

Que la presente Tesis Doctoral  
al folio 165 número 10 del libro  
correspondiente a  
Sevilla, \_\_\_\_\_

8 NOV. 1988

El Jefe del Negociado de Tesis,

*Manuel Losada*



CARACTERIZACION DEL CITOCROMO b-559 DE CLOROPLASTOS DE  
ESPINACA. LOCALIZACION Y FUNCION EN LA CADENA FOTOSINTETICA DE  
TRANSPORTE DE ELECTRONES

Trabajo presentado por el licenciado José María Ortega  
Rodríguez para optar al grado de Doctor en Biología

Sevilla, Noviembre de 1988

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
Deposito  
de la  
de esta Universidad  
hasta el día  
de 1988

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Dr Manuel Losada Villasant,  
Catedrático de Bioquímica y  
Biología Molecular

Dr Manuel Hervás Morón  
Profesor Titular de  
Bioquímica y Biología  
Molecular

T.D.  
169

T.D.  
169



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para  
que mi Tesis Doctoral Caracterización del ADN  
b-513 de cloroplastos de espinaca. Localización  
y función en la cadena fotosintética de transporte  
sea consultada, según la modalidad/es indicadas: de electrones

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

Firmado:

Sevilla, a 10 de Mayo de 1995

Jose M<sup>o</sup> ORTEGA

## INDICE

Abreviaturas y símbolos.....	1
I. <u>INTRODUCCION</u> .....	3
II. <u>MATERIALES Y METODOS</u> .....	45
II.A. <u>MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO. OBTENCIÓN DE CLORO- PLASTOS Y PARTICULAS DEL FOTOSISTEMA II</u> .....	46
II.A.1. Procedencia del material.....	46
II.A.2. Obtención de cloroplastos.....	46
II.A.2.1. Según el método de Arnon y Chain.....	46
II.A.2.2. Según el método de Singh y Wasserman.....	47
II.A.3. Obtención de partículas del fotosistema II.....	48
II.B. <u>MÉTODOS ANALÍTICOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES</u> .....	49
II.B.1. Determinación de clorofila.....	49
II.B.2. Determinación de proteína.....	49
II.B.3. Medida de las actividades fotosintéticas.....	49
II.B.4. Medidas espectrofotométricas.....	51
II.B.5. Medidas potenciométricas.....	54
II.B.6. Eliminación de pigmentos mediante extracción etanólica.....	55
II.B.7. Sonicación en presencia de Tritón y urea.....	55
II.B.8. Concentración mediante Sephadex G-25.....	56
II.B.9. Cromatografías.....	56
II.B.9.1. Cromatografía de intercambio iónico.....	56
II.B.9.2. Cromatografía de filtración en gel. Determinación de pesos moleculares.....	57
II.B.10. Electroforesis.....	58
II.B.10.1. Electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida.....	58
II.B.10.2. Electroforesis analítica en geles de poli- acrilamida conteniendo dodecil sulfato sód- ico. Determinación de pesos moleculares..	59
II.B.11. Incorporación del citocromo b-559 purificado en liposomas.....	61

II.C. REACTIVOS.....	61
III. <u>RESULTADOS</u> .....	63
III.A. <u>ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS EN CLO- ROPLASTOS Y PARTICULAS DEL FOTOSISTEMA II</u> .....	64
III.A.1. Cloroplastos.....	64
III.A.1.1. Actividades fotosintéticas.....	64
III.A.1.2. Efecto de diferentes agentes sobre las actividades fotosintéticas.....	66
III.A.1.2.1. Efecto del envejecimiento.....	66
III.A.1.2.2. Efecto de diferentes inhibidores del flujo electrónico.....	66
III.A.1.2.3. Efecto del CCCP.....	73
III.A.2. Partículas del fotosistema II.....	73
III.A.2.1. Actividades fotosintéticas.....	73
III.A.2.2. Efecto de diferentes agentes sobre las actividades fotosintéticas.....	76
III.A.2.2.1. Efecto del pH, temperatura y envejecimiento.....	76
III.A.2.2.2. Efecto de diferentes inhibidores del flujo electrónico.....	76
III.A.2.2.3. Efecto del CCCP.....	80
III.A.2.2.4. Efecto del Tritón X-100.....	80
III.B. <u>CARACTERIZACION REDOX Y ACIDO-BASE DEL CITOCROMO b-559 EN PARTICULAS DEL FOTOSISTEMA II</u> .....	80
III.B.1. Estado redox del citocromo b-559.....	83
III.B.2. Estudios potenciométricos del citocromo b-559...	85
III.B.2.1. Potenciales medios de óxido-reducción.....	85
III.B.2.2. Dependencia respecto al pH del potencial..	87
III.B.3. Efecto de diferentes agentes sobre la proporción de los pares de alto y bajo potencial del citocromo b-559.....	91
III.B.3.1. Efecto del pH, temperatura y envejeci- miento.....	91
III.B.3.2. Efecto del CCCP.....	96
III.B.3.3. Efecto del Tritón X-100.....	96

II.B.4. Regeneración de la forma oxidada de alto potencial del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II tratadas con detergente.....	100
III.C. <u>ESTUDIO DE LOS CAMBIOS REDOX INDUCIDOS POR LUCES SELECTIVAS DE LOS FOTOSISTEMAS I Y II EN LOS CITOCROMOS b-559 Y f EN CLOROPLASTOS Y b-559 EN PARTICULAS DEL FOTOSISTEMA II.....</u>	105
III.C.1. Cloroplastos.....	105
III.C.1.1. Fotorreacciones de los citocromos b-559 y f promovidas por luces de los fotosistemas I y II. Efecto del CCCP.....	105
III.C.1.2. Efecto de diferentes inhibidores del flujo electrónico sobre las fotorreacciones de los citocromos b-559 y f.....	116
III.C.1.2.1. Efecto del DCMU.....	116
III.C.1.2.1.1. Efecto sobre la fotorreducción por luz de 650 nm.....	116
III.C.1.2.1.2. Efecto sobre la fotooxidación por luz de 720 nm.....	116
III.C.1.2.1.3. Efecto del CCCP sobre la fotooxidación promovida por luz de 720 nm en presencia de DCMU....	119
III.C.1.2.2. Efecto del DBMIB.....	123
III.C.1.2.2.1. Efecto sobre la fotorreducción por luz de 650 nm.....	123
III.C.1.2.2.2. Efecto sobre la fotooxidación por luz de 720 nm.....	123
III.C.1.2.2.3. Efecto conjunto del DCMU y DBMIB sobre la fotooxidación promovida por luz de 720 nm....	127
III.C.1.2.3. Efecto del cianuro.....	127
III.C.1.2.4. Efecto de la polilisina.....	130
III.C.1.2.5. Efecto de la valinomicina.....	132
III.C.1.2.6. Efecto del TMPD.....	132

III.C.2. Partículas del fotosistema II.....	132
III.C.2.1. Fotorreacciones del citocromo b-559 promovidas por luz de 650 nm.....	132
III.C.2.2. Fotooxidación en presencia de CCCP.....	136
III.C.2.3. Efecto del DCMU y la hidroxilamina sobre la fotorreducción promovida por luz de 650 nm.....	140
III.D. <u>ESTUDIO COMPARATIVO DE ALGUNAS PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DEL CITOCROMO b-559 PURIFICADO DE CLOROPLASTOS Y DE PARTICULAS DEL FOTOSISTEMA II.....</u>	142
III.D.1. Método de purificación.....	142
III.D.1.1. Eliminación de pigmentos por extracción con etanol y solubilización del citocromo b-559.....	143
III.D.1.2. Eliminación de impurezas por cromatografía de intercambio iónico.....	145
III.D.1.3. Electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida.....	147
III.D.2. Análisis comparativo de algunas propiedades físico-químicas del citocromo b-559 purificado..	151
III.D.2.1. Espectros de absorción.....	151
III.D.2.2. Peso molecular determinado en condiciones no desnaturalizantes.....	153
III.D.2.3. Peso molecular determinado en condiciones desnaturalizantes.....	153
III.D.2.4. Potenciales medios de óxido-reducción.....	156
III.D.3. Regeneración del par de alto potencial mediante la incorporación en liposomas del citocromo b-559 purificado.....	160
IV. <u>DISCUSION</u> .....	163
V. <u>CONCLUSIONES</u> .....	195
VI. <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	198

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A	Absorbancia
ADP	Difosfato de adenosina
Asc	Ascorbato sódico
ATP	Trifosfato de adenosina
CCCP	Carbonilcianuro- <u>m</u> -clorofenil-hidrazona
DAD	2,3,5,6-tetrametil-p-fenilendiamina
DBMIB	Dibromotimoquinona
DCMU	3-(3',4'-Diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DEAE	Dietilaminoetil
Dit	Ditionito sódico
DPIP	2,6-Diclorofenol-indofenol
DTE	Ditioeritritol (2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbutano)
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
FCCP	p-Trifluorometoxi-carbonilcianuro-fenilhidrazona
Fd	Ferredoxina
Ferri	Ferricianuro potásico
g	Aceleración de la gravedad
HQ	Hidroquinona
KCN	Cianuro potásico
LDS	Dodecilsulfato de litio
MES	Acido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico
Mv	Metilviológeno (N,N' dimetil-4,4'-dipiridilo)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
PC	Plastocianina
Pi	Fosfato inorgánico
PES	Fenazina etosulfato
PMS	Fenazina metosulfato
PMSF	Fluoruro de fenil-metil sulfonilo
PQ	Plastoquinona
PTP	Potencial de transferencia de fosfato
SDS	Dodecilsulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TMPD	N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina

Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Val	Valinomicina
$\lambda$	longitud de onda

## **I. INTRODUCCION**

La fotosíntesis es un proceso bioquímico primario, único y fundamental, del que depende la vida en la Tierra; esencialmente consiste en la conversión por el reino vegetal de la energía luminosa que procede del sol en energía electrónica y subsiguientemente en energía química, que queda finalmente almacenada en la biomasa fotosintetizada y en el oxígeno liberado. Gracias a este proceso, las plantas verdes transforman, a expensa de la luz solar, los sustratos estables de que se alimentan en productos inestables ricos en energía.

Una gran variedad de organismos, tanto eucariotas como procariotas, poseen la capacidad de llevar a cabo el proceso fotosintético. Los eucariotas fotosintéticos comprenden no sólo las plantas verdes superiores, sino también formas inferiores, como son las algas pluricelulares y unicelulares verdes, rojas y pardas, así como las euglenales, dinoflageladas y diatomeas. Entre los procariotas, las cianobacterias y las bacterias púrpuras y verdes son organismos fotosintéticos.

Los demás organismos no fotosintéticos -que se alimentan directa o indirectamente de los fotosintéticos- transforman posteriormente, durante el proceso de la respiración, los sustratos ricos en energía formados por el reino vegetal en sus productos estables iniciales, a la par que aprovechan la energía liberada en la degradación oxidativa de los bioelementos reducidos para la síntesis de ATP.

Todos los organismos fotosintéticos, excepto las bacterias, utilizan el agua como donador inicial de electrones o de hidrógeno, desprendiendo como consecuencia oxígeno molecular. Las bacterias fotosintéticas utilizan en lugar de agua otros compuestos más reductores como donadores iniciales de electrones. Hoy está definitivamente establecido que sólo los organismos fotosintéticos (salvo las bacterias, como ya se ha expuesto) son capaces de fotoescindir el agua en hidrógeno y oxígeno, en tanto que todos los organismos aeróbicos pueden

transformar posteriormente, durante la respiración, la energía redox almacenada conjuntamente en estos elementos en energía química de enlace fosfato. El agua es, pues, tanto el sustrato primario de la fotosíntesis, como el producto final de la respiración aeróbica del hidrógeno. Los organismos fotoenergéticos y quimioenergéticos cierran así lo que puede considerarse como el ciclo básico del agua en bioenergética (Figura 1).

La realidad es, sin embargo, que ni la fotosíntesis termina normalmente con la fotólisis del agua en hidrógeno y oxígeno molecular ni la respiración se inicia siempre a partir de electrones a dicho nivel de potencial. De hecho, las células verdes no acumulan el poder reductor suministrado por la fotodescomposición del agua como hidrógeno molecular, sino que lo transfieren a través de transportadores de electrones adecuados -ferredoxina y piridín nucleótidos- a los bioelementos primordiales.

En el proceso fotosintético se reducen, pues, a expensas de la energía de la luz, con los electrones suministrados en último término por el agua, el carbono del dióxido de carbono a carbohidrato o hidrocarburo, el nitrógeno del nitrato o del nitrógeno molecular a amoníaco, y el azufre del sulfato a sulfuro, incorporándose todos ellos en material celular, mientras que el oxígeno del agua se oxida a oxígeno molecular y se libera como tal. La reducción fotosintética de estos bioelementos requiere no sólo poder reductor, sino, además, en la mayoría de los casos, energía química de enlace. Esta energía se genera, durante el proceso de fotofosforilación, por transducción de parte de la energía redox en energía ácido-base, y de ésta, a su vez, en energía de enlace fosfato. A diferencia del carbono, nitrógeno y azufre, el fósforo no cambia de valencia, sino que participa fundamentalmente en el proceso a modo de lanzadera, pasando de fosfato inorgánico estable a fosfato rico en energía.

