

CITOCROMO c_6 Y PLASTOCIANINA DE LA CIANOBACTERIA
***Synechocystis* PCC 6803.**
ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN LAS
PROTEÍNAS NATIVAS Y MODIFICADAS POR MUTAGÉNESIS
DIRIGIDA

Berta de la Cerda Haynes
Sevilla, 1998

TD
200



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

TD-

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral CITOCROMO C6 Y PLASTOCIANINA DE LA CIANOBACTERIA SYNECHOCYSTIS SP PCC 6803. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN PROTEÍNAS NATIVAS Y MODIFICADAS sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- + Consulta en depósito.
- + Préstamo interbibliotecario.
- + Reproducción parcial.
- + Reproducción total.
- + Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado: Rosita de la Cerda Haynes

Sevilla, a 16 de JUNIO de 1999



CITOCROMO c_6 Y PLASTOCIANINA DE LA CIANOBACTERIA

Synechocystis PCC 6803.

**ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN LAS
PROTEÍNAS NATIVAS Y MODIFICADAS POR MUTAGÉNESIS
DIRIGIDA**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Biología por la Licenciada

Berta de la Cerda Haynes

Sevilla, a los 14 de Noviembre de 1998, número 332 del libro de correspondencia.

12 NOV. 1998

El Jefe del Negociado de Teoría

Sevilla, 1998

Directores

Dr. Miguel Ángel de la Rosa Acosta
Catedrático de Universidad

Dr. José Antonio Navarro Carruesco
Colaborador Científico del CSIC

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 5 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 7 |
| ABREVIATURAS | 9 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1.1 OBJETIVOS DE LA TESIS | 15 |
| 1.2 COMPONENTES DE LA CADENA FOTOSINTÉTICA | 15 |
| 1.2.1 Complejo de citocromos <i>b_f</i> | 16 |
| 1.2.2 Fotosistema I | 18 |
| 1.2.3 Plastocianina | 20 |
| 1.2.4 Citocromo <i>c₆</i> | 24 |
| 1.3 COMPARACIÓN ESTRUCTURAL ENTRE PLASTOCIANINA Y CITOCROMO <i>c₆</i> | 26 |
| 1.4 MECANISMOS DE REACCIÓN | 28 |
| 1.4.1 Oxidación del citocromo <i>f</i> | 28 |
| 1.4.2 Reducción de P700 | 29 |
| 1.5 ESTUDIOS TERMODINÁMICOS | 33 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 37 |
| 2.1 ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO | 39 |
| 2.1.1 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 | 39 |
| 2.1.2 <i>Escherichia coli</i> | 40 |
| 2.2 OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS DE FOTOSISTEMA I | 41 |
| 2.3 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES | 42 |
| 2.3.1 Obtención de células competentes y transformación de <i>E. coli</i> | 42 |
| 2.3.2 Cultivo de células transformadas para la purificación de proteínas | 43 |
| 2.3.3 Purificación de las proteínas recombinantes | 43 |
| 2.3.3.1 Obtención de la fracción periplásmica | 44 |
| 2.3.3.2 Precipitaciones con sulfato amónico | 44 |
| 2.3.3.3 Cromatografía de intercambio iónico | 45 |
| 2.3.3.3.1 DEAE-celulosa | 45 |
| 2.3.3.3.2 CM-celulosa | 45 |
| 2.3.3.4 Cromatoenfoco | 46 |
| 2.3.3.5 Cromatografía de filtración en gel por FPLC | 46 |
| 2.3.3.6 Concentración de proteínas | 46 |

| | |
|---|----|
| 2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS | 47 |
| 2.4.1 Medidas espectrofotométricas | 47 |
| 2.4.2 Medidas potenciométricas | 47 |
| 2.4.3 Espectros de EPR | 48 |
| 2.5 ESPECTROFOTOMETRÍA CINÉTICA INDUCIDA POR LÁSER | 48 |
| 2.5.1 Descripción del sistema | 49 |
| 2.5.2 Mezcla de reacción | 49 |
| 2.5.3 Análisis de los datos | 50 |
| 2.5.4 Cálculos termodinámicos | 51 |
| 2.6 DETERMINACIÓN POR CRISTALOGRAFÍA DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL TRIPLE MUTANTE A44D/D47P/A63L | 52 |
| 2.7 MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA IN VITRO | 53 |
| 2.7.1 Plásmidos utilizados | 53 |
| 2.7.2 Aislamiento de DNA | 53 |
| 2.7.3 Análisis de DNA | 54 |
| 2.7.3.1 Electroforesis de DNA en geles de agarosa | 54 |
| 2.7.3.2 Electroforesis de DNA en geles de acrilamida | 54 |
| 2.7.4 Cuantificación de DNA | 54 |
| 2.7.5 Extracción de DNA de un gel | 55 |
| 2.7.5.1 Extracción de geles de agarosa por congelación | 55 |
| 2.7.5.2 Extracción de geles de agarosa por unión a membranas de DEAE | 55 |
| 2.7.5.3 Extracción de DNA de geles de acrilamida | 56 |
| 2.7.6 Tratamientos enzimáticos | 56 |
| 2.7.7 Mutagénesis dirigida | 56 |
| 2.7.7.1 Estrategia general | 56 |
| 2.7.7.2 Diseño de los oligonucleótidos | 57 |
| 2.7.7.3 Preparación del DNA molde | 58 |
| 2.7.7.4 Reacción de PCR | 59 |
| 2.7.7.5 Clonación | 59 |
| 2.7.8 Secuenciación de DNA | 60 |
| 2.7.8.1 Secuenciación manual | 60 |
| 2.7.8.2 Secuenciación automática | 61 |

| | |
|---|-----------|
| 2.8 MODELIZACIÓN COMPUTERIZADA | 61 |
| 2.8.1 Modelización computerizada de la estructura del citocromo c_6 silvestre de <i>Synechocystis</i> | 61 |
| 2.8.2 Modelización computerizada del potencial de superficie de las proteínas silvestres y mutadas | 62 |
| 3. RESULTADOS | 63 |
| 3.1 OBTENCIÓN DE LOS GENES MUTADOS DE PLASTOCIANINA Y CITOCROMO c_6 | 66 |
| 3.2 ANÁLISIS DE LOS MUTANTES DE PLASTOCIANINA | 67 |
| 3.2.1 Producción de los mutantes de plastocianina | 67 |
| 3.2.2 Caracterización de las plastocianinas mutadas | 68 |
| 3.2.2.1 Espectro UV/Vis | 68 |
| 3.2.2.2 Potencial redox | 68 |
| 3.2.3 Determinación por difracción de rayos X de la estructura del triple mutante de plastocianina A42D/D47P/A63L | 69 |
| 3.2.3.1 Cristalización de la proteína | 69 |
| 3.2.3.2 Caracterización del triple mutante | 70 |
| 3.2.3.3 Plegamiento de la proteína | 71 |
| 3.2.3.4 Coordinación del cobre | 71 |
| 3.2.4 Reducción de PSI por las plastocianinas modificadas | 72 |
| 3.2.4.1 Análisis cinético | 72 |
| 3.2.4.2 Parámetros termodinámicos | 77 |
| 3.2.4.3 PSI defectivo en PsaF | 84 |
| 3.3 ANÁLISIS DE LOS MUTANTES DEL CITOCROMO c_6 | 86 |
| 3.3.1 Producción de los mutantes de citocromo | 86 |
| 3.3.2 Caracterización de los citocromos mutados | 87 |
| 3.3.2.1 Espectro UV/Vis | 87 |
| 3.3.2.2 Potencial redox y espectros de EPR | 88 |
| 3.3.3 Reducción de PSI por los citocromos modificados | 89 |
| 3.3.3.1 Análisis cinético | 89 |
| 3.3.3.2 Parámetros termodinámicos | 92 |

| | |
|--|------------|
| 4. DISCUSIÓN | 97 |
| 4.1 INTERÉS DE <i>Synechocystis</i> COMO ORGANISMO DE ESTUDIO | 99 |
| 4.2 PLASTOCIANINA | 100 |
| 4.2.1 Estructura del mutante triple de la plastocianina | 100 |
| 4.2.2 Estudios funcionales de la plastocianina | 102 |
| 4.3 CITOCROMO c_6 | 109 |
| 4.4 INTERACCIÓN DE PLASTOCIANINAS MUTANTES CON EL PSI DEFECTIVO EN PsAF | 112 |
| 5. CONCLUSIONES | 115 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 119 |
| 7. APÉNDICE | 137 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1: | Transferencia de electrones en la cadena fotosintética. | 16 |
| Figura 2: | Secuencia de transporte de electrones a través del centro de reacción del PSI. | 18 |
| Figura 3: | Modelo del centro de reacción del PSI. | 20 |
| Figura 4: | Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las Pc de los organismos eucariotas espinaca y <i>Enteromorpha prolifera</i> , y de los procariotas <i>Synechocystis</i> y <i>Anabaena</i> . | 22 |
| Figura 5: | Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los Cit del alga verde <i>Monoraphidium braunii</i> y de las cianobacterias <i>Synechocystis</i> y <i>Anabaena</i> . | 25 |
| Figura 6: | Comparación de las estructuras terciarias de Pc y Cit de organismos eucariotas y procariotas. | 27 |
| Figura 7: | Modelo de los tres posibles mecanismos de reacción entre Pc o Cit y PSI. | 31 |
| Figura 8: | Esquema del mecanismo de reacción tipo III. | 31 |
| Figura 9: | Disponibilidad de hierro y cobre, así como de sulfuro y sulfato a lo largo de la vida de la Tierra. | 32 |
| Figura 10: | Esquema y fotografía del aparato de espectrofotometría cinética inducida por láser. | 50 |
| Figura 11: | Esquema de la mutagénesis dirigida por PCR en dos pasos. | 57 |
| Figura 12: | Trayectoria de la dinámica molecular en agua del Cit de <i>Synechocystis</i> . | 62 |
| Figura 13: | Estructura modelada de la Pc y del Cit de <i>Synechocystis</i> , en las que se muestran las posiciones modificadas por mutagénesis dirigida. | 65 |
| Figura 14: | Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA procedentes de la 1ª y 2ª PCR por el procedimiento de mutagénesis dirigida utilizado. | 66 |
| Figura 15: | Análisis del fragmento de la secuencia de nucleótidos del gen de la Pc D47A que contiene la mutación, comparado con la misma región de DNA de la Pc silvestre. | 66 |
| Figura 16: | Espectro de absorción de la Pc D47R. | 68 |
| Figura 17: | Representación de Nernst de la titulación potenciométrica de la Pc A42D/D47P/A63L. | 69 |
| Figura 18: | Cristales del mutante triple de Pc A42D/D47P/A63L. | 70 |
| Figura 19: | Estructura del triple mutante de la Pc A42D/D47P/A63L de <i>Synechocystis</i> . | 71 |



| | |
|---|----|
| Figura 20: Coordinación del átomo de cobre en la Pc A42D/D47P/A63L de <i>Synechocystis</i> . | 71 |
| Figura 21: Trazos cinéticos a 820 nm que muestran la reducción del PSI de <i>Synechocystis</i> por la Pc silvestre y por los mutantes L12A y D44R/D47R. | 73 |
| Figura 22: Dependencia de la constante observada (k_{obs}) respecto a la concentración de Pc para la reducción del PSI de <i>Synechocystis</i> por la Pc silvestre y sus mutantes a pH 7,5 y 5,5. | 73 |
| Figura 23: Efecto de la fuerza iónica sobre la constante bimolecular (k_2) para la reducción del PSI de <i>Synechocystis</i> por la Pc silvestre y sus mutantes. | 75 |
| Figura 24: Dependencia de la constante observada (k_{obs}) respecto a la concentración de proteína del mutante D44R/D47R en distintas condiciones de fuerza iónica. | 77 |
| Figura 25: Variación de la k_2 con la fuerza iónica a distintas temperaturas, representación de Eyring, y representaciones de los parámetros termodinámicos del mutante de Pc L12A a distinta fuerza iónica. | 78 |
| Figura 26: (A) Correlación entre la entalpía (ΔH^\ddagger) y la entropía (ΔS^\ddagger) aparentes de activación para la reducción de PSI por los distintos mutantes de Pc, y (B) dependencia de la k_2 respecto a la energía libre aparente de activación (ΔG^\ddagger) para la reducción de PSI por la Pc D44K. | 79 |
| Figura 27: Energías de interacción ($\Delta\Delta G^\ddagger$) entre la Pc y el PSI frente a la diferencia de carga (Δq) entre las proteínas mutadas y la silvestre. | 81 |
| Figura 28: Efecto de la fuerza iónica sobre los cambios en la energía aparente de activación ($\Delta\Delta G^\ddagger$) para la interacción con el PSI de los mutantes de las posiciones 44 y 47 de la Pc. | 82 |
| Figura 29: Efecto de la fuerza iónica sobre los cambios en la energía aparente de activación ($\Delta\Delta G^\ddagger$) para la interacción con el PSI de los mutantes de las posiciones 12 y 33 de la Pc. | 83 |
| Figura 30: Efecto de la fuerza iónica sobre la entalpía aparente de activación, ΔH^\ddagger (●), y sobre la entropía aparente de activación, ΔS^\ddagger (□), para la reducción del PSI por la Pc K33E. | 84 |
| Figura 31: Dependencia de la constante observada de reacción (k_{obs}) respecto a la concentración del mutante de Pc D44R/D47R para la reducción del PSI silvestre y AFK6. | 86 |
| Figura 32: Espectro de absorción UV/Vis del Cit F64A. | 88 |
| Figura 33: Trazos cinéticos que muestran la reducción del PSI de <i>Synechocystis</i> por el Cit silvestre y por los mutantes D70R y R67D. | 89 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Figura 34: | Dependencia de la constante observada (k_{obs}) respecto a la concentración de Cit para la reducción del PSI de <i>Synechocystis</i> por el Cit silvestre y sus mutantes a pH 7,5 y 5,5. | 90 |
| Figura 35: | Efecto de la fuerza iónica sobre la constante bimolecular (k_2) para la reducción del PSI de <i>Synechocystis</i> por el Cit silvestre y sus mutantes. | 91 |
| Figura 36: | (A) Dependencia de la constante bimolecular (k_2) respecto a la fuerza iónica para la reducción del PSI por el Cit F64A a diferentes temperaturas, (B) efecto de la fuerza iónica sobre la energía libre (ΔG^\ddagger), y (C) efecto de la fuerza iónica sobre la entropía (ΔS^\ddagger) y entalpía (ΔH^\ddagger) aparentes de activación de la reacción. | 93 |
| Figura 37: | Efecto de la fuerza iónica sobre los cambios en la energía aparente de activación ($\Delta\Delta G^\ddagger$) para la interacción de los mutantes del Cit con el PSI. | 94 |
| Figura 38: | Superposición de las estructuras de las Pc de <i>Synechocystis</i> , álamo y <i>C. reinhardtii</i> , representadas como esqueletos de $C\alpha$. | 101 |
| Figura 39: | Modelos del potencial electrostático en la superficie de la Pc silvestre y algunos mutantes. | 104 |
| Figura 40: | Representación tridimensional en estereovisión (arriba) y esquema de los residuos de la zona norte de la Pc (izquierda). | 108 |
| Figura 41: | Modelos del potencial electrostático de superficie del Cit silvestre y algunos de sus mutantes. | 111 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabla 1: | Rendimiento obtenido en la producción en <i>E. coli</i> de la Pc silvestre y de los diferentes mutantes. Las cantidades se refieren a los extractos de periplasma de <i>E. coli</i> . | 67 |
| Tabla 2: | Potenciales redox de la Pc silvestre y de los mutantes a pH 7,0. | 69 |
| Tabla 3: | Constantes bimoleculares para la reacción de reducción del PSI por las Pc silvestre y mutante triple, en condiciones estándar (k_2) y extrapoladas a fuerza iónica infinita (k_{inf}). | 70 |
| Tabla 4: | Comparación de las distancias de enlace del cobre a sus ligandos en distintas Pc. | 72 |
| Tabla 5: | Constante bimolecular de la reacción de reducción del PSI por las distintas Pc en condiciones estándar (k_2) y extrapolada a fuerza iónica infinita (k_{inf}). | 74 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabla 6: | Parámetros aparentes de activación y valores de energía de interacción electrostática (ΔV_{el}) calculados a partir de las representaciones de Eyring en condiciones estándar para la reducción del PSI por Pc silvestre y sus mutantes. | 80 |
| Tabla 7: | Comparación de las constantes bimoleculares de la reacción de reducción del PSI silvestre y AFK6 por las distintas Pc silvestre y mutantes, en condiciones estándar (k_2) y extrapoladas a fuerza iónica infinita (k_{inf}). | 85 |
| Tabla 8: | Constantes de asociación y de transferencia de electrones para la reacción del mutante de Pc D44R/D47R con el PSI silvestre y con AFK6. | 86 |
| Tabla 9: | Comparación de la producción de Cit por las diferentes estirpes de <i>E. coli</i> ensayadas. | 87 |
| Tabla 10: | Rendimiento obtenido en la producción en <i>E. coli</i> del Cit silvestre y de los diferentes mutantes. Las cantidades se refieren a los extractos de periplasma de <i>E. coli</i> . | 87 |
| Tabla 11: | Potenciales redox del Cit silvestre y de los mutantes a pH 7,0. | 89 |
| Tabla 12: | Constantes bimoleculares de la reacción de reducción del PSI por los distintos Cit en condiciones estándar (k_2) y extrapoladas a fuerza iónica infinita (k_{inf}). | 91 |
| Tabla 13: | Parámetros aparentes de activación calculados a partir de las representaciones de Eyring para la reducción del PSI por el Cit silvestre y sus mutantes en condiciones estándar, y valores de ΔV_{el} correspondientes a la misma reacción. | 94 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| A | Absorbancia |
| Å | Årmstrong |
| atm | Atmósfera |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| Chl | Clorofila |
| Cit | Citocromo c_6 |
| Da | Dalton |
| DEAE | Dietilaminoetil |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DNasa | Desoxirribonucleasa |
| e^- | electrón |
| E | Einstein |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| $E_{m,7}$ | Potencial redox estándar aparente al valor de pH indicado |
| EPR | Resonancia paramagnética del electrón |
| Etidio | 3,8-diamino-6-etil-5-fenil fenentridio |
| Fd | Ferredoxina |
| FPLC | Cromatografía líquida de desarrollo rápido |
| g | Aceleración gravitatoria terrestre |
| h | Constante de Plank |
| IPTG | Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido |
| k_2 | Constante bimolecular de la reacción |
| K_A | Constante de asociación de los reactivos |
| k_B | Constante de Boltzmann |
| Kb | Miles de pares de bases |
| k_{et} | Constante de transferencia electrónica |
| k_{inf} | Constante cinética de la reacción a fuerza iónica infinita |
| k_{obs} | Constante de velocidad observada |
| K_R | Constante de reorganización |
| LB | Medio Luria-Bertani |
| M | Molar |
| MES | Ácido 2(N-morfolino)etanosulfónico |
| MOPS | Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico |
| NMR | Resonancia magnética nuclear |

| | |
|-------------------|--|
| ox | Oxidado |
| p/p | Relación peso-peso |
| p/v | Relación peso-volumen |
| P680 | Par especial de clorofilas del PSII |
| P700 | Par especial de clorofilas del PSI en su forma reducida |
| P700* | Forma excitada del P700 |
| P700 ⁺ | Forma oxidada del P700 |
| pb | Pares de bases |
| pBS | Plásmido pBluescript II SK+ |
| Pc | Plastocianina |
| PCC | Colección de cultivos del Instituto Pasteur |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| <i>petE</i> | Gen que codifica la plastocianina de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 |
| <i>petJ</i> | Gen que codifica el citocromo <i>c</i> ₆ de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 |
| pGEMT | Plásmido derivado de pGEM-5ZF(+) (Promega) |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| PQ | Plastoquinona |
| psi | Libras por pulgada cuadrada |
| PSI | Fotosistema I |
| PSII | Fotosistema II |
| R | Constante de los gases |
| red | Reducido |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| T | Temperatura |
| TES | Ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico |
| Tricina | Tris(hidroximetil)metilglicina |
| Tris | Tris(hidroximetil)aminometano |
| UV/Vis | Ultravioleta/visible |
| v/v | Relación volumen-volumen |
| V _{dd} | Potencial de interacción electrostática dipolo-dipolo |
| V _{id} | Potencial de interacción electrostática ión-dipolo |
| V _{ii} | Potencial de interacción electrostática ión-ión |
| V _T | Potencial electrostático total |
| X-Gal | 5-Bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactopiranosido |
| X _R | Término de Debye-Hückel |

| | |
|---------------------------|---------------------------------------|
| $\Delta\Delta G^\ddagger$ | Cambios en la energía de activación |
| ΔG^\ddagger | Energía libre aparente de activación |
| ΔS^\ddagger | Entropía aparente de activación |
| ΔH^\ddagger | Entalpía aparente de activación |
| ΔV_{el} | Energía de interacción electrostática |

Bases Nitrogenadas

| | |
|---|----------|
| A | adenina |
| C | citosina |
| G | guanina |
| T | timina |

Aminoácidos:

| | | |
|---|-----|--------------|
| A | Ala | alanina |
| R | Arg | arginina |
| N | Asn | asparagina |
| D | Asp | aspartato |
| C | Cys | citosina |
| E | Glu | glutamato |
| Q | Gln | glutamina |
| G | Gly | glicina |
| H | His | histidina |
| I | Ile | isoleucina |
| L | Leu | leucina |
| K | Lys | lisina |
| M | Met | metionina |
| F | Phe | fenilalanina |
| P | Pro | prolina |
| S | Ser | serina |
| T | Thr | treonina |
| W | Trp | triptófano |
| Y | Tyr | tirosina |
| V | Val | valina |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVOS DE LA TESIS

El estudio de los mecanismos de reconocimiento molecular y transferencia de electrones entre proteínas se ha abordado en este trabajo usando como modelo una parte de la cadena fotosintética de transporte de electrones de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. En concreto, se han utilizado el citocromo c_6 (Cit) y la plastocianina (Pc), dos proteínas estructuralmente muy diferentes pero que realizan la misma función: la reducción de la molécula de clorofila especial fotooxidada P700⁺ del fotosistema I (PSI). Se han obtenido distintas variantes de estas proteínas por mutagénesis dirigida y, por medio de análisis cinéticos de espectrofotometría láser, se ha tratado de elucidar los factores que hacen posible esta identidad funcional, y profundizar en el conocimiento de los mecanismos de transferencia de electrones.

1.2 COMPONENTES DE LA CADENA FOTOSINTÉTICA

En las células fotosintéticas se encuentran una serie de complejos proteicos supramoleculares embebidos en la membrana tilacoidal e interconectados por pequeñas proteínas y moléculas solubles, que son en su conjunto responsables de la transferencia de electrones inducida por luz (Hall y Rao, 1994). Hay tres complejos de membrana: El PSI, que reduce a la proteína de hierro-azufre ferredoxina, o alternativamente, en ausencia de hierro, a la flavoproteína flavodoxina; el fotosistema II (PSII), que toma los electrones del agua; y el complejo de citocromos b_6/f , que acepta los electrones del PSII y los transfiere al PSI. Los dos fotosistemas contienen moléculas de clorofila que son excitadas por la luz solar y proporcionan la energía necesaria para que los electrones “suban” desde el agua a la ferredoxina (o flavodoxina). Los pigmentos fotoactivos son P700 en PSI y P680 en PSII, y en ambos casos están constituidos por dímeros de clorofila. Hay un cuarto complejo de membrana, la ATP sintetasa, que transduce la energía del gradiente de protones generado por la cadena fotosintética en ATP.

Los diferentes complejos proteicos integrados en la membrana se ponen en contacto gracias a transportadores móviles que actúan como lanzaderas de electrones. Éstos son las moléculas de plastoquinona, que transfieren electrones desde el PSII al complejo b_6/f , y las metaloproteínas solubles que transportan los electrones desde el complejo b_6/f al PSI. Las quinonas se encuentran en la membrana y se mueven libremente en ella. Las metaloproteínas (Pc y Cit) son transportadores redox solubles en medio acuoso que se localizan en la cara interna de la membrana tilacoidal. La Figura 1 muestra cómo se realiza la transferencia de



electrones por estas dos metaloproteínas. La proteína oxidada, Pc (Cu^{2+}) o Cit (Fe^{3+}), acepta un electrón del citocromo *f*. Luego, la proteína así reducida se mueve libremente por el lumen tilacoidal hasta que se encuentra con un PSI, le da un electrón al P700^+ y se separa del PSI para iniciar un nuevo ciclo.

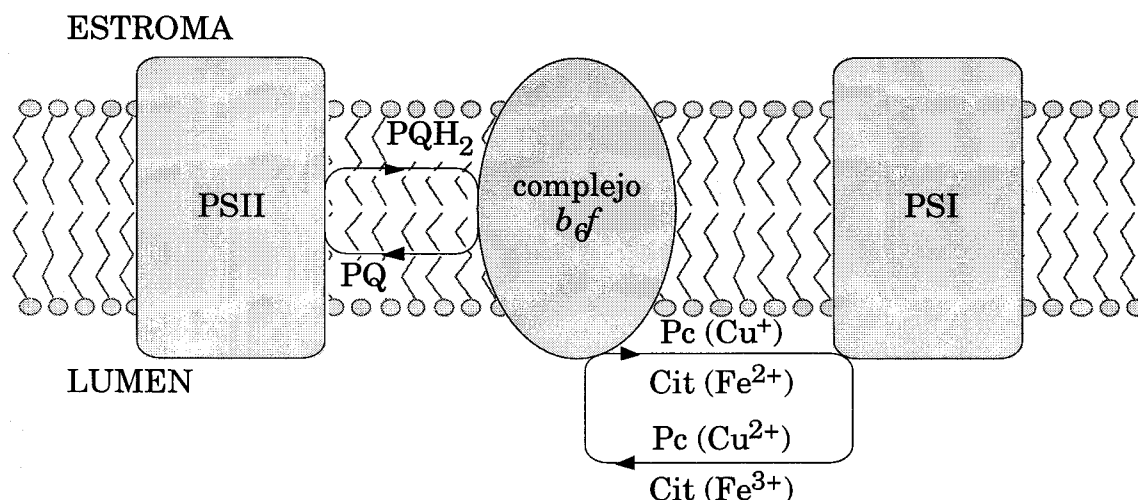


Figura 1: Transferencia de electrones en la cadena fotosintética.

En el esquema se muestra cómo el PSII da los electrones al complejo de citocromos *b₆f* por medio de las quinonas que se encuentran dentro de la membrana (PQ). Los electrones de este complejo llegan al P700^+ del PSI gracias a los transportadores móviles Pc y Cit, que se mueven libremente por el lumen tilacoidal.

A continuación se dan algunos detalles de los componentes de la cadena fotosintética que interesan al estudio realizado en esta tesis.

1.2.1 Complejo de citocromos *b₆f*

Este complejo funciona como una óxido-reductasa de membrana que acepta electrones del plastoquinol y los dona a la cuproproteína Pc o, alternativamente en ausencia de cobre, a la hemoproteína Cit (Kallas, 1994; Cramer *et al.*, 1996). El complejo actúa, pues, como un convertidor redox $2e^-/1e^-$ y no sólo es un enzima redox, sino también una bomba de protones que utiliza la diferencia de potencial entre su donador y sus aceptores de electrones (0,4 V) para generar un gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal. A diferencia de otros complejos de membrana, el complejo de citocromos *b₆f* se distribuye homogéneamente en la membrana tilacoidal de plantas superiores, algas verdes y cianobacterias (Alfred y Staehelin, 1985; Kallas, 1994). Se ha propuesto la existencia de dímeros funcionales del complejo (Cramer *et al.*, 1992). La mayor parte de las conclusiones sobre la estructura y la función del

complejo respiratorio bc_1 , cuya estructura completa se ha resuelto recientemente (Iwata *et al.*, 1998), se ha extrapolado al citocromo b_6f .

El complejo de citocromos b_6f se compone de cuatro subunidades proteicas: el citocromo f , que es un citocromo de tipo c de alto potencial; la proteína de Rieske, que es una proteína con un centro [2Fe-2S] de alto potencial; el citocromo b_6 , que es de tipo b de bajo potencial con dos grupos hemo; y la subunidad IV, que no lleva ningún cofactor redox (Hauska *et al.*, 1983; Malkin, 1992).

El citocromo f es un componente de membrana que transfiere los electrones desde la proteína de Rieske a la Pc o al Cit. Lo describieron por primera vez Hill y Scarisbrick en 1951 y fue detectado por su banda α característica a 554 nm en su forma reducida. Tiene un potencial redox estándar ($E_{m, \gamma}$) de +365 mV y una masa molecular de 30 kDa. En plantas superiores presenta una secuencia de 285 aminoácidos con un alto grado de conservación de su secuencia (80 %) (Gray, 1992). En cianobacterias, sin embargo, la secuencia es muy variable por los cambios en residuos cargados (Kallas, 1994). Existe una secuencia de diez residuos cerca del extremo amino conservada en diferentes organismos y que incluye la secuencia Cys-X-X-His para la unión del hemo. La cadena polipeptídica contiene muchos residuos cargados no conservados, de forma que el punto isoeléctrico puede ser ácido (en algunas cianobacterias) o muy básico (en algas verdes y plantas). Esta variabilidad del punto isoeléctrico tiene sentido teniendo en cuenta su interacción electrostática con la Pc y el Cit. Se ha propuesto que el citocromo f está anclado a la membrana por una sola α -hélice transmembranal cercana al extremo carboxilo (Willey *et al.*, 1984; Szczepaniak *et al.*, 1989). De hecho, la mayor parte de la proteína es hidrófila y globular, se encuentra expuesta al lumen tilacoidal y sólo 15 residuos del extremo carboxilo aparecen expuestos a la otra cara de la membrana tilacoidal (estroma o citoplasma).

Recientemente se ha resuelto la estructura de la parte hidrófila soluble del citocromo f de rábano a una resolución de 2,3 Å (Martínez *et al.*, 1994). Esta molécula parece ser muy diferente a otros citocromos tipo c , ya que es alargada y contiene dos dominios planos formados cada uno por dos hojas β antiparalelas. Sólo contiene tres α -hélices cortas, dos de las cuales forman el sitio de unión del hemo. Presenta además una coordinación inusual His-Tyr en la que el sexto ligando es el grupo α -amino de la Tyr1. De los dos dominios, el pequeño parece involucrado en la unión de la Pc y el Cit y el dominio grande, más cercano a la membrana, sería el sitio para la interacción con la proteína de Rieske.

1.2.2 Fotosistema I

El PSI es un complejo de proteínas heteromultimérico integral de membrana, en el cual algunas de las proteínas sirven como soporte de cofactores funcionales que forman una cadena redox por donde los electrones circulan desde la Pc o el Cit, en el lumen, a la ferredoxina o flavodoxina, en el estroma (eucariotas) o citoplasma (cianobacterias). La reacción comienza cuando un fotón excita el dímero de clorofilas P700, que se encuentra muy próximo al lumen tilacoidal. La molécula fotoexcitada de clorofila P700* transfiere un electrón energizado a la cercana molécula de clorofila A₀, que lo cede a la filoquinona A₁, y ésta, a su vez, a los grupos sulfoférricos F_X, F_A y F_B. Por último, el electrón es aceptado en la otra cara de la membrana por ferredoxina o flavodoxina. La molécula de clorofila P700 queda entonces oxidada y se cierra el ciclo al tomar ésta un electrón del Cit o de la Pc (Brettel, 1997) (Figura 2). Hay que comentar que todas estas reacciones son reversibles, y por tanto, para trabajar con una población estable de P700⁺, es necesario añadir a la preparación de PSI un oxidante exógeno como el metil viológeno, cuyo E_{m,7} = 440 mV le permite tomar los electrones del PSI, probablemente a nivel de los centros sulfoférricos F_A y F_B.

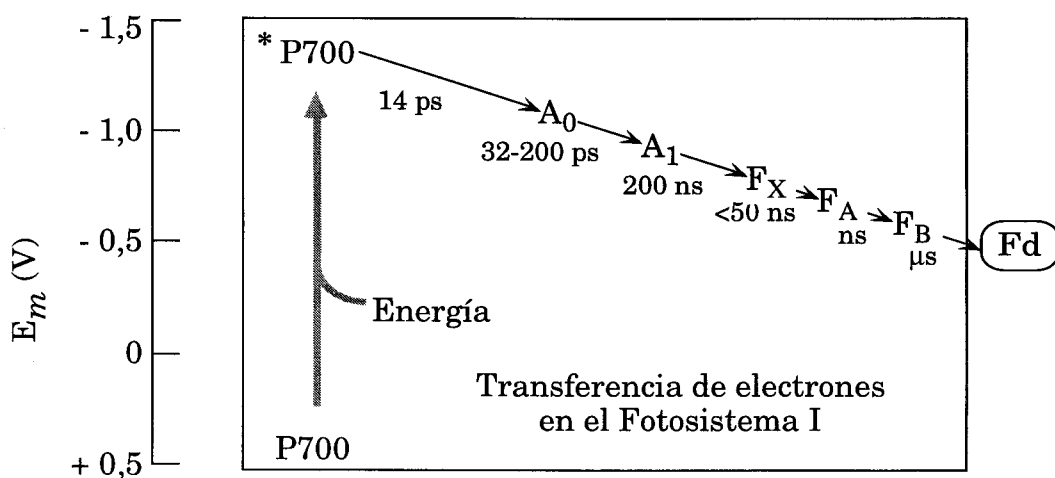


Figura 2: Secuencia de transporte de electrones a través del centro de reacción del PSI.

Fd indica ferredoxina y los números son el tiempo medio de reacción de cada transferencia electrónica.

El PSI se distribuye de forma asimétrica en la membrana tilacoidal, localizándose fundamentalmente en las zonas no apiladas de membrana de los cloroplastos (Anderson y Melis, 1983) o en la parte externa de los tilacoides cianobacterianos (Sherman *et al.*, 1994). El PSI puede aislarse en forma de monómeros o trímeros, y aunque la forma natural parece

ser la de trímero, varios estudios demuestran que el PSI monomérico es tan funcional como el trimérico (Kruip *et al.*, 1993; Van der Lee *et al.*, 1993). La única diferencia funcional observada parece ser la mayor dificultad en la formación del estado de transición en ausencia de trímeros (Golbeck, 1994).

El PSI está compuesto al menos por 12 subunidades diferentes, todas ellas presentes en una copia por cada monómero del centro de reacción (Bruce y Malkin, 1988). Las subunidades se nombran como PsaX y su gen correspondiente como *psaX*, siendo codificados en los organismos eucariotas por genes nucleares y cloroplásticos. La mayoría de estos genes se han clonado y caracterizado (Chitnis *et al.*, 1995). La estructura y la función de las subunidades del PSI son muy parecidas en todos los organismos fotosintéticos, siendo la principal diferencia la presencia de los complejos colectores de luz asociados a los PSI eucariotas (Wollman y Bennoun, 1982; Lam *et al.*, 1984) y la ausencia de algunas subunidades en procariotas. En la Figura 3 se muestra un esquema simplificado de las subunidades del PSI.

Las proteínas del PSI pueden dividirse en dos grupos, según su localización en la membrana: polipéptidos integrales de membrana, como PsaA, PsaB, PsaF, PsaG, PsaI, PsaJ, PsaK, PsaL y PsaM, y polipéptidos periféricos, como PsaC, PsaD, PsaE, PsaH y PsaN. Las subunidades PsaG, PsaH y PsaN existen sólo en plantas y algas verdes, y la subunidad PsaM se ha detectado sólo en cianobacterias. PsaA, PsaB y PsaC soportan los cofactores redox y el resto de las subunidades no contienen ningún centro de transferencia de electrones (Ikeuchi, 1992), aunque algunas de ellas contienen clorofila.

Las subunidades PsaA y PsaB forman el centro del complejo del PSI (Fish y Bogorad, 1986) y son codificadas por los genes *psaA* y *psaB*, localizados en el DNA cloroplástico de plantas y algas. Estas dos subunidades, con una masa molecular estimada de 82 kDa cada una, son muy homólogas y sus secuencias están muy conservadas (Golbeck, 1994). Ambas presentan once dominios hidrófobos (Fish y Bogorad, 1986), ocho de ellos formando α -hélices transmembranales. El heterodímero PsaA/PsaB, que atraviesa la membrana y protrude por las dos caras de ésta, contiene cuatro cisteínas que unen el centro sulfoférrico F_x , así como tres histidinas para unir P700 y/o A_0 . Estas dos subunidades también unen dos moléculas de filoquinona, una de las cuales forma parte de la cadena redox (A_1). El heterodímero PsaA/PsaB contiene también unas 100 moléculas de clorofilas antena.

La subunidad PsaF parece ser otra molécula integral de membrana, aunque se consideraba como periférica hasta hace poco (Golbeck, 1994; Chitnis *et al.*, 1995). Esta subunidad, con una masa molecular aparente de 15 kDa, contiene una región hidrófoba en la mitad de su secuencia que probablemente forma una α -hélice transmembranal. Su punto isoeléctrico es muy variable, según la procedencia de la proteína: es aproximadamente 9,0 en

plantas superiores y algas verdes (Golbeck, 1992) y en torno a 5,5 en algunas cianobacterias (Golbeck, 1994).

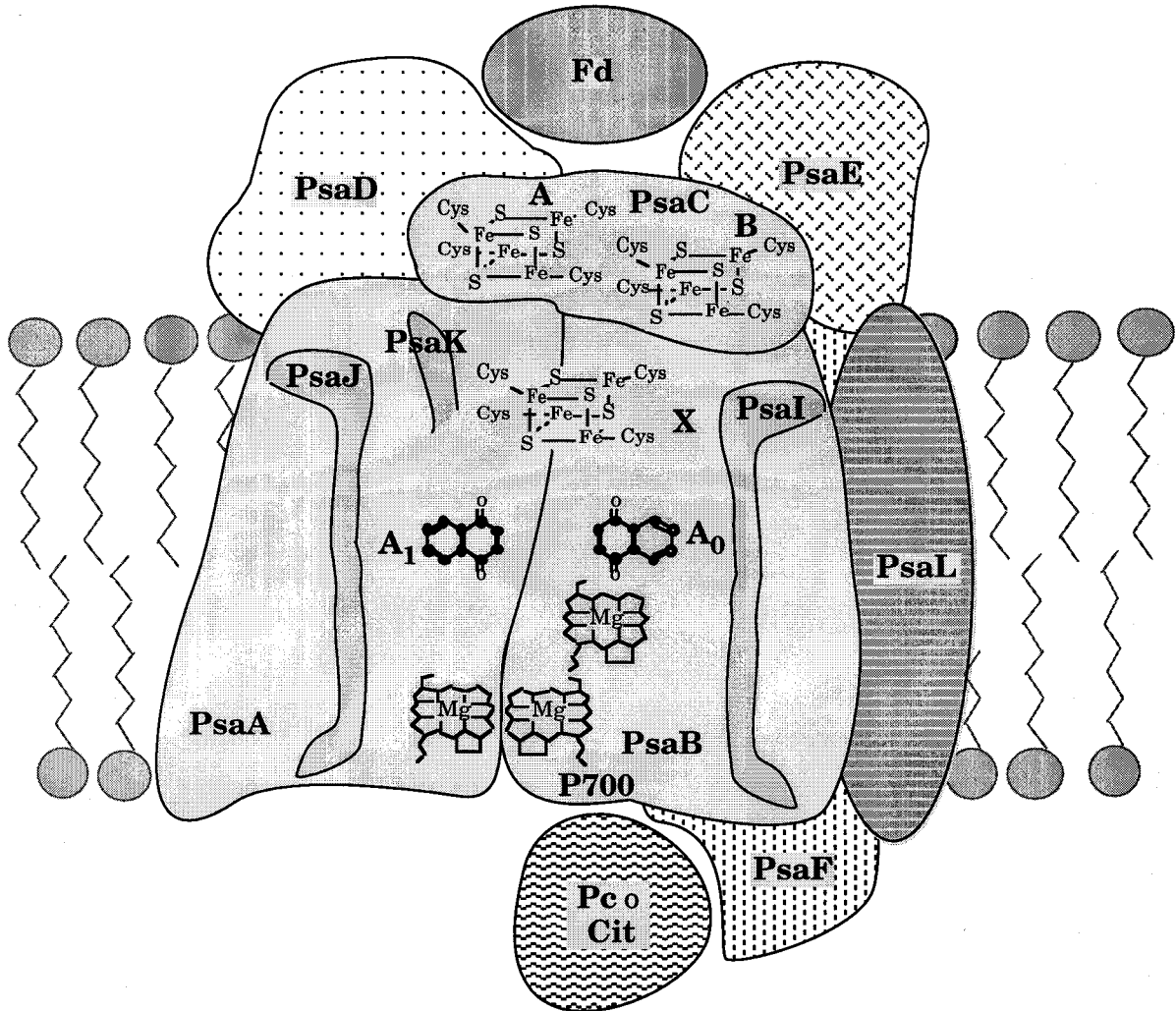


Figura 3: Modelo del centro de reacción del PSI.

Se presentan sólo los péptidos comunes a cianobacterias y eucariotas. PsaC, D y E se encuentran en la cara del estroma o del citoplasma, según el organismo. PsaI, J, F y L atraviesan la membrana.

1.2.3 Plastocianina

La Pc es una cuproproteína con una masa molecular de 10,5 kDa aproximadamente y un potencial redox de +370 mV a pH neutro, que contiene un átomo de cobre unido a una cadena de unos 99 aminoácidos. La naturaleza y estructura de los ligandos del cobre son la causa del color azul intenso de la proteína oxidada, característico de las cuproproteínas de tipo

I, con un máximo de absorción a 600 nm que se debe a la transferencia de carga que se produce en el corto enlace (Cys84)S-Cu entre el ligando y el metal como consecuencia del solapamiento de sus orbitales (Sigfridsson, 1998). Otras proteínas similares, como azurina y estellacianina, muestran también este espectro característico (Sykes, 1985; Redinbo *et al.*, 1994).

El gen que codifica la Pc es *petE*, de localización nuclear en plantas superiores y algas verdes (Grossman *et al.*, 1982). La Pc se sintetiza en el citoplasma como un precursor que lleva un péptido de tránsito. La preapoplastocianina es transportada a través de la envuelta cloroplástica (en células eucariotas) y/o la membrana tilacoidal (en cianobacterias) (Van der Plas *et al.*, 1989; Merchant *et al.*, 1990). Se conoce la secuencia de aminoácidos de las Pc de muchos organismos (Sykes, 1985; Briggs *et al.*, 1990; Redinbo *et al.*, 1994). En la Figura 4 se muestra el alineamiento de secuencias de Pc de organismos eucariotas (como la planta superior espinaca y el alga verde *Enteromorpha prolifera*) y de organismos procariotas (como las cianobacterias *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Anabaena* sp. PCC 7120). La homología de secuencia es bastante alta entre los organismos eucariotas, en comparación con los procariotas. Los residuos conservados incluyen los cuatro ligandos del átomo de cobre (His37, His87, Cys84 y Met92), así como la Tyr83, entre otros. La mayor variabilidad reside en los residuos cargados, de forma que cambia también la carga global de la proteína: en los organismos eucariotas la Pc es ácida, con un punto isoeléctrico en torno a 4; es casi neutra en cianobacterias como *Synechocystis*, con un punto isoeléctrico cercano a 6; y es básica en otras cianobacterias como *Anabaena*, con un punto isoeléctrico de 9, aproximadamente (Sykes, 1985; Medina *et al.*, 1993; Díaz *et al.*, 1994a).

Se conoce también la estructura de la Pc de distintos organismos. En primer lugar se determinó por difracción de rayos X la estructura de la Pc de álamo a 1,6 Å de resolución, refinada posteriormente hasta 1,33 Å (Guss y Freeman, 1983; Guss *et al.*, 1992). Otras estructuras obtenidas asimismo por difracción de rayos X son las de las Pc de las algas verdes *Enteromorpha prolifera* (a 1,85 Å) y *Chlamydomonas reinhardtii* (a 1,5 Å) (Collyer *et al.*, 1990; Redinbo *et al.*, 1993). Por otra parte, se ha resuelto mediante NMR la estructura de la Pc del alga verde *Scenedesmus obliquus*, así como de judía verde y perejil (Moore *et al.*, 1988; Bagby *et al.*, 1994) y de la cianobacteria *Anabaena* (Badsberg *et al.*, 1996). La comparación de todas las estructuras indica que la Pc posee un plegamiento global casi idéntico en todas ellas, con ocho cadenas conectadas por siete lazos. Siete de las cadenas presentan una conformación β mientras que la quinta cadena es bastante irregular y contiene una corta α -hélice. La forma global de la proteína es de cilindro aplanado o sandwich- β con unas dimensiones aproximadas de 40 x 28 x 32 Å³ y el átomo de cobre en el *extremo norte* de la molécula (Guss *et al.*, 1986).

