

~~T. PPOV 21/26~~  
T 9/78

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 10 ENE. 1994  
ENTRADA NUM. 3

TESIS DOCTORAL

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	<u>615043836</u>
Nº Copia	<u>16281524</u>

COBRE Y FOTOSISTEMA II:  
ANÁLISIS DE SU FUNCIÓN Y EFECTO TÓXICO

JUAN BAUTISTA ARELLANO MARTÍNEZ  
UNIVERSIDAD DE GRANADA  
1993



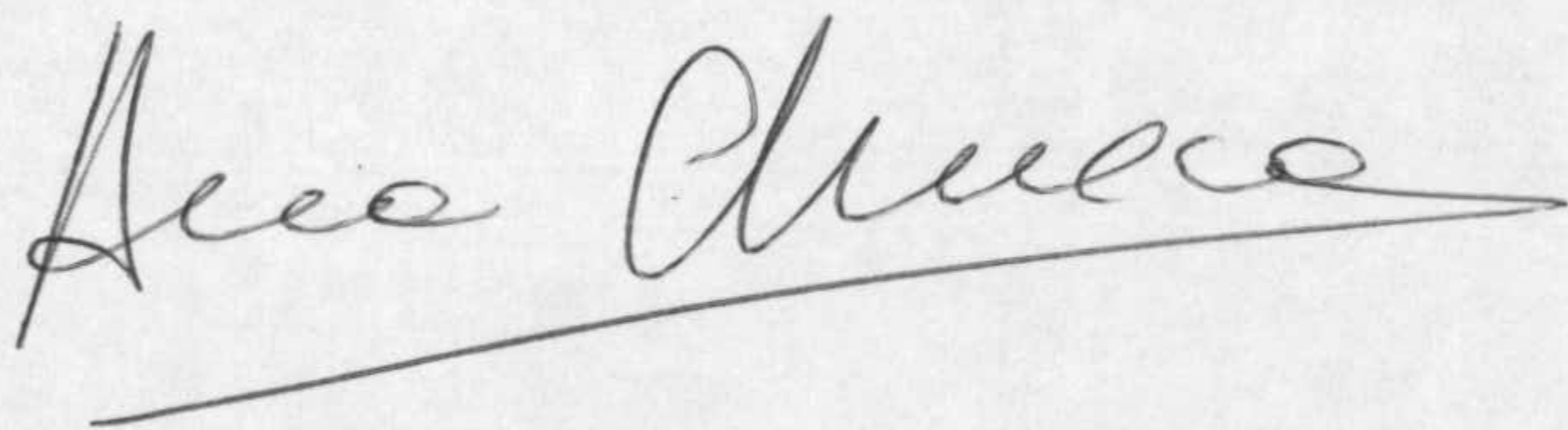
COBRE Y FOTOSISTEMA II  
ANÁLISIS DE SU FUNCIÓN Y EFECTO TÓXICO

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por el  
Licenciado en Ciencias Químicas  
Juan Bautista Arellano Martínez

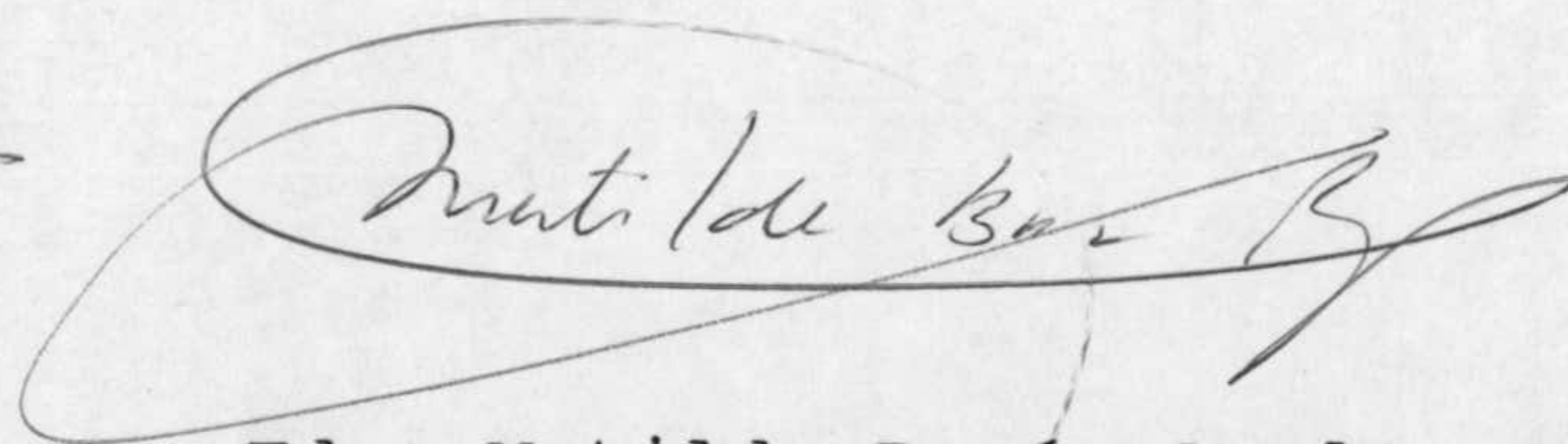


Fdo: Juan Bautista Arellano Martínez

V° B°  
LOS DIRECTORES DEL TRABAJO

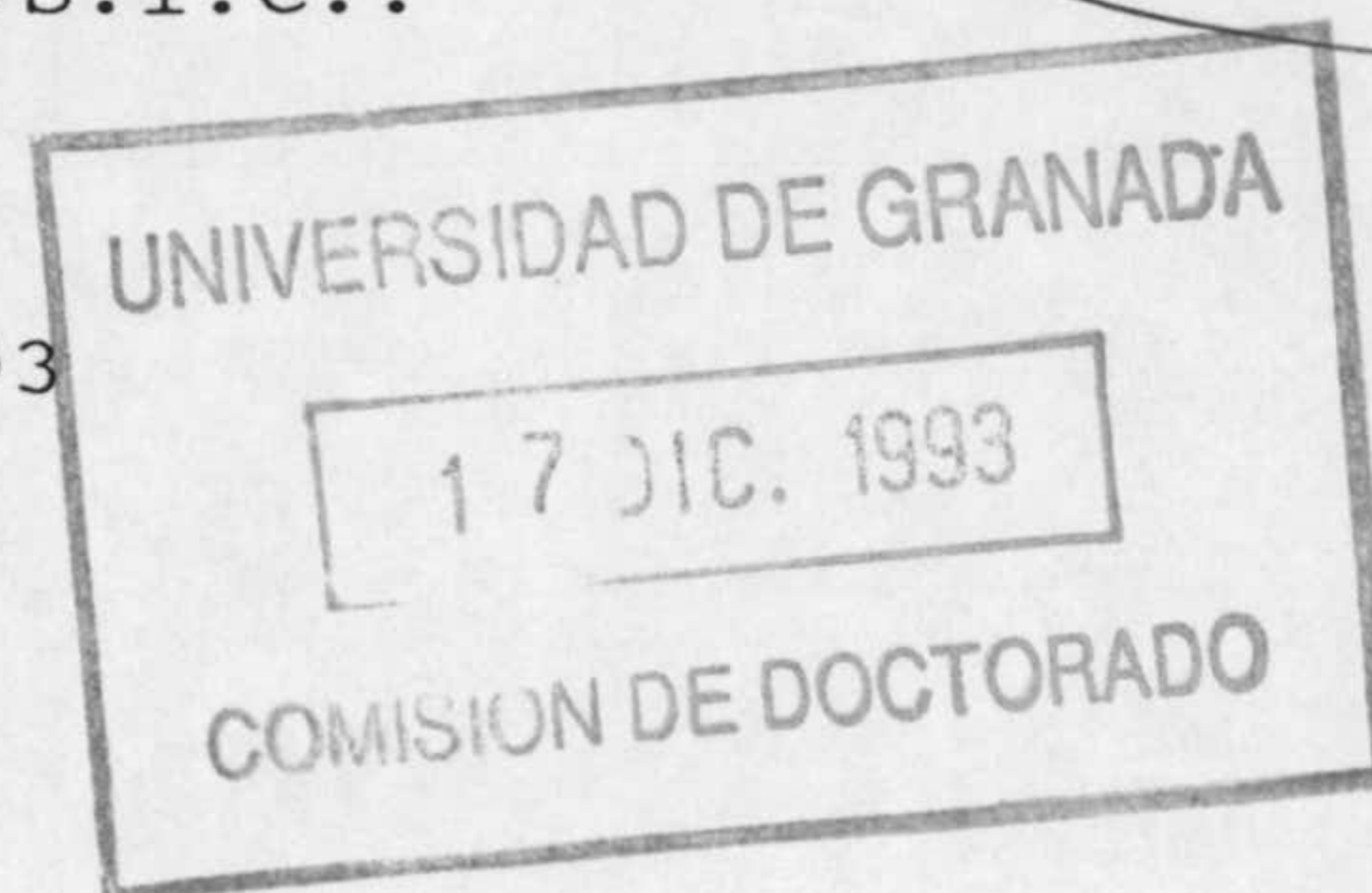


Fdo: Ana Chueca Sancho  
Doctora en Farmacia  
Profesora de Investigación  
C.S.I.C.



Fdo: Matilde Barón Ayala  
Doctora en Ciencias Biológicas  
Colaboradora Científica  
C.S.I.C..

Granada, 1993





INTRODUCCIÓN

I. Fotosistema II: Cadena de transporte electrónico y estructura.....	1
A. Transporte electrónico fotosintético.....	1
B. Componentes oxido-reductores del fotosistema II.....	8
C. Estructura del fotosistema II y polipéptidos constituyentes.....	17
D. Heterogeneidad del fotosistema II.....	39
II. Cu y Fotosistema II.....	41
A. Función del Cu en el fotosistema II.....	41
B. Efecto tóxico del Cu en el fotosistema II.....	47
OBJETIVOS.....	57
MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
A. Material vegetal.....	63
A.1. Germinación y crecimiento de plántulas.....	63
A.2. Cultivo en cámara con solución hidropónica completa.....	63
A.3. Cultivo de plantas etioladas.....	64
B. Determinación de clorofila.....	64
C. Aislamiento de fracciones subcloroplastídicas.....	65
C.1. Preparación de membranas tilacoidales.....	65
C.2. Obtención de partículas de fotosistema II.....	66
C.3. Aislamiento de centros de reacción	



## INDICE

---

fotosistema II.....	68
C.4. Preparación de membranas tilacoidales de plantas etioladas y sometidas al enverdecimiennto.....	68
D. Métodos de eliminación selectiva de polipéptidos constituyentes de las preparaciones de fotosistema II.....	69
E. Determinación del contenido en Cu de cloroplastos y preparacionessubcloroplastídicas.....	71
F. Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida conSDS.....	72
G. Electroelución de proteínas separadas en geles de poliacrilamida con SDS.....	74
H. Obtención de anticuerpos policlonales.....	75
I. Transferencia electroforética de proteínas a membranas de nitrocelulosa (Westernblotting). Inmunorrevelado.....	75
J. Transferencia electroforética de proteínas a membrana de PVDF. Secuenciación del extremo N-terminal de las proteínastransferidas.....	77
K. Análisis de ácidos nucleicos en preparaciones de partículas de fotosistema II.....	78
K.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	78
K.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	79
L. Medidas polarográficas de desprendimiento de O <sub>2</sub> por preparacionessubcloroplastídicas.....	80



<b>M. Técnicas de medida de la fluorescencia modulada.....</b>	<b>82</b>
M.1. Introducción.....	82
M.2. Inducción de la fluorescencia.....	83
M.3. Fluorescencia modulada.....	84
M.4. Descripción del fluorímetro de fluorescencia modulada.....	85
M.5. Determinación de los valores de F <sub>0</sub> y F <sub>M</sub> .....	86
<b>N. Técnicas de espectroscopía de absorción inducida por flash de rayo láser.....</b>	<b>87</b>
N.1. Medidas de los cambios de absorción a 830 nm inducidas por flash de rayo láser.....	87
N.2. Medida de los cambios de absorción a 325, 355 y 436 nm inducidas por flash de rayo láser.....	90
<b>O. Técnicas de resonancia de spin electrónico.....</b>	<b>91</b>
O.1. Tratamiento de la muestra.....	92
O.1.1. Muestra control.....	92
O.1.2. Muestra tratada con Cu.....	93
O.1.3. Eliminación del Cu con EDTA en experimentos de reversibilidad.....	93
O.2. Inducción del transporte electrónico por iluminación de la muestra.....	94
O.2.1. Experimentos a temperatura ambiente.....	95
O.2.2. Experimentos a temperatura de 200 K.....	95
O.2.3. Experimentos a temperatura de 77 K.....	95
O.3. Análisis de señales de RSE de partículas	



## INDICE

---

de fotosistema II.....	96
0.3.1. Tirosina D <sup>+</sup> .....	96
0.3.2. Tirosina Z <sup>+</sup> .....	97
0.3.3. Estado S <sub>2</sub> del complejo de iones de Mn.....	97
0.3.4. Semiquinona-hierro no hemínico (Fe <sup>+2</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> ).....	97
0.3.5. Citocromo b-559.....	98
0.3.6. Radical de clorofila.....	98

## RESULTADOS

I. Normalización del método analítico de determinación de Cu por espectrometría de absorción atómica.....	103
A. Homogenización previa de las membranas tilacoidales.....	103
B. Adición de 1-octanol.....	105
C. Exactitud del método.....	106
II. Detección de contaminaciones nucleares en partículas de fotosistema II. Modificación de su método de aislamiento para la obtención de una nueva preparación de mayor pureza.....	107
A. Seguimiento del contenido en Cu de las distintas preparaciones subcloroplastídicas originadas en el proceso de aislamiento de partículas de fotosistemaII.....	107
B. Análisis del patrón polipeptídico de las preparaciones del apartado anterior.....	109
C. Análisis de pérdidas de Cu asociados a la	



---

eliminación selectiva de polipéptidos del fotosistemaII.....	113
D. Presencia de restos nucleares en las preparaciones enriquecidas en partículas de fotosistema II: Histonas y ácidos nucleicos.....	115
E. Una nueva preparación de partículas de fotosistema II: BBYs-.....	124
<b>III. Efecto tóxico del Cu en el fotosistema II.....</b>	<b>126</b>
A. Determinación del efecto inhibidor del Cu sobre el transporte electrónico en el fotosistema II por medidas polarográficas del desprendimiento de oxígeno.....	127
A.1. Análisis de las reacciones de Hill $H_2O \rightarrow$ fenil- <i>p</i> -BQ y $H_2O \rightarrow$ SiMo a altas concentraciones de Cu.....	127
A.2. Estudio de la dependencia del pH de la inhibición por Cu del transporte electrónico.....	131
A.3. Estudio de la reversibilidad del efecto tóxico del Cu en el transporte electrónico del fotosistemaII.....	133
B. Análisis del lugar de acción del Cu tóxico en el fotosistema II mediante técnicas de fluorescencia modulada.....	135
B.1. Evolución de las señales de fluorescencia $F_M$ y $F_0$ a concentraciones crecientes de Cu.....	135

---



## INDICE

---

- B.2. Dependencia del pH de la capacidad de inhibición por Cu de la fluorescencia  $F_M$ .....138
- C. Determinación del mecanismo de acción del Cu a concentraciones tóxicas en el fotosistema II mediante espectroscopía de absorción inducida por flash de rayo láser.....139
- C.1. Estudio del efecto del Cu en la separación de cargas  $P680^+Q_A^-$ . Caracterización de los parámetros cinéticos asociados a los cambios de absorbancia registrados a 830 nm en presencia de Cu.....142
- C.2. Análisis de la separación de cargas  $P680^+Q_A^-$  en presencia de concentraciones tóxicas de Cu por medida de los cambios de absorbancia a 436 nm.....151
- C.3. Efecto del Cu tóxico sobre el lado reductor del fotosistema II. Análisis de la reducción de  $Q_A$ . Caracterización de los parámetros cinéticos asociados a los cambios de absorbancia a 325 nm en presencia de Cu.....155
- C.4. Efecto del Cu tóxico sobre las transiciones S del sistema de fotólisis del agua. Medidas de los cambios de absorbancia a 355 nm.....158
- D. Análisis del flujo electrónico en el fotosistema II en condiciones de toxicidad en Cu mediante el estudio de los espectros de RSE de los transportadores implicados.....159
- D.1. Espectro de resonancia de spin electrónico de



la señal II en presencia de concentraciones tóxicas de Cu a temperatura ambiente.....	161
D.2. Caracterización del radical inducido en luz por la presencia de Cu en preparaciones de partículas de fotosistema II.....	169
D.3. Efecto del Cu sobre la señal múltiple característica del estados $S_2$ .....	171
D.4. Estudio de la reversibilidad por RSE a temperatura ambiente del efecto causado por Cu en partículas de fotosistema II.....	173
D.5. Estudio del efecto del Cu sobre la separación de cargas $P680^+Q_A^-$ y el $Fe^{+2}$ no-hemínico mediante el espectro de RSE de la señal de $Fe^{+2}Q_A^-$ .....	175
D.6. Espectro de RSE del citocromo b-559.....	179
DISCUSION.....	185
I. Función del Cu en el fotosistema II. Nueva preparación de partículas de fotosistema II en las que se eliminan contaminaciones nucleares y elementos metálicos como el Cu.....	185
II. Efecto tóxico del Cu en el fotosistema II. Bloqueo del transporte electrónico entre la tirosina Z y P680, como principal punto de acción del efecto inhibidor dentro del fotosistema II.....	201



INDICE

---

CONCLUSIONES.....233

BIBLIOGRAFIA.....235



## INTRODUCCIÓN

## I. FOTOSISTEMA II: CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO Y ESTRUCTURA

## A. Transporte electrónico fotosintético

En la membrana tilacoidal del cloroplasto se encuentran tres complejos responsables de la oxidación del agua y reducción del NADP<sup>+</sup> denominados fotosistema II, complejo citocromo b<sub>6</sub>-f y fotosistema I. En los anteriores procesos intervienen un conjunto de agentes oxido-reductores que, por su localización y potencial oxido-reductor, son responsables de un transporte electrónico vectorial a lo largo de la membrana tilacoidal que puede resumirse en el conocido esquema Z, propuesto originalmente por Hill y Bendall (1960). La luz es necesaria como fuente de energía, ya que dicho proceso es energéticamente desfavorable, teniendo los fotosistemas II y I moléculas de clorofila asociadas en unos complejos proteína-pigmento denominados, respectivamente, antenas II y I (LHC II y LHC I), que funcionan como colectores de fotones. El citocromo b<sub>6</sub>-f permite el transporte electrónico desde el fotosistema II, donde se lleva a cabo la oxidación del agua, hasta el fotosistema I que reduce el NADP<sup>+</sup>. Como consecuencia de dicho transporte electrónico, se genera un gradiente protónico entre el espacio intratilacoidal y el estroma del cloroplasto, y un cuarto complejo situado en la membrana tilacoidal, denominado ATP-sintetasa, lo aprovecha para producir

---



## INTRODUCCIÓN

ATP de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica de Mitchell (1961). También, bajo ciertas condiciones se puede producir un transporte cíclico en torno al fotosistema I que lleva a la formación de ATP sin obtención de  $\text{NADPH}^+$ . En la figura 1, se representan esquemáticamente dichos complejos y el transporte electrónico y gradiente protónico que generan la formación de  $\text{NADPH}^+$  y ATP.

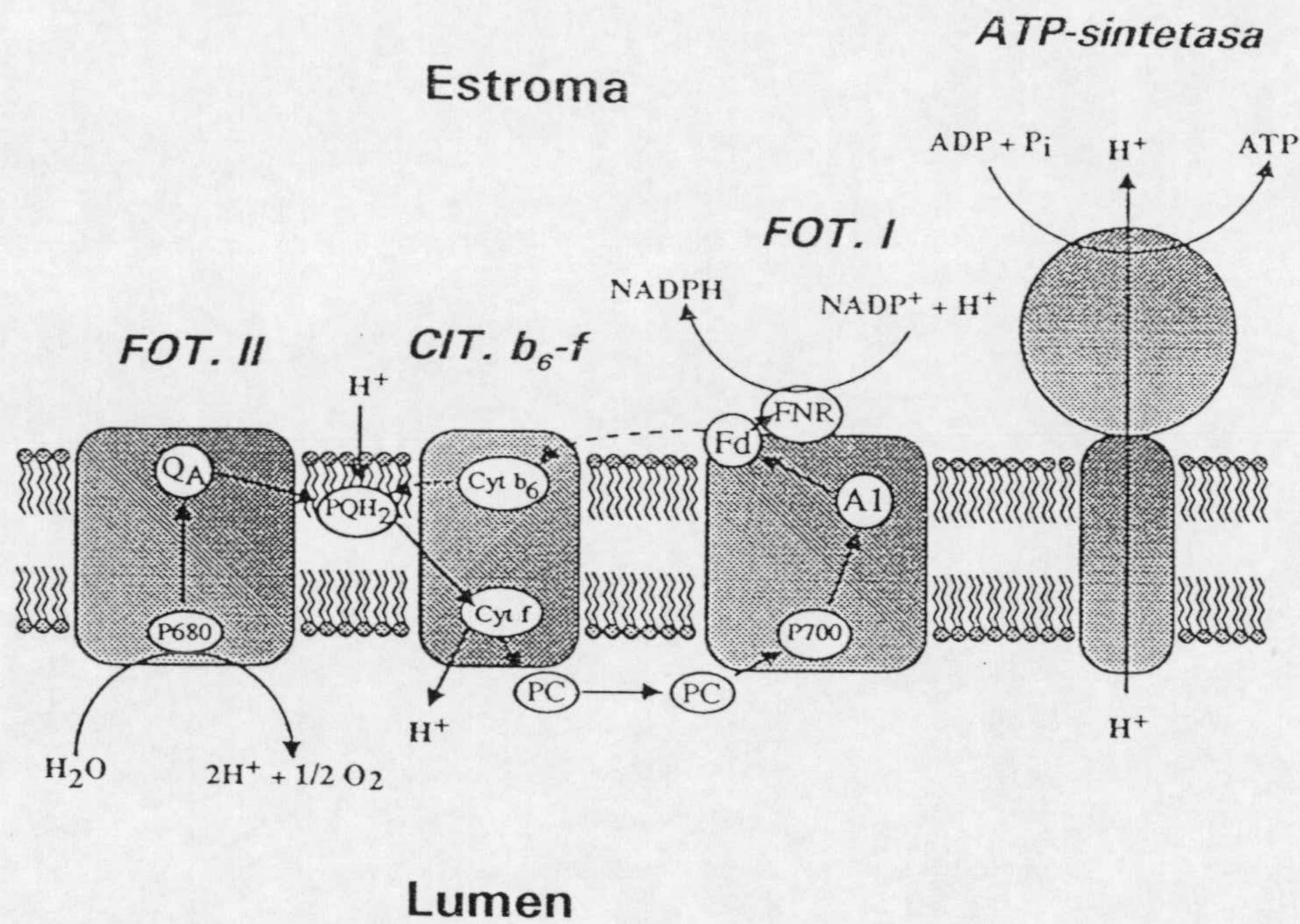


Figura 1. Representación esquemática de los 4 complejos de proteína de la membrana tilacoidal: Fotosistema II (FOT. II), complejo citocromo b<sub>6</sub>-f (CIT. b<sub>6</sub>-f), fotosistema I (FOT. I) y ATP sintasa. Se señalan algunos de los intermediadores electrónicos: Centro de reacción de fotosistema II (P680), quinona aceptora del fotosistema II (Q<sub>A</sub>), plastoquinol (QH<sub>2</sub>), citocromo f (cyt f), citocromo b<sub>6</sub> (cyt b<sub>6</sub>), plastocianina (PC), centro de reacción del fotosistema I (P700), quinona aceptora del fotosistema I (A1), ferredoxina (Fd), ferredoxín-NADP<sup>+</sup> oxidorreductasa (FNR). La línea discontinua indica el transporte electrónico cíclico en el fotosistema I. (Tesis doctoral de Per Svensson, Universidad de Lund, 1991).



En la membrana tilacoidal se distinguen dos tipos de regiones: una en donde se encuentra apilada formando -los *grana*- y otra en contacto directo con el estroma en que no se observa ningún apilamiento. La distribución de los cuatro grandes complejos mencionados entre ambas áreas es desigual. El complejo citocromo  $b_6-f$  está repartido por igual, sin embargo la ATP-sintetasa se sitúa mayoritariamente en la membrana tilacoidal expuesta al estroma (Miller y Staehlin, 1976; Vallon et al., 1986). La mayor proporción de fotosistema II está localizado en los *grana*, el denominado fotosistema II  $\alpha$ , mientras en las zonas no apiladas vecinas al estroma existe el fotosistema II  $\beta$ , minoritario y con un tamaño menor de antena que el anterior (Melis y Homann, 1978). El fotosistema I presenta una distribución inversa, encontrándose mayoritariamente en las regiones de la membrana tilacoidal expuestas al estroma (Andersson y Anderson, 1980; Vallon et al., 1986). Andreasson et al. (1988) sugirieron igualmente una heterogeneidad para este fotosistema, asociada a su tamaño de antena, denominando fotosistema I  $\alpha$  al que se encuentra presente en los *grana* con una antena mayor de la que tiene el fotosistema I  $\beta$ , que es más abundante. En la figura 2, se presentan esquemáticamente la distribución en la membrana tilacoidal de los complejos de proteína fotosistema II  $\alpha$  y  $\beta$ , fotosistema I, complejo citocromo  $b_6-f$  y ATP sintetasa, indicándose en la tabla siguiente (tabla 1) los valores porcentuales estimados para cada uno de dichos complejos en las zonas de la membrana.

---



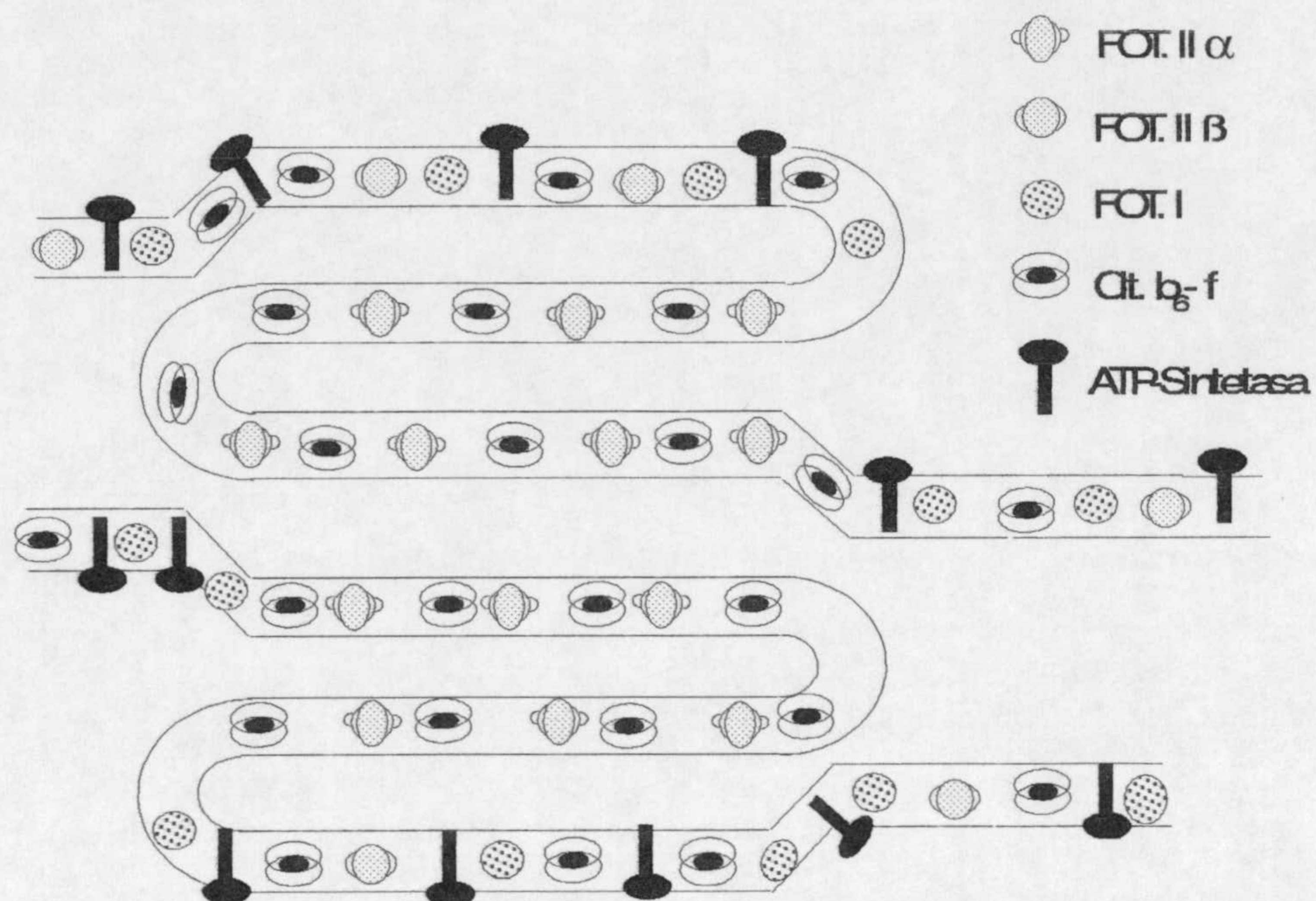


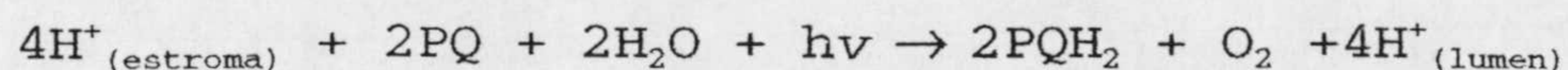
Figura 2. Distribución del fotosistema II ( $\alpha$  y  $\beta$ ), fotosistema I, citocromo  $b_6-f$  y ATP-sintetasa en la membrana tilacoidal.

Tabla 1. Distribución porcentual de los complejos de proteína en la membrana tilacoidal

Componente	Lamela granal	Lamela estromática
FOT. II	85	15
FOT. I	<15	>85
Cit. $b_6-f$	50	50
LHC II	>70-90	<10-30
ATP-sintasa	0	100



El fotosistema II es un complejo proteína-pigmento, al que está asociado un determinado grupo de cofactores, capaz de fotooxidar agua y reducir una molécula de plastoquinona (Barry, 1993; Vermaas, 1993; Vermaas e Ikeuchi, 1991; Hansson y Wydrzynski, 1990). El proceso comienza cuando la energía solar es absorbida por las moléculas de clorofila asociadas al fotosistema II y su energía de excitación es conducida hasta las moléculas del clorofila del centro de reacción, P680. El P680 excitado (P680\*) puede ya reducir una molécula de feofitina y provocar la separación de cargas  $P680^* \text{ Feo} \rightarrow P680^+ \text{ Feo}^-$ . La molécula de plastoquinona llamada  $Q_A$  es reducida inmediatamente después por la molécula de feofitina para estabilizar la separación de carga. La plastoquinona  $Q_B$  es reducida por  $Q_A$  aceptando secuencialmente dos electrones, al mismo tiempo que dos protones son tomados del estroma y la molécula de plastoquinol  $Q_B H_2$  se intercambia por otra molécula del pool de plastoquinonas de la membrana tilacoidal. El  $P680^+$  fotooxidado es nuevamente reducido por una molécula de tirosina próxima a él, llamada tirosina Z. El complejo de iones de Mn y, probablemente un radical de histidina, son oxidados generando un transporte electrónico que llega hasta el  $P680^+$  a través de la tirosina Z. Durante este último proceso una molécula de agua es oxidada formándose oxígeno y liberándose protones al lumen tilacoidal. En la ecuación química siguiente se esquematiza la reacción que sucede en el fotosistema II:





## INTRODUCCIÓN

---

Para entender cómo el fotosistema II es capaz de llevar a cabo esta reacción es fundamental conocer su organización estructural. Está constituido por un número de aproximadamente 20 polipéptidos que se distribuyen de la siguiente forma:

a) Los que forman complejos proteína-pigmento, denominados antenas, que son responsables de la captación de fotones cuya energía de excitación llega hasta el centro de reacción (Thornber *et al.*, 1988).

b) Tres proteínas extrínsecas de 33, 23 y 16 kDa en el lumen tilacoidal cuya función es facilitar la fotólisis del agua (Andersson y Åkerlund, 1987).

c) El centro de reacción del fotosistema II en el que se produce la separación primaria de cargas (Danelius *et al.*, 1987) está constituido por las proteínas D1 y D2, las subunidades de 9 kDa y 4 kDa del citocromo b-559 y un pequeño polipéptido codificado por el gen cloroplastídico *psbI* (Ikeuchi y Inoue, 1988; Webber *et al.*, 1989). A ellas se encuentran asociadas moléculas de feofitina, clorofilas y  $\beta$ -caroteno (Nanba y Satoh, 1987; Barber *et al.*, 1987), y contienen asimismo los componentes oxido-reductores  $Q_A$ ,  $Q_B$ , P680, feofitina, tirosina Z, tirosina D e incluso, probablemente, ligandos para el Mn. El heterodímero D1/D2 en ausencia de los restantes polipéptidos del centro de reacción tiene una estrecha similitud funcional con los polipéptidos L y M del centro de reacción de bacterias púrpuras fotosintéticas (Deisenhofer *et al.*, 1985).

d) Dos complejos de proteína-clorofila denominados CP 47 y

---



CP 43 (Delepelaire y Chua, 1979) se encuentran estrechamente asociados al centro de reacción del fotosistema II formando junto con éste y la proteína de 33 kDa del sistema de fotólisis de agua el complejo menor capaz de llevar a cabo la fotólisis del agua (Ghanotakis y Yocum, 1990).

e) Hay otros polipéptidos que se encuentran asociados al fotosistema II, como los polipéptidos de 10 kDa y 22 kDa (Ljungberg *et al.*, 1986a), la fosfoproteína (Benneț, 1984) y otros de más bajo peso molecular (Schröder *et al.*, 1988; Ljungberg *et al.*, 1986b) cuya estructura y estequiometría no están determinadas, aunque la mayoría de las secuencias de sus respectivos genes se conocen (Ikeuchi *et al.*, 1989).

En la figura 3 se representa un modelo del fotosistema II donde se destacan sus principales polipéptidos y cofactores.

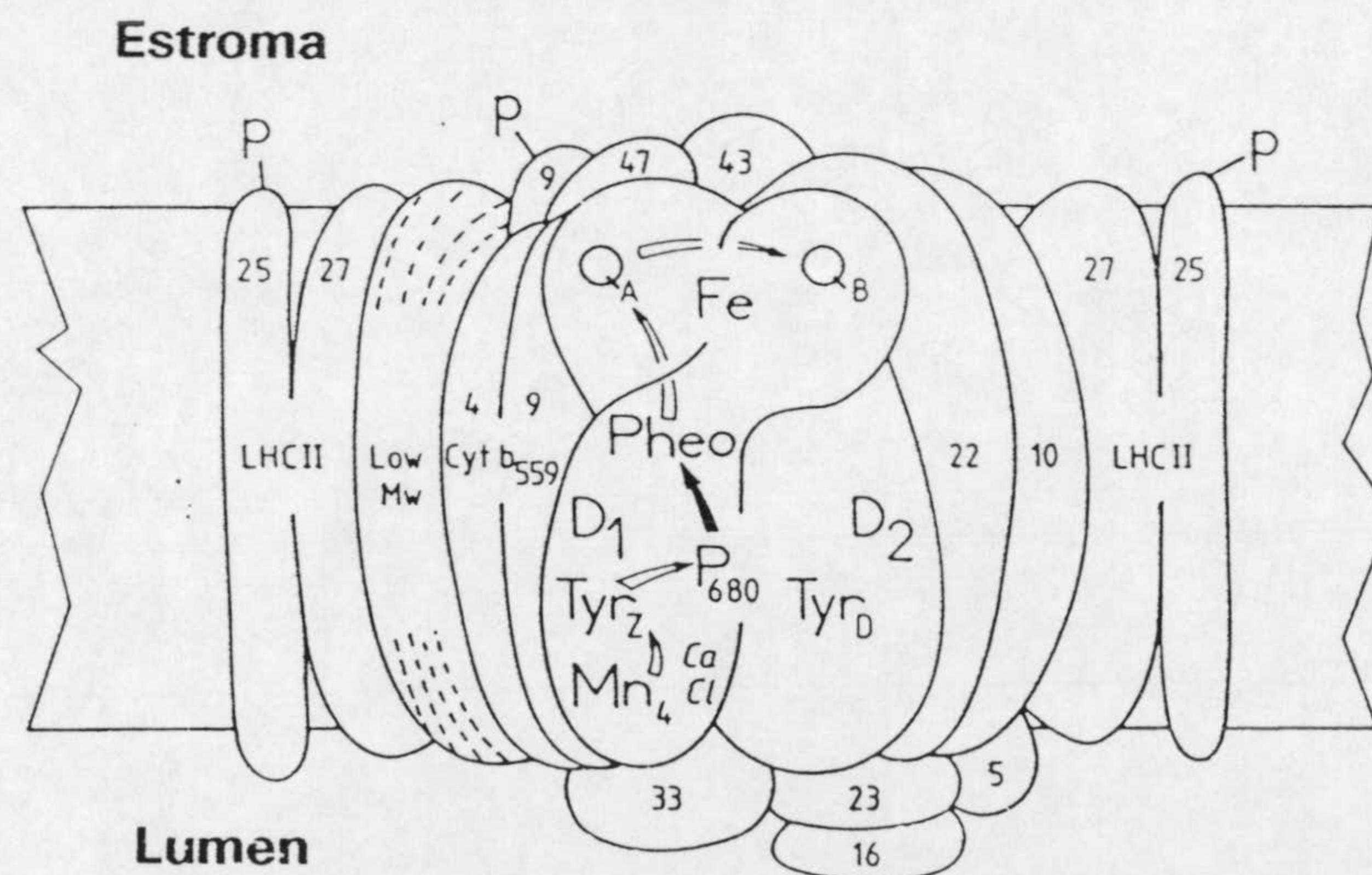


Figura 3. Modelo esquemático del fotosistema II donde se representa los polipéptidos que constituyen dicho fotosistema con sus respectivos nombres o masa molecular (kDa). En las proteínas D1 y D2 del centro de reacción se incluyen los cofactores de dicho fotosistema, indicándose el transporte electrónico que surge después de la separación de cargas (Styring y Andersson, 1991).



## INTRODUCCIÓN

### B. Componentes oxido-reductores del fotosistema II

En la tabla 2, se detallan los potenciales reductores de cada uno de los intermediarios del transporte electrónico en el fotosistema II y las velocidades de reacción entre ellos. Su naturaleza química y otras propiedades se describen a continuación brevemente.

Tabla 2. Tiempos de las velocidades de reacción entre los componentes oxido-reductores del fotosistema II y sus respectivos potenciales de reducción a pH 7.

	Cinética	Ref.		E <sup>0</sup> <sub>pH 7</sub> (mV)	Ref.
P680* → Feo	3 ps 30 ps	(1, 2) (3, 4)	P680 <sup>+</sup> /P680*	- 900	
			P680 <sup>+</sup> /P680	+ 1100	(12)
Feo → QA	300 ps 500 ps	(5, 6) (7)	Feofitina/ feofitina <sup>-</sup>	- 500	(13)
QA → QB	100-200 μs	(8)	QA/QA <sup>-</sup>	- 130	(14)
QA → QB <sup>-</sup>	400-500 μs	(8)	QB/QB <sup>-</sup>	- 45	(15)
			QB <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup> /QBH <sub>2</sub>	+ 290	(16)
Tir Z → P680	20-250 ns	(9, 10)	Tir Z <sup>+</sup> /Tir Z	+ 950-990	(17)
			Tir D <sup>+</sup> /Tir D	+ 720-760	(18)
S0 → S1	30 μs	(11)	S1/S0	+ 680-720	(18)
S1 → S2	110 μs	(11)	S2/S1	+ 900-940	(18)
S2 → S3	350 μs	(11)	S3/S2	+ 900-940	(18)
S3 →(S4)→ S0	1300 μs	(11)			

(1) Seibert et al. (1992), (2) Wasielewski et al. (1989), (3) Schelvis et al. (1992), (4) Hastings et al. (1992), (5) Nuijs et al. (1986), (6) Eckert et al. (1988), (7) Schatz et al. (1987), (8) Robinson y Crofts, (1983), (9) Brettel et al. (1984), (10) Meyer et al. (1989), (11) Dekker et al. (1984), (12) Boussac y Etienne, (1982), (13) Rutherford et al. (1981), (14) Knaff, (1975), (16) Crofts et al. (1984), (16) Diner et al. (1991), (17) Metz et al. (1989), (18) Vass y Styring, (1991)



### P680

P680 es el primer donador electrónico del centro de reacción del fotosistema II caracterizado como una molécula de clorofila *a*, aunque su estequiometría es objeto de discusión. Conjeaud y Mathis (1980) propusieron que fuera un monómero de clorofila, basándose en los resultados obtenidos por espectroscopía de absorción inducida por flash a 820 nm. Atendiendo a la homología que hay entre los centros de reacción del fotosistema II y de bacterias purpúreas (ver apartado D1/D2), se postuló que también el P680 pudiera ser un dímero de clorofila. Parecían confirmarlo los espectros de resonancia de spin electrónico del estado triplete y singlete del P680 (den Blanken *et al.*, 1983). Pero además, el hecho de que uno de los anillos de clorofila del P680 en estado triplete estuviera inclinado con respecto al plano de la membrana tilacoidal un ángulo de 30° (Mieghem *et al.*, 1991) y que el estado singlete estuviera al menos sobre dos moléculas de clorofila (Durrant *et al.*, 1992) indicarían que, o bien el dímero de clorofila del P680 estaría inclinado con respecto al plano de la membrana, a diferencia del centro de reacción en bacterias purpúreas o bien, que una tercera molécula de clorofila perteneciente al dímero de proteínas D1 y D2 contribuyera en la deslocalización de la carga (Vermaas, 1993).

### Feofitina

La molécula de feofitina asociada a la proteína D1 es el primer aceptor electrónico del fotosistema II (Klimov *et al.*,

---



## INTRODUCCIÓN

---

1977). Existen dos moléculas de feofitina por centros de reacción del fotosistema II (Nanba y Satoh, 1987; Barber *et al.*, 1987; Montoya *et al.*, 1991); aunque sólo la asociada a la proteína D1 toma parte en el transporte electrónico a lo largo del fotosistema II.

### $Q_A$

$Q_A$  es una plastoquinona unida a la proteína D2 que es reducida por la feofitina a semiplastoquinona  $Q_A^-$  (Van Gorkon, 1974) pero sin llegar a protonarse (Crofts y Wraight, 1983), siendo oxidada por  $Q_B$  antes de que la molécula de feofitina vuelva nuevamente a reducirla. Durante el transporte electrónico,  $Q_A$  permanece unida a D2, sin ser en ningún momento reemplazada por otra plastoquinona, a diferencia de lo que ocurre con  $Q_B$ . La extracción de  $Q_A$  crea en el fotosistema II un cambio conformacional que impide nuevamente su reconstitución, lo que no ocurre en bacterias fotosintéticas (Diner *et al.*, 1988).

### Hierro no-hemínico

Un ion de  $Fe^{+2}$  está equidistante de  $Q_A$  y  $Q_B$ , a una distancia de 7 Å (Mathis y Rutherford, 1987) y es responsable de un transporte electrónico eficiente entre  $Q_A$  y  $Q_B$ , aunque no toma parte en él (Diner *et al.*, 1991). Se ha observado que el  $Fe^{+2}$  puede ser oxidado a  $Fe^{+3}$  en el fotosistema II y posteriormente ser reducido nuevamente por  $Q_A$  en un tiempo de 50  $\mu s$  (Zimmermann y Rutherford, 1986; Diner y Petrouleas, 1987), pero no hay



evidencias de que esto pueda suceder en el centro de reacción de bacterias purpúreas. En ausencia del ion bicarbonato  $\text{HCO}_3^-$ , la transferencia electrónica entre  $Q_A$  y  $Q_B$  es más lenta (Eaton-Rye y Govinjee, 1988), por lo que se propuso que el  $\text{HCO}_3^-$  podría ser un ligando de dicho hierro, sustituyendo a un residuo de glutamato coordinado a  $\text{Fe}^{+2}$  observado en bacterias purpúreas y que no está conservado en el fotosistema II. Se ha sugerido, además, que el  $\text{HCO}_3^-$  pudiera estar involucrado en la protonación de  $Q_B^{-2}$  (van Rensen y Govindjee, 1988 y Eaton-Rye *et al.*, 1988).

#### $Q_B$

Es una plastoquinona intercambiable del pool de plastoquinonas que se une a la proteína D1 en el transcurso del transporte electrónico, reduciéndose hasta plastoquinol (Velthuys, 1981). La reducción transcurre en dos etapas, en las cuales primeramente se forma una semiquinona  $Q_B^-$  que permanece fuertemente unida a la proteína D1 sin intercambiarse por otra plastoquinona (Velthuys, 1981), ni ser protonada (Mathis y Rutherford, 1987). En una segunda etapa,  $Q_B^-$  es reducido a  $Q_B^{-2}$  con una protonación simultánea para formar la molécula de plastoquinol  $Q_B\text{H}_2$ , que deja su lugar de unión para que una nueva plastoquinona del pool lo ocupe (Crofts y Wraight, 1983). Se ha propuesto también que dos aminoácidos de la proteína D1, Ser-264 y His-252, podrían participar en el proceso de protonación (Hirschberg y McIntosh, 1983; Diner *et al.*, 1990).



### Tirosinas Z y D

El P680<sup>+</sup> formado después de la separación y estabilización de cargas es nuevamente reducido mediante un transporte electrónico en el que toman parte la tirosina Z, 4 iones de Mn y, probablemente un residuo de histidina, que de forma cíclica, oxidan a una molécula de agua formando O<sub>2</sub>.

Los estudios para la identificación de los radicales de tirosina Z y D, como componentes esenciales del transporte electrónico en el fotosistema II, comenzaron con la caracterización de la señal II observada por resonancia de spin electrónico correspondiente a dos radicales oxidados (Babcock y Sauer, 1973). Uno de ellos se pudo observar en oscuridad, tenía un tiempo de vida media de 10-12 h (Vass y Styring, 1991) y se le llamó desde un principio señal II lenta. El segundo presentaba un espectro idéntico, pero se indujo por luz en nanosegundos y decayó en oscuridad en microsegundos (Blankenship *et al.*, 1975, y Hoganson y Babcock, 1988), por lo que se le denominó señal II muy rápida. Sólo cuando el sistema de fotólisis del agua estaba inhibido, el radical se reducía más lentamente y su señal de RSE decae en décimas de segundo (Babcock, 1987) y se le conoció como señal II rápida. Barry y Babcock (1987) y Boerner y Barry (1993), mediante cultivos de cianobacterias en un medio con sustratos deuterados, determinaron que Z<sup>+</sup> y D<sup>+</sup> eran residuos neutros de tirosina y, mediante mutagénesis dirigida, se estableció que la tirosina 161 (Tirosina D) en la proteína D2 era la tirosina responsable de la señal II lenta (Debus *et al.*, 1988a; Vermaas



*et al.*, 1988) y la tirosina 161 (Tirosina Z) en la proteína D1 como la responsable, junto a la Tirosina D, de la la señal II muy rápida (Debus *et al.*, 1988b; Metz *et al.*, 1989). En condiciones normales, P680<sup>+</sup> es reducido por la tirosina Z (tirosina 161) de la proteína D1 (Gerken *et al.*, 1988; Debus *et al.*, 1988; Metz *et al.*, 1989). La tirosina D no reduce normalmente al P680<sup>+</sup>, pero sí se ha observado que reduce los estados S<sub>2</sub> o S<sub>3</sub> del sistema de fotólisis del agua en una escala de tiempo de segundos (Babcock y Sauer, 1973; Velthuys y Visser, 1975; y Styring y Rutherford, 1987). También la tirosina D puede ser reducida por el estado S<sub>0</sub> en una escala de tiempo de minutos (Styring y Rutherford, 1987; Vass *et al.*, 1990b; Vass y Styring, 1991).

#### Complejo de iones de Mn e histidina

Después de cada fotoacto, un equivalente de oxidación se acumula en el sistema de fotólisis del agua. Cuando son cuatro los equivalentes almacenados, se libera una molécula de oxígeno procedente de dos moléculas de agua. Joliot y Joliot (1968) observaron que el desprendimiento de oxígeno se producía cada cuatro flashes y Kok *et al.* (1970) propusieron un modelo cíclico de 5 estados de oxidación para el sistema de fotólisis del agua denominados S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> y S<sub>4</sub>, donde el subíndice indica el número de equivalentes de oxidación almacenados. En cada flash el estado S<sub>n</sub> pasaba a S<sub>n+1</sub> hasta alcanzar el estado S<sub>4</sub>, momento en el que el oxígeno es liberado y dos nuevas moléculas de agua entraban para comenzar el ciclo desde el estado S<sub>0</sub> (Zankel, 1971



## INTRODUCCIÓN

y Bouges-Bocquet, 1973). Los equivalentes de oxidación durante las transiciones S son almacenados en el complejo de iones de Mn y probablemente en un residuo de histidina, proponiendo Evelo et al. (1989) que sólo dos iones de Mn cambiaban su estado de oxidación durante las transiciones S, permaneciendo constante el estado de oxidación de los dos restantes. Los estados S se encontrarían como S<sub>0</sub> (Mn<sup>+2</sup> Mn<sup>+3</sup>), S<sub>1</sub> (Mn<sup>+3</sup> Mn<sup>+3</sup>), S<sub>2</sub> (Mn<sup>+3</sup> Mn<sup>+4</sup>) y S<sub>3</sub> (Mn<sup>+3</sup> Mn<sup>+4</sup>) siendo un radical de histidina oxidado entre S<sub>2</sub> y S<sub>3</sub> (Boussac et al., 1990). Con respecto al estado S<sub>4</sub>, no hay datos espectroscópicos que determinen los cambios de la transición desde S<sub>3</sub> a S<sub>4</sub>. En la figura 4, se representa esquemáticamente el ciclo de los estados S propuesto por Kok et al. (1970).

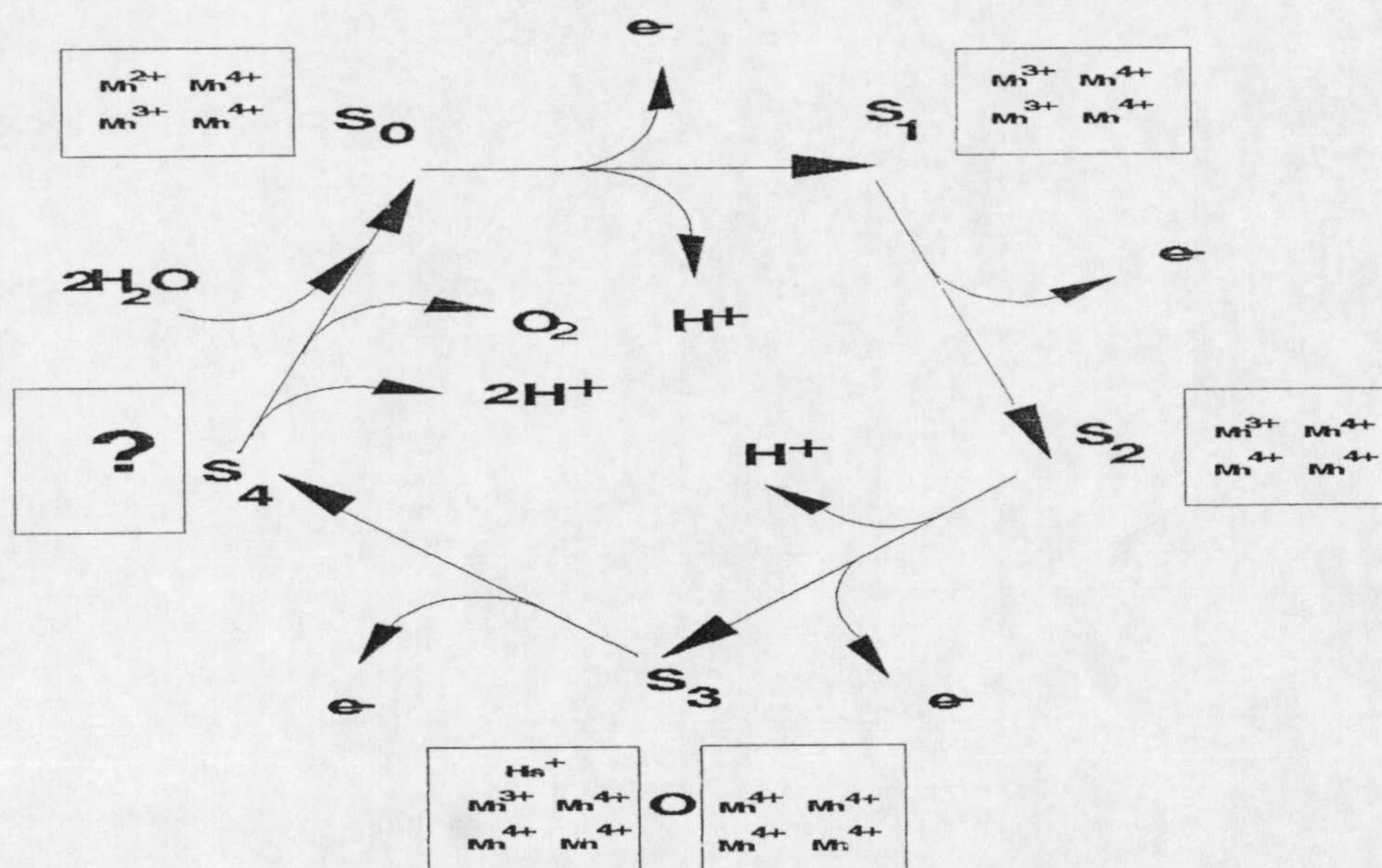


Figura 4. Ciclo de los estados S propuesto por Kok et al. (1970) donde se indican los cambios de estado de oxidación de los iones de Mn e His en cada uno de los estados S, junto con el proceso de libreración al medio de los H<sup>+</sup> y O<sub>2</sub> y captación del H<sub>2</sub>O. El estado de oxidación de los iones de Mn en S<sub>4</sub> permanece desconocido (Rutherford et al., 1991).



$S_0$  y  $S_1$  son estables en oscuridad (Kok *et al.* 1970), mientras que  $S_2$  es inestable y decae a  $S_1$  mediante una reacción de recombinación con  $Q_B^-$  o con  $Q_A^-$  (Rutherford *et al.*, 1984; Robinson y Crofts, 1983; Bennoun, 1970). El estado  $S_3$  decae igualmente a  $S_1$  pasando por el estado  $S_2$  (Rutherford, 1984) y el  $S_4$  reacciona espontáneamente con una molécula de agua para formar el  $S_0$  (Zankel, 1971; Bouges-Bocquet, 1973). En pocos segundos de oscuridad se observa que los estados  $S_0$  y  $S_1$  están en una proporción de 1:3, pero en una adaptación a la oscuridad más prolongada el estado  $S_0$  es oxidado por la tirosina D (Styring y Rutherford, 1987; Vass y Styring, 1991).

La molécula de  $H_2O$  aparentemente no es oxidada hasta que se forma el estado  $S_4$ . Brudvig *et al.* (1987) postularon que, sólo cuando la molécula de agua estuviera totalmente desprotonada,  $O^{2-}$ , sería posible su oxidación, uniéndose los protones liberados a los residuos polipeptídicos con carácter básico que hay en el entorno del complejo de iones de Mn. También ha sido propuesto que la oxidación podría producirse también sobre  $OH^-$  (Van Leeuwen *et al.*, 1990). La oxidación de las dos moléculas de agua para formar una molécula de  $O_2$  lleva consigo la liberación de 4  $H^+$  al lumen tilacoidal. Los protones aparecen en el lumen tilacoidal antes de la transición de  $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$  para favorecer la oxidación del sustrato  $O^{2-}$  o  $OH^-$ , observándose que un protón se libera en la transición  $S_0 \rightarrow S_1$ , ninguno en  $S_1 \rightarrow S_2$ , uno en  $S_2 \rightarrow S_3$  y dos en  $S_3 \rightarrow S_0$  (Saphon y Crofts, 1977) (ver figura 4). El  $O_2$  es liberado aproximadamente cada 1-3 ms (Joliot *et al.*, 1966) coincidiendo con



## INTRODUCCIÓN

---

la reducción de la tirosina Z en  $S_3$  que ocurre en 1-3 ms (Dekker *et al.*, 1984; Renger y Weiss, 1986). Sin embargo, Boussac *et al.* (1990a) establecieron que el tiempo transcurrido para un ciclo S completo era de 20 ms, así que éste debería ser el factor limitante del desprendimiento de  $O_2$ . Pero hay quienes demuestran que la velocidad del desprendimiento de  $O_2$  es aún menor, de 30-100ms, basándose en el uso de electrodos débilmente polarizados que inhiben en menor proporción a los centros de reacción (Plijter *et al.*, 1988).

### $Cl^-$ y $Ca^{+2}$

El sistema de fotólisis del agua tiene otros cofactores cuya ubicación todavía es objeto de debate, pero que, por su proximidad al complejo de iones de Mn, pueden regular la actividad del ciclo de Kok, siendo necesarios para el desprendimiento del  $O_2$  (Critchley, 1985; Boussac *et al.*, 1988).

La necesidad del ion  $Ca^{+2}$  ha sido demostrada por diversos experimentos en los que éste se ha eliminado con EGTA o por un tratamiento a pH 3 (Ono y Inoue, 1984), observándose que la transición  $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$  quedaba bloqueada (Boussac y Rutherford, 1988). También, cuando se eliminaban los polipéptidos del sistema de fotólisis del agua de 33, 23 y 16 kDa, se necesitó un aumento de la concentración de los iones  $Cl^-$  para mantener un nivel óptimo de la actividad del sistema de fotólisis del agua (Andersson *et al.*, 1984; Miyao y Murata, 1985). Si el ion  $Cl^-$  era eliminado, se interrumpía la transición  $S_2 \rightarrow S_3$ , probablemente



debido al cambio del poder oxido-reductor del  $S_3/S_2$  (Theg *et al.*, 1984; Ono *et al.*, 1986), provocando su ausencia la photoinhibición y posterior degradación de la D1 (Jegerschöld y Styring, 1991).

### C. Estructura del fotosistema II y polipéptidos constituyentes

#### Centro de reacción:

#### Proteínas D1 y D2

El centro de reacción del fotosistema II está constituido por un heterodímero de dos proteínas integrales de membrana denominadas D1 y D2. El nombre se debe a que inicialmente se observaron en autorradiografías de separaciones electroforéticas de las proteínas de este complejo como bandas anchas y difusas con una masa molecular comprendida entre 30-34 kDa (Chua y Gillham, 1977).

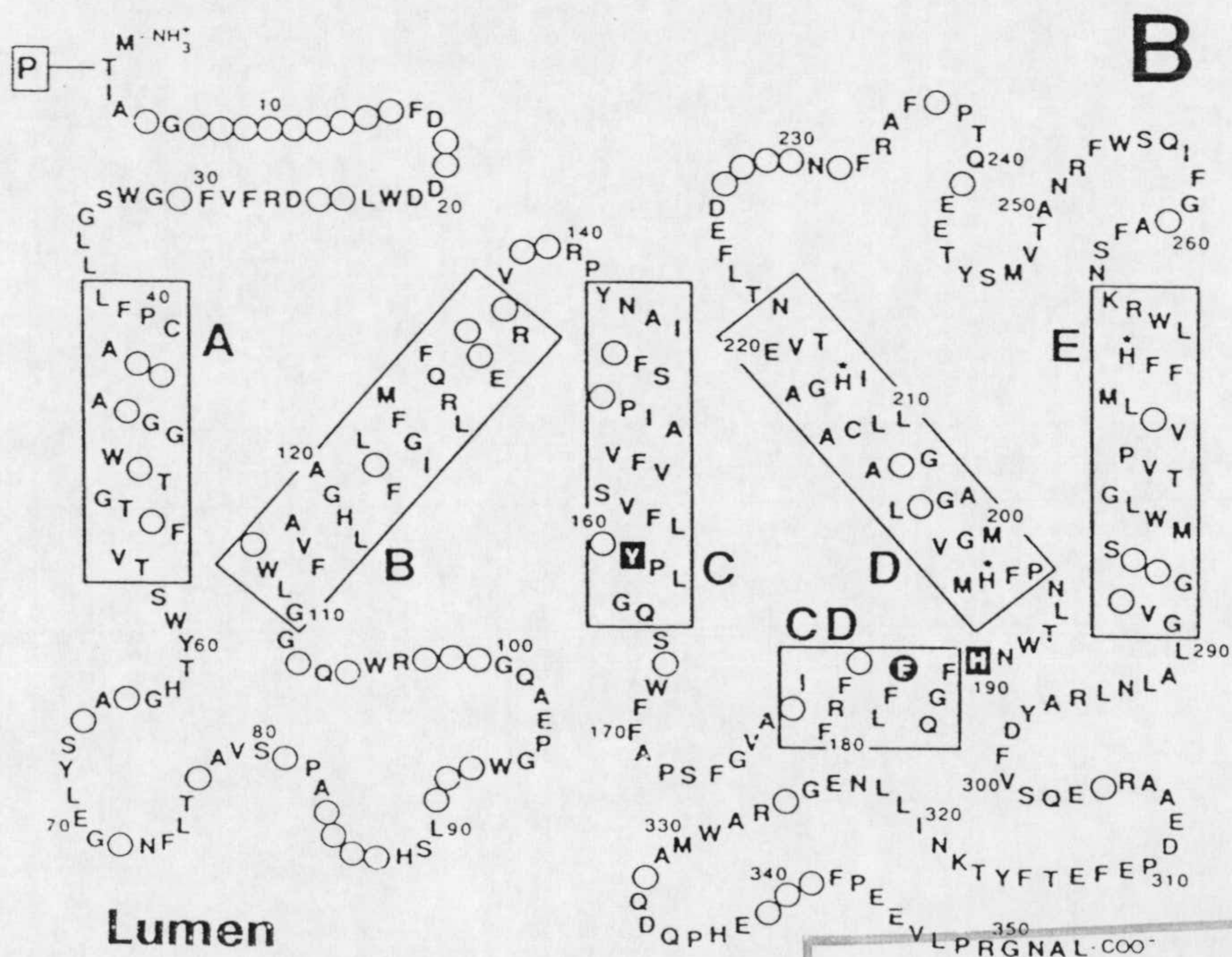
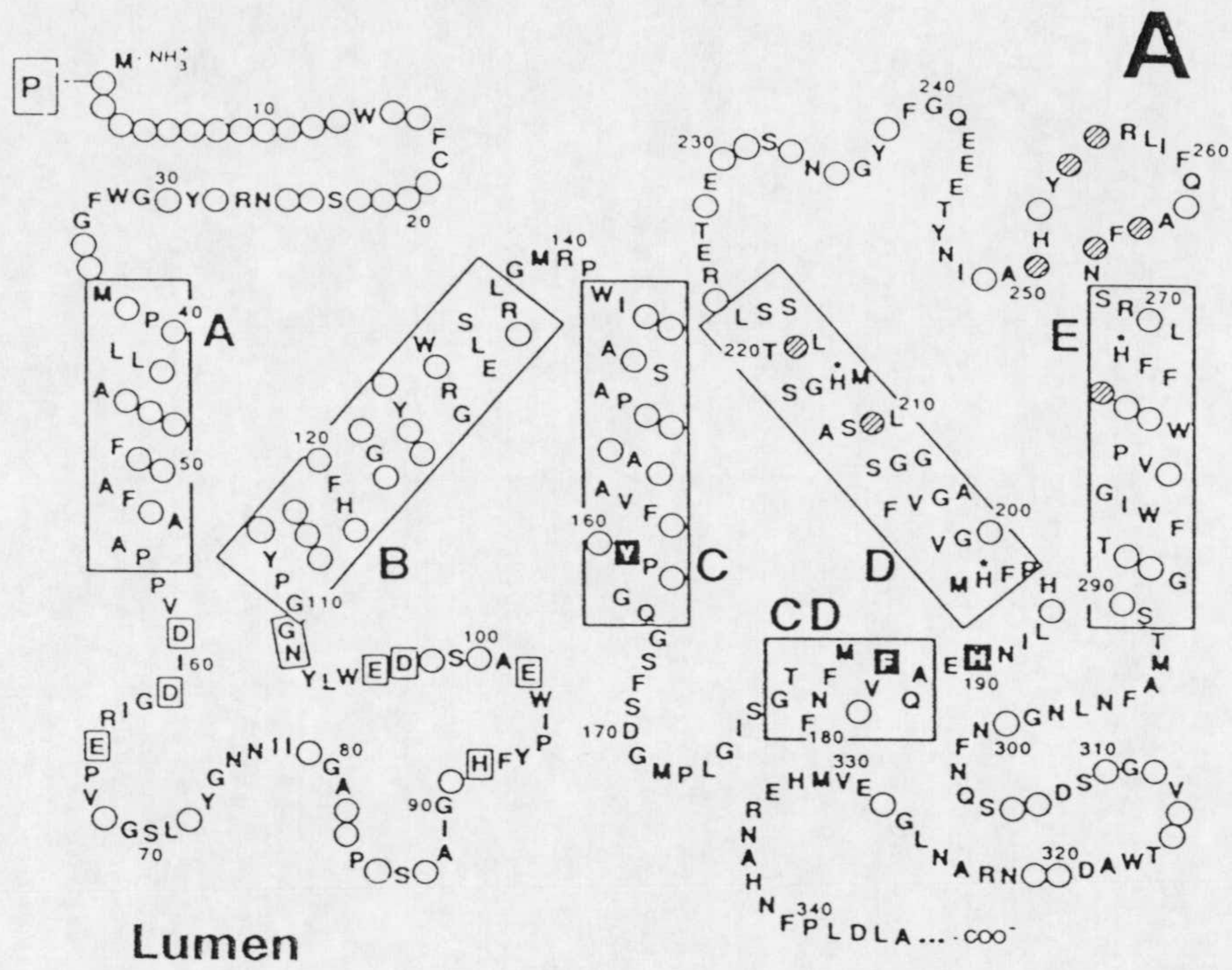
Los primeros estudios sobre la D1, también llamada proteína  $Q_B$  por tener el sitio de unión de la plastoquinona  $Q_B$  (Hirschberg *et al.*, 1984), fueron impulsados por el hecho de ser el punto de acción de la mayoría de los herbicidas antifotosintéticos que inhibían el transporte electrónico en el lado aceptor del fotosistema II. Se demostró que se sintetizaba rápidamente en luz (Bottomley *et al.*, 1974), presentaba una masa molecular de 32 kDa y estaba codificada por un gen cloroplastídico denominado *psb A* (Mattoo *et al.*, 1981), altamente conservado (Erickson *et al.*, 1985; Svensson *et al.*, 1990).

---



Figura 5. Representación esquemática de la estructura secundaria de las proteínas D1 (A) y D2 (B) del centro de reacción de fotosistema II de espinaca. En ambas proteínas los cinco fragmentos transmembranales con estructura  $\alpha$ -hélice se indican con las letras del alfabeto desde la hasta la E, mientras que un sexto fragmento, también con estructura  $\alpha$ -hélice, situado entre las hélice C y D se encuentra en la cara luminal y es denominado CD. Los residuos conservados en 38 secuencias analizadas de la proteína D1 y 15 de la proteína D2 se representan con sus respectivas letras, mientras que los círculos representan aminoácidos no conservados. La tirosina Z y D son respectivamente las Tyr-161 de la D1 y de la D2. Las histidinas con las que el P680 forman un complejo son las His-198 de la D1 y de la D2. Las histidinas que forman un complejo de coordinación con el  $Fe^{+2}$  no-hemínico son las His-215 e His-272 de la D1 y las His-215 e His-269 de la D2. A los residuos Thr-254 e His-215 de la D2 se uniría  $Q_A$  y a la His-215 de la D1  $Q_B$ . La feofitina interaccionaría por fuerzas de van der Waals con el Thr-254 de la D2. Se ha sugerido que el Asp-170 de la D1 y el Glu-70 de la D2 interaccionen con los iones del complejo de Mn (Svensson et al., 1990)





UNIVERSIDAD DE GRANADA

17 DIC. 1993

COMISION DE DOCTORADO



## INTRODUCCIÓN

---

Los estudios sobre la proteína D2 indicaron que tenía una masa molecular de 34 kDa y estaba codificada por el gen cloroplastídico *psb D* cuya secuencia también estaba altamente conservada (Rochaix *et al.*, 1984; Rasmussen *et al.*, 1984).

Las proteínas D1 y D2 tienen una gran homología funcional y estructural con las subunidades L y M de los centros de reacción de bacterias purpúreas fotosintéticas, lo que facilitó tras la cristalización del centro de reacción de estas últimas, el conocimiento de la estructura del fotosistema II (Trebst, 1986; Michel y Deisenhofer, 1988). Las proteínas D1 y D2 tienen 5 fragmentos transmembranales y una  $\alpha$ -hélice paralela al plano de la membrana denominada hélice CD que se encuentra en el loop situado entre las hélices C y D (Michel y Deisenhofer, 1988; Svensson *et al.*, 1990) (ver figura 5). Se ha comprobado que la mayoría de los residuos de los aminoácidos conservados son ligandos fundamentales de los cofactores del centro de reacción. Las His-198(D1 y D2) son los ligandos de los iones  $Mg^{+2}$  de las moléculas de clorofila del centro de reacción, P680, y las His-215(D1 y D2), His-272(D1) e His-269(D2) forman un complejo de coordinación con el hierro no-hemínico situado entre  $Q_A$  y  $Q_B$  (Trebst, 1986; Michel *et al.*, 1986). La feofitina se une a la D1 de una manera análoga a como lo hace la bacteriofeofitina en centros de reacción de bacterias purpúrea fotosintéticas, mediante un enlace por puente de hidrógeno con el Glu-130 de la proteína D1 (Moenne-Loccoz *et al.*, 1989; Navedryk *et al.*, 1990) que está situado en la hélice B cerca de la cara estromática de



la membrana. Se ha propuesto también que un residuo de triptófano que se encuentra en la posición 254 de la proteína D2 en plantas superiores, pudiera interaccionar con  $Q_A$  y feofitina para facilitar la transferencia electrónica entre ambas.  $Q_A$  y  $Q_B$  se encuentran en la región comprendida entre las hélices D y E de las proteínas D2 y D1, respectivamente, comprobándose por estudios de mutagénesis dirigida que la His 214 y Trp 253 en la D2 y la His 268 en la D1, serían sus ligandos (Vermaas *et al.*, 1988, 1990). Además, dos tirosinas, Tir-161 de D1 y Tir-161 de D2 han sido identificadas como las tirosinas Z y D del lado donador del fotosistema II (Debus *et al.*, 1988a,b; Vermaas *et al.*, 1988; Metz *et al.*, 1989). También, se ha sugerido que los átomos del complejo de iones de Mn del sistema de fotólisis del agua, tengan algún ligando en el heterodímero D1/D2. Para mayor detalle, véase el apartado correspondiente al complejo de iones de Mn.