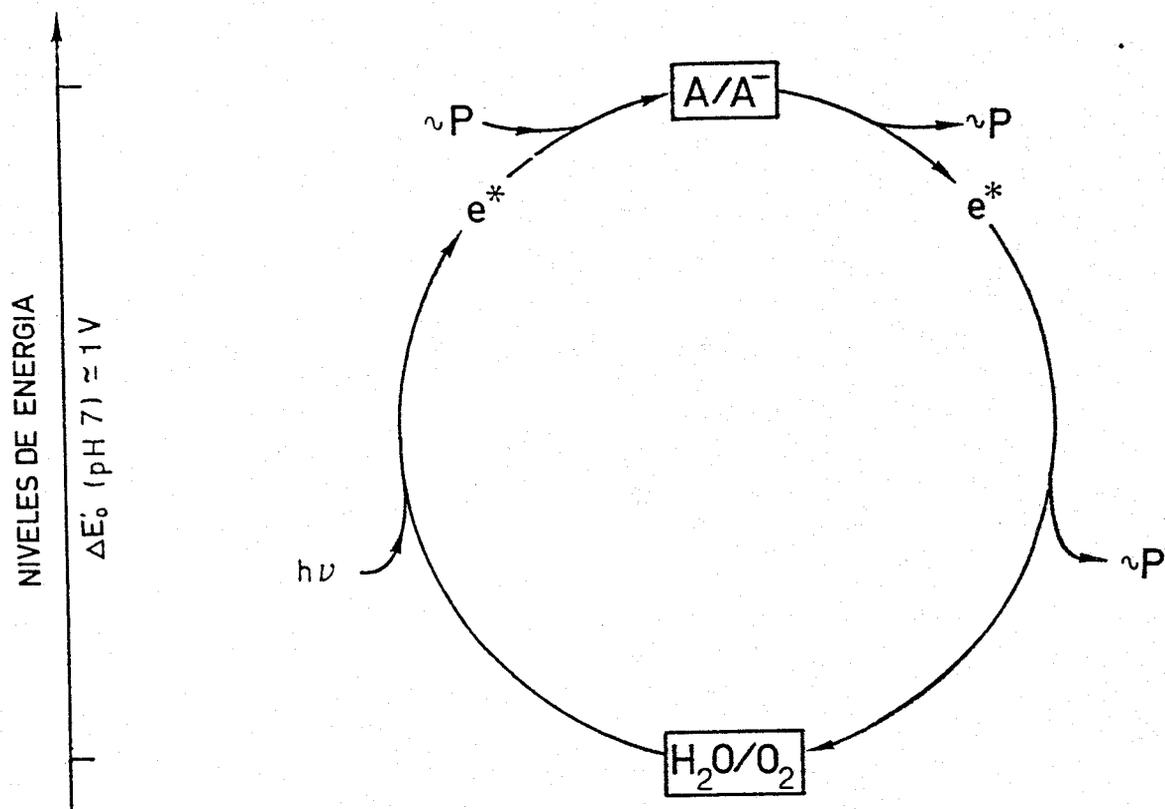


Figura 1. Ciclo del agua en bioenergética

Durante la fotosíntesis, los electrones procedentes de la oxidación del agua a oxígeno molecular son impulsados cuesta arriba, primero, a expensas de energía de la luz ( $h\nu$ ), durante la fase luminosa de la fotosíntesis, hasta el nivel de potencial del electrodo de hidrógeno ( $e^*$ ), y después, a expensas de la energía de enlace fosfato ( $\sim P$ ), hasta el nivel de potencial de los bioelementos primordiales. Posteriormente, durante la respiración, los electrones suministrados por los bioelementos reducidos ( $A^-$ ) caen cuesta abajo, primero hasta el nivel de potencial de los coenzimas redox durante los procesos disimilatorios propios del catabolismo ( $e^*$ ), y después, en cascada, hasta el oxígeno molecular, que se reduce a agua. La energía redox liberada durante las fases anaeróbica y aeróbica de la respiración se transduce eventualmente, a nivel de sustrato y de membrana, respectivamente, en energía de enlace fosfato ( $\sim P$ ).

En definitiva, se puede decir que, si bien la clorofila "per se" constituye un sistema simple que sólo permite la conversión de energía luminosa en energía redox, el proceso "in vivo", al promover la creación de un gradiente transmembranal de protones, conlleva, además, la transducción simultánea de la energía luminosa en energía ácido-base. El gradiente de protones generado por los fotosistemas clorofílicos a partir de la energía redox -en parte por liberación y fijación de protones durante la fotooxidación del agua y la reducción de los bioelementos y en parte por translocación de protones durante el flujo fotosintético de electrones- constituye la energía ácido-base que finalmente se transduce, a su vez, en energía de enlace fosfato durante la fotofosforilación, que consiste esencialmente en la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, catalizada por la ATP sintetasa. El mecanismo íntimo de la transducción de energía redox en ácido-base, y de ésta en energía de enlace fosfato, continúa siendo uno de los grandes enigmas de la bioenergética.

El aparato fotosintético de las células eucariotas se encuentra localizado en membranas especiales de los cloroplastos, llamadas tilacoides. Las cianobacterias y bacterias fotosintéticas carecen de cloroplastos, situándose sus sistemas fotosintéticos en la membrana celular o en estructuras especiales llamadas cromatóforos. Esta disposición del aparato fotosintético permite una separación eficiente de carga a ambos lados de la membrana y la creación del gradiente electroquímico de protones.

EL mayor avance conceptual en la investigación acerca de la organización y funcionamiento del aparato fotosintético fué la propuesta de la operación en serie de dos reacciones luminosas, el llamado esquema en Z, que tuvo sus orígenes en los experimentos realizados por Emerson (Emerson y Arnold, 1932), quién observó la diferente eficacia de dos tipos de luces para activar la fotosíntesis. El esquema en Z fué

inicialmente sugerido por Hill y Bendall (1960) y experimentalmente confirmado, independientemente y por varias vías, por Losada et al. (1961) y Duysens y Amez (1962). Estos últimos autores vieron que la luz roja de longitud de onda larga, que excita predominantemente a lo que ellos llamaron el fotosistema I, oxida al citocromo f, mientras que la luz roja de menor longitud de onda, que excita al fotosistema II, lo reduce.

Según el esquema más aceptado actualmente (Figura 2), el aparato fotosintético de las plantas verdes y cianobacterias oxida el agua y transfiere los electrones al  $\text{NADP}^+$ , con una ganancia neta de potencial fotoquímico de 1,13 eV (a pH 7), utilizando la energía de dos cuantos de luz por electrón. Las dos reacciones fotoquímicas primarias se producen en dos fotosistemas diferentes. Cada fotosistema está compuesto de un centro de reacción, donde tiene lugar la conversión primaria de energía, asociado a varios cientos de moléculas de pigmentos, clorofila y carotenoides, que funcionan como antena colectora de luz que transfiere la energía absorbida como energía electrónica de excitación a los centros de reacción.

Se conoce bastante bien la secuencia de transferencia de electrones en el fotosistema II (Van Gorkom, 1985; Mathis y Rutherford, 1987). El donador primario de electrones del fotosistema II, P-680 (una o dos moléculas de clorofila), transfiere un electrón en su estado excitado a una molécula de feofitina. El paso siguiente es la transferencia de un electrón desde la feofitina a un aceptor de un electrón tipo quinona,  $Q_A$ , asociado al complejo del fotosistema II.  $Q_A$  es reoxidado por un aceptor de dos electrones,  $Q_B$ , que ha sido identificado como una plastoquinona.  $Q_B$  reducido dona los electrones a un "pool" de quinonas, ya en la cadena principal de transporte de electrones que conecta ambos fotosistemas.

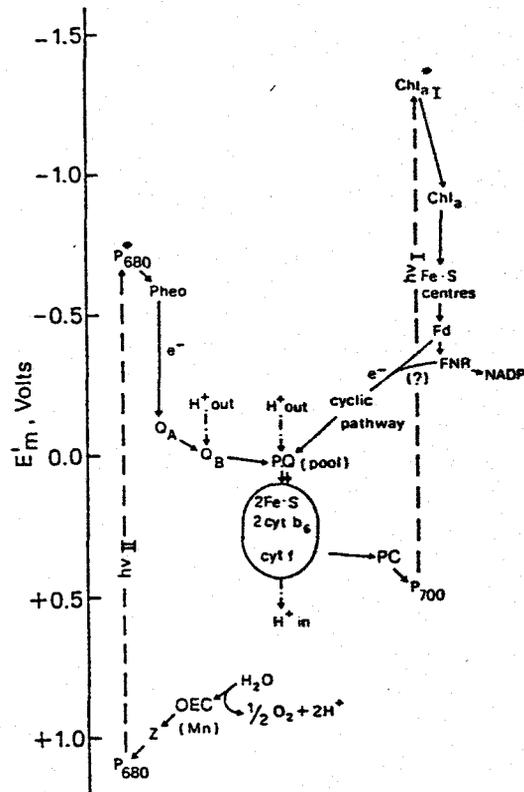


Figura 2. Esquema del transporte de electrones en la fotosíntesis oxigénica

Las flechas continuas (→) indican la dirección del transporte de electrones; (---→), transporte de protones a través de la membrana del tilacoide; (---), reacciones luminosas. Esquema de Forti (1987).

La oxidación de P-680 genera un fuerte oxidante,  $P-680^+$ , el cual oxida al donador del fotosistema II, Y ó Z, propuesto recientemente como una semiquinona asociada a una proteína (O'Malley y Babcock, 1984). En todo caso, se postula la existencia de algún otro intermediario a este nivel.  $Z^+$  oxida al complejo de rotura del agua, localizado en la cara interna de la membrana tilacoidal, que necesita acumular cuatro equivalentes de oxidación para romper el agua. La participación del manganeso en esta reacción no está aún perfectamente esclarecida.

La plastoquinona reducida transfiere los electrones al centro de reacción del fotosistema I a través de una cadena de transportadores, que parece incluir a un complejo que forman el citocromo f, el citocromo b-563 y un centro de hierro-azufre, y finalmente a la plastocianina, molécula soluble que se sitúa en el lumen del tilacoide y que es la responsable de reducir al centro de reacción del fotosistema I. La participación de los dos citocromos de tipo b que forman parte del aparato fotosintético, el citocromo b-563 y b-559, en esta secuencia del transporte no-cíclico de electrones está todavía en discusión.

El donador primario del fotosistema I es P-700, que al parecer consiste en un dímero de clorofila unido a una proteína del centro de reacción (Philipson et al., 1972). Los aceptores primarios de P-700 presentan grandes problemas de identificación. Actualmente se piensa que entre P-700 y los aceptores secundarios del fotosistema I existen dos transportadores de electrones,  $A_0$  y  $A_1$  (Sauer et al., 1978; Mathis et al., 1978).  $A_0$ , al parecer una clorofila, es el aceptor directo del fotosistema I, y transferiría los electrones a  $A_1$ , identificado, aunque de forma muy preliminar, como una quinona. Tras estos transportadores, y como aceptores secundarios del centro de reacción del fotosistema I, se han identificado tres centros sulfoferricos: Fa, Fb y Fx (Malkin y

Bearden, 1978). El aceptor estable del fotosistema I es la ferredoxina, que, una vez reducida, transfiere el electrón a la ferredoxina-NADP-reductasa (FNR), que cataliza la reacción de reducción del  $\text{NADP}^+$ , producto final de la cadena fotosintética no cíclica de transporte de electrones. La ferredoxina cataliza también el transporte cíclico de electrones alrededor del fotosistema I, reduciendo a un componente (posiblemente el citocromo b-563) de la cadena principal.

El esquema de Hill de dos fotorreacciones ha sido, sin embargo, discutido por diversos autores. La propuesta más relevante en este sentido es la realizada por Arnon y colaboradores (Knaff y Arnon, 1969b; Arnon, 1977; Arnon et al., 1981), que postulan la existencia de tres fotorreacciones en el aparato fotosintético. Según este esquema, el fotosistema II podría tener dos fotorreacciones diferentes con dos aceptores también diferentes, ferredoxina y  $\text{Q}_A$ . El fotosistema II, de esta forma, sería capaz de reducir directamente a la ferredoxina y subsecuentemente al  $\text{NADP}^+$ . La función del fotosistema I se limitaría a catalizar la fotofosforilación cíclica.

Aunque ya en los años cuarenta se sugirió un papel importante del ATP en la fotosíntesis, no fué hasta la siguiente década cuando se consiguió la primera demostración del proceso de fotofosforilación (Arnon et al., 1954). Se pudo comprobar que la formación de ATP estaba acoplada a dos tipos de reacciones dependientes del transporte electrónico inducido por luz: la fotofosforilación no-cíclica y cíclica.

El mecanismo de la fotofosforilación no se conoce, aunque la formulación de la teoría quimiosmótica de Mitchel (Boyer et al., 1977) estableció un modelo de acoplamiento a través de protones entre el transporte de electrones y la síntesis ATP. Según esta teoría, la energía necesaria para la síntesis de ATP es suministrada por la fuerza protonmotriz,

constituida por dos componentes: potencial de membrana y gradiente transmembranal de pH.

El modelo quimiosmótico adscribe los sitios transductores de energía tanto a las reacciones redox de la fotooxidación del agua como a las del transporte no-cíclico de electrones, que, de una manera u otra, liberan o introducen protones en el espacio intratilacoidal. Aunque el mecanismo de la transducción de energía redox en energía ácido-base durante el transporte no-cíclico y cíclico de electrones no está todavía establecido, se ha propuesto que las plastoquinonas o los citocromos b-559 y b-563 pueden actuar como sistemas redox vectoriales translocadores de protones.

En resumen, en el proceso fotosintético se realiza la conversión de la energía luminosa en energía redox, transduciéndose después parte de esta energía redox en energía ácido-base, y ésta, a su vez, en energía de enlace fosfato. La energía así generada se emplea en la asimilación fotosintética de los bioelementos primordiales.

#### Descubrimiento e investigaciones preliminares sobre el citocromo b-559

Los citocromos constituyen un amplio grupo de hemoproteínas que funcionan catalíticamente como transportadores de electrones en reacciones celulares asociadas a las principales rutas bioenergéticas de los organismos vivos, tales como la respiración y la fotosíntesis. Estos pigmentos celulares fueron observados por primera vez por MacMunn (1884-1886), pero fue Keilin (1925) el primero que los estudió e identificó, detectando que sufrían cambios espectrales reversibles en tejidos de animales y plantas y en bacterias. Este autor estableció la posible participación de estos pigmentos en reacciones de óxido-reducción de la respiración en una gran variedad de

especies animales y vegetales. Poco después se demostró la universalidad de estos pigmentos, al encontrarse en las partes verdes de las plantas (Hill y Scarisbrick, 1951). Los citocromos respiratorios están asociados a las membranas de mitocondrias y bacterias, y los citocromos fotosintéticos a las membranas de cloroplastos y de bacterias fotosintéticas (Lemberg y Barrett, 1973). Además, existen otros citocromos que se encuentran en solución en el citoplasma celular.

La capacidad de estos citocromos para transportar electrones reside en su grupo prostético, un hemo, que consiste en un átomo de hierro unido a un anillo tetrapirrólico (porfirina). El grupo hemo se une a la proteína a través de las posiciones quinta y sexta de coordinación del hierro y, en su caso, a través de la porfirina. La naturaleza de la porfirina y del resto proteico determinan el tipo de citocromo. La actuación de estas moléculas como transportadores de electrones se debe a que el hierro experimenta cambios reversibles entre sus formas oxidada y reducida. Estos cambios redox se acompañan de cambios de absorbancia característicos en tres bandas, que dependen del tipo de citocromo. La banda  $\alpha$  varía para los distintos tipos de citocromos entre 550 y 610 nm, la  $\beta$  entre 520 y 535 nm y la  $\gamma$  (Soret) entre 415 y 452 nm. El estado redox de un citocromo se puede determinar espectrofotométricamente por la magnitud de los picos exhibidos en las tres bandas. En su forma reducida, aparecen picos en las tres bandas, mientras que en la forma oxidada los picos  $\alpha$  y  $\beta$  desaparecen, y el pico  $\gamma$  disminuye en intensidad y se desplaza hacia la zona violeta del espectro.