El átomo de cobre se encuentra cerca de la superficie de la proteína, aunque no expuesto al solvente, en un bolsillo formado por residuos hidrófobos conservados, y está coordinado por dos nitrógenos de los anillos imidazol de las histidinas 37 y 87 y dos azufres de la Cys84 y la Met92. De todos los ligandos, la His87 es el único expuesto al solvente (Guss y Freeman, 1983; Redinbo *et al.*, 1994). La geometría del sitio activo en tetraedro distorsionado (Guss y Freeman, 1983) podría explicar el alto valor de potencial redox que tiene la Pc (+370 mV, a pH neutro) (Garrett *et al.*, 1984). La estructura cristalina de la Pc es estable en el intervalo de pH de 4 a 6 (Guss y Freeman, 1983; Guss *et al.*, 1986). Sin embargo, la geometría del sitio activo de la proteína reducida sufre importantes modificaciones a pH ácido debido a la protonación de la His87 (Kojiro y Markley, 1983; Sinclair-Day *et al.*, 1985). De hecho, la protonación de este residuo a pH inferior a 5 hace que la His87 gire y se aleje del átomo de cobre, de forma que se rompe el enlace Cu-His87. Así, el sitio activo de la Pc debe considerarse en equilibrio entre el tetraedro distorsionado a alto pH y la forma trigonal plana que se genera a bajo pH (Bagby *et al.*, 1994). La distinción entre estos dos tipos de Pc reducida es muy importante dado que a bajo pH la molécula es cinéticamente inactiva para su oxidación por complejos inorgánicos (Segal y Sykes, 1978; Sykes, 1985). De todos modos, hay que tener en cuenta que el pH fisiológico para la Pc dentro del tilacoide iluminado está entre 4,5 y 5 (Portis y McCarty, 1976).

| Plastocianina | 1 | | 10 | | 20 | | 30 | |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|-----------|-------|
| Espinaca | VEV | LLGGG | DGSLA | FLPGD | FSVAS | GEEIV | FKNNA | GFPHN |
| <i>Enteromorpha</i> | AAIV | KLGGD | DGSLA | FVPNN | ITVGA | GESIE | FINNA | GFPHN |
| <i>Synechocystis</i> | ANATV | KMGSD | SGALV | FEPST | VTIKA | GEEVK | WVNNK | LSPHN |
| <i>Anabaena</i> | ETYTV | KLGS D | KGLLV | FEPAK | LTIKP | GDTVE | FLNNK | VPPHN |
| | 40 | | 50 | | 60 | | 70 | |
| Espinaca | VVFDE | DEIPS | --GVD | AAKIS | MSEED | LLNAP | GETYK | VTLTE |
| <i>Enteromorpha</i> | IVFDE | DAVPA | --GVD | ADAIS | A-E-D | YLNSK | GQTVV | RKLTT |
| <i>Synechocystis</i> | IVFAA | DGVDA | ---DT | AAKLS | HK--G | LAFAA | GESFT | STFTE |
| <i>Anabaena</i> | VVFDA | ALNPA | KSADL | AKSLS | HK--Q | LLMSP | GQSTS | TTFPA |
| | | 80 | | 90 | | | | |
| Espinaca | ---KG | TYKFY | CSPHQ | GAGMV | GKVTV | N | | |
| <i>Enteromorpha</i> | ---PG | TYGVY | CDPHS | GAGMK | MTITV | Q | | |
| <i>Synechocystis</i> | ---PG | TYTY Y | CEPHR | GAGMV | GKVVV | E | | |
| <i>Anabaena</i> | DAPAG | EYTFY | CEPHR | GAGMV | GKITV | AG | | |

Figura 4: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las Pc de los organismos eucariotas espinaca y *Enteromorpha prolifera*, y de los procariotas *Synechocystis* y *Anabaena*.

La numeración de los residuos corresponde a la Pc de espinaca.

La región plana que rodea a la His87 se conoce como zona hidrófoba o cara norte. En los organismos eucariotas, esta región incluye los residuos Leu12, Ala33, Gly34, Phe35, Pro36, Pro86, Gly89 y Ala90 (Guss *et al.*, 1992; Redinbo *et al.*, 1994), aunque en cianobacterias se pueden encontrar otros residuos distintos en las posiciones 33 a 35 (Figura 4). Los resultados de experimentos de modificación química y mutagénesis dirigida han llevado a la conclusión de que la región hidrófoba es el sitio de transferencia de electrones al PSI (Anderson *et al.*, 1987; Nordling *et al.*, 1991; Haehnel *et al.*, 1994; Sigfridsson *et al.*, 1996). El anillo imidazol de la His87 expuesto al solvente es la distancia más corta desde el átomo de cobre a la superficie (6 Å) y muy probablemente es el camino de los electrones hacia el dímero de clorofila fotooxidado P700⁺ (ver apartado 1.4.2).

Otro sitio de unión posible para la interacción de proteínas redox con la Pc es la región que rodea a la Tyr83, que se encuentra a 19 Å del átomo de cobre. La Tyr83 está expuesta al solvente y, en plantas, se encuentra rodeada de residuos con carga negativa en las posiciones 42 a 45 y 59 a 61 (Sykes, 1985; Guss *et al.*, 1986; Redinbo *et al.*, 1994). Estas dos regiones ácidas forman la cara este o zona negativa de la Pc de plantas, la única región de superficie con concentración de cargas (Durell *et al.*, 1990). En algas verdes, aunque pueden ocurrir modificaciones en la distribución de cargas negativas (en la zona de los residuos 59 a 61), la cara este mantiene en lo fundamental su carácter ácido (Collyer *et al.*, 1990; Redinbo *et al.*, 1994). Es importante destacar que si bien la zona negativa está muy conservada en plantas superiores y algas verdes, la mayoría de estos residuos son reemplazados por otros neutros o con carga positiva en cianobacterias como *Anabaena* y *Synechocystis* (Briggs *et al.*, 1990; Redinbo *et al.*, 1994) (Figuras 4 y 6); de hecho, se ha propuesto que la zona negativa es una adquisición tardía en la evolución de las Pc (Moore *et al.*, 1988).

Se ha sugerido que la interacción de la Pc con el citocromo *f*, que es de tipo electrostático (Qin y Kostic, 1992; Meyer *et al.*, 1993), ocurre por medio de la interacción de esta región negativa de la cara este de la Pc con residuos lisina y arginina del citocromo *f* (Takabe *et al.*, 1986; Anderson *et al.*, 1987; Adam y Malkin, 1989; Christensen *et al.*, 1990; He *et al.*, 1991; Modi *et al.*, 1992a; Betts *et al.*, 1992). También se ha propuesto que la cara este de la Pc interviene en la unión con el PSI, ya que las mutaciones en esta zona inducen cambios en la tasa de reducción del PSI (Sigfridsson *et al.*, 1996). De todos estos datos se puede inferir que tanto la zona hidrófoba como la negativa intervienen en la unión con el PSI, y que la interacción con el citocromo *f* tiene lugar entre la cara este de la Pc y residuos positivos del citocromo *f*. En ambos casos, la transferencia de electrones tendría lugar por la His87.

1.2.4 Citocromo c_6

El Cit (antes llamado citocromo c -553 debido al máximo de absorción de su banda α) es una hemoproteína soluble, de 83 a 89 aminoácidos, con una masa molecular de aproximadamente 10 kDa y un potencial redox de +350 mV a pH neutro (Cohn *et al.*, 1989; Moore y Pettigrew, 1990; Campos *et al.*, 1993). Como ya se ha indicado, el Cit sustituye a la Pc en la mayoría de cianobacterias y algas eucariotas como transportador de electrones entre el complejo de citocromos b_f y el PSI (Davis *et al.*, 1980; Sandmann, 1986; Hervás *et al.*, 1995). El papel fisiológico equivalente de Pc y Cit se refleja no sólo en su tamaño y potencial redox similares, sino en la variación paralela que sufren sus puntos isoelectrónicos de unos organismos a otros, de modo que Pc y Cit son ácidos en algas verdes, como lo es la Pc en plantas, y pueden ser neutros o básicos en cianobacterias (Ho y Krogmann, 1984; Hervás *et al.*, 1995).

El Cit es un citocromo de tipo c con un solo hemo de bajo spin. El grupo hemo se une de forma covalente a la cadena polipeptídica, con la secuencia típica Cys-X-Y-Cys-His del extremo amino terminal (Moore y Pettigrew, 1990; Campos *et al.*, 1993; Kerfeld *et al.*, 1995). El Cit del alga verde *Monoraphidium braunii* presenta unos espectros de EPR y Mössbauer que indican la existencia de dos formas ácido-base interconvertibles con un $pK_a = 5$, mostrando una de ellas un tipo de coordinación axial Met-His inusual (Campos *et al.*, 1993).

El gen *petJ* que codifica el Cit es nuclear en eucariotas, como el gen *petE* de la Pc. El Cit se sintetiza en el citoplasma como preapocitocromo, con un péptido de tránsito para ser translocado al lumen de los tilacoides (cianobacterias) y/o del cloroplasto (eucariotas). (Merchant y Bogorad, 1987; Bovy *et al.*, 1992a). En la mayoría de los organismos, la síntesis de Pc y Cit está regulada a nivel transcripcional por los niveles de cobre (Bovy *et al.*, 1992b). En el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, sin embargo, la transcripción de *petJ* se inhibe por cobre, mientras que la síntesis de Pc se controla postraduccionalmente de modo que la preapoplastocianina es degradada en ausencia de cobre (Hill y Merchant, 1992).

Se conocen las secuencias de los Cit de más de 20 algas verdes y cianobacterias (Kerfeld *et al.*, 1995). En la Figura 5 se muestra el alineamiento de la secuencia del alga verde *Monoraphidium braunii* y de las dos cianobacterias *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Anabaena* sp. PCC 7120 (Campos *et al.*, 1993; Ghassemian *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994). Las regiones más conservadas incluyen los residuos 7-22 y 49-68, que contienen los ligandos del hemo His19 y Met61, así como la secuencia 76-80. El Asp3 del extremo N-terminal y el Trp89 del extremo C-terminal también están muy conservados. La región 69-72 se compone

de residuos de carga negativa y está muy conservada en los Cit de eucariotas, pero no en cianobacterias (Cohn *et al.*, 1989; Kerfeld *et al.*, 1995).

Como ya se ha comentado, aunque la estructura de la Pc es bien conocida la información estructural del Cit es mucho más reciente. En 1995 se determinó por cristalografía la estructura del Cit de las algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* y *Monoraphidium braunii* a 1,9 y 1,2 Å de resolución, respectivamente (Kerfeld *et al.*, 1995; Frazão *et al.*, 1995). La estructura por rayos X del Cit de *Monoraphidium braunii* se determinó por métodos *ab initio* a partir de datos de espectro originales; más recientemente se ha resuelto la estructura de este mismo Cit por NMR, tanto en su forma oxidada como reducida (Banci *et al.*, 1996; 1998). También por NMR se ha resuelto la estructura del Cit de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* (Beißinger *et al.*, 1998).

| Citocromo | 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
|----------------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|----|
| <i>Monoraphidium</i> | EADLA | LGKAV | FDGNC | AACHA | GGGNN | VIPDH | TLQKA | |
| <i>Synechocystis</i> | ADLA | HGKAI | FAGNC | AACHN | GGLNA | INPSK | TLKMA | |
| <i>Anabaena</i> | ADSV | NGAKI | FSANC | ASCHA | GGKNL | VQAQK | TLKKA | |
| <i>Monoraphidium</i> | AIEQF | LDGGF | NIEAI | VYQIE | NGKGA | MPAWD | GRLDE | |
| <i>Synechocystis</i> | DLEAN | --GKN | SVAAI | VAQIT | NGNGA | MPGFK | GRISD | |
| <i>Anabaena</i> | DLEKY | --GMY | SAEAI | IAQVT | NGKNA | MPAFK | GRLKP | |
| | | 80 | | | | | | |
| <i>Monoraphidium</i> | DEIAG | VAAVY | YDQAA | GNK-W | | | | |
| <i>Synechocystis</i> | SDMED | VAAVY | LDQA- | -EKGW | | | | |
| <i>Anabaena</i> | EQIED | VAAVY | LGKAD | AD--WK | | | | |

Figura 5: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los Cit del alga verde *Monoraphidium braunii* y de las cianobacterias *Synechocystis* y *Anabaena*.

La numeración de los residuos corresponde al Cit de *Monoraphidium*.

La estructura secundaria del Cit reducido de *Monoraphidium braunii* consiste en cuatro α -hélices conectadas por tres lazos (Frazão *et al.*, 1995). El hemo se encuentra en un bolsillo hidrófobo rodeado de 23 aminoácidos, de los cuales 13 son idénticos o presentan cambios conservativos en otros Cit. Cuatro residuos son siempre aromáticos (Phe11, Trp64, Tyr79 y Trp89) y llegan a la superficie de la proteína. Parte del hemo se expone al solvente (los átomos de los extremos de los pirroles C y D) (Frazão *et al.*, 1995). El hemo está unido covalentemente al polipéptido por enlaces tioéter por los residuos Cys15 y Cys18. Existe una zona ácida formada por los residuos Glu1, Asp69, Glu70, Asp71 y Glu72 (Frazão *et al.*, 1995), región no conservada en los organismos procariontes. Otra región negativa del Cit de *Monoraphidium braunii* está formada por los residuos Glu55 y Asp65 (Frazão *et al.*, 1995).

La estructura en solución del Cit oxidado es muy similar a la de la proteína reducida, con modificaciones en la orientación del propionato 7 y del residuo His30 (Banci *et al.*, 1998).

1.3 COMPARACIÓN ESTRUCTURAL ENTRE PLASTOCIANINA Y CITOCROMO c_6

Las estructuras primaria y secundaria de Pc y Cit son muy distintas en su secuencia de aminoácidos, grupos prostéticos y plegamiento; sin embargo, ambas proteínas presentan unas características estructurales comunes que pueden explicar su similitud funcional. En Frazão *et al.*, 1995 se comparan las estructuras terciarias de la Pc de *Chlamydomonas* y el Cit de *Monoraphidium*. Las moléculas se presentan alineadas de acuerdo a su momento dipolar, factor que posiblemente juega un papel importante en su orientación previa a la formación del complejo con sus sustratos y/o a la transferencia de electrones. La conclusión de este trabajo es que ambas proteínas presentan parecidos significativos, ya que la región que rodea al grupo hemo es similar a la zona hidrófoba que rodea a la His87 de la Pc, y en la zona este de ambas moléculas aparecen regiones de superficie con potencial negativo: la zona negativa que rodea a la Tyr83 en la Pc y los residuos 69 a 72 del Cit.

Los datos estructurales y los cálculos teóricos basados en la disminución del acoplamiento electrónico en la superficie del Cit indican que la transferencia de electrones más favorable resulta a través de los átomos de superficie del grupo hemo o de los residuos hidrófobos que lo rodean. Se considera que el Cit tiene un solo sitio de transferencia de electrones para su reacción con el PSI y con el citocromo *f* (Frazão *et al.*, 1995).

Cuando se comparan las estructuras de Pc y Cit de distintos organismos hay que tomar en consideración que los residuos ácidos que forman las regiones negativas se encuentran en eucariotas pero no en procariotas. La Figura 6 muestra una comparación de las estructuras terciarias de las proteínas de las cianobacterias *Synechocystis* y *Anabaena*, modeladas a partir de la Pc de *Enteromorpha* y del Cit de *Monoraphidium*. Como se ha señalado, se aprecia que las proteínas de cianobacterias carecen de las regiones negativas presentes en eucariotas. Lo más interesante es la similitud de las regiones positivas y negativas de Pc y Cit procedentes del mismo organismo; de hecho, las metaloproteínas de *Anabaena* muestran unas zonas positivas a la derecha de la estructura de acuerdo a su punto isoeléctrico cercano a 9 y al alto contenido en lisina de su secuencia. En *Synechocystis*, aunque aparece parte de las cargas negativas, éstas están contrarrestadas por el mismo número de cargas positivas, al ser su punto isoeléctrico casi neutro (Figuras 4 y 5).

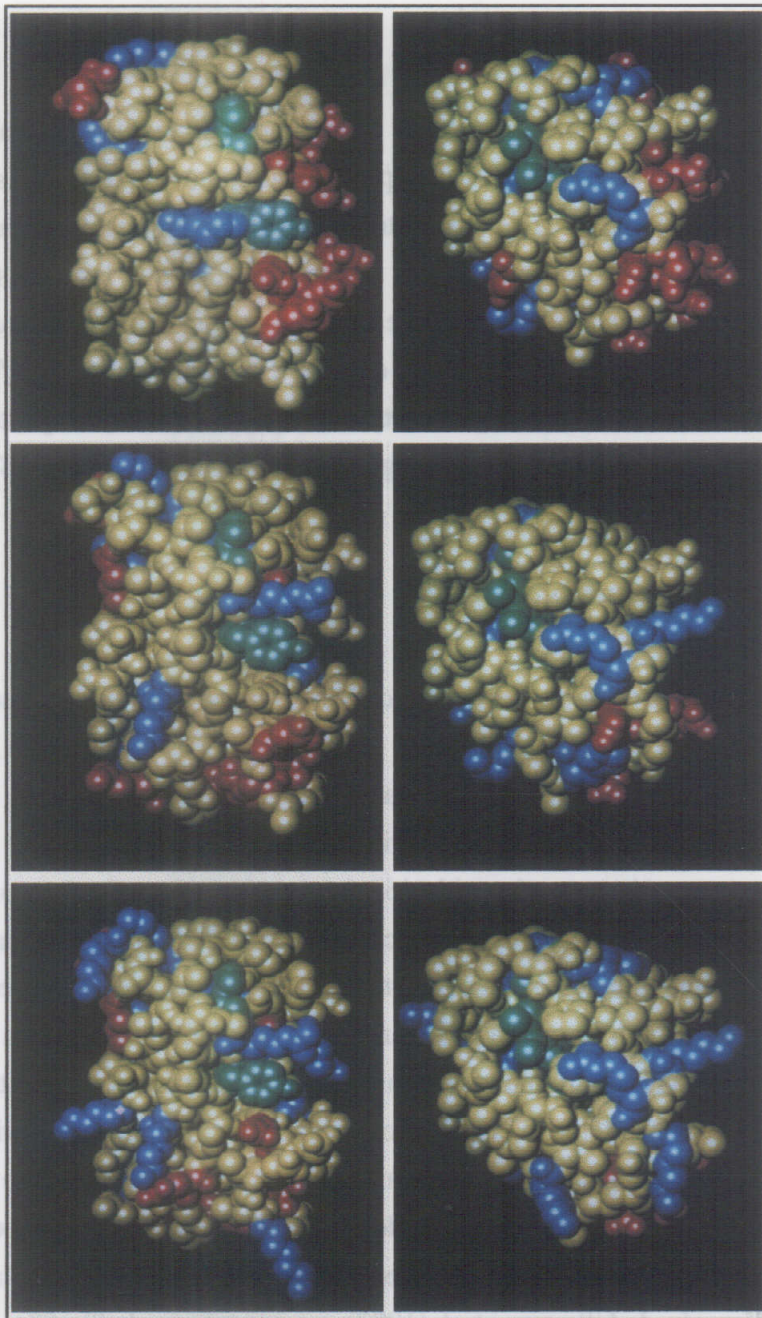


Figura 6: Comparación de las estructuras terciarias de Pc y Cit de organismos eucariotas y procariotas.

A la izquierda se muestran las estructuras de Cit y a la derecha las de Pc. Las estructuras superiores corresponden a la Pc de *Enteromorpha* y al Cit de *Monoraphidium*. Las estructuras del centro son las proteínas de *Anabaena* sp. PCC 7120, y las de abajo son las de *Synechocystis* sp. PCC 6803, en ambos casos modeladas por sustitución de aminoácidos de acuerdo con las secuencias mostradas en las Figuras 4 y 5. Los aminoácidos básicos se muestran en azul; los ácidos, en rojo; la His87, Tyr83 de la Pc y el hemo del Cit, en verde. Figura tomada de Navarro et al. (1997).

1.4 MECANISMOS DE REACCIÓN

Pc y Cit proporcionan un buen modelo para estudiar la evolución convergente de dos moléculas distintas que desarrollan el mismo papel fisiológico y que además constituyen un claro ejemplo de evolución paralela de dos proteínas dentro de un mismo organismo (Navarro *et al.*, 1997). Los datos estructurales de que se dispone indican que las zonas negativas en la superficie de la proteína donadora de electrones son una adquisición evolutiva que permite a Pc y Cit una interacción electrostática atractiva con el PSI y con el citocromo *f* para formar un complejo que optimice la transferencia de electrones. Como se discutirá posteriormente, esta región negativa aparece en paralelo con otra región positiva en el complejo PSI.

1.4.1 Oxidación del citocromo *f*

Todos los estudios de la oxidación del complejo *b_f* se han realizado sólo con Pc, y no con Cit, dada la dificultad de distinguir la señal espectrofotométrica del Cit de la del citocromo *f*. Se han realizado estudios con proteínas silvestres y modificadas, así como de entrecruzamiento químico (Gross, 1993; Sigfridsson, 1998).

Los primeros experimentos de oxidación de citocromo *f* por Pc de espinaca mostraron un acusado descenso en la velocidad de la reacción al aumentar la fuerza iónica (Takabe *et al.*, 1980), lo que sugiere una interacción electrostática atractiva entre ambas proteínas. De hecho, en la estructura del citocromo *f* resuelta por Martínez *et al.* (1994) se observa la existencia de un grupo de varias lisinas formando una región positiva en la superficie de esta proteína.

Los datos iniciales obtenidos con Pc modificadas por mutagénesis dirigida (He *et al.*, 1991; Modi *et al.*, 1992b) indican que la región que rodea a la Tyr83 es la que interviene en la interacción y en la transferencia de electrones desde el citocromo *f*, aunque con posterioridad se observó que el lugar de transferencia de electrones no es la Tyr83, sino la His87. En los estudios de modelización de Ullmann *et al.* (1997) se propone que la Tyr83 está implicada en interacciones con la Lys65, del citocromo *f*, estabilizando la unión y que en el Cit este mismo papel lo realizaría el Trp63. En el citocromo *f* de cianobacterias, al no existir la Lys65 su función la realizaría la Arg88. También proponen esta interacción de la Tyr83 con el citocromo *f* como un posible camino para los electrones, aunque sólo como un modelo teórico a confirmar por datos experimentales. El Asp42 también parece importante en la formación del complejo (Modi *et al.*, 1992a). Los datos de entrecruzamiento (Morand *et al.*, 1989) indican la interacción entre el residuo Asp44 de la cara este de la Pc de espinaca y la Lys187 del citocromo *f* de rábano, así como la interacción entre el Glu59 y/o el Glu60 de la Pc y un residuo no identificado de la región positiva del citocromo *f*. De todo esto se concluye que

para la formación del complejo electrostático interviene la zona ácida de la Pc y residuos positivos del citocromo *f*.

Se han realizado simulaciones por ordenador de la formación del complejo entre citocromo *f* y Pc mediante la optimización de las interacciones electrostáticas de los grupos cargados de ambas proteínas. Según los diferentes modelos de interacción obtenidos, se observa una distancia mínima de 31,4 Å entre el hemo y el átomo de cobre, demasiado grande para permitir una transferencia eficiente de electrones (Pearson *et al.*, 1996). De hecho, la dependencia bifásica con la fuerza iónica que muestra la reacción entre estas dos proteínas se ha interpretado como el resultado de un complejo cuya orientación inicial no es la óptima (Meyer *et al.*, 1993). Pearson *et al.* (1996) proponen que las proteínas forman un pre-complejo y luego se reorganizan para hacer posible la transferencia de electrones, quedando los centros redox, según este modelo, a una distancia de 15,3 Å. En este caso la ruta de los electrones implicaría a la His87 de la Pc (igual que en la transferencia de electrones al PSI) y al ligando del hemo Tyr1 del citocromo *f*. Según datos más recientes, el camino de los electrones probablemente incluye a la His87 en la Pc y quizás a una cadena de moléculas de agua que se encuentra cerca de la Lys66 de la región positiva del citocromo *f* y que llega hasta el hemo (Christensen *et al.*, 1990; Betts *et al.*, 1992). Datos recientes medidos in vivo de mutantes del citocromo *f* de *Chlamydomonas reinhardtii*, con mutaciones que deben afectar la interacción con la Pc, mostraron pequeños efectos sobre la tasa de crecimiento del organismo así como sobre la cinética de fotooxidación, lo que sorprende dados los resultados in vitro (Soriano *et al.*, 1996; Zou *et al.*, 1996). Por último, en un trabajo sobre la estructura del complejo Pc-citocromo *f* determinada por NMR (Ubbink *et al.*, 1998) se observa que la interacción electrostática se mantiene a la vez que la zona hidrófoba de la Pc está en contacto con el hemo del citocromo *f*, quedando una distancia entre el átomo de cobre y el hierro del hemo de 10,9 Å para la transferencia de electrones a través de la His87 de la Pc y la Tyr1 o la Phe4 del citocromo *f*.

1.4.2 Reducción de P700

Los mecanismos de reacción y los factores que controlan la reducción del PSI se han estudiado exhaustivamente y se conoce desde hace tiempo la naturaleza electrostática de la interacción entre el PSI y la Pc o el Cit. La influencia de la fuerza iónica en la reacción se explica asumiendo en eucariotas una atracción entre las cargas negativas de la cara este de las proteínas y las cargas positivas de la subunidad PsaF del PSI, mientras que la situación de cargas sería la opuesta para las proteínas de cianobacterias como *Anabaena* (Golbeck, 1994).

Según los últimos datos obtenidos por espectrofotometría cinética inducida por láser, el mecanismo de reacción de los donadores de electrones con el PSI depende del organismo del que se aislen. La Pc sigue cinéticas monofásicas en cianobacterias y bifásicas en eucariotas, mientras que el Cit sigue cinéticas monofásicas en algunas cianobacterias y bifásicas en otras, así como en los organismos eucariotas. El tiempo medio de la reacción es de unos 10 μ s para la fase rápida y cientos de microsegundos para la fase lenta (Bottin y Mathis, 1985; Hervás *et al.*, 1994; 1995; 1996). La fase rápida se asigna a la transferencia de electrones y la fase lenta a la interacción bimolecular donador/PSI.

La función de la subunidad PsaF del PSI está en discusión. Inicialmente se estableció por experimentos de entrecruzamiento que la Pc de espinaca se une a esta subunidad (Hippler *et al.*, 1989). Posteriormente se observó un fuerte descenso en la eficiencia de transferencia de electrones hacia el PSI de *Chlamydomonas* delecionado la subunidad PsaF (Hippler *et al.*, 1997). Asimismo, la mutagénesis de la subunidad PsaF en *Chlamydomonas* sugiere que varias lisinas estarían implicadas en la interacción de Pc y Cit con el PSI (Hippler *et al.*, 1998), lo que sugiere que en eucariotas la subunidad PsaF puede ser el sitio de unión para la Pc y el Cit en la cara oxidante del PSI, facilitando la orientación apropiada de los centros redox para una transferencia eficiente de electrones al P700⁺ (Wynn y Malkin, 1988; Wynn *et al.*, 1989; Hippler *et al.*, 1997). En las cianobacterias no está clara la función de la subunidad PsaF, ya que un mutante de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cuyo PSI carece de PsaF crece a la misma velocidad que el organismo silvestre (Chitnis *et al.*, 1991). También se ha visto que la constante de reacción de segundo orden de la reducción de P700⁺ por el Cit o la Pc de las cianobacterias *S. elongatus*, *Synechocystis* y *Anabaena variabilis* es la misma cuando se usa PSI completo o carente de PsaF (Hatanaka *et al.*, 1993; Hippler *et al.*, 1996).

Los estudios del efecto del pH y de la fuerza iónica, así como de la dependencia de la velocidad de la reacción respecto de la concentración de proteína donadora, han permitido proponer distintos mecanismos de reacción para la reducción de PSI por Pc y Cit (Hervás *et al.*, 1992; 1995; 1996; 1997; Sigfridsson *et al.*, 1995). En algunas cianobacterias aparece el mecanismo de reacción más simple y primitivo, en el que la transferencia de electrones ocurre tras una colisión orientada entre el PSI y su donador de electrones sin la formación de un complejo detectable (mecanismo tipo I). En otras cianobacterias se detecta la formación de un complejo electrostático previo a la transferencia de electrones (tipo II). En eucariotas y en algunos sistemas Cit/PSI cianobacterianos, el proceso se desarrolla en tres etapas: primero, la formación de un complejo donador-PSI; después, la reorganización dentro del complejo de los centros redox que van a intervenir en la reacción, con el fin de alcanzar una orientación óptima de los mismos; y ,por último, la transferencia de electrones propiamente dicha (tipo III) (Figuras 7 y 8).

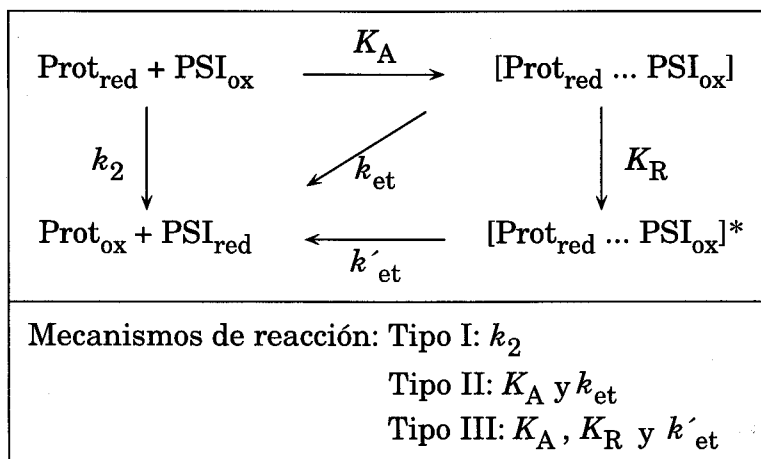


Figura 7: Modelo de los tres posibles mecanismos de reacción entre Pc o Cit y PSI.

Prot equivale a *Pc* o *Cit*; k_2 es la constante bimolecular de la reacción en el mecanismo tipo I; K_A es la constante de equilibrio para la formación del complejo intermediario; K_R es la constante de equilibrio para la reorganización de las proteínas dentro del complejo intermediario; k_{et} y k'_{et} son las constantes de transferencia de electrones en los mecanismos tipo II y III, respectivamente.

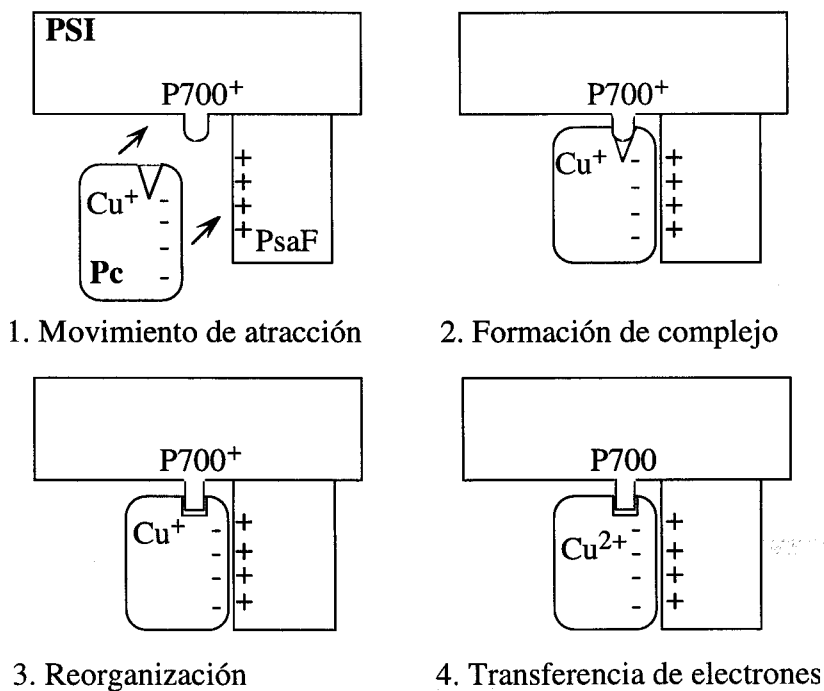


Figura 8: Esquema del mecanismo de reacción tipo III.

En *Synechocystis* el mecanismo de reacción de PSI con Cit o Pc es de tipo I (Hervás *et al.*, 1994). En otras cianobacterias (*Anabaena* y *Pseudanabaena*) se observa que la reacción del PSI con el Cit sigue un mecanismo tipo III, mientras que la reacción con la Pc es de tipo I,

por lo que se ha sugerido que, evolutivamente, la interacción se optimizó en primer lugar con el Cit de carga positiva (Hervás *et al.*, 1995; 1998). Se aprecia, además, que la reacción del Cit con el PSI de *Anabaena* es especialmente eficiente, con una velocidad de reacción alta (tiempo medio de reacción de 4 μ s), al presentar una barrera de activación reducida en comparación con el sistema Pc/PSI de espinaca, cuyo tiempo medio de reacción es de 11 μ s (Bottin y Mathis, 1985; Hervás *et al.*, 1995). En el alga verde *Monoraphidium* la reacción de Pc y Cit con el PSI es de tipo III, al igual que ocurre con la Pc de plantas superiores (Díaz *et al.*, 1994a).

Estudios de reacciones cruzadas entre las metaloproteínas de unos organismos y el PSI de otros indican que el mecanismo de reacción tipo III desaparece al intentar reproducir la reacción con el PSI de un organismo evolutivamente distante al de procedencia de la Pc o el Cit, lo que sugiere que las modificaciones que llevaron a este mecanismo se han producido paralelamente en las metaloproteínas y en el PSI (Hervás *et al.*, 1997).

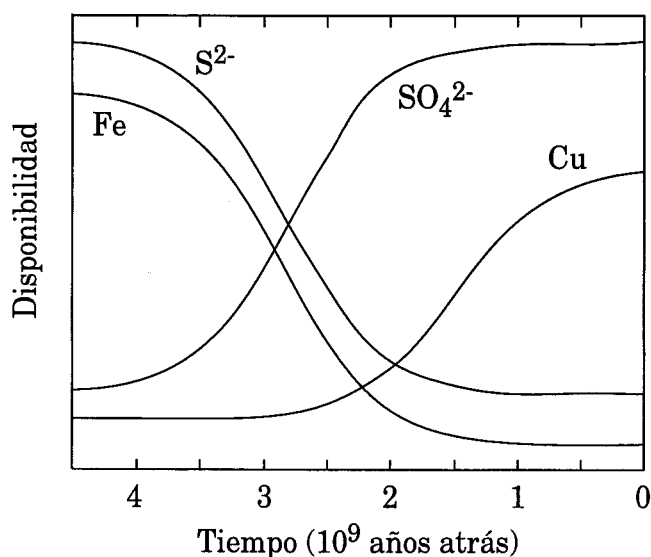


Figura 9: Disponibilidad de hierro y cobre, así como de sulfuro y sulfato a lo largo de la vida de la Tierra.

El Cit fue sustituido evolutivamente por la Pc, a pesar de haber alcanzado un complejo mecanismo de reacción. Esto es explicable por el ahorro de energía que supone para la célula utilizar una proteína como la Pc, que sólo requiere un átomo de cobre, para hacer la misma función que otra proteína que requiere un grupo hemo. Probablemente, al principio de la evolución se usó el Cit y no la Pc debido a la distinta disponibilidad de cobre y hierro a lo largo de la evolución de la Tierra. La abundancia relativa en el suelo de los metales no es tan importante para su disponibilidad como su potencial redox y la solubilidad de sus compuestos

en agua. En la actualidad, el hierro es muy abundante en la superficie terrestre, pero el hierro (III) es muy insoluble a pH neutro, de modo que se encuentra muy poco metal en solución en la forma que puede ser usado por los seres vivos. Debido a la oxidación gradual de la atmósfera, el potencial redox de la superficie marina aumentó gradualmente y, según Williams y Fráusto da Silva (1996), disminuyó la disponibilidad de hierro y sulfuros (Figura 9). Así, los primeros organismos fotosintéticos, que se desarrollaron en una atmósfera reductora, encontraban en su medio más hierro soluble que cobre, después la propia fotosíntesis oxigénica indujo un aumento en la presión parcial de oxígeno que llevó a la inversión de la situación anterior. Los primeros organismos fotosintéticos capaces de sintetizar alternativamente Pc o Cit presentan una reacción Cit/PSI más eficiente que la reacción Pc/PSI, siendo la diferencia de eficiencia más importante en lo que concierne a la fase rápida de la reacción (Hervás *et al.*, 1997). Las plantas superiores, al haber mejorado el mecanismo de reacción del PSI con la Pc, dejan de sintetizar el Cit.

En resumen, el mecanismo de reacción de las proteínas donadoras con el PSI parece haber evolucionado desde un tipo simple de colisión orientada (*Syneccoccus*, *Synechocystis*) hasta el mecanismo tipo III (organismos eucariotas) que conlleva la formación de un complejo con la intervención de una proteína específica (PsaF) para la unión del donador de electrones con el PSI. Esta proteína no tiene una función conocida en los organismos más primitivos. La sustitución del Cit por la Pc en el curso de la evolución, así como la aparición de la fase rápida en la reacción de Pc con PSI en plantas superiores, ha implicado modificaciones estructurales tanto en la proteína donadora como en el PSI (Hervás *et al.*, 1995; 1996,1997).

1.5 ESTUDIOS TERMODINÁMICOS

El signo y la magnitud de los parámetros termodinámicos de activación de entalpía (ΔH^\ddagger), entropía (ΔS^\ddagger) y energía libre (ΔG^\ddagger), obtenidos a partir de la variación de las constantes cinéticas en función de la temperatura, pueden usarse para obtener información sobre la naturaleza y magnitud de las interacciones proteína-proteína, ya sean éstas de tipo electrostático o hidrófobo. Estudios termodinámicos basados en la Teoría del Estado de Transición (Eyring, 1938) han permitido obtener información sobre los parámetros de activación en la transferencia de electrones entre proteínas y complejos inorgánicos (Goldbeck y Petch, 1976; Segal y Sykes, 1978) y entre proteínas y proteínas, incluyendo en este último caso proteínas fotosintéticas (Cox, 1975; Wood y Bendall, 1975; Takabe *et al.*, 1983). Así, Bottin y Mathis (1985) han determinado los parámetros de activación para la fase rápida de la reducción de PSI por Pc de espinaca. En general, estos estudios han mostrado que una

entalpía favorable para la unión de los sustratos se compensa por una barrera energética de naturaleza entrópica, aunque se han observado casos en los que ocurre lo contrario (Jelesarov y Bosshard, 1994).

El análisis de los parámetros termodinámicos aislados no permite obtener conclusiones de un solo valor de ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger y ΔH^\ddagger , debido a la complejidad de los fenómenos que se estudian, aunque se puede ver cómo afectan a estos parámetros las modificaciones de las condiciones experimentales. En general, ΔH^\ddagger informa sobre el trabajo ejercido por/sobre el sistema hasta llegar al estado de transición y ΔS^\ddagger refleja los grados de libertad del complejo activado respecto al estado inicial. Es esperable, por tanto, que el efecto de anular o modificar una interacción electrostática sea el de provocar un cambio en ΔG^\ddagger de naturaleza entálpica. Por otra parte, es sabido que las interacciones hidrófobas están dirigidas por cambios en la entropía del sistema y, concretamente, en las moléculas de agua. Pero estas relaciones son más complejas, ya que, al modificar una interacción electrostática se producen cambios significativos en la entropía: 1) Cambian los grados de libertad del complejo, y 2) La formación de un puente salino implica un gran ordenamiento de las moléculas de solvente a su alrededor. Además, las interacciones hidrófobas conllevan la rotura de puentes de hidrógeno en el solvente, lo que implica una componente entálpica.

En trabajos termodinámicos anteriores con organismos en distinto estado evolutivo, se ha obtenido bastante información sobre el mecanismo de reacción de la Pc con el PSI (Díaz *et al.*, 1994a, Hervás *et al.*, 1996). En el alga verde *Monoraphidium braunii*, la formación del complejo entre Pc y PSI es un proceso exergónico, mientras que la transferencia posterior de electrones presenta una gran barrera energética de aproximadamente 70 kJ/mol, producida fundamentalmente por el término entrópico (Díaz *et al.*, 1994a). Además, cambios en la fuerza iónica y el pH inducen cambios en la energía libre de activación de la reacción global, en la que los términos de entropía y entalpía cambian en direcciones opuestas. Este efecto de compensación entre los dos componentes de la energía se ha observado en otros organismos como espinaca y las cianobacterias *Anabaena* y *Synechocystis* (Hervás *et al.*, 1996). Se ha propuesto que la causa de esta compensación es la estabilización del complejo de transferencia electrónica por interacciones hidrófobas resultantes de la desolvatación de residuos hidrófobos durante la asociación de los reactivos.

Esta compensación entropía-entalpía no se observa en el caso de Cit/PSI de *Anabaena* (Díaz *et al.*, 1994a; Hervás *et al.*, 1996). Teniendo en cuenta que la compensación indica la participación de moléculas de solvente en la reacción (Casimiro *et al.*, 1993; Siddarth y Marcus, 1993; Meier *et al.*, 1994; Berghuis *et al.*, 1994), se puede deducir que, en el caso especial del Cit/PSI de *Anabaena*, el complejo está estabilizado exclusivamente por interacciones electrostáticas, mientras que en el resto de los complejos estudiados participan también interacciones hidrofóbicas (Hervás *et al.*, 1996). Parece además que, en el curso de

la evolución, las interacciones electrostáticas a larga distancia, propias del mecanismo colisional tipo I, han sido sustituidas por interacciones hidrófobas a corta distancia que facilitan un mecanismo más complejo y regulado, aunque no por ello más eficiente (Hervás *et al.*, 1997). Por otro lado, dicha compensación entalpía-entropía, debida a modificaciones del preequilibrio del sistema (sobre todo por relajación de moléculas del solvente), impide obtener conclusiones del efecto de modificar las condiciones experimentales sobre ΔS^\ddagger y ΔH^\ddagger por separado, siendo imprescindible el cálculo de ΔG^\ddagger .

Una aproximación muy usada en otros sistemas es el análisis termodinámico mediante la ecuación de Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-\Delta E_a/RT}$$

donde k es la constante de velocidad de la reacción, ΔE_a es la energía de activación y A es una constante. Los parámetros calculados mediante el uso de la ecuación de Eyring y la de Arrhenius están íntimamente relacionados, ya que, para una reacción que ocurre en solución:

$$\Delta E_a = \Delta H^\ddagger - RT$$

En los análisis termodinámicos de esta tesis se ha utilizado la ecuación de Eyring, considerando solamente ΔG^\ddagger como parámetro termodinámico significativo, ya que ΔE_a no es un parámetro apropiado para el estudio de la dependencia de la constante cinética respecto a condiciones experimentales que impliquen una modificación en la estructura del solvente, y en las reacciones que se han estudiado en este trabajo aparece un efecto de compensación entropía-entalpía debido a relajación del solvente.

Parte de los resultados de esta tesis se encuentran ya publicados o en proceso de publicación, de acuerdo con la siguiente relación:

De la Cerda, B, Navarro, JA, Hervás, M, De la Rosa, MA (1997) Changes in the reaction mechanism of electron transfer from plastocyanin to photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as induced by site-directed mutagenesis of the copper protein. *Biochemistry* 36 (33) 10125-10130.

Romero, A, De la Cerda, B, Varela, PF, Navarro, JA, Hervás, M y De la Rosa, MA (1998) The 2,15 Å crystal structure of a triple mutant from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Mol. Biol.* 275, 327-336.



De la Rosa, MA, Hervás, M, Díaz-Quintana, A, De la Cerda, B, Balme, A, Cavazza, C y Navarro, JA (1998) From cytochrome c_6 to plastocyanin. An evolutionary approach. XI International Congress on Photosynthesis. Budapest (Hungría).

De la Cerda, B, Molina-Heredia, FP, Hervás, M, Navarro, JA, Díaz-Quintana, A y De la Rosa, MA (1998) Site-directed mutants of cytochrome c_6 provide new insights into the interaction between PSI and the heme-protein. XI International Congress on Photosynthesis. Budapest (Hungría).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1.1 *Synechocystis* sp. PCC 6803

Para la obtención de preparaciones de fotosistema I de *Synechocystis* se cultivaron las siguientes estirpes:

-*Synechocystis* sp. PCC 6803 (Rippka *et al.*, 1979).

-*Synechocystis* sp. PCC 6803-AFK6, que carece de las subunidades PsaF y PsaJ del PSI (Xu *et al.*, 1994).

Para cultivar estas cianobacterias se utilizó el medio BG11 (Rippka *et al.*, 1979), cuya composición es la siguiente:

| | | |
|-----------------------------------|------|------|
| NaNO ₃ | 17,6 | mM |
| MgSO ₄ | 0,30 | mM |
| CaCl ₂ | 0,24 | mM |
| Na ₂ CO ₃ | 0,20 | mM |
| K ₂ HPO ₃ | 0,20 | mM |
| H ₃ BO ₃ | 46 | μM |
| Ácido cítrico | 28,5 | μM |
| Citrato férrico-amónico (15 % Fe) | 6 | mg/L |
| MnCl ₂ | 9,1 | μM |
| Na ₂ -EDTA | 2,4 | μM |
| Na ₂ MoO ₄ | 1,6 | μM |
| ZnSO ₄ | 0,8 | μM |
| CuSO ₄ | 0,3 | μM |
| CoCl ₂ | 0,2 | μM |

El crecimiento de los cultivos se llevó a cabo en frascos de Roux de 750 mL o en frascos de 10 ó 20 L, en cámaras de cultivo termostatzadas a 30 °C, bajo iluminación continua de 50 μE m⁻² s⁻¹, suministrada por paneles de tubos fluorescentes de luz blanca (Sylvania daylight o similares) en condiciones de burbujeo con una mezcla de aire-CO₂ al 99:1 (v/v).