#### Citocromo b-559

Está formado por dos polipéptidos de 9 y 4 kDa, codificados por los genes cloroplastídicos *psb E* y *psb F* respectivamente (Widger *et al.*, 1985). El grupo hemo del citocromo b-559 se une a una histidina de cada subunidad polipeptídica. El citocromo b-559 está estrechamente asociado al heterodímero D1 y D2, como revelaron los centros de reacción de PS II purificados (Nanba y Satoh, 1987); aunque Ortega *et al.* (1989) lo localizaron entre el pool de plastoquinonas y el citocromo f, mediando el transporte



## INTRODUCCIÓN

---

no-cíclico entre los fotosistemas I y II. La estequiometría propuesta por centro de reacción es 1:1 (Buser *et al.*, 1992) o 2:1 (Noren *et al.*, 1991). Los análisis de topología e hidropatía sugieren que cada polipéptido tiene una única región transmembranal con el extremo C-terminal orientado hacia la cara luminal estando el grupo hemo más próximo a la cara estromática (Cramer *et al.*, 1990). El poder oxido-reductor que tiene permite observarlo en dos estados diferentes, uno de alto potencial con un valor aproximado de +350 mV, mientras que presenta varios estados de bajo potencial comprendidos entre 5-230 mV dependiendo del pH (Cramer *et al.*, 1990; Ortega *et al.*, 1988). Se ha sugerido que pudiera ser oxidado por el P680<sup>+</sup> a través de una molécula de clorofila en condiciones en las que el complejo de iones de Mn estuviera bloqueado (Thompson *et al.*, 1988; Telfer, 1990), volviendo a ser reducido por Q<sub>B</sub> (Debus *et al.*, 1992; Barabás *et al.*, 1993) en un transporte electrónico cíclico a lo largo del fotosistema II. También ha sido postulado que, en ausencia de luz el citocromo b-559 podría donar un electrón a la tirosina Z<sup>+</sup> (Canaani *et al.*, 1990). Otra posible función atribuida al citocromo b-559 por Arnon y Tang (1988) y Ortega *et al.* (1992) era la de una bomba protónica que operaría junto con el citocromo b<sub>6</sub>-f en la oxidación del plastoquinol y translocación de los protones hacia el lumen tilacoidal.

Polipéptido producto del gen *psbI*.

Además del heterodímero D1/D2, el citocromo b-559, el centro



de reacción del fotosistema II tiene un polipéptido de bajo peso molecular de 4,8 kDa que está codificado por un gen cloroplastídico denominado *psb I* (Ikeuchi e Inoue, 1988; Webber *et al.*, 1989). Su correspondiente análisis de topología e hidropatía muestra una estructura con una única región transmembranal y un extremo C-terminal con carácter hidrofílico (Ikeuchi *et al.*, 1988; Webber *et al.*, 1989).

Sistema de fotólisis del agua:

Complejo de iones de Mn

Los experimentos de reconstitución con Mn para recuperar la actividad del sistema de fotólisis del agua, proporcionaron las primeras indicaciones de que era un constituyente del fotosistema II (Radner *et al.*, 1971, 1977; Yamashita *et al.*, 1976). Con preparaciones de partículas de fotosistema II más purificadas (Berthold *et al.*, 1981) se ha determinado que son 4 los átomos de Mn constituyentes del sistema de fotólisis del agua (Cheniae y Martin, 1970; Murata *et al.*, 1984). Aunque esta sería una estequiometría generalmente aceptada, también se ha propuesto un modelo hexanuclear de Mn (Pauly y Witt, 1992).

La estructura del complejo de iones de Mn no se conoce en su totalidad y son muchos los modelos propuestos. Los estudios sobre su posible estructura se han llevado a cabo por las técnicas de RSE, y EXAFS principalmente.

De acuerdo con los resultados obtenidos por RSE se pensó inicialmente que fuera un dímero de Mn(III)-Mn(IV) en el que los



## INTRODUCCIÓN

---

átomos de Mn estarían unidos por dos puentes de oxígeno (Dismukes y Siderer, 19881). Sin embargo, un estudio más profundo sobre el desdoblamiento del número de líneas de la señal mutiple del estado  $S_2$ , junto con otra señal de  $S_2$  con un valor de  $g=4.1$  (Kim *et al.* 1990), hizo pensar que éste fuera un tetrámero (Beck y Brudvig, 1986; Boussac *et al.*, 1989).

Con las técnicas EXAFS es posible conocer el número y naturaleza de los ligandos del Mn en el sistema de fotólisis del agua y la distancia entre ellos. A una distancia de 1.75-2.2 Å se encuentran los átomos de nitrógeno y oxígeno, que pertenecen a los polipéptidos del entorno y al oxígeno del puente entre dos iones de Mn (Andreasson, 1989). Una distancia Mn-Mn de 2.7 Å ha sido determinada por Sauer *et al.* (1988); George *et al.* (1989) y Penner-Hahn *et al.* (1990) que probablemente refleja la distancia Mn-O-Mn. A 3.3 Å se ha observado otra interacción que podría corresponder con Mn-Mn (Sauer *et al.*, 1988; George *et al.*, 1989). Además, existen indicaciones de una posible unión Mn-Ca a 4.3 Å (Penner-Hahn *et al.*, 1990). Según estos cálculos, los modelos de tetrámeros que podrían encajar, corresponderían con una estructura de cubo o mariposa distorsionada propuestos por de Paula *et al.* (1986) y Christou y Vicent (1987), respectivamente.

El modelo más reciente ha sido propuesto por Burghaus *et al.* (1992) y Yachandra *et al.* (1992, 1993) (figura 6), quienes conjuntamente sugirieron, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por EPR y EXAFS, un dímero de dímeros en el que los



átomos de Mn estarían unidos por un puente de oxígeno y por dos puentes carboxílicos y donde, además, un residuo de histidina,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Cl}^-$  interaccionarían directamente con un ion de Mn, aunque no asigna a que átomo de Mn se unen.

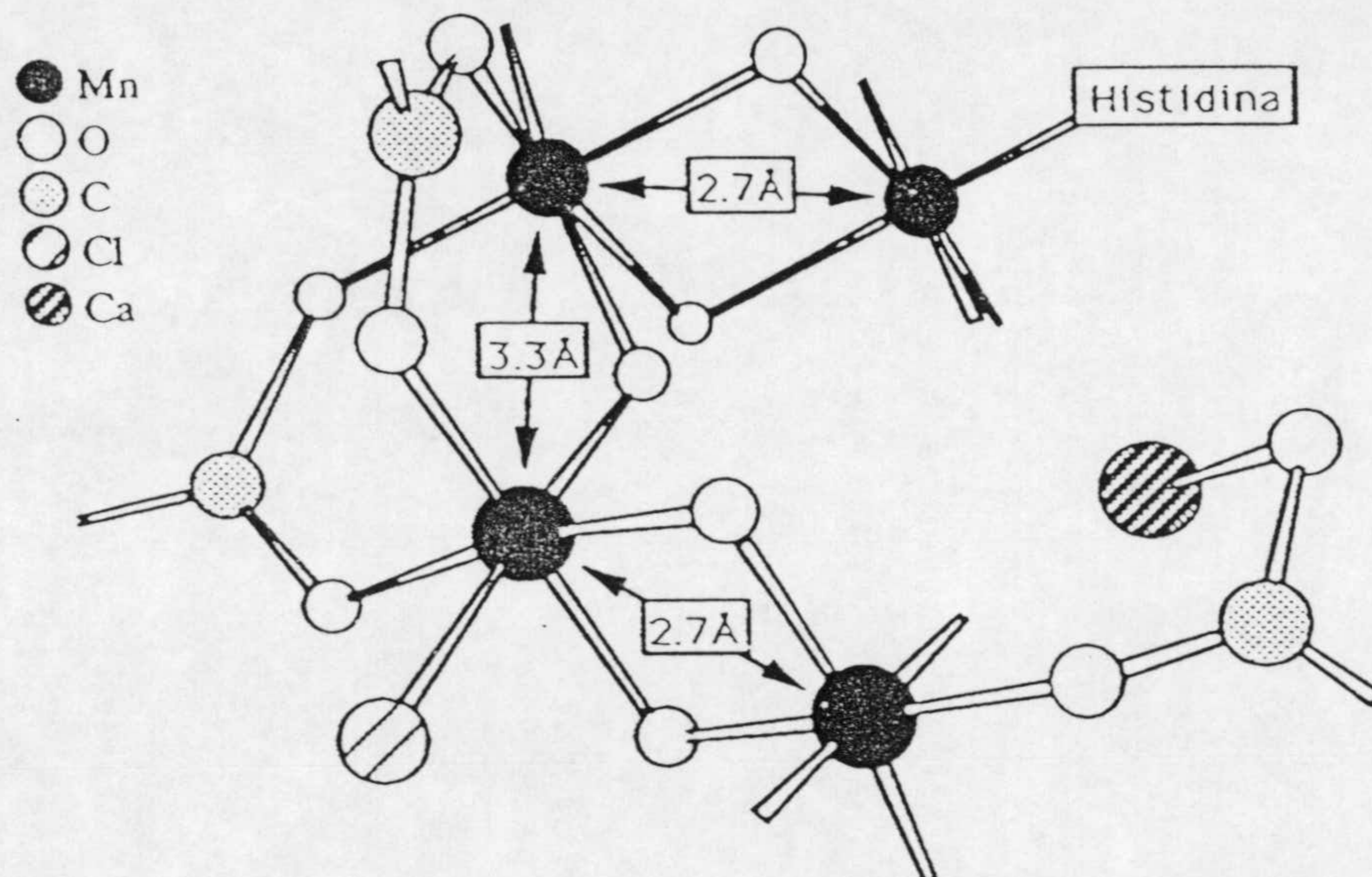


Figura 6. Modelo del complejo de iones de Mn del fotosistema II propuesto por Yachandra et al. (1993).

El primer polipéptido que fue propuesto como posible portador de algún ligando para el Mn fue la proteína de 33 kDa del sistema de fotólisis del agua, debido a su presencia en las preparaciones mínimas de centros de reacción capaces de desprender oxígeno (Ghanotakis y Yocum, 1990), y a que su eliminación correspondía con una liberación paralela de Mn (Ljunberg et al., 1986). Pero, posteriormente, se comprobó que su ausencia no impedía el desprendimiento de oxígeno en un medio con altas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  (Ghanotakis et al., 1984) e incluso mutantes de cianobacterias que carecían de esta proteína



## INTRODUCCIÓN

---

conservaban su capacidad de desprendimiento de oxígeno (Barnap y Sherman, 1991; Mayes *et al.*, 1991). Las evidencias más recientes apuntan a la localización del complejo de iones de Mn en el heterodímero de las proteínas D1 y D2, con los aminoácidos de la secuencia polipeptídica de la D1 comprendidos entre las hélices A y B y su correspondiente loop como sus más probables ligandos (Svensson *et al.*, 1990). Los candidatos más probables son el Asp 170 de la D1 (Nixon y Diner, 1992) y el Glu 69 de la D2 (Vermaas *et al.*, 1990; Van der Bolt y Vermaas, 1992). La misma tirosina Z podría estabilizar al complejo de iones de Mn, por lo que autores como Noren *et al.* (1992) opinaban que la luz es requerida para la activación de dicho complejo. También, se pensó que el CP 47 y CP 43 como portadores de ligandos para el complejo de iones de Mn (Bricker, 1990; Vermaas *et al.*, 1988).

### Polipéptidos de 33, 23 y 16 kDa

Los polipéptidos extrínsecos de 33, 23 y 16 kDa situados en la cara luminal de la membrana tilacoidal tienen una función reguladora sobre la fotólisis del agua (Andersson y Åkerlund, 1987).

El polipéptido de 33 kDa codificado por un gen nuclear denominado *psb O* (Hallic, 1989) está estrechamente relacionado con el complejo de iones de Mn, por lo que también fue denominado proteína estabilizadora del complejo de iones de Mn, aunque no existen evidencias de una unión directa al metal. Cuando esta proteína es eliminada del fotosistema II se produce una



inhibición parcial de las transiciones  $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$  (Ono y Inoue, 1985; Burnap *et al.*, 1992), variaciones del  $S_2$  (Vass *et al.*, 1987) y una pérdida de dos átomos de Mn después de un periodo prolongado de incubación (Miyao *et al.*, 1984). La unión al fotosistema II se debe principalmente a la presencia de residuos de aminoácidos que contienen grupos carboxilos en el extremo N-terminal (Odom y Bricker, 1992). Mediante reacciones de entrecruzamiento se ha podido comprobar que la proteína de 33 kDa está en un estrecho contacto con las proteínas D1, D2, CP 47 (Enami *et al.*, 1987; Bricker *et al.*, 1988), el citocromo b-559 y el polipéptido codificado por el gen *psb I* (Enami *et al.*, 1992) observándose además una estequiometría con respecto al CP 47 de 1:1 (Enami *et al.*, 1991).

Los polipeptidos de 23 y 16 kDa tienen una estequiometría 1:1:1 con respecto al polipéptido de 33 kDa (Murata *et al.*, 1984), están codificados por los genes nucleares *psb P* y *psb Q* (Hallic, 1989) y son fácilmente eliminados de las preparaciones de fotosistema II por lavados con NaCl 1-2 M (Åkerlund *et al.*, 1982). Los iones  $Ca^{+2}$  y  $Cl^{-}$  permanecen fuertemente ligados al fotosistema II cuando están presentes dichos polipéptidos, pero se carece de evidencias de su unión directa a ellos (Franzen *et al.*, 1985; Kuwabara *et al.*, 1985).

Los polipéptidos de 23 y 16 kDa están unidos al fotosistema II sólo en presencia del complejo de iones de Mn y son sus respectivas secuencias N-aminoterminales las que se encuentran más estrechamente asociadas al fotosistema II (Kuwabara *et al.*,



## INTRODUCCIÓN

---

1986; Miyao *et al.*, 1988). La proteína de 23 kDa necesita del polipéptido de 33 kDa para asociarse al fotosistema II, y el polipéptido de 16 kDa del polipéptido de 23 kDa (Miyao y Murata., 1989). También, se ha sugerido una interacción entre el CP 43 y el polipéptido de 23 kDa (de Vitry *et al.*, 1989).

### Complejos pigmento-proteína:

La clorofila asociada a los complejos de antena, proteína-pigmento, es la molécula responsable de la transferencia de la energía fotónica hasta el centro de reacción de los fotosistemas I y II. Son tres los tipos de antena del fotosistema II: la antena principal (LHC II), los complejos menores (CP 29, CP 26, CP 24 y CP 14) y las antenas internas (CP 47 y CP 43).

### Antena principal: LHC II

Es el complejo pigmento-pigmento que contiene aproximadamente la mitad del contenido en clorofila y una tercera parte de proteína de las membranas tilacoides de plantas superiores. Está constituido por 8 moléculas de clorofila *a*, 7 de clorofila *b* y entre 1-2 moléculas de xantofila por polipéptido de 25-27 kD (Chitnis y Thornber, 1988; Green, 1988). Estos polipéptidos denominados LHCP están codificados por una familia de genes nucleares, denominados *cab*, caracterizándose porque la secuencia de su primer y tercer fragmento transmembranal tienen una gran homología, lo que podría indicar que sus genes podrían haber procedido de un tandem de genes que evolutivamente se



hubieran duplicado y fusionado (Green *et al.*, 1991).

El LHC II pudo ser identificado mediante técnicas de criofractura como un trímero que interaccionaba con otros semejantes por fuerzas de Van der Waals (Kühlbrandt y Wang, 1991). La función principal de sus respectivos fragmentos transmembranales sería crear un espacio en el cual las moléculas de clorofila tendrían una distribución y orientación adecuada para la transferencia de la energía fotónica. Ésta se realizaría, dentro de cada monómero, por conversión interna y, entre los monómeros de cada trímero y entre trímeros, por medio del mecanismo descrito por Förster (1965), siendo las moléculas de clorofila situadas en el perímetro de cada monómero las responsables de la transferencia entre LHC II adyacentes o entre el LHCII y el centro de reacción.

Los polipéptidos del LHC II pueden ser fosforilados aunque en distinto grado, siendo el polipéptido de 25 kD el que se fosforila más fácilmente (Larsson y Andersson, 1985). La fosforilación se produce en uno o dos residuos de treonina del extremo N-terminal y está asociada a cambios de las condiciones de luz durante periodos cortos de aclimatación. Además, se distinguen dos poblaciones del LHC II que se caracterizan por tener la misma composición pigmentaria, pero diferente contenido polipeptídico, grado de fosforilación y conexión al centro de reacción del fotosistema II (Larsson *et al.*, 1987; Spangfort y Andersson, 1989). Una de ellas está fuertemente unida al centro de reacción del fotosistema II, constituida exclusivamente por

---



## INTRODUCCIÓN

---

los polipéptidos de 27 kD y es denominada LHC II integral; mientras que el otro LHC II está más débilmente unido, presenta los polipéptidos de 27 kD y 25 kDa en igualdad estequiométrica y se denomina LHC II periférico. Cuando las condiciones de luz son excesivas, se fosforila el polipéptido de 25 kD y el LHCII periférico unido al PSII se disocia y migra hacia la membrana de la lamela. Así, el tamaño de la antena del PSII queda reducido como mecanismo de protección contra la fotoinhibición alcanzándose un funcionamiento más equilibrado en el transporte electrónico lineal entre ambos fotosistemas (Anderson y Andersson, 1988). Cuando plantas crecidas en condiciones de baja luminosidad son sometidas a altas intensidades de luz se produce la proteólisis de la antena periférica por la acción de una proteasa estromática que requiere luz, evitándose igualmente la fotoinhibición del fotosistema II (Lindahl y Andersson, 1992).

En condiciones de elevadas temperaturas 30-45°C también hay una disociación del fotosistema II, aunque en este caso el fotosistema II junto con el LHCII integral migran a la membrana estromática y el LHCII periférico se queda en la membrana *granal* (Gounaris *et al.*, 1984) siendo parcialmente reversible cuando baja la temperatura (Sundby y Andersson, 1985).

Complejos menores: CP 29, CP 26, CP 24 y CP 14

Los complejos menores de antena están localizados principalmente en los *grana* de la membrana tilacoidal, no se fosforilan y tendrían como principal función, según algunos



autores, conectar la antena mayor al centro de reacción (Bassi *et al.*, 1987). Otros grupos destacan que puedan regular la transferencia de la energía de excitación a los centros de reacción a través del ciclo de las xantofilas (Gilmore y Yamamoto, 1992; Dainese *et al.*, 1992). Tres de estos complejos de antena han sido denominados como CP 29, CP 26 y CP 24 teniendo en cuenta su aparente movilidad en geles nativos de poliacrilamida (Green *et al.*, 1982; Bassi *et al.*, 1987). Pertenecen al grupo de las proteínas Cab estando codificados por la misma familia de genes nucleares (Green *et al.*, 1991). Recientemente Irrgang *et al.* (1993) han señalado la existencia de otro complejo de antena menor con un peso molecular de 14-15 kDa, que han llamado CP 14-15.

El CP 29 parece estar fuertemente unido al centro de reacción del fotosistema II y está constituido por dos apoproteínas con una masa molecular de 29-31.5 kDa. Su relación de clorofila *a*/ clorofila *b* es 3.0-3.2 y el número de moléculas de clorofila por apoproteína difiere según los autores: 4 (Barbato *et al.*, 1989), 8 (Bassi y Dainese, 1989) o 10-12 (Henrysson *et al.*, 1989). El tratamiento con detergentes que puedan eliminar al CP 29 provoca alteraciones del transporte electrónico a nivel de la plastoquinona  $Q_B$  (Bowlby *et al.*, 1988).

El CP 26 tiene una apoproteína de 28 kDa con 5 moléculas de clorofila asociadas y una relación clorofila *a*/clorofila *b* de 2.7 según (Barbato *et al.*, 1989) o, de acuerdo con Bassi *et al.* (1990), 9 moléculas de clorofila y una relación de 2.2.

---



## INTRODUCCIÓN

---

El CP 24 está constituido por 1 ó 2 apoproteínas de 20 kDa, 5 moléculas de clorofila y una relación clorofila *a*/clorofila *b* de 0.8-1.2 (Dunahay y Staehlin, 1986). Puede ser eliminado fácilmente del centro de reacción junto con el LHC II, por lo que no parece ser un complejo que esté en estrecho contacto con el centro de reacción.

El CP 14-15 se caracteriza por tener 3 moléculas de clorofila *a* y una molécula de clorofila *b* por apoproteína y es una aportación reciente de Irrgang *et al.* (1993) a esta serie de complejos antenas menores.

### Antenas internas: CP 47 y CP 43

Estos complejos pigmento-proteína fueron inicialmente observados en geles de poliacrilamida con concentraciones suaves de SDS, constituyendo una única banda caracterizada por tener sólo clorofila *a* (Hayden y Hopkins, 1977; Anderson *et al.*, 1978). A bajas temperaturas en geles con LiDS, ésta se diferenció en dos componentes que se conocieron con el nombre de CP 47 y CP 43 (Delepelaire *et al.*, 1979) y constituyen la denominada antena interna.

Además de esta función principal del CP 47 y CP 43, se ha intentado adjudicarles otras, algunas ya mencionadas en esta introducción, como la de su asociación a las proteínas extrínsecas del sistema de fotólisis del agua o al mismo complejo de iones de Mn (Vermaas *et al.*, 1988; Odon y Bricker, 1992; Frankel y Bricker, 1992).



La apoproteína del CP 47 tiene un masa molecular aparente comprendida entre 47-51 kDa dependiendo de la planta y el sistema de gel utilizado para su análisis, y está codificada por un gen cloroplastídico denominado *psb B* altamente conservado (Vermaas *et al.*, 1987). Los análisis de hidropatía predicen la formación de 7 fragmentos transmembranales (Morris y Hermann, 1984) o 6 (Vermaas *et al.*, 1987). El número de moléculas de clorofila *a* descrito ha sido 20-25 (de Vitry *et al.*, 1984), 6-11 (Tang y Satoh, 1984) y 20-30 (Yamaguchi *et al.*, 1988) sugiriendo que sus ligandos sean histidinas, aminoácidos de asparagina y glutamina (Wechsler *et al.*, 1985) o grupos carbonilo y moléculas de agua (Tronrud *et al.*, 1986).

La apoproteína del CP 43 tiene un peso molecular comprendido entre 40-45 kDa y está codificada por un gen cloroplastídico denominado *psb C* altamente conservado (Morris y Herrmann, 1984). Los análisis de hidropatía predicen la formación de 7 fragmentos transmembranales (Alt *et al.*, 1984) ó 6 (Chisholm y Williams, 1988). El número de moléculas de clorofila *a* difiere según los autores, 11 (Akabori *et al.*, 1988) o 26 (Yamaguchi *et al.* 1988), proponiéndose igualmente que para el CP 47 otros ligandos para ellas además de la histidina. El CP 43 puede fosforilarse en un residuo de treonina por una kinasa diferente a la correspondiente al LHC II (Bennett *et al.*, 1984) sugiriéndose una función reguladora que provocaría la disociación del LHC II del centro de reacción del fotosistema II por un mecanismo de repulsión electrostática (Michel *et al.*, 1988).



## INTRODUCCIÓN

---

En la figura 7, se ilustra un esquema simplificado de la distribución de los complejos pigmento-proteína en torno al centro de reacción del fotosistema II.

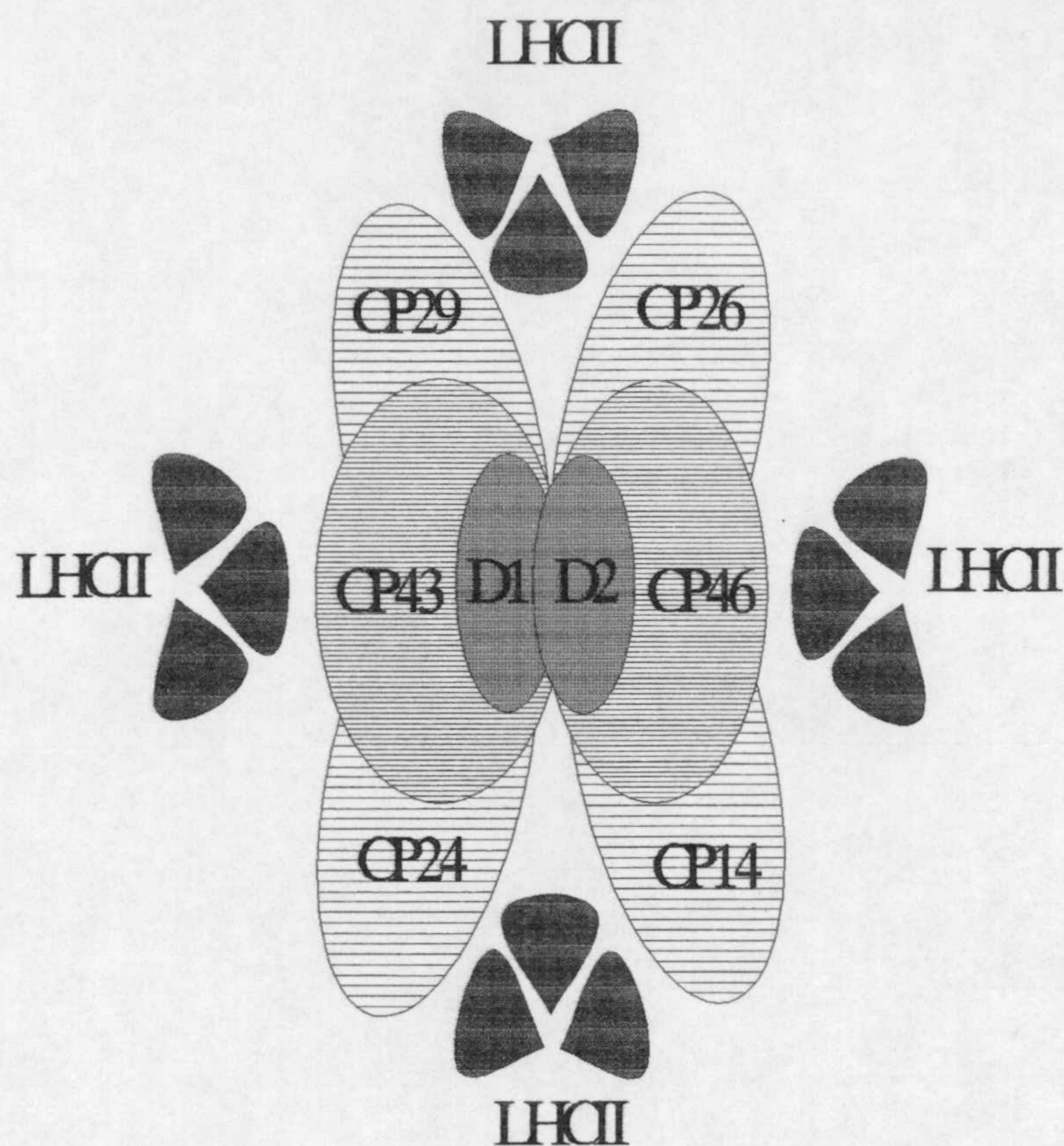


Figura 7. Modelo esquemático sobre la distribución de los complejos proteína-pigmento (Antenas internas CP 47 y CP 43; complejos menores CP 29, CP 26, CP 24 y CP 14 y la antena principal LHC II) en torno al centro de reacción del fotosistema II.

### Otros polipéptidos del fotosistema II:

Polipéptidos de 22 y 10 kDa

A ambos polipéptidos se les han asignado principalmente funciones de punto de anclaje para otros polipéptidos o de

---



regulación del transporte electrónico en el lado aceptor del fotosistema II.

La proteína de 10 kDa está codificada por el gen nuclear *psb R* (Hallic, 1989). Según Ljunberg *et al.* (1986) podría constituir un punto de anclaje para el polipéptido de 23 kDa del sistema de fotólisis del agua. La inactivación de su correspondiente gen provoca una disminución del desprendimiento del oxígeno de un 20-60%, debido probablemente a un desacoplamiento en el transporte electrónico en el lado aceptor a nivel de la  $Q_A$  (Stockhaus *et al.*, 1990).

La proteína de 22 kDa está codificada por el gen nuclear denominado *psb S* y los análisis de topología predicen cuatro fragmentos transmembranales (Kim *et al.*, 1992). La eliminación de éste o su ausencia en centros de reacción de fotosistema II (Ghanotakis *et al.*, 1987) ocasiona un desajuste del transporte electrónico entre  $Q_A$  y  $Q_B$ . Está localizada principalmente en el fotosistema II  $\alpha$  de los *grana* y en menor cantidad en el fotosistema II  $\beta$  de la membrana expuesta al estroma (Ljunberg *et al.*, 1986) y se ha sugerido que tendría una función importante en el ensamblaje del fotosistema II (Hundal *et al.*, 1990). La proteína de 22 kDa tiene cierta homología en su secuencia con las proteínas del LHC II en su cuarto fragmento transmembranal próximo al extremo C-terminal, y así algunos autores han sugerido su que pudiera englobarse junto con la familia de las proteínas Cab.

---



## INTRODUCCIÓN

---

Fosfoproteína de 9 kDa.

La fosforilación inducida por luz como mecanismo de regulación de la fotosíntesis, se lleva a cabo principalmente en varios polipéptidos del fotosistema II, entre los que está la proteína de 9 kDa denominada fosfoproteína (Bennett, 1984), codificada por el gen cloroplastídico *psb H* (Westhoff *et al.*, 1986). Se cree que esta proteína, al interaccionar con el sitio  $Q_B$  de la proteína D1, pueda favorecer la transferencia electrónica entre las plastoquinonas  $Q_A$  y  $Q_B$  (Mayes *et al.*, 1993).

Polipéptidos de baja masa molecular

Además de los polipéptidos descritos con anterioridad hay un pequeño conjunto de polipéptidos de bajo peso molecular, 3-7 kDa, asociados a las preparaciones de fotosistema II. El polipéptido de 5 kDa codificado por el gen cloroplastídico denominado *psb L* (Weber *et al.*, 1989; Ikeuchi *et al.*, 1989) tiene una función esencial en el ensamblaje del fotosistema II, ya que la delección de su gen en *Synechocystis* sp. PCC 6803 impide la formación del fotosistema II (Pakrasi y Vermaas, 1992). El gen cloroplastídico *psb J* se transcribe junto con el *psb L*, *psb E* y *psb F*, aunque no se ha caracterizado el polipéptido asociado a dicho gen. La delección del *psb J* en *Synechocystis* 6803 no impide la formación del fotosistema II y un crecimiento autotrófico, pero sí hay una disminución del desprendimiento de oxígeno (Nyhus *et al.*, 1989). Dos polipéptidos con un peso molecular aproximado de 4.7 kDa cada uno de ellos,



correspondiente a los genes cloroplastídicos *psb M* y *psb N*, han sido encontrados en el complejo de fotosistema II de *Synechococcus vulcanus* (Ikeuchi et al., 1989; Ikeuchi et al., 1990), pero no se han encontrado los correspondientes polipéptidos en plantas superiores. Los polipéptidos de codificación nuclear de 6.1 kDa (Schröder et al., 1988; Ikeuchi et al., 1989) y de 5 kDa (Ljunberg et al., 1986; Ikeuchi et al., 1989) han sido observados en el fotosistema II de plantas superiores. El polipéptido de 6.1 kDa no es esencial para el desprendimiento de oxígeno y no está presente en cianobacterias (Koike et al., 1989,1990; Ikeuchi et al.,1989), no existiendo tampoco una correlación entre el polipéptido de 5kD encontrado en plantas superiores con el de 5kDa detectado en *Synechococcus vulcanus* (Ikeuchi et al., 1989,1990). Un polipéptido de aproximadamente 3,9 kDa, asociado al sistema de fotólisis del agua está codificado por un gen cloroplastídico denominado *psb K* cuyo extremo N-terminal está expuesto a la cara luminal de la membrana tilacoidal (Koike et al., 1989; Murata et al., 1988; Ikeuchi et al., 1989,1991); no es esencial para el desprendimiento de oxígeno, ya que no hay una acusada disminución cuando se elimina del fotosistema II y, en mutantes de *Synechocystis* sp. PCC 6803, con una delección de dicho gen hay un crecimiento autotrófico (Ikeuchi et al., 1991).

En la tabla 3, están descritos todos los polipéptidos conocidos del fotosistema II junto con los genes que los codifican y sus propiedades y características más relevantes.

---



## INTRODUCCIÓN

Tabla 3. Nombres de los genes y polipéptidos que constituyen el fotosistema II y algunas de sus principales características

Nombre del gen nuclear (n) o cloroplastídico (c)	Proteína (kDa)	Localización (Fragmentos membranales)	Función	Fosforilación
<i>psb A</i> (c)	D1 (32)	Proteína intrínseca (5)	Centro de reacción	+
<i>psb B</i> (c)	CP 47 (47-51)	Proteína intrínseca (6-7)	Antena interna	
<i>psb C</i> (c)	CP 43 (43-47)	Proteína intrínseca (6-7)	Antena interna	+
<i>psb D</i> (c)	D2 (34)	Proteína intrínseca (5)	Centro de reacción	+
<i>psb E</i> (c)	Cit. b-559 (9)	Proteína intrínseca (1)	Transporte electrónico cíclico.	
<i>psb F</i> (c)	Cit. b-559 (4)	Proteína intrínseca (1)	Transporte electrónico cíclico.	
<i>psb H</i> (c)	fosfoproteína (7.6)	Proteína intrínseca (1)	Regulación del lado aceptor	+
<i>psb I</i> (c)	Polipéptido I (4.2)	Proteína intrínseca (1)	Asociada al C.R.	
<i>psb J</i> (c)	? (< 5)	Proteína intrínseca (1)	?	
<i>psb K</i> (c)	Polipéptido K (4.3)	Proteína intrínseca (1)	1	
<i>psb L</i> (c)	Polipéptido L (4.3)	Proteína intrínseca (1)	?	
<i>psb M</i> (c)	Polipéptido M (3.8)	Proteína intrínseca (1)	?	
<i>psb N</i> (c)	Polipéptido N (4.7)	proteína intrínseca	?	
<i>psb O</i> (n)	SFA (33)	proteína extrínseca	Regulación del SFA	
<i>psb P</i> (n)	SFA (23)	proteína extrínseca	Regulación del SFA	
<i>psb Q</i> (n)	SFA (16)	proteína extrínseca	Regulación del SFA	
<i>psb R</i> (n)	Polipéptido de 10 kDa (10)	Proteína intrínseca ?	Anclaje de los polipéptidos del SFA	
<i>psb S</i> (n) Cab?	Polipéptido de 22 kDa (22)	Proteína intrínseca (4)	Regulación del lado aceptor	
Cab II tipo 1 (n)	LHC II (27)	Proteína intrínseca (3)	Antena mayor	+
Cab II tipo 2 (n)	LHC II (25)	Proteína intrínseca (3)	Antena mayor	+
Cab (n)	CP 29 (29)	Proteína intrínseca (3)	Regulación del lado aceptor	
Cab (n)	CP 26 (26)	Proteína intrínseca (?)	Regulación fotónica	
Cab (n)	CP 24 (24)	Proteína intrínseca (2-3)	Conexión del LHC con CR	



#### D. Heterogeneidad del fotosistema II

El concepto de heterogeneidad del fotosistema II fue inicialmente introducido para explicar las razones por las que se observan dos cinéticas distintas asociadas, a medidas de fluorescencia inducida por luz en membranas tilacoidales en presencia de herbicidas inhibidores del fotosistema II. Se ha propuesto la existencia dos tipos de fotosistema II denominados fotosistema II  $\alpha$  y  $\beta$  (Melis y Homann, 1976; Melis y Duysens, 1979). La diferencia cinética entre ambas partículas de fotosistema II se debe a un distinto tamaño de sus antenas LHC II (Melis y Duysens, 1979; Thielen y van Gorkom, 1981). El fotosistema II $\alpha$ , situado principalmente en los *grana* está en una proporción del 75-80%, teniendo asociado a él tanto el LHC II interno como el periférico (Larsson *et al.*, 1987; Ghirardi y Melis, 1988; Green *et al.*, 1988) y un número de moléculas de clorofila comprendido entre 210-255; mientras que el fotosistema II $\beta$  ocupa el restante 20-25% de PS II y contiene únicamente asociado el LHC II interno (Ghirardi y Melis, 1988, Greene *et al.*, 1988) con un número total de 130 clorofilas y se encuentra en la lamela de la membrana tilacoidal.

Pero además de la diferencia de tamaño de antena, se han observado diferencias en la capacidad de transferencia electrónica entre  $Q_A$  y  $Q_B$  (Melis, 1985), por lo que se han distinguido también complejos de fotosistema II incapaces de reducir  $Q_B$ , denominados fotosistema IIB, y aquellos que sí tienen esta capacidad. Aproximadamente hay entre un 20-25% de

---



## INTRODUCCIÓN

---

fotosistema IIB en membranas tilacoidales (Melis 1985; Greene *et al.*, 1988).

En especies mutantes con menor cantidad de clorofila *b*, o en cloroplastos en desarrollo, la proporción de PS IIB es un 80-90% del total del fotosistema II siendo mucho mayor que en cloroplastos maduros del tipo salvaje (Thielen y van Gorkom, 1981; Ghirardi y Melis, 1988, Greene *et al.*, 1988). Estos mismos autores proponen que hay una relación de proporcionalidad entre la presencia de clorofila *b* y LHC II periférico. Cuanto mayor es la proporción de LHC II periférico, menor es la proporción de PS IIB, por lo que sugirieron que el PS IIB es un precursor del PS IIA. Sin embargo, en las especies mutantes de clorofila *b* y cloroplastos en desarrollo, la proporción de fotosistema IIB no es de un 20% por lo que ha sido propuesto que el fotosistema IIB es una subpoblación del fotosistema IIB (Thielen y van Gorkom, 1981; Ghirardi y Melis, 1988; Greene *et al.*, 1988).

Melis (1991) ha creado un modelo que explica el papel fisiológico de los fotosistema IIB y los fotosistema IIB, mediante su participación en un proceso cíclico de reparación del PS II. Cuando el fotosistema IIA en los *grana* es dañado y pierde su actividad, el polipéptido D1 que tiene unido la  $Q_B$  necesita ser reemplazado (Mattoo *et al.*, 1981); en tales condiciones, se produce un desacoplamiento entre el LHC II periférico y el fotosistema IIA dañado (Sunby *et al.*, 1986), originando un fotosistema IIB que se desplaza hacia las lamelas estromáticas, donde es reemplazado su polipéptido D1 dañado por otro procedente



de una síntesis de novo (Mattoo y Edelman, 1987); sin embargo, en este nuevo fotosistema IIB aún no se puede llevar a cabo el transporte electrónico entre  $Q_A$  y  $Q_B$ , por lo que sería un fotosistema IIB. La activación del fotosistema IIB mediante la luz, todavía en debate, daría lugar a la formación de un fotosistema IIB capaz de reducir  $Q_B$  que migraría hasta la grana de la membrana tilaoidal donde se asociaría al LHC II periférico para formar definitivamente un PS II $\alpha$  activo.

## II. Cu Y FOTOSISTEMA II

### A. Función del Cu en el fotosistema II

El papel del Cu como elemento esencial en plantas superiores fue demostrado inicialmente por Sommer (1931) y Lipman et al. (1931). Estudios posteriores establecieron que el Cu participaba en diferentes procesos vegetales: respiración (Walker et al., 1981); fotosíntesis (Whatley et al., 1951; Barker et al., 1979); metabolismo de carbohidratos y proteínas (Delhaize et al., 1985; Lyszcz et al., 1976) y en la lignificación de la pared celular (Loneragan, 1982).

Para dilucidar la función del Cu en fotosíntesis, se realizaron experiencias con agentes quelantes para posteriormente determinar su efecto sobre la actividad fotosintética (Green et al., 1936). Los resultados mostraron una disminución de la capacidad de fijación de  $CO_2$ , mientras que las tasas de respiración mitocondrial se afectaban en menor grado. La misma disminución apareció en cultivos de plantas crecidas en



## INTRODUCCIÓN

---

condiciones deficientes de Cu y Mn, atribuyéndose a un efecto sobre procesos bioquímicos en los cuales el Cu era requerido o a cambios en la ultraestructura cloroplastídica inducidos por dichas condiciones (Bottrill *et al.*, 1970). Possingham y Spencer (1960) demostraron asimismo que la deficiencia en Cu inhibía el transporte electrónico fotosintético. Pero la confirmación directa de la participación del metal en este proceso se obtuvo con el descubrimiento de la plastocianina como una cuproproteína asociada al transporte electrónico en fotosistema I, en un estudio pionero de Katoh (1960) con *Chlorella elipsoidea*. Se demostró su presencia en todas las plantas superiores (Katoh *et al.*, 1961; Plesnicar *et al.*, 1970; Ramshow, 1973) y en algunas algas y cianobacterias (Gorman *et al.*, 1966; Sandmann y Böger, 1980, 1981; Viser *et al.*, 1974; Haehnel, 1986; Sandmann y Böger, 1983).

Existen también numerosos estudios que demuestran como la deficiencia en Cu en algas y plantas superiores puede conducir a una síntesis deficiente de plastocianina y a una inhibición del transporte electrónico en el fotosistema I (Sandmann y Böger, 1983; López-Gorgé *et al.*, 1985; Lastra *et al.*, 1987). Algunos de los anteriores autores, como López-Gorgé *et al.* (1985) y Lastra *et al.* (1987), trabajando con *Pinus radiata*, o Sandmann (1985) con el alga *Dunaliella parva*, encontraron una inhibición paralela del fotosistema II de difícil explicación. Casi 20 años antes se había mencionado este mismo efecto asociado a la acción de agentes quelantes del Cu, pero ya que el punto de acción de



aquellos era en ocasiones confuso, la idea de una posible función del Cu en el fotosistema II no había prosperado como campo de investigación (Trebst, 1966; Kato et al., 1966; Renger et al., 1967; Barr y Crane, 1976).

El desarrollo de métodos de fraccionamiento de la membrana tilacoidal por medios mecánicos o con detergentes llevó a la separación física de los fotosistemas I y II para su caracterización bioquímica posterior y a la detección de Cu en distintas preparaciones de fotosistema II. Anderson et al. (1964) fueron los primeros que, tras separar fracciones enriquecidas en cada uno de los fotosistemas mediante el uso de un detergente como la digitonina, encontraron 1.9 átomos de Cu por 100 moléculas de clorofila en la preparación correspondiente al fotosistema II. Al seguir localizándose Cu en otro tipo de preparaciones de este fotosistema, se propuso que fuera un constituyente de este complejo, asignándole un papel estructural o funcional como intermediario en el transporte electrónico. Droppa et al. (1990) destacan en una revisión bibliográfica la gran variabilidad del contenido en Cu del fotosistema II de diferentes especies vegetales analizadas (ver tabla 4), atribuyéndolo a diferencias en el método de aislamiento de dichas preparaciones o a la diversidad de las especies vegetales.

Diversas funciones fueron propuestas para el Cu encontrado en el fotosistema II de organismos fotosintéticos. Holdsworth et al. (1977), Ramaswamy y Madhusanem (1978) y Ono et al. (1984) implicaban al Cu en el lado donador del fotosistema II. Los

---



## INTRODUCCIÓN

---

primeros aislaron de la diatomea *Phaeodactylum Tricornutum* un complejo proteína pigmento de 850 kDa asociado a este fotosistema, con átomos de Cu y Mn en una relación estequiométrica de 8:1 que podrían colaborar en la fotólisis del agua mediante cambios en los estados de oxidación de ambos metales. Los dos últimos trabajos habían demostrado una correlación entre la capacidad del desprendimiento de O<sub>2</sub> y el contenido en Cu de partículas de fotosistema II sometidas a lavados con Tris.

Tabla 4. Contenido de Cu en preparaciones de partículas de fotosistema II de diferentes especies vegetales.

---

	Fot. II	LHC II	CP 26	Ref.
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1.7	-	-	(1)
<i>Vicia faba</i>	2.1	-	-	(2)
<i>Triticum aestivum</i>	4.2	4.3 (75%)	-	(3)
<i>Pisum sativum</i>	3.3	1.7 (50%)	-	(4)
Espinacea oleracea	5.7	-	-	(5)
	2.2	-	-	(6, 7)
	1.2	1.4 (75%)	-	(8, 3)
	2.5	1.4 (75%)	-	(9)
	1.8	1.5 (78%)	-	(3)
	0.1-1.0	-	1	(10)

---

(1) Holdsworth y Arshad (1977), (2) Goldfeld et al., (1979), (3) Sibbald y Green (1987), (4) Barón et al. (1992), (5) Anderson et al. (1964), (6) Droppa et al. (1984), (7) Horváth et al. (1984), (8) Sibbald y Green, (1987) (9) Droppa y Horváth, 1990 (10) Arvidsson et al. (1993)

Otros posibles lugares de acción del Cu en el fotosistema II que han sido objeto de estudio fueron los complejos antena.

---



Los contenidos de Cu en la antena principal (LHC II) y el complejo menor de antena CP 26 obtenidos por distintos autores, se detallan en la tabla anterior. La función propuesta para el Cu dentro del LHC II fue estructural o de colaboración en el ensamblaje del complejo, descartando su intervención en el transporte electrónico (Sibbald y Green, 1987). Arvidsson *et al.* (1993) encontraron Cu asociado al CP 26 y sugirieron que sería la buscada oxidasa del ciclo de las xantofilas, a la que se le había adjudicado un importante papel de protección ante la fotoinhibición.

Otro procedimiento para determinar la función del Cu en el fotosistema II fue el estudio, en plantas crecidas en condiciones deficientes en Cu, de los cambios producidos en la estructura, actividad y composición pigmentaria, polipeptídica y lipídica de este complejo. Droppa *et al.* (1984) y (1987), trabajando en condiciones de deficiencia extrema de Cu, observaron en plantas de remolacha (*Beta vulgaris*) y espinaca (*Spinacea oleracea*) una disminución del 63% en el contenido total de clorofila y pequeños cambios en la relación clorofila *a*/clorofila *b* en ambas plantas, además, de una inhibición del transporte electrónico en cada fotosistema. Sin embargo, no se observaron al microscopio electrónico cambios apreciables en la ultraestructura cloroplastídica. Respecto al patrón polipeptídico del fotosistema II, de las plantas, deficientes dos polipéptidos de 28 y 13.5 kDa habían desaparecido. Droppa *et al.* (1987) también habían descrito un cambio en la composición lipídica de la membrana con un

---



## INTRODUCCIÓN

---

incremento de los sulfolípidos y fosfolípidos, paralelo a una disminución de galactolípidos, registrando en los primeros una disminución en el contenido de ácidos grasos saturados.

Analizando el origen de los cambios mencionados, los autores pensaban que el polipéptido de 29 kDa podía pertenecer a los complejos antena anteriormente señalados. Sus medidas de bandas de termoluminiscencia habían situado la inhibición del transporte electrónico entre  $Q_A$  y  $Q_B$ , atribuyéndolo a los cambios en la composición lipídica que afectaban a la fluidez de la membrana en el entorno de estas plastoquinonas, dificultando el transporte electrónico.

En ensayos con plantas de guisante (*Pisum sativum*) crecidas en condiciones deficientes en Cu, Barón *et al.* (1988) obtuvieron una disminución del 40-50% de la actividad del fotosistema II y registraron dos nuevos polipéptidos de 12 kDa y 20 kDa dentro del patrón polipeptídico del fotosistema II. El contenido total y la composición de los ácidos grasos de los lípidos mostraron variaciones similares a las presentadas por los anteriores autores, detectándose una disminución del contenido de ácidos grasos insaturados que podía provocar una pérdida de la fluidez de la membrana tilacoidal en las proximidades del fotosistema II (Barón *et al.*, 1992). Aparecieron también cambios en la composición pigmentaria tal y como con anterioridad fue establecido por Baszinsky *et al.* (1978); Horvath *et al.* (1983) y Henriques *et al.* (1989), quienes propusieron que el Cu ejercía un efecto inhibitor sobre las primeras etapas de la biosíntesis

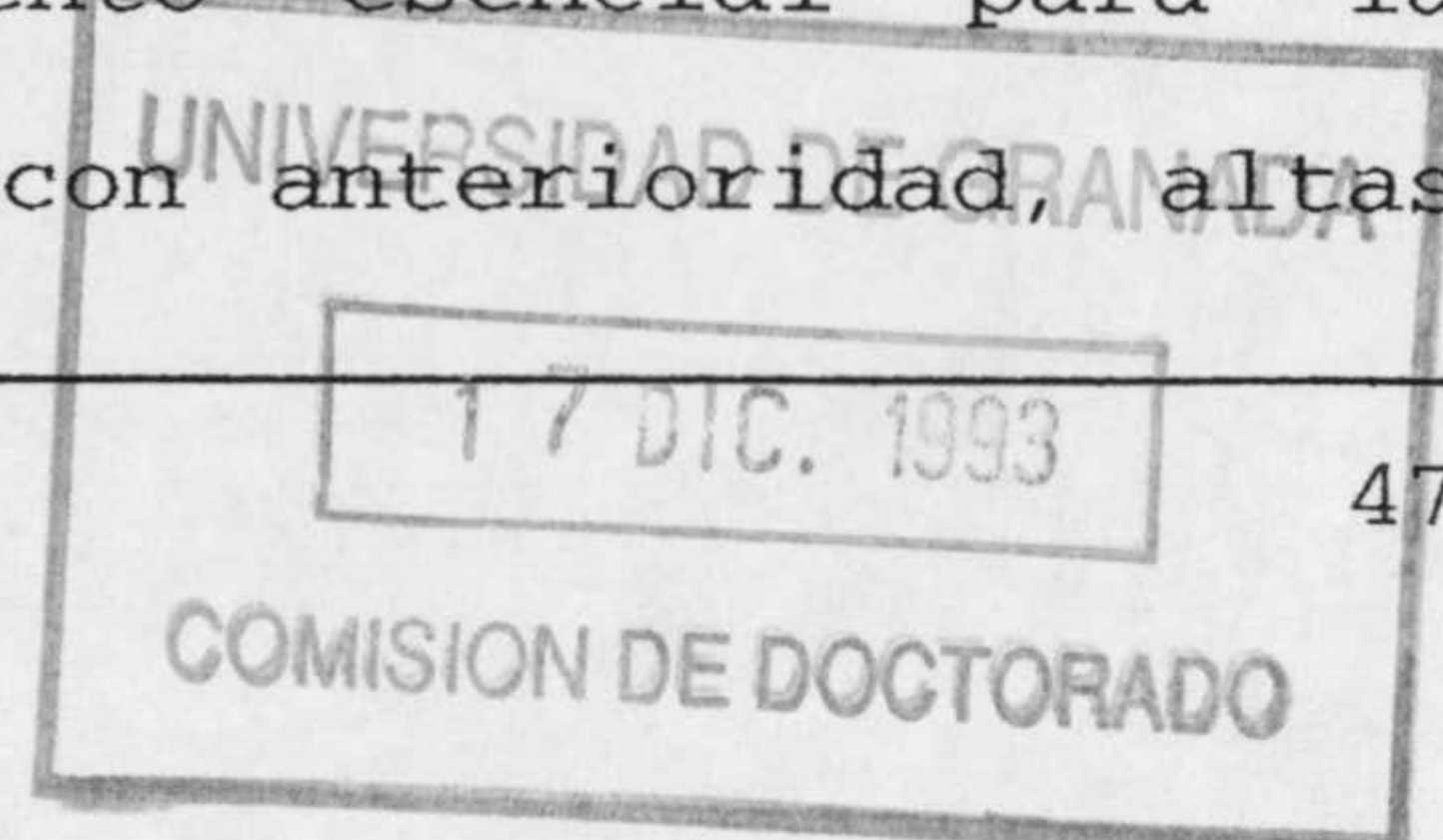


de terpenoides observando paralelamente una inhibición del transporte electrónico en el fotosistema II. Sin embargo, Barón *et al.* (1986) sólo obtuvieron ligeros cambios en el contenido de clorofila en condiciones de deficiencia severa en Cu y una disminución más acusada del contenido y composición de carotenoides del LHC II, aunque la composición de los complejos pigmento-proteína del centro de reacción quedaba prácticamente inalterada, determinándose que el contenido total de neoxantina y violaxantina en el LHCII permaneció constante, mientras los contenidos de anteraxantina, luteína y  $\alpha + \beta$  caroteno disminuyeron. En base a dichos resultados postularon que el Cu podría afectar la actividad del fotosistema II a través de cambios en su composición lipídica y pigmentaria que afectaban fundamentalmente a su antena principal.

Respecto a los cambios de la ultraestructura cloroplastídica que podrían afectar a la zona de los *grana* donde se sitúa principalmente el fotosistema II, los resultados son contradictorios. Casimiro *et al.* (1990) observaron una desorganización de la zona *granal* al igual que Henriques *et al.* (1989), aunque Vesik *et al.* (1966) y Droppa *et al.* (1984) no encontraron cambios significativos en la estructura de cloroplastos de espinaca bajo condiciones de deficiencia de Cu.

#### B. Efecto tóxico del Cu sobre el fotosistema II

Aunque el Cu es un microelemento esencial para la fotosíntesis tal como se ha descrito con anterioridad, altas





## INTRODUCCIÓN

---

concentraciones de este metal inhiben la actividad fotosintética, por lo que ha sido utilizado desde principios de siglo como algicida, herbicida y fungicida en agricultura (Greenfield, 1932).

En los últimos años, debido al incremento de su concentración en el medio ambiente, el Cu se ha convertido en un destacado contaminante y, por ello, numerosos estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han tratado de desentrañar su efecto tóxico. Los primeros ensayos realizados sobre el mecanismo de acción del Cu en fotosíntesis fueron llevados a cabo por Macdowall (1949) quien observó como el  $\text{CuSO}_4$  inhibía la reducción del indofenol en cloroplastos aislados. Steemann-Nielsen *et al.* (1969) comprobaron en un cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* con exceso de Cu que la inhibición de la actividad fotosintética era dependiente de la luz y del pH. Haberman (1969) demostró la reversibilidad del efecto tóxico por adición de Mn al medio; sin embargo, Gross *et al.* (1970) sólo encontraron una recuperación parcial de la actividad por Mn. Cedeño-Maldonado *et al.* (1972) concluyeron que el fotosistema II era más sensible a la inhibición por Cu que el fotosistema I, manifestando que dicha inhibición era irreversible y dependiente de la luz, dañándose el lado oxidante del fotosistema II.

Vierke *et al.* (1977) ratificaron esto último al demostrar que la inhibición por Cu del fotosistema II era revertida en preparaciones tratadas con Tris por la adición de difenilcarbocida, por lo que propusieron que el Cu inhibía el



sistema de fotólisis del agua. También, estudiaron los lugares de unión del Cu a la membrana tilacoidal en luz, mostrando por RSE que el Cu formaba un complejo con una proteína del fotosistema II, identificándose cuatro ligandos del metal como tres átomos de O y uno de N.

Shioi *et al.* (1978) determinaron que el sitio de acción del Cu estaba entre el centro de reacción del fotosistema II y el lugar de acción de la difenilcarbocida, ya que, a diferencia de los autores anteriores, no encontraban una recuperación de la actividad por adición de difenilcarbocida y observaron una disminución de la fluorescencia variable debido probablemente a un daño sobre el lado oxidante del fotosistema II; además, el Cu inhibía la actividad catalítica de la ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa. Bohner *et al.* (1980), en cultivos de *Scenedesmus acutus*, en condiciones tóxicas de Cu detectaron una pérdida de actividad tanto en el lado oxidante del fotosistema II como en el lado reductor del fotosistema I, tal y como habían encontrado ya con anterioridad Shioi *et al.* (1978).

Cuando Samuelson *et al.* (1980) estudiaron la reversibilidad por Mn del efecto inhibitor del Cu en el fotosistema II, comprobaron que ésta dependía del tampón de ensayo utilizado, siendo irreversible en tampón HEPES 50 mM pH 7.8 y parcialmente reversible en tampón fosfato 50 mM pH 7.8. La adición de EDTA en oscuridad antes de medir la actividad de la reacción de Hill  $H_2O \rightarrow DCIP$  asociada al fotosistema II, produjo una recuperación de ésta, independientemente del tampón utilizado. Con respecto al

---



## INTRODUCCIÓN

---

fotosistema I, determinaron la misma inhibición sobre la ferredoxina que Shioi *et al.* (1978) y Bohner *et al.* (1980).

Renganathan *et al.* (1989) también observaron que el efecto inhibitor del Cu sobre la reacción de Hill  $H_2O \rightarrow DCIP$  dependía de la naturaleza del tampón utilizado y se incrementaba con el siguiente orden Tricina < Tris < Tes < fosfato < Hepes = Mes. Asimismo, explicaron que compuestos utilizados en este tipo de estudios como DPC, DTT, ascorbato, hidroxilamina, ferricianuro y algunas benzoquinonas sustituidas podían reaccionar con el Cu.

Otros autores se sirvieron, para estudiar el efecto del Cu tóxico en el transporte electrónico, de las medidas de fluorescencia realizadas a temperatura ambiente que reflejan principalmente el estado del fotosistema II. Hsu *et al.* (1988) mostraron que la fluorescencia inicial  $F_0$  asociada al LHCII no variaba por un exceso de Cu, indicando que no había cambios en la transferencia de la energía de excitación entre el LHCII y el centro de reacción del PSII. Sin embargo, altas concentraciones de Cu provocaban un descenso en la fluorescencia variable sin cambios en la cinética de inducción, proponiendo que el Cu debería unirse en las proximidades del centro de reacción, creando una lesión reversible que incrementaría la probabilidad de disipación de la energía de excitación en forma de calor, aunque no inactivaría la separación de cargas entre el P680 y la feofitina. Samson *et al.* (1988), utilizando el alga verde *Dunaliella tertiolecta*, obtuvieron resultados similares a los anteriores y pensaron que el Cu bloquearía el transporte



electrónico en las proximidades de la tirosina Z, mientras que la velocidad de fotorreducción de  $Q_A$  no se encontraría afectada. Renganathan *et al.* (1989) se sumaban a los partidarios del centro de reacción como punto de acción del Cu tóxico, al comprobar que los porcentajes de inhibición por Cu en las reacciones de Hill  $H_2O \rightarrow SiMo$  en presencia de DCMU,  $Mn \rightarrow DCIP$  y  $Mn \rightarrow SiMo$  en presencia de DCMU eran similares. Sus medidas de fluorescencia variable demostraron asimismo que un cierto porcentaje de centros de reacción permanecerían resistentes a la toxicidad y sugirieron que estos pertenecían al fotosistema II  $\beta$  descrito por Melis (1985), por último determinaron que 1 átomo de Cu se une al centro de reacción, sugiriendo que residuos de histidina próximos al centro de reacción podrían formar un complejo con Cu que perturbara su funcionamiento normal.

Mohanty *et al.* (1989) interpretaron la disminución de la fluorescencia variable que no se recuperaba en presencia de donadores como DPC, ascorbato o Mn, en términos de inhibición del lado aceptor o proximidades del centro de reacción, basándose en medidas de las bandas de termoluminiscencia asociadas a las reacciones de recombinación  $S_2Q_B^-$  y  $S_2Q_A^-$ , explicando que el Cu podría inducir un cambio estructural en la proteína D1 que alteraba el transporte electrónico a nivel del sitio  $Q_B$ .

Renger *et al.* (1993) también opinaban que el Cu, a bajas concentraciones, podría modificar el sitio  $Q_B$  disminuyendo la afinidad de la atrazina por éste, aunque no modificaba el número de sitios de unión. Pero, para altas concentraciones de Cu

---



## INTRODUCCIÓN

---

( $\approx 10\mu\text{M}$ ) observaban otro efecto sobre el lado donador del fotosistema II entorno a la tirosina Z que bloqueaba el desprendimiento de oxígeno y no observaron una disminución del contenido de Mn para concentraciones de Cu inferiores a  $70\mu\text{M}$ .

Sin embargo, Yruela *et al.* (1991) defendían la existencia de un punto de acción del Cu en el transporte electrónico anterior al sitio  $Q_B$ , en la región feofitina- $Q_A$ - $\text{Fe}^{+2}$  no hemínico. Para ello, primero descartaron que el Cu pudiera desplazar al  $\text{Fe}^{+2}$  no hemínico situado entre  $Q_A$  y  $Q_B$  estudiando la señal de RSE  $g=8.1$ , posteriormente observaron que el desprendimiento de oxígeno en las partículas de fotosistema II era inhibido por Cu utilizando como aceptor electrónico 2,6 diclorobenzoquinona o ferricianuro, pero no cuando utilizaban silicomolibdato que consideraban un aceptor electrónico a nivel de feofitina. En trabajos posteriores, Yruela *et al.* (1992, 1993) propusieron que el Cu interaccionaba con un residuo aminoacídico con carácter ácido-base, determinando con centros de reacción de *Rhodospirillum Rubrum* y partículas de fotosistema II de remolacha (*Beta vulgaris*) que el sitio de inhibición del Cu era similar en ambos, situándolo en los residuos de His217, Tri220, Trip280 del polipéptido M y Glu104 del polipéptido L de los centros de reacción de bacterias purpúreas.

En la figura 8 se esquematizan, todos aquellos puntos de la cadena del transporte electrónico del fotosistema II donde se ha sugerido que el Cu pudiera tener su efecto tóxico. Además, se incluyen algunos donadores y aceptores más utilizados en las



reacciones de Hill dentro de fotosistema II, indicando en que puntos de la cadena se ha sugerido su participación.

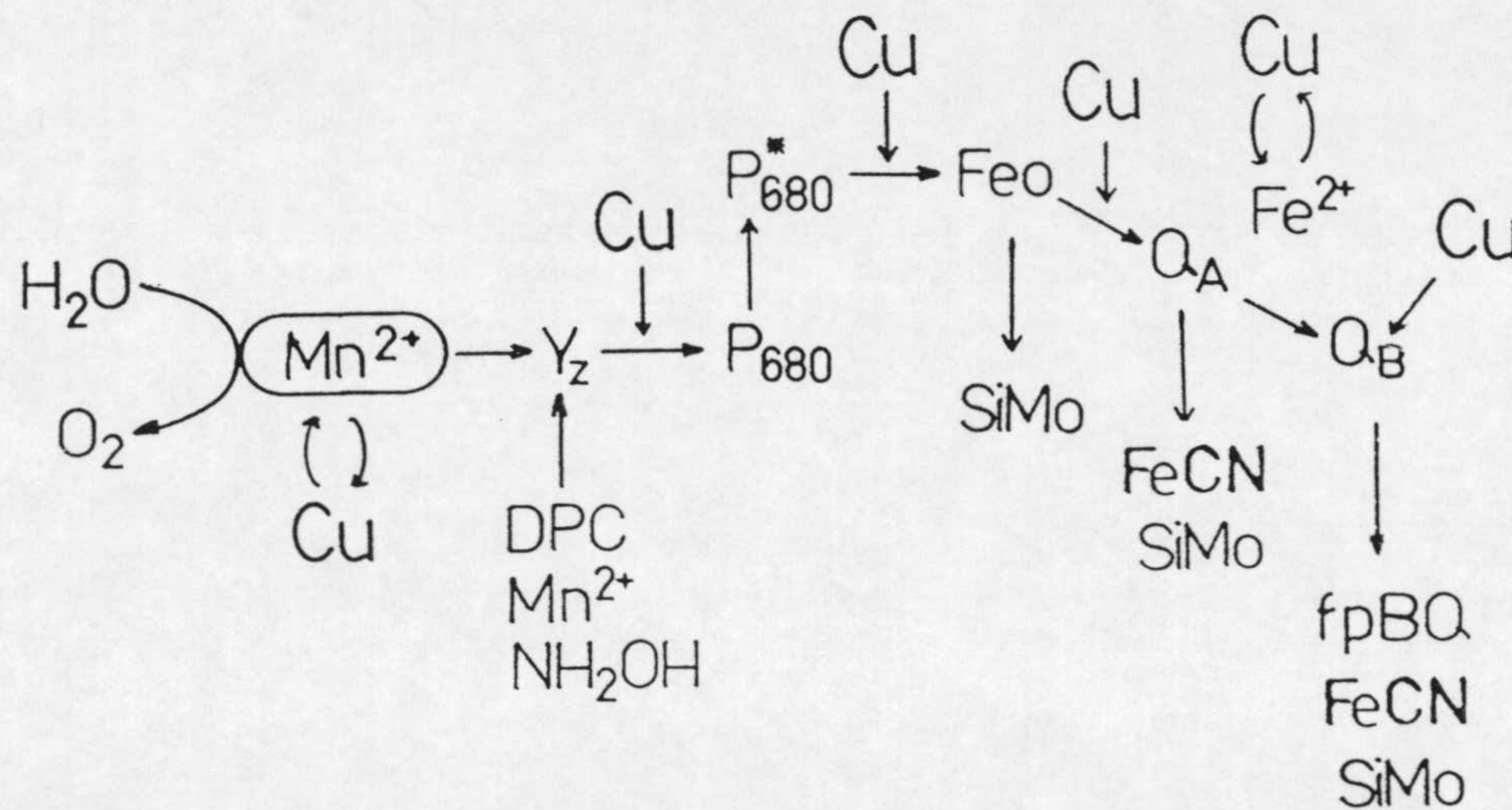


Figura 8. Principales puntos de la cadena del transporte electrónico del fotosistema II propuestos como puntos de acción del Cu tóxico. Se incluyen los lugares de acción sugeridos para los donadores  $Mn^{2+}$ , difenilcarbocida (DPC) y  $NH_2OH$ , y los aceptores silicomolibdato (SiMo),  $K_3[Fe(CN)_6]$  (FeCN) y fenil-p-benzoquinona (fpBQ).

Otra serie de autores habían relacionado la inhibición del transporte electrónico por concentraciones tóxicas de Cu en el fotosistema II con diversos efectos del Cu sobre los lípidos y pigmentos de la membrana tilacoidal. Sandmann *et al.* (1980) propusieron que el bloqueo del transporte electrónico por Cu conducía a una hiperproducción de radicales libres de oxígeno magnificada por el Cu mediante la reacción de Fenton (Farrington *et al.*, 1973), lo que provocaba la peroxidación de los lípidos de membrana y su destrucción (Dumelin y Tappel, 1977).



## INTRODUCCIÓN

---

Igualmente, Takahama y Nishimura (1975) describieron la formación de radicales libres de oxígeno por inhibición del fotosistema II.

Baszynski *et al.* (1988) sugirieron que el exceso de Cu inhibía la biosíntesis de clorofilas y carotenoides asociados a los complejos proteína-pigmento del centro de reacción del fotosistema II, así como de lipoquinonas. Esto produciría cambios estructurales en el cloroplasto mediante una degradación de las membranas granales y estromáticas junto con un incremento de plastoglobulinas e inclusiones.

Maksymiec *et al.* (1992) encontraron estos mismos cambios y los asociaban con una pérdida de la actividad fotosintética en fotosistema II, ya que los lípidos afectados formaban parte principalmente de este fotosistema regulando su actividad (Murata *et al.*, 1990; Siegenthaler *et al.*, 1986; Kruppa 1988; Tremolieres *et al.*, 1982). Además, el cambio estructural originado por la disminución del contenido de lípidos provocaría una degradación más acusada de ellos, liberándose sus correspondientes ácidos grasos insaturados que inhibirían adicionalmente la actividad del fotosistema II (Krogmann *et al.*, 1959; Siegenthaler, 1974; Schröder *et al.*, 1992). Lindon *et al.* (1991) observaron en plantas de arroz crecidas en condiciones tóxicas de Cu que los niveles de este metal se incrementaban progresivamente en los nuevos tejidos inhibiendo la síntesis de clorofila y carotenoides provocando una disminución del transporte electrónico en la membrana tilacoidal.



**OBJETIVOS**



El Cu es un micronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de plantas superiores, observándose que pequeñas variaciones en su concentración óptima en el medio producen graves alteraciones bioquímicas que afectan directamente al desarrollo de la planta. En fotosíntesis se han estudiado con gran interés los cambios que se producen en la membrana tilacoidal y las variaciones sobre el transporte electrónico bajo condiciones de deficiencia o toxicidad en dicho metal, ya que éste transporte es el principal responsable de la formación de ATP y NADPH<sup>+</sup>, imprescindibles ambos para el metabolismo de la planta. La determinación de los puntos afectados por Cu en condiciones de estrés es de un gran interés, dado los graves problemas medioambientales de contaminación de suelos y ríos por metales pesados que tienen los países más industrializados debido principalmente a la creciente polución por residuos industriales y uso agrícola como pesticidas. Así que, se abriría la posibilidad de desarrollar nuevos mecanismos de resistencia, con el consiguiente beneficio en la recuperación de terrenos contaminados.

Este estudio se ha centrado principalmente sobre el complejo del fotosistema II integrado en la membrana tilacoidal y que participa activamente en el transporte electrónico. Aunque la presencia de Cu a nivel del fotosistema II había sido apuntada últimamente por distintos autores, la cuestión sobre si el Cu es un elemento estructurador del fotosistema II seguía aún en debate, habiéndose propuesto diversas funciones. También se había

---



## OBJETIVOS

---

estudiado el efecto tóxico que el Cu produce sobre el mismo fotosistema, proponiendo diversos puntos sobre los cuales dicho elemento bloquearía el transporte electrónico. Sin embargo la diversidad de resultados con respecto al contenido en Cude este fotosistema II y el hecho de que anteriores autores hicieran el estudio correspondiente con reactivos o condiciones inadecuadas han provocado que hoy en día, aún sabiendo que el fotosistema II es inhibido por altas concentraciones de Cu, no se conozca con certeza qué componentes del fotosistema II quedan bloqueados por su acción. La disponibilidad de técnicas bioquímicas y biofísicas en nuestro grupo de trabajo y la colaboración con otros laboratorios extranjeros que han ofrecido sus técnicas como la espectroscopía de absorción inducida por flash (Instituto Max Volmer de la Universidad Técnica de Berlín) y la resonancia de spin electrónico (Laboratorio Arrhenius de la Universidad de Estocolmo) han permitido que hagamos un estudio más exhaustivo del efecto tóxico del Cu sobre el fotosistema II.

Los objetivos concretos de nuestro estudio fueron:

- Estudio de una posible función del Cu en el fotosistema II.

- Obtención de una preparación de partículas de fotosistema II con un mayor grado de pureza, para determinar adecuadamente la composición polipeptídica y de metales de dicho fotosistema y para garantizar igualmente una adecuada interpretación de los



resultados obtenidos en cada una de las técnicas que se utilizarían en el presente estudio.

- Determinación del punto de la cadena del transporte electrónico del fotosistema II donde el Cu ejercería su efecto tóxico.

- Estudio de los posibles mecanismos que el fotosistema II podría utilizar para superar la situación de estrés creada bajo concentraciones tóxicas de Cu, en las que el transporte fisiológico quedara inactivado.



**MATERIAL Y MÉTODOS**



## MATERIAL Y MÉTODOS

### A. MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron plantas de espinaca (*Spinacea oleracea* L.) y guisante (*Pisum sativum* L. variedad Lincon) cultivadas en el laboratorio y, en ocasiones, plantas de espinaca procedentes del mercado local.

#### A.1. Germinación y crecimiento de plántulas.

Las semillas de guisante o espinaca, tras seis horas de imbibición, se distribuyeron en bateas de polietileno que contenían una capa de vermiculita, cubriéndose con otra a la que se le añadió agua suficiente para mantener el conjunto en condiciones óptimas de humedad y aireación.