Los citocromos se clasifican, por lo general, en base al máximo de absorción en su banda  $\alpha$ . Así, los citocromos denominados a absorben entre 565 y 610 nm; los citocromos b entre 556 y 565 nm y los citocromos c entre 550 y 555 nm.

El estudio de los citocromos se inició en sistemas respiratorios, siendo posterior su detección y análisis en sistema fotosintéticos. Los citocromos, así como el resto de los componentes de la cadena transportadora de electrones en la respiración, han sido extensamente estudiados (Chance et al., 1970; Wilson et al., 1972; Lemberg y Barrett, 1973); algunos, como los de tipo c, en tal medida, que se han podido hacer estudios evolutivos basados en la conservación de la estructura de esta proteína, que permanece extraordinariamente inalterada (Dickerson, 1980).

Los citocromos implicados en la cadena fotosintética de transporte de electrones han sido exhaustivamente estudiados (Bendall et al., 1971; Cramer, 1977; Cramer y Whitmarsh, 1977; Bendall, 1982), aunque, aún en la actualidad, algunos de los resultados son discutidos, sobre todo, en cuanto a la localización y función de estos componentes (Bendall, 1982). En cloroplastos existen menos especies de citocromos que en mitocondrias; en concreto tres: citocromo f (Hill y Scarisbrick, 1951; Davenport, 1952), citocromo b-563 (Davenport, 1952; Hill, 1954) y citocromo b-559 (Hill y Scarisbrick, 1951; Bendall y Hill, 1956).

Respecto a la función y localización de los citocromos fotosintéticos, parece clara la participación del citocromo f en los flujos no-cíclico y cíclico, y del b-563 en éste último (Cramer, 1977; Bendall, 1982); sin embargo, con respecto al citocromo b-559 no existe consenso en cuanto a su localización y función en la cadena de transporte electrónico. El hecho de que se presente, al igual que el citocromo b-566 de mitocondrias, en dos formas con distinto potencial ha llevado a sugerir su posible implicación en el sitio de transducción de energía durante la fosforilación no-cíclica (Cramer y Horton, 1975; Butler, 1978; Losada et al., 1983; Hervás et al., 1985).

Este controvertido citocromo fué identificado por primera vez por Hill y Scarisbrick (1951), quienes lo denominaron citocromo  $b_3$  (máximo de absorbancia en la banda  $\alpha$  a 559,7 nm), siguiendo la nomenclatura usada en la época para nombrar las hemoproteínas, que identificaba a los citocromos con números crecientes según el orden de descubrimiento. Esta nomenclatura se tornó imprecisa al ir surgiendo nuevos citocromos, por lo cual, a principios de los años setenta, el Comité para la Nomenclatura de los Citocromos de la Unión Internacional de Bioquímica recomendó designar a los citocromos de tipo b de acuerdo con la posición de su máximo en la banda  $\alpha$  en espectros diferenciales reducido menos oxidado a temperatura ambiente. Tal es el caso de los citocromos b-563 y b-559 de cloroplastos, antes nombrado  $b_6$  y  $b_3$ , respectivamente, o de los citocromos b-562 y b-566 de mitocondrias, antes  $b_K$  y  $b_T$ .

Bendall y Hill (1956) encontraron este nuevo componente en cloroplastos de guisante, pero fue Lundegardh (1961, 1962) quién aportó la evidencia espectrofotométrica más clara respecto a la existencia del citocromo b-559, al observar una banda de absorción característica a 559 nm en cloroplastos. La presencia de este citocromo en cloroplastos de diversas fuentes fué posteriormente confirmada por varios autores (Levine y Gorman, 1966; Cramer y Butler, 1967).

#### Propiedades redox y ácido-base del citocromo b-559

Uno de los hechos que más ha llamado la atención desde el principio acerca del citocromo b-559 ha sido su existencia en dos formas con distintos potenciales de óxido-reducción. La primera observación en este sentido fue hecha por Bendall (1968) en cloroplastos de guisantes, donde determinó la existencia de un citocromo b-559 con un potencial de + 370 mV, y un segundo citocromo tipo b con máximo en la banda  $\alpha$  de 559 nm no reducible por ascorbato y si por ditionito (con un

potencial de + 20 mV). Ikegami et al. (1968) detectaron en cloroplastos del alga verde Euglena gracilis un citocromo b-558 con un potencial de + 320 mV entre pH 6 y 9.

Cramer et al. (1971) detectaron las dos formas de potencial del citocromo b-559 en cloroplastos de espinaca y lechuga y definieron la forma de alto potencial por su reducibilidad por hidroquinona y la de bajo potencial por su reducibilidad por ditionito. Desde entonces, diversos autores han descrito los llamados citocromo b-559 de alto potencial y citocromo b-559 de bajo potencial en una gran variedad de organismos.

En cloroplastos de espinaca, Knaff y Arnon (1971) determinaron un potencial de + 325 mV a pH 8,2 para el citocromo b-559 de alto potencial; Boardman et al. (1971) obtuvieron, por su parte, un potencial de + 350 mV a pH 7,2; Knaff (1975), + 375 mV en el intervalo de pH 6,0 a 8,0, y Horton et al. (1976), + 395 mV a pH 7,8. Rich y Bendall (1980) determinaron un valor de potencial del citocromo b-559 en cloroplastos de lechuga de + 370 mV entre pH 6,0 y 8,0. Los experimentos realizados con cloroplastos de cebada proporcionaron resultados similares. En lo que respecta a la forma de bajo potencial del citocromo b-559, Fan y Cramer (1970) estimaron un potencial medio de + 40 mV, + 80 mV y + 120 mV, a pHs 6,0, 7,0 y 8,0, respectivamente, en cloroplastos de espinaca; mientras que, por el contrario, Rich y Bendall (1980) determinaron un valor constante de + 20 mV en el intervalo de pH 6,0 a 8,0 para este citocromo en cloroplastos de lechuga y cebada.

Knaff (1975) ha sugerido que el citocromo b-559 de alto potencial tendría un  $pK_a$  de 6,0 y que tomaría un protón por electrón por debajo de este  $pK_a$ , ya que el potencial medio observado era de + 375 mV por encima de pH 6,0, pero subía a 400 mV a pH 5,5. Estos resultados contradicen los de Horton y Cramer (1975b), que describieron una disminución del potencial

medio del citocromo b-559 de alto potencial en cloroplastos de espinaca a bajo pH. De acuerdo con Horton et al. (1976), este efecto se revierte subiendo el pH y es inhibido por DCMU. Estos autores obtienen unos valores de potencial de + 395 mV a pH 7,8; + 335 mV a pH 5,0 y + 380 mV a pH 5,0 y en presencia del herbicida. Más recientemente, nuestro grupo (Galván et al., 1983; Hervás et al., 1984 y Hervás et al., 1985) ha obtenido resultados que indican que el potencial medio del citocromo b-559 de alto potencial de cloroplastos de espinaca es independiente del pH en el intervalo de pH 6,5 a 8,5 ( $E'_{\circ}$ , + 340 mV), mientras que el potencial del citocromo b-559 de bajo potencial es independiente del pH por encima de 7,6 ( $E'_{\circ}$ , pH > 7,6, + 75 mV), variando el potencial por debajo de este valor de  $pK_a$  con una pendiente de -60 mV/unidad de pH.

La forma de alto potencial del citocromo b-559 es lábil. Tratamientos que alteran la estructura de la membrana, como el envejecimiento, la sonicación, el calentamiento, la incubación con tampón Tris o Tritón X-100, la adición de CCCP, la digestión con tripsina o el lavado con NaCl producen la conversión de esta forma en la de bajo (Cramer et al., 1971; Wada y Arnon, 1971; Cox y Bendall, 1972; Galván et al., 1983; Hervás et al., 1984; Hervás et al., 1985; Briantais et al., 1985; Ghanotakis et al., 1986). Esta transformación ha sido usualmente considerada como irreversible. La reversibilidad del cambio se ha descrito en cloroplastos de espinaca y guisante a los que se les extrae la plastoquinona con hexano y heptano, restaurándose la forma de alto potencial al añadir de nuevo plastoquinona (Okayama y Butler, 1972; Cox y Bendall, 1974). Muchos tratamientos que inhiben la oxidación del agua por el fotosistema II también causan un decrecimiento en el potencial medio del citocromo b-559; así, mientras que en preparaciones frescas predomina la forma de alto potencial, en preparaciones tratadas con diversos agentes que alteran este sistema predomina la forma de bajo potencial (Wada y Arnon, 1971; Cox y Bendall, 1972). El tratamiento con hidroxilamina y

luz de cloroplastos de guisante (Horton y Croze, 1977) produce una pérdida de Mn en el sistema de oxidación del agua, y, por tanto, una pérdida de actividad del fotosistema II, que es acompañada de un aumento de la forma de bajo potencial del citocromo b-559.

Las propiedades redox del citocromo b-559 han sido también caracterizadas por espectroscopía de resonancia paramagnética del electrón en membranas tilacoidales (Bergström y Vänngård, 1982), partículas del fotosistema II (Ghanotakis et al., 1986) y en la proteína purificada (Babcock et al., 1985). Se detectan dos señales, clasificadas como hemos de bajo spin, con valores de  $g_z$  de 2,94 y 3,08, que desaparecen por reducción y que se asignan a las formas oxidadas de alto y bajo potencial del citocromo b-559.

Se admite generalmente (Heber et al., 1979; Bendall, 1982; Tsujimoto y Arnon, 1985; Cramer et al., 1986; Rao et al., 1986; Barber et al., 1987; Bendall y Rolfe, 1987) que la forma de alto potencial del citocromo b-559 es la relevante desde el punto de vista fisiológico y que la forma de bajo potencial surge por la alteración de la de alto potencial, siendo por tanto una especie no fisiológica. La forma de alto potencial del citocromo está sin duda estrechamente asociada al fotosistema II y se localiza únicamente en las regiones apiladas de los cloroplastos que constituyen los granas. Algunos autores (Anderson y Boardman, 1973; Knaff y Malkin, 1973; Heber et al., 1979; Rich y Bendall, 1980; Bendall, 1982; Rao et al., 1986; Bendall y Rolfe, 1987) afirman que el cloroplasto contiene normalmente otra forma fisiológica de bajo potencial del citocromo b-559, que se encuentra asociada al fotosistema I y que posee un potencial medio menor que la forma de alto potencial alterada. De acuerdo con estos autores, cuando se fraccionan los cloroplastos con digitonina, el citocromo b-559 de alto potencial permanece asociado al fotosistema II, mientras que la especie fisiológica de bajo

potencial -que se localiza en las membranas tilacoidales no apiladas- aparece en el fotosistema I (Anderson y Boardman, 1973; Knaff y Malkin, 1973; Heber et al., 1979; Peters et al., 1983; Barber et al., 1987) o asociada al complejo  $b_6f$  (Anderson y Boardman, 1973; Wood y Bendall, 1976; Cox, 1979; Rich et al., 1980). Diversos autores apoyan la teoría de orígenes separados para las dos formas del citocromo b-559 en base, principalmente, a su aparente diversidad funcional, o por la diferente respuesta a tratamientos con detergentes o fraccionamientos mecánicos. La cuestión se complica por el hecho de que diversos autores han detectado un amplio intervalo de formas redox intermedias (Wasserman, 1980; Bendall, 1982; Matsuda y Butler, 1983a; Tsujimoto y Arnon, 1985; Cramer et al., 1986; Bendall y Rolfe, 1987). Nuestro grupo (Hervás et al., 1985) ha presentado recientemente resultados que sugieren que las formas de alto y bajo potencial son especies moleculares interconvertibles de la misma hemoproteína. Así, la conversión de la forma de alto potencial del citocromo b-559 en la de bajo proporciona un espectro que es la suma de los dos componentes existentes en los cloroplastos sin tratar. Esto ocurre cualquiera que sea el tratamiento utilizado para transformar la forma de alto potencial en la de bajo: sonicación, calentamiento, envejecimiento, etc. (Galván, 1981).

Matsuda y Butler (1983b) han conseguido revertir parte de la forma de bajo potencial del citocromo b-559 en la de alto por inclusión del citocromo purificado de cloroplastos de espinaca, que se encuentra exclusivamente en la forma de bajo potencial, en vesículas lipídicas formadas con lípidos de la membrana del cloroplasto. Después de la integración del citocromo b-559, los autores detectan una fracción de citocromo reducible por hidroquinona en los liposomas, lo que pone de manifiesto la existencia de la forma de alto potencial del citocromo b-559 y, por tanto, la interconversión entre ambas formas.

Lugar de actuación del citocromo b-559 durante el transporte electrónico fotosintético

Uno de los aspectos más estudiados, y a la vez más controvertidos, acerca del citocromo b-559 ha sido su localización y posible función en el aparato fotosintético. Las investigaciones sobre la localización de este citocromo en la cadena fotosintética de transporte de electrones se han llevado a cabo, básicamente, a través del estudio de los cambios de absorbancia inducidos por luces selectivas de los fotosistemas I y II en preparaciones frescas de cloroplastos de plantas superiores. En este campo se han obtenido resultados muy dispares.

Lundegardh (1965) analizó por primera vez desde el punto de vista espectroscópico los cambios de absorbancia inducidos por luz en el llamado citocromo  $b_3$ , concluyendo, en base a las modificaciones de las fotorreacciones producidas por la adición de DCMU, que este citocromo estaba implicado en el sistema de rotura del agua en el fotosistema II. En esta línea, Bendall y Sofrová (1971) propusieron que el citocromo b-559 de alto potencial podría tener una función específica como transportador de electrones en el sistema de rotura de agua. Esta teoría fué posteriormente desechada al no encontrarse correlación entre la pérdida de actividad del fotosistema II y la conversión del citocromo b-559 de alto potencial en una o más formas de bajo potencial (Cox y Bendall, 1972).

La reducción del citocromo b-559 por luz selectiva del fotosistema II y su oxidación por luz del fotosistema I ha sido puesta de manifiesto por numerosos autores en diferentes condiciones. Estas reacciones han sido observadas en presencia de pequeñas concentraciones de agentes no fisiológicos como FCCP (Cramer y Butler, 1967; Böhme y Cramer, 1971; Cramer et al., 1971) y PMS (Horton y Cramer, 1975a). También se han puesto de manifiesto en ausencia de agentes artificiales, por

ejemplo, acidificando el pH externo por debajo de 6,5 (Horton y Cramer, 1975b) y después de iluminar los cloroplastos con luz actínica de alta intensidad (Hind y Nakatani, 1970; Horton y Cramer, 1975a).