Los cultivos se recogieron en fase estacionaria por centrifugación a 14.000 x g, a una densidad óptica de 1,5-1,7 medida a 580 nm.

2.1.2 *Escherichia coli*

En este trabajo se usaron las siguientes estirpes de *E. coli*: DH5 α (Hanahan, 1983), MC1061 (Meissner *et al.*, 1987), BL21(DE3) (Studier y Moffat, 1986), HB101 (Boyer y Rouland-Dusoix, 1969), JM109 (Janisch-Perron *et al.*, 1985) y XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987).

Como medio habitual de crecimiento para los cultivos líquidos o sólidos de *E. coli* se utilizó el de Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es la siguiente:

| | |
|----------------------|--------|
| NaCl | 10 g/L |
| Triptona | 10 g/L |
| Extracto de levadura | 5 g/L |

Para preparar medio sólido se añadió agar hasta una concentración final de 15 g/L. La esterilización de los medios y materiales se llevó a cabo en autoclave, a 1 atm de sobrepresión y 120 °C durante 20 min.

Según el propósito de los cultivos, se añadieron al medio los siguientes suplementos estériles:

Ampicilina (100 μ g/mL) para mantener y amplificar los plásmidos.

CuSO₄ (100 μ M) o Citrato Fe-NH₄ (6 mg/L) para producir Pc o Cit, respectivamente.

X-Gal (0,2 μ M) e IPTG (16 μ M) para seleccionar en medio sólido colonias que llevasen algún inserto que inactivase el gen *lacZ*.

Para el crecimiento de cultivos destinados a la preparación de células competentes se utilizó el medio SOB (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es la siguiente:

| | |
|----------------------|---------|
| Triptona | 20 g/L |
| Extracto de levadura | 5 g/L |
| NaCl | 0,5 g/L |
| KCl | 2,5 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |

El medio se esterilizó en autoclave como ya se ha descrito, excepto el MgCl₂, que se esterilizó por filtración por separado y se añadió al resto del medio una vez enfriado.

Los cultivos en medio líquido se incubaron en tubos o en matraces Erlenmeyer de volumen total quíntuple al del cultivo, a 37 °C y con agitación orbital continua a 200 rpm en

aparatos New Brunswick Scientific modelo G25. Los cultivos sólidos se realizaron en cajas de Petri a 37 °C.

Los cultivos líquidos y sólidos se incubaron durante 14 horas en la mayoría de los casos.

2.2 OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS DE FOTOSISTEMA I

Las partículas de PSI se obtuvieron de las células de *Synechocystis* mediante solubilización con β -dodecil maltósido, según el protocolo de Rögner *et al.* (1990), con las modificaciones descritas en Hervás *et al.* (1994). Todo el proceso se llevó a cabo en cámara fría (4 °C) y con baja intensidad de luz.

Las células procedentes de un cultivo de 10 L se recogieron por centrifugación a 14.000 x g durante 20 min. Las células precipitadas se lavaron con 100 mL de tampón A (MES 20 mM, pH 6,5, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10 mM) y se centrifugaron de la misma manera.

El precipitado resultante se resuspendió en 100 mL de tampón C (tampón A + sacarosa 1 M) y se agitó suavemente durante una hora en la oscuridad, se precipitó como antes por centrifugación y se resuspendió en 100 mL de tampón C. A la solución resultante se añadieron inhibidores de proteasas 1 mM (PMSF, benzamidina y ácido ϵ -aminocaproico) y una punta de espátula de DNasa, y se rompieron las células pasándolas tres veces por una prensa de French Aminco a 20.000 psi. Tras la rotura, la solución se centrifugó 6 min a 5.000 x g para precipitar las células no rotas. El sobrenadante se volvió a centrifugar durante 30 min a 125.000 x g para precipitar las membranas tilacoidales. El precipitado se resuspendió en tampón D (tampón B + 20 % glicerol, junto con inhibidores de proteasas, siendo el tampón B = tampón A + manitol 0,5 M), y se ajustó la concentración de clorofila a 2 mg Chl/mL. La solución resultante se congeló a -80 °C para procesarla con posterioridad.

Para la extracción de PSI se partió de una cantidad de membranas correspondiente a unos 20 mg de Chl. Las membranas se descongelaron, se diluyeron con tampón D hasta 1 mg Chl/mL y se les añadió β -dodecil maltósido hasta una concentración final de 0,1 % (p/v). La mezcla se incubó durante 10 min en oscuridad y con agitación suave, se centrifugó 30 min a 184.000 x g, y el precipitado resultante se resuspendió en tampón D + 1 % de β -dodecil maltósido, ajustando la concentración de Chl a 1 mg Chl/mL. La mezcla se incubó en oscuridad y con agitación suave durante 30 min y se centrifugó 90 min a 184.000 x g. El sobrenadante se mezcló con un volumen igual de tampón A + manitol 0,25 M y se cargó en seis tubos de gradiente discontinuo de sacarosa, preparado sobre tampón B + 0,04 % β -dodecil maltósido (7,5 mL para cada concentración de sacarosa: 8, 24, 32 y 40 %, p/v). Se

añadieron 6 mL de muestra en cada tubo y se centrifugó 18 h a 150.000 x g. Se recogió la banda verde inferior, que se lavó y concentró en un sistema de filtración a presión Amicon (membrana PM 100) usando para los lavados tampón B + 0,03 % de β -dodecil maltósido, finalizando con tampón D. La solución final (aproximadamente 1 mL) contenía 2,1 mg Chl/mL, una relación Chl/P700 aproximada de 130-150 y una concentración de P700 de 7 μ M. Esta solución se dividió en alícuotas y se congeló a -80 °C hasta su uso.

2.3 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

2.3.1 Obtención de células competentes y transformación de *E. coli*

La preparación de células competentes de *E. coli* se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Hanahan (1985). Las células se cultivaron en 100 mL de medio líquido SOB (apartado 2.1.2) con agitación vigorosa hasta alcanzar una absorbancia de 0,45-0,65 a 580 nm. Tras mantener el cultivo en hielo durante 10 min, las células se recogieron por centrifugación (5 min a 750 x g, 4 °C) y se resuspendieron en 30 mL de solución RF1 (tampón acetato potásico 30 mM, pH 5,8, RbCl₂ 100 mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM y glicerol al 15 % (v/v)) fría esterilizada por filtración. Tras mantener la solución en hielo durante 5 min, se repitió el proceso de centrifugación anterior y se resuspendieron las células en 4 mL de solución RF2 fría (tampón MOPS-NaOH 10 mM, pH 7,0, RbCl₂ 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol al 15 % (v/v)). Las células así preparadas se conservaron a -80 °C en alícuotas de 200 μ L. La competencia de las células se comprobó transformándolas con cantidades conocidas de DNA plasmídico, obteniéndose en torno a 10⁷ transformantes/ μ g de DNA.

Para transformar las células competentes, el DNA transformante (máximo 20 μ L) se mezcló con una alícuota de células competentes descongelada en hielo. Tras incubar 30 min en hielo, se sometieron a choque térmico de 100 s a 42 °C y se volvieron a incubar en hielo durante 2 min. La suspensión se suplementó posteriormente con 0,8 mL de medio LB y se incubó durante una hora a 37 °C en agitación. A continuación las células se sembraron en medio LB sólido con ampicilina y se recogieron las placas a las 12 horas.

Cuando se utilizaron plásmidos que permitieran identificar clones portadores de moléculas recombinantes gracias a la inactivación por inserción del gen *lacZ*, el medio se suplementó con IPTG y X-gal (ver apartado 2.1.2). Las colonias con plásmidos recombinantes mostraron color blanco, frente al color azul de las que no lo portaban.

2.3.2 Cultivo de células transformadas para la purificación de proteínas

En los experimentos iniciales de la tesis, las células transformadas para la purificación de proteínas (en este caso Pc) se obtuvieron a partir de un vial congelado de células DH5 α que llevaran el plásmido apropiado. A partir de aquí se obtenía un cultivo de 25 mL de LB más ampicilina crecido durante 12 h, y con él se inoculaba 1 L de LB más ampicilina que también se dejaba crecer 12 h. Por último, se inoculaban con este cultivo tres matraces de 5 L de capacidad con 3 L cada uno de LB más ampicilina más el suplemento de CuSO $_4$ y se dejaban crecer 24 h a 37 °C en agitación moderada (150 rpm) para evitar la salida de las proteínas periplásmicas al medio de cultivo.

Dado que las células tienden a suprimir el gen que nos interesa del plásmido construido, la producción de proteína se mejoró transformando las células competentes justo antes de comenzar el cultivo y eliminando uno de los inóculos previos. Se utilizaron tantos viales (de 200 μ L) de células competentes como litros finales de cultivo se fueran a producir. Cada vial se transformó según se describe en el apartado 2.4, con 0,5-1 μ g del plásmido apropiado, y el resultado de la transformación sirvió para inocular un matraz con 1 L de LB más ampicilina. Tras incubarlo a 200 rpm y 37 °C durante 12 horas, el contenido de este matraz sirvió para inocular 10-12 L (tres o cuatro matraces de 5 L de volumen total) de LB más ampicilina más un suplemento de sulfato de cobre o de citrato férrico-amónico, según se fuera a producir respectivamente Pc o Cit. Este cultivo final se incubó igual que en el método inicial anterior. En el caso del Cit, la producción de proteína se mejoró probando la expresión del gen silvestre en distintas estirpes de *E. coli*, de las cuales la más adecuada resultó ser MC1061 (ver Resultados).

2.3.3 Purificación de las proteínas recombinantes

Se han utilizado dos métodos de purificación de proteínas, pues en el método usado en las primeras purificaciones de mutantes de Pc se obtenían bajos rendimientos de extracción, usándose otro posteriormente que resultó más eficiente.

En los dos casos, la purificación comenzó por la extracción de la fracción periplásmica, ya que la Pc y el Cit producidos en *E. coli* llevan un péptido señal (que en la cianobacteria sirve para que estas proteínas sean transportadas al interior de los tilacoides) que es reconocido por la bacteria, de forma que ambas proteínas son transportadas al periplasma.

En el primer método, las extracciones de periplasma se realizaron con lisozima, seguidas de precipitación con sulfato amónico al 50 % y diálisis durante 48 h, paso en el que se perdía parte de la proteína obtenida. Después de la diálisis, el extracto era sometido a una

cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa. La solución procedente de la columna se dializaba para cambiar de tampón y era sometida a cromatoenfoco.

En el segundo método de purificación, se extraía la fracción periplásmica mediante choques térmicos en un tampón rico en $MgCl_2$, después de lo cual la solución se limpiaba por filtrado a presión a la vez que se cambiaba el tampón. A continuación, se realizaba la cromatografía de intercambio iónico, con DEAE-celulosa o CM-celulosa según fuera negativa o positiva la carga global de la proteína. Aunque en algunos casos se obtuvieron fracciones de proteína pura tras este primer paso de cromatografía, la mayoría de las veces hubo que someter la solución a cromatoenfoco, y a veces a una última cromatografía de filtración en gel por FPLC.

2.3.3.1 *Obtención de la fracción periplásmica*

El primer método de purificación usado en la tesis se basa en el protocolo de Neu y Heppel (1964). El resultado de un cultivo de 10 L se recogió por centrifugación a $12.000 \times g$ durante 10 min y se resuspendió en 450 mL de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, sacarosa 0,5 M, EDTA 450 mM y lisozima 0,1 %. Se incubó durante 1 h a $37^\circ C$ en agitación y se separó la fracción periplásmica de los esferoplastos por centrifugación a $39.000 \times g$ durante 10 min.

El segundo método de purificación es una modificación del protocolo de Efterkhar y Schiller (1994). El resultado de un cultivo de 10 L se recogió por centrifugación y se resuspendió en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y $MgCl_2$ 0,2 M hasta una concentración de 0,15 g de células por mL. La solución se sometió a cinco ciclos alternativos de incubación a $37^\circ C$ durante 10 min y a $0^\circ C$ durante 15 min. La fracción periplásmica se separó de los esferoplastos por centrifugación a $39.000 \times g$ durante 10 min.

2.3.3.2 *Precipitaciones con sulfato amónico*

Se añadió sulfato amónico a la fracción periplásmica hasta alcanzar el 50 % de saturación, manteniendo el pH en torno a 8,0 mediante adiciones de NaOH concentrado cuando era necesario, y se incubó 1 h en agitación a $4^\circ C$. Se eliminó el precipitado por centrifugación a $12.000 \times g$ durante 15 min. En el primer método de purificación, el sobrenadante se dializó 48 h frente a 25 L de Tris-HCl 2 mM pH 8,0, con un cambio de tampón a las 12 h.

En el segundo método de purificación, tras eliminar el precipitado de la precipitación con sulfato amónico al 50 %, se volvió a añadir sulfato amónico al sobrenadante hasta el

100 % de saturación y se recogieron las proteínas precipitadas mediante una nueva centrifugación. El precipitado se resuspendió en 200 mL de Tris-HCl 2 mM, pH 8,0. La solución resultante se lavó de sulfato amónico por filtrado a presión y dilución con varios volúmenes de este tampón, utilizando una membrana YM3 en un sistema de filtración a presión Amicon.

2.3.3.3 *Cromatografía de intercambio iónico*

A partir de este paso el protocolo es común para el primer y el segundo método de purificación. El proceso se llevó a cabo en cámara fría a 4 °C.

2.3.3.3.1 DEAE-celulosa

La solución obtenida en el paso anterior se diluyó hasta un volumen de 0,4 L con tampón de lavado (Tris-HCl 2 mM, pH 8,0) y se introdujo en una columna de vidrio de 2,5 x 20 cm llena con 80 mL de DE-52 (Whatman) equilibrada con tampón Tris-HCl 2 mM pH 8,0. La columna se lavó con varios volúmenes de Tris-HCl 2 mM, pH 8,0, y las proteínas se eluyeron con 300 + 300 mL de un gradiente de concentración de NaCl de 0 a 0,2 M.

El flujo de aplicación de las muestras (32 mL/h) y de las soluciones de lavado y elución (20 mL/h) se reguló por bombas peristálticas Pharmacia P1. La solución eluida de la columna se recogió automáticamente con un colector de fracciones Pharmacia frac-100.

La reutilización de la columna requería su limpieza con varios volúmenes de NaCl 2 M y su posterior reequilibrado con varios volúmenes de tampón de lavado.

2.3.3.3.2 CM-celulosa

La cromatografía se realizó de la misma forma que en el apartado anterior salvo que la matriz de la columna era carboximetil-celulosa CM-52 (Whatman), el tampón de lavado era fosfato 5 mM, pH 7,9 y la solución de elución era un gradiente de concentración de tampón fosfato de 5 a 25 mM, pH 8,0.

2.3.3.4 Cromatoenfoque

Previo al cromatoenfoque, se seleccionaron las fracciones que contenían la proteína con una relación de pureza menor de 10 (ver apartado 2.4.1), se mezclaron y la solución resultante se dializó frente a Tris-acetato 5 mM, pH 8,0. Después de añadir ferricianuro hasta 1 mM para oxidar las proteínas, se introdujo la solución en una columna de vidrio de 1,5 x 20 cm con un volumen de 20 mL de matriz Polybuffer Exchanger 94 (Pharmacia) equilibrada con el mismo tampón. Las proteínas se eluyeron con 150 mL de Polibuffer 74 (Pharmacia) diluido 10 veces, con el pH inicial ajustado a 4,0.

2.3.3.5 Cromatografía de filtración en gel por FPLC

Se utilizó un sistema de FPLC (Waters) compuesto por un inyector 650E conectado a una bomba 600E, usando un flujo de solvente de 0,2 mL/min. La salida del inyector se conectó a una columna de cromatografía Protein Pack 125 de 0,78 x 30 cm (Waters) equilibrada con tampón fosfato 10 mM, pH 8,0. La muestra se concentró en un sistema de filtración a presión Amicon hasta un volumen máximo de 2 mL y se introdujo en el inyector. La proteína se eluyó con el mismo tampón y las fracciones se recogieron en un colector automático.

2.3.3.6 Concentración de proteínas

Como último paso, en todos los casos se cambió el tampón de las soluciones de proteína a Tricina-KOH 20 mM, pH 7,5, mediante un sistema de filtración a presión Amicon. Finalmente, las muestras se concentraron hasta 1-2 mM de proteína por centrifugación a 4 °C y 7.500 x g, en concentradores Centricon (Amicon), siguiendo las instrucciones del fabricante. La solución final se congeló hasta su uso a -80 °C.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS

2.4.1 Medidas espectrofotométricas

Para la detección de las fracciones que contenían la proteína durante la purificación, así como para la determinación del grado de pureza y concentración de la misma en las preparaciones, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de haz simple Beckman modelo DU 650. Además, en todos los casos se realizó un espectro de absorción de las proteínas modificadas para compararlo con el de las proteínas nativas.

La pureza de las preparaciones de Pc se determinó por la relación de absorbancias A_{275}/A_{597} , que es de 2,2 para la proteína pura oxidada (Hervás *et al.*, 1993). Para determinar su concentración se usó un coeficiente de $4.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 597 nm.

En el caso del Cit se midió la pureza según la relación A_{552}/A_{274} , siendo de 1,14 para el Cit puro reducido. Para determinar su concentración se usó un coeficiente de $24.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 552 nm.

La pureza de las preparaciones de PSI viene dada por la relación Chl/P700. El contenido en P700 de las muestras de PSI se calculó a partir de los cambios fotoinducidos de absorbancia a 820 nm, usando el coeficiente de absorción de $6,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ determinado por Mathis y Sétif (1981). La muestra se preparó en una cubeta que contenía, en un volumen final de 0,2 mL: Tricina-KOH, 20 mM, pH 7,5, β -dodecil maltósido 0,03 %, metil viológeno 0,1 mM y ascorbato sódico 2 mM.

La concentración de Chl se calculó según Arnon (1949). La muestra (50 μL) se diluyó en 10 mL de acetona 80 % (v/v), se homogeneizó por agitación y se centrifugó durante 5 min a temperatura ambiente a $13.000 \times g$. A continuación, se midió su absorbancia a 652 nm y se calculó la concentración de Chl usando un coeficiente de 34,5 mg Chl/mL.

2.4.2 Medidas potenciométricas

Las titulaciones redox de Pc se realizaron en anaerobiosis, según el método de Dutton y Wilson (1974), con las modificaciones de Ortega *et al.* (1988). Se preparó una cubeta con la proteína oxidada (5 μM) con ferricianuro y los mediadores redox en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,0. La mezcla de reacción se sometió a agitación y gaseo con argón para asegurar la ausencia de oxígeno. Se midieron los cambios de absorbancia a 597 menos 500

nm tras la adición sucesiva de alícuotas de ditionito sódico (50 mg/mL), al tiempo que se anotaban los cambios de potencial redox.

El potencial redox se midió con un electrodo de Pt-Ag/AgCl MI-800 Microelectrodes Inc. de 4 mm de diámetro, calibrado previamente con una solución saturada de quinhidrona ($E_{m,7} = +280$ mV a 20 °C) y se registró en un potenciómetro digital Metrohm 654. Los cambios de absorbancia se midieron en un espectrofotómetro de doble longitud de onda Aminco DW 2000.

Se emplearon benzoquinona, diaminodurool y menadiona como mediadores redox a una concentración final de 20 μ M cada uno. Sus potenciales medios a pH 7,0 son, respectivamente, +293 mV, +240 mV y +422 mV (Loach, 1973).

Las titulaciones redox del Cit se realizaron en las mismas condiciones, salvo que se usó una concentración de proteína de 2 μ M en la cubeta y que la medición de los cambios de absorbancia se realizó a 552 menos 570 nm.

Los errores en las determinaciones de potencial se pueden estimar en +/- 5 mV.

2.4.3 Espectros de EPR

Los espectros de EPR se realizaron en el laboratorio del Dr. Miguel Teixeira del Instituto de Química Fina y Biotecnología en Oeiras (Portugal). Se empleó un espectrofotómetro Bruker ESP 380 equipado con un criostato de flujo continuo de helio de Oxford Instruments. Las muestras se prepararon en MES 200 mM a pH 7,0.

2.5 ESPECTROFOTOMETRÍA CINÉTICA INDUCIDA POR LÁSER

La funcionalidad de las proteínas modificadas se analizó determinando su reactividad hacia su aceptor natural de electrones, el PSI. El PSI iluminado con un corto pulso de luz láser reduce a un aceptor exógeno, en nuestro caso el metil viológeno, quedando así oxidado y preparado para recibir un electrón de la Pc o del Cit. La reacción se puede seguir por el cambio de absorbancia a 820 nm, que es una longitud de onda a la que el PSI presenta un cambio de absorbancia específico según su estado redox. La reacción se puede repetir a los pocos segundos ya que el ascorbato presente en la mezcla de reacción reduce al donador de electrones (Pc o Cit).

2.5.1 Descripción del sistema

El sistema utilizado consta de un láser de rubí, modelo 2000 de J. K. Lasers, que genera luz roja de 694 nm en pulsos de 20-30 ns. El haz láser se atenúa con filtros neutros hasta conseguir justo la intensidad de luz de excitación saturante para evitar sobreexcitar el PSI a lo largo del experimento. La luz de análisis la proporcionó una lámpara halógena de wolframio de 100 W, pasada a través de un filtro de vidrio de banda estrecha de 820 nm y un ancho de banda que proporciona el 50 % de la transmitancia en 9,4 nm; esta luz se colimó y se concentró sobre la cubeta de ensayo. Tras atravesar la cubeta, la luz de análisis se recogió en un fotodiodo Melles Griot 13DI009 de respuesta rápida (ns) y máxima sensibilidad en la zona roja/infrarroja del espectro. El fotodiodo se protegió de la luz de excitación, de la luz difusa reflejada y de la fluorescencia por otro filtro Oriel de 820 nm igual que el anterior. La señal de salida del fotodiodo se amplificó mediante un amplificador de alta impedancia Melles Griot 13AMP005 y se recogió en un osciloscopio digital Nicolet 450. El haz láser se dividió a la salida, dirigiéndose parte de él a un fotodiodo, lo que permitía activar el osciloscopio justo antes del impacto del resto del haz láser sobre la cubeta de ensayo (Figura 10).

Todos los experimentos se realizaron en una cubeta termostatazada de 1 mm de paso de luz conectada a un baño circulador. Cuando se trabajó por debajo de 15 °C se pasó un flujo de N₂ alrededor de la cubeta para evitar la condensación de agua en sus paredes

2.5.2 Mezcla de reacción

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 0,2 mL: tampón (Tricina-KOH, pH 7,5 o MES, pH 5,5) 20 mM, β-dodecil maltósido 0,03 %, una cantidad de partículas de PSI equivalentes a 0,36 mg Chl/mL, metil viológeno 0,1 mM y ascorbato sódico 2 mM.

En los ensayos de concentración de proteína, la mezcla de reacción, suplementada con MgCl₂ 10 mM, contenía Pc o Cit en cantidad variable. En los ensayos de concentración de NaCl y MgCl₂ se utilizó Tricina-KOH, pH 7,5 como tampón y la Pc o el Cit a una concentración de 100 μM. Las condiciones fueron distintas sólo en el caso concreto del mutante D44R/D47R de Pc, para el que se realizaron ensayos de concentración de proteína a baja fuerza iónica (sin MgCl₂).

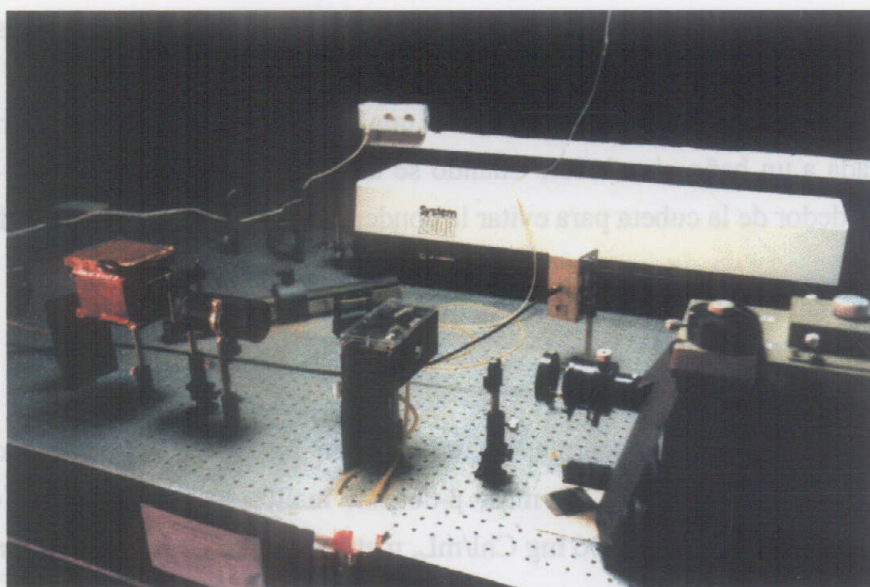
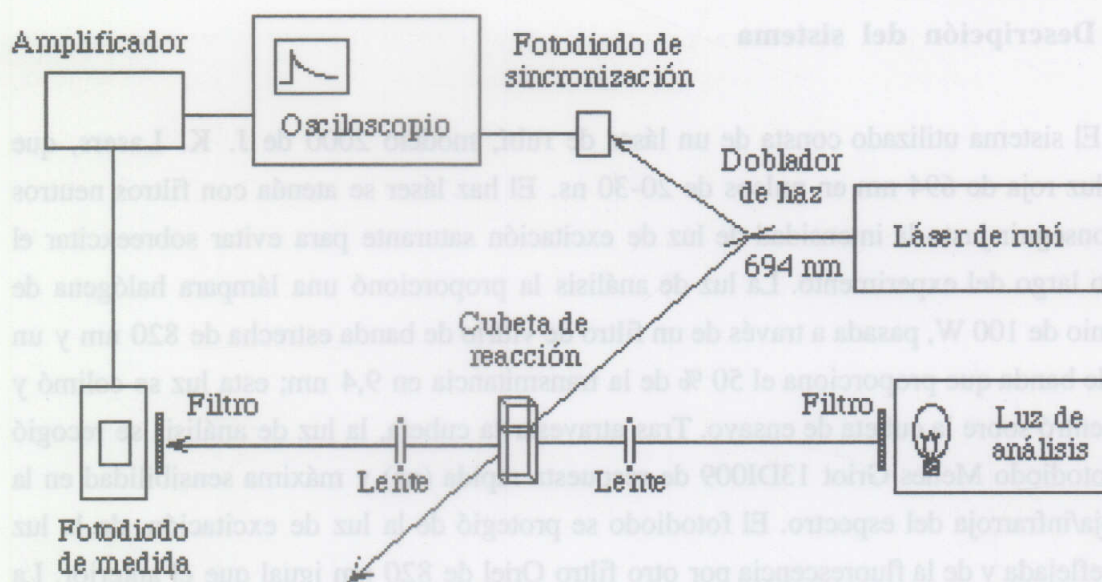


Figura 10: Esquema y fotografía del aparato de espectrofotometría cinética inducida por láser.

2.5.3 Análisis de los datos

Para cada trazo cinético se tomó un promedio de seis medidas independientes con un intervalo de 30 s entre cada disparo láser. Las constantes cinéticas determinadas en la mayoría de los experimentos tuvieron un error menor del 10 %, según la relación señal/ruido y la repetitividad de los datos.

Los experimentos cinéticos se realizaron en condiciones de pseudo-primer orden, al estar la proteína donadora en suficiente exceso respecto al PSI (mayor de 10:1). Los trazos cinéticos se analizaron como sumas de exponenciales para calcular las constantes de reacción; para esto se usó un programa informático (cedido por el Dr. P. Sétif, Saclay, Francia) basado en el método Marquardt, y los resultados se analizaron conforme a los mecanismos de reacción propuestos por Hervás *et al.* (1995) (ver Introducción).

2.5.4 Cálculos termodinámicos

Las energías de activación aparentes (ΔG^\ddagger) se calcularon a partir de la dependencia de la constante de la reacción (k_2) de la temperatura, de acuerdo con la ecuación de Eyring (1938):

$$k_2 = (k_B \cdot T/h) e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, h es la constante de Plank y R la constante de los gases. Si se expande la ecuación y se obtienen los logaritmos, tendremos la ecuación utilizada para los ajustes lineales (representaciones de Eyring):

$$\ln(k_2/T) = \ln(k_B/h) + \Delta S^\ddagger/R - \Delta H^\ddagger/R$$

Los potenciales y la energía de interacción electrostática entre la proteína donadora y el PSI se calcularon siguiendo el modelo de Watkins (Watkins *et al.*, 1994). En este modelo, se tiene en cuenta la distribución asimétrica de cargas en la superficie de las proteínas, así como las cargas localizadas en el sitio de la transferencia electrónica, siendo especialmente apropiado para la comparación de proteínas relacionadas o bien de mutantes puntuales de la misma proteína. El punto de partida es el análisis de reacciones controladas por difusión, en las que la formación del complejo activado implica ciertas restricciones de orientación para los reactivos: A fuerza iónica infinita, todas las cargas se encuentran apantalladas, de forma que la reacción sólo está limitada por la difusión de los reactivos, y por debajo de esta fuerza iónica, la reacción estará afectada por los campos eléctricos, siempre que el potencial electrostático de los mismos sea superior a la energía térmica.

En el cálculo del potencial electrostático se tienen en cuenta las interacciones de los reactivos con el solvente y con los contraiones, además de las interacciones entre los mismos. Sin embargo, se pueden eliminar directamente los dos primeros factores y dejar sólo la contribución de los reactivos, ya que en el complejo no se encuentran ni solvente ni

contraiones asociados íntimamente en el lugar de interacción. Dado que no se suele disponer de información sobre la estructura de los reactivos, se simplifica el modelo considerando que cada molécula interacciona con otra por medio de una superficie plana circular, y la ecuación resultante es:

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln k_{\text{inf}} - V_{\text{ii}} \cdot X - V_{\text{id}} \cdot Y \cdot X - V_{\text{dd}} \cdot Y^2 \cdot Z$$

donde V_{ii} , V_{id} y V_{dd} son los potenciales para las interacciones ion-monopolo, monopolo-dipolo y dipolo-dipolo, y los factores X , Y y Z contienen información sobre el efecto del apantallamiento de las cargas debido a la fuerza iónica del medio en los distintos tipos de interacción.

En el caso de reacciones sencillas en las que la k_{obs} depende monótonicamente de la fuerza iónica, se puede usar un modelo simplificado, que sólo incluye V_{ii} , al que llamaremos V_{T} (potencial electrostático total) ya que no se puede distinguir entre las interacciones mono- y dipolares, y los productos $Y \cdot X$ y $Y^2 \cdot Z$ son muy parecidos a X . La ecuación queda así:

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln k_{\text{inf}} - V_{\text{T}} \cdot X$$

2.6 DETERMINACIÓN POR CRISTALOGRAFÍA DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL TRIPLE MUTANTE A44D/D47P/A63L

El triple mutante de Pc A44D/D47P/A63L se produjo y purificó como se ha descrito anteriormente, y se cristalizó por el método de difusión de vapor en gota colgante en presencia de sulfato amónico en exceso. La cristalización, los experimentos de difracción de rayos X, la resolución y el refinamiento de la estructura fueron realizados por el Dr. Antonio Romero y Paloma F. Varela en el Departamento de Cristalografía del Instituto de Química Física Rocasolano (CSIC, Madrid), si bien los datos de rayos X hasta 2 Å de resolución se recogieron por un sistema de detector de área MAR con generador de ánodo rotatorio (MAR Research, Hamburgo). Los datos se procesaron usando el programa MOSFLM 5.2 (Leslie, 1991) y el conjunto de programas CCP4 (CCP4, 1979).

La resolución de la estructura se basó en las coordenadas de la Pc de álamo usando las técnicas de búsqueda de Patterson. El refinamiento de la estructura requirió el uso de los programas XPLOR (Brünger *et al.*, 1987) y FRODO (Jones, 1991).

2.7 MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA *IN VITRO*

La mayoría de los métodos que se describen a continuación proceden de Sambrook *et al.* (1989), y se aplicaron tal cual o con pequeñas modificaciones.

2.7.1 Plásmidos utilizados

El vector utilizado para las clonaciones estándar y como plásmido de expresión de los genes modificados de Pc y Cit fue el plásmido pBluescript II SK(+) (Stratagene), referido a lo largo de este trabajo como pBS.

En la clonación de fragmentos procedentes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el plásmido pGEMT, que es un derivado de pGEM-5ZF(+) (Promega).

Ambos son vectores seleccionables por resistencia a ampicilina y por complementación lac, al llevar un sitio de clonación múltiple en el gen *lacZ*.

2.7.2 Aislamiento de DNA

Para el aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se emplearon dos métodos alternativos, uno basado en lisis alcalina y otro en lisis por ebullición.

El primero de estos métodos, descrito originalmente por Birnboim y Doly (1979), consiste en la lisis de las células en presencia de SDS y NaOH, seguida de la eliminación del DNA cromosómico y proteínas mediante precipitación con acetato potásico y centrifugación. El procedimiento se llevó a cabo según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Las preparaciones se sometieron opcionalmente a extracciones con fenol:cloroformo (1:1, v/v) para reducir el contenido proteico de las mismas.

El método alternativo de lisis por ebullición, originalmente descrito por Holmes y Quigley (1981), consiste en la lisis de las células mediante hervido en presencia de Tritón X-100 y se realizó igualmente según Sambrook *et al.* (1989).

El aislamiento de DNA plasmídico para experimentos de secuenciación manual se llevó a cabo mediante el método de lisis alcalina seguido de dos procesos de desproteización con fenol:cloroformo. Para la secuenciación automática se realizó el aislamiento de DNA con el sistema comercial Plasmid Midi Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.7.3 Análisis de DNA

2.7.3.1 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Se llevó a cabo según Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa al 0,7-1,5 % (p/v) preparados en tampón TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) diluido al 50 % y con bromuro de etidio a una concentración de 5 µg/mL. Las electroforesis se llevaron a cabo en aparatos DNA Sub Cell (Bio-Rad). A cada muestra se añadió 1/10 del volumen de tampón de carga, que es una mezcla de azul de bromofenol 0,25 % (p/v), xilencianol 0,25 % (p/v) y glicerol 30 % (v/v) en agua.

Para determinar el tamaño de los fragmentos sometidos a electroforesis se emplearon como marcadores los fragmentos provenientes de la digestión del fago λ con *Cla*I.

Tras la electroforesis se visualizó el DNA iluminando con luz UV de 302 nm, utilizándose para ello un transiluminador LKB modelo Macro Vue. Los geles se fotografiaron con un equipo UVP Imagestore GDS-5000.

2.7.3.2 Electroforesis de DNA en geles de acrilamida

La electroforesis en acrilamida se usó para separar fragmentos de DNA de bajo peso molecular (menos de 400 pb). Se prepararon geles de poliacrilamida al 8 % en TBE en aparatos Miniprotean (Biorad) siguiendo las instrucciones del fabricante. A cada muestra se añadió tampón de carga y en un pocillo se colocó como marcador de tamaño de DNA el resultado de la digestión de pBS con *Hae*III o bien el marcador comercial MWM XIII de Boehringer. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 70 V hasta que el azul de bromofenol llegó al final del gel.

Tras la electroforesis, los geles se incubaron durante 10-15 min en una solución de TBE 1 X con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/mL y se fotografiaron como se describe en el apartado anterior.

2.7.4 Cuantificación de DNA

Para estimar la cantidad de DNA de las muestras se sometió una fracción de las mismas a electroforesis en gel de agarosa conteniendo bromuro de etidio, se iluminó con luz UV y se fotografió. La fluorescencia emitida por el bromuro de etidio intercalado en el DNA

de doble cadena es proporcional a la cantidad de DNA, así que se comparó la fluorescencia de la muestra con la de las bandas de un marcador de peso molecular de concentración conocida.

Alternativamente, el DNA se cuantificó por espectrofotometría usando la relación A_{260}/A_{280} , siendo de 1,8-2 para el DNA puro. Este método, más exacto, requiere DNA no contaminado con RNA ni nucleótidos, que interfieren en las medidas de absorbancia a 260 nm.

2.7.5 Extracción de DNA de un gel

Para separar algún fragmento de DNA y someterlo a clonación o manipulación enzimática se realizó la extracción de este DNA de los geles de agarosa o acrilamida.

2.7.5.1 Extracción de geles de agarosa por congelación

El fragmento de gel que contenía la banda de DNA elegida se cortó y congeló a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h en una jeringuilla desechable de 1 mL. El DNA se extrajo presionando el émbolo de la jeringuilla a la vez que se calentaba el contenido de la misma frotando con los dedos. El líquido eluido se sometió a extracción con fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, en presencia de acetato sódico pH 5,2 a una concentración final de 0,3 M.

2.7.5.2 Extracción de geles de agarosa por unión a membranas de DEAE

Antes de la extracción se trataron las membranas de DEAE (Schleider & Schuell) con NaCl 2,5 M durante varias horas, se lavaron con agua y se dejaron equilibrar en TBE. Una vez elegida la banda de DNA, se realizó una incisión en el gel delante de la misma y se colocó una membrana de DEAE de forma que al proseguir la electroforesis el DNA quedase adherido a ésta. Para separar el DNA, se trató la membrana con una solución de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM y NaCl 1 M durante 30 min a $68\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se eliminaron las impurezas centrifugando 15 min a $13.000 \times g$ y recogiendo todo menos los 10 μL finales. Finalmente, se precipitó el DNA con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío en presencia de MgCl_2 4 mM.

2.7.5.3 Extracción de DNA de geles de acrilamida

Se cortó el fragmento de gel con la banda de DNA de interés, se troceó y se colocó en un tubo de microcentrífuga sobre un lecho de perlas de vidrio. Se añadió solución de elución (acetato amónico 1,5 M, EDTA 1 mM) hasta cubrir totalmente el gel y se incubó durante 15 h a 37 °C.

Se perforó el fondo del tubo de microcentrífuga, se colocó dentro de un tubo de 10 mL y se centrifugó hasta recoger el eluido. Se enjuagó el gel con solución de elución y se volvió a centrifugar. Finalmente se precipitó el DNA con 0,5 volúmenes de acetato amónico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto.

2.7.6 Tratamientos enzimáticos

Las endonucleasas de restricción, la ligasa y cualquier otra enzima utilizada eran de Boehringer Mannheim o Pharmacia y se utilizaron siguiendo las instrucciones indicadas por los fabricantes.

2.7.7 Mutagénesis dirigida

2.7.7.1 Estrategia general

Los genes mutantes se obtuvieron mediante la reacción en cadena de la polimerasa en dos pasos (Giebel y Spritz, 1990), a partir de un fragmento de DNA de *Synechocystis* con el gen que se iba a modificar (*petE* o *petJ*) previamente clonado en pBS y de secuencia conocida (Hervás *et al.*, 1993; Díaz *et al.*, 1994b). El tamaño de estos genes (menos de 500 pb) permitió amplificarlos completos en un reacción de PCR.

Para producir cada gen mutante se necesitaron tres oligonucleótidos, dos de ellos comunes para todos los mutantes y homólogos a las secuencias flanqueantes al gen salvo por la introducción de un sitio de restricción en cada extremo que permitiera su clonación en pBS bajo el promotor del gen *lacZ*. El tercer oligonucleótido, llamado mutagénico, llevaba cerca del extremo 5' el codón o codones cambiados que constituían la mutación. Este cambio de codón debía modificar el mapa de restricción del gen para poder distinguir así el gen mutante del silvestre.

Se realizó una primera PCR con un oligonucleótido de un extremo del gen y el mutagénico, de la que resultó un fragmento del gen con la mutación. Este fragmento se seleccionó por su tamaño en una electroforesis en gel de agarosa y se extrajo del gel. Posteriormente se preparó la segunda reacción de PCR, que tenía como oligonucleótidos el fragmento producido en la primera PCR y el oligonucleótido del otro extremo del gen. El resultado de esta reacción fue el gen completo con la mutación, que de nuevo se seleccionó por electroforesis y se extrajo del gel (Figura 11).

Una vez producidos los genes mutantes se clonaron en pGEMT y de aquí se subclonaron en pBS. Por último, se secuenciaron para comprobar que la polimerasa de DNA no había introducido ningún error en la secuencia.

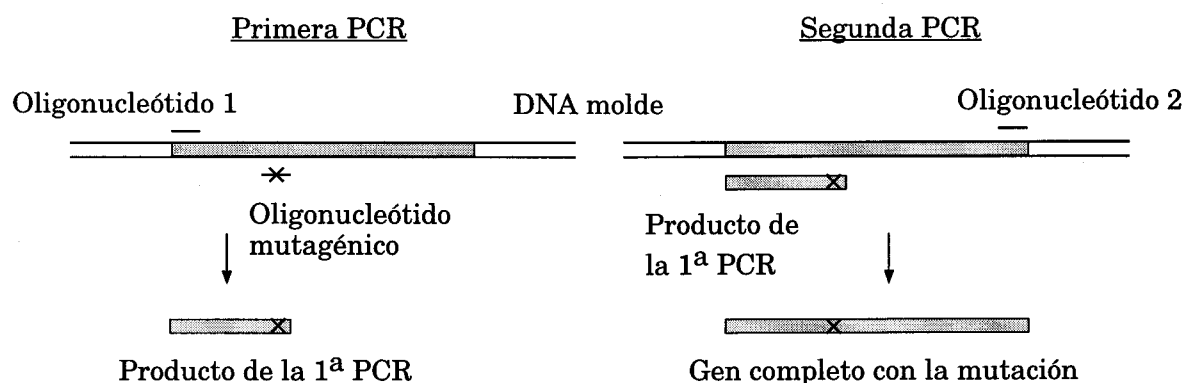


Figura 11: Esquema de la mutagénesis dirigida por PCR en dos pasos.

2.7.7.2 Diseño de los oligonucleótidos

Para el diseño de todos los oligonucleótidos se tuvo en cuenta que el número de nucleótidos distintos de la secuencia original fuera el mínimo posible y que la longitud del oligonucleótido fuera suficiente para garantizar la hibridación durante la PCR (más largo cuantos más cambios lleve respecto a la secuencia original), teniendo en cuenta que si es excesivamente largo pudieran presentarse problemas de autohibridación.

Los oligonucleótidos externos fueron similares a las secuencias que flanquean al gen, pero con las modificaciones necesarias para incluir en cada uno un sitio de restricción que permitiera clonar el gen mutado en pBS bajo el promotor *lac*.

Los oligonucleótidos mutagénicos se diseñaron de forma que el cambio de codón coincidiera con un cambio en el mapa de restricción del gen para así poder distinguir el gen mutado del silvestre por análisis de restricción. La mutación se situó cerca del extremo 5' para

que la polimerasa de DNA encontrase una doble cadena bien apareada en el extremo 3'. Los oligonucleótidos mutagénicos podían ser complementarios a cualquiera de las dos cadenas del DNA molde, pero se eligió siempre aquella posición que generase en la primera PCR un fragmento de menor tamaño para facilitar así la segunda PCR. Este requisito no se cumplió cuando esta elección provocaba la formación de alguna estructura secundaria que dificultase la reacción.

Los oligonucleótidos diseñados para la Pc fueron (en sentido 5'-> 3'):

| | |
|-----------|-----------------------------------|
| Pc 1 | CCCTATGGATCCAATCGC |
| Pc 2 | GAATTCAACGACACACAGATT |
| L12A | GTGGTGCCGCAGTTTTTG |
| K33E | AACAACGAGCTCTCCCCTCATAAC |
| D44A | GCCGCCGCGGGTGTG |
| D44K | TGCCGCCCGCGGTGTGGATGCTGACA |
| D47A | GGTGTGGCAGCTGAC |
| D47R | GGTGTGCGTGCTGACACCGCTGC |
| D44A/D47A | CCGCCGCTGGTGTGGCTGCTGACACCGCTGC |
| D44R/D47R | TGCCGCCCGCGGTGTGCGTGCTGACACCGCTGC |
| A42D/D47P | GTGTTTGACGCCGATGGTGTGCCTGCTGAC |
| A63L | GGCTTGCTCTTTGCCGCTGGTGA |

Los oligonucleótidos diseñados para el Cit fueron (en sentido 5'-> 3'):

| | |
|-------|------------------------------|
| Cit 1 | GTCITGAATTCTTTAT |
| Cit 2 | AGCCCAAGCTTCTCCC |
| F64A | GCCTGGCGCGAAGGGTCGCATCAGTG |
| R67D | TAAGGGTGATATCAGTGACAGCGACA |
| D70R | TAAGGGTCGCATCAGTCGAAGCGACA |
| D72R | GGGTCGCATCAGTCGAAGCCGGATGGAA |

Todos los oligonucleótidos procedían de Boehringer.

2.7.7.3 Preparación del DNA molde

En el caso de la Pc partimos del gen *petE* clonado en pBS (Hervás *et al.*, 1993). Como las reacciones de PCR se favorecen con DNA molde lineal, el plásmido se digirió

previamente con *EcoRV* y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se cuantificó, se purificó por extracción del gel y se diluyó hasta una concentración de 1 ng/μL.