Las bateas se mantuvieron en una cámara de cultivo Koxka, modelo Api 19/2 MPG, con un fotoperiodo de 14 h, 70% de humedad relativa y temperatura controlada (25-20°C, día-noche) e iluminación de 600  $\mu\text{mol/m/s}$ . Periódicamente se compensó la pérdida de agua debida a la transpiración. Tras dos semanas, en las plántulas aparecía la segunda hoja y se transplantaban a los medios hidropónicos.

#### A.2. Cultivo en cámara con solución hidropónica completa.

La solución nutritiva utilizada tenía un pH  $5.5 \pm 0.2$  y la composición siguiente en meq/l:  $\text{NO}_3^-$ , 11.65;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 4.66;  $\text{SO}_4^{2-}$ , 2.33;  $\text{K}^+$ , 5.96;  $\text{Ca}^{+2}$ , 9.54;  $\text{Mg}^{+2}$ , 3.58 y en ppm:  $\text{Fe}^{+3}$ , 10;  $\text{Mn}^{+2}$ ,



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

0.5;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.5;  $\text{Cu}^{+2}$ , 0.05 y  $\text{Zn}^{+2}$ , 0.05.

Para el cultivo, se utilizaron recipientes troncocónicos de polietileno con una capacidad de 2.5 litros. En las tapaderas de los mismos, se practicaron seis orificios circulares de 2 cm de diámetro en los que se colocaron las plántulas sostenidas por pequeños cilindros de esponja de plástico que presentaban una incisión radial para alojar al tallo.

Las plántulas se cultivaron en una cámara de cultivo ASL con un fotoperiodo de 14 h, 70% de humedad relativa, temperatura controlada (25-20°C, día-noche) y con una iluminación de 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los medios se mantuvieron con aireación constante, renovando las soluciones nutritivas cuando el pH variaba más de 0.5 unidades.

### **A.3. Cultivo de plantas etioladas.**

Las plantas etioladas crecieron en bateas de germinación con vermiculita en la cámara de cultivo Koxka en oscuridad durante un periodo de 14 días, con un 70% de humedad relativa y una temperatura de 20°C, reponiéndose periódicamente las pérdidas de agua.

### **B. DETERMINACIÓN DE CLOROFILA**

Se midió la absorbancia de las muestras en una disolución de acetona en agua al 80% (V/V) a 645, 652 y 663 nm en un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer UV/VIS tipo Lambda 5.



El cálculo de la concentración de la clorofila total y relación clorofila a/clorofila b se llevó a cabo de acuerdo con los coeficientes de extinción de la clorofila a y b a 663 y 645 nm, con las siguientes ecuaciones (Lichtenthaler, 1987):

$$\text{Clorofila a (mg/L)} = 12.2A_{663} - 2.8A_{647}$$

$$\text{Clorofila b (mg/L)} = 21.5A_{647} - 5.1A_{663}$$

---

$$\text{Clorofila total (mg/L)} = 18.7A_{647} + 7.1A_{663}$$

Si se deseaba conocer únicamente la concentración total de clorofila, la medida se realizó a 652 nm, donde los coeficientes de extinción de clorofila a y b son iguales:

$$\text{Clorofila total (mg/l)} = 27.8A_{652}$$

### C. AISLAMIENTO DE FRACCIONES SUBCLOROPLASTÍDICAS

#### C.1. Preparación de membranas tilacoidales.

Las hojas de espinaca o guisante se lavaron con agua del grifo y posteriormente con agua desionizada. A las hojas secas y troceadas se les añadió el tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 7.4, sacarosa 300 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM en una proporción 1/3 (M/V) triturándose adecuadamente en el homogenizador Sorvall a velocidad máxima durante 15 s, 2 veces. La mezcla resultante se filtró a través de 6 capas de gasa de nylon para eliminar principalmente los restos groseros de hoja. El filtrado se centrifugó a 3000 g durante 15 min en una centrífuga Sorvall RC-

---



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

5B refrigerada a 4°C. El precipitado formado por cloroplastos con un tanto por ciento de integridad alto se lavó con el mismo tampón, centrifugándose a 1000 g durante 10 min. El segundo sedimento fue resuspendido en un medio hipotónico, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, para lisar los cloroplastos y eliminar su envoltura externa y proteínas estromáticas. Inmediatamente después, se añadió un volumen igual de tampón Mes-NaOH 50 mM pH 6.0, sacarosa 400 mM, NaCl 15 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM, y se centrifugó a 3000 g durante 10 min. El tercer sedimento constituido esencialmente por membranas tilacoidales se resuspendió en un tampón Mes-NaOH 2 mM pH 6.0, NaCl 15 mM y MgCl<sub>2</sub> 5mM, y nuevamente se centrifugó a 3000 g durante 10 min. El cuarto sedimento estaba constituido por membranas tilacoidales operativas para ensayos de transporte electrónico o de fluorescencia, aunque también dicho sedimento fue utilizado para el aislamiento de partículas de fotosistema II. Para su almacenamiento, las membranas tilacoidales fueron resuspendidas en un tampón Hepes-NaOH 50 mM pH 7.8, sacarosa 300 mM, NaCl 20 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM, y conservadas a -80°C.

### C.2. Obtención de partículas de fotosistema II

Son varios los procedimientos descritos para el aislamiento de las partículas de fotosistema II a partir de membranas tilacoidales. Los más conocidos están basados en la solubilización de la membrana tilacoidal mediante detergentes (Berthold *et al.* 1981; ver comentario crítico de diferentes métodos en Dunahay *et al.* 1984) y otros que llevan a cabo un



fraccionamiento mecánico de la membrana tilacoidal (Svensson *et al.* 1989).

Para la obtención de las preparaciones de fotosistema II utilizadas en nuestros experimentos seguimos el método de Berthold *et al.* (1981) con las modificaciones de Ford y Evans (1983). El sedimento final de membranas tilacoidales (Apartado C.1) fue resuspendido en tampón Mes-NaOH 2 mM pH 6.0, NaCl 15 mM y MgCl<sub>2</sub> 5mM, hasta alcanzar una concentración de clorofila de aproximadamente 2.5 mg/ml. La solubilización se llevó a cabo añadiendo Tritón X-100, hasta alcanzar una relación de 25:1 (M/M), Tritón X-100: clorofila. La mezcla se mantuvo agitando en oscuridad a 4°C durante 30 min, para centrifugarla posteriormente a 40.000 g durante 30 min. El primer sedimento de partículas de fotosistema II se resuspendió en tampón Mes-NaOH 50 mM pH 6.0, sacarosa 400 mM, NaCl 15 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM para eliminar principalmente el exceso de Tritón X-100 y los restos excesivamente solubilizados, centrifugándose nuevamente en las anteriores condiciones. Las partículas de fotosistema II obtenidas se resuspendieron en el tampón Mes-NaOH 50 mM pH 6.0, sacarosa 400 mM, NaCl 15 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM, y se conservaron a -80°C.

La modificación introducida en el método anterior para la obtención de unas partículas de fotosistema II sin contaminaciones nucleares ni restos de almidón, incluyó un paso adicional en el protocolo de aislamiento. Tras la solubilización de la membrana tilacoidal con Tritón X-100 a 4°C durante 25 min,

---



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

se centrifugó la suspensión a 10.000 g durante 4 min. Con el sobrenadante recogido, se continuó con el método de aislamiento habitual de las partículas de fotosistema II, volviéndose a centrifugar a 40.000 g durante 30 min dos veces. Paralelamente el precipitado de color blanco-verdoso se resuspendió y lavó varias veces con el tampón Mes-NaOH 50 mM pH 6.0, sacarosa 400 mM, NaCl 15 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM para eliminar los restos de membrana tilacoidal que no se solubilizaron suficientemente. Se centrifugó a 3000 g durante 5 min y el sedimento fue resuspendido en el tampón Mes-NaOH 50 mM pH 6.0, sacarosa 400 mM, NaCl 15 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM y conservado a -80°C para estudiar posteriormente su composición.

La preparación de partículas de fotosistema II aislada según el método original de Berthold *et al.* (1981) y posteriores modificaciones de Ford y Evans (1983) fue denominada BBY<sub>s+</sub>, mientras que la obtenida con la modificación introducida por nuestro grupo fue denominada BBY<sub>s-</sub>. Indicando con el subíndice s+ y s- la presencia o ausencia de almidón en cada una de las respectivas preparaciones (siendo la "s" la inicial de la palabra inglesa starch, almidón).

### C.3. Aislamiento de centros de reacción de fotosistema II

### C.4. Preparación de membranas tilacoidales de plantas etioladas y sometidas al enverdecimiento

Se utilizaron plantas etioladas de 14 días que fueron



expuestas a diferentes periodos de iluminación de una intensidad de 600  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  comprendidos entre 0 y 24 h, con la finalidad de observar la evolución de la composición polipeptídica de la membrana tilacoidal durante el enverdecimiento.

Las hojas se recogieron en una cámara oscura ayudados por una luz verde muy tenue y fueron homogeneizadas durante 5 s en tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 7.4, sacarosa 300 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM, filtrándose la mezcla resultante a través de 6 capas de gasa de nylon. El filtrado se centrifugó a 3000 g durante 10 min y el sedimento formado por etioplastos (para tiempo cero de iluminación) o por membranas tilacoidales en desarrollo (para los distintos periodos de iluminación) fue resuspendido en tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 7.4, sacarosa 300 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM, centrifugándose nuevamente en las mismas condiciones. Finalmente, el nuevo sedimento fue resuspendido en tampón HEPES-NaOH 50 mM pH 7.8, sacarosa 300 mM, NaCl 20 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM, y conservado a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### D. MÉTODO DE ELIMINACIÓN SELECTIVA DE POLIPÉPTIDOS CONSTITUYENTES DE LAS PREPARACIONES DE FOTOSISTEMA II

Los polipéptidos asociados al sistema de fotólisis del agua de 33, 23 y 16 kDa y otros polipéptidos del fotosistema II de 10 y 22 kDa pueden ser eliminados de forma selectiva de las partículas de fotosistema II, mediante el uso de soluciones con altas concentraciones de sales o una combinación de éstas con bajas concentraciones de detergente.



## MATERIAL Y MÉTODOS

El procedimiento que seguimos fue básicamente el descrito por Ljungberg et al. (1986). Las partículas de fotosistema II se suspendieron en un tampón Mes-NaOH 2 mM pH 6.0, NaCl 15 mM y MgCl<sub>2</sub> 5mM centrifugándose a 40000 g durante 15 min. Posteriormente, se volvió a suspender el sedimento en el mismo tampón hasta alcanzar una concentración de clorofila de 1 mg/ml. A continuación, se añadió un volumen equivalente de la solución de lavado correspondiente, manteniéndose en agitación durante 30 min a 4°C y en oscuridad. Transcurrido dicho periodo, se centrifugó a 40000 g durante 30 min recogiendo un precipitado de partículas de fotosistema II lavadas que fueron resuspendidas en el tampón Mes-NaOH 50 mM pH 6.0, sacarosa 400 mM, NaCl 15 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. El sobrenadante obtenido contenía los polipéptidos disociados y fue utilizado como marcador en la identificación del patrón polipeptídico del fotosistema II en geles de poliacrilamida con SDS.

Las soluciones utilizadas para la eliminación selectiva de polipéptidos fueron las siguientes:

a) Mes-NaOH 20mM pH 6.0 y NaCl 2 M. Se disociaban los polipéptidos de 23 y 16 kDa del sistema de fotólisis del agua.

b) Mes-NaOH 20 mM pH 6.0 y CaCl<sub>2</sub> 2 M. Se eliminaban los polipéptidos de 33, 23 y 16 kDa, y 2 átomos de Mn del sistema de fotólisis del agua.

c) Tris-HCl 1.6 M pH 8.4. Se perdían los polipéptidos de 33, 23, 16 y 10 kDa, y los 4 átomos de Mn del del complejo anterior.

d) Mes-NaOH 20 mM pH 6.0, KSCN 6M, CaCl<sub>2</sub> 100 mM y Tritón X-



100 0.02%. Se separaban los polipéptidos de 33, 23 y 16 kDa, y los 4 átomos de Mn del sistema de fotólisis del agua junto con los polipéptidos de 10 y 22 kDa.

#### E. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN Cu DE CLOROPLASTOS Y PREPARACIONES SUBCLOROPLASTÍDICAS

La suspensión de membranas tilacoidales o partículas de fotosistema II se homogeneizaron con un potter durante 1 min para asegurarse un tamaño adecuado de las partículas en suspensión. En un tubo de ensayo se pusieron 25  $\mu$ l de la suspensión, 5  $\mu$ l de 1-octanol y un volumen conocido de HNO<sub>3</sub> 13 mM, dependiente de la concentración estimada de Cu.

Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer modelo 503 equipado con un horno de grafito modelo HGA-400.

Los parámetros instrumentales utilizados para hacer la determinación cuantitativa de Cu se enumeran en la tabla 5 y el programa seleccionado para llevar a cabo la determinación cuantitativa de Cu se detalla en la siguiente tabla 6, donde se detalla el proceso que sufre la muestra y características de cada uno de sus pasos.

Las soluciones utilizadas para construir la curva patrón fueron preparadas a partir de una solución Tritisol (Merck) conteniendo 1,000 g Cu/l. Las alícuotas de 20  $\mu$ l se inyectaron manualmente en el horno de grafito y se hicieron un mínimo de dos medidas para cada una de las muestras inyectadas.



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Tabla 5. Parámetros instrumentales para la espectroscopía de absorción atómica electrotérmica

---

Longitud de onda analítica .....	324.7 nm
Anchura de rendija .....	0.7 nm
Corrección de fondo con lámpara de deuterio ..	Sí
Parámetro de medida .....	Altura de pico
Tubo de grafito .....	Normal
Gas .....	Nitrógeno
Volumen de la muestra inyectado .....	20 µl

---

Tabla 6. Programa del horno de grafito seleccionado para el análisis

---

Etapa	Temp (°C)	Rampa (s)	Tiempo (s)	Gas (ml/s)
Secado	100	20	10	300
Secado	130	10	10	300
Calcinación	900	10	10	300
Atomización	2265	0	3	0
Limpieza	2650	1	3	300

---

### F. ELECTROFORESIS VERTICAL EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS según Laemmli (1970) fue empleada como control de pureza de partículas de fotosistema II, para la identificación del patrón

---



polipeptídico de dicho fotosistema y como paso previo al inmunorrevelado y a la secuenciación del extremo N-terminal de algunas proteínas. Se empleó el equipo de electroforesis vertical de LKB 2001.

Los geles de 1.5 mm de espesor presentaban la siguiente composición: Gel separador (12 cm), acrilamida 17.5%, bisacrilamida 0.073%; urea 4 M; Tris-HCl 375 mM pH 8.7, SDS 0.1%, persulfato amónico 0.05% y 15  $\mu$ l de TEMED por cada 35 ml de solución de gelificación. Gel concentrador (1 cm) acrilamida 5%, bisacrilamida 0.013%; Tris-HCl 125 mM pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% persulfato amónico y 5  $\mu$ l de TEMED por cada 10 ml de disolución. Como tampón de desarrollo se utilizó Tris-HCl 25 mM pH 8.4, glicina 192 mM y SDS 0.1%.

La urea se omitiría en los geles que posteriormente serían utilizados para inmunoblotting, transferencia a membranas de PVDF o para electroelución de proteínas de interés.

Las muestras, con un contenido en clorofila de 25  $\mu$ g o 50  $\mu$ g de proteína, y los marcadores de masa molecular (Pharmacia) se solubilizaron en un volumen de tampón de carga (Tris-HCl 80 mM pH 6.8, SDS 0.1%, DTT 2%, glicerina 20%, bromofenol 0.02%(M/V)) idéntico al del tampón en el que estaban disueltos durante 30 min a temperatura ambiente, para posteriormente depositarlas en los pocillos correspondientes.

La electroforesis transcurrió con una intensidad de corriente constante de 10 mA por placa durante aproximadamente 15 h. La tinción de los geles se realizó a temperatura ambiente

---



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

con Azul-Coomassie R-250 al 0.25% (M/V) en metanol:acético:agua (45:10:45) (V/V) durante un periodo de 1 a 2 h. Posteriormente, se decoloraron con una solución de etanol:acético:agua (30:10:60) (V/V).

### **G. ELECTROELUCIÓN DE PROTEÍNAS SEPARADAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS**

Este proceso se empleó para recuperar ciertas proteínas de los geles de poliacrilamida, con la finalidad de obtener posteriormente sus respectivos anticuerpos. Se llevó a cabo según Matsudaira (1987) utilizando un equipo de electroelución Bio-Rad modelo 422. Las bandas de los geles de poliacrilamida que contenían las proteínas de interés fueron cortadas, troceadas y colocadas en los correspondientes tubos de vidrio del sistema provistos de una membrana con un tamaño de poro correspondiente a 3.5 kDa y una pieza de polipropileno poroso que separa los trozos del gel de poliacrilamida del reservorio de recuperación de proteínas. Se utilizó el mismo tampón de desarrollo de la electroforesis, aplicándose una corriente de 10 mA por tubo durante 5 h. Los polipéptidos se recuperaron finalmente en un volumen comprendido entre 400-600  $\mu$ l. La solución de cada uno de ellos fue dializada contra un tampón fosfato 10 mM pH 7.0 y SDS 0.1%. Para asegurar la pureza de las proteínas electroluídas, éstas se volvieron a someter a una separación electroforética, realizándose una nueva electroelución en las condiciones anteriormente señaladas.



#### H. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Para la obtención de anticuerpos policlonales se utilizaron las proteínas electroluídas de los geles de poliacrilamida, tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Para su inoculación se preparó una emulsión con alícuotas de 10 µg de proteína en 300 µl de Adyuvante completo (ACF) o incompleto (AIF) de Freund. Para la inmunización se utilizaron ratones Balb/C An/Kon. La primera inoculación se realizó en el lomo vía subcutánea con la proteína en ACF y, dos semanas más tarde, se inoculó nuevamente con la proteína en AIF. Transcurridas otras dos semanas, se sacrificó el animal y la sangre extraída se dejó coagular a temperatura ambiente de 4 a 6 h, llevándose a continuación a 4°C durante toda la noche para retraer el coágulo. Al día siguiente se centrifugó a 3000 g durante 10 min recogiendo el sobrenadante. El suero obtenido fue conservado a -20°C en varias alícuotas.

#### I. TRANSFERENCIA ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA (WESTERNBLOTTING). INMUNORREVELADO

Una vez desarrollada la electroforesis como se ha descrito en el apartado 6, se procedía a la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm de diámetro de poro (Millipore) según la técnica descrita por Towbin *et al.* (1979). El gel de electroforesis y la membrana de nitrocelulosa eran equilibrados durante 30 min con el tampón de transferencia

---



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

compuesto por Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y metanol al 20% (V/V). La transferencia electroforética de las proteínas se llevó a cabo en un equipo Bio-Rad (Trans Blot Cell, Munich) en cubeta refrigerada a 4°C en tampón Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y metanol 20% (V/V), durante 1 h a corriente constante de 0.6 A. Para identificar los patrones de peso molecular, se tiñó la porción correspondiente de membrana con una solución de rojo Ponceau (Ponceau S 0.4% (M/V), ácido tricloroacético 3% (V/V)) durante 5 min, decolorándose posteriormente con agua.

Finalizada la transferencia, el inmunorrevelado comenzó sumergiendo el papel de nitrocelulosa en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM y NaCl 140 mM (PBS) al 5% de leche desnatada en polvo (PBSA), durante 1 h, con el fin de bloquear los sitios de enlace inespecíficos. A continuación se incubó durante 15 h a 4°C con una dilución del suero anti entre 1/1000 y 1/5000 en PBSA, dependiendo de la actividad de los anticuerpos ensayados, lavándose posteriormente 3 veces durante 15 min con PBSA. La incubación con el anticuerpo secundario, una anti-IgG conjugada a peroxidasa de conejo o ratón dependiendo de la procedencia de los anticuerpos y desarrollada en cabra (Sigma Chem), se realizó durante 2 h con el anticuerpo secundario disuelto 1/1000 en PBSA, tras lo cual, se lavó la membrana 3 veces en periodos de 2 min a temperatura ambiente con PBS. Finalmente, el complejo antígeno-anticuerpo se reveló con una solución de 4-Cl<sup>-1</sup>-naftol 0.018% (M/V) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.006% (V/V) en PBS.



### J. TRANSFERENCIA ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE PVDF. SECUENCIACIÓN DEL EXTREMO N-TERMINAL DE LAS PROTEÍNAS TRANSFERIDAS

Una vez finalizada la electroforesis en SDS tal y como se ha descrito en el apartado F, se tomó el gel de poliacrilamida para llevar a cabo el electroblotting a membranas PVDF según Matsudaira (1987). Inicialmente, la membrana se sumergió en metanol puro durante 2-3 s, lavándose posteriormente con agua desionizada. Finalizada dicha operación, se equilibró la membrana de PVDF y el gel de poliacrilamida con el tampón de transferencia (CAPS 10 mM pH 11, metanol 10% (V/V)) durante un periodo de 15 min. El gel de poliacrilamida y la membrana de PVDF fueron colocados entre seis capas de papel de filtro que previamente se habían humedecido con el tampón de transferencia. El conjunto se colocó entre las dos superficies de grafito de un sistema semiseco de transferencia electroforética de proteínas JKA-Biotech. El exceso de tampón de transferencia fue eliminado para evitar cualquier encharcamiento entre las dos placas de grafito. La intensidad de corriente constante fue de 0.9 mA/cm<sup>2</sup> y la transferencia transcurrió durante 1 h. Cuando ésta finalizó, la membrana de PVDF fue lavada con agua desionizada para eliminar los excesos de Tris y glicina.

Para visualizar las proteínas transferidas a la membrana de PVDF, ésta se tiñó con una solución de azul Coomassie R-250 (0.1% (M/V) y metanol 50%(V/V)) durante 5 min y posteriormente se decoloró con una solución de agua, metanol y ácido acético



## MATERIAL Y MÉTODOS

(45:45:10). La membrana fue lavada varias veces con agua desionizada, secándose finalmente para conservarla a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para la secuenciación de las proteínas transferidas.

Las bandas de proteínas teñidas con azul Coomassie fueron cortadas y utilizadas en el secuenciador Applied Biosystem modelo 470.

### K. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN PREPARACIONES DE PARTÍCULAS DE FOTOSISTEMA II

#### K.1. Extracción de ácidos nucleicos

Se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Sambrook *et al.* (1989). La suspensión de partículas de fotosistema II con una concentración de 2 mg/ml de clorofila fue mezclada con un volumen igual de fenol, agitándose suavemente durante 5 min para conseguir la mayor extracción de proteínas y se centrifugó a velocidad máxima en una centrífuga de mesa Hermle z 229 durante 2 min. Se tomó la fase acuosa y fue tratada con cloroformo-alcohol isoamílico 24:1(V/V) durante 5 min para precipitar restos de proteína y eliminar el fenol disuelto. Posteriormente, se centrifugó durante 5 min, recogiendo la fase acuosa nuevamente para añadirle un volumen equivalente de etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y un volumen de NaAc 3 M correspondiente a la décima parte de la fase acuosa. La solución resultante fue enfriada a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas y, transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 5 min. El sedimento formado por los ácidos nucleicos se lavó con etanol al 70%(V/V) para eliminar los restos de sales y,



tras una nueva centrifugación en las mismas condiciones fue secado al vacío durante 1 h, resuspendiéndose finalmente en 40 µl de agua para la posterior determinación de su concentración y separación en geles de agarosa.

Para calcular la concentración de ácidos nucleicos, se midió la absorbancia a 260 nm de las muestras frente a un blanco de agua destilada, según el protocolo de Sambrook *et al.* (1989). Los cálculos se realizaron teniendo en cuenta que una disolución con 50 µg/ml de ADN tenía una absorbancia de 1.0 a 260 nm.

La relación entre las medidas de absorbancia a 260 nm y a 280 nm nos proporcionó una estimación del grado de pureza de la muestra de ácidos nucleicos, ya que si ésta era inferior a 1.8 indicaba una contaminación de la muestra de ácidos nucleicos por proteínas o fenol.

#### **K.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa**

La separación de los fragmentos de ácidos nucleicos presentes en nuestras muestras de partículas de fotosistema II (BBYs+ y BBYs-) se realizó según el método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Para ello, se prepararon geles de agarosa al 0.3% (M/V) en el tampón de desarrollo Tris-Borato pH 8.3 (Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M y EDTA 2 mM). La solución de carga (azul de bromofenol 0.3%(M/V) y glicerol al 30%(M/V)) fue añadida a las muestras de ácidos nucleicos y marcadores de peso molecular en una relación de volumen 1:5. Las muestras se agitaron e, inmediatamente después, fueron cargadas en sus respectivos



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

pocillos. La electroforesis se llevó a cabo con un voltaje de 5 a 10 V/cm durante un periodo comprendido entre 3 y 4 h en una cubeta horizontal, utilizándose el mencionado tampón de desarrollo.

Como patrones de peso molecular se utilizaron los fragmentos producidos por la digestión del ADN del fago lambda con la endonucleasa Hind III de 23.13, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.03, 0.56 y 0.13 Kb respectivamente.

Terminada la electroforesis, la tinción del gel se realizó con una solución de Bromuro de Etidio, 0.5 mg/ml, durante 30 min. Para visualizar las bandas de ácidos nucleicos se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta de 254 nm.

### **L. MEDIDAS POLAROGRÁFICAS DE DESPRENDIMIENTO DE O<sub>2</sub> POR PREPARACIONES SUBCLOROPLASTÍDICAS**

Uno de los sistemas de medida del desprendimiento de O<sub>2</sub> más utilizado fue diseñado por Delieu y Walker (1981). El electrodo de oxígeno de tipo Clark se caracteriza por ser una célula electroquímica en la que se genera una corriente eléctrica proporcional a la actividad del O<sub>2</sub> en solución. Está constituido por un cátodo de Pt y un ánodo de Ag entre los que hay un puente salino de KCl. Un fino papel de envolver cigarrillos asegura que el puente salino se mantenga entre ambos polos, mientras que una membrana de teflón separa el medio de ensayo de la disolución de KCl, aunque es permeable al O<sub>2</sub>.

En nuestro caso hemos utilizado el equipo Hansatech (modelo



LD-2, Kings Lynn, Norfolk, Reino Unido). La cámara del electrodo de oxígeno estaba cubierta por una camisa de agua que circulaba a su alrededor procedente de un termostato de inmersión. Acoplado a la base de esta cámara existía un agitador magnético que aseguraba la homogeneidad de la muestra. Dos proyectores de diapositivas comunes fueron utilizados simultáneamente para asegurar unas condiciones saturantes de luz. Una caja de control Hansatech CB1D conectada al electrodo de oxígeno mantenía una diferencia de potencial constante entre el cátodo y el ánodo, y desde dicha caja había una salida a un registrador.

Cuando el electrodo de oxígeno estaba estabilizado a la temperatura deseada, se procedía al calibrado del mismo. Para ello, se añadió 1 ml de agua destilada saturada de  $O_2$  en la cámara del electrodo. Posteriormente, se hizo borbotear  $N_2$  a través del agua destilada para desplazar el  $O_2$  disuelto. La diferencia entre ambas señales era proporcional a la concentración de oxígeno disuelto en agua a dicha temperatura.

Se ha medido el  $O_2$  desprendido por las partículas de fotosistema II en las reacciones de Hill  $H_2O \rightarrow$  fenil-*p*-BQ y  $H_2O \rightarrow$  SiMo a 20°C. En ambos casos el tampón utilizado fue Mes-NaOH 20 mM pH 6.5 y NaCl 10 mM, y la reacción transcurrió a 20 °C.

a)  $H_2O \rightarrow$  fenil-*p*-BQ.

La concentración de clorofila fue de 10  $\mu$ g/ml, se utilizó una concentración de fenil-*p*-BQ 400  $\mu$ M y el volumen final de la mezcla de reacción fue 1 ml. El medio de ensayo fue incubado en oscuridad durante un periodo de 2 min en la cámara del electrodo



## MATERIAL Y MÉTODOS

de oxígeno, antes de encender los dos proyectores deteniéndose finalmente la medida tras 1 min.

### b) $H_2O \rightarrow SiMo$

El volumen de la mezcla de reacción fue de 1 ml y la concentración de clorofila de la muestra de 20  $\mu g/ml$ , utilizándose una concentración de SiMo 0.1 mM. El medio de ensayo fue incubado en oscuridad durante un periodo de 2 min en la cámara del electrodo de oxígeno en ausencia de SiMo, siendo éste añadido antes de que los dos proyectores fueran encendidos. Transcurrido 1 min se pudo observar un declive del desprendimiento de oxígeno, lo que puso de manifiesto que el SiMo actuaba como aceptor durante los primeros momentos de medida, ya que posteriormente también inhibía el desprendimiento de oxígeno.

El desprendimiento de oxígeno expresado en  $\mu mol$  de  $O_2$  /mg de clor./h fue determinado sabiendo que la solubilidad del  $O_2$  en agua a 20 °C y 1 atm de presión es 0.276  $\mu mol/ml$ .

Para el estudio del efecto del Cu, DCMU y pH sobre las mencionadas reacciones de Hill, se utilizaron concentraciones de  $CuSO_4$  entre 1 y 100  $\mu M$ , de DCMU en un intervalo de 1 nM - 50  $\mu M$  y los valores de pH variaron entre 5 y 7.

## **M. TÉCNICAS DE MEDIDA DE LA FLUORESCENCIA MODULADA**

### **M.1. Introducción.**

La energía luminosa absorbida por la clorofila de una hoja es usada fundamentalmente para llevar a cabo el proceso fotosintético, aunque parte de esta energía puede perderse como



calor o volver a emitirse como fluorescencia. La fluorescencia de la clorofila *a* de plantas superiores refleja la actividad fotosintética que tiene lugar en el cloroplasto, dependiendo de múltiples factores como son el transporte electrónico a lo largo de la membrana tilacoidal, el gradiente protónico generado entre el estroma y lumen tilacoidal, la síntesis de ATP, la fosforilación del LHC II y las reacciones enzimáticas del ciclo de Benson-Calvin. A temperaturas fisiológicas la fluorescencia es emitida fundamentalmente por el fotosistema II, por lo que los cambios inducidos en fluorescencia y su respectiva cinética como respuesta a situaciones de estrés se deben principalmente a variaciones en dicho complejo (Baker *et al.* 1988).

#### M.2. Inducción de la fluorescencia.

Kautsky y Hirsch (1931) observaron cambios en la fluorescencia de la clorofila *a* cuando una hoja se iluminaba rápidamente después de un periodo de adaptación a la oscuridad de unos 15-20 min. La cinética característica de esta inducción de la fluorescencia constituye el efecto Kautsky cuyas fases se denominan OI, D, P, S, M, T (Papageorgiou, 1975). En nuestras condiciones de ensayo, utilizando partículas de fotosistema II, únicamente se han analizado las fases OI, D, P. Cuando estas preparaciones se iluminaban con una intensidad de luz incapaz de generar un transporte electrónico y todos los centros de reacción aún permanecían "abiertos" ( $Q_A$  oxidado), aparecía una señal de fluorescencia denominada  $F_0$  que era propia de la antena.

---



Posteriormente, la iluminación con luz actínica suficientemente intensa, provocaba un incremento de la fluorescencia desde  $F_0$  a través de una inflexión I y de la fase D hasta un pico (P) o un valor de fluorescencia máxima ( $F_M$ ) que era alcanzado cuando todos los centros de reacción estaban "cerrados" ( $Q_A$  reducido). La relación  $F_M/F_0$  tiene un valor comprendido entre 4 y 5, y distintas condiciones de estrés son capaces de inducir variaciones en dicho valor.

### M.3. Fluorescencia modulada.

La medida de la fluorescencia se puede efectuar utilizando luz de una longitud de onda determinada y detectar la fluorescencia en la zona correspondiente a 685 nm. Este método de medida, aunque útil, limita las posibilidades experimentales ya que no es posible utilizar luz actínica, es extremadamente difícil medir la fluorescencia inicial  $F_0$ , no permite el análisis del quenching y cada aumento en la intensidad de la lumínica provocará el de la fluorescencia, complicando aún más la interpretación de los resultados. Sin embargo, el uso de una luz modulada débil en conjunción con un sistema de fluorescencia que sólo recoge la emitida a la frecuencia y fase de la luz modulada, permite hacer una medida de la fluorescencia en presencia de luz continua de cualquier longitud de onda. Normalmente, la luz modulada es de una intensidad tan baja ( $<1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) que es incapaz de generar una curva de fluorescencia. Una fuente de luz continua (luz actínica) de al menos  $30 \mu\text{mol/m/s}$  se incluye en



instrumentos de este tipo para inducir la curva de Kautsky.

#### **M.4. Descripción del fluorímetro de fluorescencia modulada.**

El sistema mínimo del fluorímetro de fluorescencia modulado desarrollado por Schreiber denominado PAM (Walz, Effeltrich, Alemania) está constituido por la unidad de control PAM 101, la unidad emisor-detector ED 101 y la fibra óptica F 101.

La unidad de control PAM 101 está constituida por un generador de pulsos de luz, una caja control del diodo emisor y un amplificador selectivo que registra únicamente la señal de pulso modulado. En la unidad emisor-detector ED-101 la fluorescencia es inducida por pulsos de luz de 650 nm durante 1  $\mu$ s desde el diodo emisor de luz (LED). Los pulsos pueden ser de 1.6 KHz para la determinación de  $F_0$  o de 100 KHz cuando se estudia la cinética de la señal de fluorescencia inducida por luz, ya que en este último caso se mejora la relación señal/ruido. El haz de luz pulsado atraviesa un filtro de paso corto (longitud de onda  $< 680$  nm) con el que se elimina la componente de cola de longitud de onda larga. Cuando este haz llega hasta la hoja o suspensión de membranas tilacoidales a través de la fibra óptica F 101, se crea una señal de fluorescencia que es conducida nuevamente por la fibra óptica hasta el fotodiodo detector que se protege con un filtro de paso largo (longitud de onda  $> 700$  nm). Además, el sistema de preamplificación que contiene este módulo elimina selectivamente todas las señales a excepción de la fluorescencia excitada



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

durante los pulsos de medida de  $1\mu s$ . Junto a los módulos descritos, pueden haber otros como el PAM 103 cuya aplicación fundamental es el control de la generación de pulsos saturantes procedentes de la fuente de luz FL 103.

Para la medida de fluorescencia sobre una suspensión de membranas tilacoidales o partículas de fotosistema II, se utiliza la cubeta KS 101 fabricada especialmente para este tipo de fluorímetro con un adaptador para la fibra óptica F 101, un tubo al cual se adapta perfectamente una jeringa hipodérmica para posteriores adiciones, una superficie interna inferior que refleja la luz hacia la fibra óptica y una base que se ajusta a un agitador magnético.

### M.5. Determinación de los valores de $F_0$ y $F_M$ .

La medida de la fluorescencia de la clorofila inducida por la luz fue estudiada en partículas de fotosistema II y partículas de fotosistema II lavadas con Tris. El medio de ensayo estaba constituido por Mes-NaOH 20 mM pH 6.5 y NaCl 10 mM y la concentración de clorofila fue de 10  $\mu g/ml$ . A las partículas de fotosistema II lavadas con Tris, se les añadió  $MnCl_2$  2 mM como donador electrónico.

La determinación de la señal de fluorescencia  $F_0$  fue llevada a cabo por el PAM 101 usando un rayo de luz modulada de frecuencia de 1.6 KHz y una intensidad de luz de 10  $mW/m^2$  incapaz de inducir una transición electrónica. La fluorescencia máxima,  $F_M$ , fue determinada usando el PAM 103 con luz actínica procedente



de una fuente de luz fría (Schott KL 1500/KL 1500-T) de intensidad  $20\text{mW/m}^2$  suficiente como para reducir todo  $Q_A$  y frecuencia de 100 KHz. Los valores de  $F_0$ ,  $F_M$  y parámetros cinéticos fueron tratados con un programa de ordenador suministrado por la misma casa Walz, denominado DA-100, versión 1.06a.

El estudio sobre el efecto del pH y Cu tóxico sobre  $F_0$  y  $F_M$  se llevó a cabo con el medio de ensayo habitual a diferentes pHs comprendidos entre 5.0 y 7.0, y las concentraciones de Cu oscilaron entre 1 y 100  $\mu\text{M}$ .

#### N. TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN INDUCIDA POR FLASH DE RAYO LÁSER

Esta técnica se basa en la perturbación de un sistema en equilibrio por un pulso de luz intenso y suficientemente corto volviendo a relajarse el sistema transcurrido un periodo de tiempo determinado hasta un nuevo equilibrio. La perturbación causada es detectada gracias al cambio de absorbancia de la muestra a una longitud de onda seleccionada característica de una especie molecular generada durante la perturbación (Mathis, 1977).

##### N.1. Medidas de cambios de absorción a 830 nm inducidas por flash de rayo láser.

Cuando el P680 es excitado y posteriormente oxidado produciéndose consecuentemente la separación de cargas y

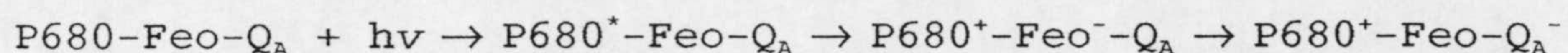
---



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

estabilización de ésta, se genera un radical catiónico de clorofila propio del P680.



La diferencia entre los espectros de absorción de  $\text{P680}^+$  y P680 muestra varios picos a 436 nm, 682 nm y 830 nm. En espectroscopía inducida por flash de láser es la longitud de onda de 830 nm ( $\epsilon = 6.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) la más utilizada en el estudio de la separación de cargas, ya que la radiación de esa longitud de onda no es fotosintéticamente activa y se puede incrementar su intensidad para la medida, siendo además la fluorescencia inducida también menor, lo que permite que los artefactos se eliminen mucho más fácilmente.

Cuando el sistema de fotólisis no está dañado, el  $\text{P680}^+$  es reducido en un tiempo de vida media de 25-45 ns en muestras adaptadas a la oscuridad; sin embargo, cuando se inhibe el sistema de fotólisis del agua por la adición de  $\text{NH}_2\text{OH}$  2mM, el  $\text{P680}^+$  es reducido mucho más lentamente mediante una cinética bifásica con unos tiempos de vida media de 20-40  $\mu\text{s}$  y 120-160  $\mu\text{s}$ , respectivamente (van Best y Mathis, 1978).

El espectrómetro de haz simple que hemos utilizado, construido en el Instituto Max Volmer de la Universidad Técnica de Berlín, tenía un tiempo de resolución de 2  $\mu\text{s}$  y estaba formado por los siguientes componentes: Una fuente de luz constituida por una lámpara de Xenon (Osram, XBO 150) de la cual procedía un haz



de luz que atravesaba un filtro de interferencia (Schott RG 715/3) para seleccionar la longitud de onda de 830 nm. La cubeta de medida tenía un paso óptico de 1cm. La señal del cambio de absorbancia procedente del detector llegaba hasta el amplificador de 1 MHz (Tektronix, AM 502) y posteriormente hasta un osciloscopio. El fotodetector estaba protegido con un filtro de interferencia (Schott RG-1000). Las partículas de fotosistema II fueron excitadas por pulsos de luz no saturantes, procedentes de una fuente de rayo láser NdYAG (Spektrum GmbH, Berlín) con una longitud de onda de 534 nm y una duración de 3 ns.

Para medir los cambios producidos por concentraciones tóxicas de Cu en la absorbancia a 830 nm de partículas de fotosistema II, centros de reacción y partículas de fotosistema II tratadas con Tris, seguimos el procedimiento descrito por Eckert *et al.* (1991) añadiendo  $\text{NH}_2\text{OH}$  2 mM e incubando durante 2 min en aquellos casos que fuera necesario para ralentizar el tiempo de reducción del  $\text{P680}^+$ . Todos los experimentos se llevaron a cabo con una concentración de clorofila de 50  $\mu\text{g/ml}$  en un medio que contenía Mes-NaOH 20 mM pH 6.0, NaCl 10 mM y DCBQ 100  $\mu\text{M}$ . El rango de concentración de Cu estuvo comprendido entre 0 y 100  $\mu\text{M}$ . Para aumentar la relación señal/ruido en cada uno de los experimentos, se hizo la media de 16 señales con una frecuencia de 1 Hz entre cada una de ellas y con un programa de ordenador diseñado para este equipo se hizo el cálculo de las componentes cinéticas de la caída de absorbancia asociada a la reducción del  $\text{P680}^+$ . En otro tipo de experimentos se excitaba la muestra con



una serie de 4 flashes, con la finalidad de poder distinguir si entre ellos había diferencias en sus respectivos incrementos de absorbancia y componentes cinéticas; para ello, la muestra fue renovada en la cubeta automáticamente después del cuarto flash y sustituida por otra fresca conservada en oscuridad.

### N.2. Medidas de cambios de absorbancia a 325, 355 y 436 nm inducidas por flash de rayo láser.

Los cambios de absorción en la región del ultravioleta y próxima a éste correspondientes a la reducción de  $Q_A$  (325 nm); a las transiciones de los estados S del sistema de fotólisis del agua (355 nm) y a la oxidación del P680 (436 nm) fueron seguidos en un fotómetro de haz simple construido en el Instituto Max Volmer de la Universidad de Berlín con un tiempo de resolución de 30  $\mu$ s. Se utilizó una lámpara de Xenon (Osram, XBO 150) para la emisión de pulsos de luz de medida cada 700 ms, que atravesaban un filtro de interferencia seleccionado para cada longitud de onda antes de llegar a la cubeta y tenían una intensidad apropiada para no inducir en más de un 5% la excitación de las partículas del fotosistema II, para evitar una doble transición en los estados S, después de cada flash de luz procedente de la fuente de un rayo laser NdYAG (Spektrum GmbH, Berlín) de una longitud de onda de 534 nm y era emitida en flashes con una duración de 3 ns. En nuestros experimentos se analizaron con un periodo de 700 ms los cambios de absorbancia a cada una de las longitudes señaladas tras cada flash de una



serie de 4 que correspondían con las transiciones S del sistema de fotólisis del agua. Para mejorar la relación señal/ruido se hizo la media de 90 medidas.

Para eliminar la oscilación binaria asociada al lado aceptor, en cada experimento se utilizó el aceptor electrónico DCBQ 100  $\mu\text{M}$  para la reoxidación de  $\text{Q}_\text{B}^-$ . Los experimentos se llevaron a cabo con una concentración de clorofila 10  $\mu\text{g/ml}$  en tampón Mes-NaOH 20 mM pH 6.5. Mediante un sistema automático, la muestra era evacuada de la cubeta después de cada serie de 4 flashes y una nueva alícuota conservada en oscuridad era adicionada. El rango de concentraciones de Cu ensayado estuvo comprendido entre 0 y 100  $\mu\text{M}$ .

#### O. TÉCNICAS DE RESONANCIA DE SPIN ELECTRÓNICO

La espectroscopía de resonancia de spin electrónico es una técnica fisico-química que ha permitido estudiar a fondo fenómenos biológicos hasta alcanzar su nivel molecular. A pesar de que con esta técnica es posible detectar o incluso caracterizar únicamente moléculas o especies químicas con electrones desapareados, la importancia del papel que con frecuencia desempeña este tipo de sustancias en procesos biológicos diversos hace de ella un instrumento específico de investigación.

La expresión matemática de la condición de resonancia del spin electrónico con la onda electromagnética que absorbe el electrón para pasar desde un estado de energía paralelo al campo

---



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

magnético externo  $E_1(\uparrow)$  hasta otro antiparalelo  $E_2(\downarrow)$  viene dada por la expresión  $h\nu=g\beta H$ . Donde  $\nu$  es la frecuencia de la radiación electromagnética,  $h$  es la constante de Planck,  $H$  es la intensidad del campo magnético externo,  $g$  es un factor característico del tipo de radical considerado y  $\beta$  es la constante del magnetón de Bohr.

El modelo del aparato de resonancia de spin electrónico utilizado fue Bruker ESP 300 equipado con un criostato y un controlador de temperatura. Los resultados fueron procesados con el programa ESP 300 del mismo aparato.

### 0.1. Tratamiento de la muestra.

#### 0.1.1. Muestra control

Las muestras de partículas de fotosistema II o partículas de fotosistema II tratadas con Tris se resuspendieron en tampón Mes-NaOH 50 mM pH 6.0, sacarosa 400 mM, NaCl 15 mM y  $MgCl_2$  5 mM hasta alcanzar una concentración de clorofila de 3-4 mg/ml. Se iluminaron durante 10-20 s con luz ambiental o procedente de un flexo de luz para asegurar un 100% de la señal II lenta asociada al radical de Tirosina  $D^+$  que fue utilizada como patrón para la cuantificación del spin electrónico de otros radicales.

#### 0.1.2. Muestra tratada con Cu

A la muestra tratada como se ha descrito en el apartado anterior, se le añadió  $CuSO_4$  hasta una concentración final 6 mM en absoluta oscuridad para no inducir el transporte electrónico y se incubó durante 2 min, añadiéndose nuevamente tampón Mes-NaOH



50 mM pH 6.0, sacarosa 400 mM, NaCl 15 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM hasta alcanzar una concentración de clorofila de 0.6-0.8 mg/ml. Para eliminar el exceso de Cu, la suspensión fue centrifugada durante 1 min en una centrífuga de mesa a velocidad máxima y el sedimento resultante se resuspendió en tampón Mes-NaOH 50 mM pH 6.0, sacarosa 400 mM, NaCl 15 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM hasta conseguir nuevamente una concentración de clorofila de 3-4 mg/ml. Este lavado se hizo para evitar, en la medida de lo posible, las distorsiones causadas por el exceso de Cu en el estudio posterior de las señales espectrales de algunos intermediarios electrónicos característicos del fotosistema II.

0.1.3. Eliminación del Cu con EDTA en experimentos de reversibilidad

La muestra tratada con Cu como anteriormente se ha indicado fue diluida hasta una concentración de clorofila de 0.6-0.8 mg/ml. Para saber si el efecto causado por Cu sobre el fotosistema II dependía de la luz la muestra era iluminada durante 5 s con un proyector de lámpara de tungsteno con una potencia de 1000 W en condiciones saturantes de luz. Posteriormente, la muestra se incubó durante 2 min con EDTA 5 mM, tras lo cual se centrifugó durante 1 min a velocidad máxima en una centrífuga de mesa. El precipitado se resuspendió en tampón Mes-NaOH 50 mM pH 6.0, sacarosa 400 mM, NaCl 15 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM hasta conseguir una concentración de clorofila de 0.6-0.8 mg/ml. Este tratamiento con EDTA se repitió hasta constatar que el espectro característico de la señal de Cu de RSE no se observaba.



El sedimento final fue suspendido hasta lograr una concentración de clorofila de 3-4 mg/ml y utilizado para hacer los correspondientes espectros.

### 0.2. Inducción del transporte electrónico por iluminación de la muestra.

Para inducir el transporte electrónico en las partículas de fotosistema II, éstas se iluminaron con una lámpara de tungsteno de 1000 W cuyo haz de luz atravesaba una solución de sulfato cúprico para absorber el calor. La iluminación se realizó sobre muestras mantenidas a distintas temperaturas con la finalidad de poder observar los espectros de las diferentes especies que intervienen en el transporte electrónico, ya que dependiendo de la temperatura éste era bloqueado en uno o varios puntos del fotosistema II como consecuencia de la ralentización de la transferencia electrónica. Esto permitió el análisis de la situación de estos transportadores en condiciones de toxicidad de Cu.

#### 0.2.1. Experimentos a temperatura ambiente

En este caso, el transporte electrónico funciona a lo largo de toda la cadena correspondiente al fotosistema II. Se utilizaron  $K_3[Fe(CN)_6]$  1 mM y DCMU 0.5 mM como aceptor e inhibidor del transporte electrónico, respectivamente. La muestra era iluminada en la cavidad del espectrómetro de RSE, mientras se registraba el espectrómetro de la señal estudiada en ese momento.



### 0.2.2. Experimentos a temperatura de 200K

El transporte electrónico en estas condiciones funciona exclusivamente desde el complejo de iones de Mn hasta  $Q_A$  y sólo se produce una separación de cargas ( $S_1Q_A \rightarrow S_2Q_A^-$ ).

Para alcanzar la temperatura de 200 K se utilizó una solución crioscópica formada por etanol y nieve carbónica que se preparó en un Dewar transparente donde se iluminaba la muestra durante 4 min girándola periódicamente para asegurar una iluminación homogénea. La muestra se mantuvo a 77 K en un Dewar con nitrógeno líquido para mantener estabilizada la separación de cargas hasta la obtención de los espectros de las especies de interés que se observarían en el aparato de RSE a temperaturas de nitrógeno o helio líquido.

### 0.2.3. Experimentos a temperatura de 77 K

En este caso se produce una única separación de cargas en la que se estabiliza el electrón en  $Q_A$ , el lado donador del fotosistema II está inactivo ya que el complejo de iones de Mn está bloqueado, no llevándose a cabo la transición  $S_1 \rightarrow S_2$ , pero sí se observa la oxidación del citocromo b559 por  $P680^+$  a través de un transporte electrónico no fisiológico al que nos referiremos detenidamente en el capítulo de discusión.

Para alcanzar la temperatura de 77 K, se depositó la muestra en un Dewar transparente con nitrógeno líquido iluminándose durante 12-20 min, conservándose a la misma temperatura hasta que se realizaron sus respectivos espectros a diferentes temperaturas.



### 0.3. Análisis de las señales de RSE de partículas de fotosistema II.

La caracterización de cada uno de los espectros estudiados se realizó según Miller y Brudvig (1991). En la tabla 7 se ilustran las propiedades de los transportadores estudiados en RSE, junto con algunos parámetros para su posible observación y seguidamente se detallan como han sido generados los espectros que hemos necesitado para el estudio de la inhibición causada por Cu y el transporte electrónico en el fotosistema II.

#### 0.3.1. Tirosina D<sup>+</sup>

Su señal se generó fácilmente a temperatura ambiente durante 10-20 s de iluminación y puede ser registrada en un ancho margen de temperatura (desde <10K hasta temperatura ambiente), utilizamos una radiación de microondas de 0.5  $\mu$ W - 2 mW. La señal de RSE tiene un valor de  $g=2.0046$  y una anchura de banda de 1.9 mT. El área de su señal, obtenida justo después de la iluminación, se tomó como patrón interno para la cuantificación del spin electrónicos de otros radicales.

#### 0.3.2. Tirosina Z<sup>+</sup>

La señal II rápida se observó durante una iluminación intensa y constante a temperatura ambiente en partículas de fotosistema II tratadas con Tris utilizando una radiación de microondas de 2 mW. Sus características espectrales fueron similares a las correspondientes a la tirosina D<sup>+</sup>, aunque con una



amplitud generalmente doble que caía en una escala de ms.

### 0.3.3. Estado $S_2$ del complejo de iones de Mn

El estado  $S_1$  del cluster de manganeso se caracteriza por ser estable en oscuridad, después de un flash de luz saturante se pasa al estado  $S_2$ , observándose de forma asociada una señal de RSE. Para observar dicha señal se mantuvo la muestra de partículas de fotosistema II a 200 K iluminándose durante 5 min. La señal del estado  $S_2$  se pudo registrar convenientemente a 10 K con una radiación de microondas de 20 mW. El valor de  $g$  es 1.96 y la anchura de su señal es de 200 mT con número de líneas  $\geq 16$  características.

### 0.3.4. Semiquinona-hierro no-hemínico, $Fe^{+2}Q_A^-$

Los experimentos en los que la señal  $Fe^{+2}Q_A^-$  fue estudiada, la muestra se incubó previamente con ácido fórmico 50 mM durante 10 min en oscuridad para desplazar el  $HCO_3^-$  ligado al  $Fe^{+2}$  no-hemínico iluminándose posteriormente durante 5 min a 200 K. Cuando se deseó cuantificar la señal del espectro, la muestra se incubó en oscuridad con ditionito 40 mM a temperatura ambiente durante 10 min para reducir totalmente  $Q_A$ .

La señal  $Fe^{+2}Q_A^-$  se caracteriza porque tiene unos valores de  $g=1.82$  y  $1.67$  y una anchura de banda de 40 mT. Esta señal pudo ser observada a temperaturas de He líquido 4 K y con una radiación de microondas de 32 mW.



### 0.3.5. Citocromo b-559

La señal puede ser observada a 15 K y con una potencia de microondas de 4 mW y son dos los espectros posibles del citocromo b-559 los que se pueden observar dependiendo, dependiendo de que la muestra de partículas de fotosistema II fuera o no iluminada. En oscuridad se pudo observar parcialmente oxidado el citocromo b-559 de bajo potencial, mientras que después de un periodo de iluminación de 20 min a 77 K (condiciones en las que el cluster de Mn estaba bloqueado) apareció una nueva señal correspondiente al citocromo b-559 de alto potencial. El citocromo oxidado tiene un  $\text{Fe}^{+3}$  ( $s=1/2$ ) y una asimetría rómbica que le da una anisotropía en el valor de g cuyos valores son  $g_z \approx 3$  y  $g_y \approx 2.2$  con anchuras de banda de 4 mT.

### 0.3.6. Radical de clorofila

Un radical de clorofila pudo ser observado después de un periodo de iluminación de 12 min a 77 K en partículas de fotosistema II. La señal de RSE de radical de clorofila aparecía sobre la señal correspondiente de la tirosina  $\text{D}^+$ , por lo que era necesario hacer la sustracción luz-oscuridad para poder observar la forma gaussiana propia del radical de clorofila que tenía como valores característicos de  $g=2.0026$  y una anchura de banda de 1.0-1.1 mT. Para su caracterización se utilizó una radiación de microondas de 0.1 mW.



Tabla 7. Señales características de resonancia de spin electrónico de los componentes oxido reductores del fotosistema II.

Valor de g	Anchura de la señal	T y P de la radiación	Naturaleza química
5-8	≈5mT	4-5K, 20-50mW	Q400=Fe <sup>+3</sup> QA
4.1	20mT	4-15K, 0.2mW	Estado S <sub>2</sub> del cluster de Mn
3.1-2.9=gz 2.1=gy	2.2- 4mT	10-15K, 4mW	Cit. b-559
1.96	200mT 16 líneas	7K, 0.2mW	Señal múltiple del estado S <sub>2</sub> del cluster de Mn
2.0046	1.9mT	Desde 10K a T ambiente, 10μW-0.2mW	Radical de tirosina Z <sup>+</sup> y D <sup>+</sup>
2.0044	0.9		QA <sup>-</sup>
2.0035	1.25mT	80K, 0.1mW	Feo <sup>-</sup>
2.0	3-5mT	4-5K, 20mW	Fe <sup>+2</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> Feo <sup>-</sup>
2.0026	1.0-1.1mT	Desde 100K a T ambiente, 0.1mW	Radical catiónico de clorofila
2.0026	≈0.8mT	Desde 100K a T ambiente, 0.1mW	P680 <sup>+</sup>
2	> 60mT	3-5K, 10μW	<sup>3</sup> P680
1.82 y 1.67	30mT	4-10K, 4-50mW	Fe <sup>+2</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>
2.0026	0.7mT	Desde 100K a T ambiente, 0.1mW	P700 <sup>+</sup> (FOT. I)



**RESULTADOS**



## RESULTADOS

### I. NORMALIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINACIÓN DE Cu POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

La medida del contenido en Cu de membranas tilacoidales y partículas de fotosistema II fue, a lo largo del presente trabajo, una técnica rutinaria pero que, a la vez, necesitaba una gran precisión. La diversidad de datos respecto al contenido de Cu de las preparaciones de fotosistema II reseñada en la literatura sobre el tema, exigía buscar una explicación y, por ello, empezamos por normalizar el método analítico de medida por espectroscopía de absorción atómica para obtener valores fiables. Las innovaciones que desarrollamos en la preparación de las muestras antes de su medida demostraron ser muy eficaces y consistieron en la homogenización previa, en el caso de membranas tilacoidales, y la adición de 1-octanol en todas ellas.

#### A. Homogenización previa de las membranas tilacoidales

Para evitar errores volumétricos al pipetear muestras en suspensión, éstas tenían que presentar un tamaño de partícula relativamente homogéneo y lo más reducido posible (Holcombe y Majidi, 1989). Las partículas de fotosistema II aisladas por el procedimiento indicado en Material y Métodos, no resultaban problemáticas, ya que formaban una suspensión muy homogénea, debido principalmente a la presencia del Tritón X-100 que quedaba

---



## RESULTADOS

---

en el medio y, junto con los fosfolípidos de membrana, forma numerosas micelas de tamaño muy similar, evitando así su agregación. Sin embargo, las suspensiones de membranas tilacoidales presentaban una falta de uniformidad en el tamaño de sus partículas, incluso después de que fueran agitadas mecánicamente y, especialmente, si habían sufrido un proceso de congelación-descongelación previo. Por ello, se homogeneizaron previamente este tipo de muestras durante varios minutos. Los resultados analíticos del contenido de Cu en membranas tilacoidales de guisante homogeneizadas y no-homogeneizadas ilustrados en la tabla 8 pusieron de manifiesto que había una mayor desviación típica en las medidas realizadas en muestras no homogeneizadas.

Tabla 8. Resultados analíticos del contenido de Cu (ng/mL) en membranas tilacoidales de guisante homogeneizadas y no-homogeneizadas.\*

---

Homogeneizadas	1139-1217-1178-1148-1178-1227-1227- 1286-1109-1276-1129
	Media=1192 y DTR=4.96%
No-homogeneizadas	1453-1513-1513-1266-1227-1306-1306- 1217-1257-1276-1286-1207
	Media=1319 y DTR=8.39%

---

\* Cada resultado corresponde a la media de 3 determinaciones.



### B. Adición de 1-octanol

Cuando a la suspensión de membranas tilacoidales o partículas de fotosistema II se les agregaba solamente  $\text{HNO}_3$  13 mM para la extracción de los metales del material vegetal, la reproducibilidad de las medidas fue muy pobre; sin embargo, ésta era adecuada para la curva patrón preparada a partir de una solución madre de Titrisol. La diferencia en el comportamiento de ambas soluciones se debió a la mayor tensión superficial de las suspensiones subcloroplastídicas, provocando que la alícuota inyectada quedara en la apertura del horno de grafito y no en su interior. Así, cuando el programa de atomización comenzaba, la corriente de gas expulsaba parte de la muestra y la señal de la medida era baja y variable, o incluso nula para algunas determinaciones.

Cuando se añadió una pequeña cantidad de 1-octanol a las preparaciones de partículas de fotosistema II, la tensión superficial de la muestra disminuyó, obteniéndose una desviación típica menor en las medidas correspondientes realizadas, como se puede apreciar en la tabla 9, donde se comparan los valores de absorbancia correspondientes a la altura de pico de cada una de las determinaciones de Cu de una suspensión de partículas de fotosistema II de guisante con o sin adición previa de 1-octanol. El volumen de 1-octanol añadido en la suspensión no fue crítica, ya que la espuma y burbujas desaparecieron por el mero hecho de su presencia.



## RESULTADOS

---

Tabla 9. Efecto de la presencia de 1-octanol en la medida del contenido de Cu de fotosistema II (BBYs+).

---

Con 1-octanol	0.116-0.120-0.121-0.110-0.127-0.130-0.117- 0.117-0.105-0.123-0.114-0.102
	Media=0.117 y DTR=7.10%
Sin 1-octanol	0.119-0.122-0.126-0.125-0.133-0.124-0.121- 0.125-0.124-0.122-0.130-0.118
	Media=0.124 y DTR=3.44%

---

Se realizaron doce inyecciones de cada una de las muestras. Todos los valores presentados en la tabla de este apartado se obtuvieron mediante el cálculo de la absorbancia correspondientes a la altura de pico de cada una de las determinaciones.

### C. Exactitud del método

Para comprobar la exactitud del método de determinación de Cu en membranas tilacoidales se comparó éste con el método recomendado por el Comité Inter-Institutos de Métodos Analíticos (C.I.I) (1969) para muestras vegetales. La tabla 10 muestra que la concordancia entre ambos métodos fue superior al 90%.

Tabla 10. Comparación de los métodos utilizados para la determinación de Cu en membranas tilacoidales.

---

Método	ng/mL
C.I.I.	187±5
Propuesto	170±8

---

Los valores corresponden a la media de 4 resultados.



Para determinar su reproducibilidad se utilizó una muestra de partículas de fotosistema II de la que se hicieron 6 determinaciones analíticas. El análisis estadístico de los resultados (576, 554, 523, 584, 526 y 561 ng/mL) dió una desviación estándar relativa del 4.55%.

## II. DETECCIÓN DE CONTAMINACIONES NUCLEARES EN PARTÍCULAS DE FOTOSISTEMA II. MODIFICACIÓN DE SU MÉTODO DE AISLAMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA NUEVA PREPARACIÓN DE MAYOR PUREZA

### A. Seguimiento del contenido en Cu de las distintas preparaciones subcloroplastídicas originadas en el proceso de aislamiento de partículas de fotosistema II

En cada una de las etapas del aislamiento de las partículas de fotosistema II, se determinó el contenido total de Cu referido al peso de hojas de partida y la relación de átomos de Cu por cada 300 moléculas de clorofila. Elegimos éste último como valor de referencia porque era el obtenido en medidas del tamaño del centro de reacción del fotosistema II. En la tabla 11, se detallan los valores obtenidos tanto en espinaca como en guisante. En el primer precipitado de cloroplastos se perdió aproximadamente un 65% del contenido total de Cu del homogenado. Esto se debió principalmente a la eliminación de cuproproteínas mitocondriales y citosólicas como la citocromo oxidasa y la superóxido dismutasa (Sandmann y Böger, 1983; Corpas et al., 1991). En el primer sedimento de membranas tilacoidales la



## RESULTADOS

---

disminución del contenido de Cu fue del 20% con respecto al de cloroplastos íntegros, a consecuencia de su lisis y consiguiente pérdida de enzimas estromáticas del ciclo de Benson-Calvin, como la Rubisco (Walker y Webb, 1981) como se aprecia en la figura 9. Después del tratamiento de las membranas tilacoidales con Tritón X-100 y posterior centrifugación para sedimentar las partículas de fotosistema II, se observó que en los sobrenadantes permanecía un 50-60% del Cu de las membranas, debido principalmente a la solubilización del fotosistema I al cual está asociada la plastocianina. En el precipitado (BBYs+) aparecía aproximadamente un 30% del Cu restante, si era seguido el procedimiento habitual de aislamiento.

Sin embargo, si se centrifugaban las membranas tilacoidales tratadas con Tritón X-100 a 10000 g para eliminar la fracción de almidón, antes de la centrifugación habitual para sedimentar las BBY, el contenido de Cu en el precipitado de las partículas de fotosistema II (BBYs-) fue menor que el esperado, siendo aproximadamente solo un 5% del Cu contenido en las membranas tilacoidales. El Cu que no fue retenido en las BBYs- apareció en la fracción del almidón. Los resultados mostraron que, al omitir la centrifugación para eliminar la fracción del almidón, el contenido de átomos de Cu por cada 300 clorofilas era 2.0 y 3.0 para guisante y espinaca, respectivamente; mientras que al incluirla como una etapa adicional en el método original los valores bajaban hasta 0.2 y 0.4.



Tabla 11. Contenido de Cu de las diferentes preparaciones del proceso de aislamiento de BBY.

	Espinaca		Guisante	
	Cu total (mg)	Atom. Cu/300 Clor.	Cu total (mg)	Atom. Cu/300 Clor.
Homogenado de la hoja	67.0	4.6	56.0	3.6
1 <sup>er</sup> sedimento de cloroplastos	26.0	2.7	21.0	2.4
2 <sup>o</sup> sedimento de cloroplastos	24.0	2.6	18.0	2.3
1 <sup>er</sup> membranas tilacoides	20.0	2.4	14.5	2.0
2 <sup>o</sup> membranas tilacoides	20.0	2.0	14.0	1.8
Sobrenadante con Tritón X-100	6.0	1.8	5.0	2.0
Sobrenadante con Tritón X-100	6.0	1.8	5.0	2.0
BBYs+	3.0	2.3	2.0	2.0
BBYs-	0.4	0.2	0.2	0.2
Fracción del almidón	2.5	-	1.5	-

El segundo precipitado de membranas tilacoidales fue dividido en dos fracciones iguales para la obtención final de BBYs+ y BBYs-. Se utilizaron 100 g de hoja.

### B. Análisis del patrón polipeptídico de las preparaciones del apartado anterior

En la figura 9 se ilustra el patrón polipeptídico de las distintas preparaciones obtenidas a lo largo del aislamiento de preparaciones de fotosistema II (BBY). Las calles 2 y 3 corresponden a cloroplastos y las calles 4 y 5, a membranas tilacoidales. Es destacable la pérdida de las subunidades mayor



## RESULTADOS

---

y menor de la Rubisco tras la lisis del cloroplasto. Con respecto al patrón polipeptídico de las preparaciones de BBY (calles 6 y 7) son notables las diferencias en la región comprendida entre 10 y 20 kDa entre las BBY<sub>s+</sub> y BBY<sub>s-</sub>. Los polipéptidos de peso molecular aparente de 20, 19, 17 y 12.6 kDa que desaparecían en las BBY<sub>s-</sub> con respecto a las BBY<sub>s+</sub> fueron encontrados en la fracción correspondiente al almidón. Similares polipéptidos se encontraron en la fracción del almidón de espinaca, como demostraremos posteriormente, cebada, trébol y maíz (datos no presentados).

Los polipéptidos anteriores eran liberados gradualmente de las preparaciones de BBY<sub>s+</sub> cuando la velocidad de centrifugación se incrementaba de 1000 a 10000 g para eliminar la fracción del almidón tras el tratamiento de las membranas tilacoidales con Tritón X-100, como se ilustra en la figura 10 con muestras de guisante. La velocidad de centrifugación de 10000 g (preparación de la calle 3, figura 10) era la más adecuada para su eliminación y además proporcionaba una preparación con un contenido de almidón mínimo a la que llamamos BBY<sub>s-</sub>. A velocidades de centrifugación superiores a 10000 g, sedimentaban junto al almidón parte de la preparación de las BBY<sub>s-</sub>, por lo que se estableció dicha velocidad como límite para eliminar la fracción del almidón. Asimismo, se pudo observar que la disminución de los cuatro polipéptidos era paralela a la del contenido de Cu en las preparaciones de fotosistema II (BBY) tal y como se ilustra en



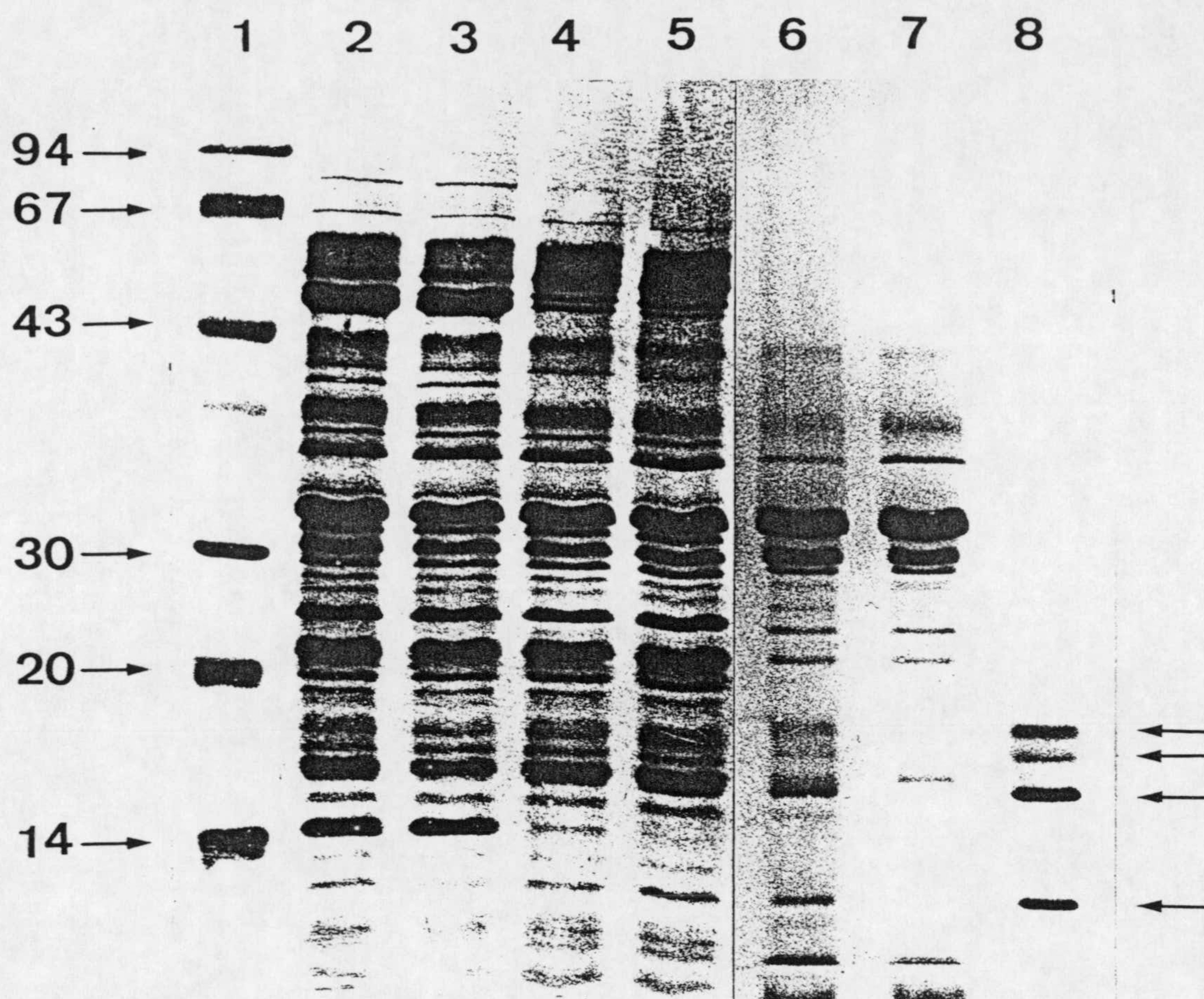


Figura 9. Análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 17.5% con SDS y urea 4 M de las preparaciones obtenidas en el proceso de aislamiento de BBY de guisante. (1) Patrones de masa molecular, (2) 1<sup>er</sup> sedimento de cloroplastos, (3) 2<sup>o</sup> sedimento de cloroplastos, (4) 1<sup>er</sup> sedimento de membranas tilacoidales, (5) 2<sup>o</sup> sedimento de membranas tilacoidales, (6) BBYs+, (7) BBYs-, (8) Fracción del almidón.