Knaff (1973) observó en fragmentos de Nostoc muscorum sin ninguna adición fotorreducción del citocromo b-559 por luz del fotosistema II y fotooxidación por luz del fotosistema I. Idénticos resultados obtuvieron Ben Hayyim y Avron (1970) en cloroplastos de lechuga. Satoh y Katoh (1972) mostraron que en cloroplastos de espinaca en condiciones fisiológicas, la única fotorreacción del citocromo b-559 era su reducción por el fotosistema II; tras la adición de DCMU desaparece la fotorreducción y aparece una fotooxidación del citocromo b-559 por el fotosistema II. Sin embargo, Anderson et al. (1973) no observaron cambios redox inducidos por luz en el citocromo b-559 en cloroplastos de espinaca no tratados. En presencia de CCCP o FCCP, el citocromo b-559 se fotooxidaba por luz de 665 nm y por luz roja de mayor longitud de onda, aunque era más efectiva la primera (Heber et al., 1979).

Numerosos autores han confirmado el bloqueo por DCMU de la fotorreducción del citocromo b-559 por luz del fotosistema II (Levine y Gorman, 1966; Cramer y Butler, 1967; Ben Hayyim y Avron, 1970; Anderson et al., 1973).

Los resultados obtenidos en cloroplastos tratados con DBMIB son contradictorios. Por una parte (Böhme y Cramer, 1971; Anderson et al., 1973) se ha observado que este agente produce la inhibición de la fotooxidación del citocromo b-559 inducida por el fotosistema I. Sin embargo, Knaff (1973) encontró que el DBMIB bloqueaba la fotorreducción del citocromo por el fotosistema II, no afectando a la fotooxidación inducida por el fotosistema I.

Uno de los problemas más importantes respecto a la actuación del citocromo b-559 en la cadena principal de transporte de electrones ha sido la cinética tan lenta de los cambios redox inducidos por luz en este citocromo, en contraste con las cinéticas de la plastoquinona y el citocromo f. Whitmarsh y Cramer (1977) realizaron un análisis cinético de estos cambios redox en cloroplastos bien acoplados, encontrando que el tiempo medio de reducción del citocromo b-559 por el fotosistema II era de 100 ms, mientras que para la reducción de la plastoquinona se obtenían valores de 6-10 ms. Este tiempo era del orden de 1/15 o 1/20 del tiempo mínimo determinado para el transporte de electrones entre plastoquinona y citocromo f, concluyendo estos autores, por tanto, que el citocromo b-559 en ningún caso podía funcionar en la cadena principal de transporte de electrones.

Un hecho muy importante, a este respecto, es la propuesta realizada por Hill y Bendall (1960) de la existencia de un sitio de fosforilación entre el citocromo b-559 y el f, basada inicialmente en la diferencia de potencial entre los dos citocromos. Los resultados de Rumberg (1965) y Cramer y Butler (1967) apoyan la idea de que el transporte de electrones entre ambos citocromos es un paso lento que limita el transporte general. El desacoplante CCCP, aunque no el amonio, aceleran este paso (Cramer y Butler, 1967; Hildreth, 1968). Larkum y Bonner (1972) compararon el efecto del CCCP sobre la fotooxidación del citocromo b-559 por el fotosistema I con el efecto de otros agentes desacoplantes, sugiriendo que, además de su acción primaria como desacoplante, el CCCP produce otros efectos. Ben Hayyin y Avron (1970) observaron que en presencia de agentes desacoplantes o fotofosforilantes ( $Mg^{++}$ ,  $P_i$ , ADP) y luz, el equilibrio redox de los citocromos b-559 y f cambiaba hacia un mayor nivel de reducción, lo cual sugería la localización de un sitio de fosforilación antes de ambos citocromos. Sin embargo, Knaff (1973) encontró que en presencia de ADP y luz, sólo el nivel de reducción del citocromo f aumentaba, no

afectándose el equilibrio redox del citocromo b-559, concluyendo, por tanto, que el sitio de fosforilación estaba entre ambos citocromos.

Whitmarsh y Cramer (1978) compararon el efecto de la gramicidina sobre la fotorreducción de los citocromos b-559 y f por el fotosistema II, concluyendo que el citocromo b-559 compite con el f por los electrones del "pool" de plastoquinona. Este desacoplante aceleraba la reducción del citocromo f y de los donadores del fotosistema I y aumentaba el tiempo medio de reducción del citocromo b-559 a más de 200 ms, respecto a 100 ms en cloroplastos bien acoplados. Estos experimentos llevaron a los autores a proponer un modelo de rama lateral de transferencia de electrones respecto a la cadena principal donde intervendría el citocromo b-559 de alto potencial.

La implicación del citocromo b-559 en un ciclo alrededor del fotosistema II ha sido sugerida por varios autores (Boardman et al., 1971; Cramer y Böhme, 1972) en base a la fotooxidación del citocromo por el fotosistema II observada a temperaturas criogénicas (Knaff y Arnon, 1969; Bendall y Sofrová, 1971; Erixon y Butler, 1971a y b; Aparicio et al., 1974) o después del tratamiento con Tris (Knaff y Arnon, 1969). En este sentido apuntaba la correlación detectada por Cramer y Böhme (1972) entre el aumento de fluorescencia de la clorofila y la disminución de la forma de alto potencial en cloroplastos tratados con hidroxilamina, FCCP o antimicina A. El problema fundamental de esta vía, en términos de su posible función fisiológica, es que se trata de un paso muy lento. De hecho, no se ha observado oxidación significativa del citocromo b-559 por el fotosistema II en cloroplastos con un sistema de rotura del agua completamente funcional. Además, no parece existir correlación entre las altas concentraciones o tiempos de incubación necesarios para que los llamados agentes ADRY, CCCP o FCCP, bloqueen el sistema de

rotura del agua y las necesarias para observar la aceleración de la oxidación del citocromo b-559 por el fotosistema I (Cramer et al., 1979).

### El citocromo b-559 en partículas del fotosistema II

A comienzos de los años setenta, varios autores obtuvieron, mediante el tratamiento de cloroplastos de espinaca con Tritón X-100 o digitonina, preparaciones de partículas del fotosistema II. Estas partículas presentaban una actividad fotoquímica muy baja con agua como donador de electrones, lo cual inducía a pensar que en ellas el sistema de rotura estaba muy alterado. En estas partículas está comúnmente aceptado que sólo aparece un tipo de citocromo, el citocromo b-559, en su forma de bajo potencial, no apareciendo en ningún caso ni el citocromo b-563 ni el citocromo f. Hind y Nakatani (1970) determinaron en estas preparaciones un potencial redox estándar para el citocromo b-559 de + 55 mV a pH 7 y Ke et al. (1972), de + 58 mV a pH 7. Sin embargo, los resultados son contradictorios en lo referente a las fotorreacciones de este citocromo en partículas del fotosistema II. Ke et al. (1972) observaron una fotorreducción reversible del citocromo b-559 a temperatura ambiente, que no era bloqueada por DCMU. Sin embargo, Wessels et al. (1973) detectaron una ligera oxidación del citocromo b-559 a temperatura ambiente. Diversos autores (Boardman, 1972; Wessels et al., 1973) han observado la fotooxidación del citocromo b-559 a la temperatura del nitrógeno líquido en partículas del fotosistema II. Ke et al. (1972), sin embargo, no observan esta reacción. En los fragmentos de fotosistema II preparados por Arnon et al. (1970) y Huzisige y Takimoto (1974), el citocromo b-559 se fotooxida a temperatura ambiente tras la adición de plastocianina, bloqueándose la reacción por DCMU (Knaff y Arnon, 1969c).

A comienzos de los años ochenta, Berthold et al. (1981) y Kuwabara y Murata (1982) describieron un método de aislamiento de partículas del fotosistema II, mediante el tratamiento de las membranas tilacoidales de espinaca con Tritón X-100, que desprendían oxígeno. Estas preparaciones presentan altas tasas de desprendimiento de oxígeno y están libres de fotosistema I y del complejo  $b_6f$ , conteniendo cantidades variables de citocromo b-559 (alrededor de 2 moléculas por centro de reacción) en sus formas de alto y bajo potencial. Una propiedad interesante de las partículas del fotosistema II extraídas según el método de Kuwabara y Murata es la gran estabilidad que muestra el sistema de rotura del agua, lo que contrasta notablemente con la labilidad del sistema en tilacoides. Sin embargo, en este tipo de partículas no se ha realizado un estudio detallado ni de las propiedades redox y ácido-base ni de las fotorreacciones del citocromo b-559. En este sentido, sólo existe una pequeña mención de Lam et al. (1983), que observaron fotooxidación del citocromo b-559 y de Ghanotakis et al. (1984), que no detectan cambios redox inducidos por luz.

Recientemente, Yamada et al. (1987) y Nanba y Satoh (1987) han demostrado que el citocromo b-559 se encuentra estructuralmente asociado al centro de reacción del fotosistema II. Nanba y Satoh (1987) han purificado el centro de reacción del fotosistema II, conteniendo únicamente los polipéptidos D1 y D2 y el citocromo b-559 (dos polipéptidos, de 9 y 4,5 kDa), y que tiene la capacidad de acumulación fotoquímica reversible de feofitina reducida. Barber et al. (1987) han extraído el citocromo b-559 del complejo D1/D2, postulando que la unidad mínima del centro de reacción del fotosistema II la constituye el heterodímero D1/D2, al que están asociadas moléculas de clorofila y feofitina.

Según los últimos esquemas propuestos (Barber, 1987; Mathis y Rutherford, 1987), el complejo del fotosistema II

estaría constituido por un grupo de polipéptidos estructurales -a los que parecen estar asociados el centro de reacción y los aceptores primarios del fotosistema II-, clorofilas antena, el sistema de rotura del agua y dos moléculas de citocromo b-559 (Figura 3).

El sistema de rotura del agua lo forman tres proteínas solubles de 33, 23 y 17 kDa, la primera de las cuales parece tener un papel importante en la estabilización del manganeso (Babcock, 1987). Las subunidades mayores, que forman el núcleo del fotosistema II, son dos polipéptidos, asociados a la antena de clorofila, de 47 y 43 kDa. Dos polipéptidos de 32 kDa (D1 y D2) parecen ser los componentes fundamentales del centro de reacción del fotosistema II. D1 es el sitio de unión del aceptor primario  $Q_B$ . El núcleo contiene además varios pigmentos asociados a membranas (feofitina, clorofila del centro de reacción y antena), lípidos, transportadores de electrones (las quinonas  $Q_A$  y  $Q_B$ ) y un átomo de hierro ferroso, que parece estar estrechamente relacionado con ambas quinonas. La función del citocromo b-559 en este complejo es una incógnita, habiéndose postulado muchas teorías al respecto.

#### Purificación del citocromo b-559

En 1971 Garewal y Wasserman (1974a y b) purificaron el citocromo b-559 con un potencial intermedio a partir de tilacoides de espinaca. Los pasos claves del procedimiento eran: eliminación de clorofila con etanol; solubilización del citocromo mediante sonicación a pH 8 y con 2% de Tritón X-100 y 2-4 M de urea; eliminación de impurezas mediante cromatografía en columna de DEAE-celulosa y, como paso final, electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo Tritón X-100. Ellos concluyeron que el citocromo b-559 era una proteína mosaico de peso molecular 110.000, con ocho pequeñas cadenas polipeptídicas de tres tipos pero de un solo tamaño

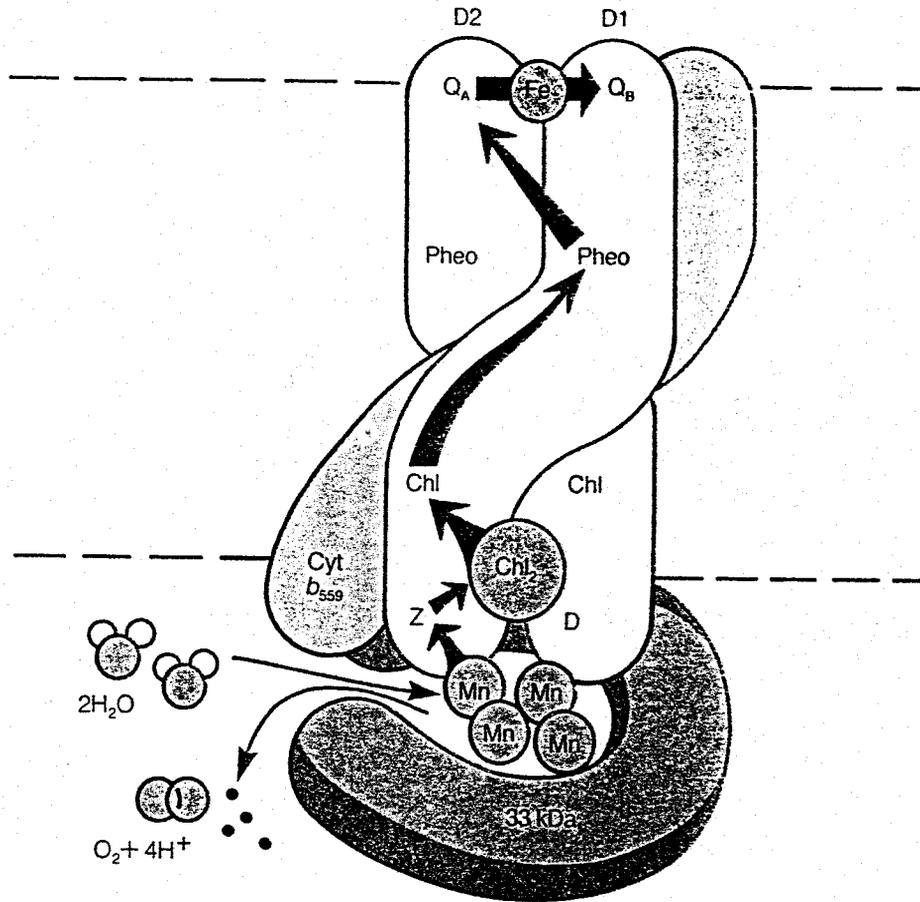


Figura 3. Representación esquemática de los polipéptidos del centro de reacción del fotosistema II y del sistema de rotura del agua asociado

$\text{Q}_A$  y  $\text{Q}_B$  son dos plastoquinonas que actúan en serie como aceptores de electrones y están asociadas a un ión ferroso (Fe). Comoceptor primario de electrones actúa una de las moléculas de feofitina (Pheo). Una clorofila especial ( $\text{Chl}_2$ ) parece ser el donador primario de P-680. Uno o dos monómeros de clorofila (Chl) podrían facilitar la transferencia de electrones a la feofitina. Z es el donador de electrones de P-680, y la proteína de 33 kDa es la responsable de la estabilización del manganeso. D es un componente similar a Z pero que no parece estar envuelto en la transferencia de electrones del agua a P-680. La función del citocromo b-559 en el centro de reacción del fotosistema II es incierta. Las flechas muestran las posibles rutas del transporte de electrones. Esquema de Barber (1987).

