reaction centre 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, Current research in Photosynthesis In M. Baltcheffsky (Ed.) pp. 359-363. Estocolmo: Kluwer.
- Chapman, D. J., Gounaris, K. & Barber, J. (1988) Electron-transport properties of the isolated D1-D2-Cytochrome b559 photosystem II reaction centre. Biochim. Biophys. Acta **933**, 423-431.
- 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.
- Clayton, R. K. (1965) Reaction centers of photosynthetic bacteria. Science **149**, 1346-1347.
- Coleman, W. 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. Annu. Rev. Biophys. Chem. **19**, 333-367.
- Crystall, B., Booth P.J., Klug, D.R., Barber, J. and Porter, G. (1989) Resolution of a long lived fluorescence component from D1-D2-Cyt b559 reaction centres. FEBS Lett. **249**, 75-78
- 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.
- de las Rivas, J., Abadía, A. & Abadía, J. (1989) A new reversed phase-HPLC method resolving all major higher plant photosynthetic pigments. Plant. Physiol. **91**, 191-192.
- de Vitry, C., Diner, B. A. & Lemoine, Y. (1987) Chemical composition of photosystem II reaction centers (PSII), phosphorylation of PSII polypeptides. Progress in photosynthesis research In J. Biggins (Ed.) pp. 105-108, Providence, Rhode Island: Matinus Nijhoff.
- de Vitry, C., Olive, J., Drapier, M., Recouvreur, M. & Wollman, F. A. (1989) Post-translational events leading to the assembly of PSII protein complex: a study using photosynthetic mutants from *Clamydomonas reinhardtii*. J. Cell. Biol. **109**, 991-1006.
- de Vitry, C., Diner, B. A. & Popot, J. L. (1991) Photosystem II particles from *Clamydomonas reinhardtii*. Purification, molecular weight, small subunit composition and protein phosphorylation. J. Biol. Chem. **266**, 16614-16621.
- Debus, R. J., Feher, G. & Okamura, M. Y. (1986) Iron depleted reaction centers from *Rb. sphaeroides* R-26: characterization and reconstitution with Fe²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. 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 D1 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 *Rhodospseudomonas viridis* at 3A resolution. Nature, **318**, 618-623.

Deisenhofer, J. & Michel, H. (1989) The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. EMBO J. **8**, 2149-2169.

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-dimensional crystals of the CP47-D1-D2-Cyt b59 complex of Photosystem II. Biochemistry **29**, 3220-3225.

Delepelaire, P. & Chua, N. H. (1979) Lithium dodecyl sulfate/polyacrilamide gel electrophoresis of thylakoid membranes at 4 °C: Characterizations of two additional Chl a-protein complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 111-115.

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.

Diner, B. A., & Petrouleas, V. (1987) Q400, the non heme iron of the photosystem II iron-quinone complex. A spectroscopic probe of quinone and inhibitor binding to the reaction center. Biochim. Biophys. Acta **895**, 107-125.

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.

Drechsler, Z. & Neumann, J. (1989) Evidence of two types of electron transfer process through photosystem II. Photosynth. Res. **21**, 187-195.

Dunahay, T. G., Stahelin, L. A., Seibert, M., Ogilvie, P. D. & Berg, S. P. (1984) Structural, biochemical and biophysical characterization of four oxygen envolving photosystem II preparations from spinach. Biochim. Biophys. Acta **764**, 179-193.

Durrant, J. R., Giorgi, L. B., Barber, J., Klug, D. R., & Porter, G. (1990) Characterization of triplet states in isolated Photosystem II reaction centres: oxygen quenching as a mechanism for photodamage. Biochim. Biophys. Acta **1017**, 167-175.

Duysens, L. N. M., Amesz, J. & Kamp, B. M. (1961) Two photochemical systems in photosynthesis. Nature **190**, 510-511.