En el caso del Cit se realizó una PCR del DNA total de *Synechocystis* (cedido por el Dr. Francisco Navarro) con los oligonucleótidos externos del Cit para obtener el gen silvestre, del cual se conocía la secuencia. La mezcla de reacción, las condiciones de la PCR, la clonación, subclonación y secuenciación fueron las que se describen en los apartados siguientes. De todo el proceso resultó el gen *petJ* clonado en pBS, que a su vez se sometió a digestión con *BstXI*, se purificó de gel de agarosa y se diluyó hasta 1 ng/μL.

2.7.7.4 Reacción de PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL, conteniendo Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 (25 °C), MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, ditioneitol 0,1 mM, EDTA 10 μM, Tween 20 0,05 % (v/v), Nonidet P40 0,05 % (v/v), glicerol 5 % (v/v), 0,2 mM de cada desoxinucleótido (A, C, G, T); 100 pmol de cada oligonucleótido (en la segunda PCR 100 pmol del oligonucleótido externo y la tercera parte del producto de la primera PCR), 1 ng de DNA molde y 1,75 U de la polimerasa de DNA Expand High Fidelity (Boehringer). A esta mezcla se le añadió un volumen igual de aceite mineral (Sigma) para evitar la evaporación.

La amplificación se realizó en un aparato Mastercycler 5330 (Eppendorf) y consistió en un primer paso de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de hibridación (a temperatura variable) y 1 min de polimerización a 72 °C. La reacción finalizó con 10 min a 72 °C para terminar de polimerizar todas las cadenas de DNA. Se usó una temperatura de hibridación de 46 °C para la mayoría de los mutantes, si bien en algunos casos varió en la primera PCR o en la segunda.

2.7.7.5 Clonación

Una vez producidos, los genes mutantes se clonaron utilizando pGEMT, que es un plásmido linearizado en *EcoRV* y que lleva una timidina terminal añadida a cada extremo 3'. Esta característica mejora su ligación con fragmentos de DNA procedentes de PCR, ya que muchas polimerasas de DNA añaden una adenina al extremo 3' de las cadenas de DNA que sintetizan. Éste es el caso de una parte de las moléculas de DNA que sintetiza la polimerasa de DNA Expand High Fidelity.

Se realizó la ligación según las instrucciones del fabricante, se transformaron células competentes de *E. coli* con parte de la ligación y se sembraron en medio LB sólido con

ampicilina, X-gal e IPTG. Tras incubar 12 h a 37 °C se seleccionaron varios clones de color blanco para analizar su DNA plasmídico, para lo cual se cultivaron en medio líquido y se realizó una minipreparación de DNA. Una pequeña parte del DNA se sometió a análisis de restricción y se seleccionaron varios clones que llevasen el gen mutado. Se procedió entonces a la clonación direccional en pBS, para lo cual se digirió la construcción (con *Bam*HI y *Eco*RI en el caso de *petE*, y con *Eco*RI y *Hin*DIII en el caso de *petJ*) para extraer el gen de un gel de agarosa.

Una vez realizada la ligación del gen con el plásmido correspondiente se repitió el proceso realizado con pGEMT hasta identificar el clon cuyo DNA se iba a secuenciar.

2.7.8 Secuenciación de DNA

2.7.8.1 Secuenciación manual

La secuenciación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Sanger *et al.* (1977), basado en el uso de didesoxirribonucleótidos de adenina, guanina, citosina y timina para producir paradas aleatorias durante la reacción de polimerización a partir de un oligonucleótido. Se utilizó 5'(α -³⁵S)dATP (1,212 μ Ci/ μ mol), suministrado por New England Nuclear, para marcar radiactivamente las cadenas sintetizadas en dichas reacciones. Como oligonucleótidos se emplearon "Reverse primer" y "M13-20 primer" de Boehringer, adecuados para secuenciar plásmidos derivados de pBS. Los reactivos y la DNA polimerasa empleados en las reacciones fueron los incluidos en el equipo Sequenase versión 2.0, (United States Biochemical). El DNA plasmídico se obtuvo mediante lisis alcalina o ebullición seguido de desproteinización con fenol:cloroformo, precipitación y resuspensión en agua estéril con RNasa.

La reacción comenzó al añadir 1 μ L de NaOH 1 M y 1 μ L del oligonucleótido a 6 μ L de DNA, e incubar la mezcla 10 min a 70 °C. A continuación se añadieron 2 μ L de TES (TES 560 mM, HCl 100 mM y MgCl₂ 100 mM) y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Una vez realizadas la desnaturalización e hibridación, se siguieron las instrucciones del fabricante para realizar el marcaje y finalizar la reacción.

Los productos de las reacciones de secuenciación se separaron en geles de poliacrilamida al 6 % (p/v) con 4,68 M de urea en tampón TBE. Se empleó un aparato de electroforesis modelo MacroPhor (Pharmacia) termostatzado con un baño Hetofrig a 55 °C. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 2.500 V. El producto de una misma

reacción se sometió a electroforesis de distinta duración, consiguiéndose con ello determinar en cada caso una secuencia de al menos 300 bases.

Terminada la electroforesis, los geles se pasaron a papel Whatman 3 MM y se secaron utilizando un secador de geles Drygel Sr. SE1160 de Hoefer Scientific Instruments. La autorradiografía se realizó con películas Kodak X-OMAT-S, en carcasas de exposición Sigma, a temperatura ambiente, empleándose para el revelado de las películas los reactivos suministrados por Valca y siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.7.8.2 Secuenciación automática

Parte de los genes mutados se comprobaron por secuenciación automática, en el servicio de secuenciación de Medigene (Martinsried, Alemania). La secuenciación se realizó a partir de los mismos oligonucleótidos usados en la secuenciación manual. El DNA se preparó según las instrucciones de Medigene.

2.8 MODELIZACIÓN COMPUTERIZADA

El trabajo de modelización computerizada fue realizado por el Dr Antonio Díaz Quintana en una estación SGI RC10000.

2.8.1 Modelización computerizada de la estructura del citocromo c_6 silvestre de *Synechocystis*

Se modeló la estructura del Cit silvestre de *Synechocystis* tomando como base la estructura del Cit del alga verde *Monoraphidium braunii*. (Frazão *et al.*, 1995). Se modificó el archivo PDB original usando el módulo BIOPOLYMER de SYBYL (Trypos inc.) para sustituir la secuencia del Cit original por la de *Synechocystis*. Se procedió entonces a la minimización en vacío de la estructura usando el módulo SANDER de AMBER 4.1 (Pearlman *et al.*, 1995). La estructura resultante se solvató con moléculas de agua TIP3P, usando la opción BLOB del módulo EDIT de AMBER. Se realizó una minimización de las moléculas de agua y se sometió a una dinámica molecular corta (9 ps). A partir de aquí se minimizó el sistema completo, tras lo cual se realizó la dinámica molecular de todo el sistema.

Se utilizaron los parámetros del hemo descritos por Banci *et al.*(1994).

De la dinámica con una trayectoria total de 250 ps se escogieron para su análisis los últimos 80 ps y así obtener un promedio de la estructura. Dicho análisis se llevó a cabo usando el módulo CARNAL de AMBER. Las estructuras fueron comprobadas con el programa PROCHECK.

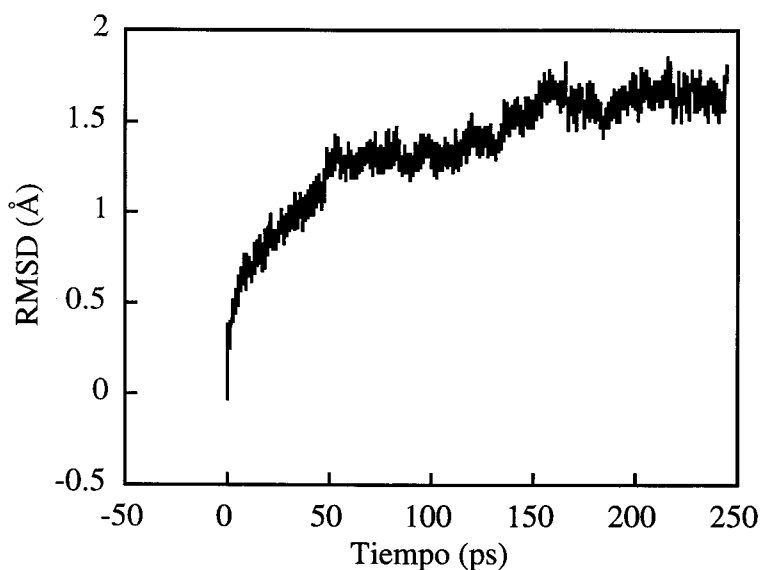


Figura 12: Trayectoria de la dinámica molecular en agua del Cit de *Synechocystis*.

La gráfica representa la desviación cuadrática media de los átomos (salvo hidrógeno) del esqueleto de la proteína respecto a la estructura minimizada, en función del tiempo de simulación.

2.8.2 Modelización computerizada del potencial de superficie de las proteínas silvestres y mutadas

Los modelos de las proteínas modificadas se obtuvieron cambiando los residuos con el módulo BIOPOLYMER de SYBYL y realizando posteriormente una minimización en vacío.

El potencial electrostático de superficie se estimó usando el algoritmo de Nicholls y Honig (1980) tal como se describe en el programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

3. RESULTADOS

Para estudiar la interacción de Pc y Cit con el PSI se diseñaron mutantes en residuos de la superficie de estas dos proteínas teniendo en cuenta las regiones que, según trabajos previos, parecen estar implicadas en la interacción con el PSI. En el caso de la Pc, las mutaciones se realizaron sobre los residuos de la cara este (Asp44 y Asp47) y de la zona norte (Leu12 y Lys33) que se señalan en la Figura 13A y 13B. En el Cit se modificaron las posiciones Asp70 y Asp72 de la cara este y los residuos Arg67 y Phe64 cercanos al hemo (Figura 13C).

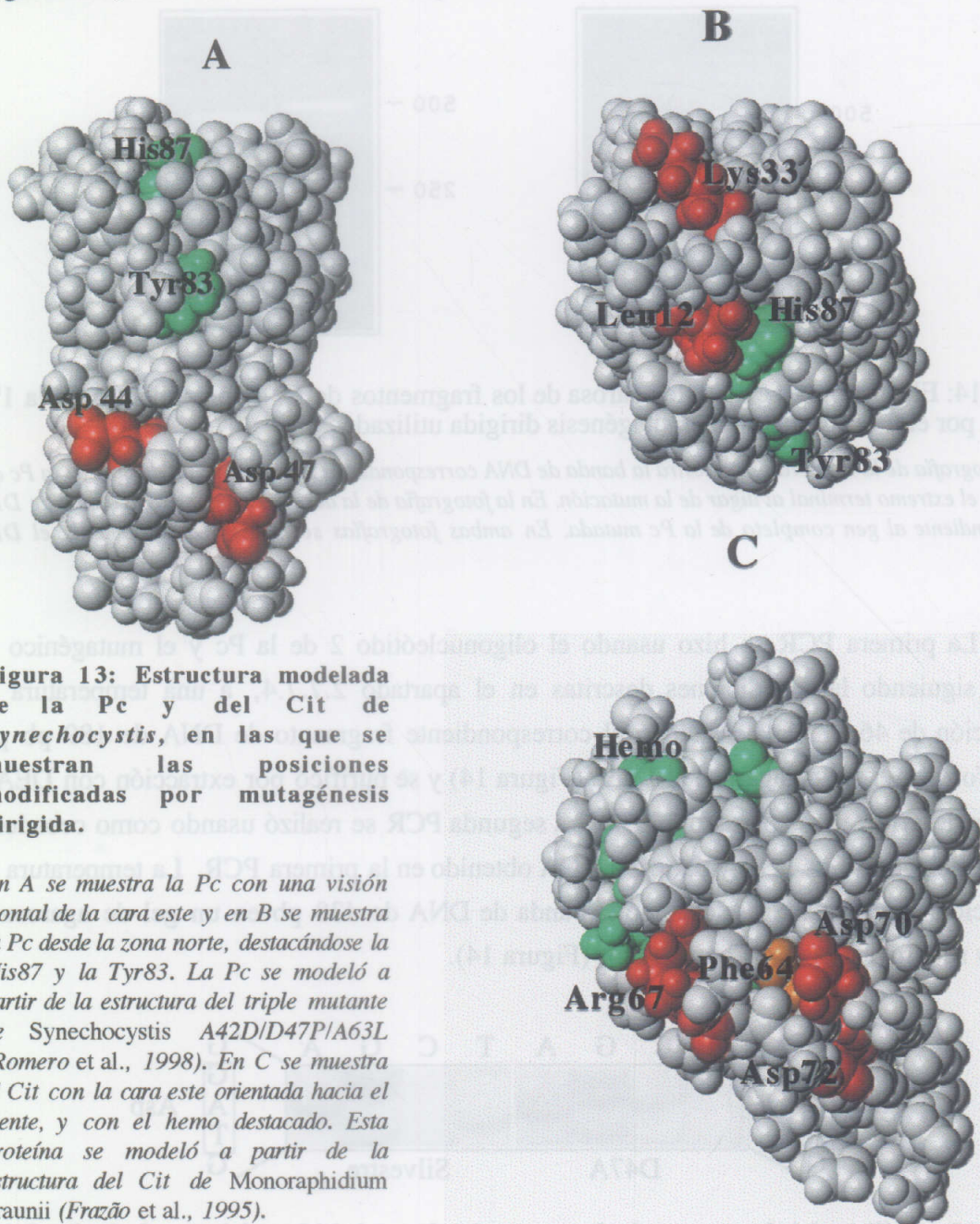


Figura 13: Estructura modelada de la Pc y del Cit de *Synechocystis*, en las que se muestran las posiciones modificadas por mutagénesis dirigida.

En A se muestra la Pc con una visión frontal de la cara este y en B se muestra la Pc desde la zona norte, destacándose la His87 y la Tyr83. La Pc se modeló a partir de la estructura del triple mutante de *Synechocystis* A42D/D47P/A63L (Romero et al., 1998). En C se muestra el Cit con la cara este orientada hacia el frente, y con el hemo destacado. Esta proteína se modeló a partir de la estructura del Cit de *Monoraphidium braunii* (Frazão et al., 1995).

3.1 OBTENCIÓN DE LOS GENES MUTADOS DE PLASTOCIANINA Y CITOCROMO c_6

Todos los genes mutantes de Pc y Cit se obtuvieron mediante el método explicado en el apartado 2.7.7.1. A continuación se describe como ejemplo la obtención del mutante D47A de la Pc.

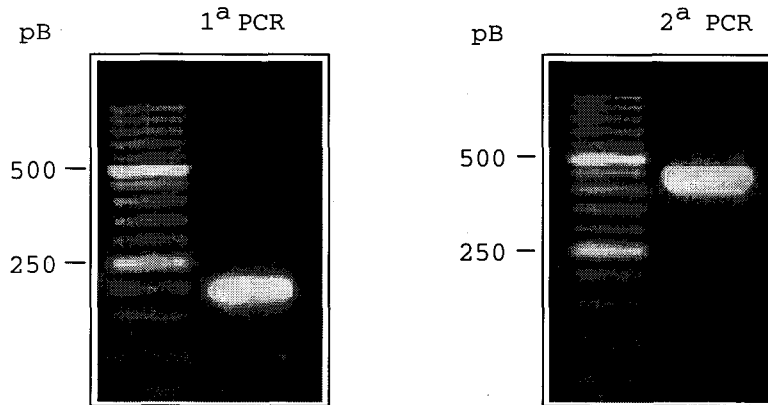


Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA procedentes de la 1ª y 2ª PCR por el procedimiento de mutagénesis dirigida utilizado.

En la fotografía de la izquierda se muestra la banda de DNA correspondiente a un fragmento del gen de la Pc que va desde el extremo terminal al lugar de la mutación. En la fotografía de la derecha se muestra la banda de DNA correspondiente al gen completo de la Pc mutada. En ambas fotografías se muestra a la izquierda el DNA patrón.

La primera PCR se hizo usando el oligonucleótido 2 de la Pc y el mutagénico de D47A, siguiendo las condiciones descritas en el apartado 2.7.7.4, a una temperatura de hibridación de 46 °C. Se seleccionó el correspondiente fragmento de DNA de 189 pb por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (Figura 14) y se purificó por extracción con DEAE, como se describe en el apartado 2.7.5.2. La segunda PCR se realizó usando como cebadores el oligonucleótido 1 de la Pc y parte del DNA obtenido en la primera PCR. La temperatura de hibridación fue 46 °C. Se seleccionó la banda de DNA de 438 pb en un gel de agarosa al 1,5 % y se purificó el DNA como antes (Figura 14).

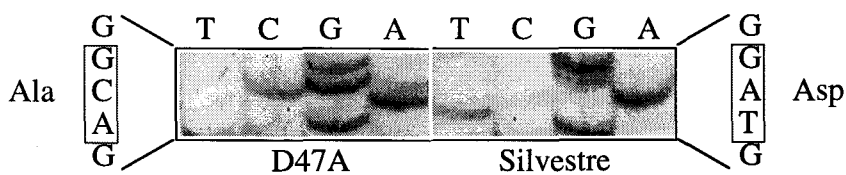


Figura 15: Análisis del fragmento de la secuencia de nucleótidos del gen de la Pc D47A que contiene la mutación, comparado con la misma región de DNA de la Pc silvestre.

El gen modificado se clonó en pBS como se describe en el apartado 2.7.7.5. Se analizó el DNA plasmídico de algunos clones por restricción con la enzima *PvuII*, se seleccionó uno de ellos que contenía el sitio de corte correspondiente a la mutación, y se secuenció manualmente como se explica en el apartado 2.7.8.1, comprobándose la ausencia de cambios no deseados y la presencia de la mutación diseñada (Figura 15).

En el resto de los mutantes, tanto de la Pc como del Cit, se siguió un proceso similar si bien variando los cebadores y, en algunos casos, también las temperaturas de hibridación de las PCR, así como las enzimas de restricción apropiadas para seleccionar los clones que llevaran la mutación. Algunos mutantes se secuenciaron de forma manual y otros de modo automático. En todos los casos el resultado fue el gen modificado y localizado entre los sitios *BamHI* y *EcoRI* (Pc), o *EcoRI* y *HinDIII* (Cit) del sitio de clonación múltiple del plásmido pBS.

3.2 ANÁLISIS DE LOS MUTANTES DE PLASTOCIANINA

3.2.1 Producción de los mutantes de plastocianina

Una vez obtenido un clon de *E. coli* con el plásmido apropiado, esto es, que contuviera el inserto del gen de la Pc con la mutación diseñada, se procedió a su cultivo en 10 L de medio para producir la proteína mutada en cantidad suficiente para su caracterización. El rendimiento de producción de Pc de los cultivos de los distintos mutantes fue variable (Tabla 1), aun cuando las condiciones de cultivo fuesen iguales en todos los casos. La purificación se llevó a cabo según se describe en el apartado 2.3.3.

Tabla 1: Rendimiento obtenido en la producción en *E. coli* de la Pc silvestre y de los diferentes mutantes. Las cantidades se refieren a los extractos de periplasma de *E. coli*.

| Plastocianina | Producción (mg/L) | Plastocianina | Producción (mg/L) |
|---------------|-------------------|----------------|-------------------|
| Silvestre | 2,0 | A44D/D47P/A63L | 5,3 |
| D44A | 2,0 | D44A/D47A | 1,7 |
| D47A | 2,7 | D44R/D47R | 1,8 |
| D44K | 3,3 | L12A | 1,2 |
| D47R | 2,8 | K33E | 2,8 |

El cultivo se realizó en las condiciones descritas en el apartado 2.1.2. La fracción periplásmica se extrajo según el método descrito en el apartado 2.3.3.1.

3.2.2 Caracterización de las plastocianinas mutadas

3.2.2.1 Espectro UV/Vis

Todas las proteínas producidas presentaron un espectro UV/Vis básicamente idéntico al de la Pc silvestre. Esta equivalencia del espectro no se limitaba a la zona visible, donde el espectro es más simple, con un único pico a 597 nm en la forma oxidada, sino que se mantenía en el espectro UV, mucho más rico en matices. Como ejemplo se presenta en la Figura 16 el espectro del mutante D47R.

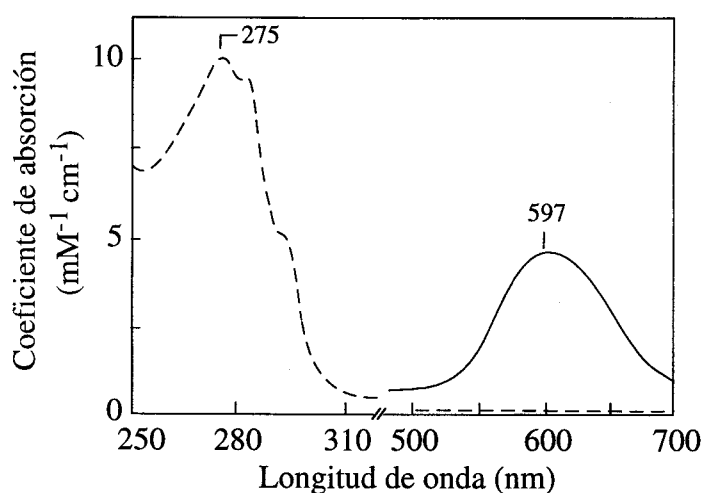


Figura 16: Espectro de absorción de la Pc D47R.

La línea continua corresponde a la Pc oxidada por ferricianuro, y la discontinua a la proteína reducida.

3.2.2.2 Potencial redox

Se determinó el potencial redox de todas las proteínas obtenidas. Como ejemplo, en la Figura 17 se muestra la titulación redox de la Pc A42D/D47P/A63L.

A excepción del triple mutante, cuyo potencial es 325 mV a pH 7, el resto de las Pc mutadas presentan un potencial similar al silvestre. Los valores de potencial determinados para cada mutante aparecen en la Tabla 2, y son la media de, al menos, tres titulaciones.

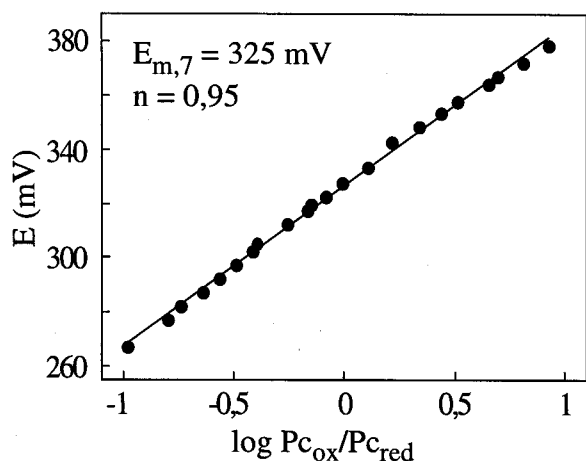


Figura 17: Representación de Nernst de la titulación potenciométrica de la Pc A42D/D47P/A63L.

La titulación se realizó a pH 7,0 y temperatura ambiente, tal como se describe en el apartado 2.4.2.

Tabla 2: Potenciales redox de la Pc silvestre y de los mutantes a pH 7,0.

| Plastocianina | $E_{m,7}$ (mV) | Plastocianina | $E_{m,7}$ (mV) |
|---------------|----------------|----------------|----------------|
| Silvestre | 358 | L12A | 357 |
| D44A | 336 | K33E | 336 |
| D47A | 349 | D44A/D47A | 352 |
| D44K | 357 | D44R/D47R | 336 |
| D47R | 342 | A42D/D47P/A63L | 325 |

3.2.3 Determinación por difracción de rayos X de la estructura del triple mutante de plastocianina A42D/D47P/A63L

3.2.3.1 Cristalización de la proteína

Durante la primera etapa de realización de esta tesis, el grupo del Dr. Antonio Romero (Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC, Madrid) trató de obtener cristales de la Pc silvestre de *Synechocystis*, proporcionada por nuestro grupo, con el objeto de resolver la estructura de la proteína por difracción de rayos X. No fue posible, sin embargo, obtener los cristales silvestres debido, probablemente, a la capacidad de interconversión entre las formas reducida y oxidada de esta proteína, lo que impedía partir de una solución homogénea.

El mutante A42D/D47P/A63L incluye modificaciones en tres residuos conservados en el resto de las Pc conocidas pero no en *Synechocystis* (Figura 4). Al purificar la proteína se observó que presentaba un potencial redox 30 mV inferior al silvestre (Tabla 2) y que era

capaz de mantenerse estable durante días en su forma oxidada, lo que permitió su cristalización. En la Figura 18 se muestran los cristales de esta proteína utilizados en la difracción de rayos X.



Figura 18: Cristales del mutante triple de Pc A42D/D47P/A63L.

3.2.3.2 Caracterización del triple mutante

El triple mutante de Pc A42D/D47P/A63L presenta un espectro UV/Vis idéntico al silvestre, lo que indica la ausencia de alteraciones en el sitio activo aunque su potencial redox a pH 7 sea, como ya se ha comentado, 30 mV inferior al de la Pc silvestre. Asimismo se estudió la reacción de esta proteína con su aceptor natural de electrones, el PSI, para determinar si las mutaciones habían alterado la interacción. El procedimiento seguido y las condiciones experimentales se describen en el apartado 3.2.4.1. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Constantes bimoleculares para la reacción de reducción del PSI por las Pc silvestre y mutante triple, en condiciones estándar (k_2) y extrapoladas a fuerza iónica infinita (k_{inf}).

| Plastocianina | k_2 ($M^{-1} s^{-1}$) | k_{inf} ($M^{-1} s^{-1}$) |
|----------------|---------------------------|-------------------------------|
| Silvestre | $8,6 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^7$ |
| A42D/D47P/A63L | $5,5 \times 10^6$ | $0,9 \times 10^7$ |

Los experimentos se realizaron como se explica en el apartado 3.2.4.1.

En la Tabla 3 se observa que la constante bimolecular de reacción (k_2) en condiciones estándar es la mitad que la silvestre, mientras que al extrapolar a condiciones independientes de las interacciones electrostáticas (k_{inf}) se obtienen valores muy similares. Este resultado parece indicar que, si bien los cambios en residuos cargados de la superficie del mutante triple afectan a la interacción electrostática Pc/PSI, la reactividad intrínseca de la Pc respecto al PSI no ha cambiado en relación al silvestre, lo que sugiere que la estructura del centro redox no está alterada significativamente.

3.2.3.3 Plegamiento de la proteína

La Pc mutante de *Synechocystis* tiene forma de un barril de dimensiones de 38 x 30 x 26 Å³, que incluye en su interior la mayoría de los residuos hidrófobos de la proteína. Presenta la estructura de β-sandwich característica de otras proteínas de cobre. En la Figura 19 se aprecia que posee ocho cadenas β agrupadas en dos hojas β, además de una α-hélice que comprende los residuos 48 al 55 a continuación de la cadena β-4, similar a la descrita para la Pc de *A. variabilis* (Badsberg *et al.*, 1996), pero más larga y regular que la de la mayoría de las Pc cuya estructura se conoce.

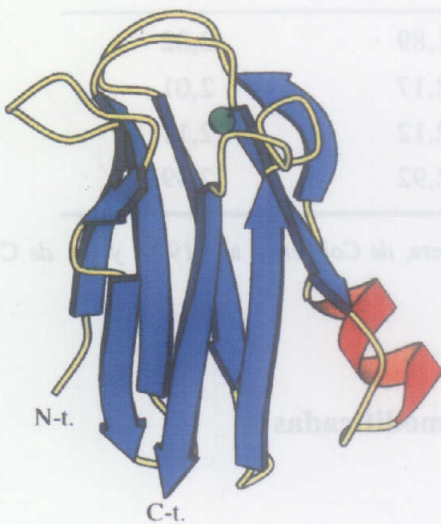


Figura 19: Estructura del triple mutante de la Pc A42D/D47P/A63L de *Synechocystis*.

3.2.3.4 Coordinación del cobre

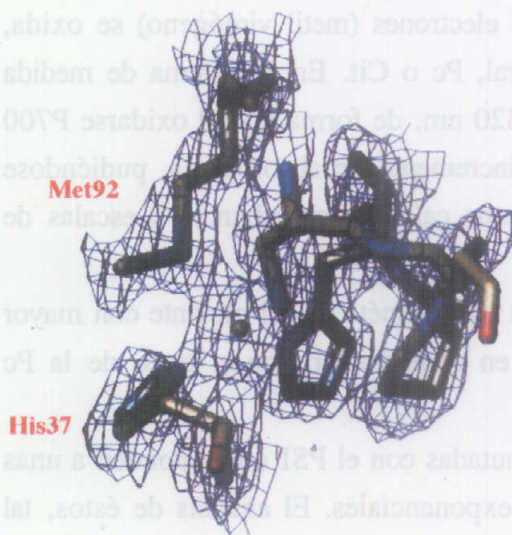


Figura 20: Coordinación del átomo de cobre en la Pc A42D/D47P/A63L de *Synechocystis*.

El átomo de cobre se sitúa, al igual que en todas las Pc conocidas, en el extremo norte de la molécula y rodeado de residuos predominantemente hidrófobos. Se coordina con los átomos de azufre de la Cys84 y Met92 y de nitrógeno de las histidinas 37 y 87, en una geometría de tetraedro distorsionado (Figura 20 y Tabla 4). Estos ligandos son los mismos en todas las Pc conocidas (Sigfridsson, 1998).

Tabla 4: Comparación de las distancias de enlace del cobre a sus ligandos en distintas Pc.

| | Distancias de enlace (Å) | | | |
|--------------------------|--|-------|---------------------|----------------------|
| | A42D/D47P/A63L <i>Synechocystis</i> | Álamo | <i>Enteromorpha</i> | <i>Chlamydomonas</i> |
| Cu-N ^{δ1} (H37) | 2,01 | 1,91 | 1,89 | 2,02 |
| Cu-N ^{δ1} (H87) | 2,01 | 2,06 | 2,17 | 2,01 |
| Cu-S ^γ (C84) | 2,26 | 2,07 | 2,12 | 2,11 |
| Cu-S ^δ (M92) | 2,64 | 2,82 | 2,92 | 2,89 |

Los datos de álamo proceden de Guss et al., 1992, los de *E. prolifera*, de Collyer et al., 1990, y los de *C. reinhardtii*, de Redinbo et al., 1993.

3.2.4 Reducción de PSI por las plastocianinas modificadas

3.2.4.1 Análisis cinético

Tal como se explica en Materiales y Métodos, el PSI puede ser fotoexcitado por un pulso láser y oxidarse en presencia de un aceptor de electrones (metil viológeno) se oxida, pudiendo así recibir un electrón de su donador natural, Pc o Cit. En el sistema de medida empleado se siguieron los cambios de absorbancia a 820 nm, de forma que al oxidarse P700 tras el impacto del láser, se produce un rapidísimo incremento de absorbancia, pudiéndose seguir posteriormente la reducción de P700⁺ como una caída de absorbancia a escalas de tiempo mucho mayores (Figura 21).

En la Figura 21 se muestran como ejemplo los trazos cinéticos del mutante con mayor velocidad de reacción con el PSI y del más lento, en comparación con el trazo de la Pc silvestre.

Los trazos de la interacción de todas las Pc mutadas con el PSI corresponden a unas cinéticas monofásicas que se ajustan a curvas monoexponenciales. El análisis de éstos, tal

como se describe en el apartado 2.5.3 permite obtener para cada cinética un valor de constante observada de pseudo-primer orden (k_{obs}), que en la Figura 22 se representa en función de la concentración de Pc.

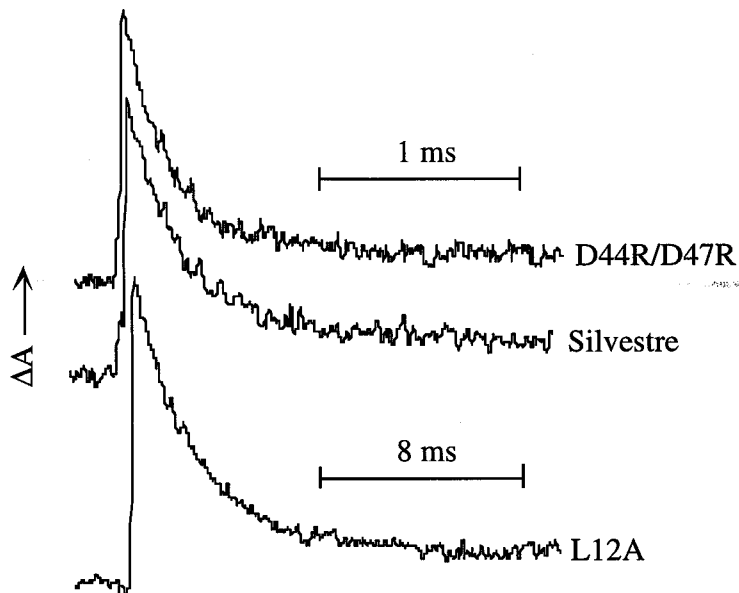


Figura 21: Trazos cinéticos a 820 nm que muestran la reducción del PSI de *Synechocystis* por la Pc silvestre y por los mutantes L12A y D44R/D47R.

La mezcla de reacción fue la estándar para pH 7,5, la concentración de proteína fue 200 μM y la temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$.

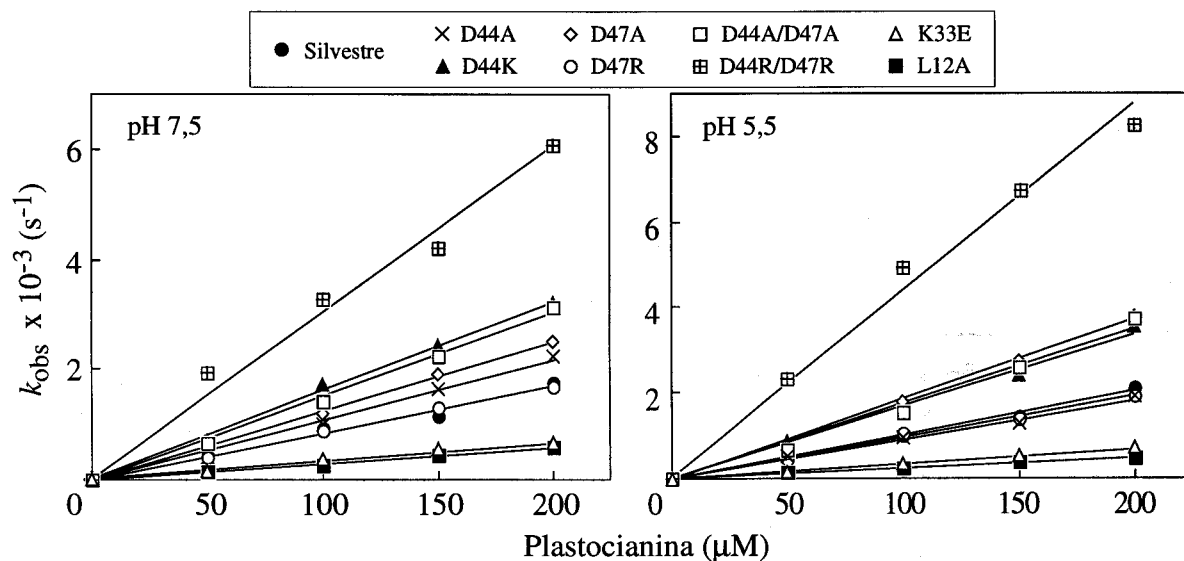


Figura 22: Dependencia de la constante observada (k_{obs}) respecto a la concentración de Pc para la reducción del PSI de *Synechocystis* por la Pc silvestre y sus mutantes a pH 7,5 y 5,5.

Los datos se obtuvieron en las condiciones estándar para ensayos de concentración de proteína a 25 $^{\circ}\text{C}$.

La constante observada para la interacción de todos los mutantes de Pc con el PSI depende de forma lineal respecto a la concentración de proteína. Todas las Pc mutadas carecen de fase rápida en sus trazos cinéticos, de modo que el mecanismo de reacción se puede asignar, al igual que en el sistema silvestre, a una colisión orientada, sin formación aparente de complejo intermediario (Hervás *et al.*, 1994). En cualquier caso se aprecian claras diferencias de efectividad entre los distintos mutantes, siendo unos mutantes donadores de electrones al PSI más eficientes que la Pc silvestre, y otros menos eficientes.

De la Figura 22 se obtienen las constantes de segundo orden (k_2) de la reacción para cada mutante de Pc con el PSI a pH 7,5 y pH 5,5, que se relacionan en la Tabla 5.

Tal como se observa en la Tabla 5 y en la Figura 22, los mutantes situados en la cara este de la Pc se pueden agrupar, según su reactividad con el PSI en condiciones estándar, en tres tipos de comportamiento: los que son similares al silvestre (D44A y D47R), los que tienen una k_2 aproximadamente dos veces mayor que la silvestre (D44K, D47A y D44A/D47A) y, por último, el mutante doble D44R/D47R, que tiene una constante cuatro veces mayor que la silvestre.

Tabla 5: Constante bimolecular de la reacción de reducción del PSI por las distintas Pc en condiciones estándar (k_2) y extrapolada a fuerza iónica infinita (k_{inf}).

| Plastocianina | $k_2 \times 10^{-6} \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$ | | $k_{inf} \times 10^{-6} \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$ | |
|---------------|---|--------|---|-------------------|
| | pH 7,5 | pH 5,5 | NaCl | MgCl ₂ |
| Silvestre | 8,6 | 9,9 | 10,6 | 10,9 |
| D44A | 9,5 | 9,5 | 9,4 | 9,5 |
| D44K | 15,7 | 16,4 | 8,3 | 10,1 |
| D47A | 11,8 | 18,4 | 12,5 | 12,2 |
| D47R | 8,5 | 9,2 | 8,7 | 7,8 |
| D44A/D47A | 14,4 | 15,9 | 7,7 | 5,3 |
| D44R/D47R | 29,7 | 37,0 | 7,6 | 9,1 |
| L12A | 2,8 | 2,4 | 4,9 | 3,9 |
| K33E | 3,2 | 3,4 | 10,8 | 4,3 |

Los valores de k_{inf} se obtuvieron a pH 7,5.

Los mutantes de la zona norte de la Pc reaccionan deficientemente con el PSI, siendo sus constantes bimoleculares de tres a cuatro veces menores que la silvestre. Otro resultado a

destacar es la ausencia general de efecto del pH, a excepción del mutante D47A, cuya k_2 a pH 7,5 es un 64 % de la misma a pH 5,5.

Dada la naturaleza electrostática de la interacción de la Pc con el PSI, puesta de manifiesto en estudios anteriores con el sistema silvestre (Hervás *et al.*, 1994), se realizó un análisis comparativo del efecto de la fuerza iónica sobre la k_2 en los distintos mutantes y en la Pc silvestre.

Estudios previos habían establecido en *Synechocystis* la existencia de repulsión de cargas entre la Pc silvestre y el PSI, de manera que el aumento de la fuerza iónica mejora la interacción apantallando cargas del mismo signo, aumentando la velocidad de la reacción hasta un límite que se define como k_{inf} (constante intrínseca de la reacción independiente de las interacciones electrostáticas).

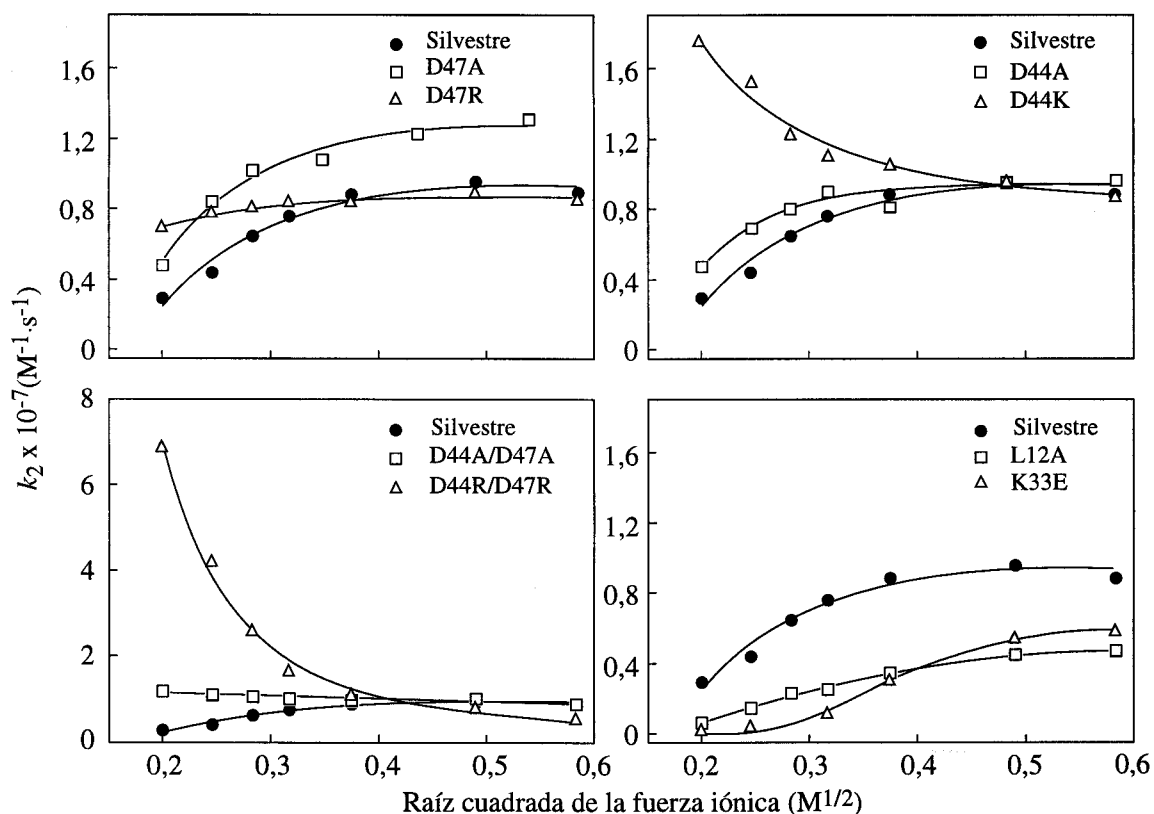


Figura 23: Efecto de la fuerza iónica sobre la constante bimolecular (k_2) para la reducción del PSI de *Synechocystis* por la Pc silvestre y sus mutantes.

Los experimentos se realizaron partiendo de la mezcla de reacción estándar y añadiendo cantidades crecientes de NaCl.

En la Figura 23 se observa cómo aparecen distintos comportamientos al variar la fuerza iónica en función de la desaparición de cargas negativas en la cara este de la Pc. Cuando desaparece una carga negativa (D44A y D47A), el comportamiento respecto a la

fuerza iónica es prácticamente silvestre; cuando el cambio es de dos cargas, el efecto depende de las posiciones implicadas: así, la reacción de los mutantes D47R y D44A/D47A con el PSI es prácticamente independiente de la fuerza iónica, mientras que el mutante D44K presenta una inversión de la dependencia de la fuerza iónica. Esta dependencia inversa respecto a la Pc silvestre aparece de manera mucho más acusada en el mutante D44R/D47R.

Tal como se explicó en Materiales y Métodos, este tipo de reacciones dependientes de la fuerza iónica pueden ajustarse al modelo de Watkins, que permite la extrapolación de la k_2 a fuerza iónica infinita (k_{inf}). Los valores obtenidos se encuentran en la Tabla 5.

Los experimentos de dependencia de fuerza iónica no sólo se realizaron con cantidades crecientes de NaCl, sino también usando MgCl₂ para ver si se observaba algún efecto específico de los cationes divalentes, como se había encontrado en estudios precedentes con otros sistemas (Takabe *et al.*, 1983; Hervás *et al.*, 1992, 1994). Los resultados son prácticamente iguales a los obtenidos con NaCl, con la única diferencia de que se obtiene el mismo efecto a fuerza iónica algo menor.

En todos los mutantes de la cara este de la Pc, así como en el mutante K33E de la zona norte, las k_{inf} son aproximadamente silvestres. En el mutante L12A, que además no presenta cambio de carga, la k_{inf} es la mitad de la silvestre, por lo que, en este caso, el efecto de la mutación no puede asignarse simplemente a cambios en la interacción electrostática Pc/PSI. Al revisar esta parte de la Tabla 5 hay que considerar que los ajustes de Watkins para el mutante D44A/D47A no son tan fiables como el resto, al ser la reacción con el PSI casi independiente de la fuerza iónica.

La única excepción encontrada en cuanto al mecanismo de reacción con el PSI aparece en el mutante D44R/D47R cuando se estudia la reacción a baja fuerza iónica. Dado que este mutante presenta una reacción con el PSI optimizada a baja fuerza iónica (Figura 23) y con las mayores constantes de reacción de entre todos los mutantes estudiados, se realizó un experimento de dependencia de la concentración de Pc a baja fuerza iónica para averiguar si el cambio de cuatro cargas producido podría afectar al mecanismo de reacción.

En la Figura 24 se puede observar que, a baja fuerza iónica, la reacción se satura a concentraciones elevadas de Pc, lo cual indica un mecanismo de reacción que incluye la formación de un complejo previo a la transferencia de electrones entre el mutante D44R/D47R y el PSI (Hervás *et al.*, 1995).