(peso molecular de 6000). El método fue ligeramente modificado por Zielinsky y Price (1982), que lo utilizaron para mostrar que el citocromo b-559 es leído y ensamblado en el cloroplasto (Zielinsky y Price, 1980), corroborando, además, que este citocromo posee una subunidad de peso molecular 6000. Más recientemente, Matsuda y Butler (1983) purificaron el citocromo b-559 a partir de hojas de espinaca siguiendo los métodos de Garewal y Wassernan (1974a y b) y Zielinsky y Price (1982), obteniendo una lipoproteína de 110.000 de peso molecular en la forma de bajo potencial; la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS de la proteína purificada mostró una única banda correspondiente a un monómero de 6 kDa.

Lach y Böger (1975a) solubilizaron el citocromo b-559 en su forma de alto potencial y purificaron hasta homogeneidad la proteína mediante una columna de Biogel A, eliminando la necesidad de realizar el lento paso electroforético de métodos anteriores (Wasserman, 1980; Zielinsky y Price, 1982). Las electroforesis analíticas en geles de poliacrilamida conteniendo SDS revelaron (Lach y Böger, 1975) una subunidad de peso molecular de 17.000 para el citocromo b-559 de Bumilleriopsis y de 37.000 para la proteína de espinaca. Por otra parte, Maroc y Garnier (1981) encontraron en el alga Chlamydomonas reinhardtii una hemoproteína con una subunidad de peso molecular de 14.000 que estaba aparentemente relacionada con el citocromo b-559. Koenig y Moller (1982) aislaron el citocromo b-559 de bajo potencial de cloroplastos de cebada usando una columna de DEAE-Sefarosa, encontrando, además, que, la hemoproteína, de peso molecular de 120.000, podía ser dissociada -dependiendo de las condiciones de la electroforesis- en componentes de 31, 30, 18, y 9 kDa.

En 1983 Metz et al. describieron un procedimiento rápido y simple de purificación del citocromo b-559 usando partículas del fotosistema II como material de partida y una columna de DEAE-celulosa como paso cromatográfico. Las

electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo LDS del citocromo b-559 purificado de espinaca y maiz pusieron de manifiesto la existencia de una banda polipeptídica mayor de 9 kDa de peso molecular y dos bandas menores, de 10 y 6 kDa. Más tarde, Widger et al. (1984) purificaron el citocromo b-559 de tilacoides de espinaca usando tres pasos cromatográficos (DEAE-celulosa, hidroxapatito y DEAE-Sephacel), encontrando que esta proteína constaba de un polipéptido principal de 10 kDa, aunque se detectaba también un pequeño polipéptido de 6 kDa. El péptido de 10 kDa fue posteriormente sometido a nuevos pasos de purificación y analizado y secuenciado en sus 27 primeros aminoácidos. Esta secuencia, junto con los anticuerpos obtenidos a partir de la proteína purificada, permitieron identificar su gen en el cromosoma de cloroplastos de espinaca (Cramer et al., 1986), pudiendo determinarse su secuencia de nucleótidos completa, que corresponde a un polipéptido de 82 aminoácidos con un peso molecular de 9,16 kDa y un único residuo de histidina. Posteriores resultados obtenidos por este mismo grupo (Cramer et al., 1986), les han llevado a sugerir que el citocromo b-559 de espinaca contiene un segundo polipéptido de 38 aminoácidos y 4,27 kDa, con un solo residuo de histidina también. Asumiendo la estructura de heterodímero postulada por estos autores, se puede calcular un peso molecular del citocromo b-559 de cloroplastos de 13,43 kDa.

Yamada et al. (1987) han purificado recientemente el centro de reacción del fotosistema II, que contiene citocromo b-559 de bajo potencial. La electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS de este complejo revela la existencia de dos subunidades del citocromo b-559, de 9 y 4,5 kDa, junto a una subunidad menor no identificada. Nanba y Satoh (1987) han purificado un centro de reacción que contiene sólo los polipéptidos D1 y D2 y el citocromo b-559, cuyo análisis electroforético confirmó la presencia de las dos subunidades de 9 y 4,5 kDa.

### Función del citocromo b-559

El aspecto quizás más discutido acerca del citocromo b-559 -componente cuantitativamente muy importante de la membrana de cloroplastos- es el papel que desempeña en el aparato fotosintético. A pesar de las extensas investigaciones desarrolladas en este sentido, no existe aún un consenso en cuanto a la función de este citocromo.

Hay una serie de hipótesis, basadas en diferentes hechos experimentales, que tratan de explicar la funcionalidad del citocromo b-559 en la fotosíntesis y que pueden resumirse como sigue:

(1) Intermediario redox en la reacción de rotura del agua por el fotosistema II (Bendall y Sofrová, 1971). Esta teoría se basa fundamentalmente en la fotooxidación del citocromo b-559 inducida por el fotosistema II en cloroplastos a -77K.

(2) Transportador de electrones en una vía cíclica y conductora de protones alrededor del fotosistema II (Tsujimoto y Arnon, 1985; Arnon y Tang, 1988). Según estos autores, el citocromo b-559 funcionaría ciclando hacia el fotosistema II parte de los electrones que llegan al "pool" de plastoquinona, de manera que se introduce en el tilacoide un protón proveniente del agua; resulta, por tanto, un balance neto final de dos protones translocados por electrón transferido en la cadena de transporte no-cíclica.

(3) Transductor de energía redox en ácido-base entre los fotosistemas II y I (Losada et al., 1983; Hervás et al., 1985). De acuerdo con esta hipótesis, el citocromo b-559 opera en la cadena principal de transporte de electrones entre ambos fotosistemas como un sistema transductor de energía redox en ácido-base, funcionando alternativamente a dos potenciales

redox y dos  $pK_a$ s, lo que permite la translocación de protones de un lado a otro de la membrana del tilacoide.

(4) Transportador de electrones entre los dos fotosistemas que capta protones en el sitio oxidante del fotosistema II ayudando a la liberación de protones en la rotura del agua (Butler, 1978; Matsuda y Butler, 1983a). Según estos autores, el citocromo, en su forma de alto potencial, estaría implicado en el sistema de rotura del agua, captando los protones liberados en su oxidación, mientras que la forma de bajo potencial actuaría en la cadena principal de transporte no-cíclico de electrones; los autores proponen un ciclo de interconversión entre las dos formas del citocromo b-559 basado en la captación o no de protones por la forma reducida de este citocromo y sugiriendo distintos valores de  $pK_a$  para las dos formas reducidas de los dos estados de potencial.

(5) Mediador en el reensamblaje del sistema de rotura del agua en cloroplastos en desarrollo o en respuesta a una situación de estrés (Cramer et al., 1986). Según esta teoría, el citocromo no tendría funcionalidad en cloroplastos con sistema de rotura del agua activo. Intervendría en la fotoactivación de los cloroplastos, proceso durante el cual se produce el ensamblaje y la activación del sistema de rotura del agua, canalizando el poder oxidante de P-680 hasta el componente de la membrana del tilacoide responsable final del ensamblaje de este sistema enzimático.

(6) Mediador en la transferencia de electrones para rerreducir a la clorofila fotooxidada y proteger al fotosistema II de la fotoinhibición (Thompson y Brudvig, 1988). Estos autores proponen que la fotoinhibición del fotosistema II se produce porque  $P-680^+$  es capaz de oxidar a su propia antena de clorofila. El citocromo b-559, según ellos, transferiría, mediante un ciclo, electrones al último componente de la antena impidiendo su fotoinactivación.

(7) Balanceador de carga en el fotosistema II (Satoh, 1988).

### Propiedades de los citocromos de tipo b

Como resumen, se exponen una serie de hechos comunes a los citocromos de tipo b, tanto respiratorios como fotosintéticos, y de interés a la hora de plantear la posible función de estas proteínas: (1) Los citocromos de tipo b de cloroplastos (Barber, 1982; Cramer y Crofts, 1982; Galván et al., 1983; Losada et al., 1983) y mitocondrias (Chance et al., 1970; Wilson y Dutton, 1970; Losada et al., 1983; Hervás et al., 1984) exhiben una forma de bajo potencial estable y una forma de alto potencial inestable. (2) La proporción entre las dos formas de potencial del citocromo b en preparaciones mitocondriales de animales (Chance et al., 1970; Wilson y Dutton, 1970) y levaduras (Losada et al., 1983; Hervás et al., 1984) depende reversiblemente del potencial de fosfato, aumentando hacia la forma de alto potencial después de la incubación con ATP, y disminuyendo hacia la forma de bajo potencial después de la incubación con ADP y fosfato. (3) El ATP parece ejercer su efecto energizador en preparaciones mitocondriales a través de la  $F_0-F_1$  ATPasa (Wikström et al., 1981), no observándose desplazamiento hacia la forma de alto potencial en presencia de inhibidores de la ATPasa, como la oligomicina (Losada et al., 1983; Hervás et al., 1984). (4) La translocación vectorial de protones asociada a cambios redox parece ser una propiedad catalítica intrínseca de los complejos mitocondriales de tipo  $bc_1$  (Guerrieri y Nelson, 1975; Leung y Hinkle, 1975; Papa, 1982a y b) y bf (Hauska et al., 1983). (5) La desenergetización de la forma de alto potencial de los citocromos de tipo b y el desplazamiento, reversible o irreversible, del equilibrio hacia la forma de bajo potencial correspondiente es causado, tanto en mitocondrias como en cloroplastos, por la adición de agentes protonofóricos, como el

CCCP, agentes desnaturalizantes, como los detergentes, así como por diversos tratamientos, como el envejecimiento, calentamiento suave, sonicación, etc. (Cramer et al., 1971; Wada y Arnon, 1971; Galván et al., 1983; Losada et al., 1983). (6) La forma de bajo potencial del citocromo b-559 (Galván et al., 1983; Losada et al., 1983) y b-563 (Fan y Cramer, 1970; Malkin, 1982) de cloroplastos, así como la del citocromo b-564 de mitocondrias de levadura (Losada et al., 1983; Hervás et al., 1984) es dependiente de pH por debajo de determinado valor de  $pK_a$ , con una pendiente próxima a  $-60$  mV/unidad de pH, mientras que la forma de alto potencial es siempre independiente de pH.

Todos estos datos parecen sugerir que los citocromos de tipo b, y en nuestro caso el citocromo b-559, podrían participar en la respiración y fotosíntesis como sistemas transductores de energía que acoplarían el transporte de electrones y la translocación de protones.

#### Sistemas bioquímicos transductores de energía

El mecanismo por el cual se produce la transducción de energía en los sistemas biológicos presenta aún en la actualidad numerosas incógnitas. A este respecto, en nuestro laboratorio se han venido elaborando durante los últimos años una serie de ideas con el propósito de establecer un concepto unificado de la transducción de energía. Esta teoría parte de la base de que el primer paso esencial en la transducción de energía por los sistemas bioelectroquímicos es la generación de un intermediario electrónicamente energizado, es decir, una configuración electrónica atómica o molecular inestable, que tiende a estabilizarse por transición de electrones desde un orbital de mayor energía a uno de energía menor. La energía electrónica sería, pues, la conexión obligatoria entre las

diferentes formas de energía transducidas por los sistemas bioelectroquímicos (Losada, 1982).

Nuestra propuesta, atendiendo primero a los sistemas transductores redox y ácido-base (Losada, 1978; Losada, 1979a y b; Losada, 1982; Losada et al., 1983; Losada, 1986), establece que estos sistemas operan, como principio básico común, entre dos potenciales redox,  $E'_o$ , o dos  $pK_a$ s alternantes para llevar a cabo la transferencia endergónica o exergónica de electrones o protones entre dos potenciales redox o pHs. En todos los casos, el cambio de potencial o  $pK_a$  se consigue por energetización de una de las dos formas del par correspondiente.

Como se muestra en la Figura 4, la energetización (bién fotónica o química) de la forma reducida ( $Red^*$  respecto a  $Red$ ) del par redox basal ( $Red^*/Ox$  respecto a  $Red/Ox$ ) determina un incremento de su presión electrónica, o de su constante de disociación para los electrones, es decir, una disminución de su potencial redox medio. Por otra parte, la energetización de la forma oxidada ( $Ox^*$  respecto a  $Ox$ ) del par redox basal ( $Red/Ox^*$  respecto a  $Red/Ox$ ) conlleva una disminución de la presión electrónica, es decir, un aumento de su potencial redox, o de su afinidad por los electrones. Los dos pares de los sistemas del tipo de la forma reducida energetizada ( $Red/Ox$  y  $Red^*/Ox$ ) comparten la misma forma oxidada y operan entre el potencial redox más alto del par basal ( $AE'_o$ ) y el potencial más bajo del par energetizado ( $BE'_o^*$ ). Los dos pares de los sistemas de forma oxidada energetizada ( $Red/Ox$  y  $Red/Ox^*$ ) comparten la misma forma reducida y operan entre el potencial más bajo del par basal ( $BE'_o$ ) y el potencial más alto del par energetizado ( $AE'_o^*$ ). Los dos sistemas, sin embargo, transducen energía redox con el mismo resultado neto.

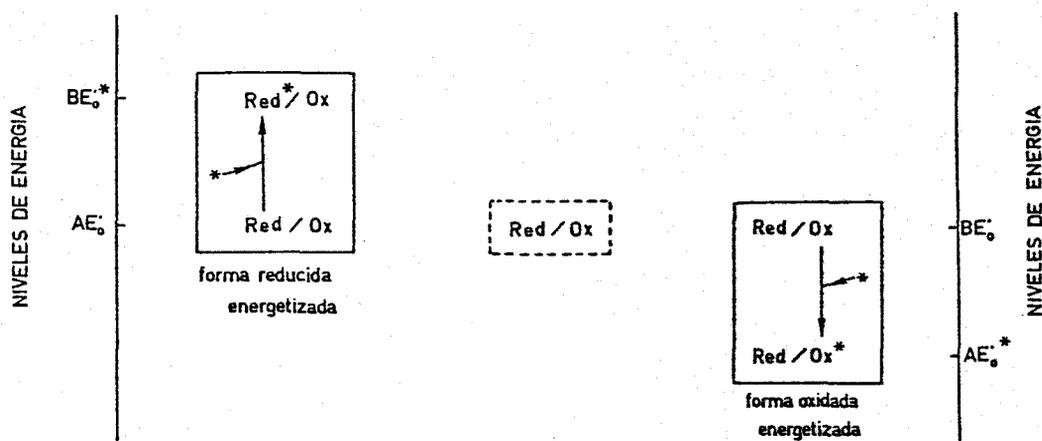


Figura 4. Sistemas redox transductores de energía del tipo de forma reducida energizada (izquierda) y forma oxidada energizada (derecha)

Izquierda: por energetización electrónica (ya sea fotónica o química) de la forma reducida del par (Red - Red\*), su potencial redox disminuye desde su valor basal ( $AE'_0$ ) hasta un valor inferior ( $BE'_0$ ), es decir, el nivel energético del par, referido a su presión electrónica, aumenta. Derecha: de forma similar, por energetización electrónica de la forma oxidada del par (Ox - Ox\*), su potencial medio aumenta desde su valor basal ( $BE'_0$ ) hasta un valor superior ( $AE'_0$ ), es decir, el nivel energético del par, referido a su presión electrónica, disminuye y su afinidad electrónica aumenta.