- Dzelzkains, V. A. & Bogorad, L. (1988) Spectral properties and composition of reaction center and ancillary polypeptide complexes of photosystem II deficient mutant of *Synechocystis* 6803. Plant. Physiol. **90**, 617-623.
- Eaton-Rye, J. J. & Govindjee (1988) Electron transfer through the quinone acceptor complex of photosystem II after one or two actinic flashes in bicarbonate-depleted spinach thylakoid membranes. Biochim. Biophys. Acta **935**, 248-257.
- 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 photosystem II membrane preparations. Protein stoichiometry and stabilization of oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta **1060**, 224-229.
- Finkele, U., Lauterwasser, C., Struck, A., Scheer, H., & Zinth, W. (1992) Primary electron transfer kinetics in bacterial reaction centers with modified bacteriochlorophylls at the monomeric sites Ba,b. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 9514-9518.
- 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.
- Ford, R. C., Picot, D. & Garavito, R. M. (1987) Crystallization of the photosystem I reaction center. EMBO J. **6**, 1581.
- Foster, T. (1965) Delocalized excitation and excitation transfer Academic Press. NY.
- Garewall, H.S. & Wassermann A.R. (1974) Triton X-100-4m urea as an extraction medium for membrane proteins. Purification of chloroplast cytochrome b559. Biochemistry **13**, 4063-4071
- Ghanotakis, D. F. & Yocum, C. F. (1986) Purification and properties of an oxygen evolving reaction center complex from photosystem II membranes. FEBS Lett. **197**, 244-248.
- 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 the D1-D2-Cytochrome b559 complex. Biochim. Biophys. Acta **974**, 44-53.
- 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/ Cytochrome b559 reaction center complex of photosystem two Isolated by two 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.
- Govindjee, van de Ven, M., Preston, C., Seibert, M. & Gratton, E. (1990) Chlorophyll a fluorescence lifetime distributions in open and closed reaction center preparations. Biochim. Biophys. Acta. **1015**, 173-179
- Graan, T. (1986) The interaction of silicomolibdate with the photosystem II herbicide binding site. FEBS Lett., **206**, 9-12.
- Hall, D. O. & Rao, K. K. (1981) Photosynthesis, 3rd edition. Ed. Edward Arnold.

- Hallick, R. B. (1989) The 33 kDa extrinsic protein is encoded by the nuclear gene *psbO*. Plant Mol. Biol. Report., 7 266-275.
- Hastings, G., J.R. Durrant, Barber, J., Porter, G. & Klug, D. R. (1992) Observation of pheophytin reduction in photosystem II reaction centres using femtosecond transient absorption spectroscopy. Biochemistry 31, 7638-7647.
- 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.
- Helenius, A. & Simons, K. (1974) Solubilization of Membranes by Detergents. Biochim. Biophys. Acta. 415, 29-79.
- Henderson, R. & Unwin, P.N.T. (1975) Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. Nature 257, 28-30.
- Hipkins, M. F. & Baker, N. (1984) Photosynthesis Energy Transduction. A Practical Approach. Oxford University Press.
- Hirschberg, J. & McIntosh, L. (1983) Molecular basis of herbicide resistance in *Amarantus hybridus*. Science 222, 483-491.
- Holzappel, W., Finklele, U., Kaiser, W., Oesterhelt, D. & Sheer, H. (1990) Initial electron transfer in the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5168-5172.
- Hsu, B.-D. & Lee, J.-Y. (1988) Toxic effects of copper on photosystem II of spinach chloroplasts. Plant Physiol. 87, 116-119.
- Huang, K.-S., Bayley, H., Liao, M.J., London, E. & Khorana G.H. (1981) Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments. J. Biol. Chem. 256, 3802-3809.
- Kan, K. S. & Thornber, J. P. (1976) The light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant. Physiol. 57, 47-52.
- Katz, J. J., Shipman, L. L., Cotton, T. M. & Janson, T. R. C. (1978) The Porphyrins. Dophin, D., Eds.
- 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. Photosyn. Res. 13, 225-260.
- Kirmaier, C. & Holten, D. (1991) An assessment of the mechanism of initial electron transfer in bacterial reaction centers. Science 30, 609-613.
- Knapp, E. W., Fischer, S. F., Zinth, W., Sander, M., Kaiser, W., Deisenhofer, J. & H., M. (1985) Analysis of optical spectra from single crystals of *Rhodospseudomonas viridis* reaction centers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8463-8467.