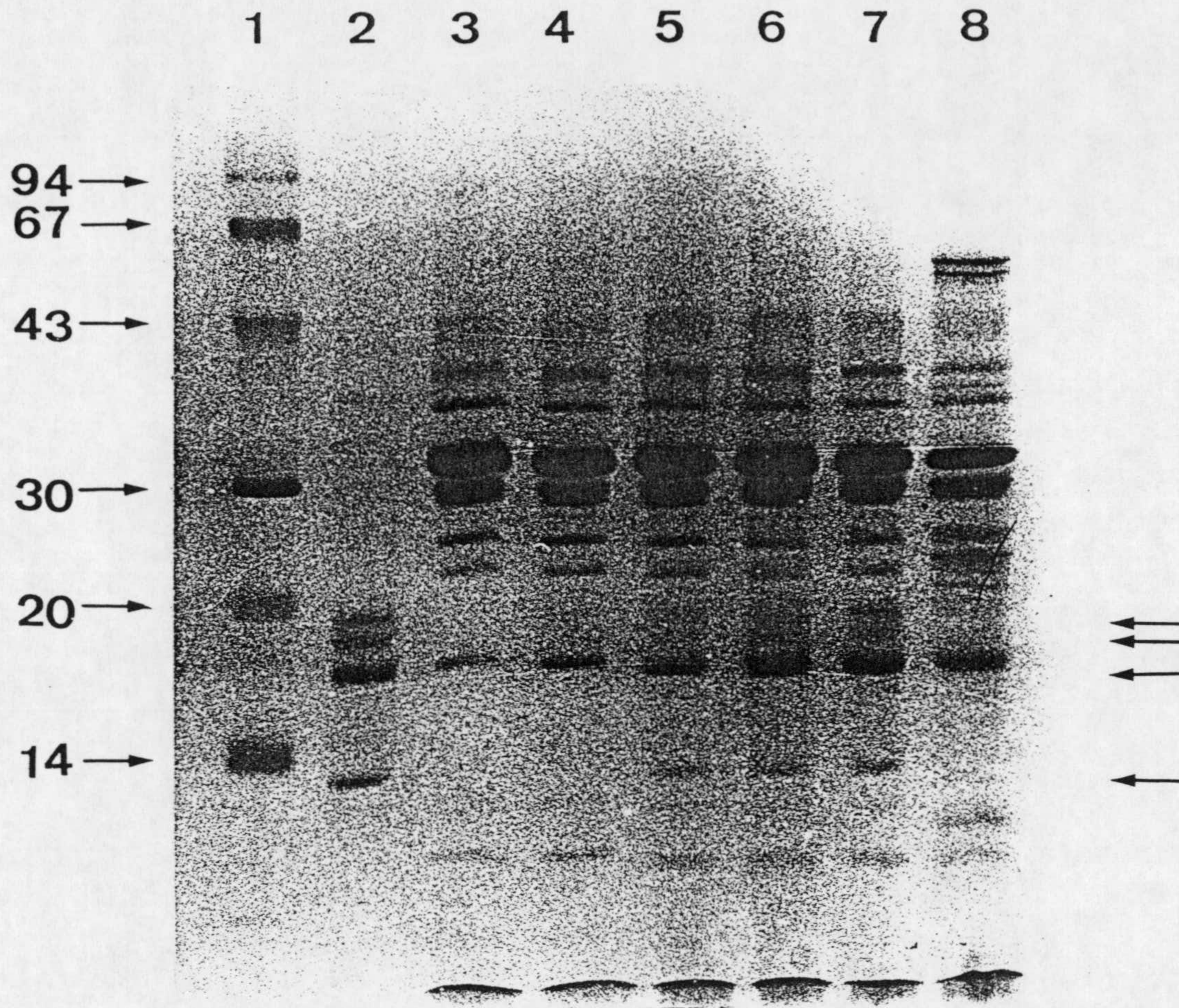


Figura 10. Efecto de las diferentes velocidades de centrifugación para la eliminación de la fracción del almidón en el patrón polipeptídico de BBY de guisante observado en geles de poliacrilamida al 17.5% con SDS y urea 4 M. (1) Patrones de masa molecular, (2) Fracción del almidón, (3) BBYs-, 10000 g, (4) BBY, 5000 g, (5) BBY, 3000 g, (6) BBY, 1000 g, (7) BBYs+, (8) 2° sedimento de membrana tilacoidales.



la tabla 12, existiendo drásticas diferencias entre aquellas muestras en que se había eliminado el almidón y los polipéptidos asociados y aquellos en que estaban presentes. Sin embargo, a pesar de las notables variaciones en composición polipeptídica y contenido en Cu entre BBYs+ y BBYs-, no las hubo en su actividad fotosintética, observándose las mismas tasas de desprendimiento de oxígeno tanto en espinaca como en guisante para la reacción de Hill  $H_2O \rightarrow$  fenil-*p*-BQ (Tabla 12).

Tabla 12. Efecto de la velocidad de centrifugación para eliminar la fracción del almidón sobre el contenido de Cu (Átomos de Cu / 300 clorofilas) y el desprendimiento de oxígeno ( $\mu\text{mol O}_2/\text{mg de clor.}/\text{h}$ ) anotado entre paréntesis.

	Espinaca	Guisante
BBYs+	2.0(400)	2.0(600)
BBY	0.9	1.0
BBY	0.6	0.7
BBY	0.4	0.5
BBYs-	0.2(400)	0.2(600)

### C. Análisis de pérdidas de Cu asociadas a la eliminación selectiva de polipéptidos del fotosistema II.

Ya que algunos autores habían propuesto con anterioridad que el Cu podría ser un constituyente del fotosistema II (Ramaswamy y Nair, 1978; Ono et al., 1984) y estar asociado a alguno de sus polipéptidos, se realizaron lavados de las BBYs+ y BBYs- con diferentes soluciones, con la finalidad de saber si el contenido



## RESULTADOS

---

de Cu variaba con la eliminación de algunos polipéptidos del sistema de fotólisis del H<sub>2</sub>O.

En la tabla 13 aparecen los contenidos en Cu y Mn de las preparaciones de BBYs+ y BBYs- de espinaca y guisante tras los lavados con las soluciones señaladas. En las preparaciones de BBYs+ y BBYs- controles, se observó el mismo contenido de Mn para cada una de las especies analizadas. Con los lavados EDTA 5mM, NaCl 1 M y CaCl<sub>2</sub> 1 M no hubo cambios significativos en el contenido de Cu, pero sí los produjeron los lavados con Tris 0.8 M pH 8.4 y NaSCN 3 M, Tritón X-100 0.01% en los que disminuyó el contenido de Cu en más de un 50% en las BBYs+. Con respecto al contenido de Mn, éste decreció drásticamente con los lavados Tris-HCl 0.8 M pH 8.4 y NaSCN 3M, Tritón X-100 0.01% por lo que se inhibió totalmente el desprendimiento de oxígeno de las partículas de fotosistema II.

Tabla 13. Efecto de los diferentes lavados sobre el contenido de Cu y Mn (Átomos / 300 clorofilas) en las preparaciones de BBYs+ y BBYs-. Los valores de Mn están entre paréntesis.

---

	Espinaca		Guisante	
	BBYs+	BBYs-	BBYs+	BBYs-
Control	2.0(4.5)	0.2(4.5)	2.3(4.0)	0.2(4.0)
EDTA 5 mM	1.5(4.2)	0.2(4.3)	2.0(4.0)	0.2(4.0)
NaCl 1 M	1.9(4.0)	0.2(4.0)	2.2(4.0)	0.2(4.0)
CaCl <sub>2</sub> 1 M	1.4(1.4)	0.1(2.0)	1.4(1.6)	0.1(1.5)
NaSCN 3 M	0.8(0.1)	0.0(0.1)	0.9(0.2)	0.1(0.2)
Tris 0.8 M	1.0(0.3)	0.1(0.2)	1.1(0.2)	0.1(0.2)

---



---

D. Presencia de restos nucleares en las preparaciones enriquecidas de partículas de fotosistema II: Histonas y ácidos nucleicos

Identificar los polipéptidos de la fracción del almidón a la que aparecía asociado la mayor parte del Cu atribuido al fotosistema II y ver si eran componentes del fotosistema II fue el siguiente paso de nuestro estudio. Las ELIPs (Proteínas inducidas por luz en los primeros estadios de la planta) tienen una masa molecular dentro del mismo rango y están sometidas a un ritmo circadiano que nos hizo pensar que pudieran acumularse en el cloroplasto. Por ello, decidimos hacer un estudio sobre la evolución de la composición polipeptídica de la membrana tilacoidal de plantas etioladas tras ser sometidas a diferentes periodos de iluminación entre 0 y 24 h (Figura 11). En etioplastos y, durante las primeras horas de exposición a la luz, las proteínas más abundantes fueron los cuatro polipéptidos de la región de 10-20 kDa, siéndolo el LHC II después de 36 h. Dichos resultados indicaban que nuestras proteínas no eran las ELIPs, ya que estaban presentes en las plantas crecidas en oscuridad y éstas únicamente se observan después de un periodo de iluminación (Preat *et al.*, 1990). Aún así, como se indicará más adelante se realizó, un inmunoensayo de las proteínas de la fracción del almidón con un suero-anti de las proteínas ELIPs, no observándose inmunorreacción alguna.

Hay otros polipéptidos del fotosistema II muy característicos en este mismo rango de masa molecular que podían

---



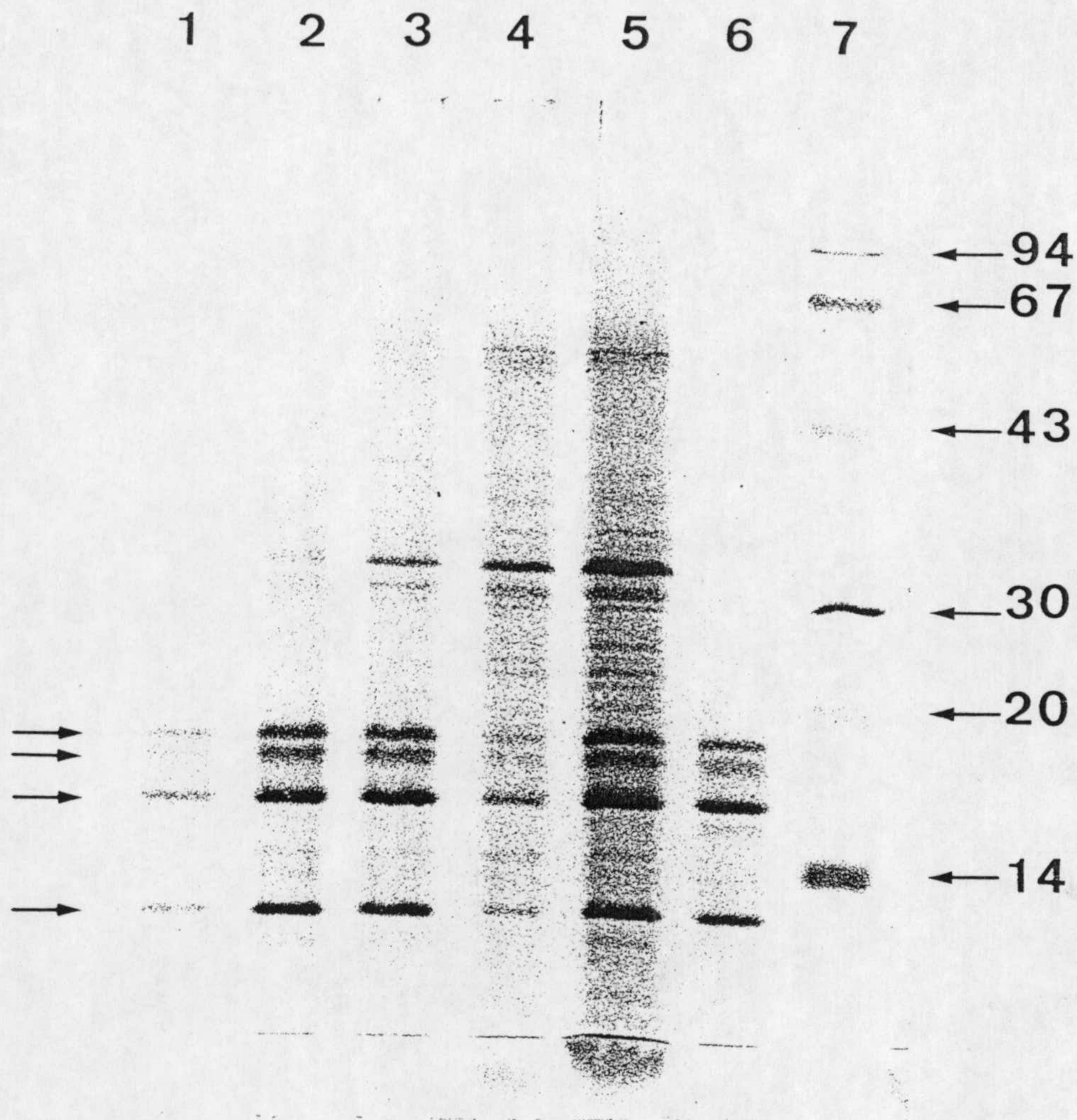
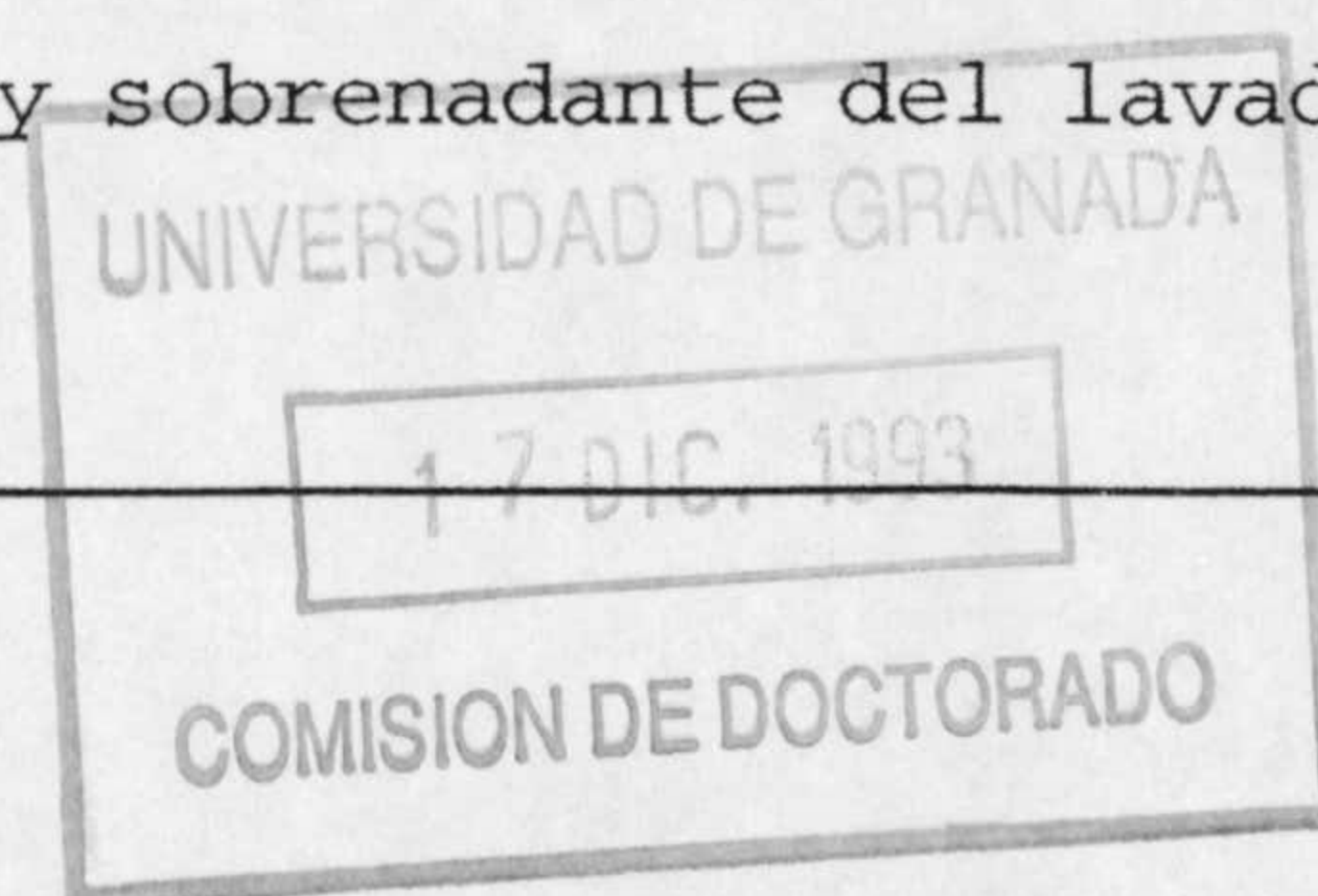


Figura 11. Análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 17.5% con SDS y urea 4 M de las preparaciones de etioplastos y membranas tilacoidales obtenidas durante el enverdecimiento de las plantas. (1) 0 h, (2) 3 h, (3) 6 h, (4) 12 h, (5) 24 h, (6) Fracción del almidón y (7) Patrones de masa molecular.



ser identificados mediante diferentes procedimientos. En la figura 12 se ilustra el patrón polipeptídico de las membranas tilacoidales, BBYs+, BBYs- y la fracción del almidón tanto de espinaca (calles 1-4) como de guisante (calles 10-7). Además en las calles 5 y 6 aparecen los polipéptidos extrínsecos de 16, 23 y 33 kDa correspondientes al sistema de fotólisis del agua de espinaca y guisante, respectivamente, obtenidos mediante el lavado de las partículas de fotosistema II con NaCl 1 M y que fueron utilizados como marcadores internos para la identificación del patrón polipeptídico de las BBYs+ y BBYs-, aunque la migración de dichos polipéptidos comparativamente en espinaca y guisante fue distinta, debido a diferencias en sus masas moleculares. En las BBYs- de espinaca (calle 4) se observó que el polipéptido de 16 kDa del sistema de fotólisis del agua co-emigraba con el polipéptido de 20 kDa de la fracción del almidón (calle 5). La posibilidad de que el polipéptido de 16 kDa del sistema de fotólisis del agua de espinaca y el correspondiente polipéptido de 20 kDa de su fracción del almidón fueran un mismo polipéptido, dado que su movilidad electroforética resultó ser muy similar, nos llevó a resolver dicha cuestión.

Para dilucidar si se trataba del mismo polipéptido, se realizó un inmunorrevelado (figura 13) con las siguientes preparaciones obtenidas de espinaca: membranas tilacoidales (calles 1 y 10), BBYs+ (calles 2 y 9), BBYs- (calles 3 y 8), fracción del almidón (calles 4 y 7) y sobrenadante del lavado de





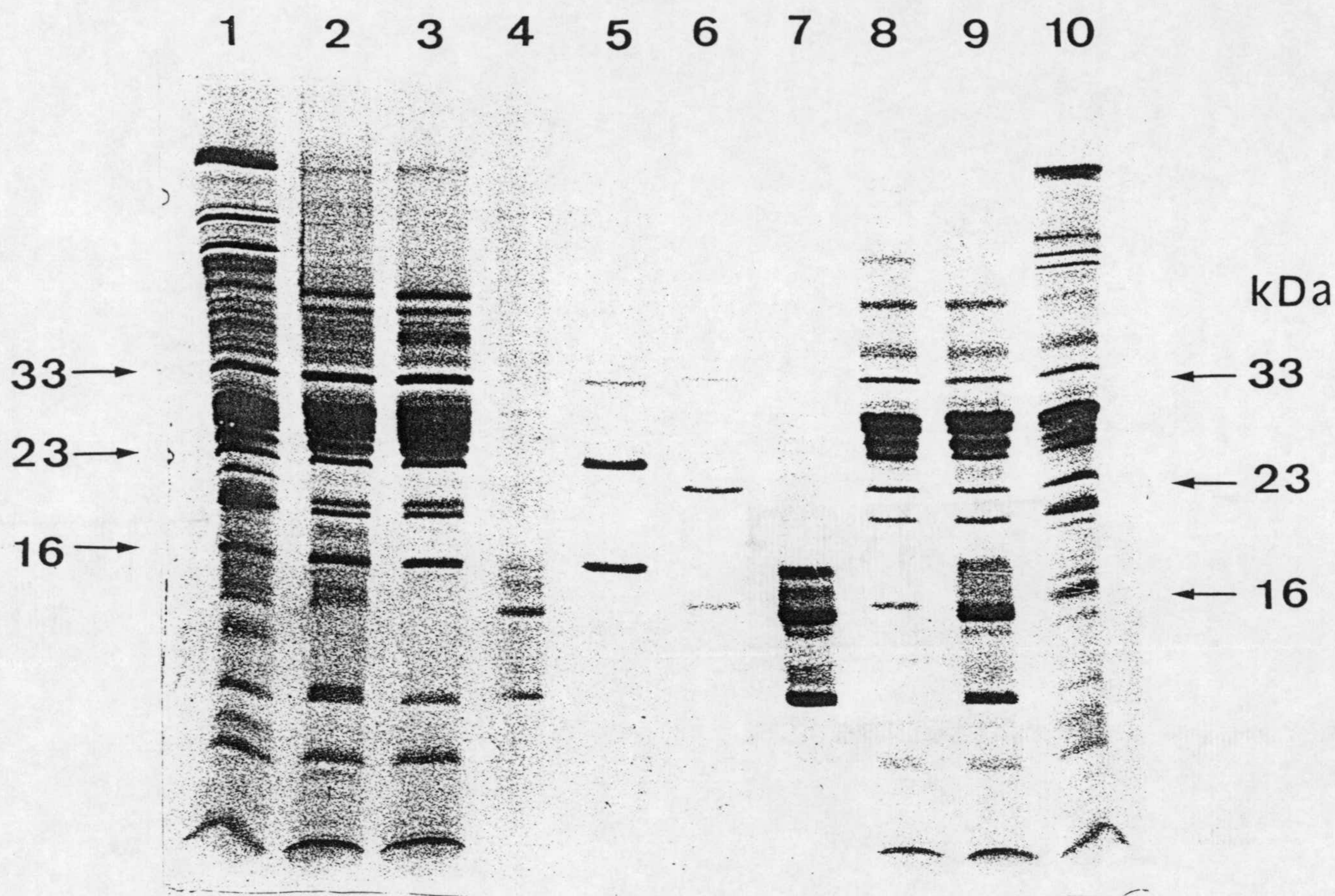


Figura 12. Comparación entre el patrón polipeptídico de preparaciones subcloroplastídicas equivalentes de espinaca (1-5) y guisante (6-10) en gel de poliacrilamida al 17.5% con SDS y urea 4 M. Membranas tilacoidales (1, 10), BBYS+(2, 9), BBYS- (3, 8), fracción del almidón (4, 7) y polipéptidos del sistema de fotólisis del agua como marcadores obtenidos del sobrenadante de BBYS- tratadas con NaCl 1 M y posteriormente centrifugadas (5, 6).



BBYs- correspondiente al lavado con KSCN 3 M, Tritón x-100 0.01% donde aparecen los polipéptidos de 33, 23, 22, 16 y 10 kDa, respectivamente (calles 5 y 6).

Después de la transferencia a un papel de nitrocelulosa, las calles 1-5 fueron teñidas con la solución de rojo Ponceau, mientras que las calles 6-10 se hicieron reaccionar con el anticuerpo contra el polipéptido de 16 kDa del sistema de fotólisis del agua. Una banda positiva de inmunorreacción se identificó en las líneas 6,8,9 y 10 correspondientes al sobrenadante de las BBYs- lavadas con KSCN 3 M, Tritón X-100 0.015, BBYs-, BBYs+ y membranas tilacoidales que demostraba la presencia de este polipéptido en ellas; mientras que no se observó reactividad en la calle 7 correspondiente a los cuatro polipéptidos que co-precipitaban con el almidón, por lo tanto la proteína que co-emigraba en espinaca con la extrínseca de 16 kDa era una proteína diferente.

Nuevos anticuerpos policlonales contra otros polipéptidos del fotosistema II comprendidos entre 20-10 kDa fueron utilizados en la caracterización de nuestras proteínas asociadas a la fracción del almidón (tabla 14). Dispusimos de los anticuerpos contra la apoproteína del CP 14, fosfoproteína de 10 kDa, la proteína de 10 kDa de Ljünberg y proteínas ELIPs. También, se utilizaron los anticuerpos contra el LHC II, ya que cabía la posibilidad de que pudieran ser productos de su degradación. Sin embargo, no se detectó ninguna inmunorreacción entre los anticuerpos contra los anteriores polipéptidos del fotosistema



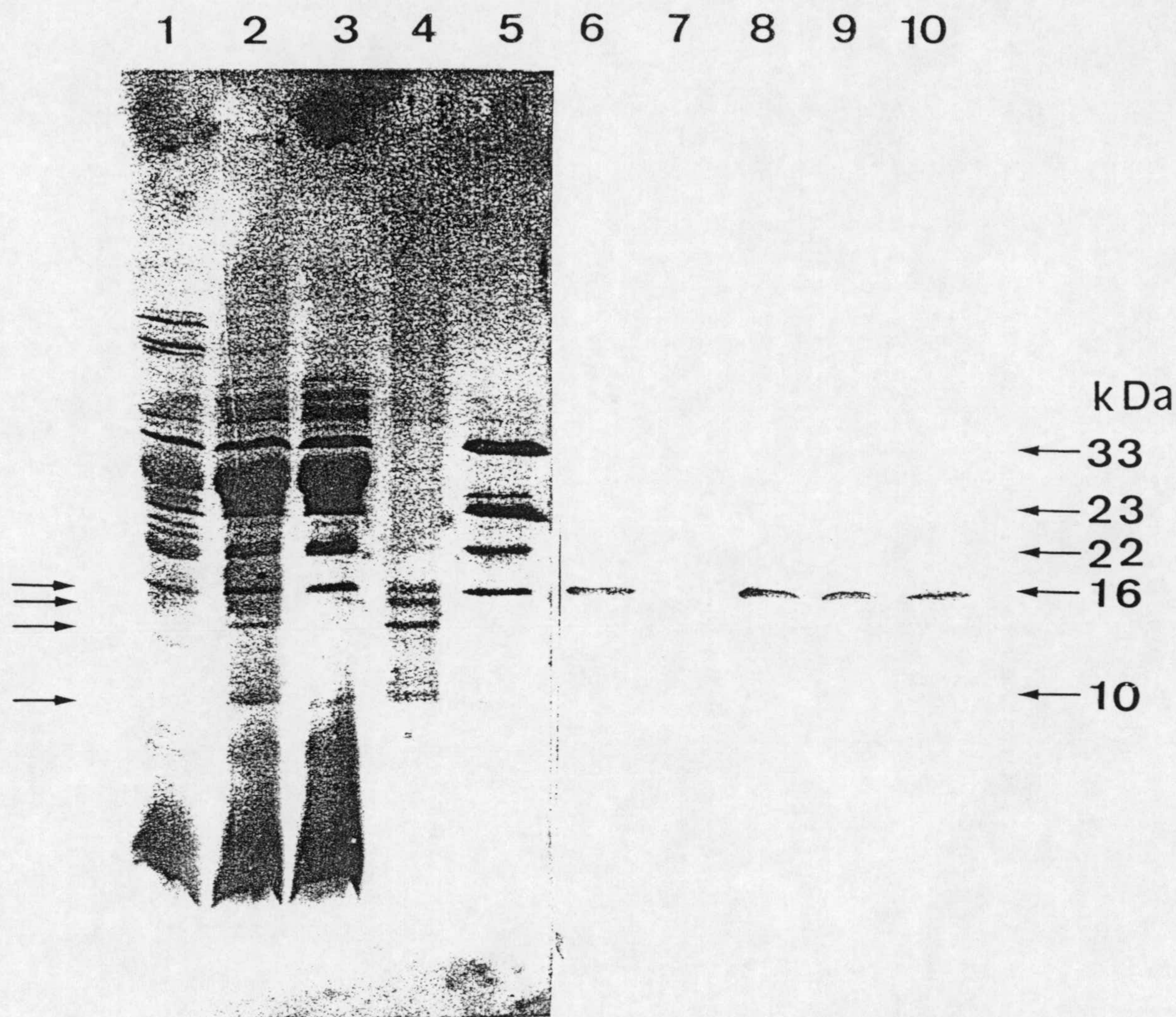


Figura 13. Tinción con Rojo Ponceau (1-5) e inmunorrevelado (6-10) con un suero-anti contra el polipéptido de 16 Kda del sistema de fotólisis del agua (SFA) de distintas preparaciones subcloroplastídicas de espinaca transferidos a membrana de nitrocelulosa. Membrana tilacoidales (1, 10), BBYS+ (2, 9), BBYS- (3, 8), Fracción del almidón (4, 7) y polipéptidos del sistema de fotólisis del agua como marcadores obtenidos del sobrenadante de BBYS- tratadas con NaSCN 3 M y posteriormente centrifugadas (5, 6).



II ensayados y cualquiera de los cuatro polipéptidos que co-sedimentaban con el almidón. Igualmente se utilizaron los anticuerpos contra cada uno de los cuatro polipéptidos asociados al almidón para una inmunorreacción con la preparación de BBYs-libre de dichos polipéptidos, con la finalidad de saber si podrían ser un producto de degradación o tener una reacción cruzada con cualquier otro polipéptido del fotosistema II; sin embargo, tampoco se observó ningún tipo de inmunorreacción. Estos resultados indicaban que los cuatro polipéptidos que aparecían en la fracción del almidón no eran integrantes del fotosistema II o productos de su degradación.

Tabla 14. Cuadro de inmunoensayos de los polipéptidos de 20, 19, 17 y 12 kDa de la fracción del almidón con anticuerpos contra algunos polipéptidos característicos del fotosistema II y con los obtenidos contra histonas animales.

	Proteína de 20 kDa	Proteína de 19 kDa	Proteína de 17 kDa	Proteína de 12 kDa
Anti-16 kDa	-	-	-	-
Anti-CP 14	-	-	-	-
Anti-9 kDa fosfoproteína	-	-	-	-
Anti-10 kDa Ljunberg	-	-	-	-
Anti-LHC II	-	-	-	-
Anti-ELIPs	-	-	-	-
Anti-H2	++	++	-	-
Anti-H4	-	-	+	++



## RESULTADOS

---

Por ello, intentamos su identificación mediante la secuenciación de su extremo N-terminal. Sin embargo, solamente los 5 primeros aminoácidos del polipéptido de 17 kDa pudieron ser identificados, mientras que los restantes polipéptidos presentaron bloqueado su extremo N-terminal. Los aminoácidos secuenciados del polipéptido de 17 kDa fueron:

Ala-Arg-Tre-Lys-Gln-...

La búsqueda de homología de secuencia con otras proteínas se llevó a cabo en el banco de datos Gen Bank Swis Prot comprobándose que presentaban una homología del 100% en estos aminoácidos con la histona H3 de plantas, hongos y levaduras. Este sorprendente resultado hacía sospechar que los restantes polipéptidos pudieran ser las histonas H2B, H2A y H4 que tenían un masa molecular similar a nuestros controvertidos polipéptidos. Para confirmarlo, se realizó un inmunorrevelado con sueros-anti obtenidos contra histonas animales y los cuatro polipéptidos de la fracción del almidón. La figura 14 muestra las bandas positivas de inmunorreacción entre las histonas H2 y los polipéptidos de 20 y 19 kDa (calle 1) y entre la histona H4 y el polipéptido de 12.6 kDa y más débilmente con el de 17 kDa (calle 2). Era posible pues concluir que las proteínas de la fracción del almidón eran las histonas H2(A+B), H3 y H4. El hecho de que estos polipéptidos se observaran en el patrón polipeptídico de



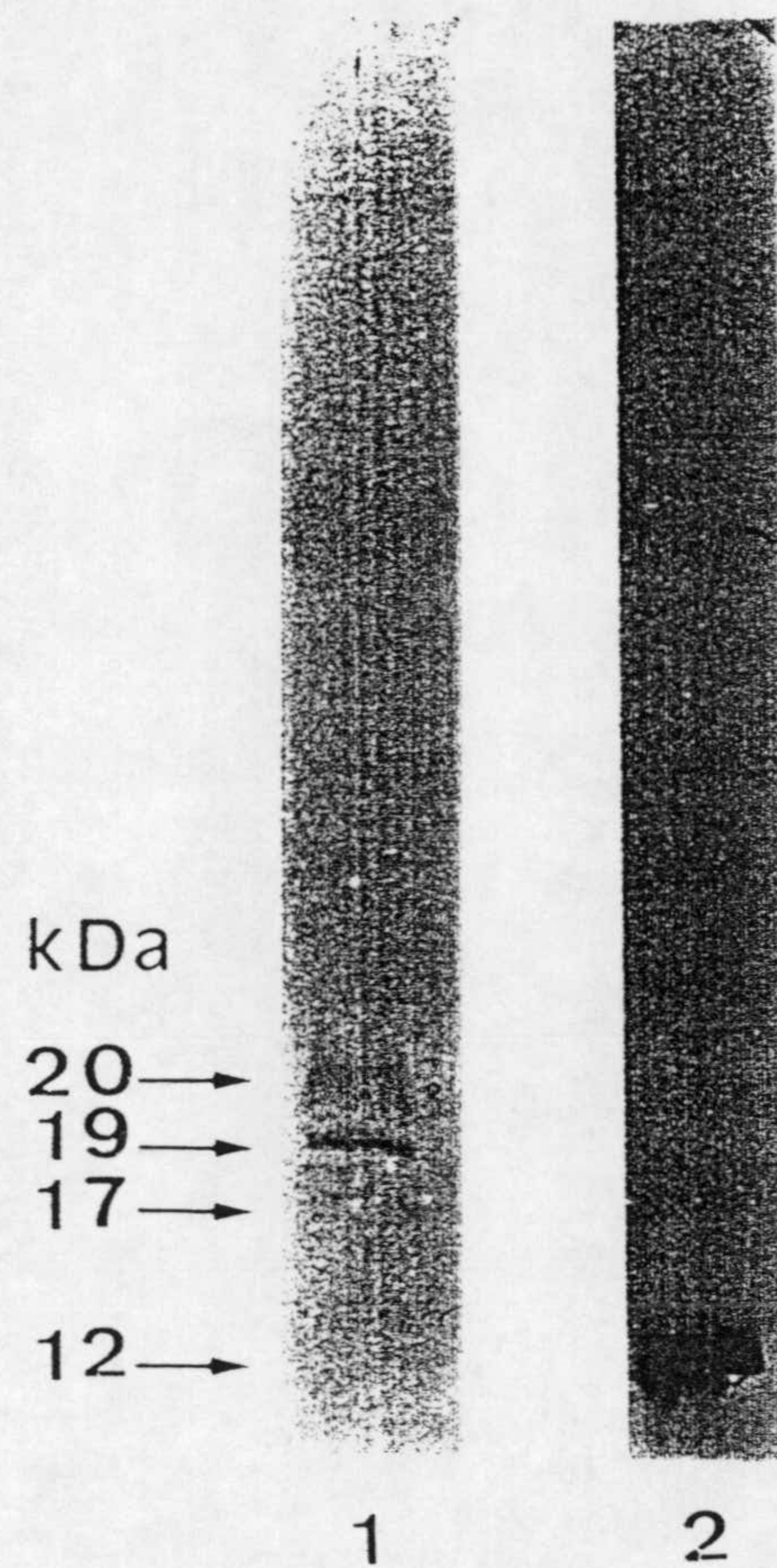


Figura 14. Inmunorrevelado de las proteínas de la fracción del almidón de guisante con un suero-anti contra histonas animales H2B (1) y H4 (2).



## RESULTADOS

---

las BBYs+ y fueran eliminados mediante una centrifugación a 10000 g junto con la fracción del almidón, obteniéndose las BBYs- apuntaba a la presencia de restos nucleares en la primera preparación de partículas de fotosistema II (BBYs+). Para investigarlo, se determinó el contenido de ácidos nucleicos en las preparaciones de BBYs+ y BBYs- de espinaca obteniéndose los valores de 150 y 20 µg/mg de clorofila, respectivamente. La separación de los fragmentos de ADN y ARN de BBYs+, BBYs- y de la fracción del almidón, se muestra en el gel de agarosa al 0.3% de la figura 15. Mientras que las BBYs+ mostraron tener una gran cantidad de ADN de peso molecular alto y ARN (calle 1), en las BBYs- el contenido de estos ácidos nucleicos decreció drásticamente (calle 2), correspondiéndose con un alto contenido de ácidos nucleicos en la fracción del almidón.

### E. Una nueva preparación de partículas de fotosistema II:

#### BBYs-

Como resumen de este segundo apartado de resultados, podemos concluir que la preparación de BBY obtenida siguiendo el método habitual de aislamiento no sólo presenta un exceso de almidón, sino que también arrastra una contaminación nuclear responsable del enmascaramiento del verdadero patrón polipeptídico de las partículas de fotosistema II, debido principalmente a las histonas que son las proteínas mayoritarias del núcleo. Además que, el contenido de metales como el Cu decrezca al eliminar esta



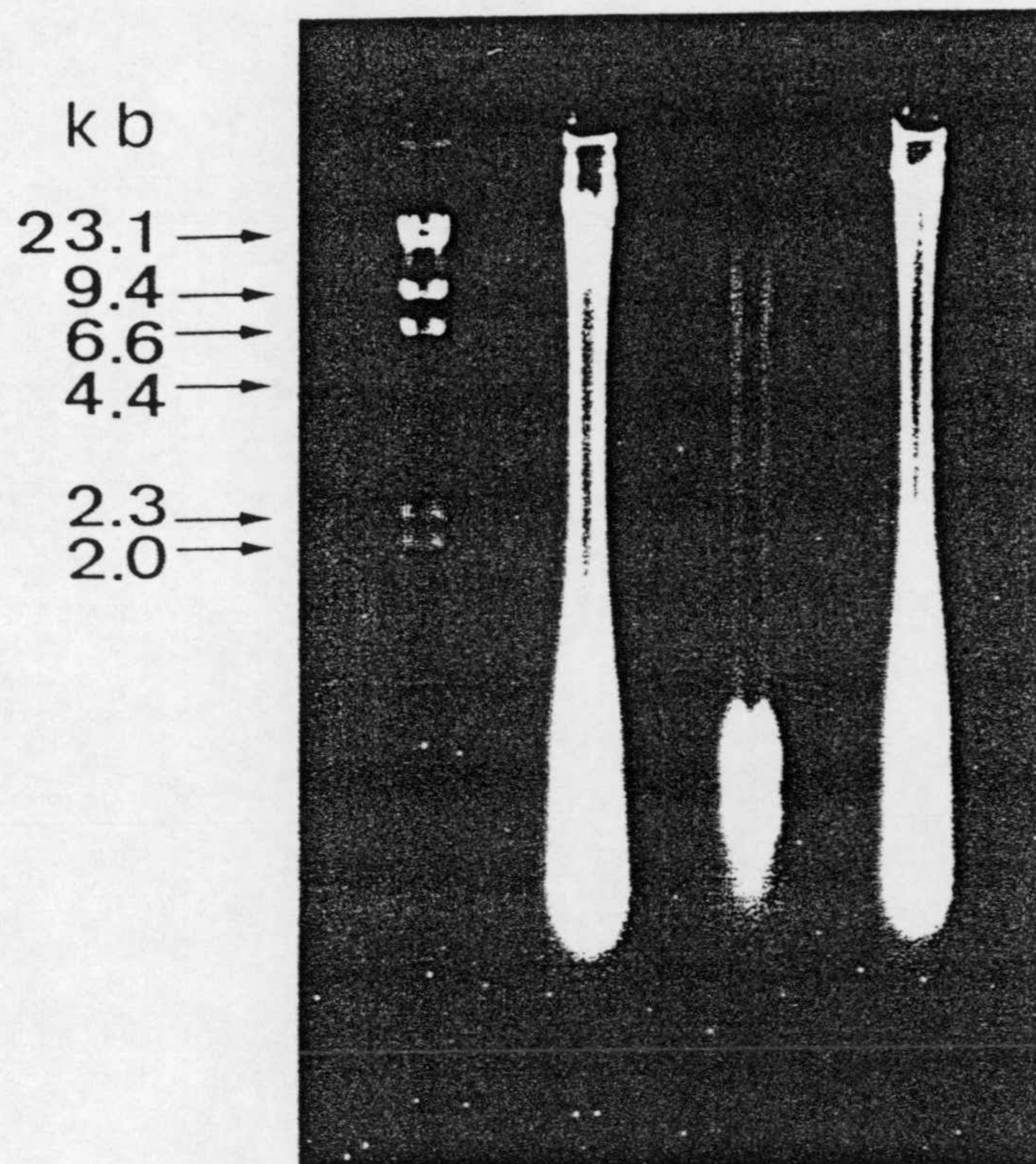


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 0.3% de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en preparaciones de espinaca. (1) BBYs+, (2) BBYs-, (3) Fracción del almidón y (4) Fragmentos 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3 y 2.0 del ADN del Fago lambda digerido con el enzima de restricción Hind III como marcadores del número de kb.



## RESULTADOS

---

contaminación nuclear, a diferencia de lo que ocurre con el Mn, puede deberse a que el primero tenga su origen en la fracción nuclear y no sea un constituyente del fotosistema II como se había postulado hasta la fecha. Esto podría explicar la alta variabilidad de contenido en Cu en las preparaciones de fotosistema II utilizadas en numerosos estudios que se detallan en la INTRODUCCIÓN de este trabajo. Resulta significativo en este sentido, el hecho de que la eliminación del Cu de las partículas de fotosistema II, junto con la fracción contaminante (almidón y restos nucleares) no muestre efecto alguno sobre la actividad fotosintética. Mediante los ensayos anteriores hemos conseguido también la puesta a punto de una modificación del método de aislamiento de partículas de fotosistema II que se caracterizan por tener como consecuencia un mayor grado de pureza que permitirá llevar a cabo estudios sobre el fotosistema II más fiables sobre su composición polipeptídica y presencia de metales.

### **III. EFECTO TÓXICO DEL Cu EN EL FOTOSISTEMA II**

El Cu tiene un efecto tóxico sobre el fotosistema II cuando está presente en el medio de cultivo de organismos fotosintéticos en altas concentraciones, inhibiendo el transporte electrónico. Sin embargo, el punto en el cual el Cu ejerce su efecto es todavía objeto de debate. Para contribuir a su esclarecimiento, los primeros experimentos que realizamos se correspondieron con los utilizados clásicamente, como desprendimiento de oxígeno y



medida de la fluorescencia inducida por luz actínica en preparaciones subcloroplastídicas. Pero además, incluimos en nuestro estudio otros experimentos llevados a cabo con equipos como espectroscopía de absorción inducida por flash de rayo láser y resonancia de spin electrónico, que nos permitieron estudiar con más detalle los intermediarios oxido-reductores del fotosistema II que intervienen en el transporte electrónico, caracterizando los cambios espectrales y cinéticos asociados a ellos como consecuencia de la presencia de Cu.

**A. Determinación del efecto inhibitor del Cu sobre el transporte electrónico en el fotosistema II por medidas polarográficas del desprendimiento de oxígeno**

**A.1. Análisis de las reacciones de Hill  $H_2O \rightarrow$  fenil-p-BQ y  $H_2O \rightarrow$  SiMo**

En el electrodo de oxígeno se midió la actividad del fotosistema II en las reacciones de Hill  $H_2O \rightarrow$  fenil-p-BQ y  $H_2O \rightarrow$  SiMo a pH 6.5, a concentraciones crecientes de Cu. El desprendimiento de oxígeno observado en las preparaciones control de BBYs- de espinaca fue de 540 y 95  $O_2/h/mg$  de clorofila, respectivamente. En la figura 16 se representa la curva de inhibición por Cu de la actividad del fotosistema II, expresada en tanto por ciento de actividad remanente, correspondiente a las dos reacciones de Hill anteriormente señaladas. En ambas curvas, se observó como el desprendimiento de oxígeno disminuyó al aumentar la concentración de Cu, alcanzándose una inhibición



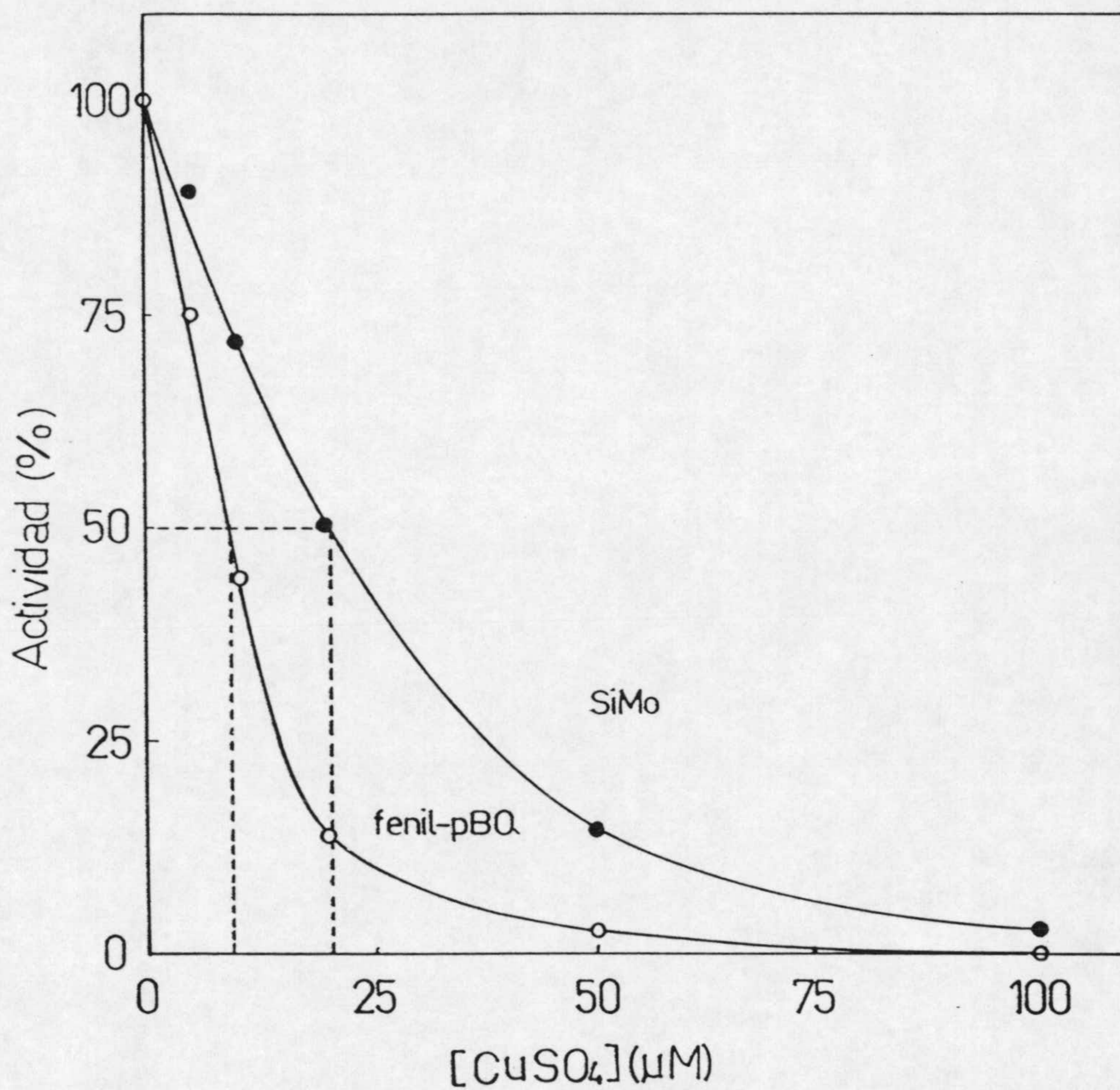


Figura 16. Inhibición por altas concentraciones de Cu del desprendimiento de oxígeno de partículas de fotosistema II en las reacciones de Hill  $H_2O \rightarrow$  fenil-p-BQ y  $H_2O \rightarrow$  SiMo. Las tasas iniciales en ausencia de Cu para las reacciones Hill  $H_2O \rightarrow$  fenil-p-BQ y  $H_2O \rightarrow$  SiMo fueron de 540 y 95  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg clor.}/\text{h}$ , respectivamente.



total con una concentración de Cu en el medio de 100  $\mu\text{M}$ . Los valores de  $I_{50}$  para las reacciones  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{fenil-p-BQ}$  y  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$  fueron 9 y 20  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Ya que el SiMo era un aceptor electrónico con un punto de acción muy controvertido, se midió el desprendimiento de oxígeno en presencia de DCMU en las reacciones de Hill  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{fenil-p-BQ}$  y  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$ , para dilucidar en qué lugar de la cadena de transporte electrónico aceptaba electrones. En la figura 17, se representa la curva de inhibición por DCMU de la actividad del fotosistema II, expresada en tanto por ciento, para ambas reacciones. Cuando era fenil-p-BQ el aceptor electrónico utilizado, la actividad disminuía drásticamente en presencia de DCMU obteniéndose un  $I_{50}$  con sólo 80 nM y una inhibición total con 10  $\mu\text{M}$  DCMU. Sin embargo, la reacción de Hill  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$  no fue tan sensible a la presencia de DCMU, el  $I_{50}$  de DCMU era 10  $\mu\text{M}$  y se mantuvo la inhibición del 50% aún con una concentración 50 DCMU, lo que indicaba la existencia de una actividad  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$  resistente al DCMU. Así, el SiMo era capaz de aceptar electrones en el fotosistema II a nivel tanto del sitio  $Q_B$  como del dominio feofitina- $Q_A$ - $\text{Fe}^{+2}$  no-hemínico, aunque en presencia de DCMU sólo era capaz de hacerlo a nivel de este último.

Tras constatar la inhibición por Cu de las reacciones  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$  y  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{fenil-p-BQ}$ , decidimos investigar el sitio  $Q_B$  como posible lugar de unión del Cu. La reacción de Hill  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$  se llevó a cabo en presencia de DCMU 20  $\mu\text{M}$ , para bloquear dicho lugar en presencia de diferentes concentraciones de Cu. El



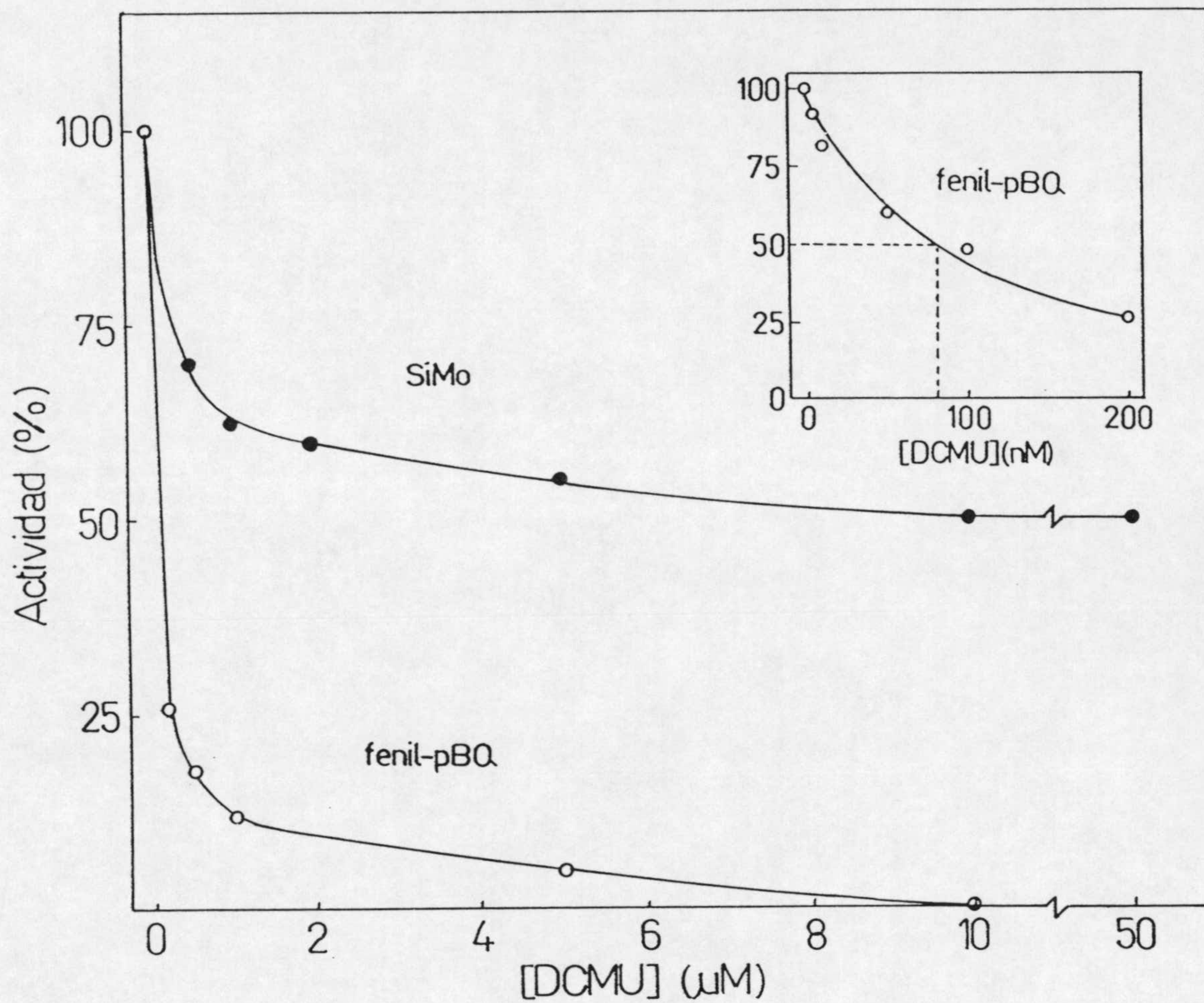


Figura 17. Inhibición por DCMU del desprendimiento de  $O_2$  de partículas de fotosistema II en las reacciones de Hill  $H_2O \rightarrow$  fenil-p-BQ y  $H_2O \rightarrow$  SiMo.



desprendimiento de oxígeno inicial del control bajo estas condiciones fue de 45  $\mu\text{mol/h/mg}$  de clorofila. La disminución de la actividad expresada en tanto por ciento del control fue idéntica a la producida en ausencia de DCMU y ya mostrada en la figura 16 (debido a la identidad de ambas curvas, no se muestra una nueva para éste ensayo). Ello puso de manifiesto que el Cu era capaz de bloquear el transporte electrónico en un lugar anterior al sitio  $Q_B$  evitando así que el SiMo pudiera reducirse.

A.2. Estudio de la dependencia del pH de la inhibición por Cu del transporte electrónico.

La actividad de las partículas de fotosistema II, medida como desprendimiento de oxígeno, fue observada a diferentes pHs. En la gráfica de la figura 17 se ilustran las variaciones de la actividad de dichas partículas en la reacción de Hill  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$  fenil-p-BQ en función del pH, en un rango comprendido entre 5.0 y 7.0. Para un pH entre 6.0 y 7.0, la actividad es básicamente la misma, sin embargo con valores inferiores a 6.0, la actividad disminuyó. Conocida la dependencia de la actividad de las partículas del fotosistema II con el pH, se llevó a cabo el estudio de la inhibición por Cu del transporte electrónico a diferentes pHs, utilizando 9  $\mu\text{M}$  de Cu como concentración por ser el valor de  $I_{50}$  a pH 6.5. En la misma figura 17, se observa como la inhibición aumentaba proporcionalmente con el pH, observándose, a pH 5, que la actividad del fotosistema II era prácticamente la misma en presencia y ausencia de Cu, mientras



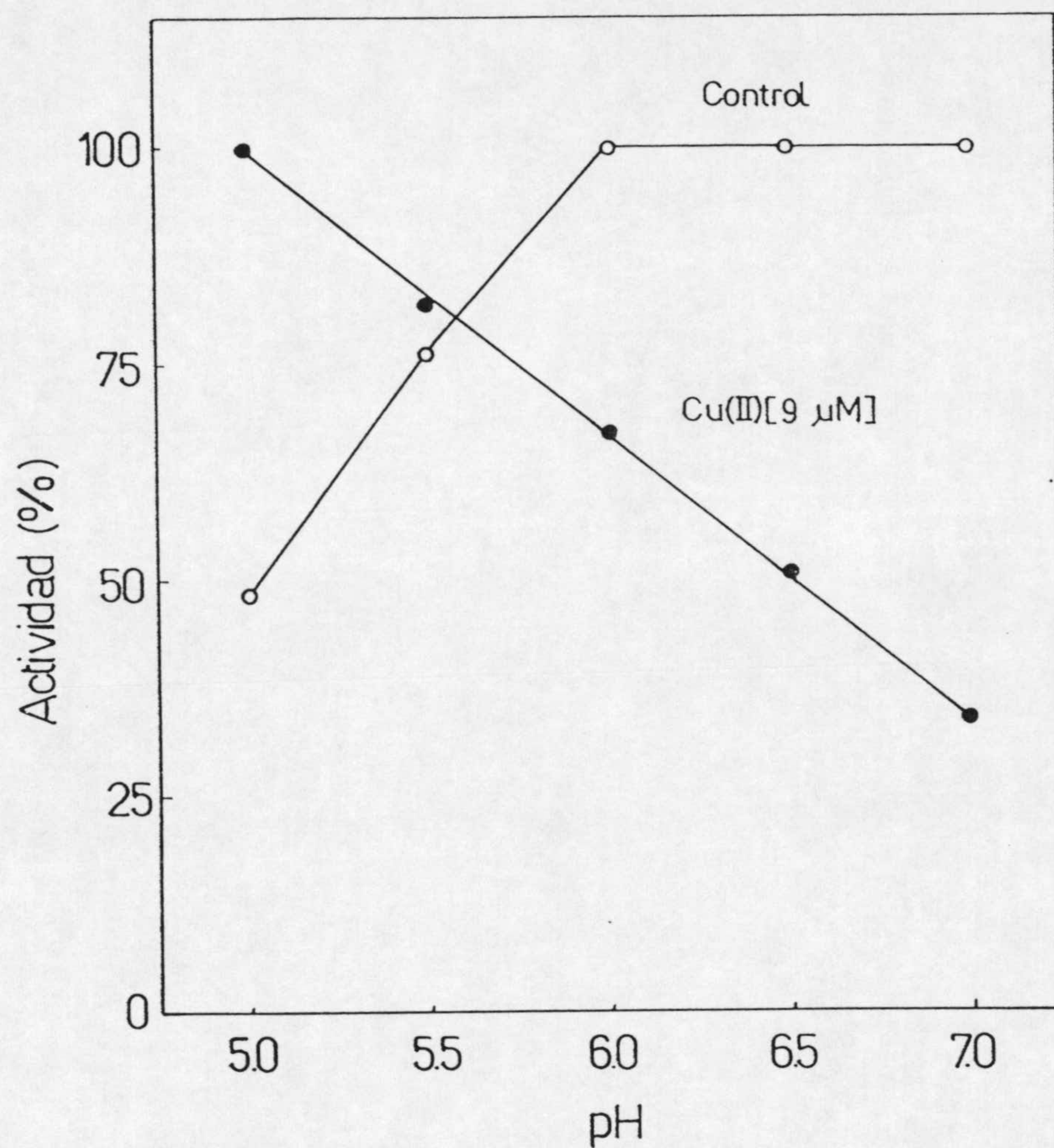


Figura 17. (o) Influencia del pH sobre la capacidad de desprendimiento de  $O_2$  de partículas de fotosistema II en la reacción de Hill  $H_2O \rightarrow$  fenil-*p*-BQ en ausencia de Cu y (•) en presencia de Cu 9  $\mu M$  ( $I_{50}$  a pH 6.5).



que, para un pH 7, la inhibición fue de un 65% para la misma concentración de Cu. Esta dependencia de la inhibición por Cu del pH, ponía de manifiesto que el metal podría unirse a un aminoácido con carácter ácido-base.

A.3. Estudio de la reversibilidad del efecto tóxico del Cu en el transporte electrónico del fotosistema II.

Tras comprobar el efecto nocivo de concentraciones tóxicas de Cu sobre el transporte electrónico en el fotosistema II, se planteó si sería posible la recuperación de la actividad al eliminar el Cu de su lugar de acción con un compuesto quelante como el EDTA 5 mM, que es habitualmente utilizado en experimentos con las partículas de fotosistema II. La concentración de Cu utilizada en estos ensayos, 30  $\mu$ M, era adecuada para inhibir un gran porcentaje del desprendimiento de oxígeno antes de la adición de EDTA como se ilustra en la figura 18 y no ocasionar tal exceso de Cu en el medio que la concentración de EDTA no fuera suficiente para quelar cuantitativamente el Cu en el medio. Las preparaciones de fotosistema II fueron sometidas a distintos periodos de iluminación, de 1 - 30 s, en presencia de Cu 30  $\mu$ M. Inmediatamente después se incubaron en oscuridad durante 1 min con EDTA. Transcurrido este tiempo, se midió el desprendimiento de oxígeno para comprobar si había una recuperación de la actividad por el tratamiento con EDTA. En la gráfica de la figura 18 se puede observar como la actividad de las partículas de fotosistema II disminuye en presencia de idénticas



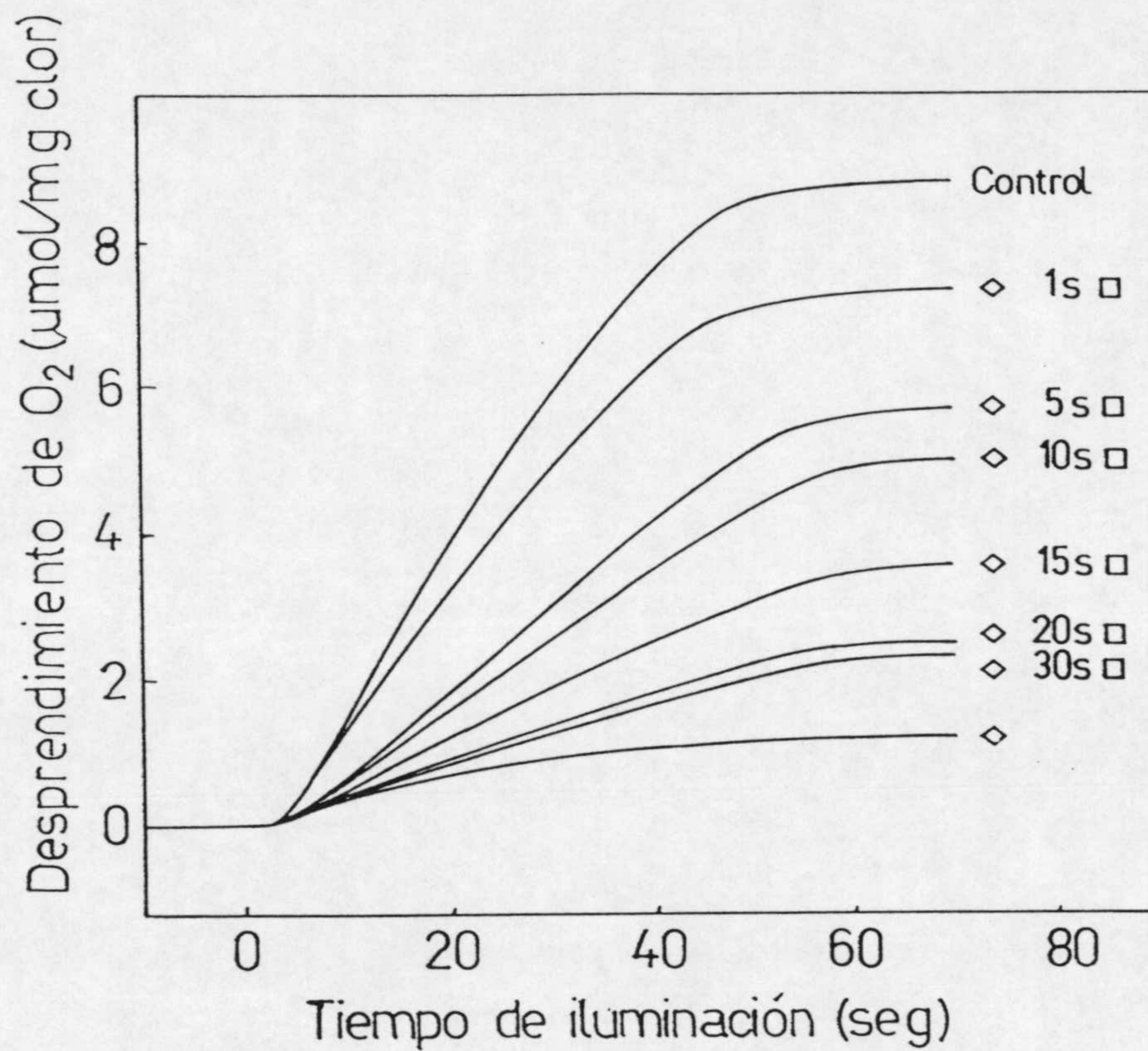


Figura 18. Análisis del desprendimiento de  $O_2$  por la reacción de Hill  $H_2O \rightarrow$  fenil-p-BQ de partículas de fotosistema II de espinaca, preiluminadas durante diferentes periodos (1-30 s) en presencia de Cu  $30 \mu M$  y tratadas posteriormente con EDTA  $5 mM$ .



concentraciones de Cu cuanto mayor es el periodo de la incubación en luz. Esto indica una menor recuperación a mayor permanencia en luz, hasta que tras 30 s en luz el daño es irreversible.

En resumen, los resultados obtenidos con el electrodo de oxígeno muestran que el Cu inhibe el desprendimiento de oxígeno en las preparaciones de las partículas de fotosistema II como consecuencia del bloqueo que provoca en la cadena de transporte electrónico de dicho fotosistema, al menos en un lugar anterior al sitio  $Q_B$  como se ha puesto de manifiesto con ambas reacciones de Hill ensayadas, aunque no podría descartarse que pudiera haber un efecto secundario sobre  $Q_B$ . La inhibición aparece como dependiente del pH indicando que el Cu se debe unir a un grupo con carácter ácido-base y, por último, el efecto tóxico del metal resulta irreversible y dependiente de la luz.

### 3B. Análisis del lugar de acción del Cu tóxico en el fotosistema II mediante técnicas de fluorescencia modulada

#### B.1 Evolución de las señales de fluorescencia ( $F_M$ ) y ( $F_0$ ) a concentraciones crecientes de Cu.

Con objeto de determinar si el lugar de acción del Cu tóxico podría ser el mismo sistema de fotólisis del agua o un punto posterior a éste en el lado donador del fotosistema II, próximo al centro de reacción se realizaron ensayos con partículas de fotosistema II tratadas con Tris que tenían el sistema de fotólisis del agua inactivado. Medimos su actividad por las



## RESULTADOS

---

curvas de inducción de fluorescencia con un fluorímetro PAM de fluorescencia modulada, añadiendo un donador electrónico al medio como  $\text{MnCl}_2$  2 mM. La relación entre  $F_M/F_0$  fue alrededor de 4 para los ensayos control bajo las condiciones de luz señaladas en Material y Métodos. En la figura 19, se registran los cambios en las curvas de inducción de la fluorescencia a diferentes concentraciones de Cu en el medio. La fluorescencia inicial  $F_0$  varió mínimamente, en todo el rango de concentraciones de Cu ensayadas, aunque se observó una tendencia a disminuir con el incremento de éstas. Esto podría deberse al hecho de que el  $\text{Cu}^{+2}$  en solución pudiera amortiguar la fluorescencia al ser un ion paramagnético, mas que a una posible acción sobre la antena principal del fotosistema II (LHC II), lo que suele relacionarse con cambios en  $F_0$ . En lo que respecta a la fluorescencia máxima ( $F_M$ ), la intensidad de la señal disminuyó con el incremento de la concentración de Cu. El valor de  $I_{50}$  resultante para la inhibición por Cu de la fluorescencia variable fue 30  $\mu\text{M}$ . En ningún momento se observó un incremento cinético de la inducción de la fluorescencia, tal y como sucede con inhibidores del lado aceptor del fotosistema II como el DCMU. Además, aun cuando la concentración de Cu en el medio era muy alta no se pudo alcanzar el valor de  $F_0$ , lo que indicaba que debería haber una fracción de partículas de fotosistema II tratadas con Tris, insensible a la presencia de Cu en el medio. Estos resultados indicaban que el lugar de acción del Cu en el transporte electrónico del



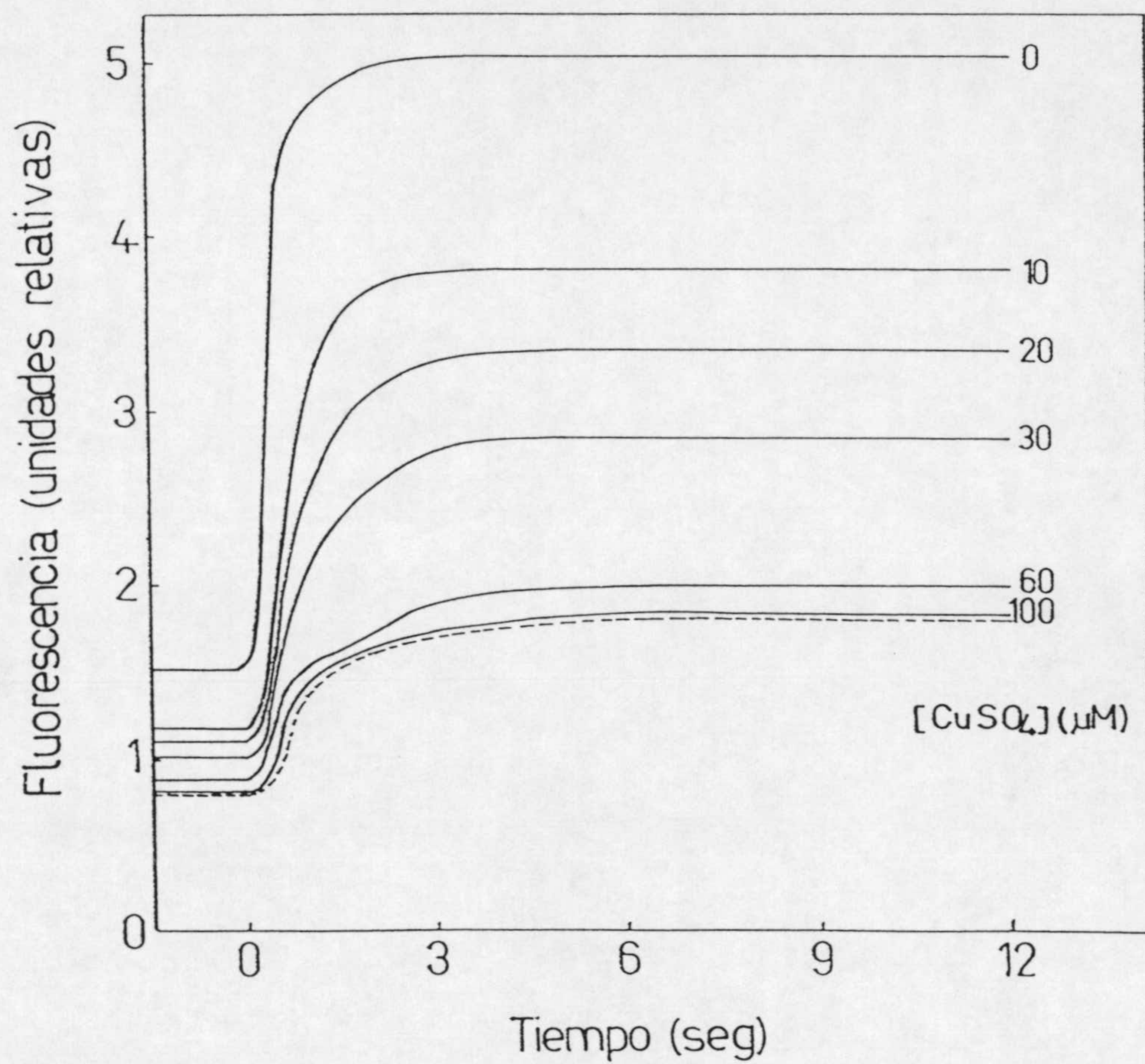


Figura 19. Efecto del Cu sobre la curva de inducción de la fluorescencia de la clorofila en preparaciones de partículas de fotosistema II tratadas con Tris, en presencia de  $\text{MnCl}_2$  2mM como donador electrónico.