Habitualmente, los pares redox (Relimpio et al., 1977) modifican su potencial en una u otra dirección respecto a su potencial medio cuando la razón entre las concentraciones de la forma oxidada y reducida se desplaza del valor estándar de 1. Por el contrario, los sistemas redox transductores de energía modifican su potencial redox medio, en una u otra dirección, por energetización de la forma oxidada o reducida del par, en vez de cambiar la razón Ox/Red. La forma energetizada del sistema correspondiente es obviamente inestable y tiende espontáneamente a transformarse en su forma desenergetizada correspondiente. Estas transformaciones son, por tanto, exergónicas y determinan una marcada desviación hacia la derecha del equilibrio entre las formas energetizada y desenergetizada, en ambos tipos de sistemas redox transductores. La gran ventaja de los sistemas redox transductores de energía es que, mediante energetización de una de las formas del par basal, su potencial medio cambia enormemente, a pesar de mantener inalterada la razón Ox/Red.

Existen sistemas redox transductores de los tipos de forma oxidada o forma reducida energetizada implicados en los metabolismos del carbono, nitrógeno y azufre, así como en fotosíntesis y respiración (Losada, 1978).

Los sistemas ácido-base transductores parecen operar según el mismo principio fundamental que los sistemas redox transductores de energía. Como se muestra en la Figura 5, la energetización (bién fotónica o química) de la forma ácida ( $AH^*$  frente a  $AH$ ) del par ácido-base basal ( $AH^*/A^-$  respecto a  $AH/A^-$ ) determina un aumento de su concentración de protones, o de su constante de disociación de protones, es decir, una disminución de su  $pK_a$ . Por otra parte, la energetización de la forma básica ( $A^{-*}$  frente a  $A^-$ ) del par ácido-base basal ( $AH/A^{-*}$  respecto a  $AH/A^-$ ) conlleva una disminución de su concentración de protones, es decir, un aumento de su  $pK_a$ , o de su afinidad por los protones. Los dos pares de los sistemas del tipo de

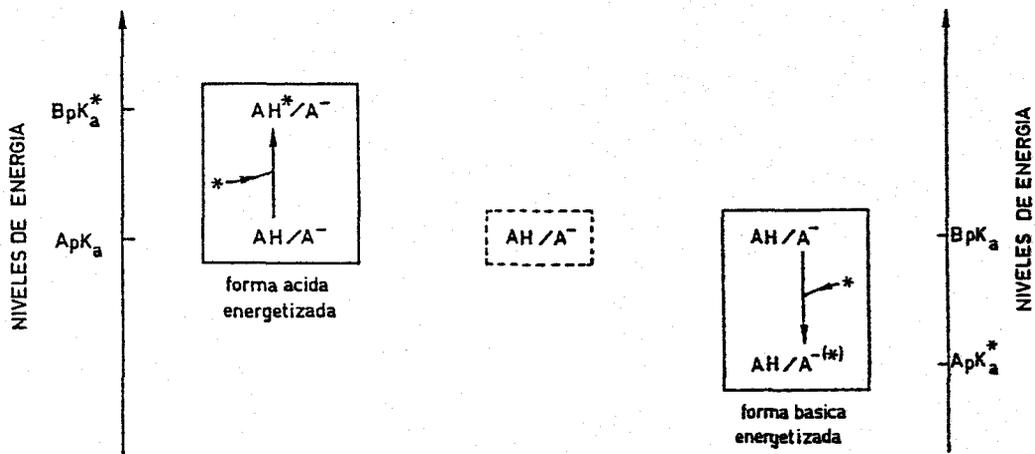


Figura 5. Sistemas ácido-base transductores de energía del tipo de forma ácida energizada (izquierda) y de forma básica energizada (derecha)

Izquierda: por energización electrónica (ya sea fotónica o química) de la forma ácida del par ( $AH - AH^*$ ) su  $pK_a$  disminuye desde su alto valor basal ( $ApK_a$ ) a un valor inferior ( $BpK_a^*$ ), es decir, el nivel de energía del par, referido a su concentración de protones, aumenta. Derecha: de forma similar, por energización electrónica de la forma básica del par ( $A^- - A^{-*}$ ), su  $pK_a$  aumenta desde su bajo valor basal ( $BpK_a$ ) a un valor superior ( $ApK_a^*$ ), es decir, el nivel de energía del par, referido a su concentración de protones, disminuye y su afinidad por protones aumenta.

forma ácida energetizada comparten la misma forma básica y operan entre el alto  $pK_a$  del par basal ( $ApK_a$ ) y el bajo  $pK_a$  del par energetizado ( $BpK_a^*$ ). Los dos pares de los sistemas del tipo de la forma básica energetizada comparten la misma forma ácida y operan entre el bajo  $pK_a$  del par basal ( $BpK_a$ ) y el alto  $pK_a$  del par energetizado ( $ApK_a^*$ ). Los dos tipos de sistemas transducen, sin embargo, energía ácido-base con el mismo resultado neto.

Los sistemas ácido-base (López-Barea et al., 1974) modifican su pH, en una u otra dirección, respecto al  $pK_a$ , al desplazar la razón de concentración entre la forma ácida y la básica del valor estándar de 1. En contraste, los sistemas transductores de energía ácido-base modifican su  $pK_a$  basal, en una u otra dirección, por energetización de la forma ácida o básica, en vez de alterar la razón entre ambas formas. Al igual que en los sistemas redox transductores, la forma energetizada del sistema correspondiente es inestable y tiende, espontáneamente, a transformarse en la forma no energetizada. Estas transformaciones son, en consecuencia, exergónicas y determinan una marcada desviación hacia la derecha del equilibrio entre las formas energetizada y desenergetizada en los dos tipos de sistemas ácido-base. La gran ventaja de este sistema es, de nuevo, que, debido a la energetización de cualquier forma del par basal, su  $pK_a$  cambia enormemente, a pesar de no alterarse la relación de concentraciones.

Según nuestra hipótesis (Losada et al., 1983; Losada, 1986), el mismo principio aplicable a los sistemas transductores de energía redox y ácido-base es también aplicable a los sistemas de enlace fosfato. Es decir, un par conjugado fosforilado-defosforilado puede operar a dos potenciales de transferencia de fosfato (PTP), alto o bajo, dependiendo del estado de energetización de las formas fosforilada o defosforilada del par. En el caso de un sistema del tipo de

forma defosforilada energizada, el par basal exhibirá un PTP alto, puesto que puede disociar fosfato a alta concentración, o transferirlo como un grupo fosfato rico en energía o grupo fosforilo ( $^+PO_3^{2-}$ ). De otro lado, el correspondiente par energizado exhibirá un PTP bajo, puesto que puede disociar fosfato a baja concentración, como fosfato inorgánico. Los sistemas de enlace fosfato del tipo de forma fosforilada energizada pueden también existir, al menos teóricamente. La forma energizada de los sistemas de enlace fosfato parece ser un intermediario electrónicamente energizado, que puede corresponder a la forma reducida u oxidada energizada de un sistema redox transductor, o a la forma ácida o básica energizada de un sistema ácido-base transductor, permitiendo el acoplamiento energético entre cualquiera de estos sistemas.

Es importante hacer notar que, mientras que los sistemas redox y de enlace fosfato pueden operar tanto en solución como en estructuras membranosas, los sistemas ácido-base deben actuar necesariamente unidos a membranas que formen vesículas.

El esquema general que hemos propuesto trata de explicar el acoplamiento entre los diversos tipos de energía biológica que se dan en la célula:

(1) Transducción de energía lumínica en energía electrónica y, posteriormente, en energía redox. Tiene lugar en los dos fotosistemas del aparato fotosintético y es catalizada por los centros de reacción de ambos fotosistemas, que están constituidos por moléculas especiales de clorofila a unidas a proteínas. El mecanismo de transducción sería el siguiente: el pigmento en su estado reducido basal (c) absorbe un cuanto de luz roja y se fotoexcita promoviendo un electrón a un orbital de mayor energía (c\*). La clorofila en este estado fotoexcitado puede donar su electrón energizado a aceptores apropiados, quedando oxidada (c<sup>+</sup>) y pudiendo recibir de nuevo un electrón en su orbital original de baja energía desde

donadores adecuados. El centro de reacción del que forma parte la clorofila a es el primero y más significativo fotosistema transductor de energía en biología. Pertenece a los sistemas redox transductores de energía del tipo de forma reducida energizada y puede, por tanto, existir como dos pares redox que comparten la misma forma oxidada: el par de alto potencial o basal,  $AE'_o$ , en el que la forma reducida es estable y desenergizada ( $c/c^+$ ) y el par de bajo potencial o energizado,  $BE'_o^*$ , en el que la forma reducida es energizada e inestable ( $c^*/c^+$ ). Este centro de reacción puede, pues, promover la transferencia de electrones, inducida por luz, desde un donador de electrones de alto potencial hasta un aceptor de electrones de bajo potencial.

Otros sistemas que pueden transducir energía lumínica en energía electrónica y posteriormente en energía redox, o viceversa, son los representados por las flavinas. Son sistemas del tipo de forma oxidada energizada, es decir, que aumentan su potencial redox por la energización de la forma oxidada del par inducida por luz.

(2) Transducción de energía lumínica en energía ácido-base. El sistema mejor estudiado y más característico es el de la bacteriorrodopsina de Halobacterium halobium. La bacteriorrodopsina convierte energía luminosa en energía electrónica y, posteriormente, en energía ácido-base. El grupo prostético de la bacteriorrodopsina es el retinal (vitamina A) unido a un residuo de lisina por una base de Schiff de  $pK_a$  muy alto. En anaerobiosis y bajo iluminación, la membrana púrpura transloca protones desde dentro hacia afuera de la célula, generando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana que puede ser utilizado para sintetizar ATP o dirigir el transporte activo de iones. La bacteriorrodopsina se encuadraría en el grupo de sistemas ácido-base transductores de energía del tipo de forma ácida energizada, que disminuyen su  $pK_a$  por energización.

(3) Transducción de energía redox en energía de enlace fosfato. Unos de los sistemas bioquímicos más conocidos e ilustrativos que pueden transducir energía de enlace fosfato en energía redox es el que cataliza la reducción, dependiente de ATP, por NAD(P)H del 3-fosfoglicerato, vía 1,3-difosfoglicerato, hasta gliceraldehído-3-fosfato. Este sistema, propio de la gluconeogénesis y del ciclo reductivo de las pentosas, también opera reversiblemente durante la glicolisis, formando ATP desde ADP y fosfato en la oxidación por  $\text{NAD}^+$  del gliceraldehído-3-fosfato a 3-fosfoglicerato (Losada, 1978; Losada, 1979b).

Todos los sistemas redox transductores de energía implicados en el metabolismo del carbono y del azufre son del tipo de forma oxidada energétizada, es decir, el potencial medio del par basal aumenta hacia 0,2 V (e incluso 0,4 V en el caso de la activación del sulfato) por energétización electrónica mediante ATP de la forma oxidada del par. Otra reacción redox acoplada a energía y de mucho interés es la reducción por ferredoxina del nitrógeno molecular a amonio, que requiere grandes cantidades de ATP. Aunque aún se desconoce el mecanismo, es posible que incluya uno o más pasos en los cuales la energía de enlace fosfato se transduce en energía redox.

(4) Transducción de energía redox en energía ácido-base. El mecanismo de la síntesis de ATP en mitocondrias, cloroplastos y bacterias es una de las mayores incógnitas de la bioenergética. La principal hipótesis considerada en la actualidad es la teoría quimiosmótica de Mitchel (Boyer et al., 1977), que postula que el transporte de electrones en la respiración y en la fotosíntesis está acoplado al transporte de protones, de forma que por cada electrón que atraviesa un sitio de acoplamiento de energía, se translocan uno o más protones a través de la membrana. Esta fuerza protonmotriz tiene dos componentes, un potencial de concentración de protones y un potencial eléctrico de membrana, y constituye el in-

termediario de alta energía que promueve la síntesis de ATP, al atravesar los protones la membrana en sentido inverso a través de la ATPasa. Pero aún quedan muchas incógnitas, sobre todo acerca del mecanismo, en términos moleculares, por el cual se acoplan la energía redox y la ácido-base, así como ésta y la de enlace fosfato.

Según nuestra hipótesis (Losada et al., 1982; Losada et al., 1983; Losada, 1986), varios citocromos respiratorios y fotosintéticos pueden ser considerados como sistemas redox transductores de energía del tipo de la forma oxidada o reducida energizada. Losada propone para explicar el acoplamiento entre la energía redox y la ácido-base, el funcionamiento de los citocromos a dos potenciales y dos  $pK_a$ s alternantes, basado en las características redox y ácido-base de estos citocromos anteriormente descritas. Funcionarían simultáneamente como un sistema redox transductor y como un sistema ácido-base transductor. El acoplamiento de energía entre ambos sistemas ocurre inevitablemente debido a que los dos muestran un intermediario común que existe bien en su estado electrónicamente energizado o en su estado basal estabilizado.

(5) Transducción de energía ácido-base en energía de enlace fosfato. El mecanismo molecular de la síntesis de ATP por las ATPasas respiratorias o fotosintéticas dirigida por protones energizados, generados durante el transporte electrónico (Boyer et al., 1977; Williams, 1978a y b) permanece aún sin aclararse. Extrapolando el razonamiento del apartado anterior a este caso, se podría pensar en la existencia de un intermediario común a estos dos tipos de energía que pueda existir en un estado electrónicamente energizado. El anión carboxilato de algún aminoácido de la ATPasa podría ser un primer candidato para esta función puesto que puede existir en forma desenergizada de anión carboxilato ( $R-COO^-$ ) o energizada de catión acilio ( $R-C=O^+$ ). La interacción de este

anión con el par metafosfato-ortofosfato se podría traducir en la transferencia reversible de protones entre ambos sistemas.

### Objeto del trabajo

En este trabajo se ha pretendido, básicamente, estudiar la posible participación del citocromo b-559 en la transducción de energía redox en energía ácido-base durante el transporte no-cíclico de electrones.

Para ello, en primer lugar, se han estudiado las propiedades redox y ácido-base del citocromo b-559 en preparaciones de partículas del fotosistema II, caracterizando los pares de alto y bajo potencial del citocromo, en sus formas oxidada y reducida, mediante el estudio de los potenciales redox de ambos pares y su dependencia respecto al pH, de su estabilidad ante el tratamiento con diferentes agentes, de la interconvertibilidad entre ambos pares, etc.