- Knox, R. S. (1986) Trapping events in light-harvesting assemblies(1st ed.) Springer-Verlag.
- Knox, R. S. (1977) Photosynthetic efficiency and exciton transfer and trapping. Topics in Photosynthesis. Elsevier. Amsterdam, the Netherlands.
- Knutson, J. R., Beecham, J. M. & Brand, L. (1983) Exponential correlation for kinetic analysis. Chem. Phys. Lett. **102**, 501-507.
- Kobayashi, M., Maeda, H., Watanabe, T., Nakane, H. & Satoh, K. (1990) Chlorophyll a and β -carotene content in the D1-D2-Cyt b559 reaction center complex from spinach. FEBS Lett. **260**, 138-140.
- 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 system I of photosynthesis at 6Å resolution Nature **361**, 326-331.
- Kuhlbrandt, W. (1984) Three-dimensional structure of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein Structure. Nature **307**, 478-480.
- Kuhlbrandt, W. & Wang, D.-N. (1991) Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. Nature **350**, 130-134.
- Kuhlbrandt, W. (1992) Two-dimensional crystallization of membrane proteins. Q. Rev. Biophys., **25**, 1-49.
- Kuwabara, T., Miyao, M., Murata, T. & Murata, N. (1985) The function of the 33 kDa protein in the photosynthetic oxygen-evolution system studied by reconstitution experiments. Biochim. Biophys. Acta., **806**, 283-289.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685.
- 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.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) Proteins measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275.
- Mardquardt, D. W. (1963) A mathematical algorithm for exponential analysis. J. Soc. Ind. Appl. Math. **11**, 431-441.
- Markwell, M., Haas, S. M., Tolbert, N. E. & Bieber, L. L. (1981) Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. Meth. Enzymol **72**, 293-303.
- 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 an 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., Rogner, M., Brudvig, G. W., and, & Diner, B. A. (1989) Directed alteration of the D1 polypeptide of 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. (1991) Crystallization of membrane proteins (1st ed.). CRC Press. Boca Raton, FL.

Michel, H. & Deisenhofer, J. (1988) Relevance of the photosynthetic reaction centre from purple bacteria to the structure of photosystem II. Biochemistry 27, 1-7.

Mimuro, M., Yamazaki, I., Itoh, S., Tamai, N. & Satoh, K. (1988) Dynamic fluorescence properties of D1-D2-Cyt b559 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.

Miyao, M. & Murata, N. (1984) Role of the 33 kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen evolution system and its replacement by chloride ions. FEBS Lett. 170, 350-354.

Miyazaki, A., Shina, T., Toyoshima, Y., Gounaris K. & Barber, J. (1989) Stoichiometry of cytochrome b559 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 b559 complex from the higher plant *Beta vulgaris* L. FEBS Lett. 283 255-258.

Montoya, G., Cases, R., Yruela, I. & Picorel, R. (1993) Spectroscopical characterization of two forms of the D1-D2-Cyt b559 complex from sugar beet. Photochem. Photobiol. Aceptado

Montoya, G., de las Rivas, J., Booth, P.J., Giorgi, L., Porter, G., Barber, J. & Picorel, R. (1993) A comparison of the photochemical activity of two forms of the D1-D2-cyt b559 complex from sugar beet. Enviado para su publicación a Biochim. Biophys. Acta.

Montoya, G., Cases, R. Rodríguez R. & Picorel, R. (1993) Detergent-induced changes on the D1-D2-Cyt b559 complex. Implications in protein-pigment interactions. Enviado para su publicación a J. Biol. Chem.