## RESULTADOS

---

fotosistema II debería estar localizado en el lado donador en un punto posterior al sistema de fotólisis del agua más próximo al centro de reacción, ya que incluso inactivando aquél se seguía manifestando el efecto inhibitor del Cu tóxico.

### B.2. Dependencia del pH de la capacidad de inhibición por Cu de la fluorescencia ( $F_M$ ).

También, se estudió la influencia del pH en el efecto inhibitor del Cu sobre el fotosistema II, por medidas de la curva de inducción de la fluorescencia en partículas de fotosistema II tratadas con Tris. Se realizaron, al igual que en el electrodo de oxígeno, ensayos con diferentes valores de pH. En la figura 20, se muestra el efecto del pH sobre la actividad de dichas partículas utilizando como donador  $MnCl_2$  2mM. En primer lugar, no se observó efecto alguno en el rango de pH de 5-7 sobre la fluorescencia inicial ( $F_0$ ), la fluorescencia máxima no varió y consecuentemente la relación  $F_M/F_0$  se mantuvo en un valor de 4, sólo para pH 5, hubo una ligera disminución de dicho valor. Sin embargo, sí se observó una ralentización de la cinética al bajar el pH. En base a estos resultados previos, se llevó a cabo un ensayo similar en presencia de una concentración de Cu similar al  $I_{50}$  para la inhibición de la fluorescencia máxima a pH 6.5. En la figura 21 se registra el aumento del efecto inhibitor del Cu sobre la fluorescencia máxima ( $F_M$ ) al incrementar el pH del medio, mientras que la fluorescencia inicial ( $F_0$ ) permaneció invariable. En dicha gráfica, se aprecia que la fase entre  $F_0$  y



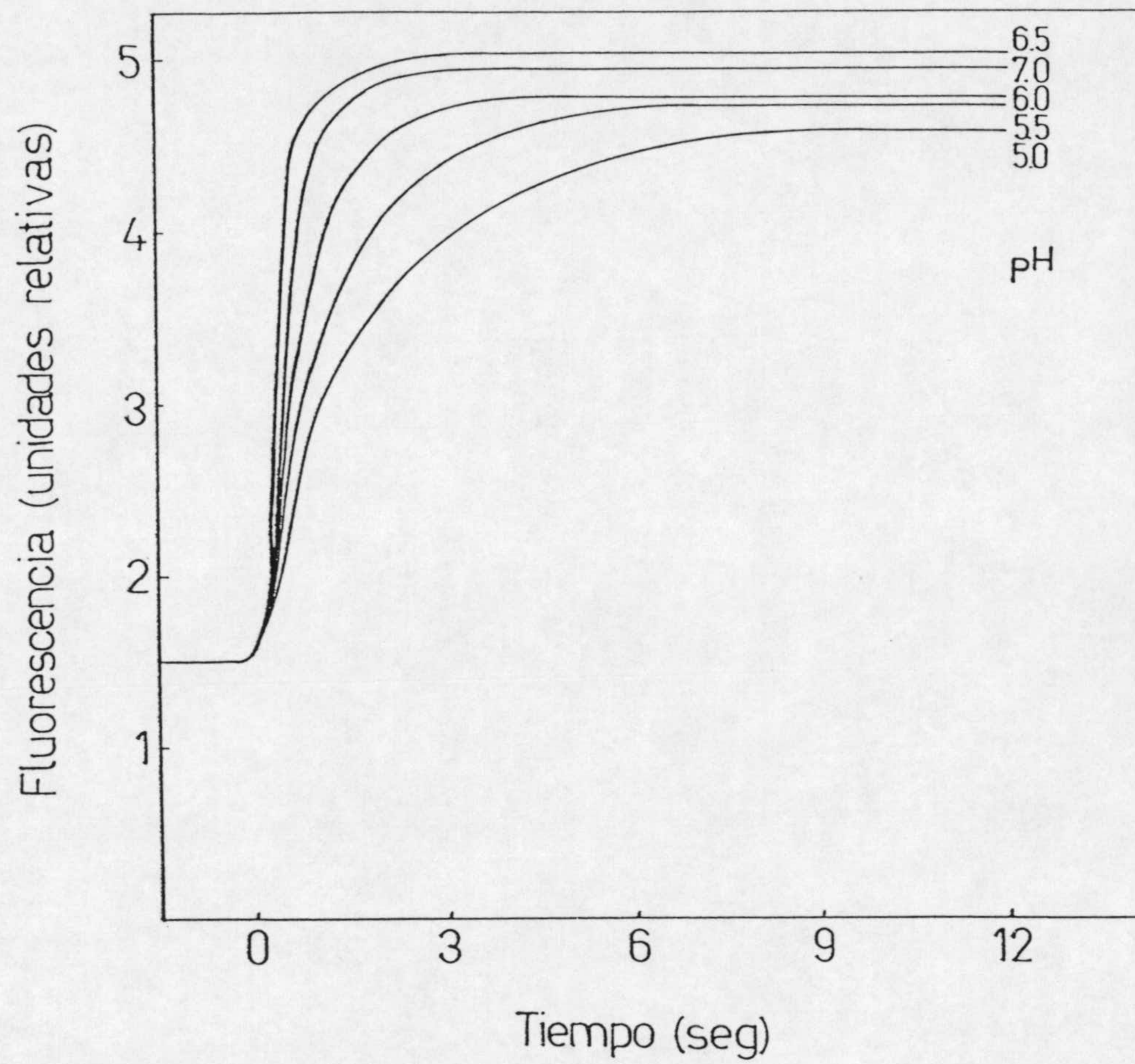


Figura 20. Efecto del pH sobre la curva de inducción de la fluorescencia de la clorofila en BBY tratadas con Tris en presencia de  $\text{MnCl}_2$  2 mM como donador electrónico.



el punto I, asociada a la actividad de los centros no-reductores de  $Q_B$ , no se afecta por la concentración de Cu 30  $\mu\text{M}$  para el rango de pH, mientras que la fase comprendida entre I y la fluorescencia máxima ( $F_M$ ), asociada a los centros con capacidad de reducir  $Q_B$ , se inhibe más acusadamente.

En resumen, los resultados obtenidos mediante la aplicación de técnicas de fluorescencia modulada indicarían que el Cu inhibiría principalmente el fotosistema II en su lado donador, ya que la inhibición de la fluorescencia por Cu se concretaba en un descenso de la fluorescencia máxima ( $F_M$ ), siendo más acusada cuando el pH se incrementaba, lo que corroboraría lo ya apuntado por las medidas polarográficas de desprendimiento de oxígeno, que el Cu debería unirse a un grupo con carácter ácido-base de lado oxidante del fotosistema II y probablemente próximo al centro de reacción.

### C. Determinación del mecanismo de acción del Cu a concentraciones tóxicas en el fotosistema II mediante espectroscopía de absorción inducida por flash de rayo láser

La espectroscopía de absorción inducida por flash nos permitió determinar los cambios de absorbancia asociados al transporte electrónico de algunas especies características del fotosistema II y sus correspondientes parámetros cinéticos. El estudio del efecto tóxico del Cu se ha realizado a varias longitudes de onda. Estudiamos a 830 y 436 nm el cambio de



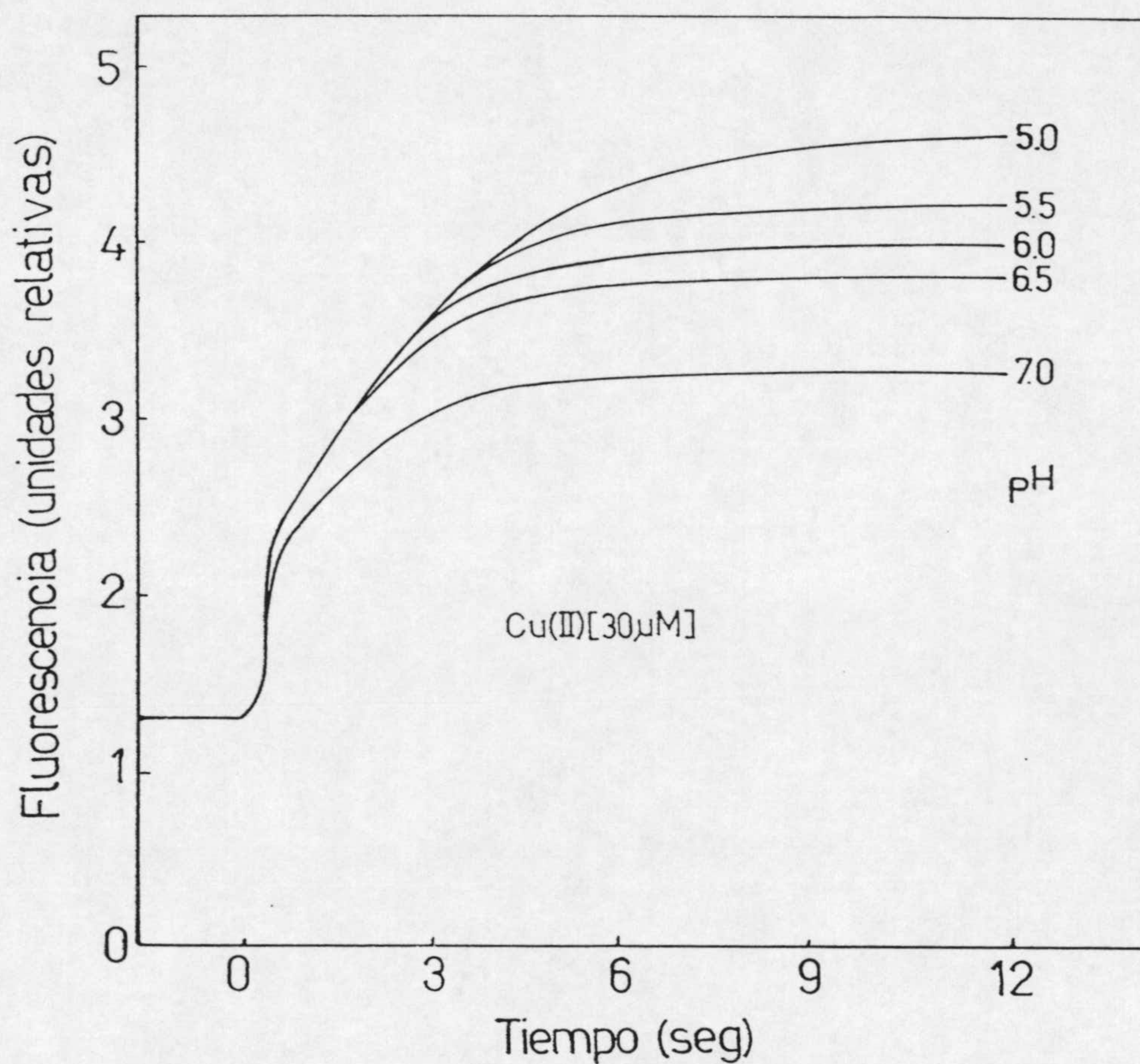


Figura 21. Efecto del pH sobre el efecto inhibitorio por Cu de la inducción de la fluorescencia de clorofila en partículas de fotosistema II tratadas con Tris en presencia de  $\text{MnCl}_2$  2 mM como donador electrónico.



## RESULTADOS

---

absorbancia inducido por flash asociados al centro de reacción P680, a 325 nm el correspondiente cambio de absorción de  $Q_A$  y a 355 nm los cambios de absorbancia debido a las transiciones S del sistema de fotólisis del agua.

C.1. Estudio del efecto del Cu en la separación de cargas  $P680^+Q_A^-$ . Caracterización de los parámetros cinéticos asociados a los cambios de absorbancia registrados a 830 nm en presencia de Cu.

Las partículas de fotosistema II con un sistema de fotólisis intacto se caracterizan porque la reducción del  $P680^+$  presenta una cinética multifásica. Aproximadamente el 70% de su reducción transcurre en un rango entre 30-250 ns debido a su donador natural la tirosina Z (van Best y Mathis, 1978); sin embargo dicha reducción no pudo ser detectada en el espectrómetro de haz simple que utilizamos, ya que su tiempo de resolución era de 2  $\mu$ s. Eckert *et al.* (1991) diseñaron un método indirecto para la determinación de la amplitud máxima esperada a 830 nm, mediante la adición de  $NH_2OH$  que inhibía el sistema de fotólisis del agua y actuaba como donador electrónico para la tirosina Z, de modo que la reducción del  $P680^+$  por la tirosina Z se ralentizaba transcurriendo en un rango de 10-20  $\mu$ s y, por tanto, nos permitió su detección en el aparato de que se disponía para las medidas.

En la figura 22A se observan los cambios de absorbancia a 830 nm inducidos por flash de rayo láser en partículas de fotosistema II de espinaca, en presencia y ausencia de  $NH_2OH$



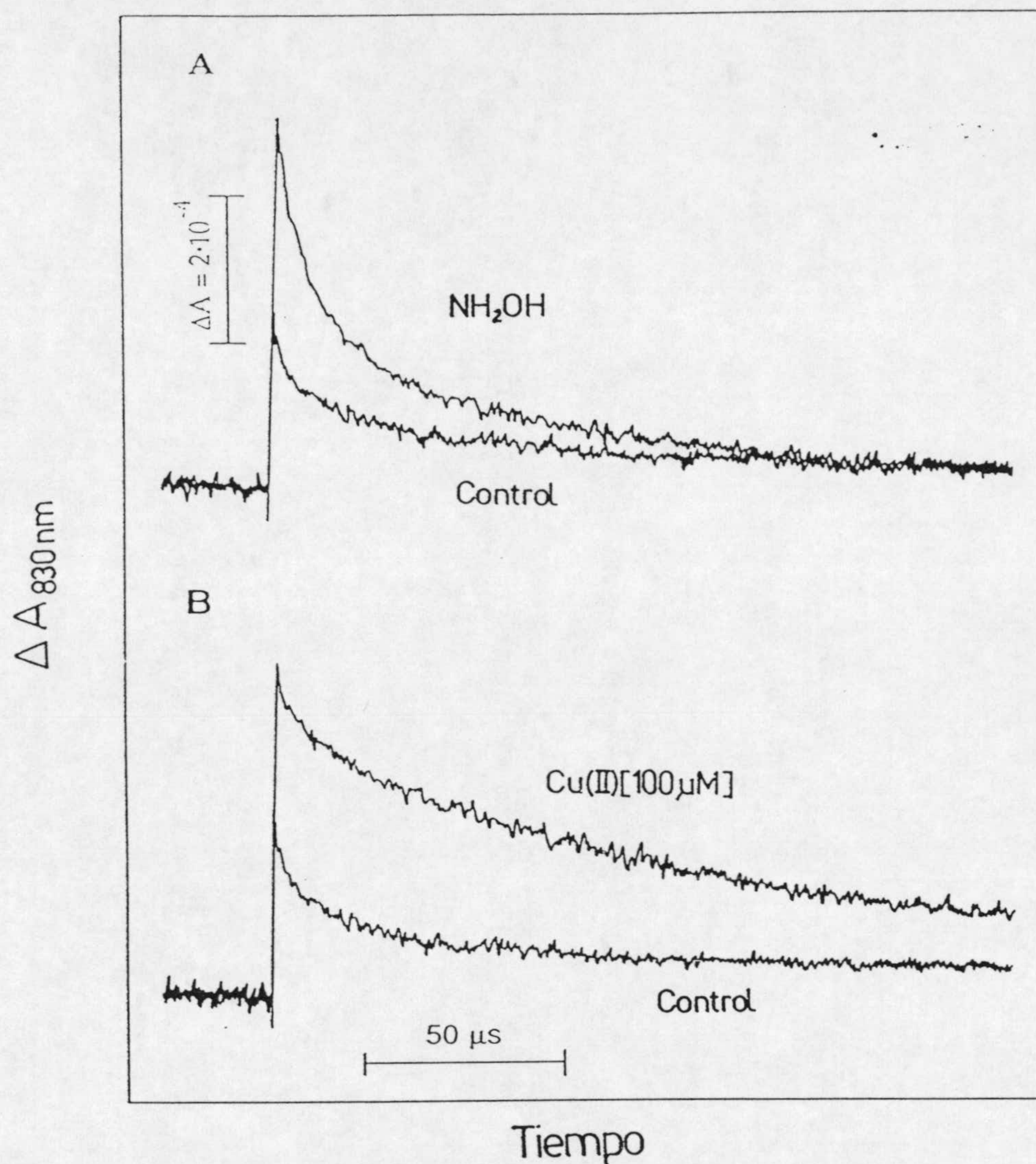


Figura 22. Cinética de los cambios de absorbancia a 830 nm inducido por flash de rayo láser en partículas de fotosistema II. (A) Partículas de fotosistema II control (trazo inferior) y tratadas con  $\text{NH}_2\text{OH}$  2mM (trazo superior). (B) Partículas de fotosistema II control (Trazo inferior) y tratadas con Cu 100  $\mu\text{M}$  (trazo superior). Las muestras fueron conservadas en oscuridad, realizándose posteriormente 16 medidas sobre ellas para mejorar la relación señal/ruido. El tiempo de duración de cada flash fue de 3 ns y el periodo entre ellos de 1 s. La concentración de clorofila fue de 50  $\mu\text{g/mL}$ . DCBQ 100  $\mu\text{M}$  fue el aceptor electrónico utilizado.



## RESULTADOS

---

2 mM. En ausencia de  $\text{NH}_2\text{OH}$ , había un incremento de absorbancia que tenía asociado una cinética en el rango de  $\mu\text{s}$  correspondiente a la recombinación entre el  $\text{P680}^+\text{Q}_\text{A}^-$  ( $\tau=140-160 \mu\text{s}$ ) que se producía mientras que la tirosina Z permanecía oxidada, pero no se detectaba el incremento de absorbancia en la escala de tiempo de ns asociada a la oxidación de la tirosina Z por  $\text{P680}^+$ . Para determinar el porcentaje de  $\text{P680}^+$  que era reducido por la tirosina Z y por la reacción de recombinación ( $\text{P680}^+\text{Q}_\text{A}^-$ ), respectivamente, se añadió  $\text{NH}_2\text{OH}$  2 mM obteniendo una amplitud de absorbancia que fue 2.4 veces mayor que en ausencia de  $\text{NH}_2\text{OH}$ , lo que establecía que en nuestras partículas de fotosistema II aproximadamente el 60% de los centros de reacción P680 eran reducidos por la tirosina Z, mientras que el 40% restante correspondía con la reacción de recombinación entre el  $\text{P680}^+$  y  $\text{Q}_\text{A}^-$  cuando aún permanecía oxidada la tirosina Z.

En la figura 23 se muestran los cambios de absorbancia a 830 nm con sus correspondientes componentes en ns ( $A_{830}^{\text{ns}} = A_{830}^{\text{Total}}(+\text{NH}_2\text{OH}, t=2\mu\text{s}) - A_{830}^{\mu\text{s}}(-\text{NH}_2\text{OH}, t=0)$ ) y  $\mu\text{s}$  ( $A_{830}^{\mu\text{s}}(-\text{NH}_2\text{OH}, t=0)$ ), además de los valores de desprendimiento de oxígeno obtenido para varias concentraciones de Cu. El desprendimiento de oxígeno y la componente en ns disminuyeron proporcionalmente con el incremento de la concentración de Cu en el medio. Se ha de tener en cuenta para este estudio comparativo que las concentraciones de clorofila fueron distintas por los requerimientos de cada uno de los aparatos. Así para la medida del desprendimiento del oxígeno en el electrodo de oxígeno se



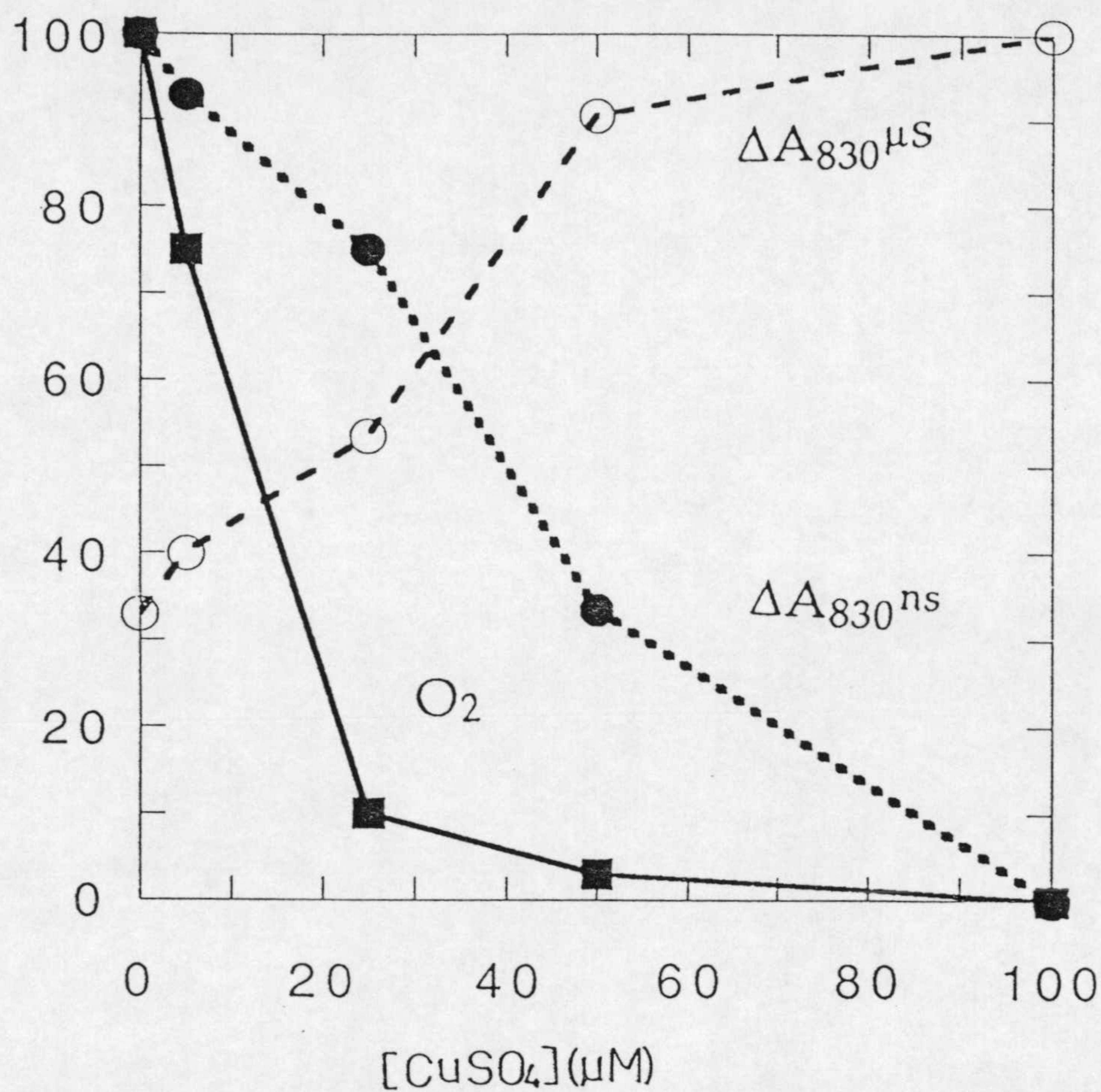


Figura 23. Representación de los cambios de las componentes de ns ( $A_{830}^{ns}$ ) y  $\mu s$  ( $A_{830}^{\mu s}$ ) del incremento de absorbancia a 830 nm e inhibición del desprendimiento de  $O_2$  en la reacción de Hill  $H_2O \rightarrow$  fenil-p-BQ en función de la concentración de Cu en el medio. La componente de ns fue determinada de acuerdo a la expresión ( $A_{830}^{ns} = A_{830}^{Total} (+NH_2OH, t=2\mu s) - A_{830}^{\mu s} (-NH_2OH, t=0)$ ) establecida por Eckert et al. (1991). La concentración de clorofila fue de 50  $\mu g/mL$  para la determinación de las componentes del  $A_{830}$  y de 10  $\mu g/mL$  para la curva de inhibición del desprendimiento de  $O_2$ .



## RESULTADOS

---

utilizó 10  $\mu\text{g}$  de clorofila/mL, mientras que en el espectrómetro de 830 nm se tomó 50  $\mu\text{g}$  de clorofila/mL; siendo la relación de átomos de Cu por centros de reacción de partículas de fotosistema II 2.5 veces mayor que en el espectrofotómetro de 830 nm. En cuanto a la componente en  $\mu\text{s}$  esta aumentó con sucesivas concentraciones de Cu alcanzando un valor máximo igual al obtenido con  $\text{NH}_2\text{OH}$  2 mM. La inhibición de la componente de ns indicaba que la reducción del  $\text{P680}^+$  no transcurría con la misma cinética que en las partículas de fotosistema II intactas, para determinar las componentes cinéticas de la reducción del  $\text{P680}^+$  y qué componentes del fotosistema II podrían reducirlo bajo dichas condiciones se utilizó la concentración de Cu 100  $\mu\text{M}$  que inhibía totalmente la componente de ns y para la cual el incremento de absorbancia a 830 nm era máximo.

En la figura 22B se muestran tanto las diferencias en los cambios de absorción como los cambios cinéticos entre las partículas de fotosistema II intactas y las tratadas con Cu 100  $\mu\text{M}$ . Además, el incremento de la absorbancia de la muestra tratada con Cu 100  $\mu\text{M}$  coincidía con el correspondiente a la muestra tratada con  $\text{NH}_2\text{OH}$ , aunque no coincidieron sus componentes cinéticas, siendo el efecto ralentizador de la cinética del Cu mayor que el de la  $\text{NH}_2\text{OH}$ .

En la figura 24, se ilustran los cambios de absorbancia a 830 nm en centros de reacción obtenidos según el método de Haag *et al.* (1990). Estos resultados son similares a los presentados para partículas de fotosistema II. Primeramente se determinó la



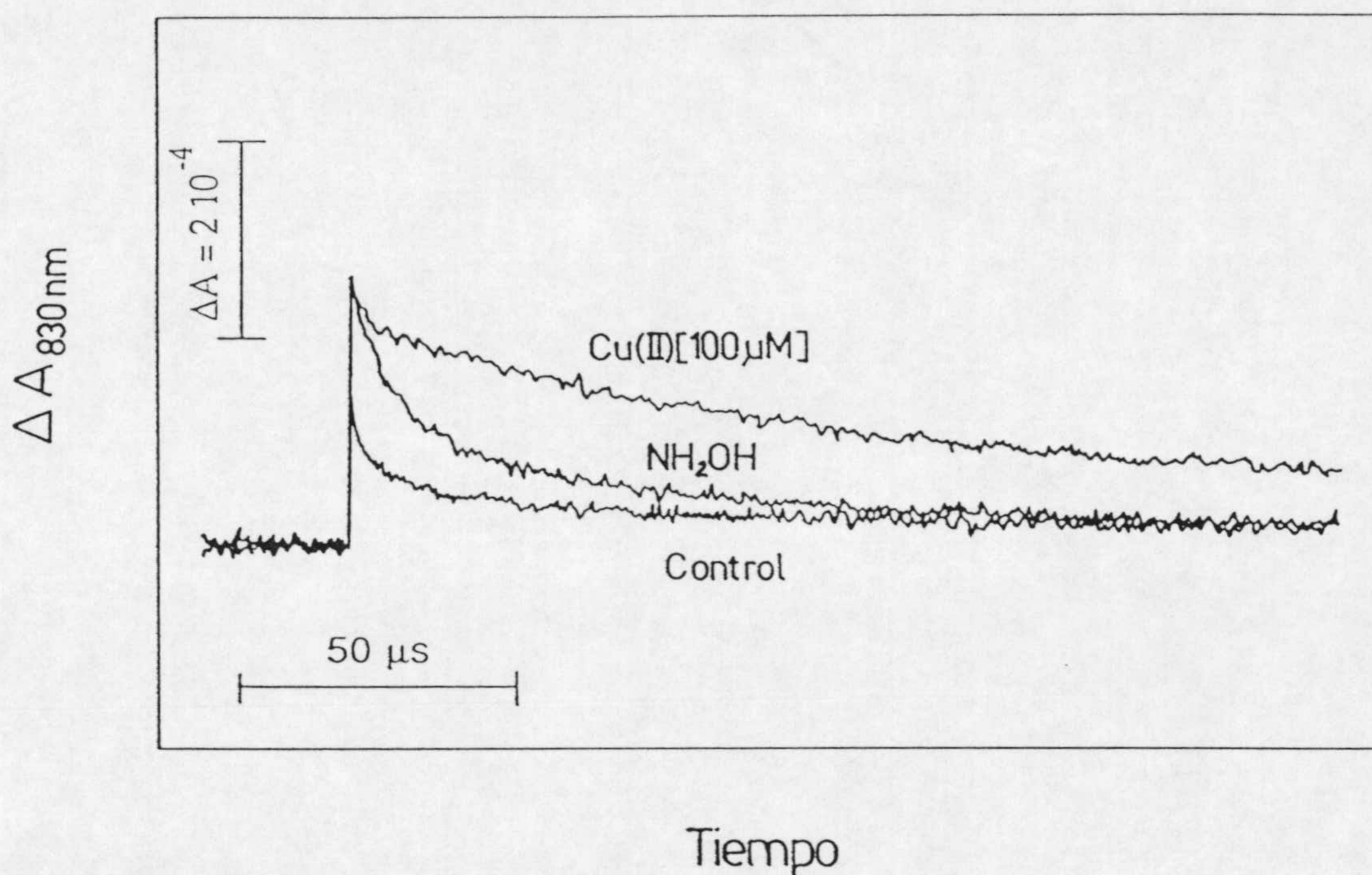


Figura 24. Cinética de los cambios de absorción a 830 nm inducidos por flash de rayo láser en centros de reacción control (trazo inferior), tratados con Cu 100  $\mu\text{M}$  (trazo superior) y con NH<sub>2</sub>OH 2 mM (trazo medio). Las muestras fueron conservadas en oscuridad realizándose posteriormente 16 medidas sobre ellas para mejorar la relación señal/ruido. El tiempo de duración de cada flash fue de 3 ns y el periodo entre ellos de 1 s. La concentración de clorofila fue de 25  $\mu\text{g/mL}$ . DCBQ 100  $\mu\text{M}$  fue el aceptor electrónico utilizado.



## RESULTADOS

---

componente de ns ( $A_{830}^{ns} = A_{830}^{Total}(+NH_2OH, t=2\mu s) - A_{830}^{\mu s}(-NH_2OH, t=0)$ ) asociada a la tirosina Z mediante la adición de  $NH_2OH$  2 mM y se registró la máxima amplitud en la absorbancia a 830 nm, que resultó ser 2.1 mayor. Con la adición de Cu 100  $\mu M$  a la preparación de centros de reacción se obtuvo la misma amplitud inicial en la absorbancia que con  $NH_2OH$  2 mM e igualmente la componente en ns asociada a la donación electrónica de la tirosina Z desapareció, registrándose una nueva cinética multifásica en una escala de  $\mu s$ . Por lo tanto, el efecto causado por Cu sobre centros de reacción de fotosistema II fue el mismo que en partículas de fotosistema II.

En la tabla 15 se detallan las componentes cinéticas tanto de las partículas de fotosistema II tratadas con  $NH_2OH$  2 mM como con Cu 100  $\mu M$  para partículas de fotosistema II y centros de reacción.

Tabla 15. Componentes cinéticas asociadas a la reducción del P680<sup>+</sup> determinadas por el cambio de absorbancia a 830 nm inducido por flash de rayo láser.

PS II, $NH_2OH$ 2 mM	PS II, Cu 100 $\mu M$	CR, Cu 100 $\mu M$
10-20 $\mu s$ 60% 120-160 $\mu s$ 40%	20-40 $\mu s$ 20-30% 120-160 $\mu s$ 60-70% > 1 ms 5-15%	10-40 $\mu s$ 20-30% 140-170 $\mu s$ 60% $\geq$ 2 ms 10-20%

También, se midieron los cambios de absorbancia a 830 nm en partículas de fotosistema II tratadas con Tris. En ellas, la



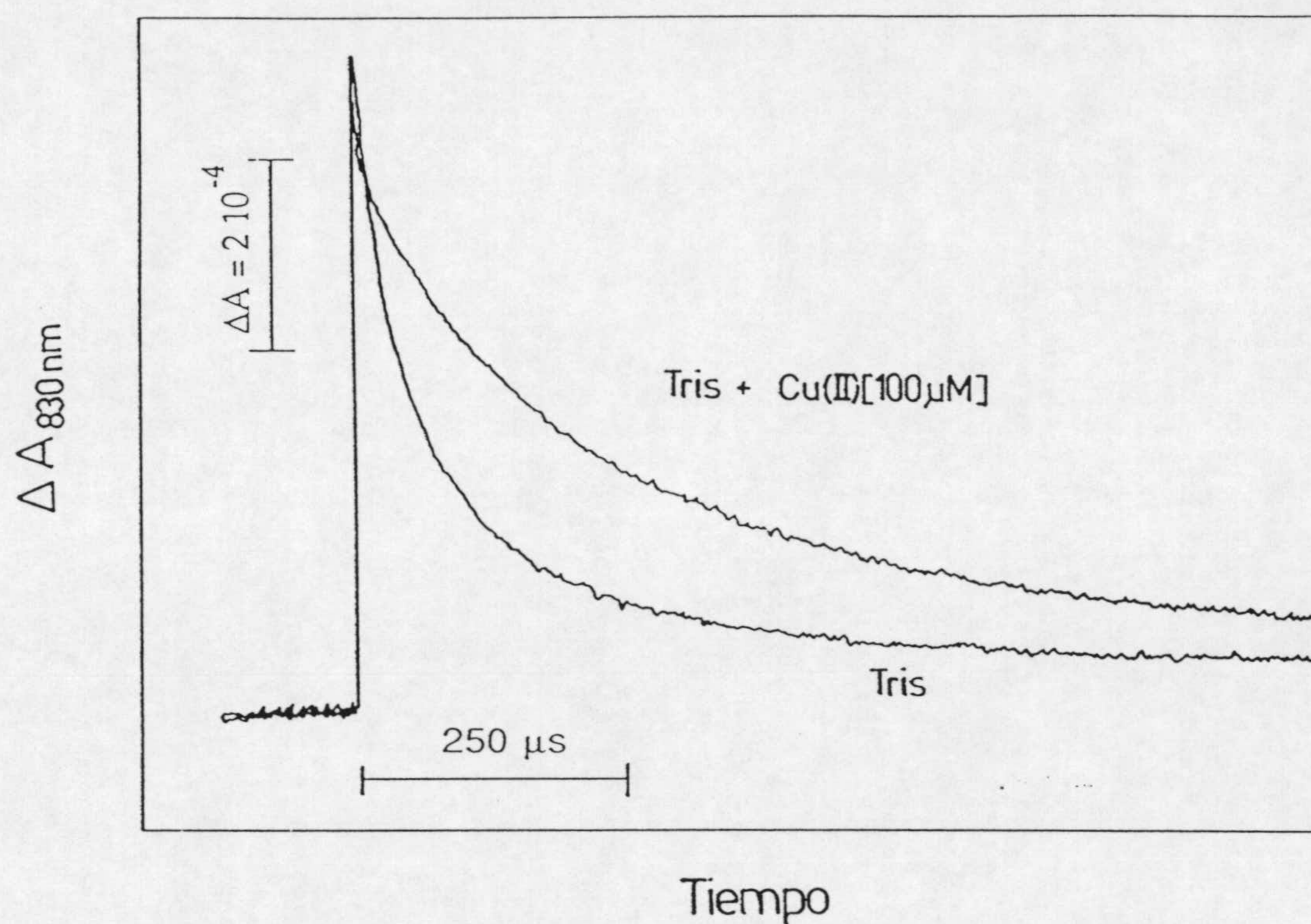


Figura 25. Cinética del cambio de absorción a 830 nm inducido por flash de rayo láser en partículas de fotosistema II tratadas con Tris (trazo inferior) y en las mismas preparaciones tras la adición de  $\text{Cu } 100 \mu\text{M}$  (trazo superior). Las muestras fueron conservadas en oscuridad realizándose posteriormente 16 medidas sobre ellas para mejorar la relación señal/ruido. El tiempo de duración de cada flash fue de 3 ns y el periodo entre ellos de 1 s. La concentración de clorofila fue de  $50 \mu\text{g/mL}$ . DCBQ  $100 \mu\text{M}$  fue el aceptor electrónico utilizado.



## RESULTADOS

---

tirosina Z reduce al P680<sup>+</sup> con una cinética lenta en un tiempo comprendido entre 10-20  $\mu$ s (Conjeaud y Mathis, 1980), lo que permitía observar los cambios de absorbancia a 830 nm asociados a la reducción del P680<sup>+</sup> en nuestras condiciones de trabajo. Estos se registran en la figura 25 donde se observa que las partículas de fotosistema II tratadas con Tris presentan idéntica amplitud inicial del incremento de la absorbancia a 830 nm en ausencia y presencia de Cu 100  $\mu$ M, sin embargo las preparaciones tratadas con Cu mostraban una cinética mucho más lenta al igual que en los casos de partículas de fotosistema II y centros de reacción bajo condiciones tóxicas de dicho metal, indicando que éste bloquearía el transporte electrónico entre la tirosina Z y el P680<sup>+</sup>. Para demostrar que la inhibición por Cu bloquearía principalmente la transferencia electrónica entre la tirosina Z y el P680, se incubaron con Cu 100  $\mu$ M en oscuridad durante 30 min., muestras de partículas de fotosistema II (figura 26, trazo superior) y partículas de fotosistema II tratadas con Tris (figura 26, trazo central) y se midieron posteriormente los cambios de absorbancia a 830 nm tras 4 pulsos individuales de flash. Después del primer flash de luz tras un periodo de incubación en oscuridad deberíamos haber esperado, en el supuesto de que la tirosina Z hubiera podido reducir al P680<sup>+</sup>, que la componente cinética rápida del cambio de absorción a 830 nm tuviera un tiempo de 30-250 ns para las partículas de fotosistema II o de 10-20  $\mu$ s en las preparaciones de partículas de fotosistema II tratadas con Tris; sin embargo, en ambos casos no



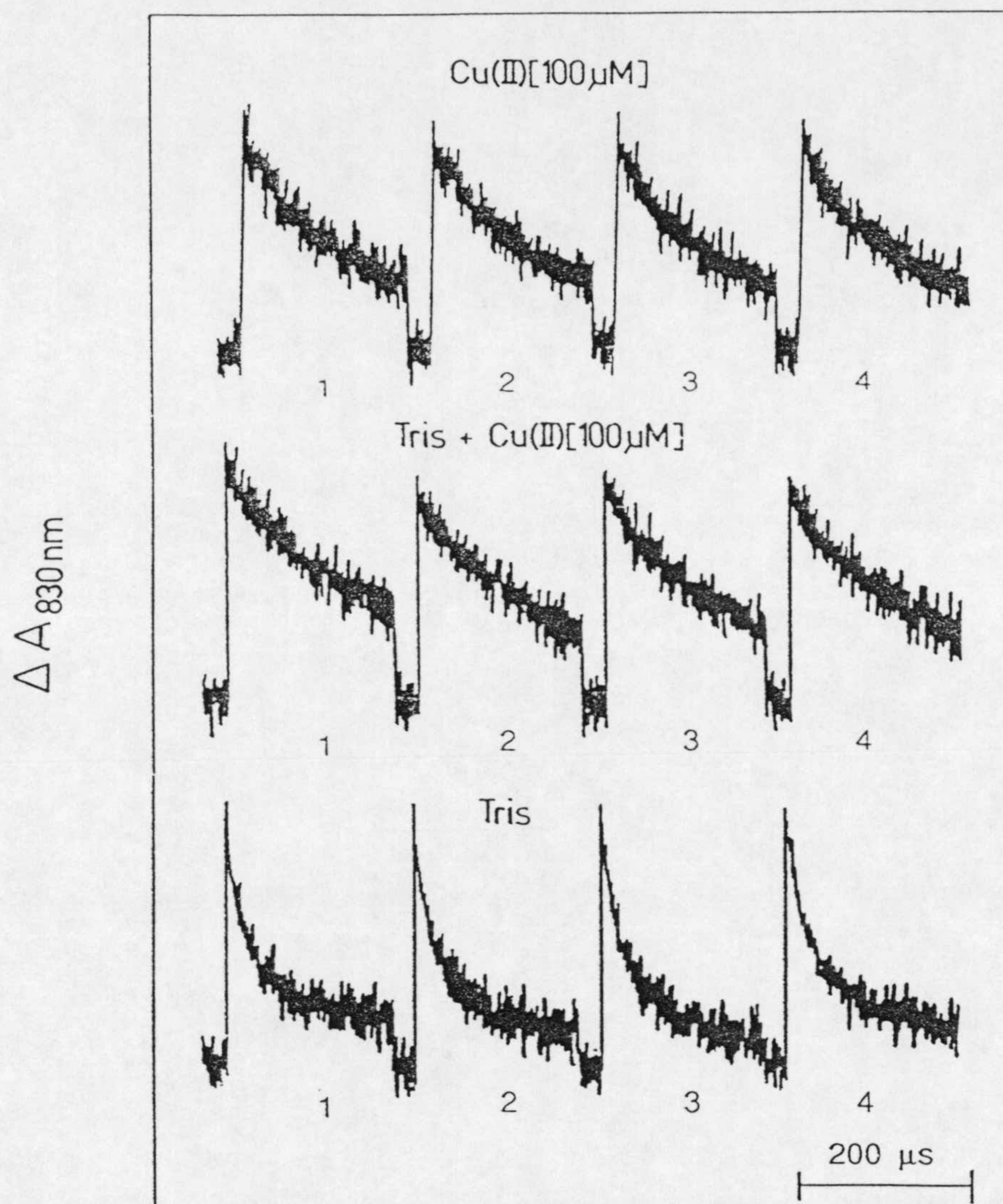


Figura 26. Cinética de los cambios de absorción a 830 nm inducidos por flash de rayo láser en partículas de fotosistema II tratadas con Cu 100  $\mu\text{M}$  (trazo superior), partículas de fotosistema II tratadas con Tris y con Cu 100  $\mu\text{M}$  (trazo central) y partículas de fotosistema II tratadas con Tris (trazo inferior). Las muestras fueron conservadas previamente en oscuridad y posteriormente sometidas a una serie de 4 flashes realizándose para cada flash 16 medidas. El tiempo de duración de cada flash fue de 3 ns y el periodo entre ellos de 700 ms. La concentración de clorofila fue de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . DCBQ 100  $\mu\text{M}$  fue el aceptor electrónico utilizado.



## RESULTADOS

---

se observaron dichas componentes cinéticas y sí se obtuvieron unas componentes cinéticas mucho más lentas. Además, las componentes cinéticas del 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> flash eran idénticas en los dos tipos de preparaciones, lo que indicaba que tampoco se podría haber propuesto que la reducción del P680<sup>+</sup> por la tirosina Z en presencia de Cu hubiera sido más lenta aún, ya que en tales circunstancias las componentes cinéticas entre el 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> flash hubieran sido distintas al permanecer oxidada en una mayor proporción la tirosina Z después del primer flash, lo que puso de manifiesto que el Cu bloqueaba la oxidación de la tirosina Z por el P680<sup>+</sup>.

C.2. Análisis de la separación de cargas P680<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> en presencia de concentraciones tóxicas de Cu por medida de los cambios de absorbancia a 436 nm.

A 436 nm el P680<sup>+</sup> tiene un mínimo de absorbancia característico que nos permitiría ratificar si los cambios de absorbancia detectados a 830 nm se correspondían con el cambio del estado de oxido-reducción del P680<sup>+</sup> (Gerken *et al.*, 1989). El aparato utilizado para esta medida tenía un tiempo de resolución de 30  $\mu$ s lo que no permitía detectar la disminución de la absorbancia en muestras no tratadas; sin embargo, cuando se añadió Cu 100  $\mu$ M, hubo una ralentización de la cinética de reducción de P680<sup>+</sup> de forma que permitió su detección (figura 27), resultando un tiempo de vida media de 130-140  $\mu$ s (75-80%) confirmando que el incremento de absorción a 830 nm igualmente

---



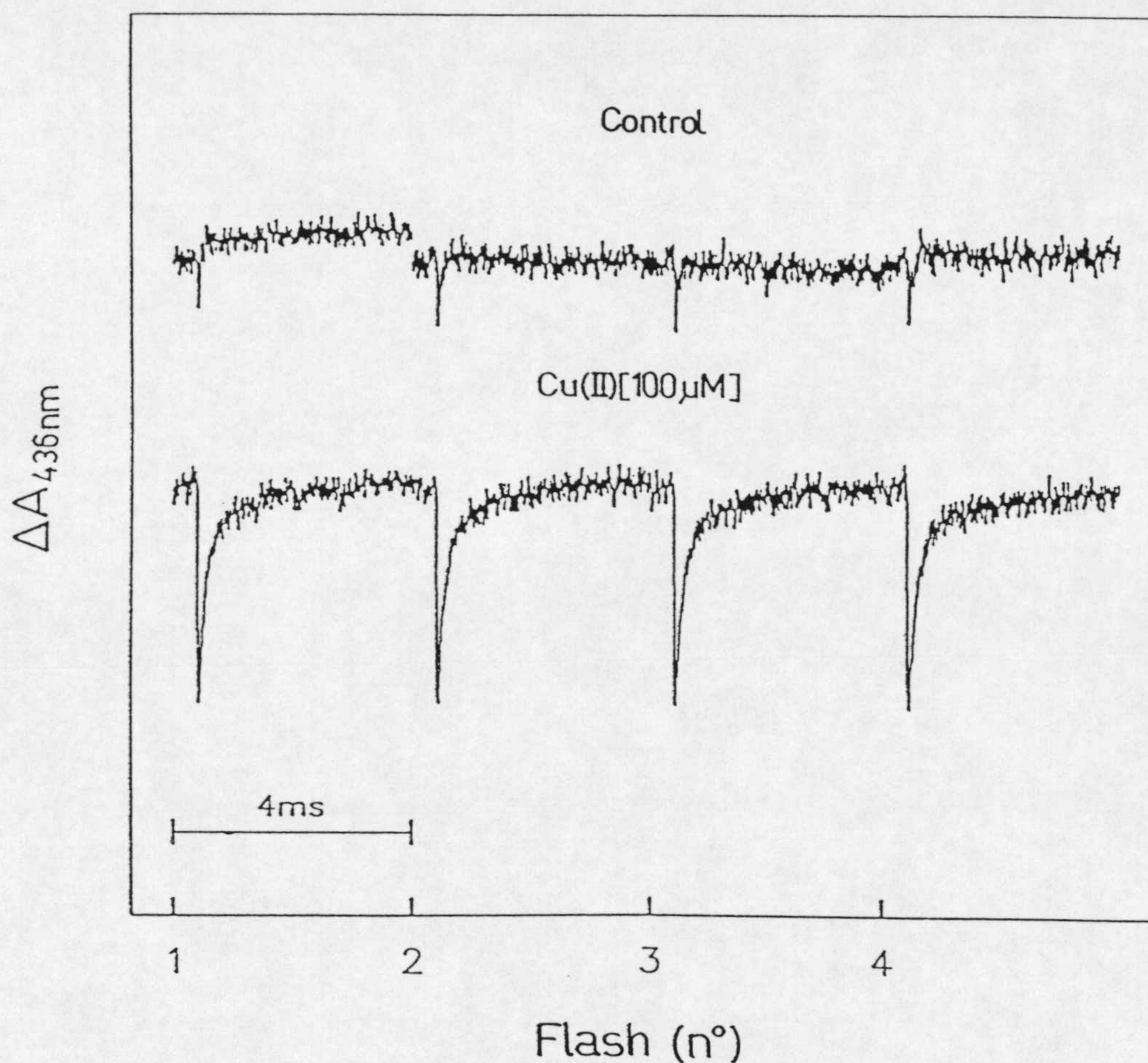


Figura 27. Cinética de los cambios de absorción a 436 nm inducidos por flash de rayo laser en preparaciones de partículas de fotosistema II control (trazo superior) y en presencia de Cu 100  $\mu$ M (trazo inferior). Las muestras son conservadas previamente en oscuridad y posteriormente sometidas a una serie de 4 flashes realizándose para cada flash 16 medidas. El tiempo de duración de cada flash fue de 3 ns y el periodo entre ellos de 700 ms. La concentración de clorofila fue de 10  $\mu$ g/mL. DCBQ 100  $\mu$ M fue el aceptor electrónico utilizado.



## RESULTADOS

---

se debía al  $P680^+$ , ya que en este último caso se obtuvieron valores muy similares 120-160  $\mu s$  (60-70%).

En resumen, los resultados obtenidos por medidas de los cambios de absorción a 830 nm y 436 nm indicarían principalmente que la separación de cargas  $P680^+Q_A^-$  no estaría afectada por la presencia de Cu ya que, para ambas longitudes de onda, se observó un incremento de la absorbancia similar al obtenido por tratamiento con Tris y  $NH_2OH$  de preparaciones de partículas de fotosistema II, que se caracterizan porque eliminan la componente cinética de ns asociada a la reducción del  $P680^+$  en sistemas intactos y provocan que la tirosina Z reduzca al  $P680^+$  en una escala de  $\mu s$ . Aunque el incremento de absorbancia en las muestras tratadas con Cu era similar al obtenido en partículas de fotosistema II tratadas con  $NH_2OH$  o Tris, las correspondientes componentes cinéticas no lo eran, hecho que se comprueba en las diferencias de las componentes cinéticas asociada a la tirosina Z en las partículas de fotosistema II tratadas  $NH_2OH$  (10-20  $\mu s$  60%) y partículas de fotosistema II tratadas con Cu (20-40  $\mu s$  30-40%). Además, los resultados obtenidos con las muestras incubadas en oscuridad durante 30 min y posteriormente utilizadas en el experimento con flashes individuales a 830 nm mostraron que no había diferencias cinéticas entre el primer y segundo flash por lo que demostraría que la tirosina Z no podría ser oxidada por el  $P680^+$ , estableciéndose como consecuencia que el efecto



principal de inhibición causado por Cu se debería a que éste bloquearía la oxidación de la tirosina Z.

C.3. Efecto del Cu tóxico sobre el lado reductor del fotosistema II. Análisis de la reducción de  $Q_A$ . Caracterización de los parámetros cinéticos asociados a los cambios de absorbancia a 325 nm.

Para dilucidar si existía también un efecto del Cu tóxico sobre el lado aceptor del fotosistema II, medimos los cambios de absorbancia a 325 nm inducidos por una serie de 4 flashes en partículas de fotosistema II con DCBQ como aceptor electrónico. A esta longitud de onda donde la diferencia entre los coeficientes de extinción de  $Q_A/Q_A^-$  es óptima, podría atribuirse el incremento de absorbancia a la reducción de  $Q_A$ , aunque también se ha de precisar que las transiciones S del sistema de fotólisis contribuyen a estos cambios de absorbancia aunque en mucho menor grado.

En la figura 28 se ilustran los cambios de absorbancia a 325 nm de partículas de fotosistema II inducidos por cada uno de los flashes, tras una adaptación previa a la oscuridad. Dos concentraciones de Cu distintas fueron utilizadas para alcanzar una inhibición parcial y total del transporte electrónico. En las muestras control el incremento de absorbancia para  $t < 50 \mu s$  corresponde con la reducción de  $Q_A^-$  que es oxidado posteriormente por  $Q_B$  o el aceptor externo DCBQ. La diferencia en el declive entre los dos primeros flashes y los dos últimos se debe a la



## RESULTADOS

---

contribución de las transiciones  $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow (S_0)$  y  $S_0 \rightarrow S_1$  en el tercer y cuarto flash, respectivamente. El incremento de absorbancia inicial para  $t < 50 \mu s$  asociado con la formación de  $Q_A^-$  permaneció constante tanto en partículas de fotosistema II control, como en las tratadas con Cu 25 y 100  $\mu M$ , lo que indicaba que la reducción de  $Q_A$  no se vería afectada. Además, se pudo observar que la contribución de las transiciones S del sistema de fotólisis tras cada uno de los flashes en las partículas de fotosistema II fue disminuyendo conforme la concentración de Cu aumentó; de tal forma que con Cu 100  $\mu M$  no hubo diferencia alguna entre los cuatro flashes, indicando que las transiciones de los estados S no se llevaron a cabo.

Tabla 16. Componentes cinéticas asociadas a la oxidación de  $Q_A^-$ , determinadas mediante el análisis de los cambios de absorbancia a 325 nm inducidos por flash de rayo láser.

PS II, Cu 100 $\mu M$	CR, Cu 100 $\mu M$
250-300 $\mu s$ 35-40% 4 ms 30% $\geq 50$ ms 20-30%	250-300 $\mu s$ 30-40% 2-3 ms 20-40% $\geq 20$ ms 40%

Idénticos resultados fueron obtenidos con centros de reacción aislados según Haag *et al.* (1992). Se determinaron también las componentes cinéticas de la oxidación de  $Q_A^-$  en presencia de Cu 100  $\mu M$ , tanto en partículas de fotosistema II como en centros de reacción (tabla 16); además, se observó que,



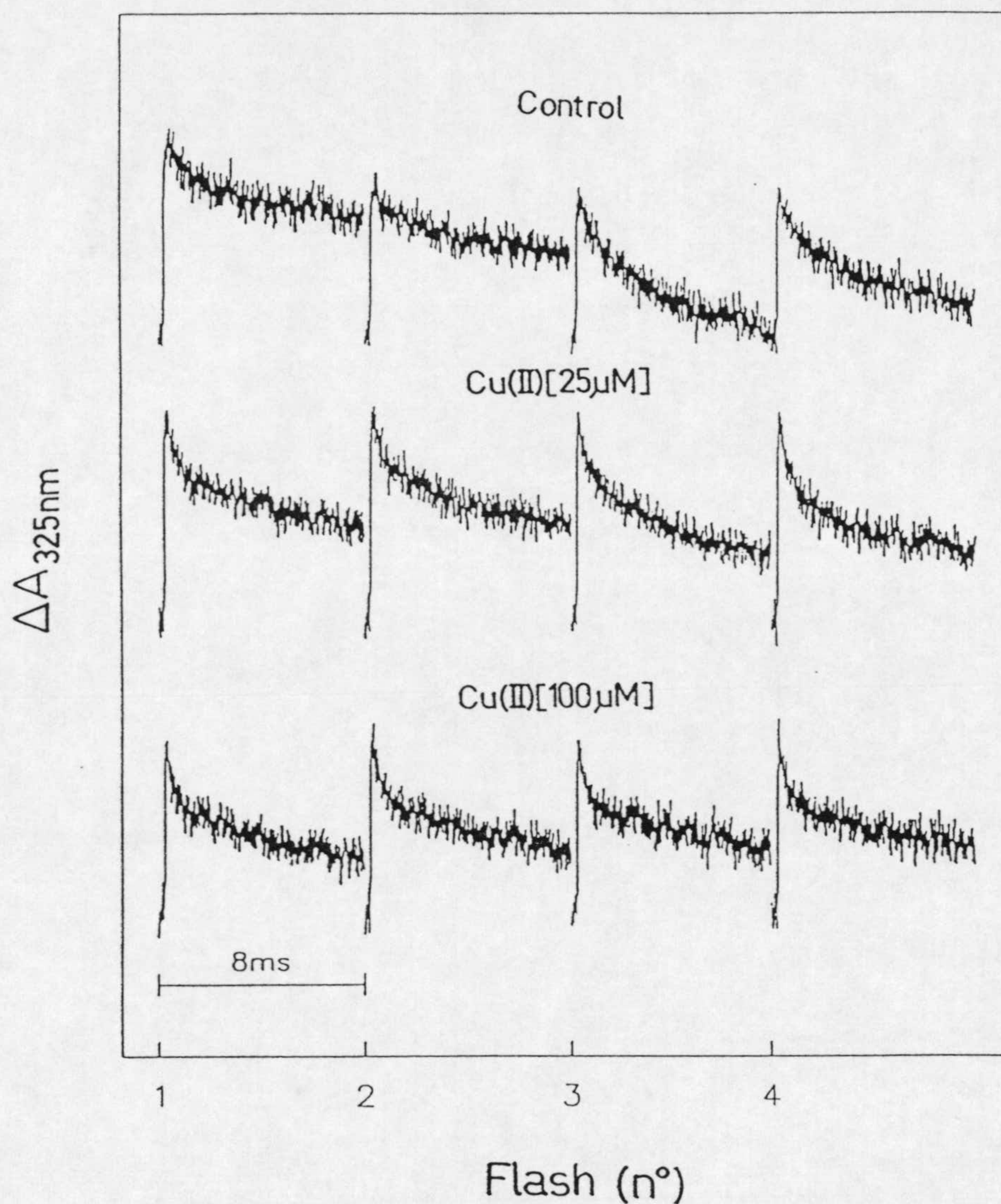


Figura 28. Cinética de los cambios de absorción a 325 nm inducidos por flash de rayo láser en preparaciones de partículas de fotosistema II control (trazo superior), tratadas con Cu 25 (trazo central) y Cu 100  $\mu\text{M}$  (trazo inferior). Las muestras fueron conservadas previamente en oscuridad y posteriormente sometidas a una serie de 4 flashes 90 medidas. El tiempo de duración de cada flash fue de 3 ns y el periodo entre ellos de 700 ms. La concentración de clorofila fue de 10  $\mu\text{g/mL}$ . DCBQ 100  $\mu\text{M}$  fue el aceptor electrónico utilizado.



a diferencia de lo que sucedía en las partículas control donde la oxidación de  $Q_A^-$  la llevaban  $Q_B$  o DCBQ, con Cu destacaba una componente cinética de 250-300  $\mu$ s (35-40%) probablemente atribuible a la oxidación de  $Q_A^-$  mediante una reacción de recombinación entre  $P680^+Q_A^-$ .

#### C.4. Efecto del Cu tóxico sobre las transiciones S del sistema de fotólisis del agua. Medidas de los cambios de absorción a 355 nm.

Con objeto de saber si las transiciones S del sistema de fotólisis del agua se alteraban por concentraciones tóxicas de Cu, se midieron los cambios de absorbancia a 355nm inducidos por una serie de 4 flashes, para estudiar de forma independiente cada una de las transiciones S del sistema de fotólisis del agua. Este experimento se realizó según la descripción de Renger y Hanssum (1992) y, en nuestro caso particular, utilizamos dos concentraciones de Cu distintas para inhibir parcial y totalmente la actividad de las partículas de fotosistema II. En la figura 29 se ilustran los cambios de absorbancia característicos de cada una de las transiciones S en partículas de fotosistema II control y en las tratadas con Cu 25 y 100  $\mu$ M. En presencia de Cu 25  $\mu$ M hubo una disminución parcial de la absorbancia inicial para cada una de las transiciones, mientras que para una concentración de 100  $\mu$ M no se observaron los cambios de absorbancia característicos de las transiciones S indicando que éstas no se producían. Puesto que la inhibición se producía desde el primer



flash, se confirmaban los resultados obtenidos en las medidas a 830 nm realizados también con una serie de 4 flashes, donde se determinó que el Cu inhibía la cinética de ns e impedía la oxidación de la tirosina Z por el P680<sup>+</sup>, hecho que explicaría que no se observara ni siquiera la primera transición  $S_1 \rightarrow S_2$  del sistema de fotólisis del agua ni por consiguiente las restantes tras los sucesivos flashes de luz.

Cuando la concentración de Cu alcanzaba 100  $\mu$ M, se observó únicamente un cambio de absorbancia para  $t < 50 \mu$ s, asociado a la reducción de  $Q_A$  que tiene un coeficiente de extinción a 325 nm del mismo orden de magnitud que tienen las transiciones S. Esto indicaba que  $Q_A$  se habría con cada flash como consecuencia de la separación de carga  $P680^+Q_A^-$ , que no se vería afectada por el Cu.

Los resultados obtenidos a 325 y 355 nm confirmarían las anteriores medidas a 830 nm y 436 nm sobre el hecho de que la separación de carga  $P680^+Q_A^-$  no estaría afectada (A 325 nm) y que por el contrario las transiciones S estarían totalmente inhibidas (A 355 nm) como consecuencia de que la tirosina Z no podría ser oxidada por el P680<sup>+</sup> por la presencia de Cu.

**D. Análisis del flujo electrónico en el fotosistema II en condiciones de toxicidad en Cu mediante el estudio de los espectros de RSE de los transportadores implicados.**

Mediante la técnica de resonancia de spin electrónico podríamos confirmar los resultados que hasta ahora se han



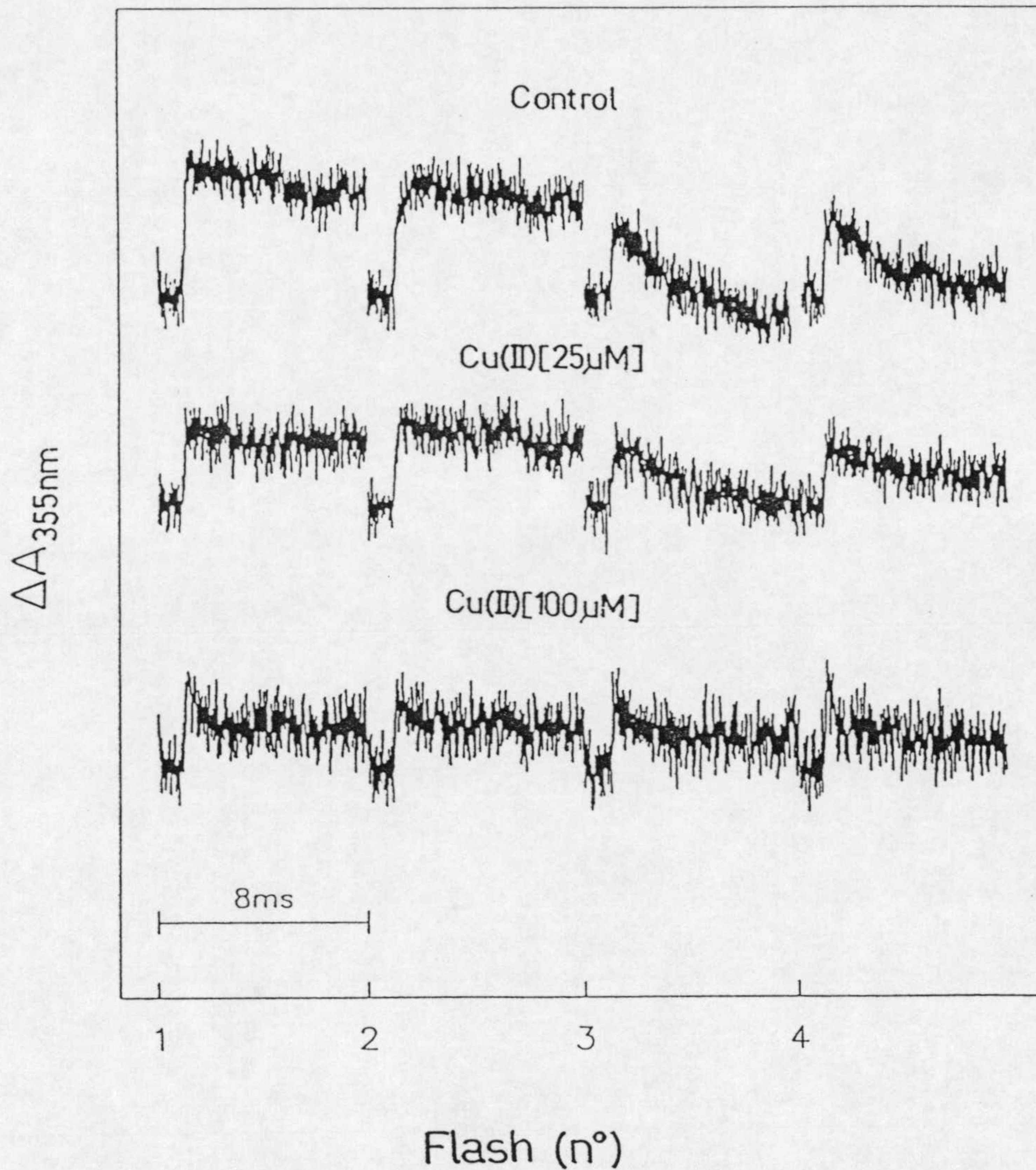


Figura 29. Cambios de absorción a 355 nm inducidos por flash de rayo láser en preparaciones de partículas de fotosistema II control (trazo superior), tratadas con Cu 25  $\mu$ M (trazo central) y Cu 100  $\mu$ M. Las muestras fueron conservadas previamente en oscuridad y posteriormente sometidas a una serie de 4 flashes realizándose 90 medidas. El tiempo de duración de cada flash fue de 3 ns y el periodo entre ellos de 700 ms. La concentración de clorofila fue de 10  $\mu$ g/mL. DCBQ 100  $\mu$ M fue el aceptor electrónico utilizado.



descrito sobre el posible efecto inhibidor del Cu sobre la tirosina Z, ya que su espectro estaba perfectamente caracterizado. Además la posibilidad de que hubiera un nuevo donador alternativo para reducir el P680<sup>+</sup> abriría una nueva perspectiva sobre las posibles vías alternativas de transporte electrónico en el fotosistema II en condiciones de bloqueo o inhibición de su lado donador.

3D.1. Espectros de resonancia de spin electrónico de la señal II en presencia de concentraciones tóxicas de Cu a temperatura ambiente

a) Efecto del Cu tóxico sobre la señal II en partículas de fotosistema II intactas.

El efecto que el Cu podría causar sobre las partículas de fotosistema II fue inicialmente abordado en RSE a temperatura ambiente. En la parte superior de la figura 30 están superpuestos los dos espectros característicos de la señal II lenta (en oscuridad) y señal II muy rápida (en luz), obtenida esta última por iluminación de la muestra durante 15 s y registro de su espectro simultáneamente. Ambas señales tienen idénticas amplitudes, aunque la señal II lenta se debe a la tirosina D<sup>+</sup>, mientras que la señal II muy rápida corresponde a la tirosina D<sup>+</sup> y tirosina Z<sup>+</sup>. El tiempo de vida media de la tirosina Z<sup>+</sup> en partículas de fotosistema II intactas está comprendido entre 110



## RESULTADOS

---

y 1300  $\mu$ s (Dekker et al 1984), y debido a que el tiempo de resolución del equipo utilizado no abarcaba este rango, no se aprecia diferencia alguna entre ambos espectros bajo las condiciones de trabajo establecidas. Con este mismo espectro pudimos ver que la señal I asociada al P700<sup>+</sup> del fotosistema I, cuyas características espectrales correspondientes a un radical de clorofila con un valor de  $g=2.0026$ , una anchura de banda de 7 Gauss y que se reduce nuevamente en una escala de tiempo de varios segundos, no se inducía indicando con ello que las preparaciones de fotosistema II utilizadas para el análisis de las señales de RSE no estaban contaminadas por el fotosistema I.

En la parte inferior de la figura 30 se representan los espectros obtenidos después de la adición de Cu a nuestras preparaciones. Mientras que en oscuridad la señal II lenta en presencia y ausencia de Cu permaneció inalterada, el espectro obtenido en luz (15 s) mostraba unas características diferentes a la señal II muy rápida, ya que aparecía la señal de un nuevo radical cuya naturaleza en un principio nos resultó desconocida. Después del periodo de iluminación, realizamos, un nuevo espectro en oscuridad comprobando que el espectro de la señal II lenta permanecía intacto, sin que se pudiera registrar el nuevo radical, lo que indicaba que era inducido únicamente en luz. Puesto que la señal II muy rápida no presentaba diferencias espectrales con respecto a la señal II lenta en BBY control, no podíamos saber si se habría afectado o no por la adicción de Cu. Si se descartaba con este ensayo que la nueva señal pudiera



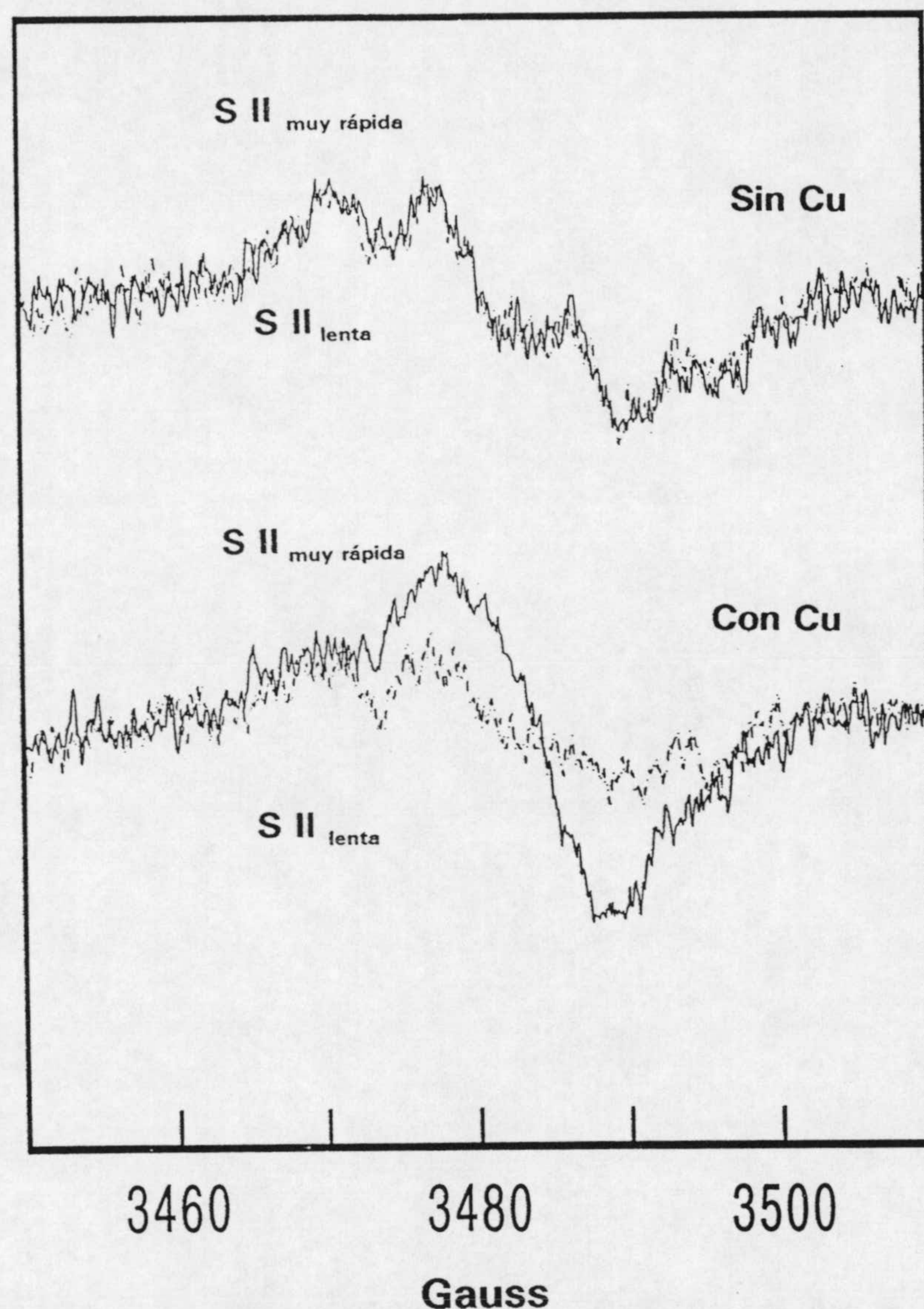


Figura 30. Espectro de RSE de la señal II en preparaciones de partículas de fotosistema II intactas. A) Espectro de la señal II lenta en oscuridad y de la señal II muy rápida inducida por luz (lámpara de 1000 W) a temperatura ambiente en ausencia de Cu. B) Espectro de la señal II lenta (trazo inferior) y señal II muy rápida (trazo superior) en presencia de Cu realizados con las mismas condiciones del apartado A). Los parámetros instrumentales fueron los siguientes: Temperatura ambiente; potencia de la radiación 20 dB (2mW); frecuencia, 9.77 GHz; modulación de la amplitud 2.92 Gauss (0.29 mT); modulación de la frecuencia 100 kHz; 1 registro de 10 s de duración.