En segundo lugar, se ha investigado en cloroplastos la localización del citocromo b-559 en la cadena fotosintética de transporte de electrones mediante el análisis comparativo de los cambios redox inducidos por luces selectivas de los fotosistemas I y II en los citocromos b-559 y f, estudiando además el efecto de diversos agentes desacoplantes e inhibidores del flujo electrónico fotosintético sobre dichos cambios. Se ha completado esta parte con el estudio de las fotorreacciones del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II.

Por último, se ha purificado el citocromo b-559 a partir de cloroplastos y partículas del fotosistema II con objeto de determinar si existen una o más especies de citocromo. Con el citocromo purificado, se ha estudiado, además, la interconvertibilidad entre ambos pares de potencial.

## II. MATERIALES Y METODOS

## II.A. MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO. OBTENCIÓN DE CLOROPLASTOS Y DE PARTICULAS DEL FOTOSISTEMA II

Todos los experimentos descritos en este trabajo se han realizado utilizando como material biológico hojas de espinaca (Spinacea oleracea, L.)

### II.A.1. Procedencia del material

Las hojas de espinaca se obtuvieron de plantas frescas recolectadas el día anterior. Se lavaron con agua destilada fría, se secaron y se mantuvieron a 4°C y en oscuridad hasta su utilización para la extracción de cloroplastos y partículas del fotosistema II, lo cual se hizo siempre el mismo día.

### II.A.2. Obtención de cloroplastos

#### II.A.2.1. Según el método de Arnon y Chain

Los cloroplastos utilizados habitualmente se obtuvieron según el procedimiento descrito por Arnon y Chain (1977). Todo el proceso de extracción se llevó a cabo en una cámara fría a 4°C y con baja iluminación.

Cincuenta gramos de hojas limpias, frías y desnervadas se trituraron en una batidora LOMI G-2 (Lorenzo Miguel, España), durante 10 segundos con 150 ml de tampón Tricina-KOH 20 mM, pH 7,5, sacarosa 0,4 M y NaCl 10 mM. El homogenado así obtenido se filtró a través de cinco capas de organdí de nylon y se centrifugó a 400xg durante un minuto para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 3000xg durante un minuto y el precipitado de cloroplastos intactos se resuspendió en 40 ml de una solución hipotónica conteniendo Tricina-KOH 20 mM, pH 7,5 y NaCl 10 mM. El uso de esta solución permite romper los cloroplastos por choque osmótico y obtener vesículas tilacoidales. El material

resuspendido se centrifugó a 10000xg durante 30 segundos, se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 2-3 ml de la solución hipotónica anterior, diluyéndose posteriormente hasta una concentración de 1 mg de clorofila/ml. La preparación de vesículas tilacoidales así obtenida se mantuvo en hielo y oscuridad hasta la realización de los distintos experimentos. Todos los ensayos descritos en este trabajo se han realizado con suspensiones de vesículas tilacoidales preparadas el mismo día de su utilización. Para simplificar, nos referiremos a ellas a partir de ahora como suspensiones de cloroplastos.

#### II.A.2.2. Según el método de Singh y Wasserman

En la purificación del citocromo b-559 se emplearon cloroplastos extraídos según el método descrito por Singh y Wasserman (1971), con pequeñas modificaciones. La temperatura se mantuvo durante todo el proceso a 4°C.

Doce kilogramos de hojas limpias y frescas se rompieron en porciones de 500 gramos en 750 ml de tampón Tris-HCl 0,02 M, pH 8 y NaCl 0,35 M con una batidora de 3,8 litros de capacidad Waring 31BL67 (Waring Products Division, EE.UU.), durante 12 segundos a mínima potencia. El homogenado se filtró a través de 4 capas de organdi de nylon y la suspensión resultante se centrifugó a 25000xg en un sistema de flujo continuo Szent-Gyorgyi-Blum, (Sorvall Instruments Inc., EE.UU.), adaptado a una centrífuga Sorvall RC2-B (Sorvall Instruments Inc., EE.UU.) a un flujo de 200 ml/minuto. Se continuó centrifugando durante 10 minutos tras la entrada de toda la solución, para asegurar la completa sedimentación. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se mezcló con 3 volúmenes de NaCl 0,035 M y se homogeneizó en la batidora durante 8 segundos a mínima potencia. La suspensión se centrifugó a 250xg durante 1 minuto. El precipitado se desechó y el sobrenadante se centrifugó de nuevo a 25000xg durante 20 minutos. El precipitado

resultante se homogeneizó a mano mediante un homogeneizador de vidrio-teflón en 250 ml de tampón Tris-HCl 0.02 M, pH 8, y NaCl 0,035 M. La suspensión se suplementó con glicerol al 10 % (v/v) y seroalbúmina bovina (7,2 mg/ml).

### II.A.3. Obtención de partículas del fotosistema II

Las partículas del fotosistema II se obtuvieron según el procedimiento descrito por Kuwabara y Murata (1982). Todo el proceso de extracción se llevó a cabo en una cámara fría a 4°C.

Trecientos gramos de hojas limpias y frías se trituraron en una batidora Waring 31BL67, durante 20 segundos con 450 ml de tampón fosfato 0,05 M, pH 7,4, NaCl 0,1 M y PMSF 1 mM. El homogenado resultante se filtró a través de 4 capas de organdi de nylon, se centrifugó a 500xg durante 30 segundos, y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 3000xg durante 5 minutos. El precipitado se resuspendió en 450 ml de NaCl 10 mM, donde se mantuvo 10 minutos, centrifugándose después a 3000xg durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante, apurando bien, y se centrifugó a 12000xg durante 10 minutos. El precipitado de cloroplastos se resuspendió en tampón fosfato 0,05 M, pH 6,9, sacarosa 0,3 M, NaCl 0,05 M y PMSF 1 mM, hasta una concentración de clorofila de 1,5-2 mg/ml. Se añadió Tritón X-100 (solución acuosa al 20% p/v) hasta una razón Tritón/clorofila de 25:1 (p/p) y se incubó durante 1 minuto con agitación suave. La suspensión se centrifugó a 1000xg durante 2 minutos, se desechó el precipitado, y el sobrenadante se centrifugó a 35000xg durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en el mismo volumen que hubiera en la fase anterior de tampón fosfato 0,04 M, pH 6,9 y PMSF 1 mM. La suspensión se centrifugó a 1000xg durante 2 minutos y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 35000xg durante 10 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en tampón MES-NaOH 0,025 M, pH 6,5, sacarosa 0,3 M, NaCl 0,01 M y PMSF 1 mM y se diluyó hasta una

concentración de clorofila de 1 mg/ml. La preparación de partículas del fotosistema II así obtenida se mantuvo en hielo y oscuridad hasta la realización de los diferentes experimentos.

## II.B. METODOS ANALITICOS Y TECNICAS EXPERIMENTALES

### II.B.1. Determinación de clorofila

La concentración de clorofila se ha determinado espectrofotométricamente según el método de Arnon (1949). Para ello, 0,1 ml de la preparación de cloroplastos o de partículas del fotosistema II se diluyeron con acetona al 80% hasta un volumen de 20 ml. La solución se centrifugó a 2500xg durante 5 minutos y se midió su absorbancia a 652 nm. El coeficiente de extinción utilizado fué de  $34,5 \text{ mg.ml}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

### II.B.2. Determinación de proteína

La concentración de proteína se determinó según el método de Bradford (1976), utilizando el reactivo para proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.) y siguiendo los procedimientos estándar (200-1400  $\mu\text{g}$  proteína/ml) y microensayo (1-20  $\mu\text{g}$  proteína/ml) recomendados por dicha firma comercial. Las rectas de calibrado se obtuvieron para cada serie de ensayos utilizando ovoalbúmina como patrón.

### II.B.3. Medida de las actividades fotosintéticas

La utilización de aceptores o donadores de electrones, naturales o artificiales, permite medir la actividad del aparato fotosintético, ya sea en su conjunto, o bien de cada fotosistema por separado (Trebst, 1972).

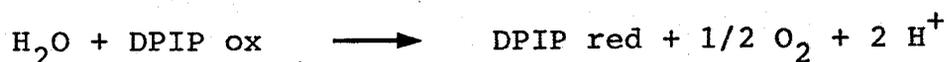
La actividad total, es decir, la actividad de los dos fotosistemas actuando secuencialmente, se ensayó usando

ferricianuro como aceptor artificial de electrones, según la reacción:



Esta reacción se siguió en un electrodo polarográfico de oxígeno YSI 5331 (Yellow Springs Instruments Co. Inc., EE.UU.), midiendo la velocidad de desprendimiento de oxígeno; o bien con un espectrofotómetro, midiendo la reducción de ferricianuro a través de la desaparición de absorbancia a 420 nm. (ver apartado II.B.4.).

La actividad específica del fotosistema II se determinó siguiendo la velocidad de desprendimiento de oxígeno en presencia de DPIP oxidado, aceptor artificial de electrones en el sitio reductor de este fotosistema:



La actividad de este fotosistema se midió alternativamente utilizando DPIP oxidado y ferricianuro o DAD oxidado y ferricianuro como sistemas aceptores de electrones.

La actividad específica del fotosistema I se determinó midiendo la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de un aceptor terminal de electrones, el Mv, que es capaz de reducir al oxígeno, y usando como donador de electrones DPIP reducido con ascorbato. La actividad del fotosistema II se bloqueó añadiendo DCMU, utilizándose además azida para inhibir la actividad de la enzima superóxido dismutasa y evitar así la formación de oxígeno a partir de los radicales superóxidos. Las reacciones globales son las siguientes:



En todos los experimentos se utilizó como fuente de iluminación una lámpara de wolframio que suministraba una intensidad luminosa de  $300 \text{ w/m}^2$ .

#### II.B.4. Medidas espectrofotométricas

Los cambios en el estado redox del citocromo b-559 se han estudiado utilizando la técnica de doble longitud de onda introducida por Chance en 1951. Esta técnica permite la medida de pequeños cambios de absorbancia en soluciones de alta absorción y gran fondo de dispersión. El fundamento se ilustra en la Figura 6 y consiste, básicamente, en usar una única cubeta a través de la que pasan secuencialmente dos haces de luz monocromática de distinta longitud de onda, lo cual permite eliminar en gran parte los efectos negativos de la dispersión, pudiéndose medir cambios de absorbancia menores de  $5 \times 10^{-3}$ . Con este sistema se mide la diferencia de absorbancia a una longitud de onda determinada (por ejemplo, un máximo de absorbancia característico del compuesto a estudiar) respecto a la absorbancia a una longitud de onda utilizada como referencia (usualmente un punto isosbético). Habitualmente, para estudiar cambios en el estado de óxido-reducción (cambios redox) de los citocromos se selecciona como longitud de onda de medida la correspondiente al máximo de absorbancia de la banda alfa, y como longitud de onda de referencia el punto isosbético más próximo.

Los cambios en el estado redox del citocromo b-559 se han seguido con un espectrofotómetro de doble longitud de onda AMINCO DW 2a<sup>TM</sup> UV/VIS (American Instruments Co., EE.UU.), usando como longitud de onda de medida 559 nm, correspondiente al máximo en la banda alfa de este citocromo, y como longitud de onda de referencia 570 nm (punto isosbético).

El estado redox de este citocromo se ha determinado mediante los cambios de absorbancia a 559-570 nm producidos al

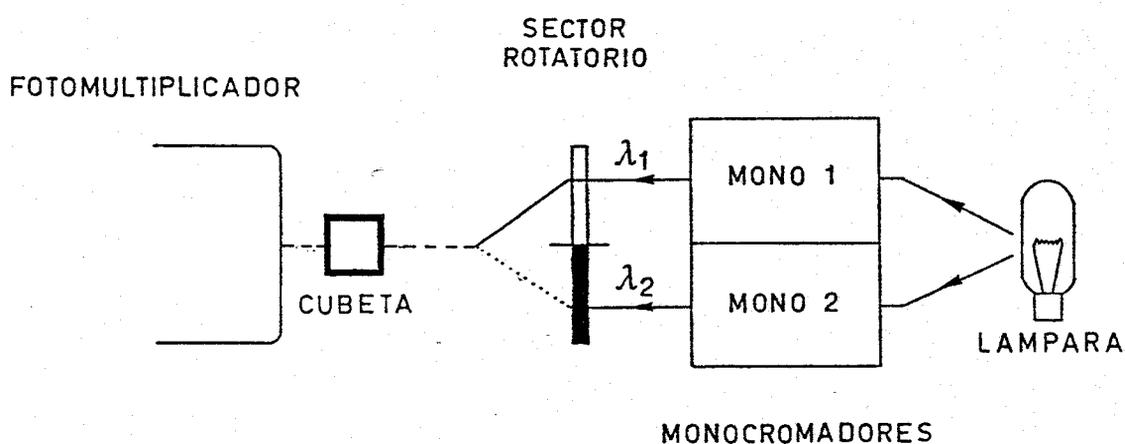


Figura 6. Esquema simplificado de un espectrofotómetro de doble longitud de onda

El haz proveniente de la lámpara es dividido y se hace pasar por dos monocromadores que seleccionan una longitud de onda cada uno. Estos rayos monocromáticos inciden posteriormente sobre un espejo rotatorio segmentado que los hace pasar secuencialmente a través de la cubeta que contiene la muestra. Después, los dos rayos inciden en el fotomultiplicador, que medirá la diferencia en absorbancia de un haz respecto al otro.

añadir a la mezcla de reacción ferricianuro como oxidante e hidroquinona y ditionito como reductores. Los espectros en la zona de la banda alfa de los citocromos se obtuvieron midiendo los cambios de absorbancia cada dos nanómetros, fijando la longitud de onda de referencia en 570 nm y variando la longitud de onda de medida desde 546 nm hasta 570 nm.

Se han realizado también determinaciones de los cambios redox del citocromo b-559 durante la iluminación de las suspensiones de cloroplastos y partículas del fotosistema II con luces selectivas de los dos fotosistemas. Para ello, se interpuso entre el fotomultiplicador del espectrofotómetro y el compartimento de cubetas un monocromador Oriel 7240 (Oriel Corporation, EE.UU.), ajustado a 565 nm (ancho de banda de 50 nm), lo que permite el paso de la luz de medida y de referencia, pero no el de la luz de excitación de los dos fotosistemas. La iluminación con luz selectiva de los fotosistemas I y II se consiguió mediante una fuente de iluminación lateral AMINCO J4-9610A que proporciona  $2000 \text{ w/m}^2$ , interponiendo entre la fuente de luz y la cubeta un filtro de banda estrecha Baird Atomic de 720 nm de máximo de transmitancia (ancho de banda de 28 nm), en el caso del fotosistema I, y de 650 nm (ancho de banda de 11 nm), en el caso del fotosistema II.