Murata, N., Higashi, S. I. & Y., F. (1990) Glycerolipids in various preparations of PSII from spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 1019, 261-268.

- Nakatani, H., Y., Ke, B., Dolan, E. & Arntzen, C. J. (1984) Identity of the photosystem II reaction centre polypeptide. Biochim. Biophys. Acta **765**, 380-387.
- Nanba, O. & Satoh, K. (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D1 and D2 polypeptides and cytochrome b559. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84** 109-112.
- Nelson, N., Drechsler, Z. & Neumann, J. (1970) Photophosphorylation in digitonin subchloroplast particles. Absence of a light-induced pH shift. J. Biol. Chem. **245**, 143-151.
- Newell, W. R., Van Amerongen, H., Barber, J. & Van Grondelle, R. (1991) Spectroscopy characterization of the reaction centre of photosystem II using polarised light : Evidence for β -carotene excitons in PSII reaction centres. Biochim. Biophys. Acta **1057**, 232-238.
- Nicholls, D. G. (1987) Bioenergetica. Introduccion a la teoria quimiosmótica. Editorial Reverte.
- Nixon, P. J., Chisholm, D. & Diner, B. A. (1991) Plant protein engineering. Ed. Edward Arnold.
- Nixon, P. J., Trost, J. T. & Diner, B. A. (1992a) Role of the carboxy terminus of polypeptide D1 in the assembly of a functional water-oxidizing manganese cluster in photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Assembly requires a free carboxyl group at C-terminal position 344. Biochemistry **31**, 10859-10871.
- Nixon, P. J. & Diner, B. A. (1992b) Asp 170 of the photosystem II reaction centre polypeptide D1 is involved in the assembly of the oxygen-envolving manganese cluster. Biochemistry **31**, 942-948.
- Ogrodnik, A., Volk, M., Letterer, R., Feick, R. & Michel-Beyerle, M. E. (1988) Determination of free energies in reaction centers of *Rb. sphaeroides*. Biochim. Biophys. Acta **936**, 361-368.
- Ono, T. A. & Inoue, Y. (1984) Ca²⁺ dependent restoration of O₂ envolving activity in CaCl₂ washed particles depleted of 33, 24 and 16 kDa proteins. FEBS Lett. **168**, 281-285.
- Parson, W. W. & Holten, D. (1986) Physical determinants of charge separation process. In L. A. Stahelin and C.J. Arntzen (Ed.), Enciclopedia of plant physiology (vol. III, pp. 338-343). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Petersen, J., Dekker, J. P., Bowlby, N. R., Ghanotakis, D. F., Yocum, C. F. & Babcock, G. T. (1990) EPR characterization of the CP47-D1-D2-Cyt b559 complex of photosystem II. Biochemistry **29**, 3226-3231.
- Petrouleas, V. & Diner, B. A. (1986) Identification of Q400, a high potential acceptor of PSII, with the iron acceptor complex. Biochim. Biophys. Acta **849**, 264-275.
- 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.
- Popot, J. L., Gerchman, S. & Engelman, D. M. (1987) Refolding of bacteriorhodopsin in lipid bilayers. A thermodynamically controlled two-stage process. J. Mol. Biol. **198**, 655-676.

Preston, C. & Seibert, M. (1991a) The carboxyl modifier 1-ethyl-3[3-(dimethyl-amino)propyl]carbodiimide (EDC) inhibits half of the high affinity Mn-binding site in PSII membrane fragments. Biochemistry 30, 9615-9624.

Preston, C. & Seibert, M. (1991b) Protease treatments of photosystem II membrane fragments reveal that there are four separate high affinity Mn-binding sites. Biochemistry 30, 9625-9633.

Putnam-Evans, C. & Bricker, T. (1992) Site-directed mutagenesis of the CPa-1 protein of photosystem II: Alteration of the basic residue pair 384,385R to 384,385G leads to a defect associated with the oxygen evolving complex. Biochemistry 31, 11482-11488.