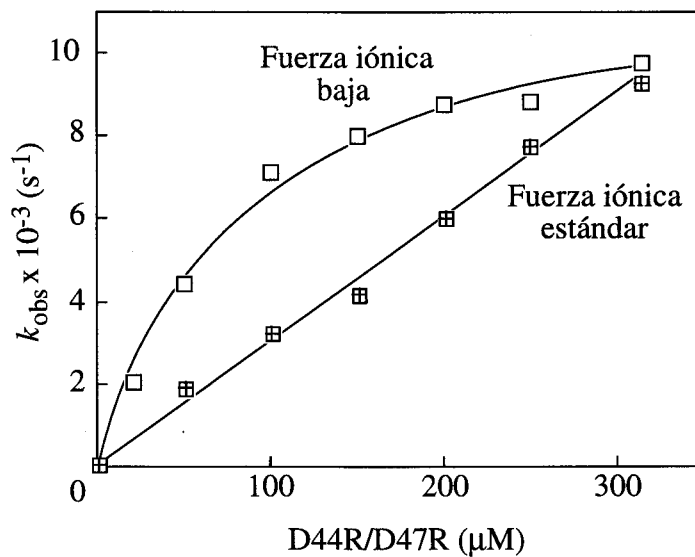


Figura 24: Dependencia de la constante observada (k_{obs}) respecto a la concentración de proteína del mutante D44R/D47R en distintas condiciones de fuerza iónica.

El experimento de fuerza iónica baja se realizó en condiciones estándar pero sin la adición de $MgCl_2$ a la mezcla de reacción.

3.2.4.2 Parámetros termodinámicos

Para obtener más información sobre la interacción Pc/PSI, se estudió el efecto de la temperatura sobre la reacción de transferencia de electrones al PSI, para lo cual se repitieron los experimentos de dependencia de proteína y de fuerza iónica a intervalos de 5 °C desde los 5 a los 25 °C. En la Figura 25 se muestra un ejemplo de cómo se analizan estos datos para obtener los parámetros termodinámicos.

El mismo estudio se realizó con todos los mutantes aumentando la fuerza iónica tanto con NaCl como con $MgCl_2$, no encontrándose diferencias apreciables en el efecto de ambas sales.

Si bien la temperatura no afecta cualitativamente a la tendencia que presenta cada mutante en la dependencia de su k_2 respecto a la fuerza iónica, el efecto de la fuerza iónica sí se hace más evidente al aumentar la temperatura (Figura 25A). En todos los casos, el cambio de energía libre con la fuerza iónica es la resultante de cambios opuestos de entropía y entalpía (Figura 24C), como ocurre en otros sistemas estudiados con anterioridad (Díaz *et al.*, 1994a; Hervás *et al.*, 1996).



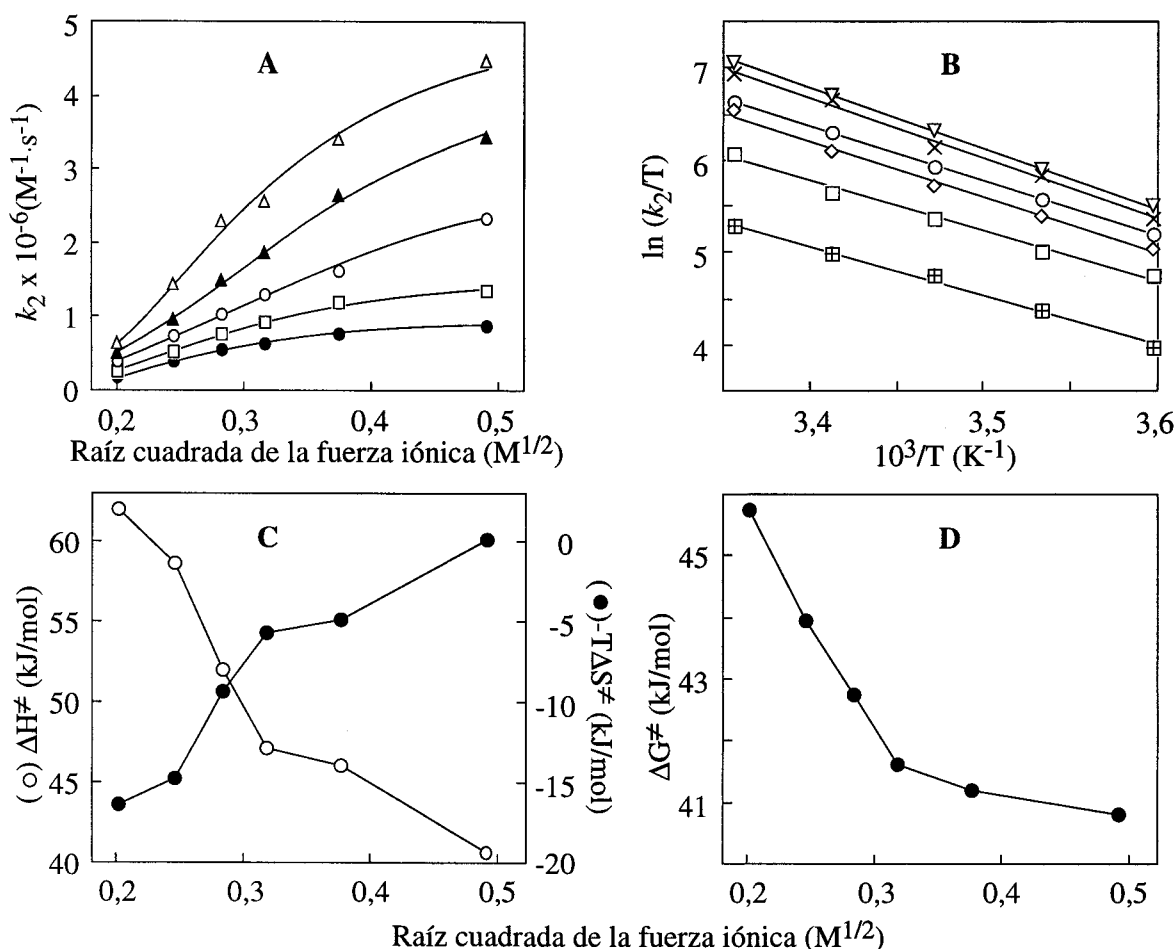


Figura 25: Variación de la k_2 con la fuerza iónica a distintas temperaturas, representación de Eyring, y representaciones de los parámetros termodinámicos del mutante de Pc L12A a distinta fuerza iónica.

En el panel A se muestra la dependencia de la k_2 respecto a la fuerza iónica a los siguientes valores de temperatura: 278 (●), 283 (□), 288 (○), 293 (▲) y 298 K (△). En el panel B se muestran las representaciones de Eyring correspondientes a los distintos valores de fuerza iónica, ordenados de forma que la línea inferior corresponde a la fuerza iónica menor. De acuerdo con los datos experimentales, de cada línea de Eyring se obtiene una pendiente y un punto de corte para $1/T = 0$, de donde se obtienen respectivamente los valores de ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger , que se muestran en el panel C y que a su vez permiten calcular ΔG^\ddagger (panel D). Los valores de ΔG^\ddagger corresponden a 298 K.

Como es de esperar, aquellos mutantes en los que un aumento de fuerza iónica disminuye las repulsiones de la Pc con el PSI (D44A, D47A, L12A y K33E) presentan una disminución de ΔG^\ddagger al aumentar la concentración de sal, como ocurre en la Pc silvestre. En los mutantes de Pc en los que la dependencia de fuerza iónica es inversa a la de la Pc silvestre (D44K y D44R/D47R), la energía libre aumenta con la fuerza iónica. En los mutantes cuya k_2 no se afecta por la fuerza iónica (D47R y D44A/D47A), ΔG^\ddagger permanece prácticamente invariable frente a este factor. Los ajustes de Watkins de la dependencia de fuerza iónica a

distintas temperaturas, la representación de la compensación entropía-entalpía, la dependencia de ΔG^\ddagger respecto a la fuerza iónica con NaCl para todos los mutantes y la comparación de todos estos valores con los datos de la Pc silvestre se muestran en el Apéndice.

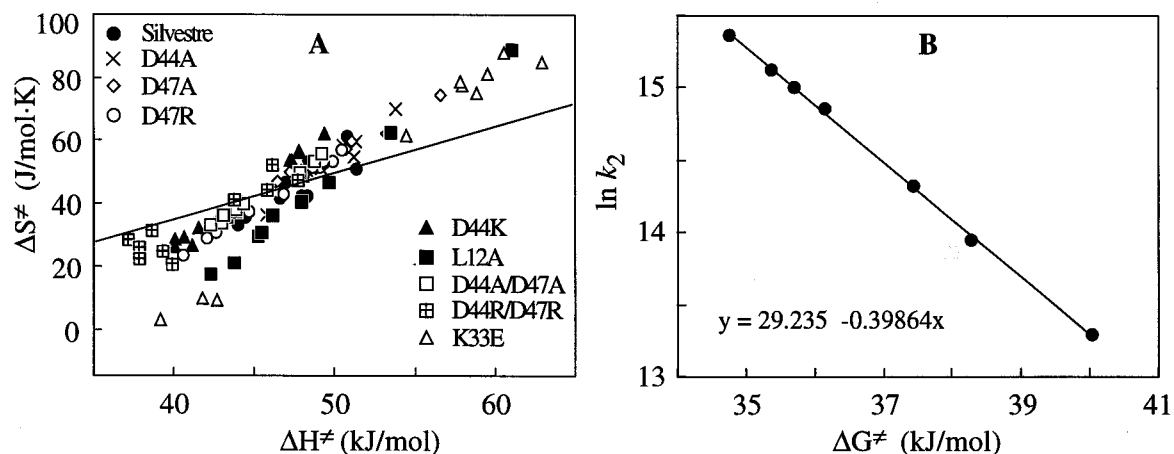


Figura 26: (A) Correlación entre la entalpía (ΔH^\ddagger) y la entropía (ΔS^\ddagger) aparentes de activación para la reducción de PSI por los distintos mutantes de Pc, y (B) dependencia de la k_2 respecto a la energía libre aparente de activación (ΔG^\ddagger) para la reducción de PSI por la Pc D44K.

Los datos del panel A corresponden a experimentos tanto de NaCl como de $MgCl_2$. La recta dibujada corresponde a la pendiente teórica de la compensación entropía-entalpía. El panel B muestra la ecuación de la recta.

En la Figura 26A se muestra la correlación lineal entre ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger que presentan todos los mutantes de Pc, así como la recta teórica que debería presentar esta compensación entropía-entalpía para el caso en que sólo se debiera a efectos de relajación del solvente (la pendiente de la recta sería $1/T$). La desviación de la recta ideal que se observa en todos los mutantes de Pc puede explicarse porque en los parámetros termodinámicos que estamos estudiando influyen otros factores además de la temperatura, como son las interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas.

En la Figura 26B se representa la dependencia de k_2 respecto a ΔG^\ddagger para el mutante D44K, como ejemplo que muestra la relación exponencial que existe entre k_2 y ΔG^\ddagger , según se deduce de la ecuación de Eyring (apartado 2.5.4).

Resultados similares se obtienen con el resto de los mutantes de Pc, tanto para los datos de NaCl como para los de $MgCl_2$. En todos los casos, el valor del punto de corte para $\Delta G^\ddagger = 0$ y de la pendiente de la recta están muy cerca de los valores teóricos (29,45 y -0,404 $\text{kJ}^{-1}\cdot\text{mol}$, respectivamente, obtenidos a partir de la ecuación de Eyring), lo que supone un

control de la buena calidad de los parámetros termodinámicos calculados a partir de los ajustes de Eyring.

A efectos comparativos se pueden obtener los parámetros termodinámicos en condiciones estándar de fuerza iónica. Estos experimentos se realizaron a pH 7,5 y pH 5,5 y a las cinco temperaturas anteriormente mencionadas. De nuevo se usaron las representaciones de Eyring para calcular los parámetros termodinámicos que se encuentran en la Tabla 6.

Tabla 6: Parámetros aparentes de activación y valores de energía de interacción electrostática (ΔV_{el}) calculados a partir de las representaciones de Eyring en condiciones estándar para la reducción del PSI por Pc silvestre y sus mutantes.

| Plastocianina | pH 7,5 | | | pH 5,5 | | | ΔV_{el} (kJ/mol) |
|---------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| | ΔH^\ddagger (kJ/mol) | ΔS^\ddagger (J/mol·K) | ΔG^\ddagger (kJ/mol) | ΔH^\ddagger (kJ/mol) | ΔS^\ddagger (J/mol·K) | ΔG^\ddagger (kJ/mol) | |
| Silvestre | 48,2 | 49,9 | 33,4 | 48,2 | 51,1 | 32,9 | 0 |
| D44A | 44,0 | 36,6 | 33,1 | 43,7 | 35,5 | 33,2 | 2,8 |
| D44K | 44,5 | 42,6 | 31,8 | 41,4 | 32,5 | 31,7 | 13,5 |
| D47A | 47,6 | 50,5 | 32,6 | 49,5 | 60,8 | 31,4 | 1,7 |
| D47R | 44,2 | 36,6 | 33,3 | 46,4 | 44,4 | 33,1 | 8,7 |
| D44A/D47A | 45,3 | 44,5 | 32,1 | 48,1 | 54,6 | 31,8 | 10,1 |
| D44R/D47R | 35,4 | 17,2 | 30,2 | 43,1 | 45,0 | 29,7 | 23,7 |
| K33E | 47,8 | 40,4 | 35,8 | 55,6 | 66,9 | 35,6 | n.d. |
| L12A | 43,4 | 24,6 | 36,0 | 46,7 | 34,4 | 36,4 | n.d. |

Los valores de ΔG^\ddagger se calcularon a 298 K y los valores de ΔV_{el} se calcularon a partir del ajuste a la ecuación de Watkins representado en la Figura 28.

El efecto de la sustitución de aminoácidos cargados sobre la reacción de la Pc con el PSI puede estudiarse calculando las energías de interacción ($\Delta\Delta G^\ddagger$) descritas por Kannt *et al.* (1996):

$$\Delta\Delta G^\ddagger = -RT \ln (k_{2 \text{ silvestre}}/k_{2 \text{ mutante}})$$

De manera que un ajuste lineal de $\Delta\Delta G^\ddagger$ respecto a la diferencia de carga entre las proteínas mutadas y la silvestre (Δq) se corresponde con un efecto meramente electrostático sobre la k_2 .

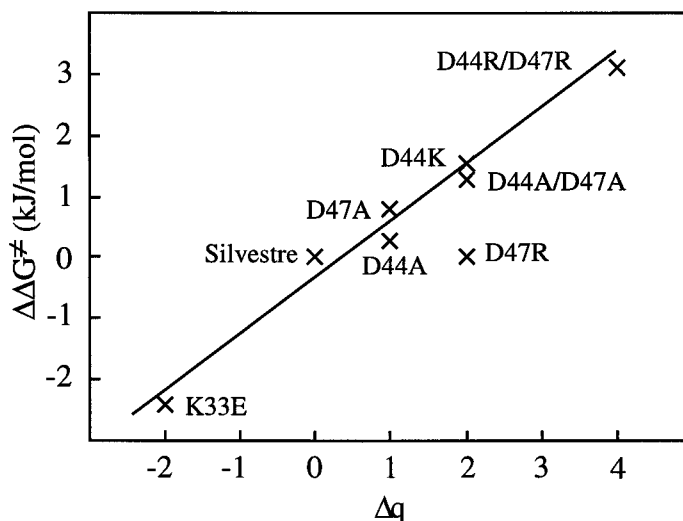


Figura 27: Energías de interacción ($\Delta\Delta G^\ddagger$) entre la Pc y el PSI frente a la diferencia de carga (Δq) entre las proteínas mutadas y la silvestre.

Se muestran los datos a pH 7,5. Los datos a pH 5,5 son prácticamente los idénticos.

En la Figura 27 se aprecia que casi todos los mutantes se ajustan a una recta con la excepción del mutante D47R. Sin embargo, este análisis no es muy satisfactorio en detalle, ya que se aprecian diferencias en $\Delta\Delta G^\ddagger$ para mutantes con el mismo Δq , de forma que se realizó un estudio más riguroso aplicando la ecuación de Watkins a los mutantes de la cara este de la Pc. En estos mutantes se ha observado que no hay variaciones de la k_{inf} (Tabla 4) con respecto al silvestre, esto es, que básicamente el efecto de las mutaciones sobre la reacción se limita a la interacción electrostática. En este caso, se puede escribir así la ecuación simplificada de Watkins:

$$\Delta\Delta G^\ddagger = \Delta V_{el} \cdot X_k$$

donde ΔV_{el} es la energía de interacción electrostática (trabajo electrostático necesario para poner juntos los reactivos, que informa sobre la intensidad de la interacción electrostática) y X_k es el término de Debye-Hückel que modifica $\Delta\Delta G^\ddagger$ en función del apantallamiento de las cargas por la fuerza iónica del medio. Usando esta ecuación se ajustaron los datos de $\Delta\Delta G^\ddagger$ al aumento de fuerza iónica (Figura 28) y se obtuvieron los valores de ΔV_{el} que aparecen en la Tabla 6, donde se puede observar que los mayores valores de ΔV_{el} se obtienen para los mutantes D44K, D47R, D44A/D47A y, sobre todo, D44R/D47R.

En la Figura 28 se aprecia que, a baja fuerza iónica, el mutante de Pc D44R/D47R, con $\Delta q = 4$, muestra un $\Delta\Delta G^\ddagger$ doble de los que presentan un $\Delta q = 2$, lo cual se mantiene para los valores de energía de interacción electrostática (ΔV_{el}) obtenidos de estos ajustes (Tabla 6).

Sin embargo, existen diferencias de ΔV_{el} tanto entre los mutantes de $\Delta q = 2$ como entre los de $\Delta q = 1$, por lo que parece que el efecto de las mutaciones no se puede adjudicar sólo al cambio de carga, sino también al lugar específico de la superficie de la proteína donde ocurre dicho cambio. Además, aunque en la mayoría de los casos y tal como se esperaba por los valores de k_{inf} , $\Delta\Delta G^\ddagger$ tiende a cero a fuerza iónica infinita, esto es, se aproxima al silvestre, no es así en el caso del mutante D47A, lo que indica que esta mutación produce algún efecto sobre la interacción Pc/PSI además del electrostático.

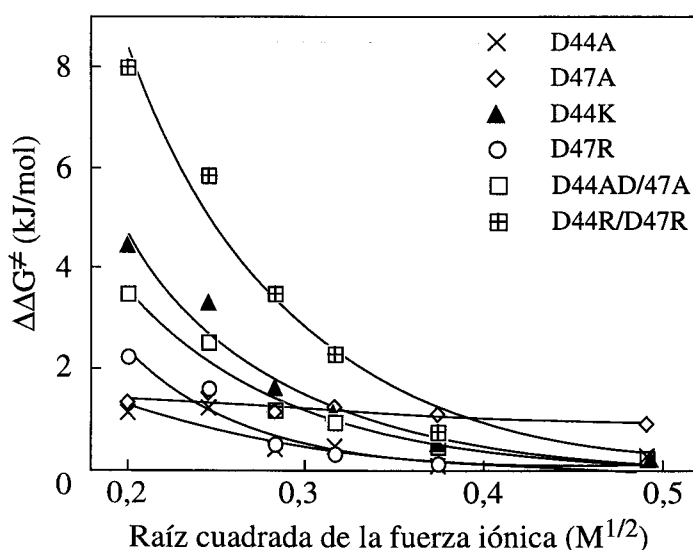


Figura 28: Efecto de la fuerza iónica sobre los cambios en la energía aparente de activación ($\Delta\Delta G^\ddagger$) para la interacción con el PSI de los mutantes de las posiciones 44 y 47 de la Pc.

Los valores de $\Delta\Delta G^\ddagger$ se obtuvieron restando los ΔG^\ddagger de los mutantes de Pc de los ΔG^\ddagger de la proteína silvestre. El aumento de la fuerza iónica se realizó añadiendo NaCl. El resto de las condiciones experimentales fueron las estándar.

En el caso del mutante de Pc L12A, no se puede usar la misma aproximación ya que no es un mutante electrostático, y en el caso concreto de K33E se observa que la dependencia con la fuerza iónica de $\Delta\Delta G^\ddagger$ no se ajusta a la ecuación de Watkins, ya que es casi lineal (Figura 29). Además, el valor absoluto de $\Delta\Delta G^\ddagger$ a baja fuerza iónica para un $\Delta q = -2$ es desproporcionado en relación a los mutantes que presentan el mismo cambio de carga en la cara este de la proteína (Figura 28). Por último, en K33E, el cambio de ΔG^\ddagger lo domina el término de entropía, al contrario que en los mutantes de la cara este (ver Apéndice). Todo esto parece indicar que las cinéticas más lentas de reducción de PSI de este mutante de Pc se deben a cambios en las interacciones hidrófobas.

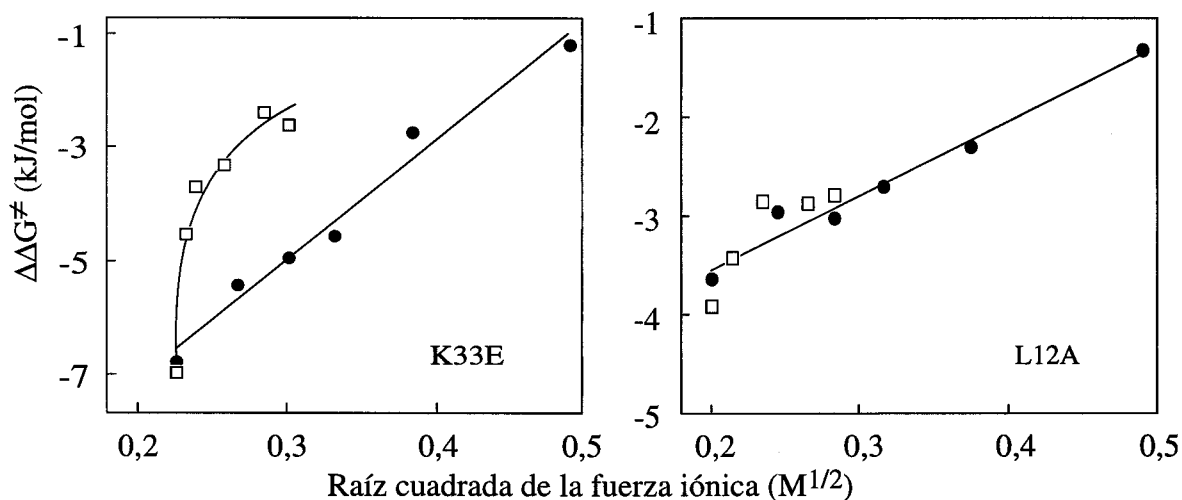


Figura 29: Efecto de la fuerza iónica sobre los cambios en la energía aparente de activación ($\Delta\Delta G^\ddagger$) para la interacción con el PSI de los mutantes de las posiciones 12 y 33 de la Pc.

Los valores de $\Delta\Delta G^\ddagger$ se obtuvieron restando los ΔG^\ddagger de los mutantes de Pc de los ΔG^\ddagger de la proteína silvestre. El aumento de la fuerza iónica se realizó añadiendo $NaCl$ (●) o $MgCl_2$ (□). El resto de las condiciones experimentales fueron las estándar.

Se estudió asimismo el efecto específico del Mg^{2+} en la interacción de K33E con el PSI. En trabajos previos se ha observado que, en algunos sistemas, los cationes de Mg^{2+} alteran de forma específica la constante de la reacción de transferencia de electrones al PSI debido a la formación de puentes electrostáticos entre las cargas negativas de las proteínas que reaccionan (Takabe *et al.*, 1983; Hervás *et al.*, 1992, 1994). En la Figura 29 se observa un efecto específico del Mg^{2+} con respecto al Na^+ para este mutante que no se aprecia ni en el mutante L12A (que se presenta a efectos comparativos como cambio en la misma zona de la proteína) ni en los mutantes de la cara este, de forma que $\Delta\Delta G^\ddagger$ varía mucho más rápidamente a concentraciones de Mg^{2+} equivalentes a menor fuerza iónica respecto a los experimentos en los que se utilizó Na^+ .

En la Figura 30 se aprecia que el efecto máximo de compensación entropía-entalpía en el mutante K33E se consigue al añadir $MgCl_2$ equivalente a una fuerza iónica mucho menor en comparación con los datos de $NaCl$. Resultados menos acusados se obtienen con algunos mutantes de la cara este de la Pc (D44R/D47R, D44A y D44K), aunque no con todos, indicando que el efecto específico del Mg^{2+} depende del lugar de la proteína al que se una el catión.

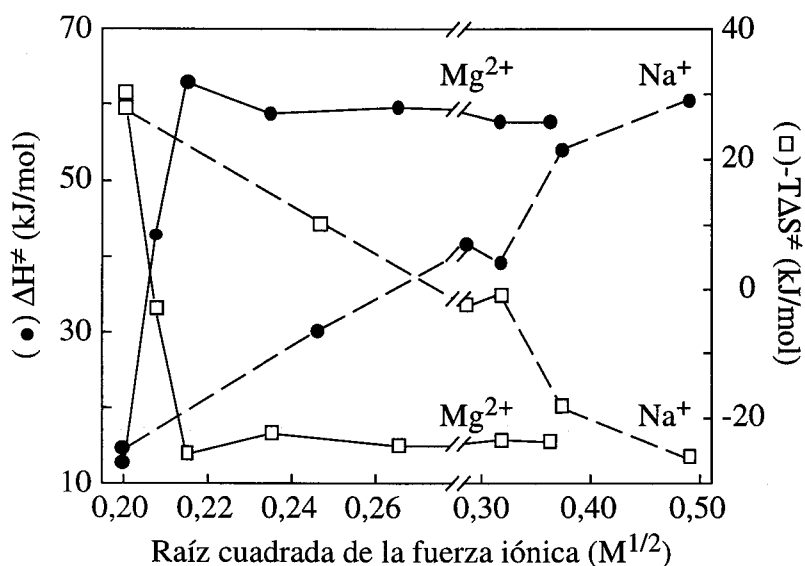


Figura 30: Efecto de la fuerza iónica sobre la entalpía aparente de activación, ΔH^\ddagger (●), y sobre la entropía aparente de activación, ΔS^\ddagger (□), para la reducción del PSI por la Pc K33E.

La fuerza iónica se aumentó añadiendo NaCl (líneas discontinuas) o MgCl₂ (líneas continuas) y el resto de las condiciones fueron las estándar. Los parámetros termodinámicos se calcularon a partir de los datos experimentales a 298 K.

3.2.4.3 PSI defectivo en PsaF

La reactividad de la Pc silvestre y de algunos mutantes de Pc se estudió de manera comparada con un PSI mutado preparado en el laboratorio del Dr. P. Chitnis (Universidad de Iowa, Ames, USA). El PSI mutado, que llamaremos AFK6, carece de las subunidades PsaF y PsaJ (Xu *et al.*, 1994) y lo usamos para analizar el posible papel de la subunidad PsaF en la interacción de Pc con PSI. Esta subunidad ha mostrado ser fundamental para la interacción del PSI con los donadores en sistemas eucariotas, pero no así en procariotas (ver Introducción).

En la Tabla 7 se puede observar que la reactividad del PSI AFK6 con la Pc silvestre es un 85 % de la del PSI silvestre, lo que indica que estas dos subunidades no son esenciales en la reacción con la Pc. Esta diferencia se mantiene en los valores de k_{inf} , por lo que puede asignarse a algún efecto estructural y no electrostático.

En general los controles con distintos mutantes de la Pc dan básicamente igual resultado al de la Pc silvestre, tanto en condiciones estándar como extrapolando a k_{inf} . Analizando los casos particulares de cada mutante, se puede destacar que la Pc D44K presenta valores de k_2 y k_{inf} mayores que la Pc silvestre. El mutante de Pc K33E reacciona, en cambio,

peor con el PSI mutado, y esta diferencia también se mantiene a fuerza iónica infinita. Asimismo hay que destacar que el mutante D44A/D47A presenta con el PSI silvestre una ligera dependencia de la fuerza iónica que desaparece en su interacción con el PSI AFK6. Todos estos datos sugieren que si bien la subunidad PsaF no juega ningún papel esencial en la interacción del PSI con la Pc en *Synechocystis*, como ya habían indicado estudios previos (Chitnis *et al.*, 1991), su ausencia perturba ligeramente el sitio de unión de la Pc con el PSI.

Tabla 7: Comparación de las constantes bimoleculares de la reacción de reducción del PSI silvestre y AFK6 por las distintas Pc silvestre y mutantes, en condiciones estándar (k_2) y extrapoladas a fuerza iónica infinita (k_{inf}).

| Plastocianina | $k_2 \times 10^{-6} (M^{-1} s^{-1})$ | | $k_{inf} \times 10^{-6} (M^{-1} s^{-1})$ | |
|---------------|--------------------------------------|----------|--|--------------------|
| | PSI silvestre | PSI AFK6 | PSI silvestre | PSI AFK6 |
| Silvestre | 8,6 | 7,3 | 10,6 | 8,3 |
| D44K | 15,7 | 20,0 | 8,3 | 11,7 |
| D47R | 8,5 | 9,0 | 8,7 | 8,0 |
| D44A/D47A | 14,4 | 14,7 | 7,6 | 13,5 ^{a)} |
| K33E | 3,2 | 2,0 | 10,8 | 6,1 |
| L12A | 2,8 | 2,7 | 4,9 | 4,3 |

^{a)} La constante de la reacción no se afecta al aumentar la fuerza iónica

El caso más interesante es el estudio comparado de la reacción con la Pc D44R/D47R, ya que a baja fuerza iónica se observa la formación de un complejo electrostático con el PSI silvestre (Figura 24). En el caso de que la subunidad PsaF estuviera implicada en dicho complejo, como lo está en eucariotas, el PSI AFK6 mostraría una reactividad alterada con este mutante.

En la Figura 31 se observa que la interacción del doble mutante con el PSI AFK6 sigue siendo del mismo tipo que con el PSI silvestre, con formación de complejo. A partir de esta figura se pueden calcular los valores de la constantes de asociación (K_A) y de transferencia electrónica (k_{et}) para la interacción de este mutante con AFK6. En la Tabla 8 se puede apreciar que la constante de asociación se dobla y la transferencia de electrones se hace el 60 % de la obtenida para el PSI silvestre en estas condiciones.

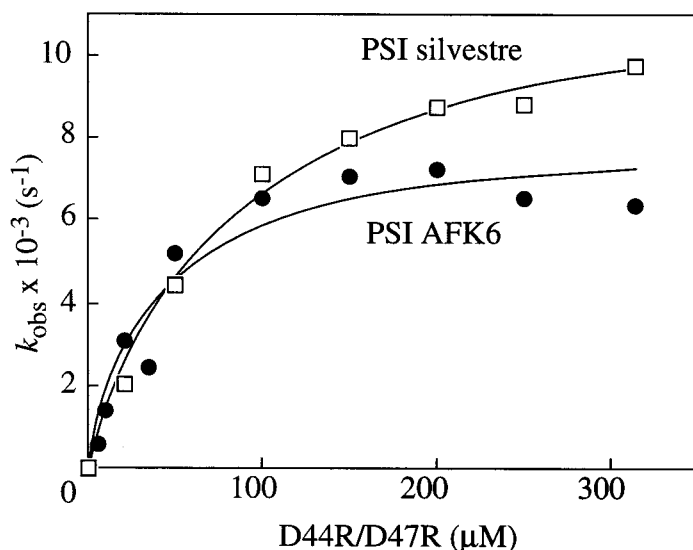


Figura 31: Dependencia de la constante observada de reacción (k_{obs}) respecto a la concentración del mutante de Pc D44R/D47R para la reducción del PSI silvestre y AFK6.

El experimento se realizó con la mezcla de reacción estándar en ausencia de MgCl_2 .

Tabla 8: Constantes de asociación y de transferencia de electrones para la reacción del mutante de Pc D44R/D47R con el PSI silvestre y con AFK6.

| Fotosistema | $K_A \times 10^{-4}$ (M^{-1}) | $k_{et} \times 10^{-4}$ (s^{-1}) |
|-------------|---|--|
| Silvestre | 1,2 | 1,2 |
| AFK6 | 2,5 | 0,8 |

3.3 ANÁLISIS DE LOS MUTANTES DEL CITOCROMO c_6

3.3.1 Producción de los mutantes de citocromo

Al igual que en el caso de la Pc, una vez obtenido un clon de *E. coli* con un plásmido apropiado, se procedía al cultivo de éste en 10 L de medio para producir proteína en cantidad suficiente para su caracterización. Sin embargo, la producción de los mutantes del Cit fue considerablemente menor que las de las Pc modificadas, siendo los rendimientos obtenidos en las mismas condiciones usadas con la Pc 10 veces más bajos.

Se modificaron diversas variables que pudieran mejorar el rendimiento del cultivo, tales como inducción con IPTG, uso de distintos medios de crecimiento, de distintos tiempos y temperaturas de incubación del cultivo, aporte de intermediarios de la ruta de síntesis del hemo, crecimiento en distintos grados de aerobiosis, etc. Sólo se mejoró el rendimiento de producción de Cit probando distintas estirpes de *E. coli*. A continuación se muestran los

rendimientos comparados de las distintas estirpes que se ensayaron, así como la producción de proteína en la estirpe seleccionada como la más productiva (MC1061) para el cultivo de los distintos mutantes.

Tabla 9: Comparación de la producción de Cit por las diferentes estirpes de *E. coli* ensayadas.

| Estirpe de <i>E. coli</i> | Producción (%) |
|---------------------------|----------------|
| MC1061 | 100 |
| BL 21 | 8 |
| JM 109 | 35 |
| DH5 α | 16 |
| XL1-Blue | 3 |
| HB101 | 7 |

Se midió la producción de Cit silvestre y F64A y en la tabla se presenta el valor medio. El cultivo se realizó en las condiciones descritas en el apartado 2.1.1, en un volumen de 200 mL. La obtención de la fracción periplásmica se llevó a cabo según el método descrito en el apartado 2.3.3.1.

Tabla 10: Rendimiento obtenido en la producción en *E. coli* del Cit silvestre y de los diferentes mutantes. Las cantidades se refieren a los extractos de periplasma de *E. coli*.

| Citocromo | Producción (mg/l) |
|-----------|-------------------|
| Silvestre | 0,5 |
| F64A | 0,5 |
| R67D | 0,8 |
| D70R | 1,8 |
| D72R | 0,6 |

El cultivo se realizó en las condiciones descritas en el apartado 2.1.2. La fracción periplásmica se extrajo según el método descrito en el apartado 2.3.3.1.

3.3.2 Caracterización de los citocromos mutados

3.3.2.1 Espectro UV/Vis

Los Cit mutados presentan un espectro UV/Vis básicamente igual al del Cit silvestre. Como ejemplo, en la Figura 32 se presenta el espectro del mutante F64A.

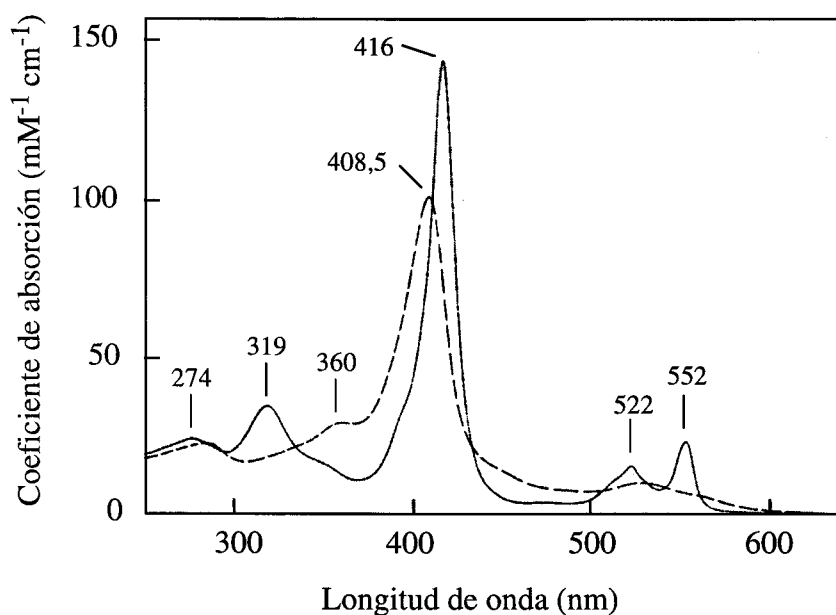


Figura 32: Espectro de absorción UV/Vis del Cit F64A.

La línea continua corresponde al Cit reducido con ascorbato y la discontinua a la proteína oxidada con ferricianuro. Los espectros se hicieron en un barrido de 250 a 600 nm.

3.3.2.2 Potencial redox y espectros de EPR

Se determinó el potencial redox de cada citocromo modificado. Los valores de potencial determinados para cada mutante se relacionan en la Tabla 11. Se aprecia que las modificaciones de la región este del Cit (D70R, D72R) no afectan al potencial redox, pero en el caso de la región hidrófoba (F64A, R67D), las dos mutaciones efectuadas dan lugar a proteínas con un potencial 30 mV más reductor. Debido a las desviaciones observadas del potencial redox silvestre, se realizaron espectros de EPR del Cit silvestre y de cada mutante en las mismas condiciones para comprobar posibles alteraciones en el entorno del hemo. Los espectros se realizaron y analizaron en el laboratorio del Prof. Miguel Teixeira (Instituto de Química Fina y Biotecnología, Oeiras, Portugal). Al analizar la región de los espectros correspondiente al hemo, no se apreció ninguna diferencia significativa entre los mutantes y el Cit silvestre.

Tabla 11: Potenciales redox del Cit silvestre y de los mutantes a pH 7,0.

| Citocromo | $E_{m,7}$ (mV) |
|-----------|----------------|
| Silvestre | 324 |
| F64A | 287 |
| R67D | 295 |
| D70R | 327 |
| D72R | 324 |

3.3.3 Reducción de PSI por los citocromos modificados

3.3.3.1 Análisis cinético

Al igual que en el caso de la Pc, se realizó un análisis detallado de la reacción de cada Cit mutado con el PSI y de la dependencia de esta reacción de la concentración de proteína, pH y fuerza iónica (con NaCl o MgCl₂). Se estudió asimismo el efecto de la temperatura y se realizó el estudio termodinámico correspondiente.

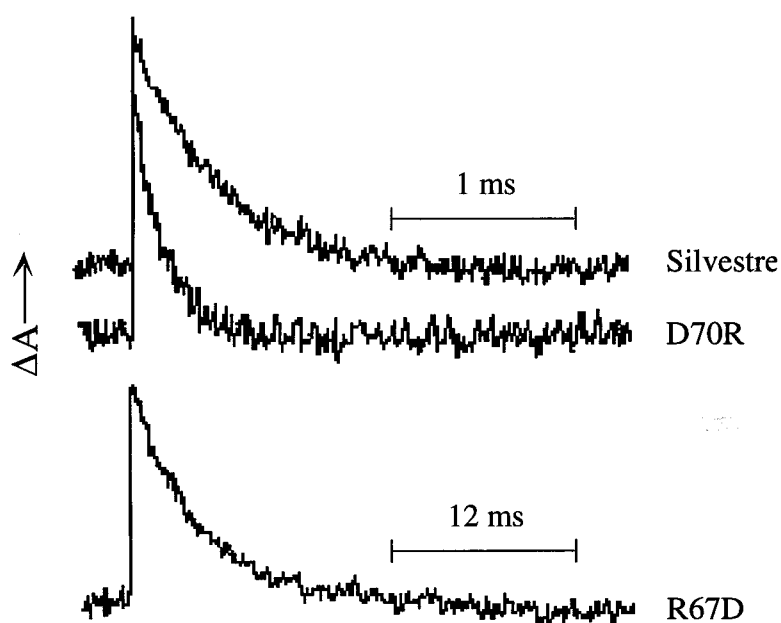


Figura 33: Trazos cinéticos que muestran la reducción del PSI de *Synechocystis* por el Cit silvestre y por los mutantes D70R y R67D.

La mezcla de reacción fue la estándar a pH 7,5, la concentración de proteína fue 200 μ M y la temperatura 25 °C.

En primer lugar se comprobó que los trazos de todos los Cit mutados muestran una cinética monofásica que se ajusta a una curva monoexponencial. En la Figura 33 se muestran los trazos cinéticos del mutante con mayor velocidad de reacción con el PSI y del más lento, en comparación con el trazo del Cit silvestre.

Los trazos cinéticos se analizaron como se describe en el apartado 2.5.3 a fin de obtener de cada cinética un valor de constante observada (k_{obs}), que se representa en la Figura 34 en relación a la concentración de Cit.

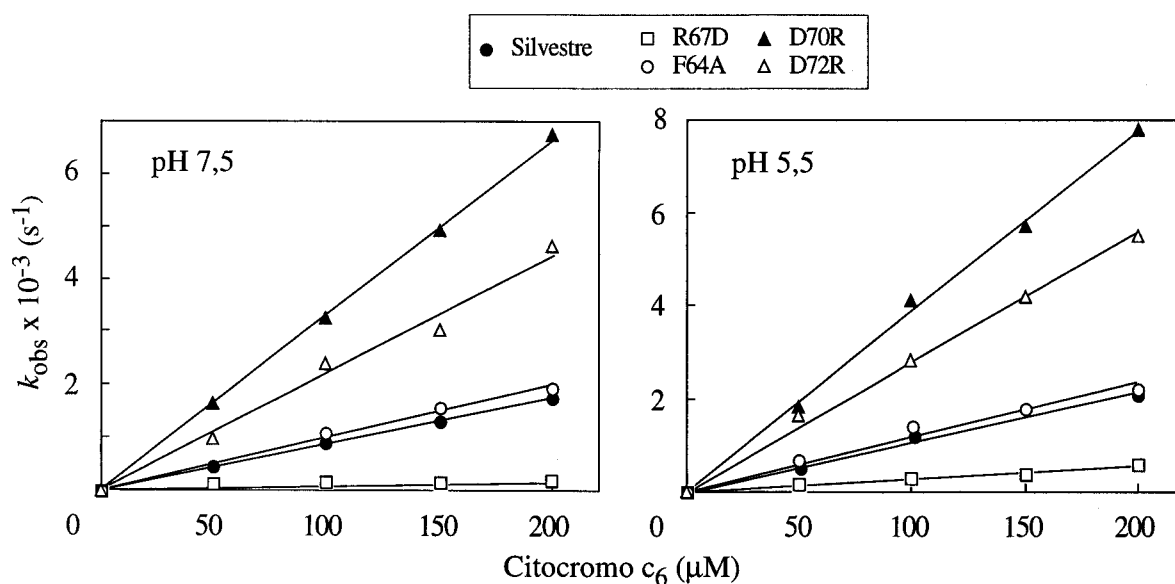


Figura 34: Dependencia de la constante observada (k_{obs}) respecto a la concentración de Cit para la reducción del PSI de *Synechocystis* por el Cit silvestre y sus mutantes a pH 7,5 y 5,5.

Los datos se obtuvieron en las condiciones estándar para ensayos de concentración de proteína a 25 °C.

Todos los mutantes de Cit presentan una dependencia lineal de su constante observada (k_{obs}) respecto a la concentración de proteína; esto, unido a los trazos cinéticos monofásicos, nos permite deducir que su mecanismo de reacción con el PSI es, al igual que en el Cit silvestre, del tipo de colisión orientada, sin formación aparente de complejo intermediario previo a la transferencia de electrones (Hervás *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos son similares a pH 7,5 y 5,5.

En la Tabla 12 se aprecia que el comportamiento del mutante F64A es similar al silvestre respecto a la reducción del PSI. Por otra parte, es destacable el aumento de la velocidad de la reacción de los mutantes D70R y D72R, mayor en el caso de la posición 70. Igualmente relevante es la baja eficiencia del mutante R67D.

Tabla 12: Constantes bimoleculares de la reacción de reducción del PSI por los distintos Cit en condiciones estándar (k_2) y extrapoladas a fuerza iónica infinita (k_{inf}).

| Citocromo c_6 | $k_2 \times 10^{-6} (M^{-1} s^{-1})$ | | $k_{inf} \times 10^{-6} (M^{-1} s^{-1})$ | |
|-----------------|--------------------------------------|--------|--|-------------------|
| | pH 7,5 | pH 5,5 | NaCl | MgCl ₂ |
| Silvestre | 8,9 | 14,4 | 13 | 11 |
| F64A | 10,2 | 12,4 | 9 | 9 |
| R67D | 1,1 | 2,7 | 4 | 4 |
| D70R | 33,1 | 38,8 | n.d. | n.d. |
| D72R | 22,1 | 27,9 | 20 | 22 |

Los valores de k_{inf} se calcularon a pH 7,5, excepto para el mutante D70R, que no se pudo determinar.

En la Figura 35 se presenta la dependencia de la reacción con los distintos mutantes respecto a la fuerza iónica, aumentando este parámetro con cantidades crecientes de NaCl. Los resultados obtenidos con MgCl₂ son casi idénticos, apreciándose, por tanto, un efecto similar de los cationes monovalentes y divalentes, a excepción del efecto específico del Mg²⁺ ya comentado.