## RESULTADOS

---

corresponder con la señal I de unas características espectrales similares, ya que en ausencia de Cu no fue inducida como anteriormente comentamos. Así que parecería deberse a un componente oxido-reductor del fotosistema II que era inducido en luz por Cu.

b) Efecto del Cu tóxico sobre la señal II en partículas de fotosistema II lavadas con Tris.

Con preparaciones de partículas de fotosistema II lavadas con Tris a las cuales se les eliminó el sistema de fotólisis del agua, pudimos observar la señal de la tirosina  $Z^+$  con una iluminación constante e intensa a temperatura ambiente, ya que al no poder ser reducido por el complejo de iones de Mn, ésta es reducida por la semiquinona  $Q_B^-$  mediante una reacción de recombinación cuyo tiempo de vida media es de 400 ms (Yocum *et al* 1981) y podía ser fácilmente observada en nuestras condiciones de trabajo. En la parte superior de la figura 31 en ausencia de Cu, se observan los espectros de la señal II lenta en oscuridad asociada al radical de la tirosina  $D^+$  y la señal II rápida en luz (15 s) correspondiente a los radicales de tirosina  $D^+$  y  $Z^+$ , ambas señales en luz y oscuridad tienen características espectrales idénticas, aunque distintas amplitudes. En este ensayo, no utilizamos ningún aceptor por lo que la señal II rápida no alcanzó una amplitud doble a la señal II lenta, hecho que se consigue en presencia de aceptores electrónicos como el  $K_3[Fe(CN)_6]$ . En la parte inferior de la figura 31 se representan



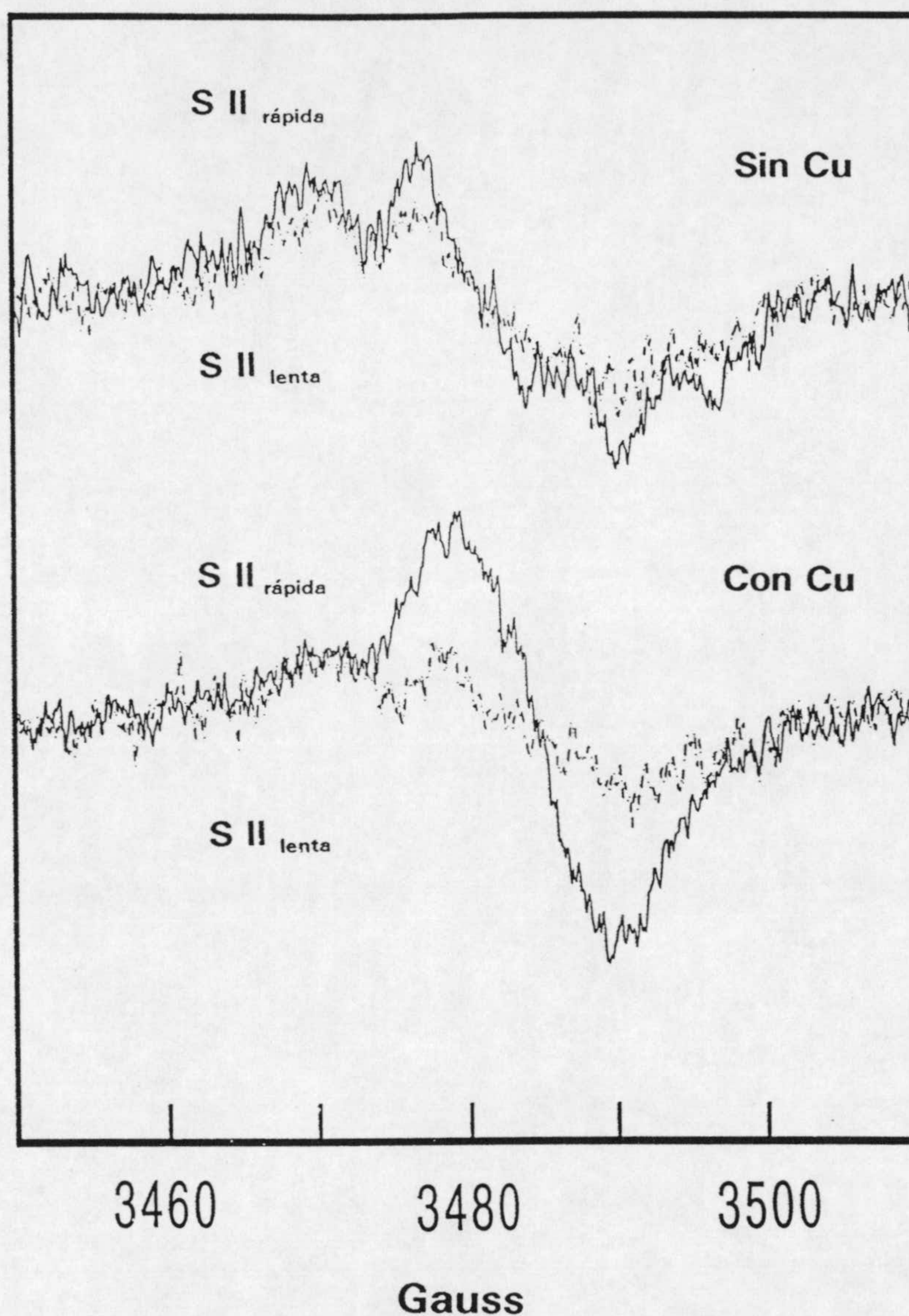


Figura 31. Espectro de RSE de la señal II en preparaciones de partículas de fotosistema II tratadas con Tris. A) Espectro de la señal II lenta en oscuridad (trazo inferior) y de la señal II rápida (trazo superior) inducida por luz (lámpara de 1000 W) a temperatura ambiente en ausencia de Cu. B) Espectro de la señal II lenta (trazo inferior) y señal II rápida (trazo superior) en presencia de Cu realizados con las mismas condiciones del apartado A). Los parámetros instrumentales fueron los siguientes: Temperatura ambiente; potencia de la radiación 20 dB (2mW); frecuencia, 9.77 GHz; modulación de la amplitud 2.92 Gauss (0.29 mT); modulación de la frecuencia 100 kHz; 1 registro de 10 s de duración.



## RESULTADOS

---

los espectros de las partículas tratadas con Tris en presencia de Cu. En oscuridad la señal II lenta asociada al radical de tirosina  $D^+$  no sufrió modificación alguna y alcanzó la misma amplitud que en el caso anterior en ausencia de Cu. En luz el nuevo radical era nuevamente inducido, mientras que la señal II rápida no lo fue, como se puede apreciar en la zona del primer pico de la señal II (3469 Gauss). La señal del radical de tirosina  $D^+$  no se afectó como se pudo comprobar posteriormente, ya que la señal II lenta se volvería a ver en un espectro realizado en oscuridad. Este resultado indicaba que la tirosina Z, en presencia de Cu, no era oxidada por el P680<sup>+</sup> confirmando los resultados de los apartados anteriores.

c) Efecto del Cu sobre la señal II en partículas de fotosistema II tratadas con Tris en presencia de un inhibidor como el DCMU.

Otros experimentos realizados a temperatura ambiente se llevaron a cabo para determinar el comportamiento del radical inducido en luz por Cu en partículas de fotosistema II lavadas con Tris en presencia de un inhibidor del transporte electrónico en el sitio  $Q_B$  como el DCMU. Con DCMU 0.5 mM en partículas de fotosistema II tratadas con Tris la señal II rápida no se inducía debido la reacción de recombinación entre la tirosina  $Z^+$  y  $Q_A^-$  que transcurre con un tiempo de vida media de 20 ms, resultando que ambos espectros de la señal II en oscuridad y luz tenían la misma amplitud. En oscuridad no hay variaciones con respecto a la señal



II lenta en presencia de Cu y DCMU y en luz únicamente se observa la inducción del radical, mientras que la señal II rápida está inhibida tanto por DCMU como por Cu (Figura 32, parte inferior). Sin embargo, el radical también sigue siendo inducido (55%) por Cu cuando en el medio hay DCMU.

d) Efecto del Cu sobre la señal II en partículas de fotosistema II tratadas con Tris en presencia de un aceptor como  $K_3[Fe(CN)_6]$ .

Con  $K_3[Fe(CN)_6]$  1 mM la señal II rápida es inducida alcanzando generalmente una amplitud doble a la señal II lenta. En la figura 32 (parte superior) se representa el efecto causado por  $K_3[Fe(CN)_6]$  1mM en partículas de fotosistema II tratadas con Tris en presencia de Cu. En oscuridad la señal II lenta no se alteró por la presencia de Cu, tal y como se ha descrito en los casos anteriores y en luz la señal rápida desapareció, lo que sería atribuible a la presencia de Cu en el medio, pero al igual que en el caso anterior el nuevo radical fue inducido, llegando a alcanzar en este caso un área relativa de 1 con respecto a la señal II lenta normalizada.

Los resultados de los experimentos realizados a temperatura ambiente muestran que la señal II en luz atribuible a la tirosina  $Z^+$  desaparecía en presencia de Cu como consecuencia de que el Cu inhibía la oxidación de la tirosina Z por el  $P680^+$ . En su lugar un nuevo radical fue inducido en luz hasta un 60 y 75% en partículas de fotosistema II intactas y partículas de fotosistema



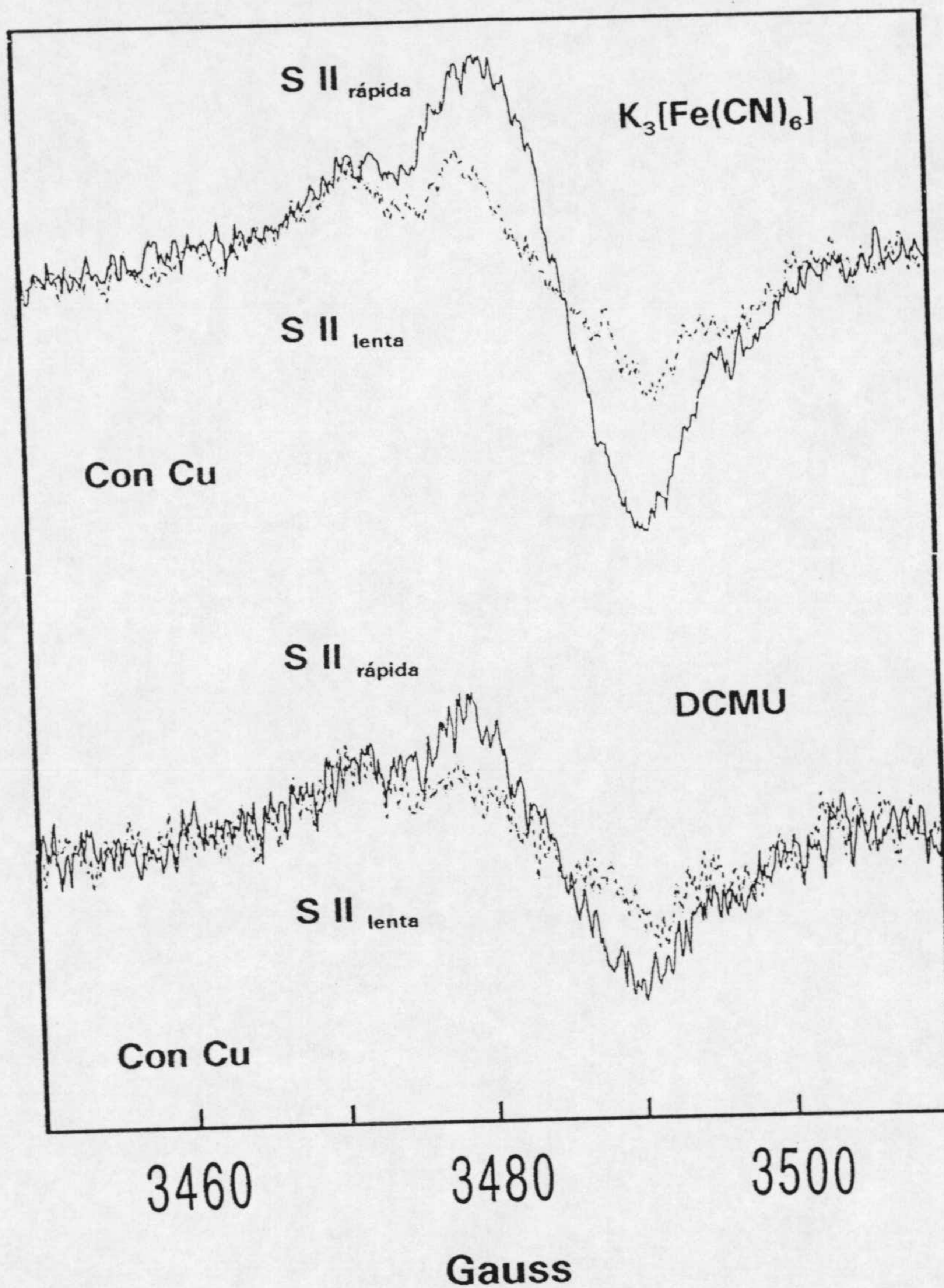


Figura 32. Espectro de RSE de la señal II en preparaciones de partículas de fotosistema II tratadas con Tris en presencia de A) Cu y un aceptor electrónico como  $K_3[Fe(CN)_6]$  y B) Cu y un inhibidor del transporte electrónico como el DCMU. En los aparatos A) y B) el trazo inferior corresponden con la señal II lenta y el trazo superior con la señal II rápida inducida por luz (Lámpara de 1000 W) en presencia de Cu y  $K_3[Fe(CN)_6]$  o Cu y DCMU, respectivamente. Los parámetros instrumentales fueron los siguientes: Temperatura ambiente; potencia de la radiación 20 dB (2mW); frecuencia, 9.77 GHz; modulación de la amplitud 2.92 Gauss (0.29 mT); modulación de la frecuencia 100 kHz; 1 registro de 10 s de duración.



II tratadas con Tris, respectivamente, llegando a inducirse en esta última preparación hasta un 100% en presencia de  $K_3[Fe(CN)_6]$  y sólo un 55% con DCMU en el medio.

D.2 Caracterización del radical inducido en luz por la presencia de Cu en preparaciones de partículas de fotosistema II

Para determinar la naturaleza del nuevo radical inducido, se iluminó una preparación de partículas de fotosistema II a 200K durante 5 min, tal y como se ha descrito en MATERIAL Y MÉTODOS con la finalidad de que se produjera una única separación de cargas. En la figura 33 se registra a 15 K el espectro en oscuridad de la señal II lenta correspondiente a la tirosina  $D^+$  en presencia de Cu. Superpuesto a dicho espectro está el obtenido a 15 K, después de haber iluminado la muestra previamente en presencia de Cu, observándose en este último nuevamente la presencia del radical. La sustracción de los espectros en luz y oscuridad está en el margen inferior derecho de la figura 33 cuyas características espectrales son su forma gaussiana, el valor de  $g=2.00273$  y su anchura de banda de 9.7 gauss. Entre los radicales que tienen característica muy similares están el  $P680^+$  y un radical de clorofila (Miller y Brudvig, 1991). Aunque el  $P680^+$  tiene una anchura de banda más estrecha (8.0 Gauss) y un tiempo de vida media muy inferior en presencia de Cu (120-160  $\mu s$  60-70%) tal y como se ha puesto de manifiesto en los experimentos de espectroscopía a 830 nm inducida por flash, mientras que por resonancia de spin electrónico el radical descrito a temperatura



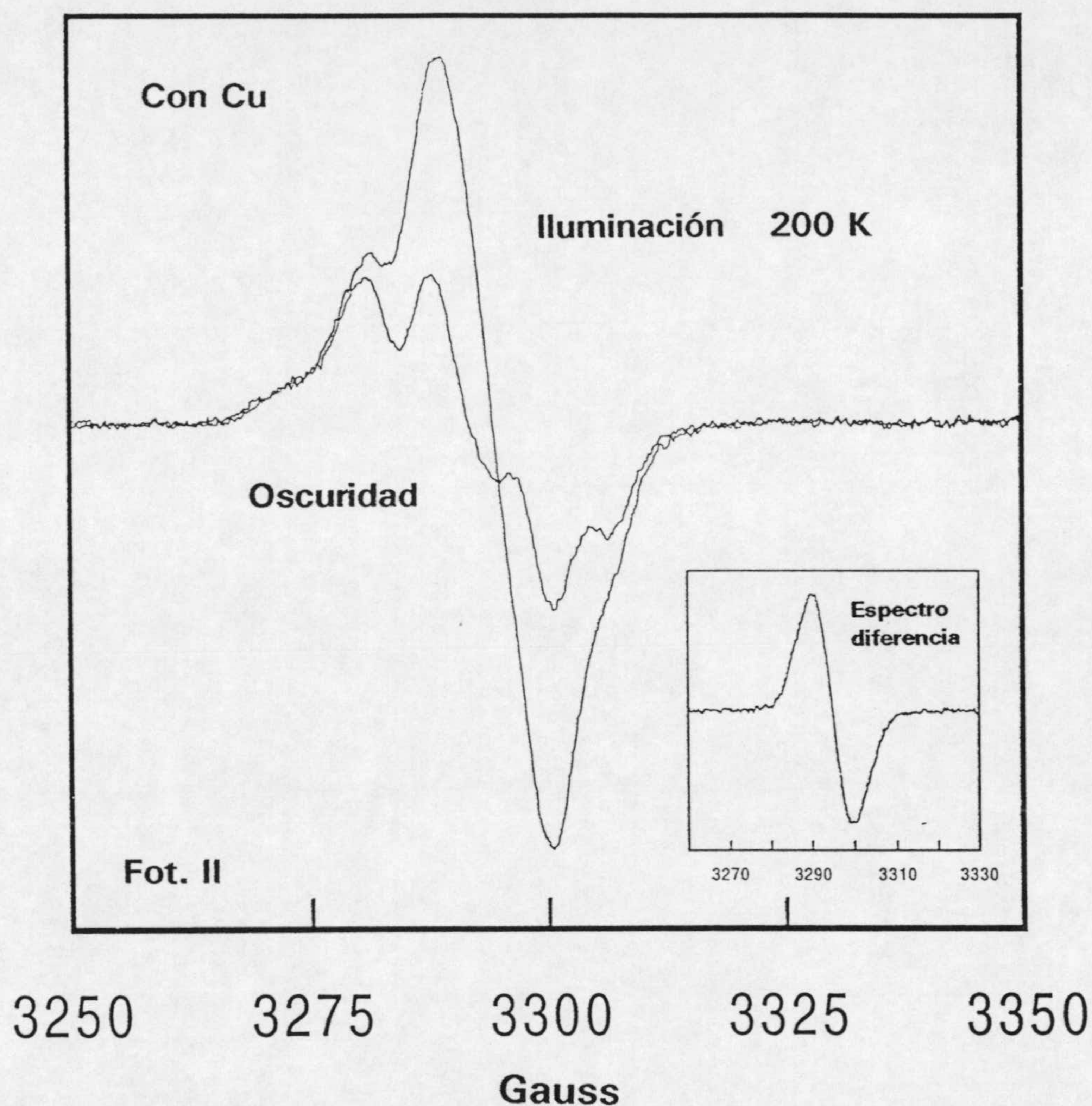


Figura 33. Espectro de RSE del radical de clorofila inducido por luz. A) Espectro conjunto de la señal de la tirosina D<sup>•</sup> y el radical de clorofila fotooxidado en una preparación de partículas de fotosistema II iluminada (lámpara de 1000 W) durante 4 min. a 200 K en presencia de Cu. B) Espectro de la señal de la tirosina D<sup>•</sup> en oscuridad en presencia de Cu. C) Espectro diferencia entre los obtenidos en los apartados A) y B). Los parámetros instrumentales fueron los siguientes: Temperatura, 15 K; potencia de la radiación 0.5  $\mu$ W (56 mW); frecuencia, 9.23 GHz; modulación de la amplitud 2.49 Gauss (0.25 mT); modulación de la frecuencia 100 kHz.



ambiente tiene un tiempo de vida media de 200-500 ms (figura 34). Por lo tanto, se descartó que la señal observada fuera la correspondiente al P680<sup>+</sup>. La normalización de la señal del espectro de la tirosina D<sup>+</sup> en los experimentos anteriores nos permitió determinar que el área relativa de dicho radical era de 0.75.

El hecho de que el radical apareciera después de la iluminación a 200 K, donde únicamente se produciría una separación de carga, confirmaba los resultados obtenidos por espectroscopía de absorción a 830 nm y 355 nm inducido por flash con los que se había establecido que el Cu bloquearía la oxidación de la tirosina Z y, por lo tanto induciría la aparición del radical, muy específicamente desde el primer flash de luz recibido por las partículas de fotosistema II como consecuencia de la oxidación de éste por el P680<sup>+</sup>.

### D.3 Efecto del Cu sobre la señal múltiple característica del estado S<sub>2</sub>

La inducción del transporte electrónico en partículas de fotosistema II por iluminación, mientras se mantenía una temperatura de 200 K, nos permitiría poder establecer si se produciría la transición electrónica entre los estados S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> en presencia de Cu. En la figura 35 aparece en la parte superior el espectro característico de la señal múltiple del estado S<sub>2</sub> del sistema de fotólisis del agua registrado a 10 K en unas BBY intactas, después de la iluminación a 200 K, tal y como



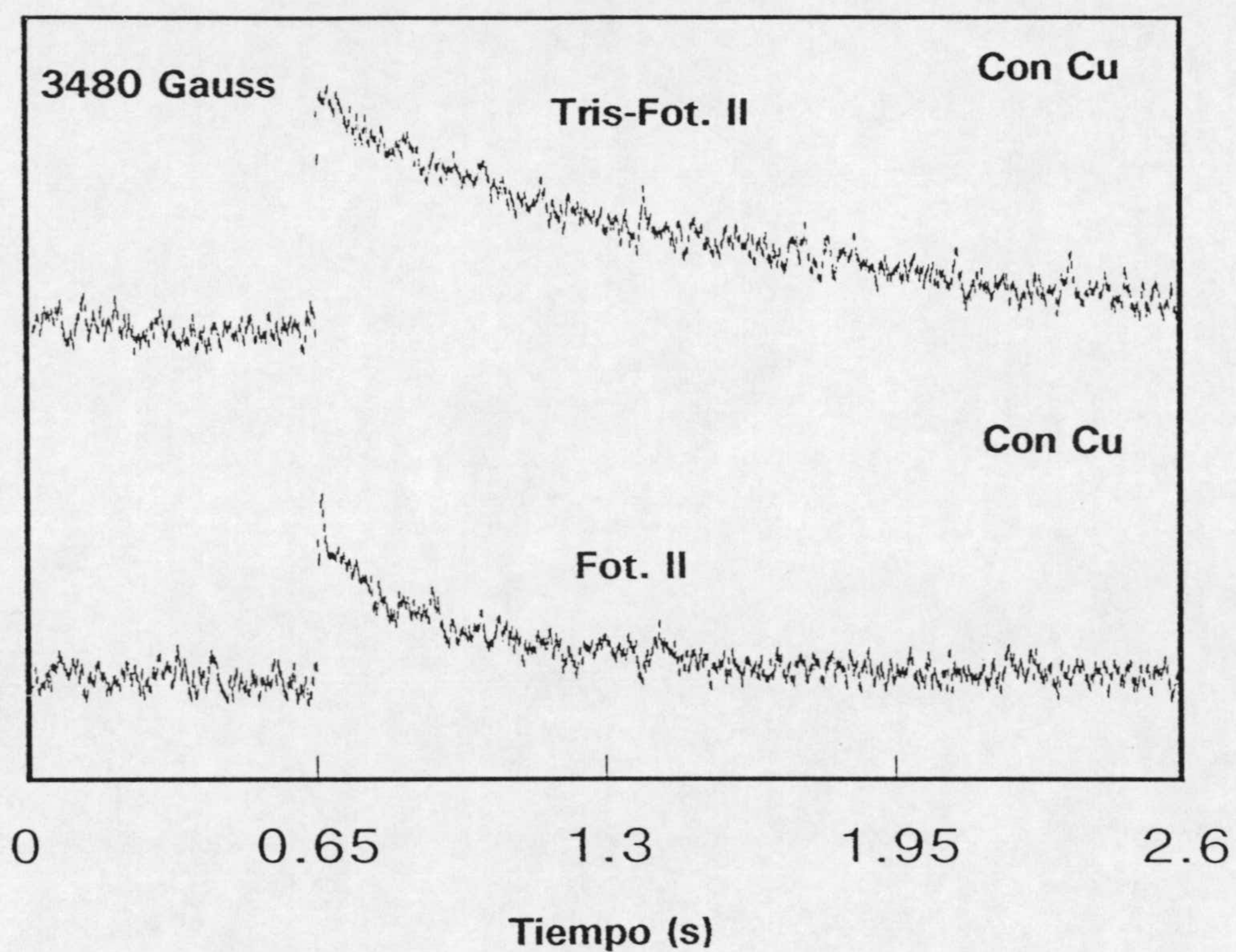


Figura 34. Caída cinética del radical de clorofila inducido por luz en presencia de Cu medida sobre el máximo de su señal a 3480 Gauss en A) preparaciones de partículas de fotosistema II tratadas con tris y B) preparaciones de partículas de fotosistema II intactas. Los parámetros instrumentales fueron los siguientes: Temperatura ambiente; potencia de la radiación 20 dB (2mW); frecuencia, 9.77 GHz; modulación de la amplitud 3.28 Gauss (0.33 mT); modulación de la frecuencia 100 kHz; 100 flashes; un tiempo entre cada uno de ellos de 2.62 s, tiempo de conversión 2.56 ms y constante de tiempo 5.12 ms.



describieron Dismukes y Siderer (1981); sin embargo, la adición de Cu en las mismas condiciones llevó al espectro inferior, sólo registrable en la zona de 3500-4000 Gauss, donde el espectro mismo del Cu no enmascaraba al correspondiente del estado  $S_2$ . En éste no se observa la parte correspondiente de la señal múltiple del estado  $S_2$  en la región desde 3500 a 4259 Gauss, indicando que la transición desde  $S_1$  hasta  $S_2$  no se habría podido llevar a cabo.

D.4. Estudio de la reversibilidad a temperatura ambiente por RSE del efecto causado por Cu en partículas de fotosistema II

Al igual que en las medidas polarográficas de desprendimiento de oxígeno, nos propusimos estudiar si el efecto causado por Cu era dependiente de la luz e irreversible. En RSE podríamos profundizar aún más ya que teníamos la oportunidad de determinar si la señal del radical de clorofila podría recuperarse después de que fuera eliminado el exceso de Cu con EDTA 5 mM. Una preparación de partículas de fotosistema II fueron incubadas en oscuridad con Cu y otra fue iluminada en presencia de Cu durante 5 s, manteniendo la muestra a temperatura ambiente, siguiendo el procedimiento descrito en MATERIAL Y MÉTODOS. El tratamiento con EDTA se realizó cuidadosamente varias veces hasta que no se pudo detectar la señal de Cu por RSE. La señal muy rápida registrada durante la iluminación de la preparación incubada con Cu en oscuridad, tras la eliminación de éste con EDTA, muestra como la señal del radical de clorofila no es



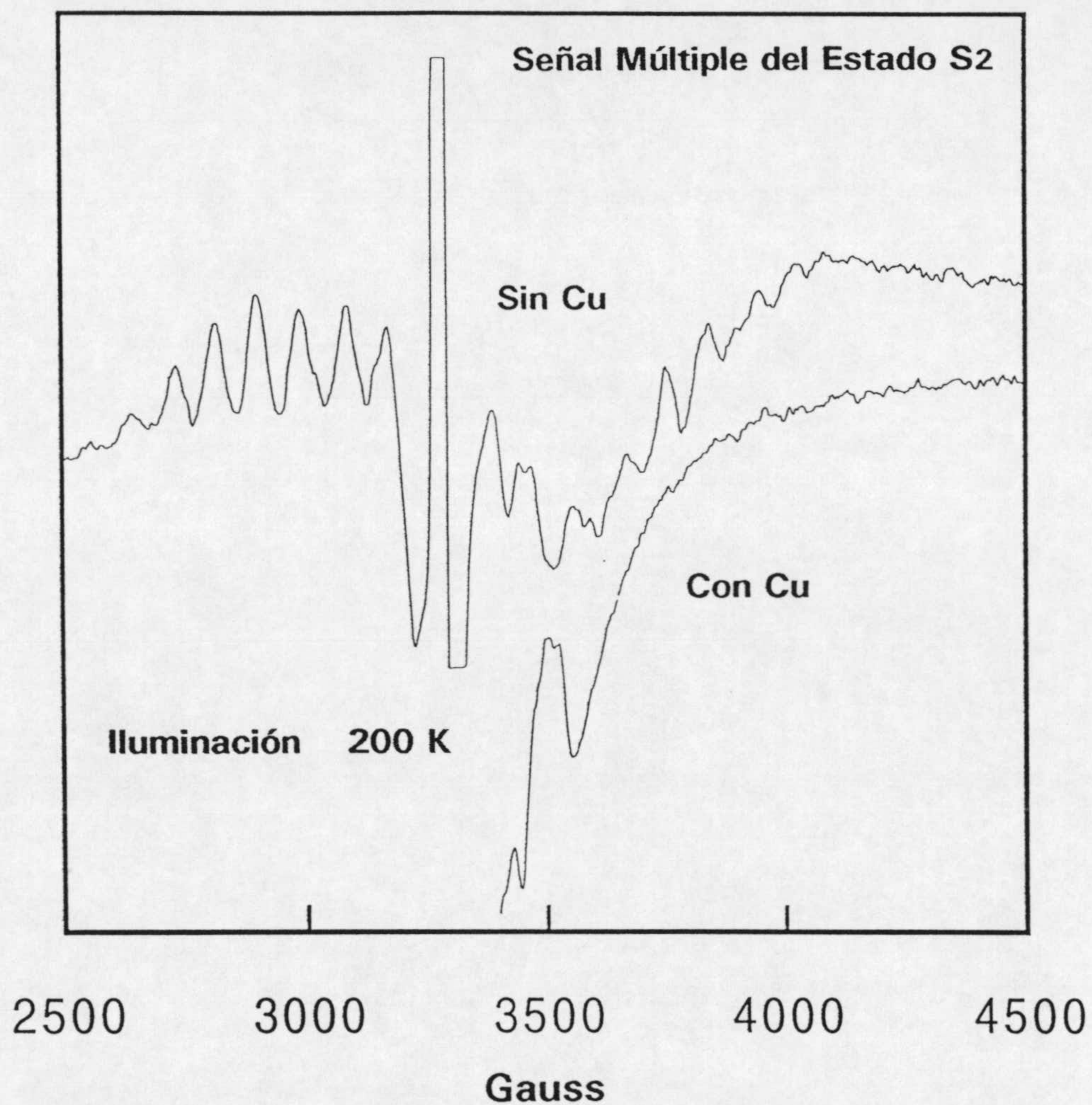


Figura 35. Espectro de la señal múltiple ( $g=4.1$ ) del estado S2 del sistema de fotólisis del agua en preparaciones de partículas de fotosistema II. A) Espectro obtenido en una preparación de partículas de fotosistema II inducido por luz (Lámpara de 1000 W) durante 4 min. a 200 K en ausencia de Cu. B) Espectro realizado en las mismas condiciones que en el apartado A) en presencia de Cu. Los parámetros instrumentales fueron los siguientes: Temperatura, 10 K; potencia de la radiación 10 dB (20 mW); frecuencia, 9.23 GHz; modulación de la amplitud 24.9 Gauss (2.49 mT); modulación de la frecuencia 100 kHz.



inducido, indicando que el tratamiento con EDTA fue adecuado para eliminar el Cu que fue añadido, evitando de ésta forma el efecto tóxico del Cu. También se observa que parcialmente en dicha preparación, después de realizar un tratamiento exhaustivo con EDTA, se induce la señal II rápida debido a que el tratamiento con EDTA pudo eliminar el Mn del complejo del sistema de fotólisis del agua y éste entonces no pudo reducir a la tirosina  $Z^+$ . Sin embargo, cuando el Cu fue eliminado con EDTA después de la incubación en luz durante 5 s, pudimos observar que la señal del radical de clorofila había sido inducido por la luz, aun incluso en ausencia de Cu, correspondiendo su área con un 75% de la señal de la tirosina  $D^+$ , después de que esta última fuera normalizada. Así que, la razón de la irreversibilidad de la acción del Cu sobre las partículas de fotosistema II, aún después de su eliminación, se debió a la pérdida de la funcionalidad de la tirosina Z y que como consecuencia se inducía la aparición del radical de clorofila.

D.5 Estudio del efecto del Cu sobre la separación de cargas  $P680^+Q_A^-$  y el  $Fe^{+2}$  no-hemínico mediante el espectro de RSE de la señal de  $Fe^{+2}Q_A^-$

La separación de cargas  $P680Q_A$  puede ser igualmente seguida en RSE iluminando la muestra, mientras se mantenía una temperatura de 200 K, en tales condiciones  $Q_A^-$  mantendría una interacción magnética con el  $Fe^{+2}$  no-hemínico dando una señal característica que puede incrementarse por la adición de ácido



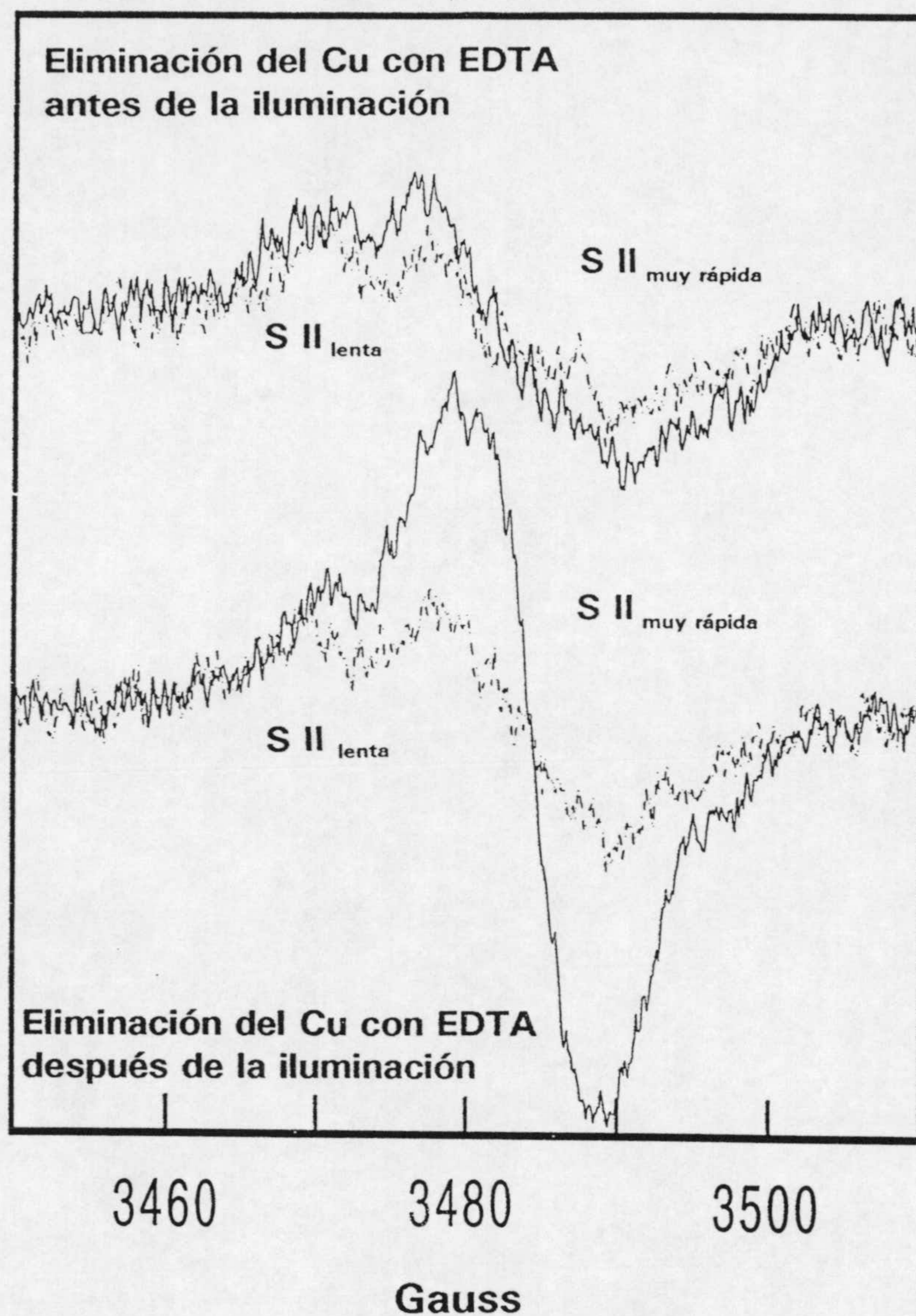


Figura 36. Estudio de la reversibilidad del efecto causado por Cu sobre la señal II de partículas de fotosistema II. A) Incubación con Cu de la preparación y posterior eliminación de éste con EDTA 5mM antes de la iluminación. El trazo inferior corresponde con la señal II lenta y el trazo superior con la señal II muy rápida. B) Incubación con Cu de la preparación y posterior iluminación durante 5 s con una lámpara de 1000 W, eliminándose finalmente el Cu con EDTA 5mM. El trazo inferior corresponde con la señal II lenta y el trazo superior con la señal II muy rápida. Los parámetros instrumentales fueron los siguientes: Temperatura ambiente; potencia de la radiación 20 dB (2mW); frecuencia, 9.77 GHz; modulación de la amplitud 2.92 Gauss (0.29 mT); modulación de la frecuencia 100 kHz; 1 registro de 10 s de duración.



fórmico 50 mM (Vermaas y Rutherford, 1984) y que se puede cuantificar cuando se añade al medio ditionito 40 mM y se lleva a cabo una incubación en oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente. Sin embargo, el interés de poder observar el espectro de  $\text{Fe}^{+2}\text{Q}_A^-$ , después de la separación de carga en presencia de Cu no era factible, dada la presencia de ácido fórmico y fundamentalmente la de ditionito que reduciría al Cu en el medio de ensayo, siendo por tanto imposible sacar alguna conclusión de dicho resultado; por ello, propusimos registrar el espectro de  $\text{Fe}^{+2}\text{Q}_A^-$ , después de que la muestra fuera incubada con Cu en luz durante 5 s y tratada posteriormente con EDTA 5 mM para su eliminación. De ésta forma, el Cu no reaccionaría con ácido fórmico o ditionito, pero asegurábamos que el radical de clorofila se induciría tal y como previamente se hizo en los experimentos de reversibilidad. En la figura 37, en la parte superior, se encuentra el espectro realizado después de la eliminación del Cu con EDTA y antes de la adición de ácido fórmico 50 mM y ditionito 40 mM. En la parte inferior de la figura 37, se registra el espectro de la señal de  $\text{Fe}^{+2}\text{Q}_A^-$  con sus valores característicos de  $g = 1.82$  y  $1.64$ , indicando que la separación de carga se había producido, por lo que el Cu no había afectado la separación de cargas  $\text{P680Q}_A$ , además de que tampoco parecía que el  $\text{Fe}^{+2}$  no-hemínico hubiera sido reemplazado por Cu, ya que en tales condiciones no se hubiera podido observar dicho espectro y un nuevo espectro debería haber aparecido correspondiente a  $\text{Q}_A^-$  en ausencia del  $\text{Fe}^{+2}$  cuyas características,



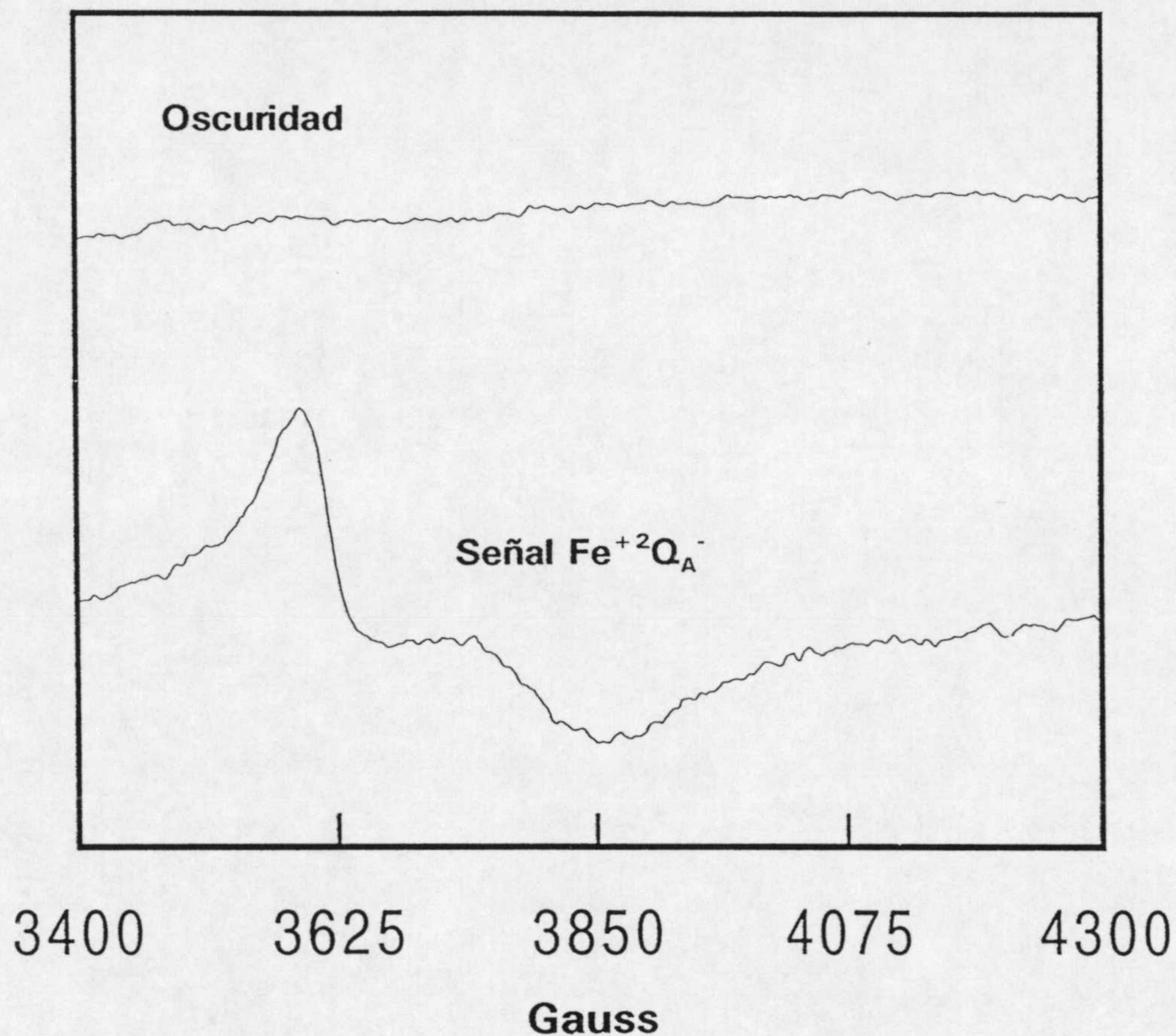


Figura 37. Espectro de RSE de la señal  $\text{Fe}^{+2}\text{QA}^-$  en partículas de fotosistema II tratadas con Cu. A) Espectro en oscuridad realizado en ausencia de Cu después de un periodo de incubación de 2 min en oscuridad y su eliminación posterior con EDTA 5mM. B) Espectro de la señal  $\text{Fe}^{+2}\text{QA}^-$  después de la incubación con Cu en oscuridad durante 2 min. e iluminación posterior durante 5 s, eliminándose finalmente el Cu con EDTA 5mM. Para inducir totalmente la señal  $\text{Fe}^{+2}\text{QA}^-$  se añadió ditionito 40 mM en la muestra y se incubó durante 10 min en oscuridad. Los parámetros instrumentales fueron los siguientes: Temperatura, 4 K; potencia de la radiación 8 dB (32 mW); frecuencia, 9.23 GHz; modulación de la amplitud 31.4 Gauss (3.14 mT); modulación de la frecuencia 100 kHz.



descritas en la tabla 7 de MATERIAL Y MÉTODOS, son muy distintas a las del espectro  $\text{Fe}^{+2}\text{Q}_A^-$ .

#### D.6 Espectro de RSE del citocromo b-559

Puesto que los resultados obtenidos hasta ahora por RSE indicaban que el lado donador del fotosistema II estaba bloqueado por Cu, decidimos registrar el espectro del citocromo b-559, ya que con anterioridad, como se ha descrito en la INTRODUCCIÓN de esta tesis, hay autores que proponen que en condiciones en las que el lado donador está bloqueado el citocromo b-559 podría estar involucrado en un transporte electrónico en torno al fotosistema II mediante el cual el  $\text{P680}^+$  podría nuevamente reducirse. La figura 38 muestra el espectro del citocromo b-559 de unas partículas de fotosistema II en la región de  $g \approx 3.0$ . En la parte inferior de esta figura 38 se registra el espectro realizado en oscuridad del citocromo b-559 cuando se encuentra en su forma de bajo potencial cuyo máximo está en un valor de  $g=2.96$ . Para determinar la concentración del citocromo b-559, éste se fotooxidó a 77 K durante 20 min para asegurar la aparición del 100% del área de su espectro, observándose como el citocromo b-559 de alto potencial fotooxidado tiene un valor de  $g=3.08$ . Cuando la muestra fue incubada en oscuridad con Cu el citocromo b-559 de bajo potencial fue oxidado en su totalidad, como consecuencia cuando posteriormente se iluminó la muestra a la temperatura de 200 K, el citocromo de b-559 de alto potencial no pudo aperecer, observándose que éste último espectro tenía las



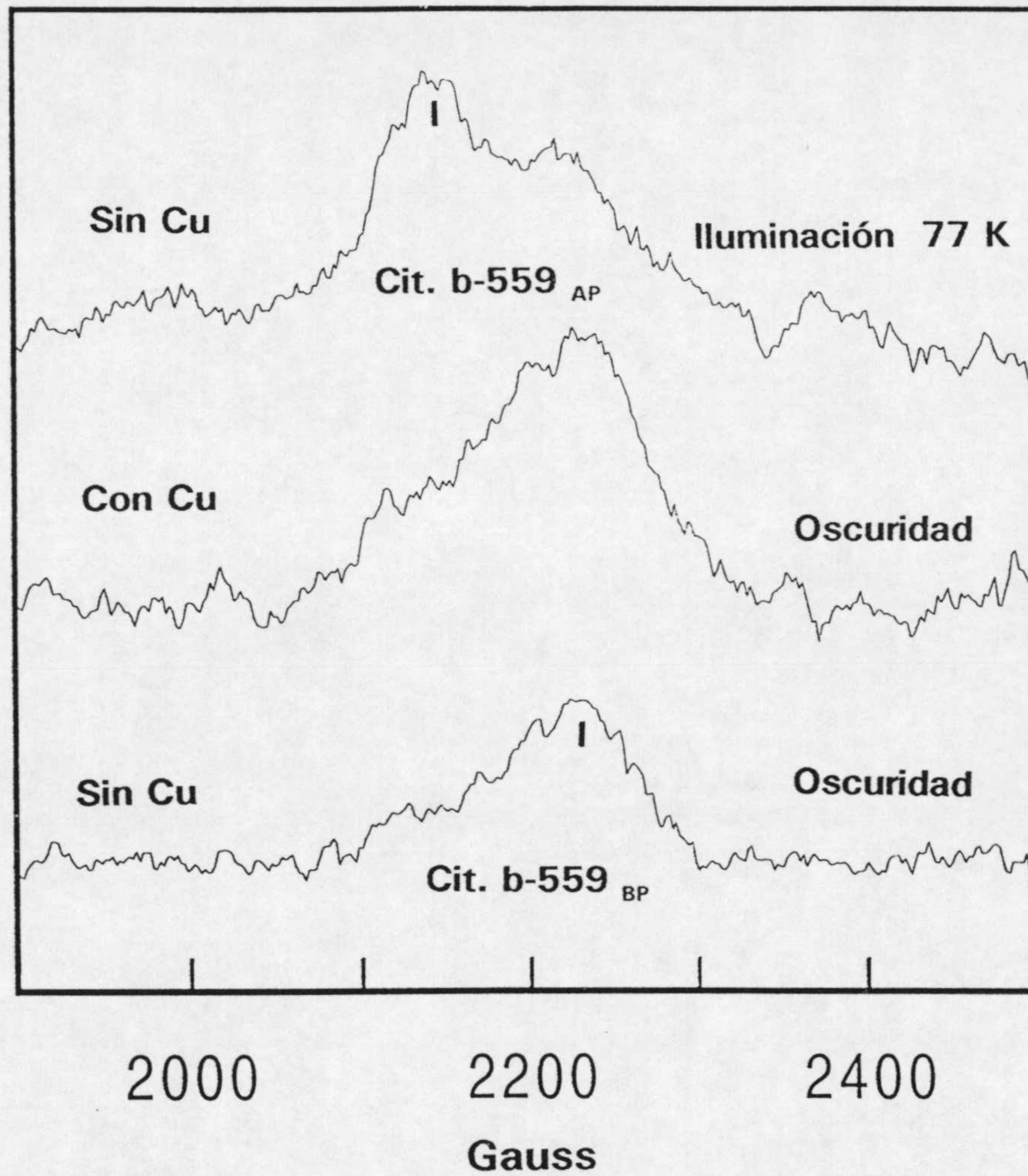


Figura 38. Espectro de RSE del citocromo b-559 en preparaciones de partículas de fotosistema II. A) Espectro del citocromo b-559 fotooxidado en una preparación iluminada (Lámpara de 1000 W) durante 20 min a 77 K en la que se induce la oxidación del citocromo b-559 de alto potencial,  $g=3.08$ . B) Espectro del citocromo b-559 en oscuridad en una preparación en presencia de Cu en la que se observa como se oxida totalmente el citocromo de bajo potencial,  $g=2.96$ . C) Espectro del citocromo b-559 en oscuridad en una preparación en ausencia de Cu en la que se observa únicamente el citocromo de bajo potencial parcialmente oxidado. Los parámetros instrumentales fueron los siguientes: Temperatura, 15 K; potencia de la radiación 15 dB (6.32 mW); frecuencia, 9.23 GHz; modulación de la amplitud 15.7 Gauss (1.57 mT); modulación de la frecuencia 100 kHz.



mismas características que el obtenido previamente en oscuridad en presencia de Cu.



DISCUSIÓN



---

I. FUNCIÓN DEL CU EN EL FOTOSISTEMA II. NUEVA PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS DE FOTOSISTEMA II EN LAS QUE SE ELIMINAN CONTAMINACIONES NUCLEARES Y ELEMENTOS METÁLICOS COMO EL Cu.

En la primera parte de este trabajo la conclusión más llamativa que luego nos llevaría a otras muy novedosas sobre el papel del Cu en el fotosistema II, fue que la preparación de partículas de fotosistema II más universalmente utilizada, BBY, y que fue objeto de nuestros ensayos, presentaba una fuerte contaminación nuclear. Histonas, ácidos nucleicos y diversos metales aparecían en ella. Su eliminación sólo era posible mediante una modificación que introdujimos en el método original de aislamiento (Berthold *et al.*, 1981), consistente en una corta centrifugación, 4 min, a 10 000 g, tras el tratamiento de las membranas tilacoidales con Tritón. Así se eliminaba el almidón de la preparación y, en el sedimento correspondiente, aparecían también las histonas, H4, H3 y dos del grupo H2, ácidos nucleicos y diversos metales, entre ellos el Cu, que era el objeto de nuestros estudios. Este paso estaba ausente en la primera descripción del método y en la mayoría de sus modificaciones posteriores, o la centrifugación para la eliminación del almidón era realizada a menor velocidad.

Desde que Berthold *et al.* (1981) publicaron el procedimiento de obtención de la preparación de las partículas de fotosistema II, conocida como BBY, con una alta capacidad de desprendimiento de oxígeno, éste ha sido el más utilizado y ha permitido un profundo conocimiento de la estructura y composición

---



polipeptídica, pigmentaria y lipídica del fotosistema II, la naturaleza química de sus componentes oxido-reductores y la funcionalidad del transporte electrónico asociado. Basadas en este método, se han publicado varias modificaciones que pretendían conseguir una preparación más activa o acortar el proceso (Ford y Evans, 1984; Kuwabara y Murata, 1982; van Leeuwen *et al.* 1991). También, han sido utilizados otros métodos que solubilizaban las membranas tilacoidales combinando varios detergentes como el Tritón X-100 y la digitonina (Yamamoto *et al.*, 1982; Dunahay *et al.*, 1984) o llevan a cabo el fraccionamiento mecánico de la membrana tilacoidal (Svensson y Albertsson, 1989).

Si alguno de estos métodos se analizan en detalle, sólo el de Kuwabara y Murata (1982) y el de van Leeuwen *et al.* (1991) incluyen un paso adicional en el protocolo de aislamiento para la eliminación de partículas groseras de almidón, después de la solubilización de las membranas tilacoidales con Tritón x-100, en los que se centrifuga a 1000 g durante 2 min. o a 2000 g durante 5 min., respectivamente. Sin embargo, estos dos últimos procedimientos no han sido los más habituales en el aislamiento de preparaciones de fotosistema II.

En las modificaciones al método de Berthold *et al.* (1981), algunas de ellas utilizadas en estudios sobre Cu en fotosistema II, normalmente no se incluye una centrifugación intermedia para eliminar almidón (Ford and Evans, 1984; Droppa *et al.* , 1984; Sibbald and Green, 1987) o ésta se realiza a baja velocidad. Como



se demuestra en el apartado de RESULTADOS, la eliminación de las contaminaciones nucleares es progresiva cuando se incrementa la velocidad de esta centrifugación de 1.000 a 10.000 g, y sólo esta última garantiza una eliminación total de aquellas al sedimentar con la fracción del almidón, histonas, ácidos nucleicos y metales en exceso. Esto implica que los métodos de aislamiento anteriormente citados han llevado al aislamiento de partículas de fotosistema II con una fuerte contaminación de restos nucleares, lo que afectaría el patrón polipeptídico y el contenido en metales de la preparación obtenida, con el consiguiente perjuicio para los resultados obtenidos en estudios realizados con aquella.

La contaminación nuclear presente en las BBY la consideramos procedente de los cloroplastos a partir de los cuales estas preparaciones fueron obtenidas. Estos son normalmente aislados por centrifugación diferencial sin ningún proceso de purificación adicional (gradientes de Percol o sacarosa, etc.). La presencia de restos del núcleo en estas preparaciones ha sido descrita principalmente en etioplastos y plantas en los primeros estadios del enverdecimiento (Hoyer-Hansen y Simpson 1977 y Welty *et al.* 1992).

La primera evidencia de una contaminación de nuestras BBY por restos nucleares, la tuvimos al identificar los cuatro polipéptidos de masa molecular 12-20 kDa que aparecían en el sedimento de almidón asociados a una gran cantidad de Cu y otros



## DISCUSIÓN

---

metales pesados. Mediante diversos experimentos de inmunorrevelado con los antisueros correspondientes, descartamos que éstos fueran polipéptidos del fotosistema II en ese rango de peso molecular o productos de degradación de otras proteínas mayores. La identificación del polipéptido de 17 kDa como la histona H3 por secuenciación del extremo N-terminal y los ensayos de inmunorrevelado con histonas animales que le siguieron para probar la identidad de los tres polipéptidos restantes, eran absolutamente concluyentes: Estábamos en presencia de 4 histonas, H4, H3 y 2 proteínas del grupo H2. Estas eran eliminadas totalmente de la preparación al realizar la centrifugación a 10.000 g para eliminación del almidón pero permanecían en la preparación que denominamos BBY<sub>s+</sub> en cuyo aislamiento se omitía esta centrifugación, o en aquellas en que la velocidad de centrifugación era más baja (figura 10. de RESULTADOS). En estos casos podían falsear el patrón polipeptídico del fotosistema II, de lo que era buen ejemplo el hecho de que en preparaciones de espinaca el polipéptido de 16 kDa del sistema de fotólisis del agua y la histona H3 emigraran conjuntamente en los sistemas de gel de poliacrilamida utilizados. Los experimentos que realizamos con plantas etioladas de guisante y espinaca sometidas posteriormente a distintos periodos de iluminación para comprobar los cambios originados por la luz en la composición de la membrana tilacoidal, destacaron que aquellas histonas contaminaban también las preparaciones de membranas tilacoidales de etioplastos y cloroplastos en diversas etapas del



enverdecimiento. Los anticuerpos de las histonas que aparecían en la fracción del almidón reaccionaban con los polipéptidos correspondientes de las anteriores preparaciones y los de las histonas animales. Welty *et al.* (1992) habían detectado también la presencia de las histonas H4, H3, H2a y H2b en preparaciones de membranas tilacoidales de guisante obtenidas durante el proceso de diferenciación cloroplastídica inducido por la luz.

Estas evidencias descartan la intervención de estos polipéptidos - ya identificados como histonas nucleares - en el desarrollo cloroplastídico, como algunos autores habían propuesto (Droppa *et al.* 1990). Se había señalado anteriormente que la abundancia de estas proteínas estaba en relación inversa con la presencia de polipéptidos del LHCII durante la diferenciación por la luz y en mutantes con síntesis deficiente de la antena (Droppa *et al.*, 1988) ; y se propuso que, por lo tanto, realizaban un papel fundamental en el ensamblaje de los fotosistemas. Con nuestros datos, podemos concluir que las histonas nucleares pueden contaminar las preparaciones de etioplastos, cloroplastos obtenidos durante el enverdecimiento y cloroplastos maduros, permaneciendo en muchos casos en preparaciones subcloroplastídicas como son las partículas de fotosistema II. El reto era pues obtener preparaciones sin contaminaciones nucleares para llegar a conclusiones fiables en el estudio de estructura y metabolismo del cloroplasto, como ya señalan Hoyer-Hansen y Simpson (1977) para etioplastos.



## DISCUSIÓN

---

Asimismo nuestra sospecha de que las histonas presentes en preparaciones BBY pudieran estar asociadas a ácidos nucleicos y, por ello, sedimentarían conjuntamente con el almidón como restos de la cromatina nuclear, se vió confirmada por las determinaciones espectrofotométricas de ácidos nucleicos en BBY<sub>s+</sub> y BBY<sub>s-</sub> y la separación de fragmentos de ADN y ARN por electroforesis en gel de agarosa en ambas preparaciones (figura 15): Ambos ácidos nucleicos contaminaban las BBY<sub>s+</sub> y se eliminaban junto con el almidón, desapareciendo en la nueva preparación que pusimos a punto, BBY<sub>s-</sub>.

La presencia de altas cantidades de metales como Ca, Fe, Zn y Cu en la fracción de almidón asociados a las histonas y ácidos nucleicos también presentes, había resultado en principio otro resultado sorprendente. También eran eliminados de las BBY<sub>s-</sub> fácilmente junto con la contaminación nuclear y el almidón mediante la centrifugación a 10.000 g, sin ocasionar cambios en la actividad fotosintética de las resultantes BBY<sub>s-</sub>. La presencia de metales en núcleos celulares ya había sido constatada por diversos autores (Lebkowski y Laemli, 1982). Fe, Cu, Mg y Zn habían sido detectados *in situ* en núcleos mediante análisis de fluorescencia de rayos X o microanálisis por rayos X (Skrinska *et al.*, 1978; Quintana *et al.*, 1987). Los grupos fosfato y las bases púricas y pirimidínicas de los ácidos nucleicos ofrecían asimismo varios puntos para unión de metales (Eichorn *et al.*, 1971); e incluso se había descrito que metales como el Cu y Ca podían estar implicados en los procesos reversibles de



enrollamiento del ADN (Lebkowski y Laemli, 1982). Ante ello, concluimos que aquellos metales que eran eliminados de la preparación junto con la fracción del almidón, procedían también de una contaminación de los núcleos celulares junto con las histonas y los ácidos nucleicos.

Por todo ello, proponemos una modificación al método de aislamiento de partículas de fotosistema II, BBY, de Berthold et al. que garantiza la obtención de una preparación altamente purificada en la que se ha eliminado el almidón y las contaminaciones nucleares, y que a lo largo de este estudio hemos llamado BBY<sub>s</sub>-. La modificación propuesta consiste en la introducción de una nueva centrifugación exactamente a 10.000 g durante 4 min tras el tratamiento de las membranas tilacoidales con Tritón X-100, para luego centrifugar, como habitualmente, a 40.000 g y obtener el sedimento de BBY, demostrándose en nuestro estudio que centrifugaciones más bajas no logran eliminar por completo las contaminaciones mencionadas. Este sencillo cambio en el protocolo tiene un tremendo efecto en la preparación obtenida, ya que en ella se consiguió eliminar histonas nucleares que falsearían el patrón polipeptídico del fotosistema II, metales procedentes del núcleo que podían ser atribuidos a este fotosistema y ácidos nucleicos y almidón, cuya ausencia mejoraba notablemente las propiedades ópticas de la preparación. Esto hace nuestra preparación BBY<sub>s</sub>- indispensable en el estudio de la función de distintos metales en el fotosistema II y en aquellos que abordan la composición y estructura de este fotosistema. Las



## DISCUSIÓN

---

ventajas de utilizarla en ensayos biofísicos como RSE, espectroscopía inducida por flash de rayo láser, etc, tuvimos ocasión de comprobarlas a lo largo del presente estudio.

Conseguir la preparación de fotosistema II adecuada para nuestro trabajo sobre LA FUNCION DEL COBRE EN FOTOSISTEMA II, nos había proporcionado paralelamente gran información sobre ésta que, en numerosas ocasiones, nos pareció bastante ambigua. A la vez, aclaraba algunos de los resultados, aparentemente contradictorios, publicados en los últimos años.

En la primera parte de este trabajo habíamos comprobado la sustancial diferencia en contenido de Cu entre la preparación de fotosistema II aislada según Berthold *et al.* (1981) con las modificaciones de Ford y Evans (1983) (BBY<sub>s+</sub>) y la aislada incluyendo además la nuestra. Las BBY<sub>s+</sub> presentaban 2,3 y 2,0 átomos de Cu por centro de reacción en espinaca y guisante, respectivamente; mientras el contenido en Cu de las BBY<sub>s-</sub> correspondientes era de 0,2, prácticamente insignificante teniendo en cuenta los errores inherentes a la medida. El Cu eliminado aparecía en el sedimento de la centrifugación que recogía el almidón, asociado a una contaminación nuclear de ácidos nucleicos, histonas y otros metales presentes en el núcleo celular. Asimismo las drásticas diferencias de contenido en Cu entre los dos tipos de preparaciones, no se traducían en cambios en su actividad fotosintética, la operatividad del transporte electrónico medida como desprendimiento de O<sub>2</sub> era idéntica. Nuestra conclusión era rotunda: El Cu que se consideraba asociado



al fotosistema II según diversos autores procedía de una contaminación nuclear en las preparaciones utilizadas para los experimentos y no podíamos considerarlo un elemento estructural de este fotosistema.

De hecho resultaba sorprendente la variabilidad de los contenidos en Cu de fotosistema II publicados en la literatura: Solamente examinando los datos referentes a plantas superiores encontrábamos 2,1 átomos por centro de reacción en *Vicia faba* (Gol'dfel'd and Khalilov 1979), 4,2 en cebada (Sibbald y Green 1987) y 3,3 en guisante (Barón *et al.* 1992). Comparando valores para la misma planta, encontramos en espinaca 5,7 (Anderson *et al.* 1964), 2,5 (Sibbald y Green 1987), 2,2 (Droppa *et al.* 1984; Horvath *et al.* 1984)), 1,8 (Droppa y Horvath 1990) y 1,2 (Sibbald y Green 1987 b); en una reciente publicación (Arvidsson *et al.* 1993) encuentran en sus propias preparaciones BBY de espinaca unas variaciones entre 0,1-1,1 átomos de Cu por 300 moléculas de clorofila. Esta diversidad no podía atribuirse, como algunos autores pretenden, a diferencias entre especies vegetales, ya que también aparecían trabajando con la misma planta; algunos grupos propusieron que existían pérdidas de Cu a lo largo del proceso de aislamiento de BBY. La mayoría de los valores de contenido de Cu en fotosistema II citados anteriormente, habían sido obtenidos en este tipo de partículas excepto en el caso de Anderson *et al.* (1964).

Cuando seguimos paso a paso las pérdidas de Cu asociadas al proceso de obtención de las preparaciones, tal como se detalla

---



## DISCUSIÓN

---

en el apartado de RESULTADOS, las más notables estaban asociadas a la eliminación de cuproproteínas para conseguir una nueva preparación: oxidasas del citoplasma con Cu, Rubisco que también lo asocia o plastocianina. No existían "inexplicables" pérdidas de Cu salvo aquella para la que este trabajo ha encontrado una explicación: el Cu asociado a una contaminación nuclear por histonas y ácidos nucleicos que aparecía en el sedimento de la centrifugación a 10.000 g para eliminar el almidón de la preparación final de fotosistema II. El amplio rango de contenidos en Cu obtenido en trabajos profusamente citados en este texto, lo atribuimos a no haber eliminado la fracción del almidón y la contaminación asociada, o a haberlo hecho parcialmente por centrifugación a velocidades más bajas de 10.000 g. Y ya habíamos demostrado anteriormente que, variando la velocidad de centrifugación para eliminar almidón, podíamos obtener prácticamente unas BBY con la concentración de Cu "deseada".

Entrando en un nivel más detallado de discusión, cabe destacar algunos trabajos que han sugerido diversas funciones para el Cu que encontraban en las preparaciones de fotosistema II, funciones que incluso han sido contrapuestas y que los mismos autores han rechazado entre sí. Holdsworth y Arshad (1970), Ramaswamy y Nair (1978) y Ono *et al.* (1984) pensaban que el Cu podría tener una función en el lado donador del fotosistema II. Los primeros creían que participaba junto al Mn en el transporte electrónico entre la molécula de H<sub>2</sub>O y el centro de reacción



P680. Los dos grupos restantes manifestaron que el Cu podría estar asociado con alguno de los polipéptidos del sistema de fotólisis del agua, basándose en que el tratamiento de las membranas tilacoidales o preparaciones de BBY (BBY<sub>s+</sub>) con Tris llevaba consigo la pérdida simultánea de estos polipéptidos y de Cu provocando una disminución de la capacidad del desprendimiento de oxígeno.

El problema era que para atribuir cualquier función del Cu en el lado oxidante del fotosistema II mediante eliminación selectiva de sus componentes, habría que encontrar un método que eliminara el Cu manteniendo el Mn. La importancia de éste para la oxidación del agua había generado una abundante literatura en los últimos años (ver revisión Debus, 1992) y estaba claro que pérdidas en la capacidad de desprendimiento de O<sub>2</sub> podían ser fácilmente asociadas a pérdidas de Mn. Con nuestra modificación al método de aislamiento de BBY, habíamos logrado obtener una preparación sin Cu y con un contenido inalterado de Mn. La preparaciones de BBY<sub>s-</sub> y BBY<sub>s+</sub> tenían las mismas tasas de desprendimiento de oxígeno e igual contenido en Mn, a pesar del bajo contenido en Cu en las primeras. Al no haberse observado unas tasas inferiores de desprendimiento de oxígeno parecía improbable que el Cu tuviera una función directa en el sistema de fotólisis del agua. Tampoco se había detectado Cu al purificar y caracterizar los polipéptidos del sistema de fotólisis del agua de 33, 23 y 16 kDa; ni había podido ser establecido por EFAXS o



## DISCUSIÓN

---

RSE que junto a los átomos del cluster de Mn haya átomos pesados como el Cu.

Por nuestra parte, también realizamos los "lavados selectivos" de los polipéptidos del sistema de fotólisis del agua de las preparaciones  $BBY_{s+}$  y  $BBY_{s-}$  de espinaca y guisante y medimos los contenidos en Cu y Mn de las preparaciones resultantes, como se indica en la tabla 13 de RESULTADOS. Con EDTA 5 mM, el Cu que había en las preparaciones de  $BBY_{s+}$  no varió en una gran medida, lo que podría indicar que el Cu se encontraba fuertemente ligado como correspondería al presente en la contaminación nuclear. Sólo se observó que el contenido de Cu disminuyó aproximadamente en un 50% en estas preparaciones con los lavados de Tris 0.8 M pH 8.4 que eliminaba los polipéptidos de 33, 23 y 16 kDa y parcialmente el de 10 kDa, y con el tratamiento KSCN 3M, Mes-NaOH 20 mM pH 6.0,  $CaCl_2$  50 mM y Tritón X-100 0.01% que eliminaba a los polipéptidos de 33, 23 y 16 kDa y parcialmente a los de 22 y 10 kDa. Ambos tratamientos resultaban lo suficientemente drásticos como para eliminar gran parte del Cu de diferentes tipos de complejos y, en nuestro caso, podía estar haciéndolo del que formaban las histonas asociadas a los ácidos nucleicos, que contaminaban las  $BBY_{s+}$ . Lo confirmaba el hecho de que, si se trataba con Tris o KSCN, la fracción del almidón con la contaminación nuclear asociada, la liberación de Cu era semejante. Los lavados de  $BBY_{s+}$  provocaron una inhibición de la capacidad del desprendimiento de oxígeno, sin embargo es muy difícil poder atribuir esta disminución a una pérdida de Cu,



ya que en ambos casos también se eliminó más del 95% del Mn en dichas preparaciones. Y de hecho la preparación BBY<sub>s</sub>- no sufre pérdidas en su capacidad de desprendimiento de O<sub>2</sub> por eliminación del Cu con la fracción del almidón, pero esto sí ocurre cuando se realiza un lavado con Tris, que elimina también prácticamente todo el Mn presente.

Algunos grupos destacaban la presencia de Cu en complejos antena del fotosistema II: Sibbald y Green (1987a,b) y Droppa *et al* (1990), en la antena principal LHCII y Arvidsson *et al.* (1992 y 1993), en el complejo menor CP26 (Bassi *et al.*, 1987).