Renger, G. (1976) Studies on the structural and functional organization of system II of photosynthesis. The use of trypsin as structurally selective inhibitor at the outer surface of the thylakoid membrane. Biochim. Biophys. Acta. 440, 287-300.

Roelofs, T. A., Gilbert, 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.

Rogner, M., Chisholm, D. A. & Dinner, B. A. (1991) Site-directed mutagenesis of the psbC gene of photosystem II: Isolation and functional characterization of CP43-less photosystem II core complexes. Biochemistry 30, 5387-5395.

Ruffle, S. V., Donnelly, D., Blundell, T. L. & Nugent, J. H. A. (1992) A three-dimensional model of the Photosystem II reaction centre 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.

Samson, G., Morissette, J-C. & Popovic, R. (1988) Copper quenching of the variable fluorescence in *Dunaliella tertiolecta*. New evidence for a copper inhibition effect on PSII photochemistry. Photochem. Photobiol., 48, 329-332

Sauer, K. (1986) Photosynthetic light reactions. Physical aspects. In L. A. Stahelin & Arntzen C.J. (Ed.), Enciclopedia of plant physiology (vol. III, pp. 85-97). Heidelberg: Springer-Verlag.

Scherz, A. & Parson, W. W. (1984) Exciton interactions in dimers of bacteriochlorophylls and related molecules. Biochim. Biophys. Acta 766, 666-678.

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. J. Norris & J. Deisehofer Eds. Academic press. NY.

- Shuvalov, V. A., Heber, U. & Schreiber, U. (1989) Low temperature photochemistry and spectral properties of a photosystem 2 reaction centre complex containing the proteins D1 and D2 and two hemes of Cyt b559. FEBS Lett. 258, 27-31.
- Spangfort, 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.
- Stocker, J. W., Taguchi, A. K. W., Murchison, H. A., Woodbury, N. W. & Boxer, S. G. (1992) Spectroscopy and redox properties of sym 1 and (M)F195H: *Rhodobacter capsulatus* reaction center symmetry mutants which affect the initial electron donor. Biochemistry 31, 10356-10362.
- Straley, S. C., Parson, W. W., Mauzerall, D. C. & Clayton, R. K. (1973) Pigment content and molar extinction coefficients of photochemical reaction centers from *Rhodospseudomonas spheroides*. Biochim. Biophys. Acta 305, 597-609.
- 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.
- Takahashi, Y., Satoh, K., & Itoh, S. (1989) Silicomolybdate substitutes for the function of primary electron acceptor and stabilizes charge separation in the photosystem II reaction center complex. FEBS Lett. 255, 133-138.
- Taguchi, A. K. W., Stocker, J. W., Alden, R. G., Causgrove, T. P., Peloquin, J. M., Boxer, S. & Woodbury, N. W. (1992) Biochemical characterization and electron transfer relations of sym1, a *Rhodobacter capsulatus* reaction center symmetry mutant which affects the initial electron donor. Biochemistry 31, 10345-10355.
- 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.
- Tanaka, S., Kawata, Y., Wada, K. & Hamaguchi, K. (1989) Extrinsic 33-kDa protein of spinach oxygen-evolving complexes. Kinetic studies of folding and disulfide reduction. Biochemistry 28, 7188-7193.
- Tanford, C. & Reynolds, J. A. (1976) Characterization of membrane proteins in detergent solutions. Biochim. Biophys. Acta 457 133-170.
- 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, D., Jankowiak, R., Seibert, M. & Small, G. J. (1991) Effects of detergent on the excited state structure and relaxation dynamics of the photosystem II reaction center. A high resolution hole burning study. Photosynth. Res. 27, 19-29.
- Telfer, A., Barber, J. & Evans, M. C. W. (1988) Oxidation-reduction potential dependence of reaction centre triplet formation in the isolated D1-D2-Cyt b559 complex. FEBS Lett. 232, 209-213.