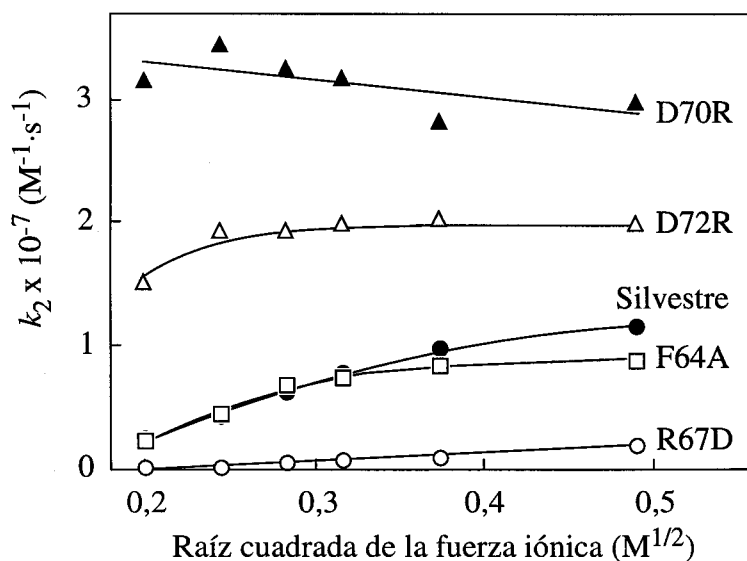


Figura 35: Efecto de la fuerza iónica sobre la constante bimolecular (k_2) para la reducción del PSI de *Synechocystis* por el Cit silvestre y sus mutantes.

Los datos que se presentan se obtuvieron incrementando la fuerza iónica con NaCl; los experimentos de MgCl₂ dieron resultados prácticamente idénticos.

El Cit silvestre se comporta como la Pc respecto a la fuerza iónica, de modo que la reacción se acelera al aumentar la concentración de sal por apantallamiento de interacciones electrostáticas repulsivas entre el Cit y el PSI. Esta tendencia se satura al aproximarnos a fuerza iónica infinita, donde la reacción se hace independiente de las interacciones electrostáticas. El mutante F64A, que no presenta cambio de cargas respecto al silvestre, se comporta de forma muy similar a éste. El Cit R67D, que muestra un perfil de dependencia de la fuerza iónica paralelo al del Cit silvestre, presenta una reactividad con el PSI mucho menos eficiente en todo el intervalo de fuerza iónica ensayado.

Aplicando la ecuación de Watkins a los datos de la Figura 35, se calcularon las constantes de la reacción extrapoladas a fuerza iónica infinita (k_{inf}) que se muestran en la Tabla 12. Tan solo la k_{inf} de F64A se aproxima a la k_{inf} del Cit silvestre, indicando que el resto de las mutaciones han provocado efectos no sólo electrostáticos. En el caso de R67D, la k_{inf} es un 30% de la del Cit silvestre, aunque la cinética tan lenta que presenta impide un cálculo exacto de su k_{inf} . El efecto de la fuerza iónica sobre la k_2 del Cit D70R es muy débil, lo que dificulta una estimación exacta de la k_{inf} . Su interacción con el PSI está optimizada a baja fuerza iónica, con lo que el efecto de las sales es inverso al silvestre. Estos datos corroboran los resultados de la dependencia de concentración de proteína (Figura 34), en el sentido de que la posición 70 es más importante en la interacción con el PSI que la posición 72.

3.3.3.2 Parámetros termodinámicos

Para conocer en mayor detalle el efecto de las mutaciones sobre la interacción Cit/PSI, se realizó un análisis termodinámico comparado de los Cit mutados y del silvestre. Como se describió para los mutantes de Pc, la dependencia de la temperatura de las constantes de reacción genera líneas de Eyring sin discontinuidades, de las que se obtienen la entropía (ΔH^\ddagger), entalpía (ΔS^\ddagger) y energía libre de activación (ΔG^\ddagger) de la reacción.

El origen de los datos termodinámicos para la dependencia de fuerza iónica se muestra en la Figura 36 con el mutante F64A (el resto de los mutantes se encuentran en el Apéndice). Para todos los mutantes se puede observar el mismo efecto de compensación entropía-entalpía que presenta el Cit silvestre. Los valores obtenidos a partir de la reacción en condiciones estándar se muestran en la Tabla 13.

Los parámetros de activación para los mutantes son muy similares a los del Cit silvestre, siendo el Cit R67D el más diferente en este sentido, ya que su energía libre de activación a pH 7,5 es 5 kJ/mol más alta que la del Cit silvestre, lo cual se relaciona con su ineficiencia en la reacción con el PSI. El aumento de energía libre en este mutante se debe,

sobre todo, a un incremento de entalpía del sistema, que aumenta en 5 kJ/mol. También es destacable el aumento del término de entropía ($-T\Delta S^\ddagger$) en 14 J/mol en el mutante D70R.

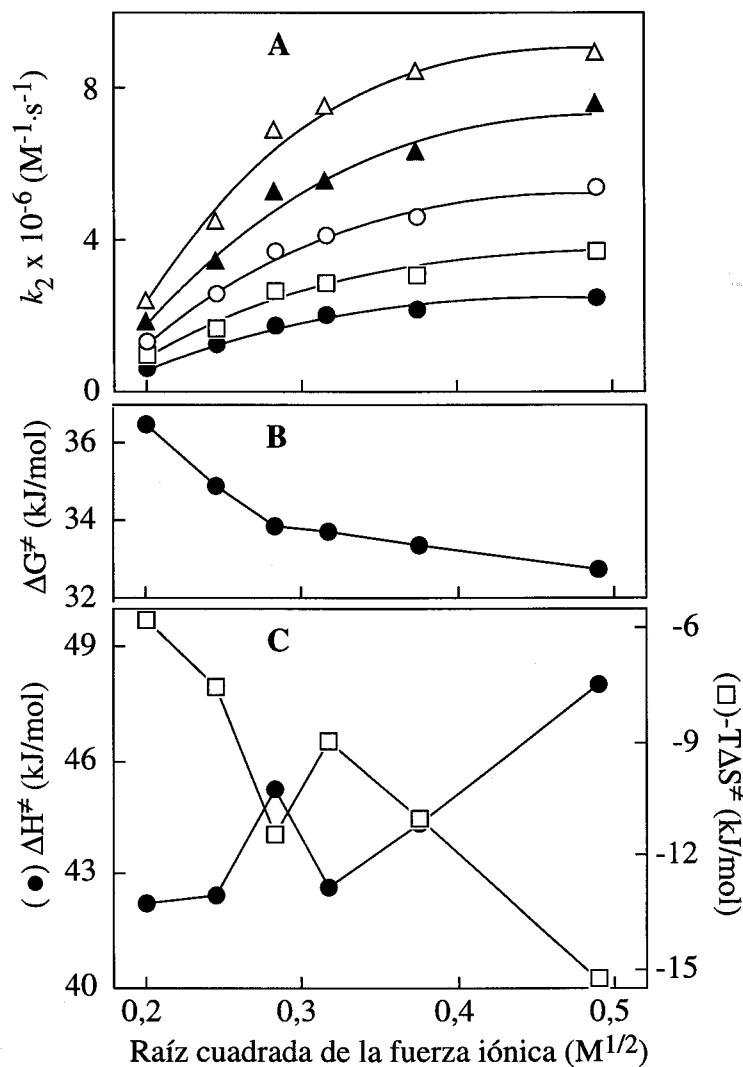


Figura 36: (A) Dependencia de la constante bimolecular (k_2) respecto a la fuerza iónica para la reducción del PSI por el Cit F64A a diferentes temperaturas, (B) efecto de la fuerza iónica sobre la energía libre (ΔG^\ddagger), y (C) efecto de la fuerza iónica sobre la entropía (ΔS^\ddagger) y entalpía (ΔH^\ddagger) aparentes de activación de la reacción.

En el panel A se muestra la dependencia de la fuerza iónica de la k_2 a los siguientes valores de temperatura: 278 (●), 283 (□), 288 (○), 293 (▲) y 298 K (Δ). Los valores de los parámetros termodinámicos de los paneles B y C se calcularon a partir de representaciones de Eyring para los valores de k_2 a cada valor de fuerza iónica, como se ha descrito previamente.

Como ya se explicó en el caso de la Pc, la forma más apropiada de analizar el efecto de las mutaciones que incluyen cambios de carga es calculando las energías de interacción ($\Delta\Delta G^\ddagger$). En la Figura 37 se muestra la dependencia de esta energía respecto a la fuerza iónica

infinita para cada mutante. En los mutantes en que $\Delta\Delta G^\ddagger$ no tiende a cero a fuerza iónica tenemos una nueva indicación de que su k_{inf} no es equiparable a la silvestre y que se ha afectado alguna interacción no electrostática (Tabla 12).

Tabla 13: Parámetros aparentes de activación calculados a partir de las representaciones de Eyring para la reducción del PSI por el Cit silvestre y sus mutantes en condiciones estándar, y valores de ΔV_{el} correspondientes a la misma reacción.

| Citocromo | pH 7,5 | | | pH 5,5 | | | ΔV_{el} (kJ/mol) |
|-----------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| | ΔH^\ddagger (kJ/mol) | ΔS^\ddagger (J/mol·K) | ΔG^\ddagger (kJ/mol) | ΔH^\ddagger (kJ/mol) | ΔS^\ddagger (J/mol·K) | ΔG^\ddagger (kJ/mol) | |
| Silvestre | 41,8 | 28,2 | 33,3 | 41,0 | 29,8 | 32,1 | 0 |
| F64A | 42,0 | 30,8 | 32,8 | 38,6 | 20,7 | 32,4 | n.d. |
| R67D | 47,3 | 30,4 | 38,2 | 46,3 | 33,8 | 36,2 | n.d. |
| D70R | 42,5 | 42,1 | 30,0 | 35,4 | 19,4 | 29,6 | 8,5 |
| D72R | 39,0 | 26,6 | 31,1 | 37,4 | 23,3 | 30,5 | 6,6 |

Los valores de ΔV_{el} se calcularon a partir del ajuste según la ecuación de Watkins, representado en la Figura 38. Los datos de F64A y R67D no se pudieron ajustar a la ecuación de Watkins.

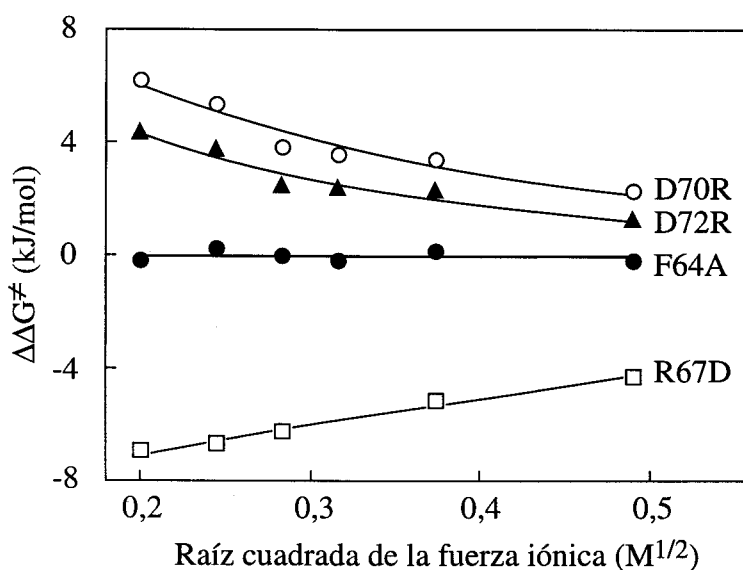


Figura 37: Efecto de la fuerza iónica sobre los cambios en la energía aparente de activación ($\Delta\Delta G^\ddagger$) para la interacción de los mutantes del Cit con el PSI.

Del ajuste de los datos de la Figura 37 a la ecuación de Watkins se obtienen los valores de energía de interacción electrostática (ΔV_{el}). Las diferencias en ΔG^\ddagger entre el Cit

silvestre y los mutantes son proporcionales a ΔV_{el} . Es de resaltar que los datos obtenidos para el mutante R67D no se pueden ajustar a la ecuación de Watkins, ya que ΔG^\ddagger depende linealmente de la concentración de sales en la mezcla de reacción, lo que impide dar un valor fiable de ΔV_{el} para este mutante. El Cit F64A tiene un ΔV_{el} cercano a cero, como se espera de su comportamiento silvestre; los datos no se ajustan a Watkins debido a que los valores de $\Delta\Delta G^\ddagger$ son muy bajos en todo el rango de fuerza iónica analizado. Para los mutantes de la cara este se obtienen valores de ΔV_{el} pequeños en comparación con los datos de mutantes similares de la Pc.

4. DISCUSIÓN

4.1 INTERÉS DE *Synechocystis* COMO ORGANISMO DE ESTUDIO

El trabajo presentado se centra en el estudio de la reacción de transferencia de electrones desde Pc y Cit al PSI en el organismo procariota *Synechocystis*, usando como herramientas fundamentales la mutagénesis dirigida de las metaloproteínas, el análisis cinético por láser y los estudios estructurales. Al comienzo de la tesis ya se habían realizado trabajos con el sistema Pc/PSI de eucariotas, con una Pc ácida, pero no en procariotas, que presentan donadores básicos o neutros, como es el caso de *Synechocystis*. Se disponía de los genes *petE* y *petJ* clonados en *E. coli* en nuestro laboratorio y se conocía que los productos de la expresión de dichos genes en la enterobacteria eran idénticos a las proteínas cianobacterianas. Además, el aparato fotosintético de este organismo está bien caracterizado, incluyendo el PSI, y la facilidad para aplicar técnicas de biología molecular hacen de *Synechocystis* un buen modelo en el estudio de la relación estructura-función en fotosíntesis.

Synechocystis es capaz de sintetizar Pc y Cit, de modo que se pueden realizar estudios paralelos sobre los factores estructurales que permiten realizar la misma función a dos proteínas con estructuras diferentes y profundizar sobre las relaciones estructura-función. Anteriormente no se habían realizado estudios de mutagénesis sobre el Cit dada la dificultad de expresar esta proteína en *E. coli*, siendo pues esta tesis la primera descripción de mutantes del Cit.

Un estudio detallado de la reacción de ambas proteínas nativas con su PSI (Hervás *et al.*, 1994) permitió describir sus principales características: I) La transferencia de electrones ocurre tras una colisión orientada sin formación de complejo intermediario cinéticamente detectable, lo que resulta en la ausencia de fase rápida y una dependencia lineal de la velocidad de reacción respecto a la concentración de proteína donadora. II) Es un proceso fundamentalmente electrostático. La interacción electrostática entre los donadores de electrones y el PSI es repulsiva, de modo que se observa un aumento en la velocidad de la reacción al aumentar la fuerza iónica. III) Existe un efecto específico del Mg^{2+} sobre la reacción, acelerándola por encima de lo esperable respecto a la fuerza iónica; y IV) En general, el Cit es más eficiente en su función que la Pc, especialmente en condiciones de fuerza iónica y pH fisiológicos, aunque estas diferencias no son muy acusadas.

La principal desventaja del estudio que se quería realizar era el desconocimiento de las estructuras de Pc y Cit de *Synechocystis* al inicio de la tesis, de forma que las mutaciones se diseñaron en base a la comparación de secuencia y estructura de otras proteínas similares. Se eligieron residuos de la zona este y de la zona hidrófoba de la Pc, basándonos en los resultados publicados sobre mutagénesis de Pc eucariotas (ver Introducción). En el Cit, del que se conocía bastante menos acerca de su estructura, se diseñaron mutantes de carga y de

algún residuo cercano al hemo que pudieran ser semejantes a otros de función bien conocida en la Pc. En todos los casos se diseñaron mutantes de superficie, en los que se pretendía no afectar el centro redox, para así poder estudiar y comparar la interacción de Pc y Cit con el PSI. Asimismo, hubiera sido muy interesante poder estudiar el efecto de todas estas mutaciones sobre la reacción de las metaloproteínas con el otro sustrato fisiológico (citocromo *f*), pero, tras varios intentos de purificación, no fue posible poner a punto ningún método razonablemente bueno para obtener cantidad suficiente de citocromo *f* o del complejo *b₆f* para los estudios que se querían realizar. Alternativamente, se trató de estudiar la reacción de la Pc de *Synechocystis* con citocromo *f* de rábano, que está disponible como producto comercial, pero no se obtuvo reacción, de modo que se abandonó esta línea de trabajo.

4.2 PLASTOCIANINA

4.2.1 Estructura del mutante triple de la plastocianina

En esta tesis se presenta la estructura de la Pc A42D/D47P/A63L, resuelta por cristalografía de rayos X, siendo las principales características de la molécula y de su centro redox las esperadas para una Pc típica. Aunque es un mutante, el hecho de que la estructura sea muy similar a otras Pc y los controles realizados sobre potencial redox, espectro UV/Vis y funcionalidad de la proteína, permiten predecir que la estructura debe ser prácticamente idéntica a la de la Pc silvestre de *Synechocystis*. La característica menos extrapolable a la estructura silvestre son las distancias de los ligandos al cobre, especialmente las de los azufres, distintas a las de otras Pc conocidas. Probablemente sea ésta la causa de la diferencia de potencial redox observada en este mutante con respecto al silvestre, ya que estudios de dinámica molecular de la proteína en los que se sustituye la Leu63 por alanina (que es el residuo que se encuentra en la Pc silvestre de *Synechocystis*) muestran un pequeño desplazamiento del átomo de cobre que lo acerca a las posiciones observadas en otras Pc.

Cuando se superponen las estructuras del mutante triple de *Synechocystis* y de Pc eucariotas, se puede observar que las líneas estructurales generales son muy similares en todas las proteínas, aunque la Pc de *Synechocystis* es más similar en conjunto a las Pc de algas verdes que a la de álamo, al presentar esta última un lazo en las posiciones 58-60 que no existe en el resto. La particularidad más destacable de la estructura de *Synechocystis* es el acortamiento del lazo que conecta la cadena β -4 con la pequeña α -hélice situada entre los residuos Ala48 y Leu55, de forma que la hélice va desde la Pro47 a la Lys54, con dos vueltas completas, y se produce un desplazamiento de la cadena polipeptídica con respecto a las otras

estructuras de Pc (Figura 38). Algo similar se ha descrito para la estructura en solución de la Pc de *Anabaena variabilis* (Badsberg *et al.*, 1996).

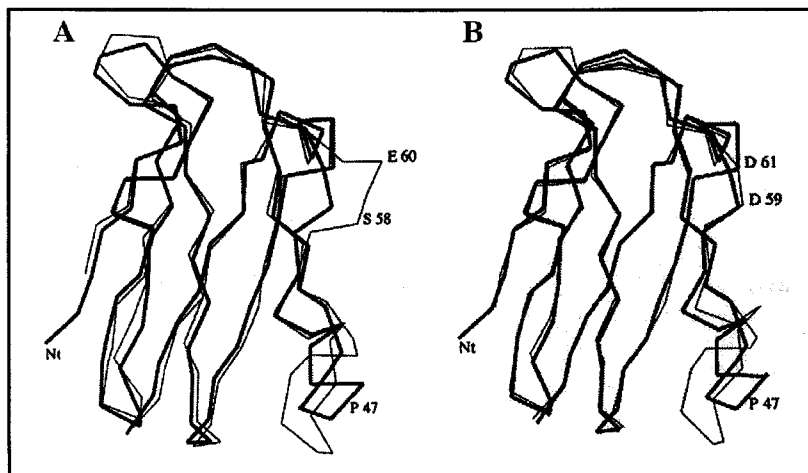


Figura 38: Superposición de las estructuras de las Pc de *Synechocystis*, álamo y *C. reinhardtii*, representadas como esqueletos de Ca .

La estructura de *Synechocystis* se muestra en líneas gruesas y las otras dos en líneas finas. En A se muestra la superposición con la estructura de álamo (Guss *et al.*, 1992) y en B con la de *C. reinhardtii* (Redinbo *et al.*, 1993).

Al comparar la estructura del triple mutante con las de otras Pc, quizás la diferencia más relevante sea la que ya se suponía por su secuencia y punto isoeléctrico, esto es, la ausencia de ciertos residuos negativos en el entorno de la Tyr83. Esta cuestión se aprecia claramente al conocer la estructura en detalle (Romero *et al.*, 1998), ya que en *Synechocystis* la vuelta β de 58-60 se ha perdido, y por tanto no están presentes los residuos Glu59, Glu60 y Asp61 de la región superior negativa en Pc eucariotas (que también presentan una región inferior negativa de los residuos 42 a 44). Los residuos Asp53 y Glu85 aparecen tanto en algas como en *Synechocystis*, pero en este último su carga negativa está parcialmente apantallada por la Lys60 y Arg88. Además, el anillo de la Tyr83 se encuentra situado entre las dos cadenas laterales de estos residuos positivos. Ésta es la zona de la Pc que se supone implicada en la formación del complejo electrostático previo a la transferencia de electrones, de forma que la ausencia de esta zona negativa podría explicar el porqué *Synechocystis* presenta un mecanismo colisional simple en lugar del más evolucionado de formación de complejo estable (Hervás *et al.*, 1994, 1995).

4.2.2 Estudios funcionales de la plastocianina

Mientras que en organismos eucariotas se han realizado numerosos estudios de mutagénesis dirigida de la Pc (Gross, 1996; Sigfridsson, 1998), es en este trabajo donde se aborda por primera vez la mutagénesis de la Pc en cianobacterias. De aquellos estudios se deducía la importancia de la zona ácida, inexistente en cianobacterias, y de la zona hidrófoba (ver Introducción). Así, el mayor interés de este trabajo es aclarar el papel de residuos específicos en la interacción Pc/PSI en procariotas, en este caso en *Synechocystis*. Como ya se ha comentado, se diseñaron los cambios en las zonas de la proteína que se conocía con anterioridad en eucariotas que estaban implicadas en la interacción con el PSI: la zona hidrófoba norte y la cara este.

Para descartar que el efecto de las mutaciones se debiera a cambios estructurales que afectasen a la reactividad del centro redox de las proteínas modificadas con respecto al silvestre, se realizó una serie de controles de sus espectros UV/Vis y de sus potenciales redox, de los que se concluye que la conformación del centro redox de todas las Pc mutadas no ha sufrido modificaciones significativas.

En ningún caso se aprecia un cambio en el mecanismo de reacción en las condiciones estándar de ensayo, no observándose la formación de complejo con el PSI. En general no se aprecian efectos del pH, tal como ocurre en el sistema silvestre. Lo que sí se aprecia son variaciones en la efectividad de los distintos mutantes como donadores de electrones al PSI. Del estudio de la reacción en condiciones estándar se obtienen algunas conclusiones en cuanto a la importancia de las mutaciones según el lugar donde se producen. La ausencia de carga en la posición 47 (D47A) da lugar a una constante de reacción con el PSI similar a la del mutante doble D44A/D47A, mientras que para obtener el mismo efecto modificando solamente la posición 44 se requiere duplicar el cambio de carga, ya que el mutante D44A es prácticamente silvestre. Estos efectos específicos se discutirán más adelante en relación a la variación de la velocidad de la reacción con la fuerza iónica. El resultado más interesante es el aumento de k_2 en el mutante D44R/D47R, no sorprendente para un cambio de cuatro cargas dado el carácter repulsivo de la interacción de la Pc silvestre con el PSI.

La forma más adecuada de comparar los diversos mutantes es el estudio de la influencia de la fuerza iónica sobre la reacción, dado que la interacción con el PSI es un proceso gobernado principalmente por las interacciones electrostáticas a distancia. De hecho, de aquí proceden los datos más interesantes, aunque en *Synechocystis* el efecto de la fuerza iónica es mucho menor que el observado en otros organismos en los que la Pc (y el Cit) presentan un punto isoeléctrico ácido o básico.

La región ácida de la cara este de la Pc eucariota es fundamental en la interacción con el PSI al dirigir la fuerza electrostática de atracción con la subunidad PsaF, que está cargada positivamente (Haehnel *et al.*, 1994; Sigfridsson *et al.*, 1996; Hippler *et al.*, 1996). Sin embargo, en *Synechocystis* existen fuerzas electrostáticas repulsivas entre la Pc y el PSI, tal como se deduce de un aumento de reactividad por apantallamiento de cargas al aumentar la fuerza iónica (Hervás *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos con la Pc mutada en los residuos 44 y 47 indican que este área de la Pc de *Synechocystis* es responsable en gran parte de la repulsión electrostática con el PSI. Teniendo presente esta repulsión, se pueden entender los cambios en la interacción con el PSI de los mutantes diseñados en la cara este. Todos, en mayor o menor grado, pierden cargas negativas, y los cambios en la dependencia de la fuerza iónica de su reacción con el PSI se relaciona con la disminución de la repulsión electrostática. Así, cuando desaparece una carga negativa de la cara este de la Pc (D44A y D47A) el comportamiento respecto a la fuerza iónica es básicamente silvestre. En el mutante doble D44A/D47A, la desaparición de dos cargas negativas de esta región disminuye la repulsión entre Pc y PSI hasta hacer la reacción prácticamente independiente de la fuerza iónica. Algo similar ocurre con el cambio de dos cargas en un solo residuo (D47R). Sin embargo, el mismo cambio de cargas localizado en la posición 44 produce un efecto de inversión de la dependencia de la fuerza iónica. En este último mutante (D44K) la interacción electrostática está optimizada, de forma que la reacción se hace más lenta al aumentar la fuerza iónica. Se deduce pues que cambios similares de carga en residuos distintos pero próximos implican diferencias drásticas en la interacción Pc/PSI y que el residuo 44 de la Pc desempeña un papel relevante en dicha interacción. El caso extremo de esta inversión de la dependencia de fuerza iónica es el mutante D44R/D47R, que, además, presenta un mecanismo de reacción con formación de complejo en condiciones de baja fuerza iónica en la mezcla de reacción. Este complejo, que no aparece en la Pc silvestre ni en el resto de los mutantes, es semejante al mecanismo de reacción de los organismos más evolucionados, y en este mutante de *Synechocystis* se obtiene al invertir la carga superficial de la cara este de la Pc, lo que hace a esta proteína más parecida a la Pc de algas verdes o plantas. El mencionado complejo entre Pc D44R/D47R y PSI no está optimizado, como se aprecia por sus valores de constante de asociación y de transferencia electrónica, que son bastante inferiores a los de otros sistemas estudiados (espinaca, *Monoraphidium* o *Anabaena*) (Hervás *et al.*, 1995). Esto es debido, como ya se comentó en la Introducción, a que la evolución del sistema donador/PSI hacia un mecanismo de reacción eficiente con fase rápida se produce de manera paralela en los donadores de electrones y el PSI, y, en este caso, el PSI es el silvestre de *Synechocystis*.

Los datos obtenidos a distinta fuerza iónica pueden comprenderse mejor visualizando los cambios inducidos por las mutaciones en el potencial electrostático de superficie, modelizados por dinámica molecular, en base a la estructura del mutante triple. La simulación



por ordenador de la distribución de potenciales de superficie en la Pc silvestre (Figura 39) muestra la superficie parcialmente negativa de la cara este, así como la ausencia de carga en la región hidrófoba del norte de la proteína. Hay algunos residuos positivos dispersos que no forman una superficie con carga definida. En la figura se muestra además el potencial de superficie de los mutantes de la zona este que implican un cambio de dos cargas.

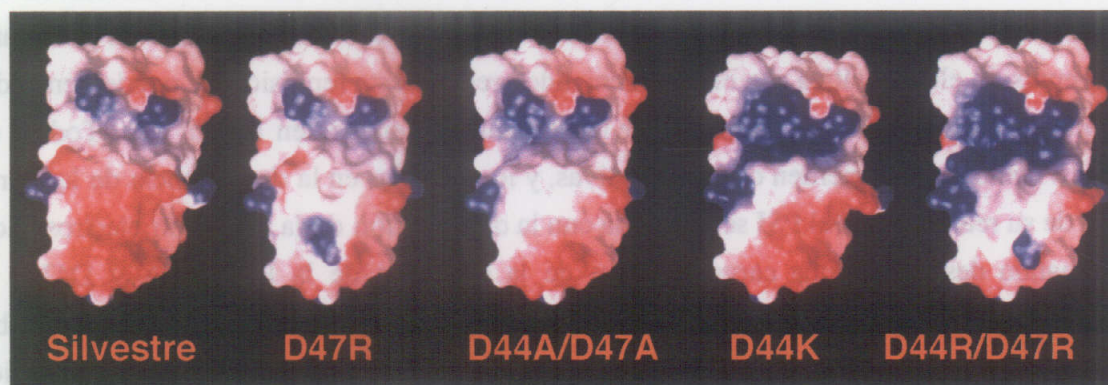


Figura 39: Modelos del potencial electrostático en la superficie de la Pc silvestre y algunos mutantes.

La simulación se realizó como se explica en *Materiales y Métodos*, asumiendo una fuerza iónica de 40 mM a pH 7. Las regiones de potencial negativo se representan en rojo y las de potencial positivo en azul. La orientación de las moléculas es tal que la zona hidrófoba queda en el extremo superior y la cara este al frente.

En el mutante D47R disminuye la región negativa y aumenta la zona neutra, de forma similar a lo que ocurre en el mutante D44A/D47A. Ambos mutantes presentan una reacción con el PSI casi independiente de la fuerza iónica. La sustitución del Asp44 por un residuo positivo (D44K) lleva a la aparición de una región de carga positiva, lo que es coherente con su dependencia de la fuerza iónica inversa respecto al silvestre. Este efecto es más acusado en el mutante doble D44R/D47R, que presenta el potencial electrostático invertido respecto a la Pc silvestre, lo que se corresponde con una interacción electrostática atractiva a larga distancia con el PSI, como se comprueba por su comportamiento frente a la fuerza iónica. Esta inversión de la carga superficial puede explicar también la formación del complejo electrostático entre este mutante de Pc y el PSI en condiciones de baja fuerza iónica. La diferencia de efecto entre las mutaciones de las posiciones 44 y 47 para los mismos cambios netos de carga global puede deberse a que el residuo 44 se encuentra cerca de dos residuos positivos y en un extremo de la cara este, mientras que la posición 47 queda en el interior de la región negativa, de forma que el cambio de carga de la posición 47 queda apantallado y el efecto es forzosamente menor que el de la mutación en la posición 44, tanto en el potencial local de superficie como en el comportamiento cinético respecto a la fuerza iónica.

El estudio de la k_{inf} nos informa sobre la naturaleza del cambio que hemos producido, de forma que si la k_{inf} es comparable a la de la Pc silvestre, se puede asegurar que el efecto de la mutación sobre la interacción de la Pc y el PSI será puramente electrostático, ya que el apantallamiento de todas las cargas anula el efecto de la mutación. En caso contrario, el efecto de la mutación habrá de explicarse por alguna modificación estructural o del centro redox. En todos los mutantes de carga de la cara este de la Pc, el efecto de la mutación es explicable por alteraciones en la interacción electrostática con el PSI, ya que sus valores de k_{inf} son muy parecidos a los de la Pc silvestre, descartando pues la posibilidad de perturbaciones estructurales que afecten a la interacción con el PSI.

Respecto a la zona hidrófoba de la Pc, los datos obtenidos con los mutantes L12A y K33E confirman que esta zona es muy importante en la interacción con el PSI, como se había observado en organismos eucariotas, proponiéndose que la zona norte es el lugar de transferencia electrónica hacia el PSI, a través de la His87 (Nordling *et al.*, 1991; Haehnel *et al.*, 1994; Sigfridsson *et al.*, 1996). Sin embargo, el descenso en la eficiencia de estos mutantes con respecto a la Pc silvestre no es tan drástico como el observado en otros mutantes equivalentes de Pc eucariotas, en los que desaparece totalmente la fase rápida (Haehnel *et al.*, 1994; Sigfridsson *et al.*, 1996). Esto es coherente con la dificultad de ver efectos específicos drásticos en un mecanismo de reacción tan simple como es el mecanismo colisional orientado de *Synechocystis*.

La aproximación termodinámica permite estudiar en mayor detalle el papel de cada residuo modificado en la interacción con el PSI, así como la naturaleza de las interacciones proteína-proteína. La Teoría del Estado de Transición se ha aplicado con éxito al estudio de los parámetros de activación de reacciones redox entre proteínas involucradas en la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis (Cox, 1975; Wood y Bendall, 1975; Takabe *et al.*, 1983; Bottin y Mathis, 1985). La mayoría de estos estudios muestran que la barrera de la energía de activación es de naturaleza entrópica. En los trabajos realizados con los sistemas de Pc/PSI y Cit/PSI de *Monoraphidium*, *Anabaena*, *Synechocystis* y espinaca, la reacción del PSI con sus donadores de electrones presenta valores de ΔG^\ddagger entre 30 y 40 kJ/mol (Díaz *et al.*, 1994a; Hervás *et al.*, 1996). A excepción del sistema Cit/PSI de *Anabaena*, en el resto de los sistemas se encuentra una compensación entropía-entalpía que se refleja en la relación lineal $\Delta H^\ddagger/\Delta S^\ddagger$, cuya pendiente nos informa de la naturaleza de dicha compensación. Así, cuando la compensación se debe en exclusiva a efectos del solvente, por exclusión de moléculas de agua que se encuentran ordenadas previamente en la superficie de las proteínas en solución, la pendiente de la recta debe ser el inverso de la temperatura media del intervalo en que se hayan hecho los experimentos, en este caso $3,47 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$, y si la compensación se debe exclusivamente a efectos electrostáticos la recta debe ser $14,41 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ (estimado por simulación). En los estudios realizados con los sistemas silvestres de Pc/PSI y Cit/PSI de

Synechocystis y con el sistema Pc/PSI de *Anabaena*, el valor de dicha pendiente es intermedio a los valores anteriormente mencionados, por lo que se considera que en la compensación intervienen factores electrostáticos y de solvente. En *Monoraphidium*, sin embargo, la compensación se puede atribuir completamente al solvente (Díaz *et al.*, 1994a). Se observa también que la variación de ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger con la fuerza iónica no es predecible, ya que en algunos sistemas la tendencia para la reacción Pc/PSI es similar a la de Cit/PSI, mientras que en otros casos se encuentran comportamientos inversos. Según Bendall (1998), ΔH^\ddagger puede aumentar o disminuir en función del balance global de las interacciones (hidrófobas, de Van der Waals, puentes de hidrógeno) entre las proteínas que reaccionan y ΔS^\ddagger aumenta o disminuye en función de que se liberen moléculas de solvente al formarse el complejo o de que las moléculas de solvente atrapadas en la interfase del complejo queden muy ordenadas. En el caso de los sistemas Pc/PSI y Cit/PSI silvestres de *Synechocystis*, la evolución de los parámetros termodinámicos con la fuerza iónica es inversa para Pc y Cit, aunque en ambos casos el comportamiento no varía en función de que se añada NaCl o MgCl₂ a la mezcla de reacción (Hervás *et al.*, 1996).

A partir de un primer análisis siguiendo la aproximación de Kannt, en esta tesis se trató de relacionar el cambio en la energía libre de activación con el cambio de carga neta de la proteína que produce cada mutación. Se observaron, sin embargo diferencias significativas en $\Delta\Delta G^\ddagger$ para mutantes con el mismo cambio de carga neta, por lo que fue necesario utilizar la ecuación de Watkins para estimar el efecto real de cada mutación. En el estudio termodinámico de los mutantes de Pc se obtuvieron líneas de Eyring completas que permitieron calcular los parámetros termodinámicos y comprobar que todas las Pc mutadas presentan la relación lineal esperada entre ΔG^\ddagger y $\ln k_2$, así como una compensación entropía-entalpía debida tanto a efectos del solvente como electrostáticos. Los valores de ΔG^\ddagger calculados son bastante similares a los valores de la Pc silvestre de *Synechocystis*; el valor algo menor de ΔG^\ddagger del mutante doble D44R/D47R se debe a cambios paralelos en ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger .

Los valores de energía de interacción electrostática (ΔV_{el}) obtenidos de la dependencia de $\Delta\Delta G^\ddagger$ de la fuerza iónica (Figura 26) no se relacionan necesariamente con el cambio de carga neta producido por la mutación, sino con el lugar concreto de la superficie de la proteína en el que ocurre el cambio de carga. ΔV_{el} es el parámetro que mejor indica el distinto efecto de mutaciones aparentemente tan comparables como D44K y D47R (un mismo cambio de carga en dos posiciones muy próximas de la superficie de la Pc). Así, de las tres Pc mutantes que presentan un $\Delta q = 2$, D44A/D47A tiene un valor de ΔV_{el} más parecido a D47R que a D44K (ver Tabla 6), de modo que el potencial local negativo en las proximidades del residuo 44 parece determinante en la repulsión electrostática de la Pc y el PSI.

En la mayoría de los casos, $\Delta\Delta G^\ddagger$ tiende a cero a fuerza iónica infinita, esto es, se aproxima al silvestre. Esto es otra indicación de que, en los mutantes de la cara este, las

diferencias respecto al silvestre se deben exclusivamente a factores electrostáticos. El único caso en que varía algo el comportamiento es el mutante D47A, en que $\Delta\Delta G^\ddagger$ no tiende a 0 a fuerza iónica infinita, aunque se aproxima mucho, y su k_{inf} es ligeramente superior a la silvestre. Esto se puede interpretar en términos de un cambio estructural que permite un mayor grado de libertad del complejo Pc/PSI. Quizás el residuo en la posición 47, que queda muy expuesto al solvente, participe en algún contacto con el PSI aunque no sea esencial para la estabilidad del complejo.

Se observa que, si bien el efecto de las mutaciones se debe en gran parte al cambio de carga, parte del fenotipo de los mutantes se debe también al lugar específico de la superficie de la proteína donde ocurre el cambio, esto es, las modificaciones en el potencial local de la superficie de la proteína es lo que realmente explica el efecto de la mutación.

Respecto a los mutantes de la zona norte, en la Pc L12A, por su propia naturaleza, no se ha podido usar la misma aproximación empleada con los mutantes de la cara este, ya que la modificación no provoca cambio de carga y sus efectos no pueden atribuirse a cambios en las interacciones electrostáticas de largo alcance, sino a variaciones en las interacciones hidrófobas o en los puentes de hidrógeno que se establecen con el PSI. Considerando que, en otros organismos, la Leu12 está implicada en interacciones hidrófobas con el PSI (Hippler *et al.*, 1996) se puede esperar que la desaparición de un CH_2 al sustituir la leucina por alanina produzca un $\Delta\Delta G^\ddagger$ negativo teórico de -2,8 kJ/mol, de acuerdo con estudios de la energía de solvatación de cadenas alifáticas (Cohn y Edsall, 1965; Low y Somero, 1975a), efecto que se corresponde con los valores de la Tabla 6. Del mismo modo se espera una disminución del valor absoluto de $\Delta\Delta G^\ddagger$ al aumentar la fuerza iónica por el descenso en la actividad del agua que se ha observado también en otros sistemas (Low y Somero, 1975a, 1975b; Loftfield *et al.*, 1980; Rand *et al.*, 1993; Jelesarov y Bosshard, 1994).

El mutante K33E, aunque presenta un cambio de dos cargas, que de acuerdo al modelo de interacción electrostática repulsiva Pc/PSI produciría un $\Delta\Delta G^\ddagger$ negativo, no tiene un comportamiento que se pueda explicar del mismo modo que el de los mutantes de la cara este de la Pc. Su dependencia de $\Delta\Delta G^\ddagger$ respecto de la fuerza iónica no se ajusta a la ecuación de Watkins, al presentar un perfil lineal. Además, la variación de ΔG^\ddagger con la fuerza iónica es, en valor absoluto, desproporcionada si se compara con los otros mutantes de carga, y está dominada por el término entrópico, al contrario que las mutaciones de la cara este (ver Apéndice). Este mutante presenta una gran compensación entropía-entalpía que indica que su ineficiencia como donador de electrones al PSI se debe a cambios en las interacciones hidrófobas. Asimismo, la compensación entropía-entalpía mencionada anteriormente se afecta de modo específico por cationes divalentes: al añadir Mg^{2+} a la mezcla de reacción se alcanza la máxima compensación a una fuerza iónica bastante menor que la necesaria para lograr el mismo efecto con Na^+ . Este efecto, que en principio podría adjudicarse a cambios del

solvente, debe ser considerado como específico según las posiciones a las que se unan los cationes en la proteína, ya que ocurre algo similar en el mutante D44R/D47R y menos acusado en el mutante D44K, pero no en el resto de los mutantes de la cara este.

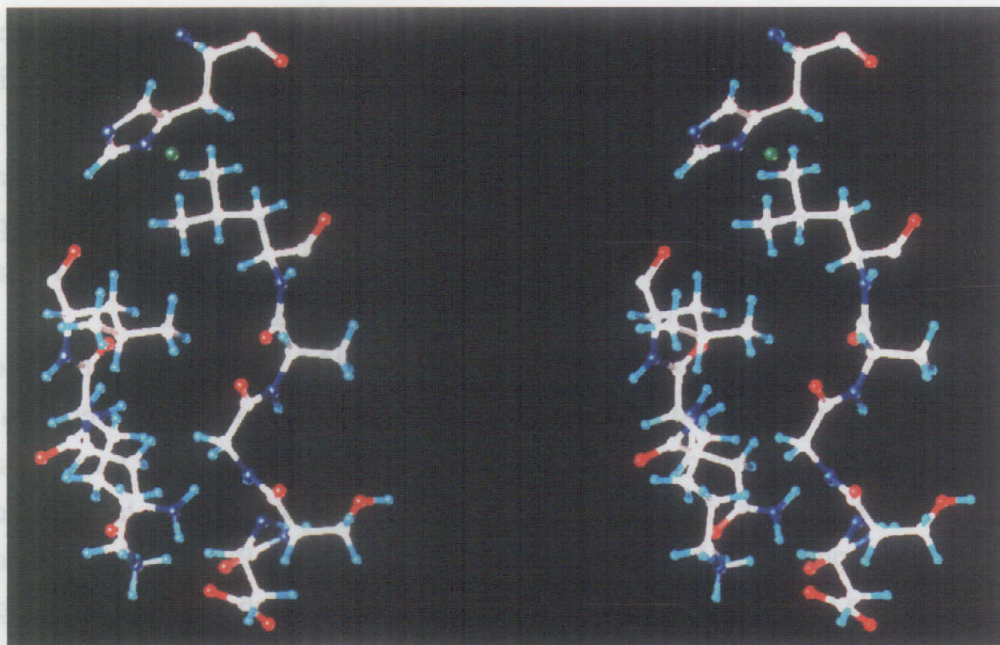


Figura 40: Representación tridimensional en estereovisión (arriba) y esquema de los residuos de la zona norte de la Pc (izquierda).

El átomo de cobre se muestra en verde. En el esquema, la flecha indica el grupo NH de la Lys33.

Para explicar los resultados obtenidos con el mutante K33E se realizó una modelización de los residuos que lo rodean (Figura 40). De acuerdo con este modelo, parece que la Lys33 estabiliza el lazo en el que se encuentra por puentes de hidrógeno con el

segmento Asp8-Leu12. Los grupos NH de Lys33 y Gln32 se encuentran unidos por puentes de hidrógeno con grupos CO de Asp8 a distancias de unos 2 Å. En el mutante K33E se rompen los puentes de hidrógeno debido a las repulsiones electrostáticas entre Glu33 y Asp8, lo que induce la separación de las cadenas laterales de Leu34 y Leu12, que forman el bolsillo hidrófobo del cobre. Como resultado, la adición de Mg^{2+} , incluso a bajas concentraciones, compensa las repulsiones electrostáticas entre Glu33 y Asp8 hasta revertir el efecto de la mutación, lo cual concuerda con los datos obtenidos. Hay que destacar que todas la Pc presentan un residuo ácido conservado en la posición 8 (Redinbo *et al.*, 1994).

4.3 CITOCROMO c_6

En el estudio del Cit por mutagénesis dirigida, se encontró como principal dificultad el bajo rendimiento de producción de Cit recombinante, en la estirpe de *E. coli* que se estaba utilizando habitualmente (DH5 α), en las diversas condiciones de cultivo ensayadas. Tal como se muestra en la Tabla 9, la elección de la estirpe MC1061 de *E. coli* mejoró la producción, incrementándola más de 6 veces, de forma que se pudo acometer la mutagénesis de esta proteína del mismo modo que se había realizado con la Pc.

Dado que no existía ningún dato previo sobre mutagénesis dirigida de ningún Cit ni se disponía de información sobre la estructura del Cit de *Synechocystis*, se seleccionaron residuos de la superficie de la proteína que, según la estructura conocida de Cit eucariotas, pudieran ser análogos a otros residuos de la Pc que se había demostrado que eran importantes en la interacción con el PSI. Así, se eligió el residuo de fenilalanina conservado en la posición 64, que podría corresponder a la Tyr83 de la Pc, residuo aromático conservado cercano a una región ácida. Por otra parte, se cambió la carga de dos residuos negativos, Asp70 y Asp72, localizados en una zona similar a la cara este de la Pc, mutándolos a arginina, de forma que pudieran equipararse a las mutaciones realizadas en dicha región de la Pc. Se modificó también la Arg67, un residuo positivo muy cercano al hemo.