Sibbald y Green (1987), que encontraban 2.5 y 4.2 átomos de Cu por cada 300 moléculas de clorofila en partículas de fotosistema II de espinaca y cebada, respectivamente, asignaban un 76 y 46% al LHC II de dichas especies, aislado por el método de Ryrie *et al.* (1980). Estos autores sugirieron que el Cu tendría una función estructural dentro del LHC II o colaboraría en la síntesis de sus polipéptidos o en el ensamblaje; pero no asignaban ninguna otra función al restante tanto por ciento de Cu, aunque descartaban que tenga alguna función en el transporte electrónico dentro del fotosistema II. El contenido de Cu en nuestras BBY<sub>s</sub>- no corresponde en ningún momento con el propuesto para el LHCII, y también determinamos por inmunorreveado con anticuerpos contra el LHCII que, en el sedimento de la fracción nuclear contaminante asociada al almidón y enriquecida en Cu estaba ausente cualquier polipéptido de la antena.



## DISCUSIÓN

---

La hipótesis más plausible para explicar los anteriores datos era que ya que se habían descrito en el LHCII sitios de unión para metales, (Davis and Gross, 1975; Lagoutte y Durantón, 1975; Takahashi y Asada, 1986; Foyer y Hall, 1979; Tajmir-Riahi y Ahmed, 1993), un Cu contaminante podía haberse unido a ellos a lo largo del método de aislamiento.

Droppa *et al.* (1990) argumentaron que el Cu en la antena principal (LHC II) podría estar en una forma análoga al presente en las oxidasas, que contienen en su centro activo varios átomos de Cu, y que su función sería la de proteger este fotosistema de la acción de radicales libres generados durante su actividad.

Arvidsson *et al.* (1992), a diferencia de Sibbald y Green (1987), encontraron como máximo un único átomo de Cu por centro de reacción y, dado que el número de complejos LHC II era mayor, indicaron que el Cu estaría asociado a un complejo menor de antena. Ya que con anterioridad Droppa *et al.* (1984) constataron que un polipéptido de 28 kDa desaparecía en condiciones de deficiencia en Cu, propusieron que éste podría ser la apoproteína del complejo CP26. Por último sugerían una actividad oxidasa de esta antena menor dentro del ciclo de las xantofilas. Sin embargo, estos mismos autores observaron grandes variaciones en la estequiometría del Cu en las partículas de fotosistema II que aislaban, encontrando valores desde 0.1 hasta 1 átomos de Cu por centro de reacción, como destacamos anteriormente, explicándolo por una unión lábil del Cu a su punto de acción en el fotosistema II. Para estabilizar esta unión añadieron Cu 10  $\mu\text{M}$  en los



tampones utilizados durante el aislamiento de las BBY. En estas condiciones, purificaron parcialmente mediante sucesivos tratamientos con detergentes, el CP 26, sin embargo no determinaron en la preparación final el número de átomos de Cu por complejo antena. La relación de reciprocidad entre el Cu y el CP26 la habían pretendido demostrar mediante lavados con NaSCN 3M, Mes-NaOH 50 mM pH 6.5, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, Tritón X-100 0.01% y sacarosa 0.4 M, en los que el contenido de Cu bajó hasta un 50% a la vez que se observó como junto con los polipéptidos de 33, 23, 16, 22 y 10 kDa, se había solubilizado la proteína de 28 kDa. Sin embargo había que señalar que, observando atentamente las separaciones electroforéticas de las proteínas de las distintas preparaciones utilizadas, partían de una preparación contaminada por restos nucleares en la que, por lavado con Tritón, desaparecían hasta 10 polipéptidos y no solamente los asociados a la fotólisis del agua y el de 28 kDa, y podían detectarse hasta histonas nucleares. Estos resultados coincidían con los de la tabla 13 comentada anteriormente, donde las BBY<sub>s+</sub> tratadas con NaSCN 3M muestran una disminución del 50-60% de Cu, aunque en el sobrenadante de nuestras BBY<sub>s+</sub> no se observaba un polipéptido con dicho peso molecular.

Respecto a la purificación del CP26, hay que destacar que ésta no es a homogeneidad, detectándose otras proteínas en la preparación final, que fue realizada en presencia de un exceso de Cu y partiendo de preparaciones contaminadas por restos del núcleo, ya que se encontraron histonas en estadios intermedios



## DISCUSIÓN

---

de la preparación. El exceso de Cu en el medio y el presente en la contaminación podría favorecer la unión del metal a lugares inespecíficos de unión para metales (Davis and Gross, 1975; Lagoutte y Durantón, 1975; Takahashi y Asada, 1986; Foyer y Hall, 1979; Tajmir-Riahi y Ahmed, 1993), riesgo del que advierten los mismos autores. En el caso del CP26, la situación es equivalente a la ya criticada sobre la presencia de Cu en el LHCII. De hecho puede que estemos hablando de la misma proteína. Arvidsson *et al* (1993) propusieron que el LHCII purificado podía contener cantidades significativas de una proteína de 28 kDa que sería la apoproteína del CP26. Este podría ser el caso de los trabajos citados de Sibbald y Green (1987 a y b).

En base al conjunto de resultados presentados en la primera parte de este trabajo, proponemos que el Cu no es un elemento constituyente del fotosistema II, aunque sí podría tener un efecto indirecto tanto en su actividad como en su composición proteica, pigmentaria y lipídica en condiciones de deficiencia o toxicidad como se ha reflejado en la introducción de esta tesis y en anteriores trabajo de nuestro grupo (López-Gorgé *et al.*, 1985; Barón *et al.*, 1988, 1992).



---

## II. EFECTO TÓXICO DEL CU EN EL FOTOSISTEMA II. BLOQUEO DEL TRANSPORTE ELECTRÓNICO ENTRE LA TIROSINA Z Y P680 COMO PRINCIPAL PUNTO DE ACCIÓN DE SU EFECTO INHIBIDOR DENTRO DEL FOTOSISTEMA II.

Cuando medimos el efecto tóxico del Cu en el fotosistema II como pérdida de la capacidad del desprendimiento de oxígeno a concentraciones crecientes del metal, utilizando las reacciones de Hill  $H_2O \rightarrow \text{fenil-p-BQ}$  y  $H_2O \rightarrow \text{SiMo}$ , obtuvimos valores de  $I_{50}$  9 y 20  $\mu\text{M}$  Cu, respectivamente, en un medio que contenía Mes-NaOH 20 mM pH 6.5 y NaCl 10 mM. Otros grupos de investigación aún observando el mismo efecto del Cu sobre la actividad de este fotosistema, presentaban distintos valores de  $I_{50}$ . Habermann (1969) en la reacción  $H_2O \rightarrow p\text{-benzoquinona}$  obtuvo un  $I_{50}$  de 2 mM en tampón fosfato, Cedeño-Maldonado *et al* (1972) y Hsu y Lee (1988) presentaron un  $I_{50}$  de 10  $\mu\text{M}$  Cu para la reacción de Hill  $H_2O \rightarrow \text{DCIP}$  en tampón Hepes; pero para esta misma reacción Shioi *et al.* (1978) consiguieron solamente una inhibición del 15% con 10  $\mu\text{M}$  Cu en tampón Tris; Sandmann y Böger (1980) determinaron un 5% de inhibición con 50  $\mu\text{M}$  Cu en tampón fosfato, aunque Samuelsson y Öquist (1980), y Gupta (1987) en este último tampón llegaron a un  $I_{50}$  5  $\mu\text{M}$  Cu. Uribe y Stark (1982) e Yruela *et al.* (1993) alcanzaron una inhibición del 25% con 60  $\mu\text{M}$  Cu en tampón Tricina y un  $I_{50}$  de 20.7  $\mu\text{M}$  Cu en tampón Mes para la reacción de Hill  $H_2O \rightarrow K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , respectivamente. Yruela *et al.* (1993) y Renger *et al.* (1993), en la reacción de Hill  $H_2O \rightarrow \text{DCBQ}$ , determinaron un  $I_{50}$  de 6.6  $\mu\text{M}$  y de 8-10  $\mu\text{M}$  en tampón Mes respectivamente. Renganathan

---



## DISCUSIÓN

---

y Bose (1989) con la reacción de Hill  $H_2O \rightarrow SiMo$  en presencia de DCMU consiguieron un valor de  $I_{50}$  de inhibición con  $15 \mu M$  Cu en tampón Hepes, aunque Yruela *et al.* (1993) no observaron inhibición alguna en la reacción de Hill  $H_2O \rightarrow SiMo$  en tampón Mes.

Renganathan y Bose (1990) en un trabajo sobre tampones y reactivos utilizados para el estudio de la inhibición por Cu del fotosistema II, concluían que tampones orgánicos como Tricina, Tris y Tes no deberían usarse, ya que estos interaccionarían con Cu (Good *et al.*, 1966) al igual que el tampón fosfato (Massey, 1973), mientras que los tampones Hepes y Mes no lo harían. Además, reactivos utilizados como donadores o aceptores electrónicos artificiales de la cadena del transporte electrónico como DPC,  $NH_2OH$  y ascorbato reaccionaban químicamente con el Cu, por lo que debería evitarse su empleo. En base a dichas sugerencias se seleccionó el tampón Mes para nuestros estudios que es frecuentemente utilizado en los ensayos con partículas de Fotosistema II, evitando además utilizar los reactivos anteriormente mencionados en cualquier medida de actividad de las partículas de Fotosistema II en presencia de Cu.

Los aceptores electrónicos como el DCPIP, DCBQ, fenil-*p*-BQ y  $K_3[Fe(CN)_6]$  se caracterizan porque son reducidos en el sitio  $Q_B$  del fotosistema II. En membranas tilacoidales en las que se ha llevado a cabo una digestión controlada por tripsina y el sitio  $Q_B$  se ha destruido o modificado significativamente, el DCBQ no puede reducirse (Yruela *et al.*, 1993) ni el DCMU puede unirse a



su lugar específico (Renger, 1976; Drechsler y Newmann, 1989), pero el  $[K_3Fe(CN)_6]$  puede todavía funcionar como aceptor electrónico, por lo que se ha sugerido que  $Q_A$  pudiera donarle electrones. El SiMo es un aceptor electrónico bastante más controvertido y han sido propuestos diversos puntos del fotosistema II como lugares de su reducción. Ben-Hayyim y Neumann (1975) observaron que el SiMo era fotorreducido en presencia de DCMU a pH 6 a nivel de Q (reconocido en la actualidad como  $Q_A$ ), mientras que a pH 8 la reducción era fuertemente inhibida. Zilinskas y Govindjee (1975) determinaron que la iluminación previa de la muestra con anterioridad a la adicción de SiMo incrementaba el desprendimiento de  $O_2$ , probablemente inducido por un cambio conformacional de la membrana en luz, y propusieron, al igual que los anteriores autores, que el SiMo era reducido por Q. Böger (1982) y Graan (1986) observaron que también el SiMo podría reducirse en el sitio  $Q_B$ , ya que había una inhibición competitiva entre el SiMo y el DCMU por dicho sitio. Barber et al. (1987) y Takahashi et al. (1989) con centros de reacción de fotosistema II constituidos por D1, D2, citocromo b-559 y los pigmentos clorofila a, feofitina y  $\beta$ -caroteno en una proporción 4:2:1, pero en los que no estaban presentes las quinonas  $Q_A$  y  $Q_B$  ni el cluster de Mn, determinaron que el SiMo era reducido por la feofitina cuando utilizaban DPC como donador electrónico. Finalmente, Schansker y van Rensen (1993) sugirieron que el SiMo se unía al Fotosistema II en un punto próximo al sitio  $Q_B$  desplazando al  $HCO_3^-$  del  $Fe^{+2}$  no-hemínico situado entre  $Q_A$  y  $Q_B$ ,



## DISCUSIÓN

---

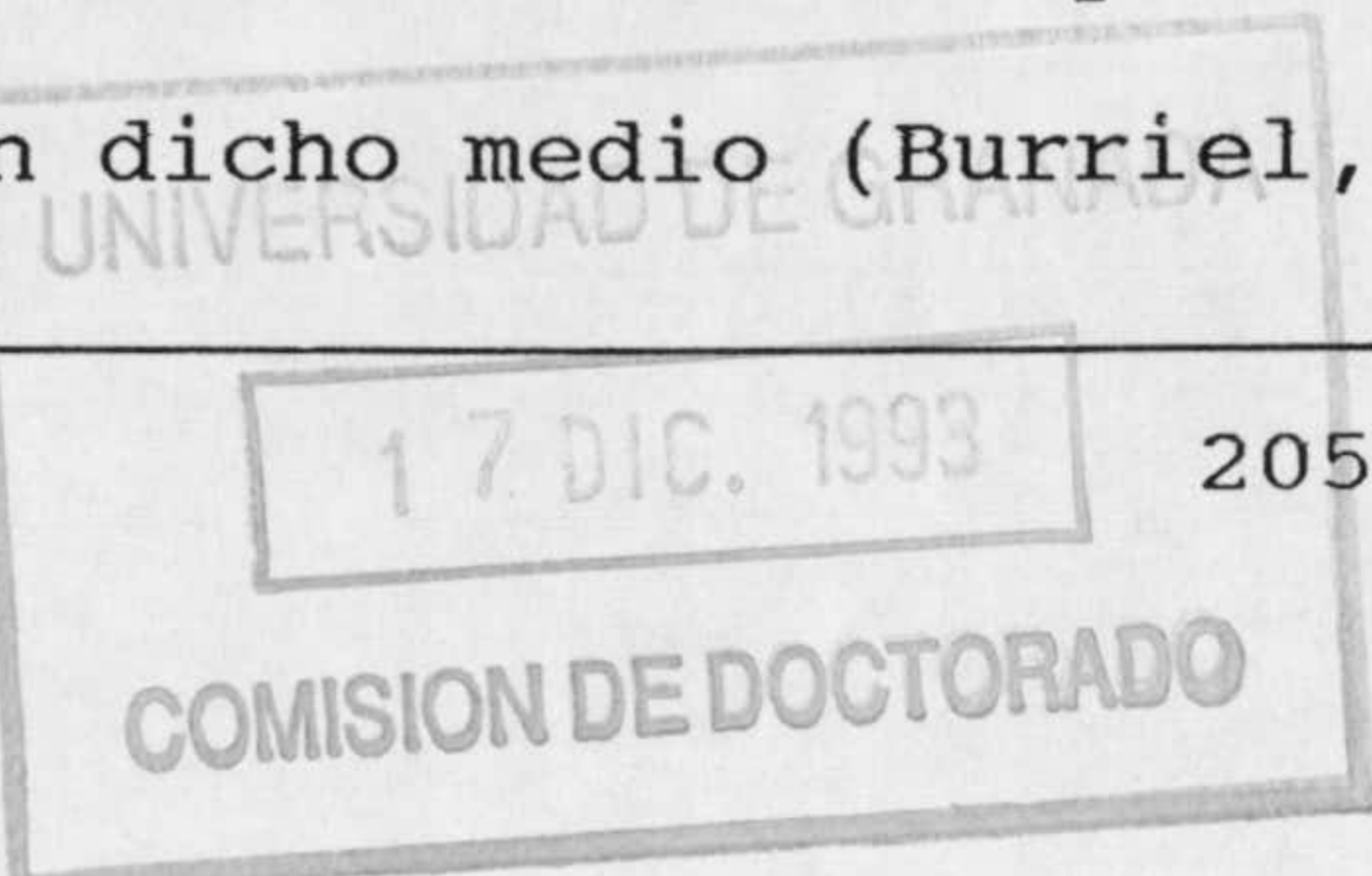
aceptando electrones de dicho Fe, sin que además observaran competición alguna con el DCMU por el sitio  $Q_B$ .

En nuestros experimentos estudiamos la inhibición causada por DCMU en las reacciones de Hill  $H_2O \rightarrow$  fenil-*p*-BQ y  $H_2O \rightarrow$  SiMo. Con la primera obtuvimos un valor de  $I_{50}$  de 80 nM de DCMU y una inhibición total con DCMU 10  $\mu$ M, lo que concordaba con la utilización de un aceptor electrónico en el sitio  $Q_B$ . Sin embargo, en la reacción de Hill  $H_2O \rightarrow$  SiMo con una concentración de DCMU 10  $\mu$ M conseguimos una inhibición del 50% bajo las mismas condiciones, llegando incluso a mantenerse hasta con una concentración de DCMU 50  $\mu$ M en el medio, por lo que indicaba una actividad de transporte electrónico resistente al herbicida. Parecían, por lo tanto, existir dos lugares en los cuales el SiMo podría aceptar electrones, uno a nivel de  $Q_B$  (sensible al DCMU) tal y como describen Böger (1982) y Graan (1986), y otro anterior al sitio  $Q_B$  (insensible al DCMU) que por las características de nuestro experimento no podríamos precisar si era a nivel de  $Q_A$  (Zilinskas y Govinjee, 1975; Ben-Hayyim y Neumann, 1975), Fe no-hemínico (Schanker y van Rensen, 1993) o feofitína (Barber *et al.*, 1982; Takahashi *et al.*, 1987) o un efecto conjunto de dichos efectos insensibles al DCMU. Cuando realizamos la curva de inhibición por Cu con la reacción  $H_2O \rightarrow$  SiMo(+DCMU) se obtuvo una curva de inhibición similar a la obtenida para esta misma reacción en ausencia del herbicida. Aunque la interpretación de estos resultados fuera compleja, debido al debate del punto de acción del SiMo en el fotosistema II, eran destacables ya que



otros autores no habían registrado pérdida de la actividad por Cu en condiciones muy similares de ensayo (Yruela *et al.* 1991). Renganathan y Bose (1989) obtenían resultados similares a los nuestros y describieron una inhibición por Cu en la reacción de Hill  $H_2O \rightarrow SiMo(+DCMU)$  obteniendo un  $I_{50}$  de inhibición de  $15 \mu M$  Cu. Si el Cu inhibía el transporte electrónico  $H_2O \rightarrow SiMo$  resistente al DCMU, podríamos proponer al menos que había un lugar de inhibición anterior al segundo punto de acción del SiMo (insensible al DCMU). Aunque, con estos resultados no se podía descartar que pudiera haber otro punto a nivel de  $Q_B$  donde la reducción de SiMo (sensible al DCMU) o fenil-*p*-BQ estuvieran inhibida. Sin embargo, Yruela *et al.* (1992) determinaron que la inhibición por DCMU y Cu no era competitiva sugiriendo que el Cu no se uniría al sitio  $Q_B$ , pero Renger *et al.* (1993) creían que el Cu pudiera modificar el sitio  $Q_B$  advirtiéndolo que el Cu afectaba la afinidad de la atrazina.

La influencia del pH sobre el efecto tóxico del Cu en el fotosistema II nos permitió indagar en la naturaleza de su punto de unión a este fotosistema. En principio comprobamos que el intervalo de pH 6 - 7 era óptimo para la medida del desprendimiento de oxígeno y que deberíamos evitar pHs > 7.0, que incrementarían las posibles interacciones de Cu con los grupos fosfato de los fosfolípidos asociados a las partículas de fotosistema II, además de eludir el mismo efecto causado por un pH básico que daría lugar a la formación del hidróxido cúprico y su posterior óxido que precipitarían en dicho medio (Burriel,





## DISCUSIÓN

---

*et al.*, 198 ), pudiendo ambos efectos enmascarar los resultados. Para pHs inferiores a 6.0 la actividad de las partículas de Fotosistema II fue disminuyendo paulatinamente al aumentar la acidez del medio. Schlodder y Beyer (1987) determinaron que el desprendimiento de oxígeno era óptimo para pHs entre 6.5 y 7.5, inhibiéndose a pHs inferiores y superiores a dicho intervalo, proponiendo que para pHs ácidos la inhibición reversible se debía a la protonación de un grupo cuyo pKa debería ser 4.5, que dañaría el sistema de fotólisis del agua retardando las transiciones  $S_i \rightarrow S_{i+1}$  observando correlativamente que la señal II rápida de RSE debida a la tirosina Z incrementaba al bajar el pH. Mientras que, a pHs básicos, la inhibición reversible del sistema de fotólisis del agua podría deberse a un intercambio entre los aniones  $Cl^-$  y los aniones  $OH^-$ , aunque para pHs  $> 9$  la inhibición ya era irreversible debido a la pérdida del cluster de Mn y a la proteína de 33 kDa del sistema de fotólisis del agua. Conjeaud y Mathis (1980) en partículas de fotosistema II lavadas con Tris no advirtieron efecto alguno sobre la reacción de recombinación entre el  $P680^+$  y  $Q_A^-$  en un rango de pH comprendido entre 4 y 9, aunque sí sobre la reducción del  $P680^+$  por la Tirosina Z variando su tiempo de vida media desde  $2 \mu s$ , a pH 9, hasta  $44 \mu s$ , a pH 4, por lo que la separación de carga no estaba afectada, aunque sí la estabilización de la separación de cargas que aumentaba al bajar el pH. En relación a la dependencia de la inhibición por Cu del pH, ésta disminuye proporcionalmente con el pH, de forma que su influencia sobre la



actividad de las partículas del fotosistema II a pH 5 es mínima, advirtiéndose solamente el efecto anteriormente mencionado sobre el lado donador por el pH (Schlodder y Meyer, 1987; Conjeaud y Mathis, 1980). La actividad del lado donador debería ir recuperándose al aumentar el pH, sin embargo el Cu la inhibe de forma más acusada, lo que podría apuntar a una competencia entre el Cu y los H<sup>+</sup> por un mismo ligando. Steemann-Nielsen *et al.* (1969) manifestaron un efecto similar del pH sobre la inhibición causada por Cu en cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* e Yruela *et al.* (1992) propusieron una inhibición competitiva entre el Cu y un H<sup>+</sup>, aunque dichos autores propusieron que ambos podrían unirse a un ligando en el lado aceptor del fotosistema II asignándole un pKa de 7.2 que no necesariamente se debería a un único grupo con carácter ácido base aunque propusieron que podría ser un residuo de histidina o triptófano, aunque el residuo de éste último aminoácido no tiene carácter ácido-base. También, Vierke y Struckmeier (1977), tras estudios de RSE, concluyeron que el Cu debería unirse a una proteína del fotosistema II, con 4 ligandos asociados al Cu que corresponderían con tres átomos de O y uno de N. Habría que buscar el ligando de Cu en función de sus respectivos pKas entre los aminoácidos que tienen un radical con carácter ácido-base. En un primer grupo estarían aquellos con carácter básico como la cisteína pKa 8.33, tirosina pKa 10.07, lisina pKa 10.53 y arginina pKa 12.48 y un segundo grupo con carácter ácido como el ácido aspártico pKa 3.86, ácido glutámico pKa 4.25 e histidina pKa 6.00. En nuestras condiciones de



## DISCUSIÓN

---

trabajo, difícilmente podríamos creer que los radicales del grupo primero pudieran tomar parte ya que para nuestro intervalo de pH están protonados y debería ser el pH muy similar a sus respectivos pKas para observar dicha inhibición competitiva. Sin embargo, los radicales del segundo grupo formado por el ácido aspártico, el ácido glutámico y la histidina podrían interaccionar con Cu. Principalmente la histidina cuyo nitrógeno podría donar su par electrónico y formar con el Cu un complejo de coordinación cuya estabilidad dependería en una gran medida del pH del medio para un intervalo como el utilizado dado el pKa de dicho radical, aunque tampoco se podría descartar los residuos de los ácidos glutámico y aspártico tal y como muestra el hecho de que el Cu tuviera ligandos de O.

Tras investigar la naturaleza del punto de unión del Cu al fotosistema II para inhibir el transporte electrónico, nos planteamos si la inhibición podría ser reversible o no. Steemann-Nielsen (1969) y Cedeño-Maldonado y Swader (1972) propusieron que el efecto causado por Cu dependía de la luz. Habermann (1969), Gross *et al.* (1970) y Gupta (1980) encontraron una reversibilidad de la actividad por  $Mn^{+2}$  exógeno; y Hsu y Lee (1988) encontraron una recuperación de la actividad tras eliminar el exceso de Cu por centrifugación. Sin embargo, Samuelson y Öquist (1980) y Cedeño-Maldonado y Swader (1972) propusieron que la inhibición era irreversible.

Nuestros resultados mostraban que, cuanto mayor era el periodo de iluminación durante la preincubación con Cu de las



partículas de fotosistema II menor era la recuperación de la actividad por un tratamiento posterior con EDTA. Por ello, concluimos que el efecto causado por el Cu debería ser irreversible en luz bajo nuestras condiciones de trabajo, en un medio con tampón Mes-NaOH 20 mM pH 6.5. Los autores que con anterioridad habían propuesto que el efecto inhibitor era reversible por  $Mn^{+2}$  utilizaron tampón fosfato que podía interaccionar con el Cu y evitar la unión de éste a su punto de acción (Massey *et al.*, 1973; Renganathan y Bose, 1990) y Samuelson y Öquist (1980) propusieron que la inhibición sí era irreversible aún en presencia de  $Mn^{+2}$  cuando utilizaron tampón Hepes.

Para profundizar aún más sobre que lado del fotosistema II el Cu inhibía la actividad de dichas partículas se estudiaron los cambios de la emisión de fluorescencia emitida por este fotosistema e inducidos por luz en presencia de Cu. Con partículas de fotosistema II lavadas con Tris utilizando como donador  $Mn^{+2}$  exógeno, se puso de manifiesto que la fluorescencia máxima ( $F_M$ ) disminuía con el incremento de la concentración de Cu, ralentizándose progresivamente la inducción de la fluorescencia hasta alcanzar los mínimos valores de fluorescencia observados en las preparaciones de partículas de fotosistema II tratadas con Tris en ausencia de Mn, lo que indicaba que el Cu inhibía la donación electrónica por Mn al fotosistema II. Además, el hecho de que no hubiera un incremento de la inducción de la fluorescencia por la presencia de Cu entre las fases de I y  $F_M$ ,



## DISCUSIÓN

---

correspondiente a la fracción de partículas de fotosistema II reductoras de  $Q_B$  (Lichtenthaler, 1988), lo que suele ocurrir con inhibidores del lado aceptor como el DCMU (Schreiber y Neubauer, 1987a), indicaría que el Cu no bloquea la transferencia electrónica entre  $Q_A$  y  $Q_B$ . Así que, la inhibición de la fluorescencia máxima ( $F_M$ ) por Cu, manteniéndose los valores de  $F_0$  constante, apuntaría más bien a un bloqueo del transporte electrónico en el lado donador del fotosistema II y, dado que nuestras preparaciones carecían del sistema de fotólisis del agua, el punto de acción debería estar bastante próximo al centro de reacción de dicho fotosistema. Shioi *et al.* (1978), Samson *et al.* (1988), Samson y Popovic (1988), y Hsu y Lee (1988) obtuvieron similares resultados en condiciones en las que el sistema de fotólisis del  $H_2O$  estaba inhibido o en partículas de fotosistema II lavadas con Tris utilizando donadores artificiales como el DPC o  $NH_2OH$ . Renganathan y Bose (1989) determinaron igualmente un efecto inhibitor del Cu sobre la fluorescencia máxima tanto en partículas de fotosistema II como en centros de reacción llegando incluso a proponer que las His 198 de la proteína D1 e His 215 de la proteína D2 del centro de reacción pudieran ser ligandos para el mismo Cu. Mohanty *et al.* 1988 con idénticos resultados a los anteriores, propusieron que la pérdida de la fluorescencia no tendría por qué deberse únicamente a un daño en el lado donador argumentando, ya que en condiciones de fotoinhibición el sitio  $Q_B$  se altera apareciendo una disminución de la fluorescencia, aunque posteriormente Eckert *et al.* (1991)



demonstraron que bajo condiciones de fotoinhibición se daña tanto el lado donador como el aceptor.

Al disminuir el pH en nuestros experimentos en ausencia de Cu, la inducción de la fluorescencia se ralentizó; sin embargo el nivel de fluorescencia máxima ( $F_M$ ) permaneció constante para el intervalo de pH 5-7, sólo a pH 5 se observó un "quenching" de la fluorescencia. Krieger *et al.* (1992) determinaron un "quenching" de la fluorescencia para pHs < 5.5, paralelo a una disminución en el desprendimiento de oxígeno; aunque la señal de fluorescencia podía ser recuperada al igual que en nuestro caso por la adición de donadores electrónicos por lo que sugirieron que el "quenching" estaba causado por una inhibición del transporte electrónico desde el sistema de fotólisis del agua, como consecuencia de la protonación de algún ligando en el lado donador cuyo aparente pKa estaría comprendido entre 4.5-4.8. El hecho de que el Cu tuviera un efecto dependiente del pH, siendo más acusada la inhibición de la inducción de la fluorescencia al aumentar éste, indicaría que el residuo con carácter ácido-base (probablemente una histidina tal y como han sugerido anteriores autores) se encontraría en el lado donador.

Schreiber y Neubauer (1987), y Nocton y Horton (1990) propusieron, que cuando el sistema de fotólisis del agua estaba inhibido, el  $P680^+$  podría ser reducido nuevamente por la reacción de recombinación entre  $Q_A^-P680^+ \rightarrow Q_AP680$  o, alternativamente, por otros donadores por medio de un ciclo en torno al fotosistema II en el que el citocromo b-559 y las plastoquinonas del lado



aceptor del fotosistema II estarían involucrados. Este ciclo o la misma reacción de recombinación entre el  $P680^+$  y  $Q_A^-$  podrían ser responsables del "quenching" de fluorescencia cuando el lado donador hubiera estado bloqueado y se hubiera prolongado el tiempo de vida media del  $P680^+$ , Butler (1972) puso de manifiesto igualmente que el  $P680^+$  podría amortiguar la fluorescencia. Kriger *et al.* (1992) explicaron que la energía de excitación podía disiparse como calor debido a la reacción de recombinación entre el  $P680^+$  y  $Q_A^-$  en condiciones en las que el lado donador del fotosistema II estuviera bloqueado y la tirosina Z no pudiera reducir al  $P680^+$  como por acidificación del medio (Schlodder y Meyer, 1987; Meyer *et al.*, 1987) o pérdida de  $Ca^{+2}$  asociado al sistema de fotólisis del agua (Boussac *et al.*, 1992), sin que por ello la separación de carga estuviera afectada tal y como demostraron Conjeaud y Mathis (1980). Así, en partículas de fotosistema II cuyo lado donador hubiera estado inactivado, aun en condiciones de alta intensidad de luz  $Q_A$ , debería permanecer oxidada como consecuencia de la reacción de recombinación disipándose la energía en forma de calor evitando que la señal de fluorescencia se indujera al no acumularse  $Q_A$  reducido.

Nuestros resultados, después de las experiencias realizadas con el electrodo de oxígeno y con el fluorímetro de fluorescencia modulada, apuntaban a que el Cu podría causar una inhibición principalmente en el lado donador del fotosistema II. Observar que la separación de cargas y estabilización  $P680^+-feo-Q_A^-$  no se encontraba afectada por la presencia de Cu, tal y como proponían



los anteriores autores cuando el lado donador se encontraba inhibido, y que hubiera un ciclo en torno al fotosistema II o una reacción de recombinación entre  $P680^+ Q_A^-$  en dichas condiciones de inhibición que justificaran la inhibición del desprendimiento de oxígeno y el "quenching" de fluorescencia consolidarían nuestros resultados. Para ello abordamos un estudio más detallado con técnicas de espectroscopía de absorción inducida por flash y de resonancia de spin electrónico.

En medidas de cambios de absorbancia a 830 nm inducidos por flash de láser, observamos inicialmente que, al aumentar la concentración de Cu en el medio, la componente de ns asociada a la reducción del  $P680^+$  por su donador, la tirosina Z, disminuía mientras que la componente de  $\mu s$ , relativa normalmente a una reacción de recombinación aumentaba.

La componente de ns se determinó indirectamente con la ecuación ( $A_{830}^{ns} = A_{830}^{Total}(+NH_2OH, t=2\mu s) - A_{830}^{\mu s}(-NH_2OH, t=0)$ ) según Eckert *et al.* (1991) comprobándose además que el máximo incremento de absorbancia  $A_{830}^{Total}(+NH_2OH, t=2\mu s)$  para las distintas concentraciones de Cu permaneció constante, indicando que, aunque la componente de ns asociada a la tirosina estaba inhibida, la separación de cargas  $P680^+Q_A^-$  no estaba afectada ya que para todas las concentraciones de Cu se observó la misma absorbancia a 830 nm que en las preparaciones control en presencia únicamente de  $NH_2OH$  2 mM, que se caracteriza porque tampoco afecta la separación de carga y elimina igualmente la



## DISCUSIÓN

---

componente de ns. Además, la inhibición de la componente de ns iba acompañada por una disminución del desprendimiento de oxígeno. Para una concentración de Cu 100  $\mu\text{M}$ , en nuestras condiciones de trabajo el  $A_{830}^{\text{Total}}$  coincidió finalmente con la componente de  $\mu\text{s}$   $A_{830}^{\mu\text{s}}(-\text{NH}_2\text{OH}, t=0)$ , sin que se observara después de la adicción de  $\text{NH}_2\text{OH}$  2 mM un nuevo incremento asociado a la componente de ns, indicando que para dicha concentración de Cu se había inhibido totalmente el desprendimiento de oxígeno. El efecto tóxico del Cu parecía estar más asociado a una acción sobre el lado donador, inhibiendo la reducción del  $\text{P680}^+$  por la tirosina Z que a cualquier otra acción más directa sobre el centro de reacción. Para determinar con mayor exactitud a qué nivel del lado donador del fotosistema II el Cu podría bloquear el transporte electrónico, estudiamos las variaciones en la cinética de reducción del  $\text{P680}^+$ . Los parámetros cinéticos obtenidos por los cambios de absorción a 830 nm en presencia de Cu eran muy distintos a los correspondientes a unas partículas de fotosistema II cuyo sistema de fotólisis del agua estuviera intacto; para esta última preparación, Eckert *et al.* (1988) determinaron por espectroscopía de absorción a 830 nm inducida por flash con un tiempo de resolución en la escala de ns que aproximadamente el 70% del  $\text{P680}^+$  era reducido por la tirosina Z en un periodo de tiempo de 30-260 ns, correspondiendo el restante 30% a la reacción de recombinación entre  $\text{P680}^+\text{Q}_\text{A}^-$ . Sin embargo, los parámetros cinéticos obtenidos con Cu fueron los siguientes: 20-40  $\mu\text{s}$  (30-40%), 120-160  $\mu\text{s}$  (60-70%) y  $> 1\text{ms}$  (5-15%). Para



indagar a que nivel el Cu podría inhibir el lado donador del fotosistema II comparamos, así mismo, estas componentes cinéticas obtenidas por medidas a 830 nm para el Cu, con las de otros compuestos que inhiben igualmente el lado donador del fotosistema II. Existen compuestos como el ácido diisotiocianoestilbeno 2,2' disulfónico, trifluoperazina o lauril colina que inhiben el desprendimiento de oxígeno sin que por ello se inhiban las transiciones S; otro grupo lo compondrían aquellos del tipo ADRY que desestabilizan la transición  $S_2 \rightarrow S_3$ . Los del primer grupo mantiene la componente de ns, variando sólo en proporción de un 70 a un 50% y, para el segundo, dicha componente permanece inalterada; por lo que la transferencia electrónica desde la tirosina Z al  $P680^+$  no está especialmente afectada por ninguno de los dos tipos de inhibición descrita sobre el sistema de fotólisis (Eckert *et al.*, 1988). Pero nuestros resultados no apuntan a una inhibición de este tipo, ya que las concentraciones tóxicas de Cu no sólo inhiben el desprendimiento de oxígeno, sino que, simultáneamente, la componente cinética de ns asociada a la tirosina Z desaparece, así que, los parámetros cinéticos asociados al incremento de absorbancia a 830 nm en partículas de fotosistema II tratadas con Cu parecían descartar el sistema de fotólisis del agua como punto de acción del metal. Hecho confirmado en experimentos similares realizados con partículas de fotosistema II tratadas con Tris o  $NH_2OH$ . En este tipo de preparaciones la inhibición del sistema de fotólisis del agua o la misma eliminación de éste, va acompañada de una alteración de



## DISCUSIÓN

---

la componente cinética de ns que llega hasta desaparecer, mientras que una nueva componente en la escala de  $\mu\text{s}$  aparece igualmente asociada a la tirosina Z, aunque con nueva cinética 10-20  $\mu\text{s}$  debido a la inhibición o eliminación del sistema de fotólisis del agua (van Best y Mathis, 1978; Conjeaud y Mathis, 1980). Los experimentos realizados previos a la adición de Cu con partículas de fotosistema II tratadas con  $\text{NH}_2\text{OH}$  2mM o lavadas con Tris indicaron que la nueva componente rápida en la escala de 10-20  $\mu\text{s}$  (60%) estaba igualmente asociada a la reducción del  $\text{P680}^+$  por su donador la tirosina Z, mientras que la componente cinética lenta de 120-160  $\mu\text{s}$  (40%) correspondía con la reacción de recombinación entre el  $\text{P680}^+$  y  $\text{Q}_\text{A}^-$  cuando aún permanecía oxidada la tirosina Z.

En nuestros ensayos, cuando el Cu a una concentración 100  $\mu\text{M}$  inhibía totalmente el desprendimiento de oxígeno y la componente de ns desaparecía, la nueva componente cinética rápida de 20-40  $\mu\text{s}$  (30-40%) era muy distinta a la que habíamos obtenido previamente con partículas de fotosistema II tratadas con  $\text{NH}_2\text{OH}$  o lavadas con Tris de 10-20  $\mu\text{s}$  (60%). Una posible explicación de las variaciones en el tanto por ciento y vida media de las respectivas componentes podría ser que el Cu ralentizara aún más la reducción de la tirosina  $\text{Z}^+$  que la  $\text{NH}_2\text{OH}$  o el Tris, pero ello implicaría que esta componente podría tener un tanto por ciento mayor para aquellos casos en los que las partículas de fotosistema II fueran incubadas en oscuridad durante un largo periodo o bien cuando se añadiera al medio un donador artificial



que pudiera reducir más fácilmente a ésta, después de que hubiera sido oxidada por el P680<sup>+</sup>, sin embargo no se observó que en dichas condiciones pudiera incrementarse el tanto por ciento de la componente cinética rápida de  $\mu\text{s}$ . También se estudiaron las posibles diferencias de las componentes cinéticas del cambio de absorción a 830 nm en experimentos donde se iluminaban con una serie de 4 flashes las partículas de fotosistema II control o tratadas con Tris, con la intención de determinar si el Cu podría tener un efecto inhibitorio distinto dependiendo del número de flash; sin embargo, en ambos tipos de preparaciones en presencia de Cu no hubo diferencia alguna en las componentes cinéticas entre el 1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y sucesivos flashes. Un caso distinto fue el encontrado por Conjeaud y Mathis (1980) quienes demostraron a pHs bajos que la contribución de la reducción del P680<sup>+</sup> por la tirosina Z disminuía en el 2<sup>o</sup> flash en favor de la reacción de recombinación, ya que la cinética de reducción del P680<sup>+</sup> por la tirosina Z se ralentizaba con el pH. Nuestros experimentos indicaban que el Cu bloqueaba, más que ralentizar como ocurría con NH<sub>2</sub>OH y Tris, la transferencia electrónica entre la tirosina Z y el P680. Para confirmar éste resultado, se hicieron igualmente las medidas del cambio de absorbancia a 355 nm, correspondientes a las transiciones S del sistema de fotólisis del agua, pudiendo comprobar que, desde la primera transición S<sub>1</sub> → S<sub>2</sub>, el sistema estuvo bloqueado, porque en ningún momento después de cada flash de luz, la tirosina Z había reducido al P680<sup>+</sup>, por lo que se justificaba que no hubiera ninguna



diferencia en cada una de las cuatro transiciones de los estados S y que la caída cinética característica de la transición  $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$  (Renger *et al.*, 1983) no se apreciara. Hay trabajos previos que podrían apoyar dicha hipótesis como los experimentos de espectroscopía de absorción inducida por flash realizados por Ford y Evans (1983) con partículas de fotosistema II tratadas con  $\text{NH}_2\text{OH}$ , en los que observaron que el sistema de fotólisis del agua se bloqueaba con  $\text{NH}_2\text{OH}$  como se ha descrito; sin embargo, cuando el periodo de incubación era más prolongado, la componente cinética rápida, correspondiente a la reducción de la tirosina Z por el  $\text{P680}^+$ , tenía una menor contribución en el incremento de absorbancia a 830 nm debido a que la  $\text{NH}_2\text{OH}$  para periodos muy prolongados de incubación bloqueaba igualmente la reducción de la tirosina Z por el  $\text{P680}^+$ . También, Ghanotakis y Babcock (1983) con un experimento similar en RSE determinaron que la señal II rápida asociada a la tirosina Z era inducida por  $\text{NH}_2\text{OH}$  en partículas de fotosistema II después de que se eliminara nuevamente la  $\text{NH}_2\text{OH}$ ; pero para periodos más prolongados en los que no se eliminaba la señal II rápida desaparecía.

Todos los experimentos sobre cambios de absorción a 830 nm apuntaban a que el Cu bloquearía la transferencia electrónica entre la tirosina Z y el  $\text{P680}^+$ , sin afectar a la separación de cargas entre el  $\text{P680}$  y  $\text{Q}_A$ . La amplitud inicial del cambio de absorción a 830 nm en presencia de  $\text{NH}_2\text{OH}$ , refleja el número de centros de reacción que son capaces de llevar a cabo la separación y estabilización de carga  $\text{P680}^+\text{Q}_A^-$ . En presencia de Cu



100  $\mu\text{M}$  se ha observado que la amplitud es la misma que con  $\text{NH}_2\text{OH}$  2 mM o con partículas de fotosistema II tratadas con Tris, tratamientos, ambos, que no afectan la separación y estabilización de cargas. Sin embargo, algunos autores habían señalado un efecto del Cu sobre el lado aceptor del fotosistema II. Yruela *et al.* (1993) propusieron que el Cu podría bloquear la transferencia electrónica entre feofitina y  $Q_A$  lo que nuestros anteriores datos descartaban. Si ésto ocurriera, la separación de cargas no podría estabilizarse y debería de producirse la reacción de recombinación entre  $\text{P680}^+$  y  $\text{feo}^-$ . Los parámetros cinéticos de dicha reacción son conocidos, Eckert *et al.* (1987) y Hansson *et al.* (1988) determinaron que, en presencia de ditionito, el centro de reacción se encontraría como  $\text{P680-feofitina-}Q_A^-$ , en estas condiciones la reacción de recombinación entre  $\text{P680}^+\text{feo}^-$  y  $\text{P680}^*\text{ feofitina}$  en equilibrio con la antena transcurriría con un periodo de vida media de 500 ps, observando, además, una componente de 3-22 ns (25%). En centros de reacción en los que no hay  $Q_A$  (Danelius *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 1987) determinaron que en la reacción de recombinación entre  $\text{P680}^+\text{feo}^-$  la componente de ns era de 30 ns. Cuando  $Q_A$  estaba doblemente reducido ( $Q_A\text{H}_2$ ) en condiciones de alta intensidad lumínica y en presencia de ditionito, se observó una componente de ns similar a la de centros de reacción mencionados anteriormente. Así que, en cualquiera de los casos si la transferencia entre feofitina y  $Q_A$  hubiera estado bloqueada por Cu deberíamos haber esperado una reacción de recombinación entre



## DISCUSIÓN

---

P680<sup>+</sup> y feo<sup>-</sup> de un orden de ns; ello no nos hubiera permitido determinar a 830 nm un incremento de absorbancia como el obtenido dentro de la escala de  $\mu$ s al igual que como sucede con NH<sub>2</sub>OH o Tris que no afectan la separación de cargas P680<sup>+</sup>feoQ<sub>A</sub><sup>-</sup> (Conjeaud y Mathis, 1980; van Best y Mathis, 1978).

Los resultados obtenidos a 325 nm en los que la amplitud de los cambios de absorción indican la cantidad de Q<sub>A</sub> reducido después de cada flash mostraron similares incrementos de absorbancia tanto para las muestras control como para las inhibidas parcial o totalmente con Cu 25  $\mu$ M o 100  $\mu$ M demostrándose nuevamente que la separación de cargas no estaba afectada ni la consiguiente reducción de Q<sub>A</sub>. Si la componente la cinética lenta de 120-160  $\mu$ s (60-70%) observada a 830 nm en presencia de Cu correspondiera únicamente a la reacción de recombinación entre P680<sup>+</sup> y Q<sub>A</sub><sup>-</sup>, deberíamos esperar igualmente que en los cambios de absorción a 325 nm dicha componente se pudiera igualmente apreciar, sin embargo sólo un 35-40% del incremento de absorbancia a 325 nm está comprendido entre 250-300  $\mu$ s. Esta discrepancia podría explicarse basándonos en el hecho de que en las muestras tratadas con Cu, en las que la tirosina Z estaría bloqueada, un nuevo donador podría reducir al P680<sup>+</sup> con un tiempo de vida media de 200-400  $\mu$ s. La componente de 250 a 300  $\mu$ s del incremento de absorbancia a 325 nm podría reflejar la reacción de recombinación entre P680<sup>+</sup> y Q<sub>A</sub><sup>-</sup> en presencia de Cu y el P680<sup>+</sup> podría decaer más rápidamente (140  $\mu$ s) por dicho nuevo donador adicional. El que la reacción de recombinación en las muestras



tratadas con Cu fuera más lenta podría deberse al hecho de que la tirosina Z no se hubiera oxidado (a diferencia de las muestras tratadas con Tris o  $\text{NH}_2\text{OH}$  donde si es posible) por lo que no habría interacción electrostática entre la tirosina  $\text{Z}^+$  y  $\text{P680}^+\text{Q}_\text{A}^-$  que acelerara la reacción de recombinación. Similar ralentización de la reducción del  $\text{P680}^+$  obtuvieron Ford y Evans (1983) cuando iluminaron partículas de fotosistema II tratadas durante un largo periodo con  $\text{NH}_2\text{OH}$  para inhibir la reducción del  $\text{P680}^+$  por la tirosina Z.

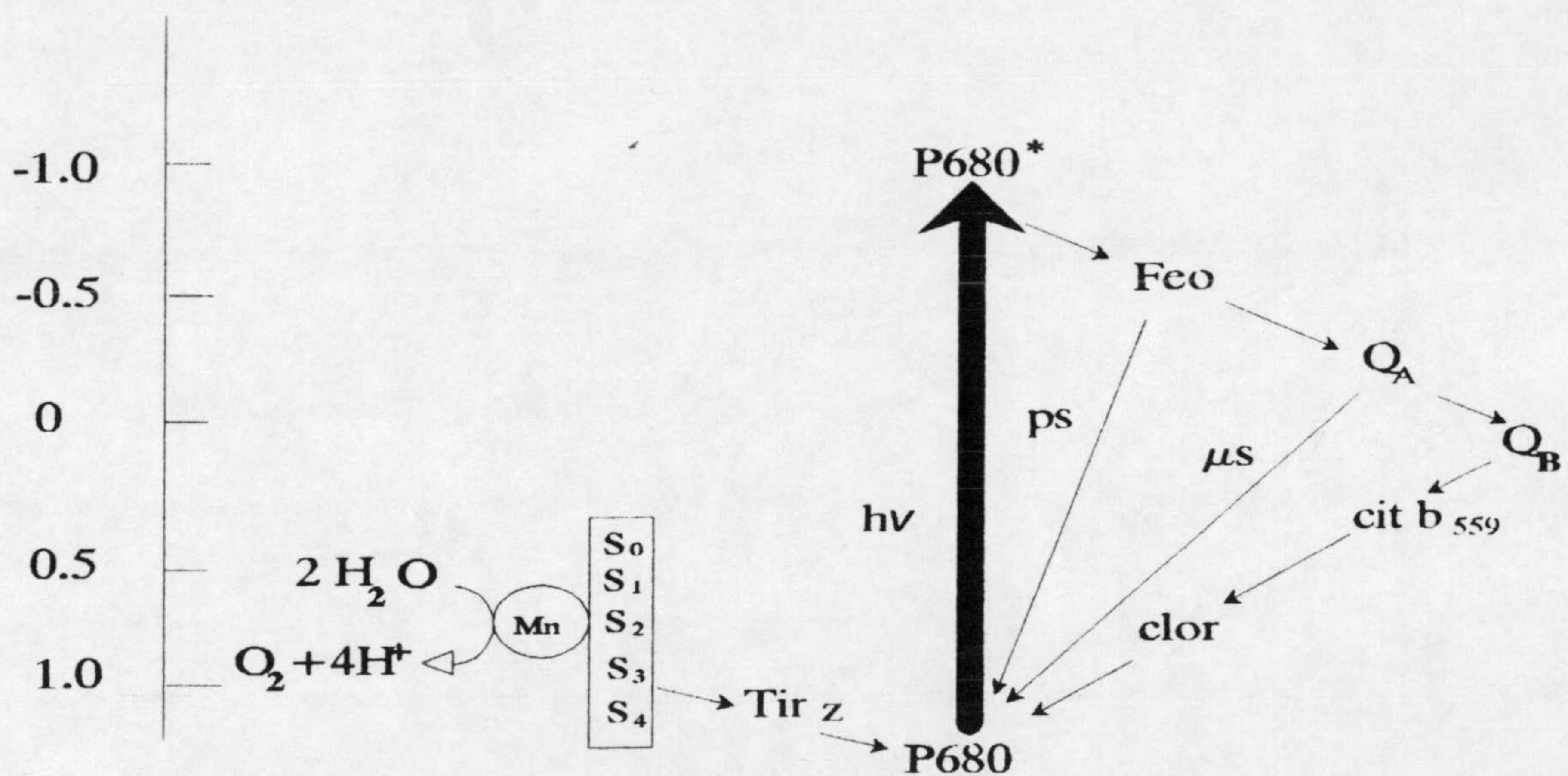


Figura 31. Esquema Z del transporte electrónico de fotosistema en el que se detalla el transporte electrónico desde el complejo de iones de Mn hasta la quinona  $\text{Q}_\text{B}$  y las posibles reacciones de recombinación del  $\text{P680}^+$  con los componentes electrónicos del lado aceptor del fotosistema II feofitina (feo), las



## DISCUSIÓN

---

Saber si realmente un nuevo donador podría ser inducido en condiciones de toxicidad por Cu capaz de reducir al P680<sup>+</sup> era el nuevo reto que nos propusimos para abordar los estudios por resonancia de spin electrónico. Los resultados de RSE pusieron de manifiesto que la señal rápida en partículas de fotosistema II lavadas con Tris en presencia de Cu estaba inhibida y, como consecuencia, un nuevo radical con un valor de  $g=2.00273$ , anchura de banda de 9.7 Gauss y un tiempo de vida media de 200-500 ms aparecía. De acuerdo a dichos parámetros, según Miller y Brudvig (1991), éste podría ser un radical de clorofila, pero no el centro de reacción P680<sup>+</sup> que tiene una anchura de banda de 8 Gauss y que para nuestras condiciones de trabajo y por la adición de Cu tendría un tiempo de vida media de muy inferior (120-160  $\mu$ s 60-70%), por lo que en RSE no hubiera dado lugar a que pudiéramos observar su espectro. De Paula *et al.* (1985) estudiaron la reducción del P680<sup>+</sup> por diferentes donadores electrónicos para temperaturas comprendidas entre 77 y 200 K. Para temperaturas próximas a 77 K, el sistema de fotólisis del agua estaría bloqueado por lo que sería imposible la transición  $S_1 \rightarrow S_2$ , registrándose entonces la señal de un radical de clorofila con las características de  $g=2.0024$  y una anchura de banda de 10 Gauss, junto con la señal del citocromo b-559 oxidado. Cuando la temperatura subía hasta 200 K el sistema de fotólisis dejaba de estar inhibido y la señal del radical progresivamente desaparecía. Estos autores propusieron que el citocromo b-559 podría ser oxidado por el P680<sup>+</sup> via dicho radical



de clorofila en condiciones en las cuales el sistema de fotólisis del agua estuviera inhibido.

Los resultados que hemos obtenido con Cu indican, que desde temperatura ambiente hasta 200 K donde no habría otros factores que pudieran inhibir al sistema de fotólisis del agua, el radical de clorofila es inducido, debido a que el P680<sup>+</sup> no puede ser reducido por la tirosina Z con el transporte electrónico fisiológico propio desde el sistema de fotólisis del agua, como demuestra el hecho de que no pueda observarse a temperatura ambiente la señal de la tirosina Z en partículas lavadas con Tris o la señal múltiple del estado S<sub>2</sub> en BBY iluminadas a 200 K. Igualmente hemos observado que el radical de clorofila que se induce a 77 K descrito por de Paula *et al.* (1985) en ausencia de Cu tiene características espectrales muy similares al que detectamos a 200 K en presencia de Cu, donde el metal y no la temperatura induce dicho radical. De modo que, no sólo en condiciones en las que el sistema de fotólisis del agua está inhibido por bajas temperaturas, sino que también en presencia de inhibidores como el Cu, puede inducirse un transporte electrónico no fisiológico en el fotosistema II en el que están involucrados el citocromo b-559 y un radical de clorofila. La diferencia observada entre la inhibición originada a 77 K (de Paula *et al.*, 1985) y la creada por el Cu tóxico reside en el citocromo b-559. El espectro del citocromo b-559 en ausencia de Cu a 77 K después de iluminar la muestra, se caracterizó porque la forma de alto potencial (g=3.08) estaba oxidada



## DISCUSIÓN

---

correspondiendo con los 2/3 del espectro del citocromo b-559 totalmente oxidado. Sin embargo, en presencia de Cu, el citocromo b-559 es oxidado en oscuridad totalmente en su forma de bajo potencial ( $g=2.96$ ), por lo que no hay posibilidad alguna de que se pudiera fotoinducir el citocromo b-559 de alto potencial. La diferencia causada por Cu es de un gran interés ya que el hecho de que el citocromo b-559 esté de una u otra forma podría justificar la formación de un ciclo alrededor del fotosistema II. El citocromo b-559 es un componente del fotosistema II que ha suscitado múltiples discusiones sobre su posible función. Es sobradamente conocido que el citocromo b-559 en partículas de fotosistema II a temperatura ambiente y pH 7.5 se encuentra en 2/3 como citocromo b-559 de alto potencial en su estado reducido y protonado mientras que 1/3 restante se encuentra en su forma de bajo potencial en un estado oxidado y desprotonado (Ortega *et al.*, 1988). La posibilidad de que el citocromo b-559 interviniera en un transporte electrónico cíclico en el fotosistema II como mecanismo de protección para prevenir la fotoinhibición de los centros de reacción (Heber *et al.*, 1979; Folkowski *et al.*, 1986; Thomson y Brudvig, 1988; Lapointe *et al.*, 1993; Buser *et al.*, 1992) ha sido de especial interés para los presentes estudios. Sin embargo, no vamos a entrar en debate sobre sus otras posibles funciones como mediador en el transporte electrónico entre el fotosistema II y I (Ortega *et al.*, 1989), ni como bomba protónica (Arnon y Tang, 1988).



Miller y Brudvig (1990) utilizando partículas de fotosistema II tratadas con  $\text{NH}_2\text{OH}$  para inhibir el sistema de fotólisis del agua, sin que por ello se afectara el estado de oxidación del citocromo b-559, pudieron determinar después de un periodo de iluminación a 215 K la fracción del citocromo oxidado (0.54) y la fracción del radical de clorofila junto con la tirosina D oxidada después de la iluminación (0.37), mientras que en partículas lavadas con Tris el radical de clorofila conjuntamente con la tirosina D oxidada después de la iluminación fue 0.9, dado que el citocromo b-559 se había oxidado por el tratamiento con Tris y era incapaz de donar los electrones al radical de clorofila. Cuando el tratamiento lo hicimos con Cu, el citocromo b-559 de bajo potencial se oxidó totalmente, por lo que en nuestras condiciones de trabajo el radical de clorofila se indujo 0.75 después de un periodo de iluminación a 200 K. Los resultados indicaron que el radical de clorofila se induciría aún más siempre que el citocromo b-559 estuviera oxidado. Thompson y Brudvig (1988) sugirieron un transporte electrónico entre el citocromo b-559 y el P680 a través de dicho radical de clorofila cuyo potencial reductor es  $E_{m_{\text{pH } 7}} = 0.780 \text{ mV}$ . El poder oxidante del  $\text{P680}^+$  ( $E_m = 1.1 \text{ V}$ ) es tal que podría oxidar una molécula de clorofila próxima al centro de reacción que posteriormente se regeneraría cuando el citocromo b-559 pudiera nuevamente reducirla. Falkowski *et al.* (1986) propusieron que el ciclo podría funcionar en condiciones de altas intensidades de luz para preveer un daño fotoinhibitorio. Thompson y Brudvig (1988)



## DISCUSIÓN

---

explicaron que el radical de clorofila desconectaría la antena del centro de reacción evitando que la energía fotónica llegara hasta el P680 evitando que el  $P680^+$  pudiera dañar de una forma irreversible al fotosistema II, oxidando cualquier otra molécula o aminoácido de las proximidades. Cuando en el medio hubiera Cu, éste bloquearía el transporte electrónico fisiológico desde el lado donador del fotosistema II, induciendo la oxidación del radical de clorofila que tal y como proponen los anteriores autores podría evitar que un exceso de energía llegara hasta el centro de reacción. Ellos mismos indican la existencia de un ciclo electrónico alrededor del fotosistema II cuando el sistema de fotólisis del agua está dañado para regenerar el citocromo b-559 y poder preservar el fotosistema II durante un periodo prolongado de iluminación.

Se ha sugerido que las quinonas  $Q_A$  ,  $Q_B$  o pool de quinonas pudieran ser eslabones del ciclo y pudieran reducir al citocromo b-559. Thompson y Brudvig (1988), y Arnon y Tang (1988) propusieron que podría ser el pool de quinonas responsable de la reducción del citocromo b-559 durante dicho ciclo. Samson y Fork (1991) creían que tanto  $Q_B$  como  $Q_A$  podrían reducir al citocromo b-559 de alto potencial, ya que en condiciones en las que se utilizaba el DCMU para inhibir el transporte electrónico entre  $Q_A$  y  $Q_B$ , el citocromo b-559 aún podía ser reducido. Buser *et al.* (1992) llegaron a observar que, en condiciones en las que el pool de quinonas o  $Q_A$  estaban reducidos, el citocromo b-559 no podía ser reducido si en el sitio  $Q_B$  había DCMU sugiriendo en base



aconsideraciones termodinámicas que el par  $Q_B/Q_B^-$  ( $E_{m_{pH\ 7}} = -45$  mV) y  $Q_B/Q_BH_2$  ( $E_{m_{pH\ 7}} = +255$  mV) podrían reducir al citocromo de alto potencial ( $E_{m_{pH-ind.}} = +380$  mV), mientras el par  $Q_B^-/Q_BH_2$  únicamente lo podría hacer a altos pHs ( $E_{m_{pH\ 8.5}} = +170$  mV) mientras que a bajos pHs no podría ( $E_{m_{pH\ 4.5}} = +420$  mV). Barabás *et al.* (1993) coincidieron con Buser *et al.* (1992) en que la semiquinona  $Q_B^-$  podría reducir al citocromo de alto potencial.

El espectro del citocromo b-559 en oscuridad en presencia de Cu mostraba que estaba oxidado totalmente en su forma de bajo potencial, caracterizándose porque ésta es la forma más inactiva del fotosistema II, a diferencia de lo que sucede con la forma de alto potencial que es la forma fotoactiva que participa en el ciclo electrónico a lo largo del fotosistema II. El hecho de que el Cu indujera la formación del citocromo b-559 de bajo potencial implicaría que el funcionamiento del ciclo tal y como han descrito los autores mencionados, no podría funcionar con el citocromo b-559 de alto potencial, pero al tener el citocromo de bajo potencial un potencial oxido reductor  $E_{m_{pH\ 6}} = +240$  mV (Ortega *et al.*, 1988), aún el par  $Q_B/Q_B^-$  o  $Q_A/Q_A^-$  podría reducir el citocromo b-559 de bajo potencial. Cuando a temperatura ambiente en el medio había  $K_3[Fe(CN)_6]$  en partículas de fotosistema II tratadas con Tris, el radical, que en ausencia de este aceptor se inducía 0.75, llegaba a inducirse totalmente (100%) como consecuencia de que el  $K_3[Fe(CN)_6]$  ( $E_m = +430$  mV) mantenía oxidado al citocromo b-559, además de que éste al actuar como un aceptor electrónico permitiría que hubiera un flujo electrónico



## DISCUSIÓN

---

hacia fuera del fotosistema II, por lo que dicho radical podría inducirse aún más, porque no se reduciría tan fácilmente por las quinonas. El DCMU impide que el citocromo b-559 se oxide por  $Q_B$  al estar unido al sitio  $Q_B$ , sin embargo se observó que el radical de clorofila se inducía en un 0.55 en partículas de fotosistema II tratadas con Tris, por lo que parecía suceder que el citocromo b-559 podría ser reducido por  $Q_A$  bajo dichas condiciones, al igual que como propusieron Samson y Fork (1991).

Al igual que en las medidas polarográficas de desprendimiento de oxígeno se estudió si el Cu tenía un efecto irreversible dependiente de la luz sobre la actividad del fotosistema II. Los experimentos realizados a temperatura ambiente indicaron que, después de la adición de Cu y la eliminación de éste con EDTA 5 mM, en oscuridad en partículas de fotosistema II lavadas con Tris, la señal II rápida aparecía sin que se hubiera observado variación alguna con respecto al espectro previo de dichas partículas en ausencia de Cu. Sin embargo, cuando las partículas de fotosistema II lavadas con Tris y tratadas con Cu fueron iluminadas previamente a la eliminación del Cu con EDTA, llegando a asegurar por RSE que no había señal de dicho metal, se volvió a observar nuevamente el radical de clorofila y la desaparición de la señal II rápida. Estos resultados corroboraban los de las medidas polarográficas de desprendimiento de oxígeno, indicando que el Cu ejercía su efecto únicamente en presencia de luz y que éste sería irreversible después de un periodo de iluminación a temperatura ambiente o



incluso después de una única separación de carga llevada a cabo a 200 K. El Cu además habría transformado en oscuridad al citocromo b-559 de alto potencial reducido en citocromo b-559 de bajo potencial oxidado. Si el Cu era eliminado previamente a la iluminación, el citocromo b-559 podría volver a convertirse en citocromo b-559 de alto potencial reducido por el transporte electrónico desde el sistema de fotólisis del agua no observándose el radical de clorofila; sin embargo cuando el Cu era eliminado después de una iluminación previa, se mantenía la situación en la que la tirosina Z había perdido su función y el citocromo b-559 de bajo potencial permanecía oxidado, así que el radical de clorofila volvería a inducirse incluso después de haber eliminado el Cu. En presencia de Cu el ciclo podría funcionar, aunque menos eficientemente probablemente dado la diferencia que hay en los potenciales reductores de ambos citocromos (citocromo b-559 de bajo potencial  $E_{m_{pH\ 6}} = +240$  mV y citocromo b-559 de alto potencial  $E_{m_{pH-ind}} = +380$  mV).

También nos planteamos confirmar por experimentos de RSE que el Cu no había tenido un efecto sobre la separación de carga  $P680^+Q_A^-$  lo que habíamos visto por espectroscopía de absorción tanto a 830 nm como a 325 nm; para ello se estudió el espectro de  $Fe^{+2}Q_A^-$ . La señal se estudió sobre aquellas muestras que habían sido tratadas con Cu en luz y posteriormente había sido eliminado con EDTA, porque la cuantificación de la señal del espectro se haría posteriormente añadiendo en oscuridad ditionito para reducir todo  $Q_A$  y el hecho de que el ditionito redujera al Cu en



## DISCUSIÓN

---

las preparaciones podría generar un artefacto que enmascara al espectro de  $\text{Fe}^{+2}\text{Q}_\text{A}^-$ . Era de gran interés poder observar dicha señal por RSE, ya que Eggers y Vermaas (1992) pudieron demostrar que la mutación de la His268 de la proteína D2 a la que está ligada el  $\text{Fe}^{+2}$  no hemínico por Gln no impedía que  $\text{Q}_\text{A}$  pudiera reducirse, aunque no pudieron observar la señal característica de  $\text{Fe}^{+2}\text{Q}_\text{A}^-$  y, en nuestro caso, si el Cu pudiera unirse en un complejo con algunas de las histidinas a las que el  $\text{Fe}^{+2}$  está ligado, como habían señalado algunos autores, podría dilucidarse si en nuestras condiciones no observaríamos dicha señal. El hecho de que el espectro de  $\text{Fe}^{+2}\text{Q}_\text{A}^-$  se observara en estas muestras, comprobando previamente que el radical de clorofila había sido inducido también, nos demostraba que la separación de carga  $\text{P680}^+\text{Q}_\text{A}^-$  no había sido afectada por Cu ni tampoco que el Cu hubiera tenido algún efecto adicional sobre el  $\text{Fe}^{+2}$  no-hemínico ya que la pérdida de dicho hierro hubiera dado lugar a una señal distinta de RSE asociada a  $\text{Q}_\text{A}^-$  cuando no se encuentra dicho catión de hierro (Miller y Brudvig, 1991). Mohanty *et al.* (1989) sugirieron que el Cu podría interaccionar con el  $\text{Fe}^{+2}$  no-hemínico alterando el transporte electrónico entre  $\text{Q}_\text{A}$  y  $\text{Q}_\text{B}$ , sin embargo nosotros al igual que Yruela *et al.* (1991) no observamos variaciones en los espectros de  $\text{Fe}^{+2}\text{Q}_\text{A}^-$ .



**CONCLUSIONES**



1. Se ha modificado el método de preparación de partículas de fotosistema II, obteniendo una nueva preparación que hemos denominado BBY<sub>s</sub>-, más purificada en la que se ha eliminado almidón, restos nucleares (histonas y ácidos nucleicos) y metales no ligados específicamente a este fotosistema II como el Cu.

2. El Cu detectado en la preparación de fotosistema II más universalmente utilizadas, BBY, procede de una contaminación nuclear, por lo que el Cu detectado en dichas preparaciones no es un constituyente del fotosistema II, aunque puede tener un efecto indirecto sobre la actividad de este fotosistema modificando su composición proteica, pigmentaria y lipídica.

3. El efecto tóxico causado por Cu sobre el fotosistema II se produce principalmente sobre el lado donador de dicho fotosistema bloqueando la transferencia electrónica entre la tirosina Z y el centro de reacción P680, siendo el daño dependiente de la luz e irreversible.

4. Como consecuencia del efecto inhibitor del Cu sobre éste fotosistema, un nuevo donador electrónico, cuya naturaleza es la de un radical de clorofila, es oxidado por el centro de reacción, P680; participando dicho radical en un transporte electrónico cíclico en torno al fotosistema II en el que nuevamente sería reducido por las plastoquinonas del lado aceptor de dicho fotosistema a través del citocromo b-559. Sin embargo, el hecho



## CONCLUSIONES

---

de que el Cu indujera la oxidación del citocromo b-559 de bajo potencial provocaría que este ciclo no funcionara eficientemente, causando, por ello, la pérdida final de la actividad de este fotosistema.



**BIBLIOGRAFÍA**



Åkerlund, H. E., Jansson, C. and Andersson, B. Reconstitution of photosynthetic water splitting in inside-out thylakoid vesicles and identification of a participating polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta*; 1982; 681: 1-10.

Alt, J., Morris, P., Westhof, P. and Hermann, R. G. Nucleotide sequence of the clustered genes for the 44 kDa chlorophyll a apoprotein and "32 kDa-like" protein of the photosystem II reaction centre in the spinach plastid chromosome. *Curr. Genet.*; 1984; 8: 597-606.

Anderson, J. M., Waldron, J. C. and Thorne, S. W. Chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids. Spectral characteristics of six complexes resolved by an improved electrophoretic procedure. *FEBS Lett.*; 1978; 92: 227-233.

Anderson, J. M. and Andersson, B. The dynamic photosynthetic membrane and regulation of energy conversion. *TIBS*; 1988; 13: 351-355.

Anderson, J. M., Boardman, N. K. and David, D. J. Trace metal composition of fractions obtained by digitonin fragmentation of spinach chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 1964; 17: 685-690.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Andersson, B., Larsson, C., Ljungberg, U. and Åkerlund, H. E. Immunological studies on the organization of proteins in photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta*; 1984; 766: 21-28.

Andersson, B. and Anderson, J. M. Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll protein complex of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*; 1980; 593: 427-440.

Andersson, B., Critchley, C., Ryrie, I. J., Jansson, C., Larsson, and C. Anderson J. M. Modification of the chloride requirement for photosynthetic O<sub>2</sub> evolution. The role of the 23kDa polypeptide. *FEBS Lett.*; 1984; 168: 113-112.

Andersson, B. and Åkerlund, H. E. Proteins of the oxygen complex. In: *Topics in Photosynthesis, Vol. 8* (J. Barber, ed.); 1987: pp. 379-420. Elsevier, Amsterdam.

Andreasson, E., Svensson, P., Weibull, C. and Albertsson, P. Å. Separation and characterization of stroma and grana evidence for heterogeneity in antenna size of both photosystem I and photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*; 1988; 936: 339-350.



Andreasson, L. E. Is nitrogen liganded to manganese in the photosynthetic oxygen evolving system?. *Biochim. Biophys. Acta*; 1989; 973: 465-467.

Arnon, D. I. and Tang, G. M. S. Cytochrome b-559 and proton conductance in oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1988; 85: 9524-9528.

Arvidsson, P. O., Bratt, C. E., Andreasson, L. E. and Åkerlund, H. E. The 28 kDa apoprotein of CP 26 in PS II binds copper. *Photosynth. Res.*; 1993; 37: 217-225.

Arvidsson, P. O., Bratt, C. E., Andreasson, L. E., Åkerlund, H. E. Copper present in PSII is associated with CP26. In: *Research in Photosynthesis, Vol. 1* (N. Murata, ed.); 1992: pp. 235-238. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Babcock, G. T. and Sauer, K. Electron paramagnetic resonance signal II in spinach chloroplasts: I. Kinetic analysis for untreated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*; 1973; 325: 483-503.

Babcock, G. T. The photosynthetic oxygen-evolving process. In: *Photosynthesis* (J. Amesz, ed.); 1987: pp. 125-158. Elsevier, Amsterdam.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Baker, N. R. and Horton, P. Chlorophyll fluorescence quenching during photoinhibition. In: Photoinhibition (D. J. Kyle, C. B. Osmond and C. J. Arntzen, eds.); 1988: pp. 145-168. Elsevier, Amsterdam.

Barabás, K., Kravcova, T. and Garab, G. Flash-induced reduction of cytochrome b-559 by  $Q_B$  in chloroplast in the presence of protonophores. *Photosynth. Res.*; 1993; 36: 59-64.

Barbato, R., Rigoni, F., Giardi, M. T. and Giacometti G. M. The minor antenna complexes of an oxygen evolving photosystem II preparation: purification and stoichiometry. *FEBS Lett.*; 1989; 251: 147-154.

Barber, J., Chapman, D. J. and Telfer, A. Characterisation of a PS II reaction centre isolated from the chloroplasts of *Pisum sativum*. *FEBS Lett.*; 1987; 220: 67-73.

Barker, A. V. Nutritional factors in photosynthesis of higher plants. *J. Plant Nutr.*; 1979; 1: 309-347.

Barón, M. and Sandmann, G. Activities of Cu-containing proteins in Cu-depleted pea leaves. *Physiol. Plant.*; 1988; 72: 801- 806.



Barón, M., López Gorgé, J., Lachica, M. and Sandmann, G. Changes in carotenoids and fatty acids in PSII of Cu-deficient plants. *Physiol. Plant.*; 1992; 84: 1-5.