- Telfer, A., He, W.-Z. & Barber, J. (1990) Spectral resolution of more than one chlorophyll electron donor in the isolated photosystem II reaction center complex. Biochim. Biophys. Acta **1017**, 143-151.
- Telfer, A., de las Rivas, J. & Barber, J. (1991) β -Carotene within the isolated photosystem II reaction centre: photooxidation and irreversible bleaching of this chromophore by oxidised P680. Biochim. Biophys. Acta **1060**, 106-114.
- Tetenkin, V. L., Gulyaev, B. A., Seibert, M. & Rubin, A. B. (1989) Spectral properties of stabilized D1/D2/ cytochrome b-559 photosystem II reaction center complex. Effects of tritonX-100, the redox state of pheophytin and β - carotene . FEBS Lett. **250**, 459-463.
- Thompson, L. K., Miller, A. M., Buser, C. A., de Paula, J. & Brudvig, G. W. (1989) Characterization of the multiple forms of cytochrome b559 in photosystem II. Biochemistry **28**, 8048-8056.
- Thornber, J. (1986) Biochemical characterization and structure of pigment-proteins of photosynthetic organism . In L. A. Stahelin & C.J. Arntzen (Ed.), Enciclopedia of plant physiology (vol. 19, pp. 98-142). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Trebst, A. (1986) The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of PSII in the thylakoid membrane. Z. Naturforsch. **41c**, 240-245.
- Trebst, A. (1987) Three-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction centre polypeptides of photosystem II. Z. Naturforsch. **42c**, 742-750.
- Uehara, K., Mimuro, M., Fujita, Y. & Tanaka, M. (1988) Spectral analysis of chlorophyll a aggregates in the presence of water soluble macromolecules. Photochem. Photobiol. **48**, 725-732.
- van Dorssen, R. J., Breton, J., Plitjer, J. J., Satoh, K., van Gorkom, H.J. & Amesz, J. (1987) Spectroscopic properties of the reaction center and of 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., Otte, S. C. M., Kleinherenbrink, F. A. M., Nieveen, M. C., Aartsma, T. J. & van Gorkom, H. J. (1990) Time-resolved spectroscopy at 10 K 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.
- van Mieghem, F. J. E., Satoh, K. & Rutherford, A.W. (1991) A chlorophyll tilted 30° relative to the membrane in the photosystem II reaction centre. Biochim. Biophys. Acta **1058**, 379-385.
- van der Rest, M. & Gingras, G. (1974) The pigment complement of the photosynthetic reaction center from *Rhodospirillum rubrum*. J Biol. Chem., **249**, 6446-6450

van der Vos, R., van Leeuwen, P. J., Braun, P. & Hoff, A. J. (1992) Analysis of the optical absorbance spectra of D1-D2-Cyt b559 complexes by absorbance-detected magnetic resonance. Structural properties of P680. Biochim. Biophys. Acta **1120**, 184-198.

Vermaas, W. F. J., Williams, J. G. K., Rutherford, A. W., Mathis, P. & Arntzen, C. J. (1986) Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 lacks the photosystem II chlorophyll-binding protein CP-47. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 9474-9477.

Vermaas, W. F. J., Williams, J. G. K. & Arntzen, C. J. (1987) Site-directed mutations of two His residues in the D2 protein inactivate and destabilize PSII in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Z. Naturforsch. **42c**, 762-768.

Vermaas, W. F. J., Rutherford, A. W. & Hansson, O. (1988) 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.

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.

Webb, M. & Green, B. (1991) Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. Biochim. Biophys. Acta **1060**, 133-158.

Widger, W. R., Cramer, W. A., Hermodson, M., Meyer, D. & Gullifor, M. (1984) Purification and partial amino acid sequence of the chloroplast cytochrome b-559. J. Biol. Chem. **259**, 3870-3876.

Williams, J. C., Steiner, L. A. & Simon, M. I. (1984) Primary structure of the L subunit of the reaction center from *R. Sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 7303-7307.