Al igual que en el caso de la Pc, se realizó una serie de controles (espectro UV/Vis, potencial redox y espectro de EPR) para comprobar que las mutaciones puntuales no alteraban la estructura del centro redox, confirmándose la ausencia de alteraciones en el entorno del hemo en todos los Cit mutados. Al estudiar la reacción de las proteínas modificadas con el PSI se aprecia que, en todos los casos, al igual que ocurre con los mutantes de Pc, se mantiene el mecanismo de reacción tipo I. La mayor parte de la información sobre el efecto de las mutaciones se obtiene de los cambios que se producen en la velocidad de la reacción Cit/PSI en condiciones estándar y de la dependencia de la reacción respecto a la fuerza iónica.

La mutación F64A provoca un comportamiento prácticamente silvestre en condiciones estándar y también al extrapolar a fuerza iónica infinita, de modo que este residuo aromático no parece implicado en la interacción del Cit con el PSI. La simulación por ordenador de la estructura del Cit de *Synechocystis* basada en la estructura del Cit de *Monoraphidium* (utilizado para la predicción de los potenciales electrostáticos de superficie del Cit silvestre y de los mutantes) indica que este residuo Phe64, está poco expuesto al solvente y con el anillo aromático orientado hacia el interior de la molécula, muy cerca del hemo. El anillo aromático podría interaccionar con el grupo guanidino de la Arg67, estableciendo un camino para la transferencia electrónica entre estos dos residuos, similar a la interacción catión-orbitales π propuesta por Ulmann et al. (1997) para *Monoraphidium*. Estos autores proponen modelos teóricos en los que la Phe64, o su equivalente en otros Cit, sería análoga a la Tyr83 de la Pc y participaría como su intervención en la transferencia de electrones. De los datos de nuestro trabajo podemos descartar la participación de la Phe64 en la transferencia de electrones al PSI, aunque no sabemos si podría estar implicada en la reacción con el citocromo *f*. Sin embargo, los datos de que se dispone sobre la estructura del Cit y su momento dipolar apuntan a la existencia de un único lugar de transferencia de electrones, tanto para la oxidación del citocromo *f* como para la reducción del PSI (Frazão *et al.*, 1995). En cualquier caso, su cercanía al hemo podría explicar los cambios que la mutación de este residuo produce en el potencial redox.

La Arg67 sí parece ser fundamental en la interacción con el PSI, ya que su mutación por aspartato provoca un descenso de ocho veces en la constante bimolecular de la reacción en condiciones estándar, aún cuando su potencial redox es más reductor que el de la proteína silvestre. Además, su k_{inf} es un 30% de la del Cit silvestre, lo que nos indica que la mutación no sólo modifica la interacción electrostática con el PSI, sino que produce algún cambio estructural o estérico que afecta a la interacción Cit/PSI, o bien altera directamente la transferencia de electrones.

En los mutantes de la zona este del Cit se aprecia un efecto similar al de los mutantes de la misma zona de la Pc. La desaparición de cargas negativas de esta región favorece la interacción con el PSI, siendo la k_2 en condiciones estándar del Cit D72R el doble de la silvestre, y la del Cit D70R, el triple. Así pues, al igual que en el caso de la Pc, las cargas negativas de esta región parecen dificultar la interacción del Cit silvestre con el PSI.

Los estudios de dependencia de la fuerza iónica confirman en gran medida las observaciones hechas en condiciones estándar, ya que la desaparición de las cargas negativas de las posiciones 70 y 72 mejora la interacción con el PSI de modo comparable a las mutaciones del mismo tipo de la cara este de la Pc. Aparece de nuevo un fenotipo diferente para mutaciones muy similares en posición y cambio de carga, debido a efectos específicos, por la posición del residuo. Se observa una situación análoga entre los residuos 44 y 47 de la

Pc y los residuos 70 y 72 del Cit, ya que la mutación de un aspartato por un residuo positivo lleva a la desaparición del efecto de la fuerza iónica en uno de los casos, y a la inversión del mismo efecto con respecto a la proteína silvestre en el otro caso. En el Cit, la posición 70 es más importante en cuanto a la repulsión electrostática con el PSI que la posición 72. Todo esto indica que el área del Cit formada por los residuos de las posiciones 69-72 podría equipararse a la zona ácida de la cara este de la Pc.

Al igual que el caso de la Pc, se analizaron los datos obtenidos a distinta fuerza iónica comparando el potencial electrostático de superficie de los Cit silvestre y mutados modelizados por ordenador. En la simulación del Cit silvestre (Figura 41) se observa, de modo análogo a la Pc, una superficie negativa en la cara este. Sin embargo aparece una región positiva en las proximidades de la región expuesta al solvente del hemo que no tiene un claro equivalente en la superficie de la Pc. Se muestran además los cambios en el potencial de superficie inducidos por las mutaciones que implican un cambio de carga.

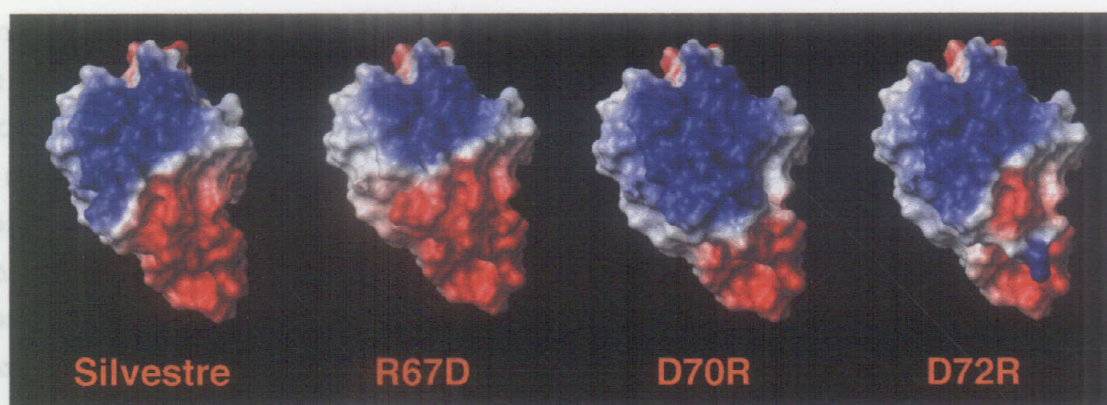


Figura 41: Modelos del potencial electrostático de superficie del Cit silvestre y algunos de sus mutantes.

La simulación se realizó como se explica en Materiales y Métodos. El ajuste del potencial electrostático se hizo asumiendo una fuerza iónica de 40 mM y pH 7. Las regiones de potencial negativo se representan en rojo y las de potencial positivo en azul. La orientación de las moléculas es tal que la zona expuesta al solvente del hemo queda en el extremo superior izquierdo y la cara este hacia el frente.

En todas las simulaciones realizadas, se puede encontrar una buena correlación entre el resultado experimental de actividad con el PSI y la distribución de cargas en la superficie de la proteína; así, en el mutante más afectado en su actividad (R67D), la desaparición de una arginina muy cercana al hemo, aparte de otros efectos ya mencionados (sobre la estructura o sobre la transferencia electrónica), implica una disminución notable de la superficie positiva cercana al hemo y una ampliación de la región negativa de la cara este, de forma que debe aumentar la repulsión electrostática con el PSI. Esto se corresponde con el comportamiento

observado en este mutante respecto a la fuerza iónica, dentro de los límites de su lenta reacción con el PSI. En los dos mutantes de la cara este, se aprecia una disminución de superficie negativa respecto al Cit silvestre, así como un efecto diferente según la posición del residuo en que se cambien las cargas, en función del apantallamiento que se produzca con las cargas que rodean al residuo modificado. Tal como se esperaba, la inversión de carga del residuo 70 causa un mayor efecto en cuanto a la disminución de la región negativa de la cara este que el mismo cambio en la posición 72, lo cual se corresponde con la inversión de la dependencia de la fuerza iónica respecto al Cit silvestre que presenta D70R y no D72R.

En el estudio termodinámico de los mutantes del Cit se usó la misma aproximación empleada con los mutantes de la Pc, con resultados satisfactorios, al confirmarse las conclusiones obtenidas con las observaciones cinéticas. En todos los casos aparece una compensación entropía-entalpía similar a la del sistema silvestre Cit/PSI, y, según la pendiente de la recta que relaciona ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger , dicha compensación se debe tanto a efectos electrostáticos como a relajación del solvente, como ocurre con los mutantes de la Pc. El comportamiento del mutante F64A es similar al Cit silvestre, tanto en sus parámetros termodinámicos (ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger) como en la dependencia de $\Delta\Delta G^\ddagger$ de la fuerza iónica y en su ΔV_{el} . El mutante R67D presenta un valor de ΔG^\ddagger alto, debido a un aumento de ΔH^\ddagger respecto al Cit silvestre, que se corresponde con su ineficiencia como reductor del PSI y se refleja en el valor bajo de ΔV_{el} . El comportamiento de los mutantes D70R y D72R se ajusta a la ecuación de Watkins, y la diferencia de $\Delta\Delta G^\ddagger$ a baja fuerza iónica para dos mutantes con igual Δq sugiere de nuevo que el efecto de estas dos mutaciones sobre la interacción electrostática con el PSI es bastante diferente, dependiendo del lugar concreto de la proteína donde se produzca el cambio.

4.4 INTERACCIÓN DE PLASTOCIANINAS MUTANTES CON EL PSI DEFECTIVO EN PsaF

Estudios previos sobre la interacción de la Pc silvestre de *Synechocystis* con el PSI defectivo en PsaF AFK6, indican que esta subunidad no tiene un papel esencial en la reacción de transferencia de electrones al PSI en esta cianobacteria (Chitnis *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1994; Hippler *et al.*, 1996). En este trabajo se ha estudiado la interacción de distintos mutantes de Pc con el PSI AFK6 para establecer si las modificaciones de la Pc producen algún cambio en la zona de interacción de esta proteína con el PSI.

Los resultados obtenidos con D44K indican que esta proteína interacciona mejor con el PSI sin PsaF. Este hecho no se debe a cambios en la interacción electrostática, de forma que esta subunidad del PSI puede ocultar parcialmente un sitio de interacción favorable para

este mutante de Pc. Algo similar ocurre con D44A/D47A, que presenta con el PSI silvestre una ligera dependencia de la fuerza iónica que desaparece en su interacción con el PSI AFK6. Así pues, la ausencia de la subunidad PsaF parece producir cambios estructurales que afectan a las interacciones electrostáticas. En el caso de K33E, la menor reactividad con el PSI mutante se mantiene a fuerza iónica infinita, lo que probablemente implica efectos estéricos debidos al cambio de tamaño del aminoácido.

El estudio más interesante es el realizado con el mutante D44R/D47R, en el que se observa que la subunidad PsaF no sólo no es necesaria para la formación del complejo, como sostiene Hippler *et al.* (1996) para la Pc silvestre, sino que la presencia de dicha subunidad dificulta la asociación de la Pc mutante con el PSI, disminuyendo la constante de asociación. Esto sugiere que el complejo que se observa entre la Pc D44R/D47R y el PSI a baja fuerza iónica se forma por interacción de la Pc con algunos residuos de carga negativa de las subunidades PsaA o PsaB (y no de la PsaF) del PSI, tal como ocurre para el sistema silvestre de *Synechocystis* (Fromme *et al.*, 1994), facilitando así la orientación correcta de los centros redox antes de la transferencia de electrones. La subunidad PsaF tendría sólo un papel estructural. El mencionado complejo mutante no es eficiente, ya que las constantes de asociación y de transferencia de electrones son bajas en relación a otros sistemas, como ya se ha comentado, al no haber evolucionado aún la subunidad PsaF del PSI hasta convertirse en el lugar apropiado para la unión óptima de los donadores de electrones. Probablemente la función de la subunidad PsaF como zona de unión de los donadores de electrones al PSI apareció en los eucariotas junto a la región ácida de los propios donadores.

5. CONCLUSIONES

1. La estructura de la plastocianina mutante triple, obtenida por difracción de rayos X, es muy similar a la de todas las plastocianinas conocidas, a excepción de las ligeras diferencias en las distancias de los ligandos al cobre.
2. Las mutaciones producidas en la cara este de la plastocianina indican que esta región es equiparable a la zona ácida de proteínas eucariotas, esto es, participa en la interacción electrostática con el PSI.
3. Las mutaciones producidas en la zona hidrófoba norte de la plastocianina permiten deducir que esta región es equivalente a la zona correspondiente de plastocianinas eucariotas. Los residuos aquí localizados juegan un papel esencial en la interacción con el PSI.
4. La sustitución de los residuos 44 y 47 de la plastocianina por arginina produce cambios en el mecanismo de reacción de esta proteína con el PSI, en condiciones de baja fuerza iónica, de forma que la transferencia de electrones ocurre tras la formación de un complejo no optimizado.
5. En general, la subunidad PsaF del PSI de *Synechocystis* no tiene ningún papel en la reacción con la plastocianina silvestre ni con los mutantes ensayados. Además no es necesaria para la formación del complejo entre PSI y el doble mutante D44R/D47R de plastocianina.
6. Se ha mejorado la producción de citocromo c_6 recombinante utilizando la estirpe de *E. coli* MC1061, lo que ha permitido abordar por primera vez estudios de mutagénesis dirigida de este tipo de citocromos.
7. Se ha identificado una región en el citocromo c_6 que parece ser análoga a la cara este de la plastocianina, participando en interacciones electrostáticas con el PSI.
8. El residuo Arg67 del citocromo c_6 juega un papel fundamental en la reacción de esta proteína con el PSI y, probablemente, participa en interacciones no sólo electrostáticas con su aceptor de electrones.
9. Los estudios cinéticos y termodinámicos indican que el efecto de las mutaciones de carga producidas en la superficie de las dos metalo-proteínas (plastocianina y citocromo c_6) no se puede atribuir simplemente al cambio de carga global producido, sino al cambio de potencial electrostático local de las superficies de interacción.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adam, Z y Malkin, R (1989) On the interaction between cytochrome *f* and plastocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 975, 158-163.

Alfred, DR y Staehelin, LA (1985) Lateral distribution of the cytochrome *b₆f* and coupling factor ATP synthetase complexes of chloroplast thylakoid membranes. *Plant Physiol.* 78,199-202.

Anderson, GP, Sanderson, DG, Lee, C-H, Durell, SR, Anderson, LB y Gross, EL (1987) The effect of ethylenediamine chemical modification of plastocyanin on the rate of cytochrome *f* oxidation and P700⁺ reduction. *Biochim. Biophys. Acta* 894, 386-398.

Anderson, JM y Melis, A (1983) Localization of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 745-749.

Arnon, DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1-15.

Badsberg, U, Jorgensen, AMM, Gesmar, H, Led, JJ, Hammerstad, JM, Jespersen, L-L y Ulstrup, J (1996) Solution structure of reduced plastocyanin from the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *Biochemistry* 35, 7021- 7031.

Bagby, S, Driscoll, PC, Harvey, TS y Hill, HAO (1994) High-resolution solution structure of reduced parsley plastocyanin. *Biochemistry* 33, 6611-6622.

Banci, L, Bertini, I, Quacquareni, G, Walter, O, Díaz, A, Hervás, M y De la Rosa, MA (1996) The solution structure of cytochrome *c₆* from the green alga *Monoraphidium braunii*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 1, 330-340.

Banci, L, Bertini, I, De la Rosa, MA, Koulogliotis, D, Navarro, JA y Walter, O (1998) Solution structure of oxidized cytochrome *c₆* from the green alga *Monoraphidium braunii*. *Biochemistry* 37, 4831-4843.

Beißinger, M, Sticht, H, Sutter, M, Ejchart, A, Haehnel, W y Rösch, P (1998) Solution structure of cytochrome *c₆* from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *EMBO J.* 17 (1), 27-36.

- Bendall, DS (1996) Interprotein electron transfer. En: Protein electron transfer. (DS Bendall, ed.) BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford.
- Berghuis, AM, Guillemette, JG, McLendon, G, Sherman, F, Smith, M y Brayer, GD (1994) The role of a conserved internal water molecule and its associated hydrogen bond network in cytochrome *c*. *J. Mol. Biol.* 236, 786-799.
- Betts, JN, Beratan, DN y Onuchic, JN (1992) Mapping electron tunneling pathways: an algorithm that finds the minimum length/maximum coupling pathway between electron donors and acceptors in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 4043-4046.
- Birnboim, HC y Doly, J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bottin, H y Mathis, P (1985) Interaction of plastocyanin with the photosystem I reaction center: a kinetic study by flash absorption spectroscopy. *Biochemistry* 24, 6453-6460.
- Bovy, A, de Vrieze, G, Borrias, M y Weisbeek, P (1992a) Isolation and sequence analysis of a gene encoding a basic cytochrome *c*-553 from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7937. *Plant Mol. Biol.* 19, 491-492.
- Bovy, A, de Vrieze, G, Borrias, M y Weisbeek, P (1992b) Transcriptional regulation of the plastocyanin and cytochrome *c*553 genes from the cyanobacterium *Anabaena* species PCC 7937. *Mol. Microbiol.* 6, 1507-1513.
- Boyer, HW y Roulland-Dusoix, D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41, 459-472.
- Brettel, K (1997) Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1318, 322-373.
- Briggs, LM, Pecoraro, VL y McIntosh, L (1990) Copper-induced expression, cloning, and regulatory studies of the plastocyanin gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* 15, 633-642.
- Bruce, BD y Malkin, R (1988) Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem I complex. *J. Biol. Chem.* 263, 7302-7308.

Brünger, A, Kuryan, K y Karplus, M (1987). Crystallographic R-factor refinement by molecular dynamics. *Science* 235, 458-460.

Bullock, WO, Fernández, JM y Short, JM (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bioethniques* 5, 376.

Campos, AP, Aguiar, AP, Hervás, M, Regalla, M, Navarro, JA, Ortega, JM, Xavier, AV, De la Rosa, MA y Teixeira, M (1993) Cytochrome c_6 from *Monoraphidium braunii*: A cytochrome with an unusual heme axial coordination. *Eur. J. Biochem.* 216, 329-341.

Casimiro, DR, Richards, JH, Winkler, JR y Gray, HB (1993) Electron transfer in ruthenium-modified cytochromes *c*. σ -Tunnelling pathways through aromatic residues. *J. Phys. Chem.* 97, 13073-13077.

CCP4 (1979). The SERC (UK) Collaborative Computing Project No. 4. Daresbury Laboratory, Warrington, UK.

Chitnis, PR, Purvis, D y Nelson, N (1991) Molecular cloning and targeted mutagenesis of the gene *psaF* encoding subunit III of photosystem I from the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 266, 20146-20151.

Chitnis, PR, Xu, Q, Chitnis, VP y Nechushtai, R (1995) Function and organization of photosystem I polypeptides. *Photosynth. Res.* 44, 23-40.

Christensen, HEM, Conrad, LS, Mikkelsen, KV, Nielsen, MK y Ulstrup J (1990) Direct and superexchange electron tunneling at the adjacent and remote sites of higher plant plastocyanins. *Inorg. Chem.* 29, 2808-2816.

Cohn, CL, Hermodson, MA y Krogmann, DW (1989) The amino acid sequence of cytochrome *c553* from *Microcystis aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 270, 219-226

Cohn, EJ y Edsall, JT (1965) en : *Proteins, amino acids and peptides* (Hafner Publishing Co., New York), p. 212.

Collyer, CA, Guss, JM, Sugimura, Y, Yoshizaki, F y Freeman, HC (1990) Cristal structure of plastocyanin from a green alga, *Enteromorpha prolifera*. *J. Mol. Biol.* 211, 617-632.

Cox, RP (1975) The properties of cytochrome *f* and P700 in chloroplasts suspended in fluid media at sub-zero temperatures. *Eur. J. Biochem* 55, 625-631.

Cramer, WA, Everly, RM, Furbacher, PN, Huang, D, Tae, G-S, Szczepaniak, A, Cherepanov, DA y Krishtalik, LL (1992) En: Murata, N (ed) *Research in photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol II, pp 447-454.

Cramer, WA, Soriano, GM, Ponomarev, M, Huang, D, Zhang, H, Martínez, SE y Smith, JL (1996) Some new structural aspects and old controversies concerning the cytochrome *b₆f* complex of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 477-508.

Davis, DJ, Krogmann, DW y San Pietro, A (1980) Electron donation to Photosystem I. *Plant Physiol.* 65, 697-702

De la Cerda, B, Navarro, JA, Hervás, M, De la Rosa, MA (1997) Changes in the reaction mechanism of electron transfer from plastocyanin to photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as induced by site-directed mutagenesis of the copper protein. *Biochemistry* 36 (33) 10125-10130.

Díaz, A, Hervás, M, Navarro, JA, De la Rosa, MA y Tollin, G (1994a) A thermodynamic study by laser-flash photolysis of plastocyanin and cytochrome *c₆* oxidation by photosystem I from the green alga *Monoraphidium braunii*. *Eur. J. Biochem.* 222, 1001-1007.

Díaz, A, Navarro, F, Hervás, M, Navarro, JA, Chávez, S, Florencio, FJ y De la Rosa, MA (1994b) Cloning and correct expression in *E. coli* of the *petJ* gene encoding cytochrome *c₆* from *Synechocystis* 6803. *FEBS Lett.* 347, 173-177.

Durell, SR, Labanowski J, Gross EL (1990) Modeling of the electrostatic potential field of plastocyanin. *Arch. Biochem. Biophys.* 277, 241-254.

Dutton, PL y Wilson, DF (1974) Redox potentiometry in mitochondrial and photosynthetic bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 346, 165-212.

Efterkar, F y Schiller, NL (1994) Partial purification and characterization of a manuronan-specific alginate lyase from *P. aeruginosa*. *Current Microbiol.* 29, 37-42.

Eyring, H (1938) A discussion of reaction kinetics. I. General. The theoretical methods of treating activation energy and reaction velocity. *Trans. Faraday Soc.* 34, 3-11.

Fish, LE, Bogorad, L (1986) Identification and analysis of the maize P700 chlorophyll *a* apoproteins PSI-A1 and PSI-A2 by high pressure chromatography analysis and partial sequence determination. *J. Biol. Chem.* 261, 8134-8139.

Frazão C, Soares CM, Carrondo MA, Pohl, E, Dauter Z, Wilson KS, Hervás M, Navarro JA, De la Rosa MA y Sheldrick, G (1995) *Ab initio* determination of the crystal structure of cytochrome *c*₆ and comparison with plastocyanin. *Structure* 3, 1159-1169.

Fromme, P, Schubert, W-D y Kraus, N (1994) Structure of Photosystem I: Suggestion on the docking sites for plastocyanin, ferredoxin and the coordination of P700. *Biochim. Biophys. Acta* 1187: 99-105.

Garrett, TPJ, Clingeffer, DJ, Guss, JM, Rogers, SJ y Freeman, HC (1984) The crystal structure of poplar apoplastocyanin at 1.8-Å resolution. The geometry of the copper-binding site is created by the polypeptide. *J Biol. Chem.* 259, 2822-2825.

Ghassemian, M, Wong, B, Ferreira, F, Markley, JL y Straus, NA (1994) Cloning, sequencing and transcriptional studies of the genes for cytochrome *c*-553 and plastocyanin from *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology* 140, 1151-1159.

Giebel, LB y Spritz, RA (1990) Site-directed mutagenesis using a double-stranded DNA fragment as a PCR primer. *Nucl. Acids Res.* vol 18, nº 16, 4947.

Golbeck, M y Petch, I (1976) Kinetics and equilibria of the electron transfer between azurin and the hexanocyano-Fe(II/III) couple. *Biochemistry* 15, 4197-4208.

Golbeck, JH (1992) Structure and function of photosystem I. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 43, 293-324.

Golbeck, JH (1994) En: Bryant DA (ed) *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 319-360.

Gray, JC (1992) Cytochrome *f*: structure, function and biosynthesis. *Photosynth. Res.* 34, 359-374.

Gross, EL (1993) Plastocyanin: structure and function. *Photosynth. Res.* 37, 103-116.

Gross, EL (1996) Plastocyanin: structure, location, diffusion, and electron transfer mechanisms. En: *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. D. Ort y C. Yocum, editores. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Grossman, AR, Bartlett, SG, Schmidt, GW, Mullet, JE y Chua, N-H (1982) Optimal conditions for post-translational uptake of proteins by isolated chloroplasts. In vitro synthesis and transport of plastocyanin, ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase, and fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 257, 1558-1563.

Guss, JM y Freeman, HC (1983) Structure of oxidized poplar plastocyanin at 1.6Å resolution. *J. Mol. Biol.* 169, 521-563.

Guss, JM, Harrowell, PR, Murata, M, Norris, VA y Freeman, HC (1986) Cristal structure analyses of reduced (Cu^I) poplar plastocyanin at six pH values. *J. Mol. Biol.* 192, 361-387.

Guss, JM, Bartunik, HD y Freeman, HC (1992) Accuracy and precision in protein structure analysis: restrained least-squares refinement of the structure of poplar plastocyanin at 1.33 Å resolution. *Acta Crystallogr.* B48, 790-811.

Haehnel, W, Jansen, T, Gause, K, Klösgen, RB, Stahl, B, Michl, D, Huvermann, B, Karas, M y Herrmann, RG (1994). Electron transfer from plastocyanin to photosystem I. *EMBO J.* 13, 1028-1038.

Hall, DO y Rao, KK (1994) *Photosynthesis*, 5ª ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Hanahan, D (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.

Hanahan, D (1985) The techniques for transformation of *E. coli*. En *DNA cloning*. vol 1, (DM Glover) IRL Press, Oxford.

Hatanaka, H, Sonoike K, Hirano M, Katoh S (1993) Small subunits of photosystem I reaction center complexes from *Synechococcus elongatus*: Is the psaF gene product required for oxidation of cytochrome *c*-553?. *Biochim. Biophys. Acta* 1141, 45-51.

- Hauska, G, Hurt, E, Gabellini, N y Lockau, W (1983) Comparative aspects of quinol-cytochrome *c*/plastocyanin oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* 726, 97-133.
- He, S, Modi, S, Bendall, DS y Gray, JC (1991). The surface-exposed tyrosine residue Tyr83 of pea plastocyanin is involved in both binding and electron transfer reactions with cytochrome *f*. *EMBO J.* 10, 4011-4016.
- Hervás, M, De la Rosa, MA y Tollin, G (1992) A comparative laser flash photolysis study of algal plastocyanin and cytochrome *c*₅₅₂ photooxidation by photosystem I particles. *Eur. J. Biochem.* 203, 115-120.
- Hervás, M, Navarro, F Navarro, JA, Chávez, S, Díaz, A, Florencio, FJ y De la Rosa, MA (1993) *Synechocystis* 6803 plastocyanin isolated from both the cyanobacterium and *E. coli* transformed cells are identical. *FEBS Lett.* 319, 257-260.
- Hervás, M, Ortega, JM, Navarro, JA, De la Rosa, MA y Bottin, H (1994) Laser flash kinetic analysis of *Synechocystis* PCC 6803 cytochrome *c*₆ and plastocyanin oxidation by photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta.* 1184, 235-241.
- Hervás, M, Navarro, JA, Díaz, A, Bottin, H y De la Rosa, MA (1995) Laser-flash kinetic analysis of the fast electron transfer from plastocyanin and cytochrome *c*₆ to photosystem I. Experimental evidence on the evolution of the reaction mechanism *Biochemistry* 34, 11321-11326.
- Hervás, M, Navarro, JA, Díaz, A y De la Rosa, MA (1996) A comparative thermodynamic analysis by laser-flash absorption spectroscopy of photosystem I reduction by plastocyanin and cytochrome *c*₆ in *Anabaena* PCC 7119, *Synechocystis* PCC 6803 and spinach. *Biochemistry* 35, 2693-2698.
- Hervás, M, Navarro, JA, Molina-Heredia, FP y De la Rosa, MA (1998) The reaction mechanism of photosystem I reduction by plastocyanin and cytochrome *c*₆ follows two different kinetic models in the cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. PCC 6903. *Photosynth. Res.* 57, 93-100.
- Hill, KL y Merchant, S (1992) *In vivo* competition between plastocyanin and a copper-dependent regulator of the *Chlamydomonas reinhardtii* cytochrome *c*₆ gene. *Plant Physiol.* 100, 319-326.

- Hill, R y Scarisbrick, R (1951) The haematin compounds of leaves. *New Phytol.* 50, 98-111
- Hippler, M, Ratajczak, R y Haehnel, W (1989) Identification of the plastocyanin binding subunit of photosystem I. *FEBS Lett.* 250, 280-284.
- Hippler, M, Riedel, A, Schroer, U, Nitschke, W y Haehnel, W (1996) Light-induced charge separation between plastocyanin and the iron-sulfur clusters F_A and F_B in the complex of plastocyanin and photosystem I. *Arc. Bioch. Bioph.* 330, 414-418.
- Hippler, M, Drepper, F, Farah, J y Rochaix, J-D (1997) Fast electron transfer from cytochrome c_6 and plastocyanin to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* requires PsaF. *Biochemistry* 36, 6343-6349.
- Hippler, M, Drepper, F, Haehnel, W y Rochaix J-D (1998) The N-terminal domain of PsaF: Precise recognition site for binding and fast electron transfer from cytochrome c_6 and plastocyanin to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7339-7344.
- Ho, KK y Krogmann, DW (1984) Electron donors to P700 in cyanobacteria and algae. An instance of unusual genetic variability. *Biochim. Biophys. Acta* 766, 310-316.
- Holmes, DS y Quigley, M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-197.
- Ikeuchi, M (1992) Subunit proteins of photosystem I. *Plant Cell Physiol.* 3, 669-676.
- Iwata, S, Lee, JW, Okada, K, Lee, JK, Iwata, M, Rasmussen, B, Link, TA, Ramaswamy, S y Jap, BK (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc_1 complex. *Science* 281, 64-71.
- Janisch-Perron, C, Vieira, J y Messing, J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103.
- Jelesarov, I y Bosshard, HR (1994) Thermodynamics of ferredoxin binding to ferredoxin:NADP⁺ reductase and the role of water at the complex interface. *Biochemistry* 33, 13321-13328.

- Jones, TA, Zou, J-Y, Cowan, SWT y Kjeldgaard, M (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in this models. *Acta Crisallog. sec. A*, 47, 110-119.
- Kallas, T (1994) En: Bryant DA (ed) *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 259-317.
- Kannt, A, Young, S y Bendall, DS (1996) The role of acidic residues of plastocyanin in its interaction with cytochrome *f*. *Biochim. Biophys. Acta* 1277, 115-126.
- Kerfeld, CA, Anwar, HP, Interrante, R, Merchant, S y Yeates, TO (1995) The structure of chloroplast cytochrome c_6 at 1.9 Å resolution: evidence for functional oligomerization. *J Mol Biol.* 250, 627-647.
- Kojiro, C, Markley, JL (1983) Connectivity of proton and carbon spectra of the blue copper protein, plastocyanin, established by two-dimensional nuclear magnetic resonance. *FEBS Lett.* 162, 52-56.
- Koradi, R, Billeter, M y Wütrich, K (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* 14, 51-55.
- Kruip, J, Boekema, EJ, Bald, D, Boonstra, AF y Rögner, M (1993) Isolation and structural characterization of monomeric and trimeric photosystem I complexes (P700.F_A/F_B and P700.F_x) from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 268, 23353-23360.
- Kruip, J, Bald, D, Boekema, EJ y Rögner M (1994) Evidence for the existence of trimeric and monomeric photosystem I complexes in thylakoid membranes from cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 40, 279-286.
- Lam, E, Ortiz, W y Malkin, R (1984) Chlorophyll *a/b* proteins of photosystem I. *FEBS Lett* 168, 10-14
- Laskowski, RA, McArthur, MW, Moss, DS y Thornton, JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* 26, 283-291.

Leslie, AGW (1991) En: *Cystallographic Computing*. vol. 5, 50-61, Oxford University Press, Oxford.

Loach, PA (1973) Oxidation-reduction potentials, absorbance bands and molar absorbance of compounds used in biochemical studies. En: *Handbook of chemistry selected data for molecular biology* (Sober, HA ed.), 2ª edición, J33-J40, CRC press, Cleveland, Ohio.

Lotffield, RB, Eigner, EA, Pastuzyn, A, Lörgren, TNE y Jakubowsky, H (1980) Conformational changes during enzyme catalysis: role of water in the transition state. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 3014-3018.

Low, PS y Somero, GN (1975a) Activation volume in enzymatic catalysis: Their sources and modification by low molecular weight solutes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3014-3018.

Low, PS y Somero, GN (1975b) Protein hydration changes during catalysis: A new mechanism of enzymatic rate-enhancement and ion activation/inhibition of catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3305-3309.

Malkin, R (1992) Cytochrome *bc1* and *b₆f* complexes of photosynthetic membranes. *Photosynth. Res.* 33, 121-136.

Martínez, SE, Huang, D, Szepaniack, A, Cramer, WA y Smith, JL (1994) Cristal structure of chloroplast cytochrome *f* reveals a novel cytochrome fold and unexpected heme ligation. *Structure* 2, 95-105.

Mathis, P y Sétif, P (1981) Near infra-red absorption spectra of the chlorophyll *a* cations and triplet state *in vitro* and *in vivo*. *Isr. Jour. Chem.* 21, 316-320.

Medina, M, Díaz, A, Hervás, M, Navarro, JA, Gómez-Moreno, C, De la Rosa, MA y Tollin, G (1993) A comparative laser flash absorption spectroscopy study of *Anabaena* PCC 7119 plastocyanin and cytochrome *c₆* photooxidation by photosystem I particles. *Eur. J. Biochem.* 213, 1133-1138.

Meier, M, van Eldik, R, Chang, IJ, Mines, GA, Wuttke, DS, Winkler, JR y Gray, HB (1994) Pressure effects on the rates of intramolecular electron transfer in ruthenium-modified cytochrome *c*. Role of the intervening medium in tunneling distant Fe²⁺:Ru³⁺ electronic couplings. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 1577-1578.

Meissner, PS, Sisk, WP y Berman, ML (1987) Bacteriophage λ cloning system for the construction of directional cDNA libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 4171.

Merchant, S y Bogorad, L (1987) The Cu(II)-repressible plastidic cytochrome *c*. J. Biol. Chem. 262, 9062-9067.

Merchant, S, Hill, K, Kim, JH, Thompson, J, Zaitlin, D y Bogorad, L (1990) Isolation and characterization of a complementary DNA clone for an algal pre-apoplastocyanin. J. Biol. Chem. 265, 12372-12379.

Meyer, TE, Zhao, ZG, Cusanovich, MA y Tollin, G (1993) Transient kinetics of electron transfer from a variety of *c*-type cytochromes to plastocyanin. Biochemistry 32, 4552-4559.

Modi, S, Nordling, M, Lundberg, LG, Hansson, O y Bendall, DS (1992a) Reactivity of cytochromes *c* and *f* with mutant forms of spinach plastocyanin. Biochim. Biophys. Acta. 1102, 85-90.

Modi, S, He, S, Gray, JC y Bendall, DS (1992b) The role of surface-exposed Tyr83 of plastocyanin in electron transfer from cytochrome *c*. Biochim. Biophys. Acta 1101, 64-68.

Moore, JM, Case, DA, Chazin, WJ, Gippert, GP, Havel, TF, Powls, R y Wright, PE (1988) Three-dimensional solution structure of plastocyanin from the green alga *Scenedesmus obliquus*. Science 240, 314-317.

Moore, GR y Pettigrew, GH (1990) Cytochromes *c*: evolutionary, structural and physicochemical aspects. Springer-Verlag, Berlin.

Morand, LZ, Frame, MK, Colvert, KK, Johnson, DA, Krogmann, DW y Davis, DJ (1989) Biochemistry 28, 8039-8047.

Navarro, JA, Hervás, M y De la Rosa, MA (1997) Coevolution of cytochrome c_6 and plastocyanin, mobile proteins transferring electrons from cytochrome b_6/f to photosystem I. J. Bioinorg. Chem. 2, 11-22.

Neu, HC y Heppel, LA (1965) The release of enzymes from *E. coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. J. Biol. Chem. 240, 3685.

- Nicholls, A y Honig, B (1991) A finite difference algorithm using successive over-relaxation to solve the Poisson-Boltzmann equation. *J. Comp. Chem.* 12, 435-445.
- Nordling, M, Sigfridsson, K, Young, S, Lundberg, LG y Hansson, O (1991) Flash-photolysis studies of the electron transfer from genetically modified spinach plastocyanin to photosystem I. *FEBS Lett.* 291, 327-330.
- Ortega, JM, Hervás, M y Losada, M (1988) Redox and acid-base characterization of cytochrome *b*-559 in photosystem II particles. *Eur. Jour. Biochem.* 171, 449-455.
- Pearlman, DA, Case, DA, Cadwell, GC, Siebel, GL, Singh, UC, Weiner, P y Kollman, PA (1995) AMBER 4.1, University of California, San Francisco.
- Pearson, DC, Gross, EL y David, ES (1996) Electrostatic properties of cytochrome *f*: implications for docking with plastocyanin. *Biophys. J.* 71, 64-76.
- Portis, AR y McCarty, RE (1976) Cuantitative relationships between phosphorylation, electron flow, and internal hydrogen ion concentrations in spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 251 (6), 1610-1617.
- Qin, L, Kostic, NM (1992) Electron-transfer reactions of cytochrome *f* with flavin semiquinones and with plastocyanin. Importance of protein-protein electrostatic interactions and of donor-acceptor coupling. *Biochemistry* 31, 5145-5150.
- Rand, RP, Fuller, NL, Butko, P, Francis, G y Nichols, P (1993) Measured change in protein solvation with substrate binding and turnover. *Biochemistry* 32 (23) 5925-5929.
- Redinbo, MR, Cascio, D, Choukair, MK, Rice, D, Merchant, S y Yeates, TO (1993) The 1.5-Å crystal structure of plastocyanin from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry* 32, 10560-10567.
- Redinbo, MR, Yeates, TO y Merchant, S (1994) Plastocyanin: structural and functional analysis. *J Bioenerg. Biomembr.* 26, 49-66.
- Rippka, R, Derruelles, J, Waterbury, J, Hedman, M y Stanier, R (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 11, 1-61.

Rögner, M, Nixon, PJ, y Dinner, BA (1990) Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 265, 6189-6196.

Romero, A, De la Cerda, B, Varela, PF, Navarro, JA, Hervás, M y De la Rosa, MA (1998) The 2,15 Å cristal structure of a triple mutant from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Mol. Biol.* 275, 327-336.

Sambrook, J, Fritsch, E y Maniatis, T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Sandmann, G (1986) Formation of plastocyanin and cytochrome *c*-553 in different species of blue-green algae. *Arch. Microbiol.* 145, 76-79.

Sanger, F, Nicklen, S y Coulson, A (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Segal, MG y Sykes, AG (1978) Kinetic studies on 1:1 electron-transfer reactions involving blue copper proteins. 1. Evidence for an unreactive form of the reduced protein (pH 5) and for protein-complex association in reactions of parsley (and spinach) plastocyanin. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 4585-4592.

Sherman, DM, Troyan, TA y Sherman, LA (1994) Localization of membrane proteins in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant Physiol.* 106, 251-262.

Siddarth, P y Marcus, RA (1993) Correlation between theory and experiment in electron-transfer reactions in proteins: electronic couplings in modified cytochrome *c* and myoglobin derivatives. *J. Phys. Chem.* 97, 13078-13082.

Sigfridsson, K, Hansson, Ö, Karlsson, BG, Baltzer, L, Nordling, M, y Lundberg, LG (1995) Spectroscopic and kinetic characterization of the spinach plastocyanin mutant Tyr83His: A histidine residue with a high pK value. *Biochim. Biophys. Acta* 1228: 28-36.

Sigfridsson K, Young S, Hansson O (1996) Structural dynamics in the plastocyanin-photosystem I electron-transfer complex as revealed by mutant studies. *Biochemistry* 35, 1249-1257.

- Sigfridsson, K (1998) Plastocyanin, an electron-transfer protein. *Photosynth. Res.* 57, 1-28.
- Sinclair-Day, JD, Sisley, MJ, Sykes, AG, King, GC y Wright, PE (1985) Acid dissociation constants for plastocyanin in the Cu^I state. *J Chem. Soc. Chem. Comm.* 1985, 505-507.
- Soriano, GM, Ponomarev, MV, Tae, G-S y Cramer, WA (1996) Effect of the interdomain basic region of cytochrome *f* on its redox reactions *in vivo*. *Biochemistry* 35, 14590-14598.
- Studier, FW y Moffat, BA (1987) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113.
- Sykes, AG (1985) Structure and electron-transfer reactivity of the blue copper protein plastocyanin. *Chem. Soc. Rev.* 14, 283-315.
- Szczepaniak, A, Black, MT y Cramer, WA (1989) Topography of the chloroplast cytochrome *b₆*: orientation of the cytochrome and accessibility of the lumen-side interhelix loops. *Z. Naturforsch.* 44c,453-461.
- Takabe, T, Niwa, S, Ishikawa, H y Takenaka, K (1980) Electron transfer reactions of cytochrome *f* from *Brassica komatsuna* with hexacianoferrate. *J. Biochem. Tokyo* 88, 1167-1176.
- Takabe, T, Ishikawa, H, Niwa, S y Itoh, S (1983) Electron transfer between plastocyanin and P700 in highly-purified photosystem I reaction center complex. Effects of pH, cations and subunit peptide composition. *J. Biochem.* 94, 1901-1911.
- Takabe, T, Takenaka, K, Kawamura, H y Beppu, Y (1986) Charges on proteins and distances of electron transfer in metalloprotein redox reactions. *J. Biochem. Tokyo* 99, 833-840.
- Ubbink, M, Ejdebäck, M, Karlsson, BG y Bendall D (1998) The structure of the complex of plastocyanin and cytochrome *f*, determined by paramagnetic NMR and restrained rigid-body molecular dynamics. *Structure* 6 (3) 323-335.
- Ullmann, GM, Knapp, E-W y Kostic, NM (1997) Computational simulation and analysis of dynamic association between plastocyanin and cytochrome *f*. Consequences for the electron-transfer reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 42-52.

Van der Lee, J, Bald, D, Kwa, SLS, Van Grondelle, R, Rögner, M y Dekker, JP (1993) Photosynth. Res. 35, 311-321.

Van der Plas, J, Bovy, A, Kruyt F, de Vrieze, G, Dassen, E, Klein, B y Weisbeek, P (1989) The gene for the precursor for plastocyanin from the cyanobacterium *Anabaena sp.* PCC 7937: Isolation, sequence and regulation. Mol. Microbiol. 3, 275-284.

Watkins, JA, Cusanovich, MA, Meyer, TE y Tollin, G (1994) A "parallel plate" electrostatic model for bimolecular rate constants applied to electron transfer proteins. Protein Sci. 3, 2104-2114.

Willey, DL, Auffret, AD y Gray, JC (1984) Structure and topology of cytochrome *f* in pea chloroplast membranes. Cell 36, 555-562.

Williams, RJP y Fráusto da Silva, JJR (1996) The natural selection of the chemical elements, Clarendon Press, Oxford, UK.

Wollman, F-A y Bennoun, P (1982) A new chlorophyll-protein complex related to photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochim. Biophys. Acta. 680, 353-360.

Wood, PM y Bendall, DS (1975) The kinetics and specificity of electron transfer from cytochromes and copper proteins to P700. Biochim. Biophys. Acta 387, 115-128.

Wynn, RM y Malkin, R (1988) Interaction of plastocyanin with photosystem I: a chemical cross-linking study of the polypeptide that binds plastocyanin. Biochemistry 27, 5863-5869.

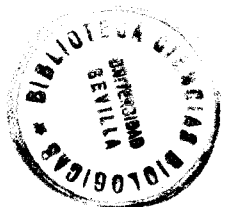
Wynn, RM, Omaha, J y Malkin, R (1989) Structural and functional properties of the cyanobacterial photosystem I complex. Biochemistry 28, 5554-5560.

Xu, Q, Jung, Y-S, Chitnis, VP, Guikema, JA, Golbeck, JH y Chitnis, PR (1994) Mutational analysis of photosystem I polypeptides in *Synechocystis sp.* PCC 6803. Subunit requirements for reduction of NADP⁺ mediated by ferredoxin and flavodoxin. J. Biol. Chem. 269, 21512-21518.

Zang, L, Pakrasi, HB y Withmarsh, J (1994) Photoautotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6806 in the absence of cytochrome *c-553* and plastocyanin. J. Biol. Chem. 269, 5036-5042.