Barr, R., and Crane, F. L. Organization of electron transport in photosystem II of spinach chloroplasts according to chelator inhibition sites. *Plant. Physiol.*; 1976; 57: 450-453.

Barry, B. A. The role of redox-active amino acids in the photosynthetic water-oxidizing complex. *Photochem. Photobiol.*; 1993; 57: 179-188.

Barry, B. A. and Babcock, G. T. Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen-evolution system. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1987; 84: 7099-7103.

Bassi, R., Hoyer-Hansen, G., Barbato, R., Giacometti, G. M. and Simpson, D. J. Chlorophyll-proteins of the photosystem II antenna system. *J. Biol. Chem.*; 1987; 262: 13333-13341.

Bassi, R., Rigoni F. and Giacometti, M. G. Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae. *Photochem. Photobiol.*; 1990; 52: 1187-1206.

Bassi, R. and Dainese, P. The role of light harvesting complex II and of the minor chlorophyll a/b proteins in the organization

---



## BIBLIOGRAFÍA

---

of the photosystem II antenna system. *Prog. Photosyn. Res.*; 1989; 2: 209-216.

Baszynski, T., Tukendorf, A., Ruszkowska, M., Skorzynska, E. and Maksymiec, W. Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. *J. Plant Physiol.*; 1988; 132: 708-713.

Baszynski, T., Ruszkowska, M., Krol, M., Tukendorf, A. and Volinska, D. Effect of copper deficiency on photosynthetic apparatus of higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.*; 1978; 78: 207-216.

Beck, W. F. and Brudvig, G. W. Binding of amines to the oxygen-evolving center of photosystem II. *Biochemistry*; 1986; 25: 6479-6486.

Ben-Hayyim, G., and Neumann, J. On the mechanism of action of silimolybdic acid in chloroplasts. *FEBS Lett.*; 1975; 56: 240-243.

Bennett, J. Chloroplast protein phosphorylation and the regulation of photosynthesis. *Physiol. Plant.*; 1984; 60: 583-590.



Bennoun, P. Reoxidation of the fluorescence quencher "Q" in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea. *Biochim. Biophys. Acta*; 1970; 216: 357-363.

Berthold, D. A., Babcock, G. T. and Yocum, C. A. A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett.*; 1981; 134: 231-234.

Blankenship, R. E., Babcock, G. T., Warden, J. T. and Sauer, K. Observation of a new EPR transient in chloroplasts that may reflect the electron donor to photosystem II at room temperature. *FEBS Lett.*; 1975; 51: 287-293.

Boerner, R. J. and Barry, B. A. Isotopic labeling and EPR spectroscopy show that a tyrosine residue is the terminal electron donor, Z, in manganese-depleted photosystem II preparations. *J. Biol. Chem.*; 1993; 23: 17151-17154.

Böger, P. Replacement of photosynthetic electron transport inhibitors by silicomolybdate. *Physiol. Plant.*; 1982; 54: 221-224.

Bohner, H., Böhme, H. and Böger, P. Reciprocal formation of plastocyanin and cytochrome c-553 and the influence of cupric



## BIBLIOGRAFÍA

---

ions on photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta*; 1980; 592: 103-112.

Bottomley, W. Spencer, D. and Whitfeld, P. R. Protein synthesis in isolated spinach chloroplasts. Comparison of light driven and ATP driven synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*; 1974; 164: 106-117.

Bottrill, D. E., Possingham, J. V. and Kriedemann, P. E. The effect of nutrient deficiencies on photosynthesis and respiration in spinach. *Plant Soil*; 1970; 32: 424-438.

Bouges-Bocquet, B. Electron transfer between the two photosystems in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*; 1973; 314: 250-254.

Boussac, A. and Etienne, A. L. *Biochem. Biophys. Commun.*; 1982; 109: 1200-1205.

Boussac, A. and Rutherford, A. W.  $\text{Ca}^{+2}$  binding to the oxygen evolving enzyme varies with the redox state of the Mn cluster. *FEBS Lett.*; 1988; 236: 432-436.

Boussac, A., Zimmermann, J. L. and Rutherford, A. W. EPR signals from modified charge accumulation states of the oxygen- evolving



enzyme in calcium-deficient photosystem II. *Biochemistry*; 1989; 28: 8948-8989.

Boussac, A., Zimmermann, J. L., Rutherford, W. A. and Lavergne, J. Histidine oxidation in the oxygen-evolving photosystem-II enzyme. *Nature*; 1990; 347: 303-306.

Boussac, A., Rutherford, A. W. and Styring, S. Interaction of ammonia with the water splitting enzyme of photosystem II. *Biochemistry*; 1990; 29: 24-32.

Bowlby, N. R., Ghanotakis, D. T., Yocum, C. F., Petersen, J. and Babcock, G. T. In: *Light Energy Transduction in Photosynthesis: Higher Plants and Bacterial Models* (S. E. Stevens and D. A. Bryant, eds.); 1988: p. 215. American Society of Plant Physiologists.

Brettel, K., Schlodder, E. and Witt, H. T. Nanosecond reduction kinetics of photooxidized chlorophyll-a II (P-680) in single flashes as a probe for the electron pathway, H<sup>+</sup> release and charge accumulation in the O<sub>2</sub>-evolving complex. *Biochim. Biophys. Acta*; 1984; 766: 403-415.

Bricker, T. M., Odom, W. R. and Queirolo, C. B. Close association of the 33 kDa extrinsic protein with the apoprotein of CPaI in photosystem II. *FEBS Lett.*; 1988; 231: 111-117.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Bricker, T. M. The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in Photosystem II. *Photosyn. Res.*; 1990; 24: 1-13.

Brudvig, G. W. and de paula, J. C. In: *Progress in Photosynthesis Research, Vol. 1* (J. Biggins, ed.); 1987: pp. 491-498. Martinus Nijhoff, Dordrecht.

Burghaus, O., De Rose, V. J., Liang, W., Yachandra, V. K. and Klein, M. P. Modeling manganese EPR signals of the oxygen evolving complex: structures, oxidation states and ligands. In: *Research in Photosynthesis, Vol. 2* (N. Murata, ed.); 1992: pp. 109-113. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Burnap, R. L. and Sherman, L. Deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC6803 indicates that the manganese-stabilizing protein of photosystem II is not essential for oxygen evolution. *Biochemistry*; 1991; 30: 440-446.

Burnap, R. L., Shen, J. R., Jursinic, P. A., Inoue, Y. and Sherman L. A. Oxygen yield and thermoluminescence characteristics of a cyanobacterium lacking the manganese-stabilizing protein of photosystem II. *Biochemistry*; 1992; 31: 7404-7410.

Buser, A. C., Diner, A. B. and Brudvig, W. G. Reevaluation of the stoichiometry of cytochrome b559 in photosystem II and thylakoid membranes. *Biochemistry*; 1992; 31: 11441-11448.



Buser, C. A., Diner, B. A. and Brudvig, G. W. Photooxidation of cytochrome b-559 in oxygen-evolving photosystem II. *Biochemistry*; 1992; 31: 11449-11459.

Butler, W. L. Primary nature of fluorescence yield changes associated with photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1972; 69: 3420-3422.

C.I.I. (Comité Inter-Instituts d'Etude des Techniques Analytiques de Diagnostic Foliaire). Methodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. *Oléagineux*; 1969; 24: 497-504.

Canaani, O. and Havaux, M. Evidence for a biological role in photosynthesis for cytochrome b-559 as component of photosystem II reaction center. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1990; 87: 9295-9299.

Casimiro, A., Barroso, J. and Pais, M. S. Effect of copper deficiency on photosynthetic electron transport in wheat plants. *Physiol. Plant.*; 1990; 79: 459-464.

Cedeño-Maldonado, A. and Swader, J. A. The cupric ion as an inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.*; 1972; 50: 698-701.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Cheniae, G. M. and Martin, I. F. Sites of function of manganese within photosystem II. Roles in oxygen evolution system. *Biochim. Biophys. Acta*; 1970; 197: 219-239.

Chisholm, D. and Williams, G. K. Nucleotide sequence of psbC, the gene encoding the CP43 chlorophyll a-binding protein of Photosystem II, in cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant. Mol. Biol.*; 1988; 10: 293-301.

Chitnis, P. R. and Thornber, J. P. The major light-harvesting complex of photosystem II: Aspects of its molecular and cell biology. *Photosynth. Res.*; 1988; 16: 41-63.

Chua, N. H and Gillham, N. W. The sites of synthesis off the principal thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.*; 1977; 74: 441-452.

Conjeaud, H. and Mathis, P. The effect of pH on the reduction kinetics of P-680 in Tris-treated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*; 1980; 590: 353-369.

Cramer, W. A., Furbacher, P. N., Szczepaniak, A. and Tae, G. S. The chloroplast b cytochromes: crosslinks, topography and functions. In: *Current Research in photosynthesis*, Vol. 3 (M.



Baltscheffsky, ed.); 1990; pp. 221-230. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Critchley, C. The role of chloride in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*; 1985; 811: 33-46.

Crofts, A. R. and Wraight, C. A. The electrochemical domain of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*; 1983; 726: 149-185.

Crofts, A. R., Robinson, H. H. and Snozzi, M. Reactions of quinol at catalytic sites; a diffusional role in H-transfer. In: *Advances in Photosynthesis Research, Vol. 1* (C. Syybesma, ed.); 1984: pp. 461-468. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, The Hague.

Dainese, P., Marquardt, J., Pineau, B. and Bassi, R. Identification of violaxanthin and zeaxanthin binding proteins in maize photosystem II. In: *Research in Photosynthesis, Vol. 1* (N. Murata, ed.); 1992: pp. 287-290. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Danielius, R. V., Satoh, K., van Kan, P. J. M., Plijter, J. J., Nuijs, A. M. and van Gorkom, H. J. The primary reaction of photosystem II in the D1-D2-cytochrome b-559 complex. *FEBS Lett.*; 1987; 213: 241-244.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Davis, D. J. and Gross, E. L. Protein-protein interactions of light-harvesting and pigment protein from spinach chloroplasts. 1.  $\text{Ca}^{+2}$  binding and its relation to protein association. *Biochem. Biophys. Acta*; 1975; 387: 557-567.

de Paula, C. J., Innes, B. J. and Brudvig, W. G. Electron transfer in photosystem II at cryogenic temperatures. *Biochemistry*; 1985; 24: 8114-8120.

de Paula, J. C., Beck, W. F. and Brudvig, G. W. Magnetic properties of manganese in the photosynthetic  $\text{O}_2$  evolving complex. 2. Evidence for a manganese tetramer. *J. Am. Chem. Soc.*; 1986; 108: 4002-4009.

de Vitry, C., Wollmann, F. A. and Delepelaire, P. Function of the polypeptides of the Photosystem II reaction center in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta*; 1984; 767: 415-422.

de Vitry, C., Olive, J., Drapier, D., Recouvreur, M. and Wollman, F. A. Posttranslational events leading to the assembly of photosystem II protein complex: a study using photosynthesis mutants of *chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.*; 1989; 109: 991-1006.



Debus, J. R. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta*; 1992; 1102: 269- 352.

Debus, R. J., Barry, B. A., Sithole, I., Babcock, G. T. and McIntosh, L. Directed mutagenesis indicates that the donor to P680+ in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. *Biochemistry*; 1988; 27: 9071-9074.

Debus, R. J., Barry, B. A., Babcock, G. T. and McIntosh, L. Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1988; 85: 427-430.

Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. and Michel, H. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* centre at 3 Å resolution. *Nature*; 1985; 318: 618-624.

Dekker, J. P., van Gorkom, H. J. and Ouwehand, L. Absorbance difference spectra of the successive redox states of the oxygen-evolving apparatus of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*; 1984; 767: 1-9.

Dekker, J. P., Ghanotakis, D. F., Plijter, J. J., van Gorkom, H. J. and Babcock, G. T. Kinetics of the oxygen-evolving complex in



## BIBLIOGRAFÍA

---

salt-washed photosystem II preparations. *Biochim. Biophys. Acta*; 1984; 767: 515-523.

Delepelaire, P. and Chua, N. H. Lithium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis of thylakoid membrane at 4°C: characterizations of two additional chlorophyll a-protein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1979; 76: 111-115.

Delhaize, E., Loneragan, J. F. and Webb, J. Development of three copper metalloenzymes in clover leaves. *Plant Physiol.*; 1985; 78: 4-10.

Delieu, T, and Walker, D. A. Polarographic measurement of photosynthetic O<sub>2</sub> evolution by leaf. *New Phytol.*; 1972; 71: 201-205.

den Blanken, H. J., Hoff, A. J., Jongenelis, A. P. J. M. and Diner, B. A. High-resolution triplet-minus-singlet absorbance difference spectrum of photosystem II particles. *FEBS Lett.*; 1983; 157: 21-27.

Diner, A. B., Petruleas, V. and Wendoloski, J. J. The iron-quinone electron-acceptor complex of photosystem II. *Physiol. Plant.*; 1991; 81: 423-426.



Diner, B. A., Nixon, P., Metz, J. G., Rogner, M. and Chisholm, D. *Biophys. J.*; 1990; 57: 405-.

Diner, B. A., Ries, D. F., Cohen, B. N., Metz, J. G. COOH-terminal processing of the D1 polypeptide of the photosystem II reaction center of *Scenedesmus obliquus* is necessary for the assembly of the oxygen-evolving complex. *J. Biol. Chem.*; 1988; 263: 8972-8980.

Diner, B. A. and Petrouleas, V. 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*; 1987; 895: 107-125.

Dismukes, G. C. and Siderer, Y. Intermediates of a polynuclear manganese center involved in photosynthetic oxidation of water. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1981; 78: 274-278.

Drechsler, Z. and Neumann, J. Evidence for two types of electron transfer through photosystem II. *Photosynth. Res.*; 1989; 21: 187-195.

Droppa, M., Masojidek, J., Rozsa, Z., Wolak, A., Horvath, L. I., Farkas, T. and Horvath, G. Characteristics of Cu deficiency-induced inhibition of photosynthetic electron transport in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*; 1987; 891: 75- 84.

---



## BIBLIOGRAFÍA

---

Droppa, M. Ghirardi, M. L. Horvath, G. and Melis, A. Chlorophyll b deficiency in soybean mutants.II. Thylakoid membrane development and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*; 1988; 932: 138-145.

Droppa, M., Terry, N. and Horvath, G. Effects of Cu deficiency on photosynthetic electron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1984; 81: 2369-2373.

Droppa, M. and Horvath, G. The role of copper in photosynthesis. *CRC Plant Sci.*; 1990; 9: 111-123.

Dumelin, E. E. and Tappel, A. L. Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of polyunsaturated fatty acids and decomposition of preformed hydroperoxides. *Lipids*; 1977; 12: 894-900.

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



Dunahay, T. G. and Staehelin L. A. Isolation and characterization of a new minor chlorophyll a/b protein complex (CP24) of spinach. *Plant. Physiol.*; 1986; 80: 429-434.

Durrant, J. R., Hastings, G., Hong, Q., Barber, J., Porter, G., Klug, D. R. Determination of P680 singlet state lifetimes in photosystem II reaction centres. *Chem. Phys. Lett.*; 1992; 188: 54-60.

Eaton-Rye, J. J. and Govindjee. Electron transfer through the quinone acceptor complex of photosystem II in bicarbonate-depleted spinach thylakoid membranes as a function of actinic flash number and frequency. *Biochim. Biophys. Acta*; 1988; 935: 237-247.

Eckert, H. J., Wiese, N., Bernarding, J., Eichler, H. J. and Renger, G. Analysis of the electron transfer from Pheo<sup>-</sup> to Q<sub>A</sub> in PS II membrane fragments from spinach by time resolved 325nm absorbance changes in the picosecond domain. *FEBS Lett.*; 1988; 240: 153-158.

Eckert, H. J. and Renger, G. Temperature dependence of P680<sup>+</sup> reduction in O<sub>2</sub>-evolving PS II membrane fragments at different redox states S<sub>1</sub> of the water oxidizing system. *FEBS Lett.*; 1988; 236: 425-431.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Eckert, H. J., Geiken, B., Bernarding, J., Napiwotzki, A. Eichler, H. J. and Renger, G. Two sites of photoinhibition of the electron transfer in oxygen evolving and Tris-treated PS II membrane fragments from spinach. *Photosynth. Res.*; 1991; 27: 97-108.

Eggers, M. and Vermaas, W. F. J. Site-directed mutagenesis to probe the role of the D2 protein in photosystem II. In: *Regulation of Chloroplast Biogenesis*. (J. Argyroudi-Akoyunoglou, ed.); 1992: pp. 559-566. New York, Plenum.

Eichhorn, G. L., Berger, N. A., Buttzow, J. J., Clark, P., Rifkind, J. M, Shin, Y. A. and Tarien, E. The effect of metal ions on the structure of nuclei acids. *Advances in Chemistry Series "Bioinorganic Chemistry"*; 1971; 100: 135-154.

Enami, I., Satoh, K. and Katoh, S. Crosslinking between the 33 kDa extrinsic protein and the 47 kDa chlorophyll-carrying protein of the PS II reaction center core complex. *FEBS Lett.*; 1987; 226: 161-165.

Enami, I., Ohta, S., Mitsuhashi, S., Takahashi, S., Ikeuchi, M. and Katoh, S. Evidence from crosslinking for a close association of the extrinsic 33kDa protein with the 9.4 kDa product of the



psbI gene in oxygen-evolving photosystem II complexes from spinach. *Plant. Cell. Physiol.*; 1992; 33: 291-297.

Enami, I., Kaneko, M., Kitamura, N., Koike, H., Sonoike, K., Inoue, Y. and Kato, S. Total immobilization of the extrinsic 33 kDa protein in spinach photosystem II membrane preparations. Protein stoichiometry and stabilization of oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta*; 1991; 1060: 224- 232.

Erickson, J. M., Rahire, M., Rochaix, J. D. and Mets, L. Herbicide resistance and cross resistance: Changes at three distinct sites in the herbicide-binding protein. *Science*; 1985; 228: 204-207.

Evelo, R. G., Styring, S., Rutherford, A. W. and Hoff, A. J. EPR relaxation measurements of photosystem II reaction centers: Influence of S-state oxidation and temperature. *Biochim. Biophys. Acta*; 1989; 973: 428-442.

Falkowski, P. G., Fujita, Y., Ley, A. and Mauzerall, D. Evidence for cyclic electron flow around photosystem II in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol.*; 1986; 81: 310-312.

Farrington, J. A., Ebert, M., Land, E. J. and Fletcher, K. Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with

---



## BIBLIOGRAFÍA

---

oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochim. Biophys. Acta*; 1973; 314: 372-381.

Ford, R. C. and Evans, M. C. W. Electron transfer to P-680<sup>+</sup> in active and inhibited Photosystem II fraction from higher plants. *Biochim. Biophys. Acta*; 1985; 807: 1-9.

Ford, R. C. and Evans, M. C. W. Isolation of a PSII preparation from higher plants with highly enriched oxygen-evolution activity. *FEBS Lett.*; 1983; 160: 159-164.

Förster, T. In: *Modern Quantum Chemistry*, Vol. 3 (O. Sinanoglu, ed.); 1965: pp. 93-137. Academic Press, London.

Foyer, C. H. and Hall, D. O. A rapid procedure for the preparation of light harvesting chlorophyll a/b protein complex. *FEBS Lett.*; 1979; 101: 324-328.

Franzen, L. G., Hansson, Ö. and Andréasson, L. E. The roles of the extrinsic subunit in photosystem II as revealed by EPR. *Biochim. Biophys. Acta*; 1985; 808: 171-179.

George, G. N., Prince, R. C. and Cramer, S. P. The manganese site of the photosynthetic water-splitting enzyme. *Science*; 1989; 243: 789-791.



Gerken, S., Brettel, K., Schlodder, E. and Witt, H. T. Optical characterization of the immediate electron donor to chlorophyll aII+ in O<sub>2</sub>-evolving photosystem II complexes. Tyrosine as possible electron carrier between chlorophyll and the water-oxidizing-manganese complex. FEBS Lett.; 1988; 237: 69-75.

Ghanotakis, D. F., Demetriou D. M. and Yocum C. F. Isolation and characterization of an oxygen-evolving Photosystem II reaction center core preparation and a 28 kDa Chl-a-binding protein. Biochim. Biophys. Acta.; 1987; 891: 15-21.

Ghanotakis, D. F. and Yocum C. F. Photosystem II and the oxygen-evolving complex. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.; 1990; 41: 255-276.

Ghanotakis, F. D. and Babcock, T. G. Hydroxylamine as an inhibitor between Z and P680 in photosystem II. FEBS. Lett.; 1983; 153: 231-234.

Ghirardi, M. L. and Melis, A. Chlorophyll b-deficiency in soybean mutants. I. Effects on photosystem stoichiometry and chlorophyll antenna size. Biochim. Biophys. Acta; 1988; 932: 130-137.

Gilmore, A. M. and Yamamoto, H. Y. Dark induction of zeaxanthin-dependent nonphotochemical fluorescence quenching mediated by ATP. Proc. Natl. Acad. Sci.; 1992; 89: 1899-1903.

---



## BIBLIOGRAFÍA

---

Gol'dfeld'd, M. G. and Khalilov, R. T. Localization of copper in photosynthetic apparatus of chloroplasts. *Biofizika*; 1979; 24: 762-765.

Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. E., Izawa, S. and Singh, R. M. M. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*; 1966; 5: 467-477.

Gorman, D. and Levine, L. P. Photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. Electron transport in mutant strains lacking either cytochrome or plastocyanin. *Plant Physiol.*; 1966; 41: 1648-.

Gounaris, K., Brain, A. R. R., Quinn, P. J. and Williams, W. P. Structural reorganization of chloroplast thylakoid membranes in response to heat stress. *Biochim. Biophys. Acta*; 1984; 766: 198-208.

Graan, T. The interaction of silicomolybdate with the photosystem II herbicide-binding site. *FEBS Lett.*; 1986; 206: 9-14.

Green, B. R., Camm, E. L. and van Houten, J. The chlorophyll-protein complexes of *Acetabularia*. A novel chlorophyll a/b complex which forms oligomers. *Biochem. Biophys. Acta*; 1982; 681: 248-255.



Green, B. R. The chlorophyll-protein complexes of higher plant photosynthetic membranes, or just what green band is that? *Photosynth. Res.*; 1988; 15: 3-32.

Green, B. R., Pichersky, E. and Kloppstech, K. Chlorophyll a/b-binding proteins an extended family. *TIBS*; 1991; May: 181- 186.

Green, L. F., McCarthy, J. F. and King, C. G. Inhibition of respiration and photosynthesis in *Chlorella pyrenoidosa* by organic compounds that inhibit copper catalysis. *J. Biol. Chem.*; 1939; 128: 447-453.

Greene, B. A., Staehelin, L. A. and Melis, A. Compensatory alterations in the photochemical apparatus of a photoregulation, chlorophyll b-deficient mutant of maize. *Plant Physiol.*; 1988; 87: 365-370.

Greenfield, S. S. Inhibitory effects of inorganic compound on photosynthesis in *Chlorella*. *Am. J. Bot.*; 1942; 29: 121-131.

Gross, R. E., Pugno, P. and Dugger, M. Observations on the mechanism of copper damage in *Chlorella*. *Plant Physiol.*; 1970; 46: 183-185.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Gupta, S. L. Copper uptake and inhibition of growth, photosynthetic pigments and macromolecules in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Photosynthetica*; 1986; 20: 447-453.

Haag, E., Irrgang, K. D., Boekema, E. J. and Renger, G. Functional and structural analysis of photosystem II core complexes from spinach with high oxygen evolution capacity. *Eur. J. Biochim.*; 1990; 189: 47-53.

Habermann, H. M. Reversal of copper inhibition in chloroplast reactions by manganese. *Plant Physiol.*; 1969; 44: 331-336.

Haehnel, W. Plastocyanin. In: *Encyclopedia of Plant Physiology, Photosynthesis III*, Vol. 19 (L. A. Staehelin and C. J. Arntzen, eds); 1986: pp. 547-551. Springer-Verlag, Berlin.

Hallick, R. B. *Plant Mol. Biol. Rep.*; 1989; 7: 266-275.

Hansson, Ö. and Wydrzynski, T. Current perceptions of photosystem II. *Photosynth. Res.*; 1990; 23: 131-162.

Hastings, G., Durrant, J. R., Barber, J., Porter, G. and Klug, D. R. Electron and energy transfer in isolated photosystem two reaction centres 2: Radical pair formation. In: *Research in Photosynthesis*, Vol. 2 (N. Murata, ed.); 1992: pp. 247-250. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.



Hayden, D. B. and Hopkins, W. G. A second distinct chlorophyll a-protein complex in mesophyll chloroplasts. *Can. J. Bot.*; 1977; 55: 2525-2529.

Henriques, F. Effects of copper deficiency on the photosynthetic apparatus of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Plant Physiol.*; 1989; 135: 453-458.

Henrysson, T., Schröder, W., Spangfort, M. and Åkerlund, H. E. Isolation and characterization of the chlorophyll a/b binding CP29 from spinach. *Biochim Biophys Acta*; 1989; 2: 180-194.

Hill, R. and Benndall, F. Function of the two cytochrome components in chloroplasts: A working hypothesis. *Nature*; 1960; 186: 136-137.

Hirschberg, J., Bleecker, A., Kyle, D., McIntosh, L. and Arntzen, C. J. The molecular basis of triazine-herbicide resistance in higher-plant chloroplasts. *Z. Naturforsch.*; 1984; 39: 412- 420.

Hoganson, C. W. and Babcock, G. T. Electron transfer events near the reaction center in O<sub>2</sub>-evolving photosystem II preparations. *Biochemistry*; 1988; 27: 5848-5855.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Holcombe, J. A. and Majidi, V. Error analysis for sampling of slurries: Volumetric errors. *J. Anal. At. Spectrom.*; 1989; 4: 423-425.

Holdsworth, E. S. and Arshad, J. H. A Mn-Cu-pigment complex isolated from the PSII of *Phaeodactylum tricornutum*. *Arch. Biochem. Biophys.*; 1977; 183: 361-377.

Horvath, G., Droppa, M. and Terry, N. Changes in photosynthetic attributes in response to copper depletion in sugar beet (*Beta vulgaris*). *J. Plant Nutr.*; 1983; 6: 971-981.

Horvath, G., Droppa, M. and Terry, N. Role of copper in photosynthesis: new sites of action in the electron transport chain. In: *Advances in Photosynthesis Research*, Vol. 1 (C. Sybesma, ed.); 1984: pp. 509-513. W. Junk, The Hague.

Hoyer, H. G. and Simpson, J. D. Changes in the polypeptide composition of internal membranes of barley plastids during greening. *Carlsberg Res. Commun.*; 1977; 42: 379-389.

Hsu, B. D. and Lee, J. Y. Toxic effects of copper on photosystem II of spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*; 1988; 87: 116-119.

Hundal, T., Virgin, I., Styring, S. and Andersson, B. Changes in the organization of the photosystem II following light induced



D1 protein degradation. *Biochim. Biophys. Acta*; 1990; 1017: 235-241.

Hutchinson, D. J., Disinski, F. J. and Nardelli, C. A. Determination of copper in infant formula by graphite furnace atomic absorption spectroscopy with a L'vov platform. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 1986; 69: 60-64.

Ikeuchi, M., Koike, H., Mamada, K., Takio, K. and Inoue, Y. Comparative study of PS II low-molecular-mass components between *Synechococcus vulcanus* and higher plants. In: *Current Research in Photosynthesis, Vol. 1*, (M. Baltscheffsky, ed.); 1990: pp. 347-350, Kluwer, Dordrecht.

Ikeuchi, M., Koike, H. and Inoue, Y. Identification of psb L gene products in cyanobacterial photosystem II reaction center preparations. *FEBS Lett.*; 1989; 251: 155-160.

Ikeuchi, M., Eggers, D., Shen, G., Webber, A. N., Yu, J., Hirano, A., Inoue, Y. and Vermaas, W. F. J. *J. Biol. Chem.*; 1991; 266: 11111-11115.

Ikeuchi, M., Koike, H. and Inoue, Y. N-terminal sequencing of low-molecular-mass components in cyanobacterial photosystem II core complex; two components correspond to unidentified open

---



## BIBLIOGRAFÍA

---

reading frames of plant chloroplast DNA. FEBS Lett.; 1989; 253: 178-182.

Ikeuchi, M. and Inoue, Y. A new 4.8 kDa polypeptide intrinsic to the PS II reaction center, as revealed by modified SDS-PAGE with improved resolution of low-molecular-weight proteins. Plant. Cell. Physiol.; 1988a; 29: 1233-1239.

Ikeuchi, M. and Inoue, Y. A new photosystem II reaction center component (4.8 kDa protein) encoded by chloroplast genome. FEBS Lett.; 1988; 241: 99-104.

Irrgang, K. D., Kablitz, B., Vater, J. and Renger, G. Identification, isolation and partial characterisation of 14- 15 kDa pigment binding protein complex of PS II from spinach. Biochim. Biophys. Acta; 1993; 1143: 173-182.

Jegerschöld, C. and Styring, S. Fast oxygen-independent degradation of the D1 reaction center protein in photosystem II. FEBS Lett.; 1991; 280: 87-90.

Joliot, P., Hoffnung, M. and Chabaud, R. J. Chim. Biophys.; 1966; 63: 525-634.



Joliot, P. and Joliot, A. Polarographic method for detection of O<sub>2</sub> production and redn. of Hill reagent by isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*; 1968; 153: 625-634.

Katoh, S., Suha, I., Shiritori, I. and Takamiya, A. Distribution of plastocyanin in plants with special reference to its localization in chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*; 1961; 94: 136-141.

Katoh, S., and San Pietro, A. Inhibitory effect of salicylaldehyde on chloroplast photooxidation reduction reactions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 1966; 24: 903-908.

Katoh, S. A new copper protein from *Chlorella elipsoidea*. *Nature*; 1960; 186: 533-534.

Kautsky, H. and Hirsch, A. Neue Versuche zur Kohlenstoff assimilation. *Naturwissenschaften*; 1931; 19: 964.

Kim, D. H., Britt, R. D., Klein, M. P. and Sauer, K. The g=4.1 EPR signal of the S<sub>2</sub> state of the photosynthetic oxygen-evolving complex arises from a multinuclear manganese cluster. *J. Am. Chem. Soc.*; 1990; 112: 9389-9391.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Klimov, V. V., Klevanik, A. V. and Shuvalov, A. Reduction of pheophytin in the primary light reaction of photosystem II. FEBS Lett.; 1977; 82: 183-186.

Knaff, D. B. The effect of pH on the midpoint oxidation-reduction potentials of components associated with plant photosystem II. FEBS Lett.; 1975; 60: 331-335.

Koike, H., Mamada, K., Ikeuchi, M. and Inoue, Y. Low-molecular-mass proteins in cyanobacterial photosystem II: Identification of psb K gene products by N-terminal sequencing. FEBS Lett.; 1989; 244: 391-396.

Kok, B., Forbush, B. and McGlloin, M. Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution. I. A linear four step mechanism. Photochem. Photobiol.; 1970; 11: 457-475.

Krieger, A., Moya, I. and Weis, E. Energy-dependent quenching of chlorophyll a fluorescence: effect of pH on stationary fluorescence and picosecond-relaxation kinetics in thylakoid membranes and Photosystem II preparations. Biochim. Biophys. Acta; 1992; 1102: 167-176.

Krogmann, D. W. and Jagendorf, A. T. Inhibition of the Hill reaction by fatty acids and meta-chelating agents. Arch. Biochem. Biophys.; 1959; 80: 421-430.



Krupa, Z. Cadmiun-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex II in radish cotyledons. *Physiol. Plant.*; 1988; 73: 518-524.

Kühlbrandt, W. and Wang, D. N. Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. *Nature*; 1991; 350: 130-134.

Kuwabara, T., Miyao, M., Murata, T. and Murata, N. The function of the 33 kDa protein in the photosynthetic oxygen-evolution system studied by reconstitution experiments. *Biochim. Biophys. Acta*; 1985; 806: 283-289.

Kuwabara, T., Murata, T., Miyao, M. and Murata, N. Partial degradation of the 18-kDa protein of the photosynthetic oxygen-evolving complex: A study of a binding site. *Biochim. Biophys. Acta*; 1986; 850: 146-155.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 1970; 227: 680-685.

Lagoutte, B. and Duranton, J. A manganese protein complex within the chloroplast structures. *FEBS Lett.*; 1975; 51: 21-24.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Larsson, U. K., Sundby, C. and Andersson, B. Characterization of two different subpopulations of spinach light-harvesting chlorophyllab-protein complex (LHC II): polypeptide composition, phosphorylation pattern and association with photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*; 1987; 894: 59-68.

Larsson, U. K. and Andersson, B. Different degrees of phosphorylation and lateral mobility of two polypeptides belonging to the light-harvesting complex photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*; 1985; 809: 396-402.

Lastra, O., Chueca, A., Gonzalez, C., Lachica, M. and López-Gorgé, J. El cobre como nutriente de la planta. *An. Edafol. Agrobiol.*; 1987; 46: 1005.

Lebkowski, J. S. and Laemmli, U. K. Non-histone proteins and long range organization of HeLa interphase DNA. *J. Mol. Biol.*; 1982; 156: 325-344.

Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*; 1987; 148: 350-382.

Lichtenhaler, H. K. and Rinderle, U. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. CRC



Critical Reviews in Analytical Chemistry; 1988; Vol. 19.  
Supplement: S29-S85.

Lidon, F. C. and Henriques, F. S. Effects of copper on the ascorbate, diamine and o-diphenol oxidases activities of rice leaves. *Oyton*; 1991; 52: 97-104.

Lidon, F. C. and Henriques, F. S. Limiting step on photosynthesis of rice plants treated with varying copper levels. *J. Plant Physiol.*; 1991; 138: 115-118.

Lindahl, M. and Andersson, B.. A proteolytic activity associated with loss of LHC II during acclimation of spinach leaves from low to high light. In: *Research in Photosynthesis, Vol. I* (N. Murata, ed.); 1992; (pp. 307-310. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.).

Lipman, C. and Mackiney, E. Proof of the essential nature of copper for higher green plants. *Plant Physiol.*; 1931; 6: 593-599.

Ljünberg, U., Åkerlund, H. E. and Andersson, B. Isolation and characterization of the 10 kDa and 22 kDa polypeptides from higher plant photosystem II. *Eur. J. Biochem.*; 1986; 158: 477-482.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Ljüngberg, U., Henrysson, T., Rochester, C. P., Åkerlund, H. E. and Andersson, B. The presence of low-molecular-weight polypeptides in spinach photosystem II core preparations. Isolation of a 5 kDa hydrophilic polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta*; 1986; 849: 112-120.

Loneragan, J. F. Response of plants to trace elements. *Prog. Bot.*; 1982; 44: 92-95.

López Gorgé, J., Lastra, A., Chueca, A. and Lachica, M. Use of photosynthetic parameters for the diagnosis of copper deficiency in *Pinus radiata* seedlings. *Physiol. Plant.*; 1985; 65: 508-512.

Lyszcz, S., Ruszkowska, M., Wojcieszka, U. and Zinkiewicz, E. The activity of ascorbic acid and chatecol oxidase, the rate of photosynthesis and respiration as related to plant organs, stage of development and copper supply. *Acta Agrobot.*; 1976; 29: 99-105.

Macdowall, F. D. The effect of some inhibitors of photosynthesis upon the chemical reduction of a dye by isolated chloroplasts. *Plant Physiol.*; 1949; 24: 464-480.

Maksymiec, W., Russa, R., Urbanik-Sypniewska, T, and Baszynski, T. Changes in acyl lipid and fatty acid composition in thylakoids



of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. *J. Plant Physiol.*; 1992; 140: 52-55.

Massey, A. G. Copper. In: *Comprehensive Inorganic Chemistry*, Vol. 3 (J. C. Bailar, H. J. Emelens, S. R. Nyhamand Trotman-Dickenson, eds.); 1973: pp. 57-60. Pergamon Press Ltd, Oxford.

Mathis, P. Fast absorption spectroscopy for studying the primary photoreactions. In: *Primary Processes of Photosynthesis* (J. Barber, ed.); 1987: pp. 269-302. Elsevier, North-Holland.

Mathis, P. and Rutherford, A. V. The primary reactions in photosystems I and II of algae and higher plants. In: *Photosynthesis* (J. Amesz, ed.); 1987: pp.63-96, Elsevier, Amsterdam.

Matsudaira, P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinilidene difluoride membranes. *J. Bio. Chem.*; 1987; 262: 10035-10038.

Mattoo, A. K. and Edelman, M. Intramembrane translocation and posttranslational palmitoylation of the chloroplast 32 kDa herbicide-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1987; 84: 1497-1501.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Mattoo, A. K., Pick, U., Hoffman-Falk, H., and Edelman, M. The rapidly metabolized 32 KDa polypeptide of the chloroplast is the "proteinaceous shield" regulating photosystem II electron transport and mediating diuron herbicide sensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci.; 1981; 78: 1542-1576.

Mayes, S. R., Cook, K. M., Self, S. J., Zhang, Z. and Barber, J. Deletion of the gene encoding the photosystem II 33 kDa protein from *Synechocystis* sp. PCC 6803 does not inactivate water-splitting but increases vulnerability to photoinhibition. Biochim. Biophys. Acta; 1991; 1060: 1-12.

Mayes, S.R., Dubbs, J. M., Vass, I, Hideg, E, Nagy, L. and Barber, J. Further characterization of the psb H Locus *Synechocystis* sp. PCC 6803: Inactivation of psb H impairs Q<sub>A</sub> to Q<sub>B</sub> electron transport in photosystem II. Biochemistry; 1993; 32: 1454-1465.

Melis, A. and Duysens, L. N. M. Biphasic energy conversion kinetics and absorbance difference spectra of PS II of chloroplasts. Evidence for two different PS II reactions centers. Photochem. Photobiol.; 1979; 29: 373-382.

Melis, A., Svensson, P. and Albertsson, P. Å. The domain organization of the chloroplast thylakoid membrane localization

---



of photosystem I and of the cytochrome b6-f complex. *Biochim. Biophys. Acta*; 1986; 850: 402-412.

Melis, A. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta*; 1991; 1058: 87-106.

Melis, A. Functional properties of photosystem IIB in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*; 1985; 808: 334-342.

Melis, A. and Homann, P. H. Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. *Photochem. Photobiol.*; 1976; 23: 343-350.

Melis, A. and Homann, P. H. A selective effect of magnesium ion on the photochemistry at one type of reaction center in photosystem II of chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*; 1978; 190: 523-530.

Metz, J. G., Nixon, P. J., Roegner, M., Brudvig, G. W. and Diner, B. A. Directed alteration of the D1 polypeptide of photosystem II: Evidence that tyrosine-161 is the redox component, Z, connecting the oxygen-evolving complex to the primary electron donor P680. *Biochemistry*; 1989; 28: 6960- 6969.

Meyer, B., Schlodder, E., Dekker, J. P. and Witt, H. T. O<sub>2</sub> evolution and Chl-aII<sup>+</sup> (P-680<sup>+</sup>) nanosecond reduction kinetics in

---



## BIBLIOGRAFÍA

---

single flashes as a function of pH. *Biochim. Biophys. Acta*; 1989; 974: 36-43.

Michel, H., Weyer, K. A., Gruenberg, H., Dunger, I., Oesterhelt, D. and Lottspeich, F. The "light" and "medium" subunits of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*: Isolation of the genes, nucleotide and amino acid sequence. *EMBO J.*; 1986; 5: 1149-1158.

Michel, H. and Deisenhofer, J. Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II. *Biochemistry*; 1988; 27: 1-7.

Michel, H., Hunt, D. F., Shabanowitz, J. and Bennett, J. Tandem mass spectrometry reveals that three Photosystem II proteins of spinach chloroplasts contain N-acetyl-O-phosphothreonine at their NH<sub>2</sub> termini. *J. Biol. Chem.*; 1988; 263: 1123-1130.

Michel, H. and Deisenhofer, J. X-ray diffraction studies on a crystalline bacterial photosynthetic reaction center: A progress report and conclusions on the structure of photosystem II reaction centers. In: "Photosynthesis II: Photosynthetic Membranes and Light-Harvesting Systems", Vol. 19 (L. A. Stachelin and C. J. Arntzen, eds.); 1986: pp.371- 381, *Encycl. Plant Physiol., New Ser.* Springer Verlag, Berlin.



Miller, A. F. and Brudvig, G. W. Electron-transfer events leading to reconstitution of oxygen-evolution activity in manganese-depleted photosystem II. *Biochemistry*; 1990; 29: 1385-1392.

Miller, A. F. and Brudvig, G. W. A guide to electron paramagnetic resonance spectroscopy of photosystem II membranes. *Biochim. Biophys. Acta*; 1991; 1056: 1-18.

Miller, K. R. and Staehlin, L. A. Analysis of the thylakoid outer surface. Coupling factor is limited to unstacked membrane regions. *J. Cell Biol.*; 1976; 68: 30-47.

Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*; 1961; 191: 144-148.

Miyao, M. and Murata, N. The Cl<sup>-</sup> effect on photosynthetic oxygen evolution: Interaction of Cl<sup>-</sup> with 18-kDa, 24 kDa, and 33 kDa proteins. *FEBS Lett.*; 1985; 180: 303-308.

Miyao, M. and Murata, N. The mode of binding of three extrinsic proteins of 33 kDa, 23 kDa, and 18 kDa in the photosystem II complex of spinach. *Biochim. Biophys. Acta*; 1989; 977: 315- 321.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Miyao, M., Fujimura, Y. and Murata, N. Partial degradation of the extrinsic 23-kDa protein of the photosystem II complex of spinach. *Biochem. Biophys. Acta*; 1988; 936: 465-474.

Miyao, M. and Murata, N. Role of the 33 kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen-evolution system and its replacement by chloride ions. *FEBS Lett.*; 1984; 168: 281-286.

Moënne-Loccoz, P., Robert, B. and Lutz, M. A resonance raman characterization of the primary electron acceptor in photosystem II. *Biochemistry*; 1989; 28: 3641-3654.

Mohanty, N., Vass, I. and Demeter, S. Copper toxicity affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor ( $Q_B$ ). *Plant Physiol.*; 1989; 90: 175-179.

Montoya, G., Yruela, I. and Picorel, R. Pigment stoichiometry of a newly isolated D1-D2-cytb-559 complex from the higher plant *Beta vulgaris* L. *FEBS Lett.*; 1991; 283: 255-258.

Morris, J. and Herrmann, R. G. Nucleotide sequence of the gene for the P680 chlorophyll a apoprotein of the Photosystem II reaction center from spinach. *Nucleic. Acid. Res.*; 1984; 12: 2837-2850.



Murata, N. and Miyao, M. Extrinsic membrane proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Trends Biochem. Sci.*; 1985; 10: 122-124.

Murata, N., Miyao, M., Hayashida, N., Hidaka, T. and Sugiura, M. Identification of a new gene in the chloroplast genome encoding a low-molecular-mass polypeptide of the photosystem II complex. *FEBS Lett.*; 1988; 235: 283-288.

Murata, N., Miyao, M., Omata, T., Matsunami, H. and Kuwabara, T. Stoichiometry of components in the photosynthetic oxygen evolution system of photosystem II particles prepared with Triton X-100 from spinach chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta*; 1984; 765: 363-369.

Nabedryk, E., Andrianambinintsoa, S., Berger, G., Leonard, M., Mantele, W. and Breton, J. Characterization of bonding interactions of the intermediary electron acceptor in the reaction center of photosystem II by FTIR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*; 1990; 1016: 49-54.

Nanba, O. and Satoh, K. Isolation of Photosystem II reaction center consisting of D1 and D2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1987; 84: 109-112.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Neubauer, C. and Schreiber, U. The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side. *Z. Naturforsch.*; 1987; 42: 1246-1254.

Nixon, P. J. and Diner, B. A. Aspartate 170 of the photosystem II reaction center polypeptide D1 is involved in the assembly of the oxygen-evolving manganese cluster. *Biochemistry*; 1992; 31: 942-948.

Nixon, P. J., Chisholm, D. A. and Diner, B. A. Isolation and functional analysis of random and site-directed mutants of photosystem II. In: *Plant Protein Engineering*, (P. Shewry and S. Gutteridge eds.); 1992: pp.93-141. Cambridge University Press, Cambridge.

Noren, G. H. and Barry, B. A. The YF161D1 mutant of *Synechocystis* 6803 exhibits an EPR signal from a light-induced photosystem II radical. *Biochemistry*; 1992; 31: 3335-3342.

Nuijs, A. M., van Gorkom, H. J., Plijter, J. J. and Duysens, L. N. M. Primary charge separation and excitation of chlorophyll a in photosystem II particles from spinach as studied by picosecond absorbance difference spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*; 1986; 848: 167-175.



Nyhus, K. J. and Pakrasi, H. B. In: Techniques and New Developments in Photosynthesis Research (J. Barber and R. Malkin, eds.); 1989: pp. 469-472. Plenum Press, New York.

Odom, W. R. and Bricker, T. M. Interaction of CPa-1 with the manganese-stabilizing protein of photosystem II: identification of domains cross-linked by 1-ethyl 3, 3(dimethylamino) propylcarbamide. *Biochemistry*; 1992; 31: 5616-5620.

Ono, T. and Inoue, Y. Ca<sup>+2</sup>-dependent restoration of O<sub>2</sub>-evolving activity in CaCl<sub>2</sub>-washed PSII particles depleted of 33, 24 and 16 kDa polypeptides. *FEBS Lett.*; 1984; 168: 281-286.

Ono, T., Kajikawa, H. and Inoue, Y. Changes in protein composition and Mn abundance in photosystem II particles on photoactivation of the latent O<sub>2</sub>-evolving system in flash-grown wheat leaves. *Plant. Physiol.*; 1986a; 80: 85-90.

Ono, T., Nakatani, H. Y., Johnson, E., Arntzen, C. J. and Inoue, Y. Comparative biochemical properties of oxygen evolving photosystem II particles and of chloroplasts isolated from intermittently flashed wheat leaves. In: *Advances in Photosynthesis Research Vol. 1* (C. Sybesman, ed.); 1984: pp. 383-386. W. Junk, The Hague.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Ono, T., Zimmermann, J. L., Inoue, Y. and Rutherford, A. W. EPR evidence for a modified S-state transition in chloride- depleted photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*; 1986; 851: 193-201.

Ono, T. and Inoue, Y. S-state turnover in the O<sub>2</sub>-evolving system of CaCl<sub>2</sub>-washed photosystem II particles depleted of three peripheral proteins as measured by thermoluminescence. Removal of 33 kDa protein inhibits S<sub>3</sub> to S<sub>4</sub> transition. *Biochim. Biophys. Acta*; 1985; 806: 331-340.

Ortega, J. M., Hervás, M. and Losada, M. Location of cytochrome b-559 between photosystem II and photosystem I in noncyclic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta*; 1989; 975: 244- 251.

Ortega, J. M., Hervás, M. and Losada, M. A possible role for cytochrome b-559 in photosynthesis. In: *Research in photosynthesis, Vol. 2* (N. Murata, ed.); 1992: pp. 697-700. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Ortega, J. M., Hervás, M. and Losada, M. Redox and acid-base characterization of cytochrome b-559 in photosystem II particles. *Eur. J. Biochem.*; 1988; 171: 449-455.

Pakrasi, H. B. and Vermaas, W. F. J. Protein engineering of photosystem II. In: *the Photosystem: Structure, Function and*

---



Molecular Biology. Current Topics in Photosynthesis. Vol. 11, 1992, (J. Barber, ed.): pp. 231-256. Elsevier, Amsterdam.

Papageorgiou, G. Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. In: Bioenergetics of Photosynthesis (E. Govindjee, ed.); 1975: pp. 319-366. Academic Press, New York.

Penner-Hahn, J. E., Fronko, R. M., Pecoraro, V. L., Yocum, C. F., Betts, S. D. and Bowlby, N. R. Structural characterization of the manganese sites in the photosynthetic oxygen evolving complex using X-ray absorption spectroscopy. J. Am. Chem. Soc.; 1990; 112: 2549-2557.

Plesnicar, M. and Bendall, D. S. The plastocyanin content of chloroplasts from some higher plants estimated by a sensitive enzymatic assay. Biochim. Biophys. Acta; 1970; 216: 192-199.

Plijter, J. J., Aalbers, S. E., Barends, J. P. F., Vos, M. H. and van Gorkom, H. J. Oxygen release may limit the rate of photosynthetic electron transport; the use of a weakly polarized oxygen electrode. Biochim. Biophys. Acta; 1988; 935: 299-311.

Quintana, C., Olmedilla, A., Antonie, N. and Carizqueta, A. The occurrence of metals Al, Fe, Ni, Cu, Zn in the nuclei of animal cells: an ultrastructural, in situ, X-ray microanalytical study. Biology Cell; 1987; 61: 115-119.

---



## BIBLIOGRAFÍA

---

Radmer, R. and Cheniae, G. M. Photoactivation of the manganese catalyst of O<sub>2</sub> evolution II. A two-quantum mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*; 1971; 253: 182-186.

Ramaswamy, N. K. and Madhusudanen, N. P. Specific requirement for copper ions in the reversal of inhibition of photosynthesis in Tris-washed potato tuber chloroplasts. *Plant Sci. Lett.*; 1978; 13: 383-387.

Ramshaw, J. A. M., Brown, R. H., Scawen, M. D. and Boutler, D. Higher plant plastocyanin. *Biochim. Biophys. Acta*; 1973; 303: 269-.

Rasmussen, O. F., Bookjans, G., Stummann, B. and Henningsen, K. *Plant Mol. Biol.*; 1984; 3: 191-199.

Renganathan, M. and Bose, S. Inhibition of primary photochemistry of photosystem II by copper in isolated pea chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*; 1989; 974: 247-253.

Renganathan, M. and Bose, S. Inhibition of photosystem II activity by Cu(II) ion. Choice of buffer and reagent is critical. *Photosynth. Res.*; 1990; 23: 95-99.



Renger, G. and Weiss, W. The detection of intrinsic 320 nm absorption changes reflecting the turnover of the water-splitting enzyme system which leads to oxygen formation in trypsinized chloroplasts. FEBS Lett.; 1982; 137: 217-221.

Renger, G. Vater, J. and Witt, H. T. Effect of salicylaldehyde on the complete electron transport system of photosynthesis and on the isolated cycle II. Biochem. Biophys. Res. Comm.; 1967; 26: 477-480.

Renger, G., Gleiter, H. M., Haag, E. and Reifarth, F. Photosystem II: thermodynamics and kinetics of electron transport from  $Q_A$ -to  $Q_B(Q_B^-)$  and deleterious effects of copper(II). Z. Naturforsch.; 1993; 48: 234-240.

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

Renger, G. and Weis, W. Studies on the nature of the water oxidizing enzyme system. III. Spectral characterization of the intermediary redox states in the water-oxidizing enzyme system Y in photosystem II. Biochim. Biophys. Acta; 1986; 850: 173-183.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Robinson, H. H. and Crofts, A. R. Kinetics of the oxidation-reduction reactions of the photosystem II quinone acceptor complex, and pathway for deactivation. FEBS Lett.; 1983; 153: 221-226.

Rochaix, J. D., Dron, M., Rahire, M. and Malnoe, P. Sequence homology between the 32 kD and the D2 chloroplast membrane polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Mol. Biol.; 1984; 3: 363-370.

Rutherford, A. W., Govindjee and Ionue, Y. Charge accumulation and photochemistry in leaves studied by thermoluminescence and delayed light emission. Proc. Natl. Acad. Sci.; 1984; 81: 1107-1111.

Rutherford, A. V., Mullet, J. E. and Crofts, A. R. Measurement of the midpoint potential of the pheophytin acceptor of photosystem II. FEBS Lett.; 1981; 123: 235-237.

Ryrie, I. J., Anderson, J. M. and Goodchild, D. J. The role of light harvesting Chl a/b protein complex in chloroplast membrane stacking. Cation-induced aggregation of reconstituted proteoliposomes. Eur. J. Biochem.; 1980; 107: 345-354.



Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York; 1989.

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

Samson, G. and Fork, D. C. Enhanced susceptibility of the oxidized and unprotonated forms of high potential cytochrome b-559 toward DCMU. *Photosynth. Res.*; 1991; 27: 179-187.

Samson, G. and Popovic, R. Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 1988; 16: 272-278.

Samuelsson, G. and Öquist, G. Effects of copper chloride on photosynthetic electron transport and chlorophyll-protein complexes of *Spinacea oleracea*. *Plant Cell Physiol.*; 1980; 21: 445-454.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Sandmann, G. and Böger, P. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Plant Physiol.*; 1980; 66: 797-800.

Sandmann, G., Böger, P. The enzymological function of heavy metals and their role in electron transfer processes in plants. In: *Inorganic Plant Nutrition. Parts A&B* (A. Läuchli, and R. L. Bielecki, eds.); 1983: pp. 563-596. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.

Sandmann, G. Photosynthetic and respiratory electron transport in Cu(II)-deficient *Dunaliella*. *Physiol. Plant.*; 1985; 65: 481-486.

Saphon, S. and Crofts, A. R. Protolytic reactions in photosystem II: A new model for the release of protons accompanying the photooxidation of water. *Z. Naturforsch.*; 1977; 32: 617-626.

Sauer, K., Guiles, R. D., McDermott, A. E., Cole, J. L., Yachandra, V. Y., Zimmermann, J. L., Klein, M. P., Dexheimer, S. L. and Britt, R. D. Spectroscopic studies of manganese involvement in photosynthetic oxygen evolution. *Chemica Scripta*; 1988; 28: 87-91.



Schansker, G. and van Rensen, J. J. S. Characterization of the complex interaction between the electron acceptor silicomolybdate and photosystem II. *Photosynth. Res.*; 1993; 37: 165-175.

Schatz, G. H., Brock, H. and Holzwarth, A. R. Picosecond kinetics of fluorescence and absorbance changes in photosystem II particles excited at low photon density. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1987; 84: 8418-8422.

Schelvis, J. P. M., van Noort, P. I., Aartsma, T. J. and van Gorkom, H. J. The origin of the 30 ps lifetime component in the photosystem II D1-D2-Cytb559 complex. In: *Research in Photosynthesis, Vol. 2* (N. Murata, ed.); 1992: pp. 81-84. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Schlodder, E. and Meyer, B. pH dependence of oxygen evolution and reduction kinetics of photooxidized chlorophyll aII (p680) in photosystem II particles of *Synechococcus* sp. *Biochim. Biophys. Acta*; 1987; 890: 23-31.

Schreiber, U. and Neubauer, C. O<sub>2</sub>-dependent electron flow, membrane energization and mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.*; 1990; 25: 279-293.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Schreiber, U. and Neubauer, C. The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: II. Partial control by the photosystem II donor side and possible ways of interpretation. *Z. Naturforsch.*; 1987; 42: 1255-1264.

Schröder, W. P., Henrysson, T. and Åkerlund, H. E. Characterization of low molecular mass proteins of photosystem II by N-terminal sequencing. *FEBS Lett.*; 1988; 235: 289-292.

Schröder, W. P., Messinger, J., Tremolieres, A. and Renger, G. Effects of BSA, fatty acids and lipase treatment on PS II. In: *Research in Photosynthesis, Vol. 1* (N. Murata, ed.); 1992; pp. 159-162. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Seibert, M., Toon, S., Govindjee, O'neil, M. P. and Wasielewski, M. R. Primary charge separation in isolated photosystem II reaction centers. In: *Research in Photosynthesis, Vol. 2* (N. Murata, ed.); 1992: pp. 41-44. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Shioi, Y., Tamai, H. and Sasa, T. Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*; 1978; 19: 203-209.



Sibbald, P. R. and Green, B. R. Copper in photosystem II. In: Progress in Photosynthesis Research, Vol. 2 (J. Biggins, ed); 1987: pp. 573-576. Martinus Nijhoff, Dordrecht.

Siegenthaler, P. A. Inhibition of photosystem II electron transport in chloroplasts by fatty acids and restoration of its activity by Mn<sup>2+</sup>. FEBS Lett.; 1974; 39: 337-340.

Skrinska, V. A., Messineo, L., Towns, R. L. R and Pearson, K. H. Transition metals in calf thymus deoxyribonucleoprotein. Experientia; 1978; 34: 15-17.

Sommer, A. Copper as an essential for plant growth. Plant Physiol.; 1931; 6: 339-345.

Spangfort, M. and Andersson, B. Subpolutions of the main chlorophyll a/b light-harvesting complex of photosystem II-isolation and biochemical characterization. Biochim. Biophys. Acta; 1989; 977: 163-170.

Spencer, D. and Possingham, J. V. The effect of nutrient deficiencies on the Hill reaction of isolated chloroplasts from tomato. Aust. J. Biol. Sci.; 1960; 13: 441-446.

Steemann-Nielsen, E., Kamp-Nielsen, L. and Wium-Andersen, S. The effect of deleterious concentrations of copper on the

---



## BIBLIOGRAFÍA

---

photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol. Plant.*; 1969; 22: 1121-1333.

Stockhaus, J., Höfer, M., Renger, G., Westhoff, P., Wydrzynski, T. and Willmitzer, L. Anti-sense RNA efficiently inhibits formation of the 10 kDa polypeptide of photosystem II in transgenic potato plants: analysis of the role of the 10 kDa protein. *EMBO J.*; 1990; 9: 3013-3021.

Styring, S. and Rutherford, A. W. In: the oxygen-evolving complex of photosystem II the  $S_0$  state is oxidized to the  $S_1$  state by  $D^+$  (Signal II slow). *Biochemistry*; 1987; 26: 2401-2405.

Sunby, C. A., Melis, A., Maenpaa, P. and Andersson, B. Temperature-dependant changes in the antenna size of photosystem II. Reversible conversion of photosystem II $\alpha$  to photosystem II $\beta$ . *Biochim. Biophys. Acta*; 1986; 851: 475-483.

Sundby, C. and Andersson, B. Temperature induced reversible migration along the thylakoid membrane of photosystem II regulates its with LHC II. *FEBS Lett.*; 1985; 191: 24-28.

Svensson, B., Vass, I., Cedergren, E. and Styring, S. Structure of donor side components in photosystem II predicted by computer modelling. *EMBO J.*; 1990; 9: 2051-2059.



Svensson, P. and Albertsson, P. A. Preparation of highly enriched photosystem II membrane vesicles by a non-detergent method. *Photosynth. Res.*; 1989; 20: 249-259.

Tajmir-Riahi, H. A. and Ahmed, A. Complexation of copper and zinc ions with proteins of a light-harvesting complex (LHC II) of chloroplast thylakoid membranes studied by FT-IR spectroscopy. *J. Mol. Structure*; 1993; 297: 103-108.

Takahama, U. and Nishimura, M. Formation of singlet molecular oxygen in illuminated chloroplasts. Effects on photoactivation and lipid peroxidation. *Plant Cell Physiol.*; 1975; 16: 737-748.

Takahashi, M. and Asada, K. Sizes of Mn-binding sites in spinach thylakoids. *J. Biol. Chem.*; 1986; 261: 16923-16926.

Takahashi, Y., Hansson, Ö, Mathis, P. and Satoh, K. Primary radical pair in the photosystem II reaction centre. *Biochim. Biophys. Acta*; 1987; 893: 49-59.

Takahashi, Y., Satoh, K. and Itoh, S. Silicomolybdate substitutes for the function of a primary electron acceptor and stabilizes charge separation in the photosystem II reaction center complex. *FEBS Lett.*; 1989; 255: 133-138.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Telfer, A., de las Rivas, J. and Barber, J. *Biochim. Biophys. Acta*; 1991; 1060: 106-114.

Theg, S. M., Jursinic, P. A. and Homann, P. H. Studies on the mechanism of chloride action on photosynthetic water oxidation. *Biochim. Biophys. Acta*; 1984; 766: 104-111.

Thielen, A. P. G. M. and van Gorkon, H. J. Quantum efficiency and antenna size of photosystem II $\alpha$  and II $\beta$  and I in tobacco chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*; 1981; 635: 475-483.

Thompson, K. L. and Brudvig, W. G. Cytochrome b-559 may function to protect photosystem II from photoinhibition. *Biochemistry*; 1988; 27: 6653-6658.

Thornber, J. P., Peter, G. F., Chitnis, P. R., Nechushtai, R. and Vainstein, A. The light-harvesting complex of photosystem II of higher plants. In: *Light-Energy Transduction in Photosynthesis: Higher Plant and Bacterial Models* (S. E. Stevens, Jr. and D. A. Bryant, eds.); 1988: pp. 137-154. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.

Towbin, L., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1979; 76: 4350-4354.



Trebst, A. Inhibition of photosynthetic reactions on isolated chloroplasts by salicylaldoxime. *Z. Naturforsch.*; 1963: 817- 821.

Trebst, A. The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane. *Z. Naturforsch.*; 1986; 41: 240-245.

Tremolieres, A., Dubacq, J. P., Duval, J. C., Lemoine, Y. and Remy, R. Role of phosphatidylglycerol containing trans-hexadecenoic acid in oligomeric organization of the light-harvesting chlorophyll protein (LHCP). In: *Biochemistry and Metabolism of plant lipids* (J. F. G. M. Wintermans and P. J. C. and Kuiper, eds.); 1982: pp. 369-373. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

Tronrud, D. E., Schmidt, M. F. and Matthews, B. W. Structure and X-ray amino acid sequence of a bacteriochlorophyll-a protein from *Prosthecochloris aestuarii* refined at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*; 1986; 188: 443-454.

Uribe, E. G. and Stark, B. Inhibition of photosynthetic energy conversion by cupric ion. *Plant Physiol.*; 1982; 69: 1040- 1045.

Vallon, O., Wollman, F. A. and Olive, J. Studies on the cytochrome b6/f complex. II. Localization of the complex in the thylakoid membranes from spinach and *chlamydomonas reinhardtii*

---



## BIBLIOGRAFÍA

---

by immunocytochemistry and freeze-fracture analysis of b6/f mutants. *Photobiochem. Photobiophys.*; 1986; 12: 203-220.

van Best, A. J. and Mathis, P. Kinetics of reduction of the oxidized primary electron donor of photosystem II in spinach chloroplasts and in *Chlorella* cells in the microsecond and nanosecond time ranges following flash excitation. *Biochim. Biophys. Acta*; 1978; 503: 178-188.

van der Bolt, F. and Vermaas, W. Photoinactivation of photosystem II as studied with site-directed D2 mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta*; 1992; 1098: 247-254.

van Gorkom, H. J. Identification of the reduced primary electron acceptor of photosystem II as a bound semiquinone anion. *Biochim. Biophys. Acta*; 1974; 347: 439-442.

van Leeuwen, P. J., Vos, M. H. and Gorkom, H. J. Photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta*; 1990; 1018: 173-176.

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



van Mieghem, F. J. E., Satoh, K., Rutherford, A. W. A chlorophyll tilted 30° relative to the membrane in the photosystem II reaction centre. *Biochim. Biophys. Acta*; 1991; 1058: 379-385.

van Rensen, J. J. S., Tonk, W. J. M. and de Bruijin, S. M. Involvement of bicarbonate in the protonation of the secondary quinone electron acceptor of photosystem II via the non-haem iron of the quinone-iron acceptor complex. *FEBS Lett.*; 1988; 226: 354-361.

Vass, I., Deak, Z., Jegerschöld, C. and Styring, S. The accessory electron donor tyrosine-D of Photosystem II is slowly reduced in the dark during low-temperature storage of isolated thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta*; 1990; 1018: 41-46.

Vass, I., Deak, Z. and Hideg, E. Charge equilibrium between the water oxidizing complex and the electron donor tyrosine D in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*; 1990; 1017: 63-69.

Vass, I. and Styring, S. pH-dependent charge equilibria between tyrosine-D and the S-states in photosystem II. Estimation of relative midpoint redox potentials. *Biochemistry*; 1991; 30: 830-839.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Vass, I., Ono, T. and Inoue, Y. Removal of 33 kDa extrinsic protein specifically stabilizes the  $S_2Q_A$ -charge pair in photosystem II. FEBS Lett.; 1987; 211: 215-220.

Vaughn, K. C., Vierling, E., Duke, S.O. and Alberte, R. S. Immunocytochemical and cytochemical localization of photosystem I and II. Plant Physiol.; 1983; 73: 203-207.

Velthuys, B. R. Electron-dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II. FEBS Lett.; 1981; 126: 277-281.

Velthuys, B. R. and Visser, J. M. The reactivation of EPR signal II in chloroplasts treated with reduced dichlorophenolindophenol: Evidence against a dark equilibrium between two oxidation states of the oxygen evolving system. FEBS Lett.; 1975; 55: 109-112.

Vermaas, J. F. W. and Rutherford, W. A. EPR measurements on the effects of bicarbonate and triazine resistance on the acceptor side of photosystem II. FEBS Lett.; 1984; 175: 243- 248.

Vermaas, W. F. J., Dohnt, G. and Renger, G. Binding and release kinetics of inhibitors of  $Q_A^-$  oxidation in thylakoid membranes. Biochim. Biophys. Acta; 1984; 765: 74-83.



Vermaas, W. F. J., Charite, J. and Shen, G. Glu-69 of the D2 protein in photosystem II is a potential ligand to Mn involved in photosynthetic oxygen evolution. *Biochemistry*; 1990; 29: 5325-5332.

Vermaas, W. F. J. Molecular-biological approaches to analyze photosystem II structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*; 1993; 44: 457-481.

Vermaas, W. F. J. and Ikeuchi, M. Photosystem II. In: *The photosynthetic Apparatus: Molecular Biology and Operation. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 7B* (L. Bogorad and I. Vasil, eds.); 1991: pp. 25-111. Academic Press, San Diego.

Vermaas, W. F. J., Ikeuchi, M. and Inoue, Y. Protein composition of the photosystem II core complex in genetically engineered mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosyn. Res.*; 1988; 17: 97-113.

Vermaas, W. F. J., Charité, J. and Shen, G. Q<sub>A</sub> binding in D2 contributes to the functional and structural stability of photosystem II. *Z. Naturforsch.*; 1990; 45: 359-365.

Vermaas, W. F. J., Williams, J. G. K. and Arntzen, C. J. Sequencing and modification of psb B, the gene encoding the CP47

---



## BIBLIOGRAFÍA

---

protein of Photosystem II, in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biol.*; 1987; 8: 317-326.

Vermaas, W. F. J., Rutherford, A. W. and Hansson, O. Site-directed mutagenesis in photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Donor D is a tyrosyl residue in the D2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1988; 85: 8477-8481.

Vesk, M., Possingham, J. V. and Mercer, F. V. The effect of mineral nutrient deficiencies on the structure of the leaf cells of tomato, spinach and maize. *Aust. J. Bot.*; 1966; 14: 1-18.

Vierke, G. and Struckmeier, P. Binding of copper (II) to protein of the photosynthetic membrane and its correlation with inhibition of electron transport in class II chloroplasts of spinach. *Z. Naturforsch.*; 1977; 32: 605-610.

Visser, J. W., Ames, J. and Van Gelder, B. F. EPR signals of oxidized plastocyanin in intact algae. *Biochim. Biophys. Acta*; 1974; 333: 279.

Walker, C. D. and Webb, J. Copper in plants: forms and behaviour. In: *Copper in Soil and Plants* (J. F. Loneragan, A. D. Robson and R. D. Graham, eds); 1981: pp. 189-212. Academic Press, Sydney.



Wasielowski, M. R., Johnson, D. G., Seibert, M. and Govindjee. Determination of the primary charge separation rate in isolated photosystem II reaction centers with 500-fs time resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1989; 86: 524-528.

Webber, A. N., Packman, L., Chapman, D. J., Barber, J. and Gray, J. C. A fifth chloroplast-encoded polypeptide is present in the photosystem II reaction center complex. *FEBS Lett.*; 1989; 242: 259-262.

Webber, A. N., Hird, S. M. Packman, L. C. Dyer, T. A. and Gray, J. C. A photosystem II polypeptide is encoded by an open reading frame cotranscribed with genes for cytochrome b-559 in wheat chloroplast DNA. *Plant. Mol. Biol.*; 1989; 12: 141- 151.

Wechsler, T., Suter, F., Fuller, C. and Zuber, H. The complete amino acid sequence of the bacteriochlorophyll c binding polypeptide from chlorosomes of the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *FEBS Lett.*; 1985; 181: 173-178.

Welty, B. A., Morishige, D. T. and Thornber, J. P. Identity of a group of 13.5-20 KDa polypeptides whose apparent abundance decrease during plastid development. *Plant Cell Physiol.*; 1992; 33: 1049-1055.



## BIBLIOGRAFÍA

---

Westhoff, P., Farchaus, J. W. and Herrmann, R. J. The gene for the M, 10,000 phosphoprotein associated with photosystem II is part of the psbB operon of the spinach plastid chromosome. *Curr. Genet.*; 1986; 11: 165-169.

Whatley, F. R., Ordin, L. and Arnon, D. I. Distribution of micronutrient metals in leaves and chloroplast fragments. *Plant Physiol.*; 1951; 26: 414-.

Widger, W. R., Cramer, W. A. Hermodson, M. and Herrmann, R. G. Evidence for a hetero-oligomeric structure of the chloroplast cytochrome b-559. *FEBS Lett.*; 1985; 191: 186-190.

Yachandra, V. K., De Rose, V. J., Latimer, M. J., Mukerji, I., Sauer, K. and Klein, M. P. A structural model for the photosynthetic oxygen evolving manganese complex. In: *Research in Photosynthesis, Vol. 2* (N. Murata, ed.); 1992: pp. 281- 287. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Yachandra, V. K., DeRose, V. J., Latimer, M. J., Mukerji, I, Sauer, K. and Klein, M. P. A structural model for the photosynthetic oxygen evolving manganese complex. *Jpn. J. appl. Phys.*; 1993; 32: 523-526.

Yamaguchi, N., Takahashi, Y. and Satoh, K. Isolation and caracterización of a photosystem II core complex depleted in the



43 kDa chlorophyll-binding subunit. *Plant. Cell. Physiol.*; 1988; 29: 123-129.

Yamamoto, Y., Ueda, T., Shinkai, H. and Nishimura, M. Preparation of oxygen-evolving photosystem II subchloroplasts from spinach. *Biochim. Biophys. Acta*; 1982; 679: 347-350.

Yamashita, T. and Tomita, G. Light-reactivation of (Tris-washed)-DPIP-treated chloroplast: Manganese incorporation, chlorophyll fluorescence, action spectrum and oxygen evolution. *Plant. Cell. Physiol.*; 1976; 17: 571-582.

Yruela, I., Montoya, G., Alonso, P. J. and Picorel, R. Identification of the pheophytin- $Q_A$ -Fe domain of the reducing side of the photosystem II as the Cu(II)-inhibitory binding site. *J. Biol. Chem.*; 1991; 266: 22847-22850.

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

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

---



## BIBLIOGRAFÍA

---

Zankel, K. L. Biochim. Biophys. Acta; 1971; 245: 373-385.

Zilinskas, B. A. and Govindjee. Silicomolybdate and silicotunstate mediated dichlorophenylldimhetilurea- insensitive photosystem II reaction: Electron flow, chlorophyll a fluorescence and delayed light emission changes. Biochim. Biophys. Acta; 1975; 387: 306-319.

Zimmermann, J. L. and Rutherford, A. W. Photoreductant-induced oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the electron acceptor complex of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta; 1986; 851: 416-423.