Williams, J. C., Alden, R. G., Murchison, H. A., Peloquin, J. M., Woodbury, N. W. & Allen, J. P. (1992) Effects of mutations near the bacteriochlorophylls in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. Biochemistry **31**, 11029-11037.

Woodbury, N. W. T. & Parson, W. W. (1984) Nanosecond fluorescence from isolated photosynthetic reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Biochim. Biophys. Acta **767**, 345-361.

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., Bylina, E. J., Alberti, M., Begush, H. & Hearst, J. E. (1984) Nucleotide and deduced polypeptide sequences of the photosynthetic reaction center, B870 antenna, and flanking polypeptides from *Rhodobacter capsulata*. Cell **37**, 949-957.

Youvan, D. C. & Marrs, B. L. (1987) Molecular mechanisms of photosynthesis. Sci. Amer., **256**, 42-48.

Yruela, I., Montoya, G., Alonso, P. J. & Picorel, R. (1991) Identification of the pheophytin-Qa-Fe domain of the reducing side of the Photosystem II as the Cu(II)-inhibitory binding site. J Biol. Chem. 266, 22847-22850.

Zinth, W., Kaiser, W. & Michel, H. (1983) Efficient photochemical activity and strong dichroism of single crystals of reaction centers from *R. viridis*. Biochim. Biophys. Acta 723, 128-131.

Publicaciones y manuscritos enviados del autor del la presente memoria de tesis doctoral :

The interaction of Triton X-100 with purple membrane. Effect of lighth-dark adaptation. J.M. González-Mañas, G. Montoya, C. Rodríguez-Fernández, J.I.G. Gurtubay and F.M. Goñi. *Biochim. Biophys. Acta* (1990) 1019, 167-169.

Pigment stoichiometry of a newly isolated D1-D2-Cyt b559 complex from the higher plant *Beta vulgaris*. G. Montoya, I. Yruela and R. Picorel. *FEBS Lett.* (1991) 283, 255-258.

Identification of the Pheo-Qa-Fe domain of the reducing side of the Photosystem II as the Cu(II) inhibitory binding site. I.Yruela, G. Montoya, P.J. Alonso and R. Picorel. *J. Biol. Chem.* (1991) 266, 22847-22850.

The inhibitory mechanism of Cu(II) on the Photosystem II electron transport from higher plants. I. Yruela, G. Montoya and R. Picorel. *Photosynth. Res.* (1992) 33, 227-233

Precise location of the Cu(II) inhibitory binding site in plant and bacterial photosynthetic reaction centers as probed by lighth induced absorption changes. I. Yruela, M. Alfonso, I. Ortiz de Zarate, G. Montoya and R. Picorel. *J. Biol. Chem.* (1993) 268, 1684-1689

Spectroscopical characterization and band assignment of two forms of the D1-D2-Cyt b559 complex from *Beta vulgaris*. G. Montoya, R. Cases and R. Picorel. *Research in Photosynthesis* (1993), (N. Murata, Ed.) Kluwer Academic Publishers.

Spectroscopical characterization of two forms of the D1-D2-Cyt b559 complex from sugar beet. G. Montoya, R. Cases, I. Yruela and R. Picorel. *Photochem. Photobiol.* aceptado

A comparison of the photochemical activity of two forms of the Photosystem II reaction center isolated from sugar beet. G. Montoya, J. de las Rivas, P.J. Booth, L.B., Giorgi, D.R., Klug, G. Porter, J. Barber and R. Picorel. *Biochim. Biophys. Acta.* enviado para su publicación.

Detergent-induced reversible denaturation of the D1-D2-Cyt b559 complex. Implications for pigment-

protein interactions. G. Montoya, R. Cases, R. Rodríguez and R. Picorel. J. Biol. Chem. enviado para su publicación.

The internal antenna complexes of Photosystem II CP43 and CP47. Spectral properties pigment stoichiometry and aminoacid analysis. M. Alfonso, G. Montoya, R. Rodríguez and R. Picorel. Eur. J. Biochem. enviado para su publicación.