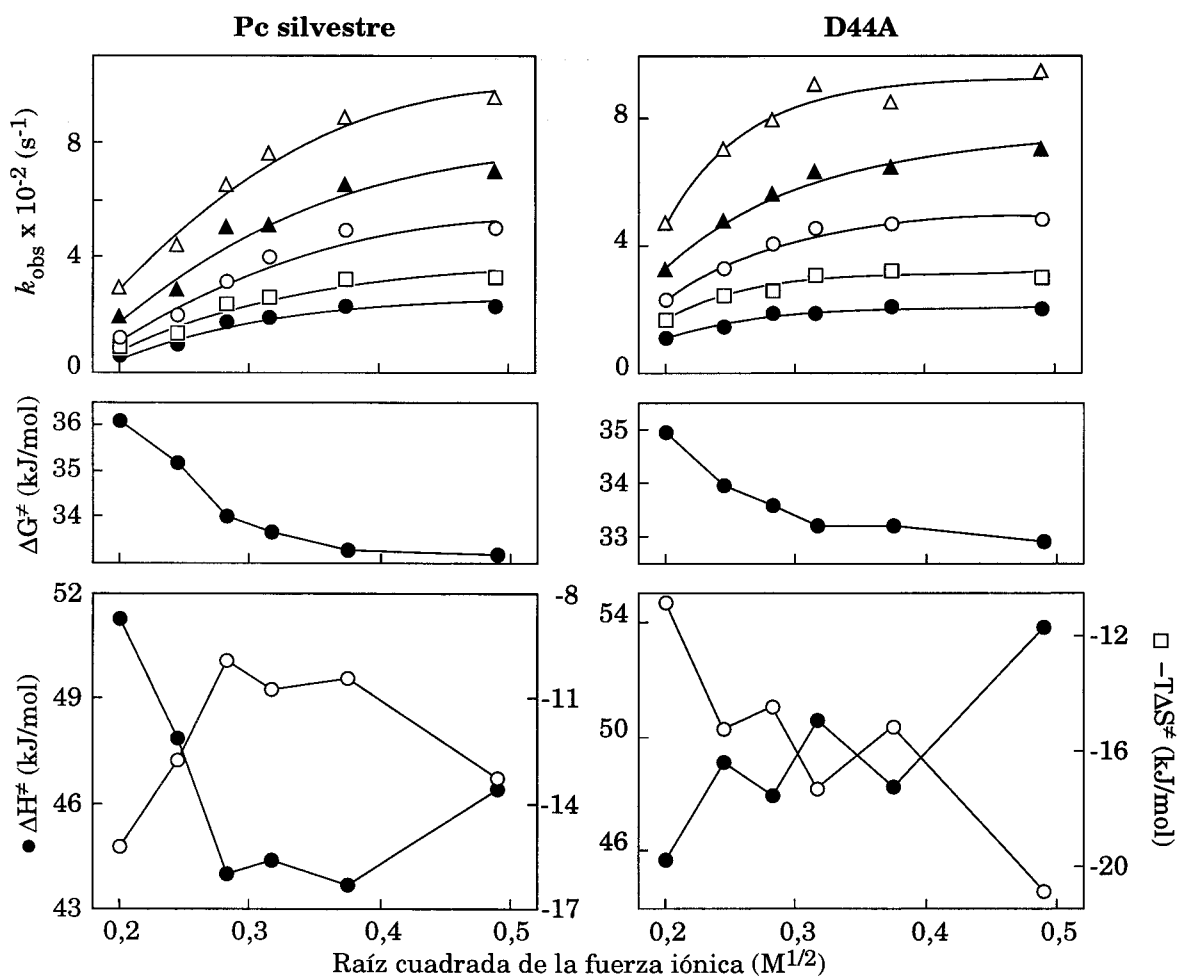
Zou, J, Fernández-Velasco, JG y Malkin, R (1996) N-terminal mutants of chloroplast cytochrome *f*. *J. Biol. Chem.* 271, 6225-6232.

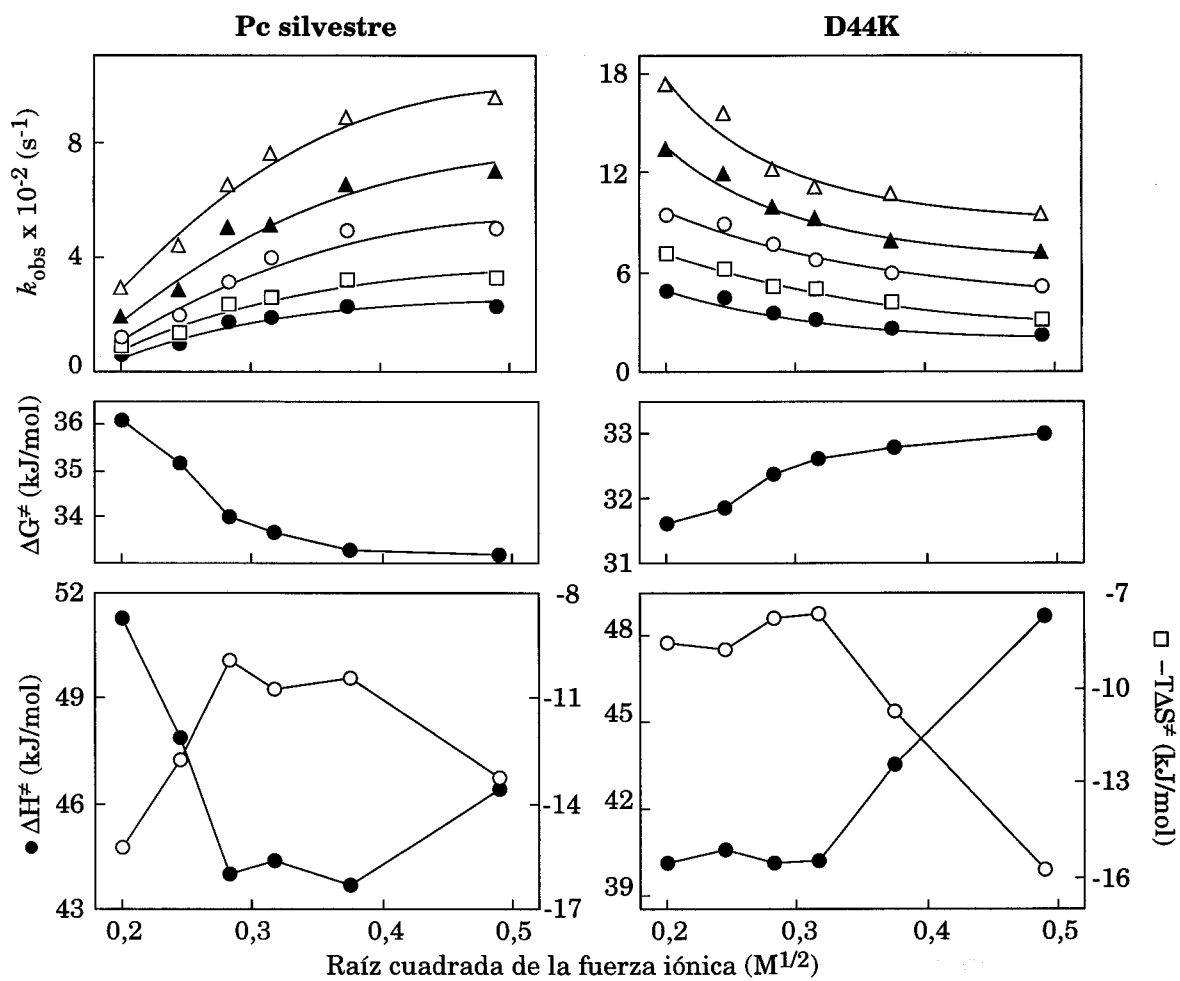
7. APÉNDICE

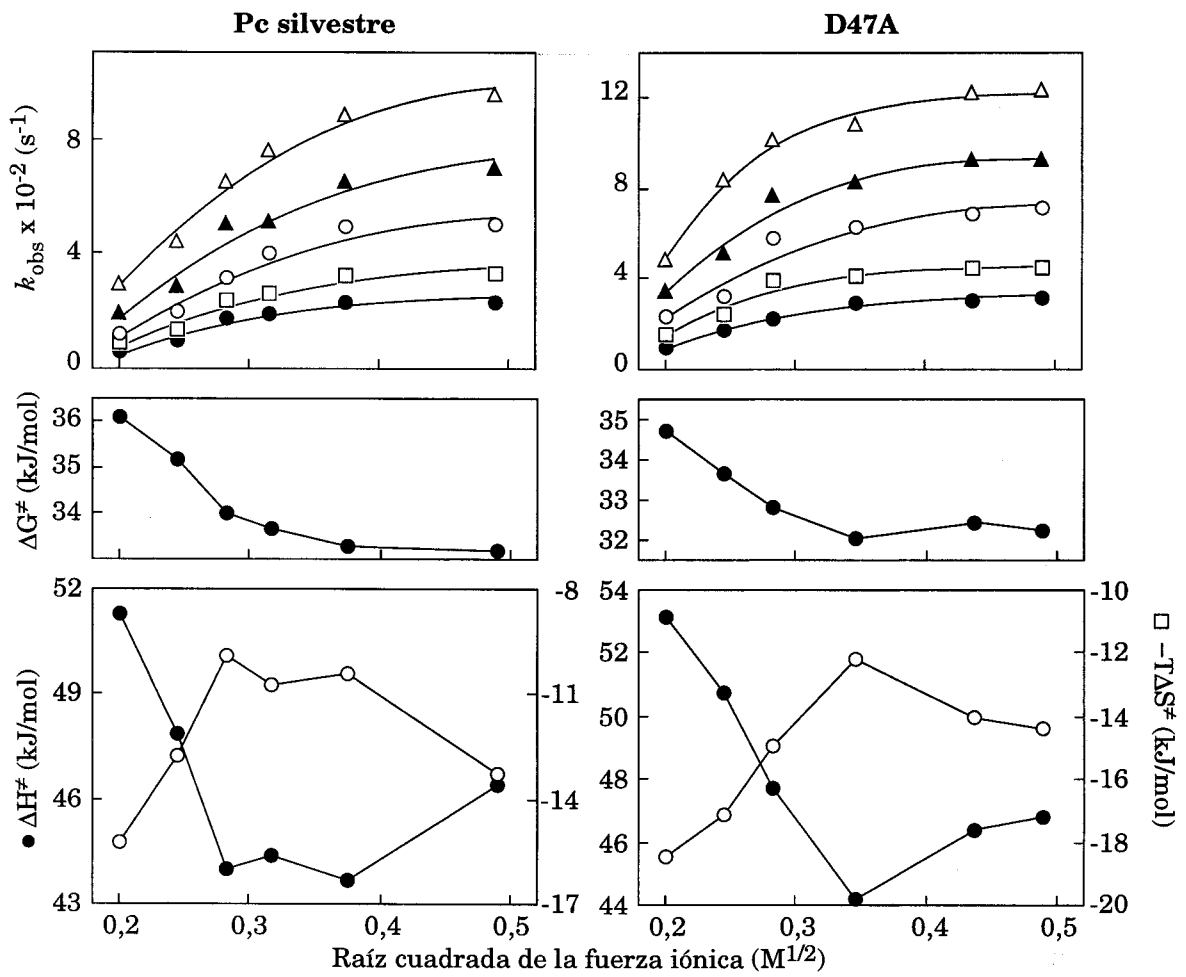


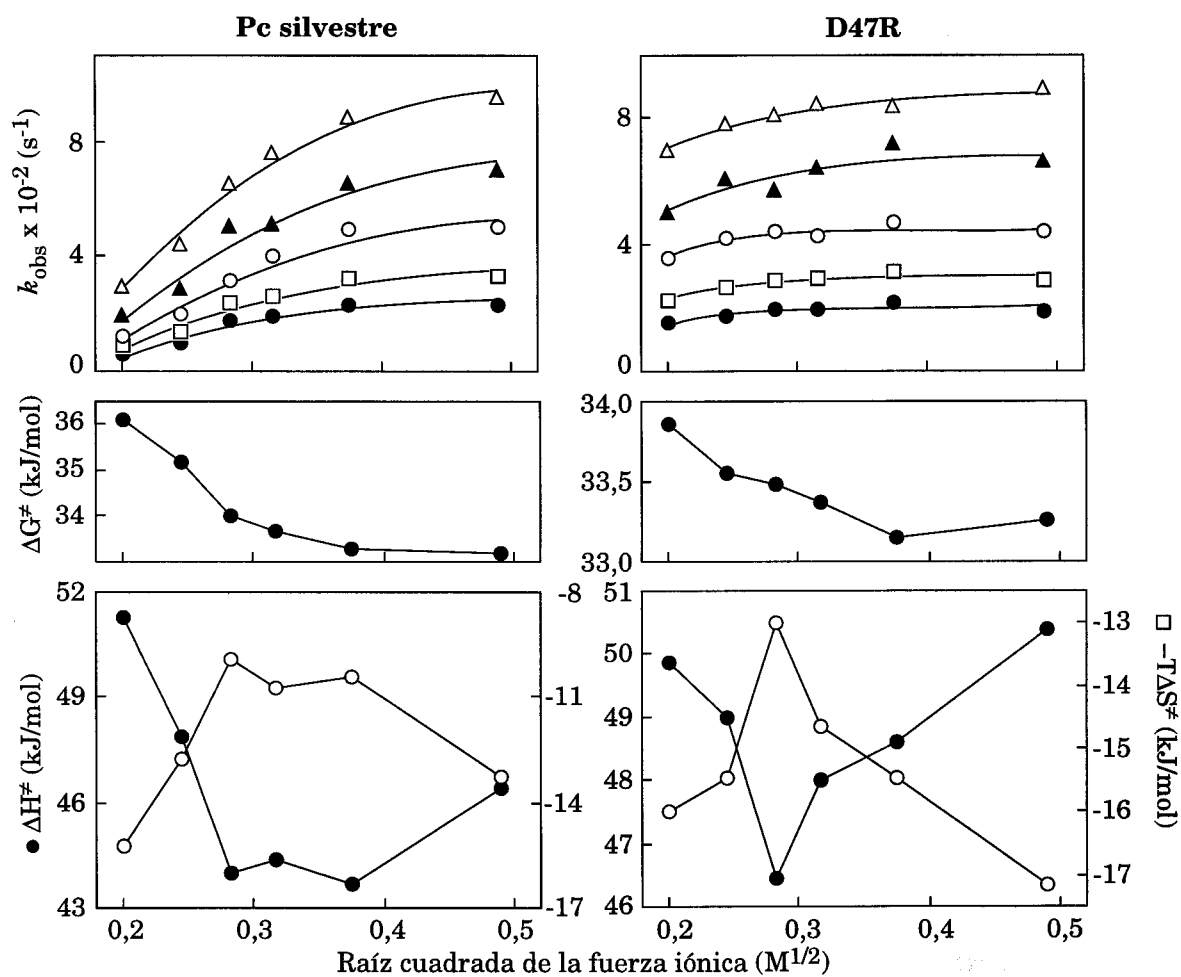
En las siguientes páginas se muestran los datos correspondientes a la dependencia de la reducción de PSI respecto a la fuerza iónica a diferentes temperaturas, así como el efecto de la fuerza iónica sobre los parámetros termodinámicos deducidos a partir de estos datos para cada uno de los mutantes de Pc y Cit. En cada página se relacionan los datos de cada mutante junto a los de la proteína silvestre, a efectos comparativos. Todos los datos se obtuvieron añadiendo NaCl a la mezcla de reacción para aumentar la fuerza iónica. Los datos equivalentes a los anteriores en los que el aumento de fuerza iónica se produjo con MgCl₂ no se presentan por ser muy similares a los datos con NaCl, excepto en los casos comentados en Resultados y Discusión.

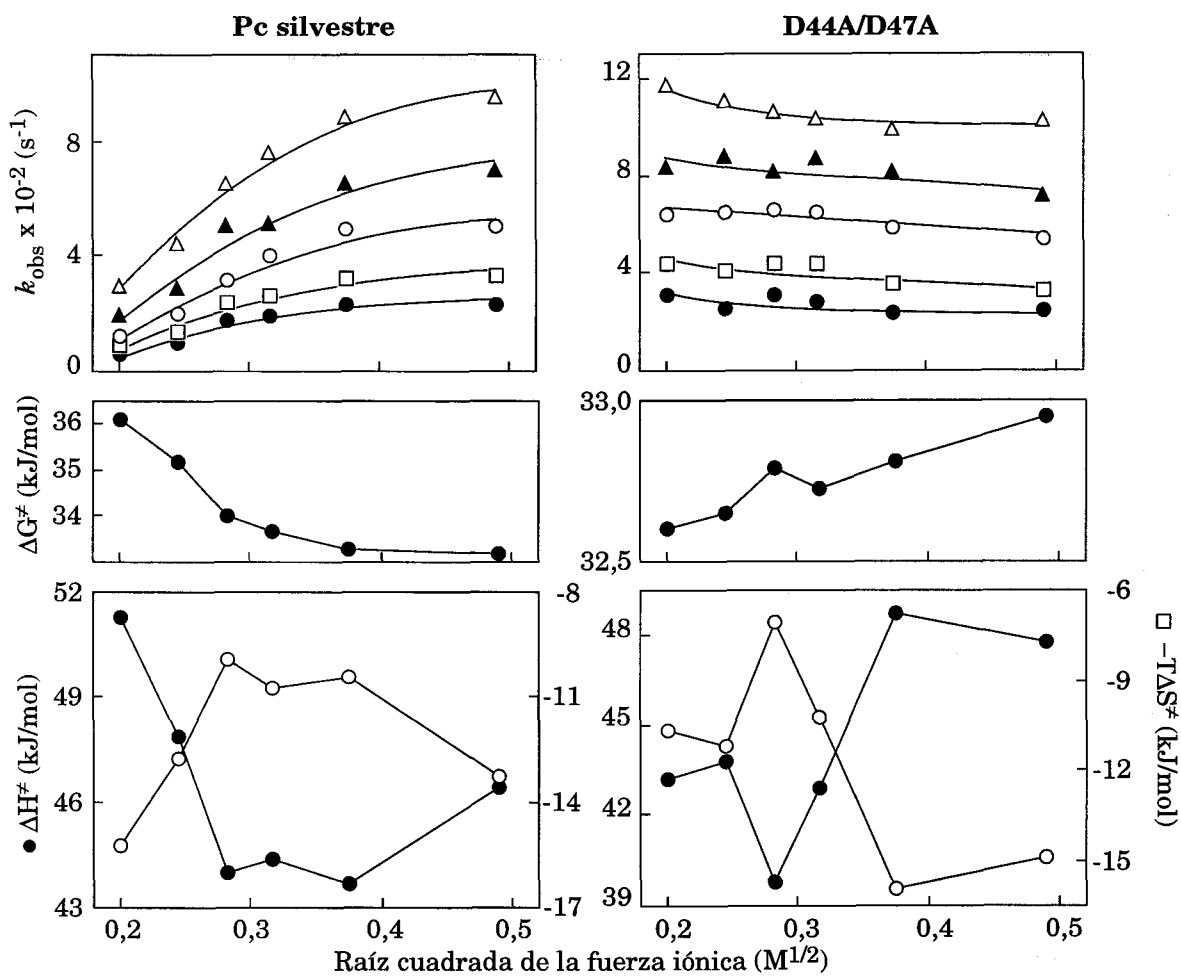
| Mutante | Página |
|--------------|--------|
| Pc D44A | 140 |
| Pc D44R | 141 |
| Pc D47A | 142 |
| Pc D44K | 143 |
| Pc D44A/D47A | 144 |
| Pc D44R/D47R | 145 |
| Pc L12A | 146 |
| Pc K33E | 147 |
| Cit F64A | 148 |
| Cit F64A | 149 |
| Cit R67D | 150 |
| Cit D70R | 153 |
| Cit D72R | 154 |

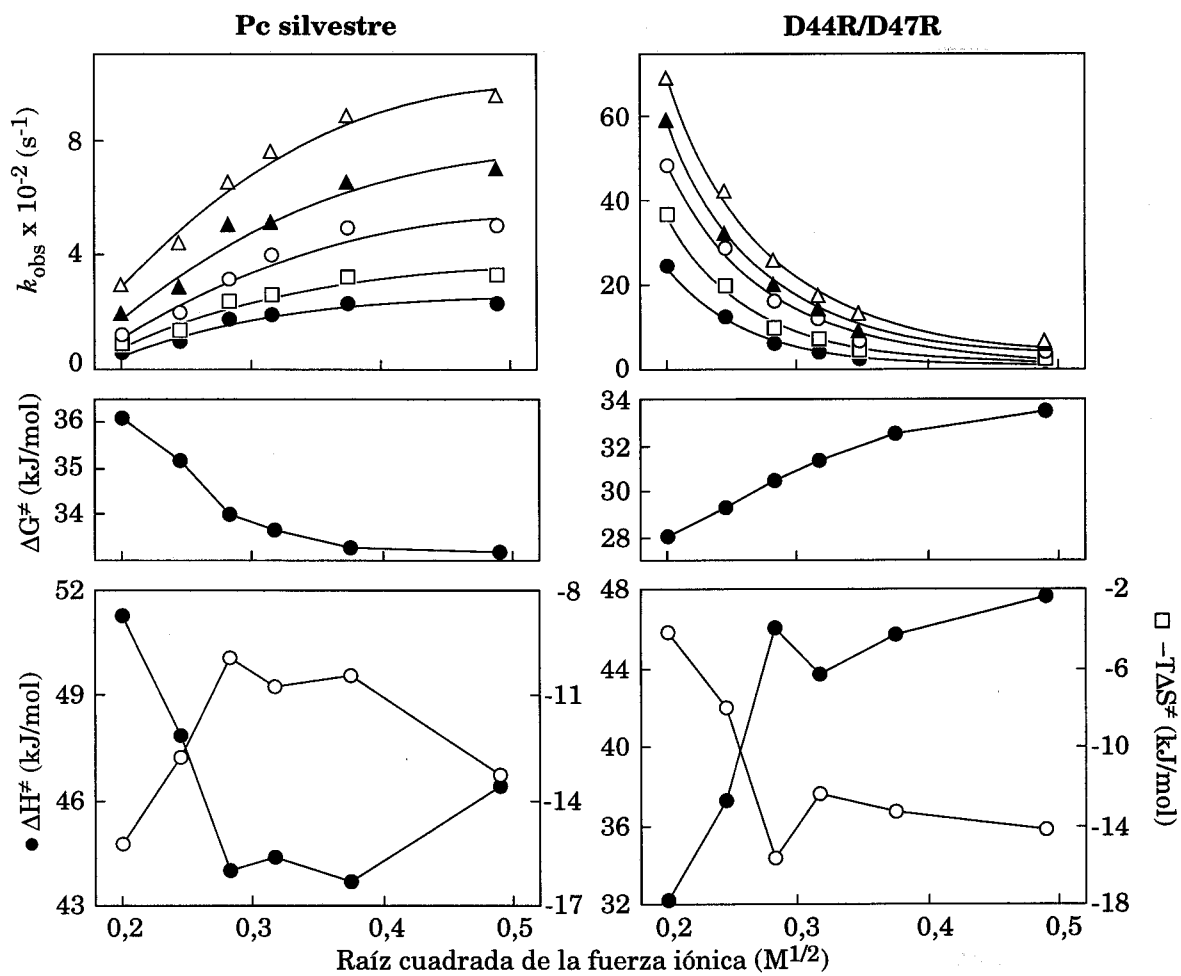


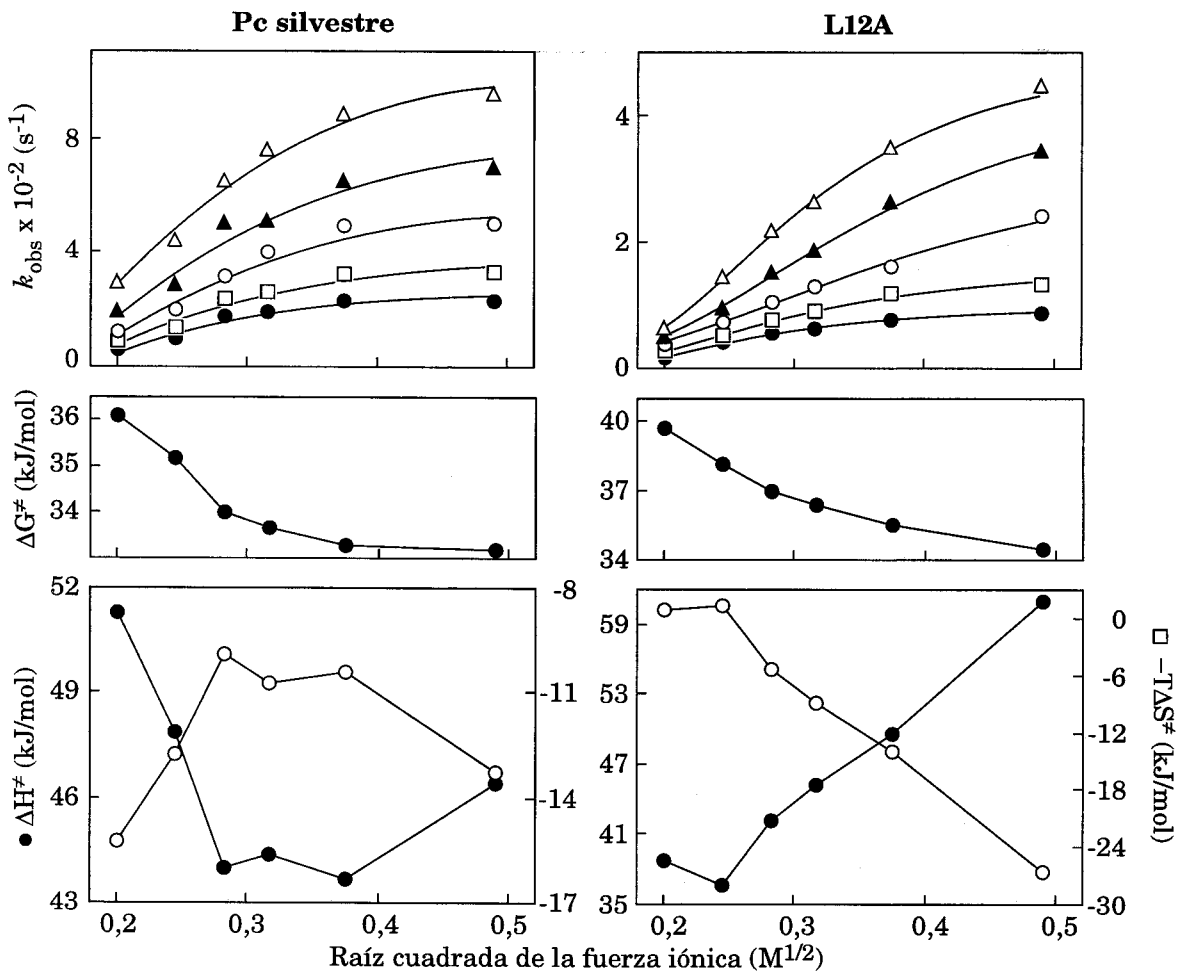


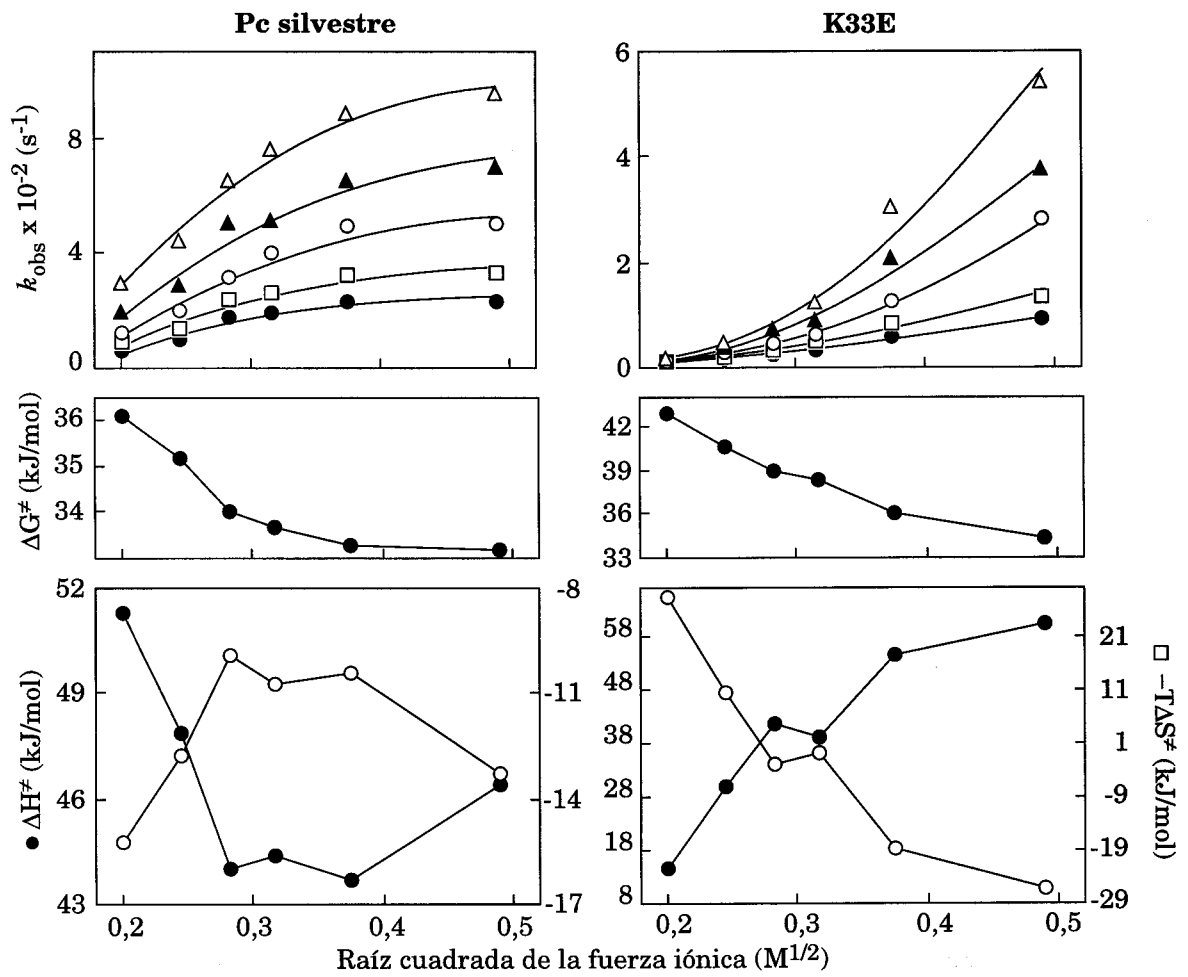


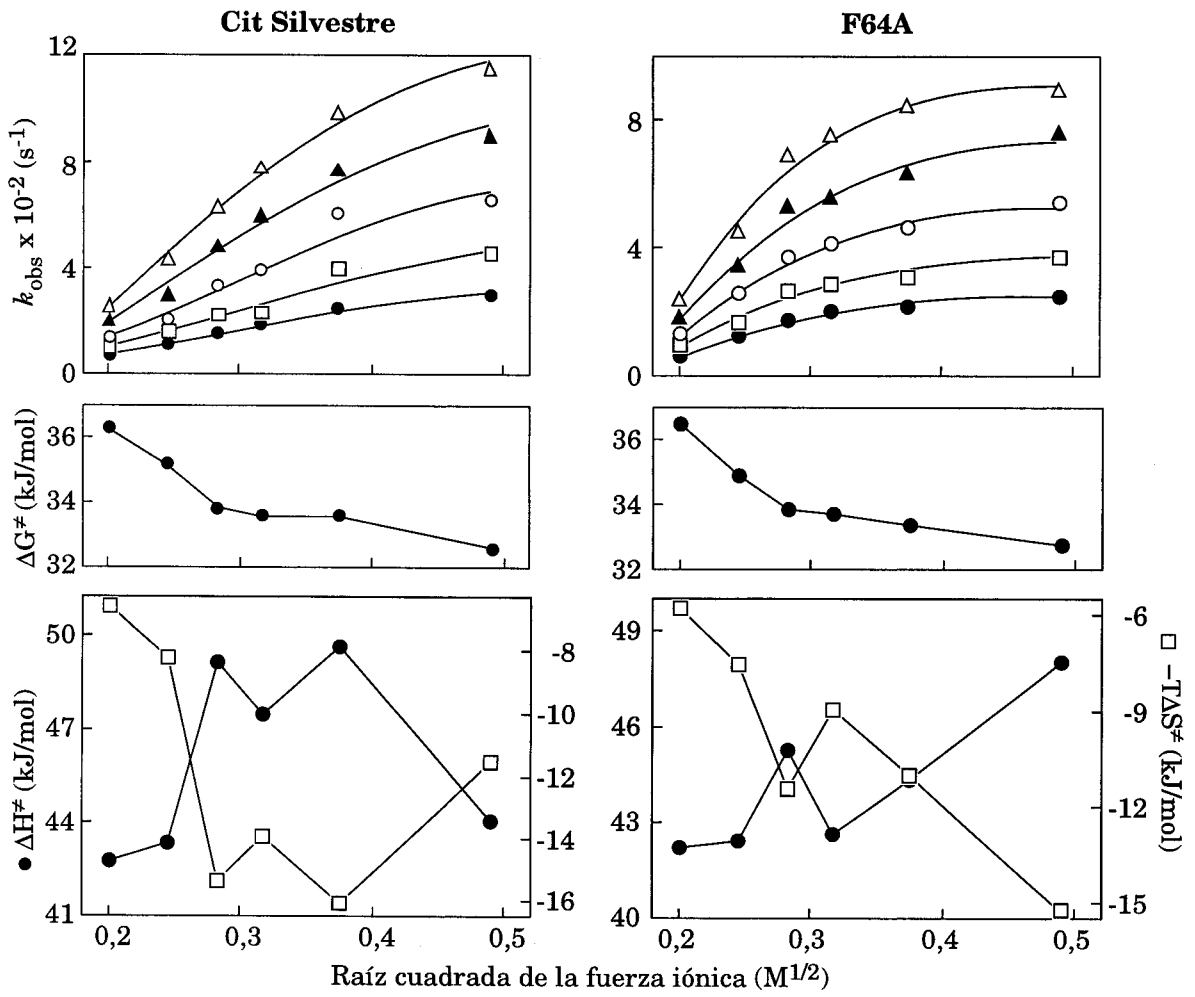


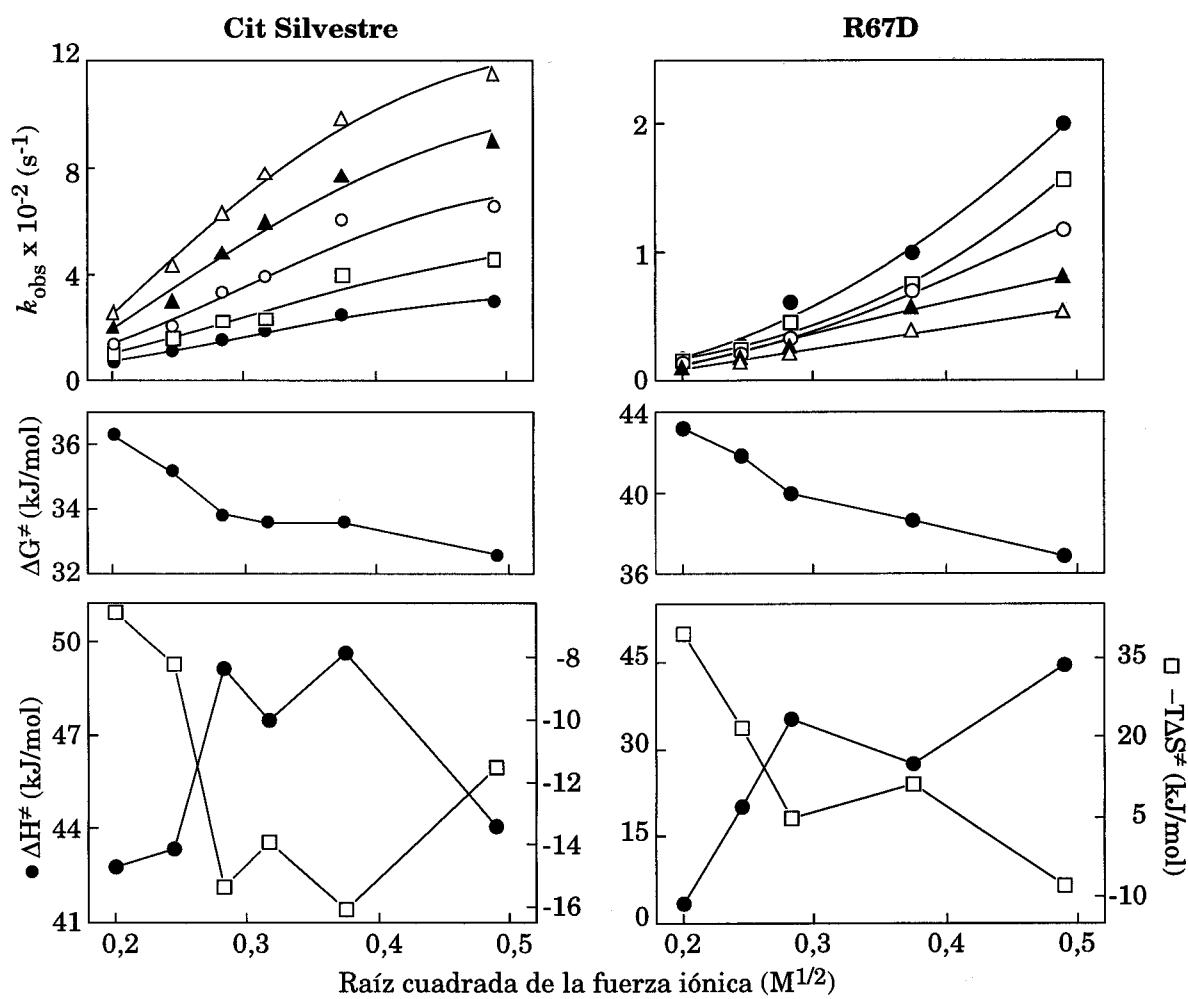


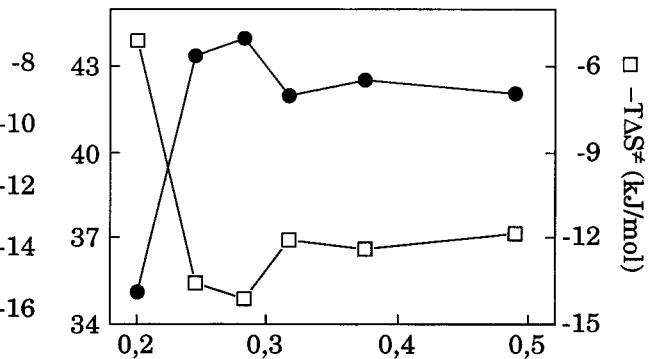
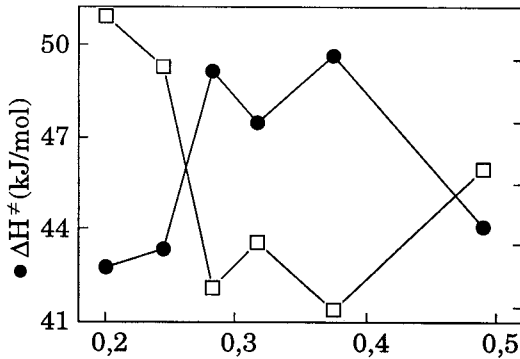
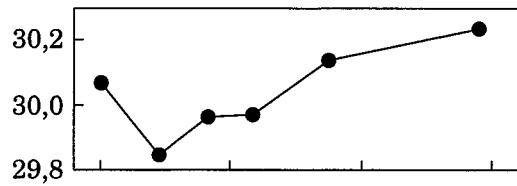
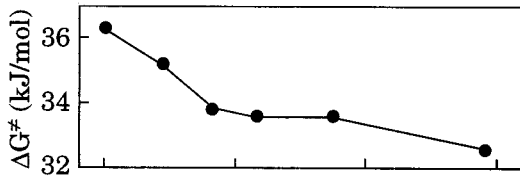
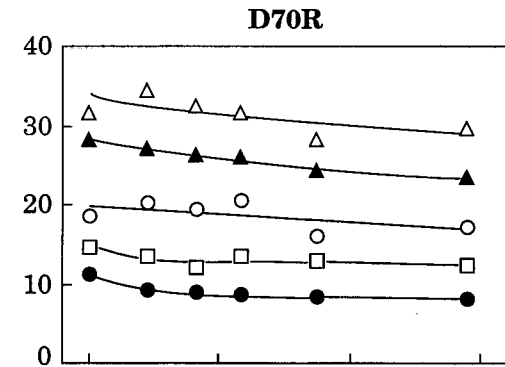
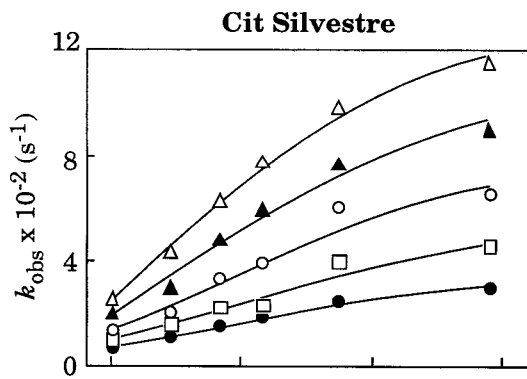




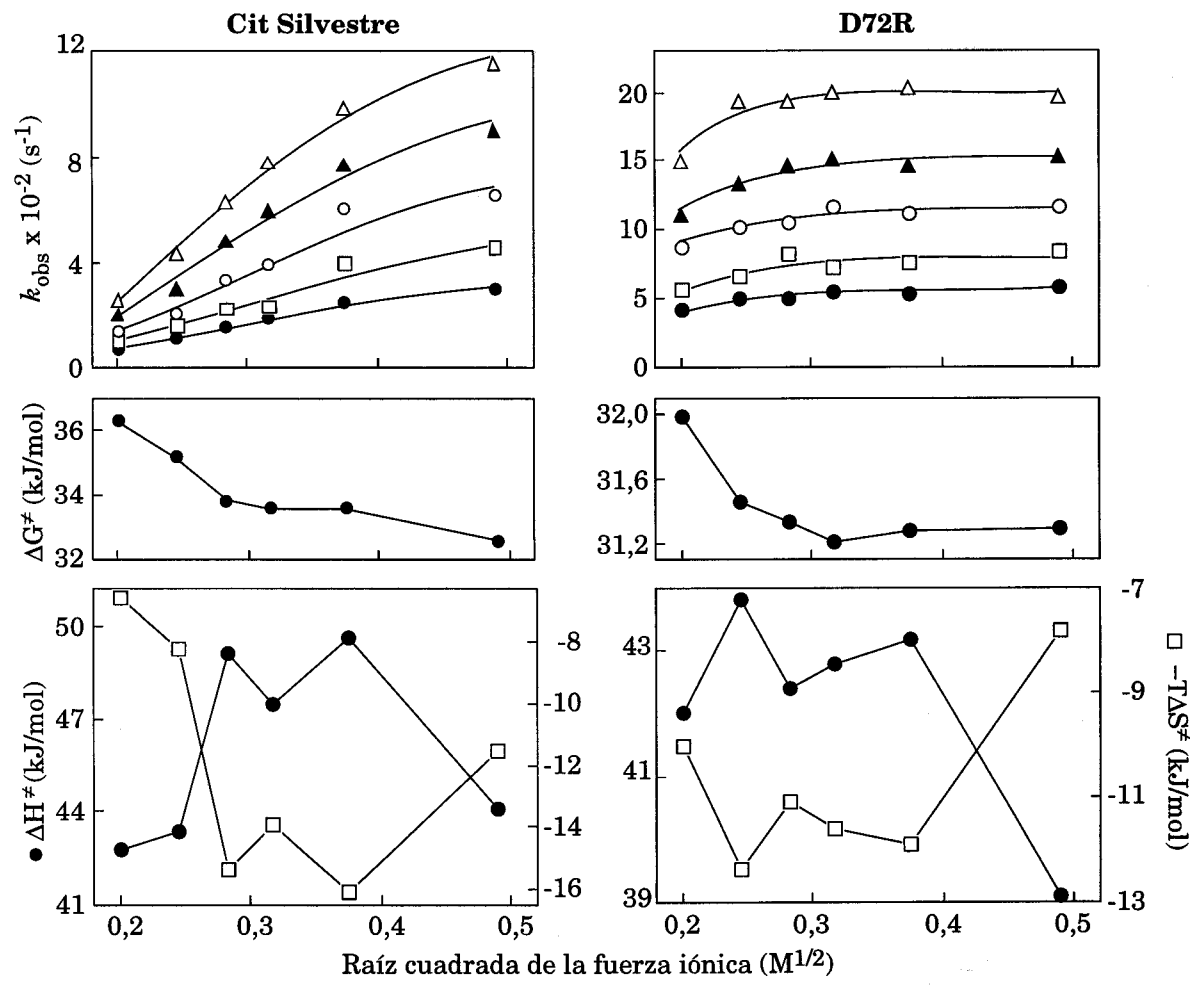








Raíz cuadrada de la fuerza iónica ($M^{1/2}$)



Reunión de la Comisión de Integración de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales en el día de la sesión, para juzgar el Tesis doctoral de D. BERTA DE LA CERDA HAYNES

titulada CITOCROMO C6 Y PLASTOCIANINA DE LA CIANOBACTERIA *Synalocystis* sp. 6803. ESTUDIO DE LA RELACION POR SU ESTRUCTURA-FUNCION EN LAS PROTEINAS NATIVAS Y MODIFICADAS DIRIGIDA

por el Dr. D. BERTA DE LA CERDA HAYNES. SOBRESALIENTE CON LAUDE (POR UNANIMIDAD)

Hecho en la ciudad de Buenos Aires, a los 7 días del mes de MAYO de 1999

El Vocal,

[Signature]

El Doctorado,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Secretario,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Doctorado,

[Signature]