Todos los experimentos se realizaron con agitación continua, para evitar la sedimentación de las partículas y facilitar la rápida mezcla de los reactivos añadidos, y a temperatura constante, gracias a que el portacubetas estaba conectado a un baño circulador termostatzado Lauda K2R (Messgerate Werk Lauda, Alemania Federal).

Las determinaciones puntuales de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Pye-Unicam SP8-150 (Pye-Unicam Ltd., Gran Bretaña), dotado de salida digital y registrador incorporado. Los espectros de absorción del citocromo purificado e incluido en liposomas se realizaron a temperatura

ambiente en un espectrofotómetro Beckman DU-7 (Beckman Instruments Inc., EE.UU.). Las determinaciones espectrofotométricas de las actividades fotosintéticas en cloroplastos (ver apartado II.B.3.) se realizaron con el espectrofotómetro AMINCO DW 2a<sup>TM</sup> UV/VIS en su modalidad doble haz, midiendo la velocidad de reducción de ferricianuro, empleado como aceptor terminal de electrones, por el descenso de absorbancia a 420 nm al iluminar las preparaciones de cloroplastos con luz roja. Entre el fotomultiplicador y la cubeta se interpuso un filtro de banda estrecha Baird Atomic de 423 nm de máximo de transmitancia, de forma que se puede medir la desaparición de ferricianuro a 420 nm simultáneamente a la iluminación de la muestra, sin que haya interferencia de la luz de excitación con el haz de medida. La iluminación se consiguió con una fuente de luz AMINCO J4-9610A provista de un filtro de banda ancha Balzers (600-800 nm).

#### II.B.5. Medidas potenciométricas

Las titulaciones redox del citocromo b-559 se han realizado siguiendo los cambios de absorbancia a 559-570 nm al añadir alícuotas de ditionito 0,5 M, para las titulaciones reductivas, o alícuotas de ferricianuro 0,1 M, para las titulaciones oxidativas, a una mezcla de reacción que contenía los mediadores redox adecuados, convenientemente agitada y gaseada con argón pasado a través de pirogarol para asegurar la ausencia de oxígeno. Previamente al ensayo, las muestras se oxidaron o redujeron completamente con ferricianuro o ditionito. Tras cada adición se anotó el potencial redox medido con un electrodo combinado Pt-Ag/AgCl Ingold (Dr. W. Ingold AG., Suiza),  $E_{O'}$  + 222 mV a 25°C, (Dutton, 1978), conectado a un potenciómetro Beckman 4500 (Beckman RIIC Ltd., Gran Bretaña) y previamente calibrado con una solución saturada de quinhidrona ( $E_{O'}$ , pH 7, + 280 mV a 20°C).

Como mediadores redox se usaron (Knaff y Malkin, 1973; Horton y Croze, 1977; Wilson, 1978): DAD 20  $\mu\text{M}$  ( $E_o'$ , pH 7, + 240 mV); 1,2-naftoquinona 20  $\mu\text{M}$  ( $E_o'$ , pH 7, + 145 mV); PMS 2,5  $\mu\text{M}$  ( $E_o'$ , pH 7, + 80 mV); PES 10  $\mu\text{M}$  ( $E_o'$ , pH 7, + 55 mV) y duroquinona 20  $\mu\text{M}$  ( $E_o'$ , pH 7, + 5 mV).

#### II.B.6. Eliminación de pigmentos mediante extracción etanólica

Como paso previo en el proceso de purificación del citocromo b-559, las suspensiones de cloroplastos o partículas del fotosistema II fueron sometidas a una extracción etanólica para eliminar la mayor parte de la clorofila y otros pigmentos. Para ello, se les añadió etanol al 90%, enfriado previamente a  $-10^{\circ}\text{C}$ , homogeneizándose la solución en la batidora Waring durante 20 segundos a mínima potencia. La suspensión resultante se centrifugó a 35000xg durante 5 minutos. El precipitado se volvió a someter a la extracción con etanol, pero al 100% y empleando la mitad de volumen de alcohol utilizado en el paso anterior. El precipitado final se resuspendió en 7-8 volúmenes de Tris-HCl 0,05 M, pH 8, se homogeneizó en la misma batidora durante 1 minuto a mínima potencia y se centrifugó a 30000xg durante 5 minutos, repitiéndose este proceso de lavado una vez más. El precipitado resultante se resuspendió en un pequeño volumen del mismo tampón y se homogeneizó a mano.

#### II.B.7. Sonicación en presencia de Tritón y urea

La solubilización del citocromo b-559 se consiguió mediante sonicación en presencia de Tritón y urea. Para ello, se utilizó tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 8, Tritón X-100 2% (p/v), urea 4 M y DTE 5 mM. Alícuotas de 10 ml se sonicaron durante dos minutos en hielo en periodos de 15 segundos con intervalos de 1 minuto, usando un sonicador Branson B-12 (Branson Sonic Power Company, EE.UU.) a 90 w de potencia.

Los restos de membranas y otros agregados celulares se eliminaron de las suspensiones sonicadas mediante una primera centrifugación a 30000xg durante 30 minutos, y una segunda del sobrenadante de la centrifugación anterior a 90000xg durante 30 minutos en una ultracentrífuga Spinco L2-65B (Beckman Instruments Inc., EE.UU.).

#### II.B.8. Concentración mediante Sephadex G-25

La concentración de las suspensiones durante los distintos pasos de la purificación del citocromo b-559 se realizó siguiendo el método que a continuación se describe:

Se añadieron varios gramos de Sephadex G-25 Fine seco a las suspensiones y se agitaron suavemente. Se dejó reposar la mezcla durante 5 a 10 minutos a 4°C y, tras ésto, se centrifugó la suspensión a 500xg durante 2 minutos en un sistema de dos tubos de centrífuga, uno mayor que contiene a uno más pequeño horadado finamente en el fondo. Entre ambos tubos se interpuso un organdí de nylon. Este sistema permite el paso de la solución, que es recogida en el segundo tubo, pero retiene el Sephadex hinchado.

#### II.B.9. Cromatografías

##### II.B.9.1. Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se realizó en una columna de vidrio de 5 x 25 cm (volumen vacío de 450 ml) conteniendo un lecho de DEAE-celulosa microgranular DE-52 (Whatman, Gran Bretaña) equilibrada con Tris-HCl 0,05 M, pH 8, Tritón X-100 2%, urea 2 M y DTE 2 mM. El flujo de montaje utilizado fué superior a 300 ml/hora. La cromatografía se desarrolló con el mismo tampón a un flujo de 6 ml/hora regulado por medio de una bomba peristáltica Perpex 10.200 (LKB, Suecia) de cabezas reductoras intercambiables. Se recogieron

automáticamente fracciones de 2 ml mediante un colector de fracciones Frac-100 (Pharmacia Fine Chemicals, Suecia), analizándose su contenido en citocromo b-559 espectrofotométricamente.

Antes de montar las columnas, los gases disueltos en las suspensiones de DEAE-celulosa se eliminaron por succión mediante una bomba de vacío Millipore XX5522050 (Millipore, EE.UU.).

En otros casos se preparó, según se ha descrito anteriormente, una columna de DEAE-celulosa de 3 x 19 cm con un volumen vacío de alrededor de 100 ml.

#### II.B.9.2. Cromatografía de filtración en gel. Determinación de pesos moleculares

El peso molecular del citocromo b-559 purificado se determinó mediante cromatografía de filtración en gel, siguiendo el método descrito por Siegel y Monty (1966), en una columna de vidrio calibrado Pharmacia de 40 x 2,6 cm, conteniendo un lecho de Sephadex G-150 Fine limitado en su parte superior con un émbolo adaptador. La columna se equilibró con Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 0,5 mM y NaCl 0,1 M, tampón que se utilizó también para desarrollar la filtración. Las muestras, 0,6 ml de tampón de equilibrado conteniendo citocromo b-559 purificado y/o las proteínas marcadoras, se aplicaron directamente a través del émbolo en la parte superior del lecho del gel. La cromatografía descendente se desarrolló a 4°C y a un flujo de 9 ml/hora.

Se recogieron fracciones de 1,1 ml y se determinó el volumen de elución de cada una de las proteínas utilizadas midiendo la absorbancia a 230 nm, en el caso de las proteínas patrones, y a 416 nm (correspondiente a la banda Soret de la forma oxidada), en el caso del citocromo b-559. El volumen

vacío o de exclusión del lecho de gel se estimó a partir del volumen de elución de una muestra conteniendo azul dextrano 0,3% (p/v). El volumen total se determinó calibrando la columna vacía con agua destilada, y se confirmó posteriormente filtrando una muestra conteniendo ferricianuro potásico 8 mM. El azul dextrano y el ferricianuro se detectaron midiendo la absorbancia a 620 nm y 420 nm, respectivamente.

Se usaron las siguientes proteínas como patrones de peso molecular (2 mg de cada una): catalasa (232 kDa); aldolasa (158 kDa); seroalbúmina bovina (67 kDa); ovoalbúmina (43 kDa); y  $\alpha$ -quimiotripsinógeno (25 kDa).

El peso molecular se obtuvo representando en ordenadas, en escala semilogarítmica, el peso molecular y en abcisas el volumen de elución de las proteínas.

## II.B.10. Electroforesis

### II.B.10.1. Electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida

Las separaciones preparativas mediante electroforesis de disco se realizaron en geles de poliacrilamida al 10% (p/v) de acrilamida según el método descrito por Jovin et al. (1964), en un sistema para 12 geles Shandon (Shandon Scientific Company Ltd., Gran Bretaña), usando cilindros de vidrio de 15 mm de diámetro interno.

Los geles se prepararon mezclando 4 volúmenes de una solución de acrilamida al 20% y bis-acrilamida al 0,8% con 1 volumen de tampón Tris-HCl 3 M, pH 8,3, conteniendo TEMED al 0,46% (v/v), 1 volumen de agua destilada y 2 volúmenes de persulfato amónico al 0,1%, preparado inmediatamente antes de su uso. Se añadía además DTE 4 mM, glicerol 10% y Tritón X-100 0,1%, cuyos volúmenes se restaban del de agua destilada. Los

geles, de 7 cm de longitud, se recubrían de una pequeña capa de agua destilada. Los gases disueltos se eliminaron mediante vacío antes de la polimerización, que se desarrollaba a temperatura ambiente. Una vez finalizada ésta, los geles se recubrían con una capa de 1 cm de gel de empaquetamiento conteniendo acrilamida al 4% en Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, preparado según el protocolo descrito anteriormente, modificando el volumen de la solución de acrilamida y corrigiendo el volumen final con agua destilada. El tampón de electroforesis contenía Tris (3,6 g/l)-glicina (15,3 g/l), pH 8,3, Tritón X-100 0,1% , Tris-tioglicolato 4 mM y DTE 1 mM. Una vez aplicada la muestra (aproximadamente 0,3 ml), se sometió el sistema a una corriente constante de 1,5 mA/gel durante 18 horas a 4°C. La banda de citocromo b-559 -caracterizada espectrofotométricamente- se cortó y homogeneizó a mano en un pequeño volumen de tampón de electroforesis, sometiendo la suspensión a agitación suave bajo atmósfera de argón a 4°C durante 2 horas, para facilitar la difusión del citocromo atrapado en el gel. Los restos del gel se eliminaron centrifugando a 3000xg durante 1 hora.

En otros casos se emplearon cilindros de vidrio de 6 mm de diámetro para la electroforesis.

#### II.B.10.2. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico. Determinación de pesos moleculares

Las electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Weber y Osborn (1975) en el sistema Shandon, usando cilindros de vidrio de 4 mm de diámetro interno con 1,5 cm de gel de empaquetamiento al 4% de acrilamida y 7 cm de gel de desarrollo al 9%. La preparación de los geles se realizó según el procedimiento descrito en el apartado II.B.10.1., pero eliminando el Tritón X-100, glicerol y DTE, y añadiendo SDS al 0,1% (p/v). Las proteínas patrón (en torno a 8 µg), disueltas

previamente en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8, y el citocromo b-559 se calentaron por separado a 100°C durante 5 minutos en presencia de SDS 1% y 2-mercapto-etanol 1%. Una vez enfriadas ambas muestras, se les añadió glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,01%, aplicándose 100 µl por tubo. La electroforesis se desarrolló aplicando inicialmente una intensidad de 2,5 mA/gel, hasta que el frente había recorrido el gel de empaquetamiento (1 hora, aproximadamente), elevándose a continuación la intensidad a 3-4 mA/gel y manteniéndose así hasta que el colorante alcanzó el extremo inferior de los geles (3-4 horas). El proceso se desarrolló a 4°C, empleándose como tampón de electroforesis Tris (6 g/l)-glicina (28,8 g/l), pH 8,3, conteniendo SDS al 0,1% y DTE 2 mM.

Las proteínas utilizadas como patrones de peso molecular fueron: fosforilasa b (94 kDa); seroalbúmina bovina (67 kDa); ovoalbúmina (43 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa); inhibidor de la tripsina de soja (20,1 kDa);  $\alpha$ -lactoalbúmina (14,4 kDa) y citocromo c (12,4 kDa).

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se localizaron tiñéndolas por inmersión de los geles en una solución de azul de Coomassie R al 0,25% en 9% de ácido acético y 45% de metanol. Después de varias horas de tinción (entre 3 y 5), los geles se lavaron repetidas veces en una solución de ácido acético al 7% y metanol al 5% con una pequeña cantidad de resina DOWEX 50 WX2, con el fin de acelerar el proceso de desteñido. Tras esto, las proteínas se visualizan como bandas de color azul. Los geles una vez teñidos se conservaron en agua destilada.

Después de la tinción para proteínas, se realizaron densitogramas de los geles en un espectrofotómetro Beckman DU-7 con un accesorio de barrido de geles Beckman 596464 (Beckman Instruments Inc., EE.UU.). Para ello, los geles se

colocaron en tubos de vidrio de 5 mm de diámetro, midiéndose la absorbancia a 600 nm a lo largo del gel.

Para la determinación del peso molecular del citocromo b-559 se representaron en ordenadas, en escala semilogarítmica, los pesos moleculares de las proteínas patrones y en abcisas la movilidad electroforética relativa de cada proteína respecto al frente (Rf) determinada mediante los densitogramas.

Todas las electroforesis se realizaron en una cámara fría a 4°C utilizando una fuente de alimentación Pharmacia ECPS 3000/150 (Pharmacia Fine Chemicals, Suecia).

#### II.B.11. Incorporación del citocromo b-559 en liposomas

El citocromo b-559 purificado fué incorporado en liposomas según el método de Matsuda y Buttler (1983), con algunas modificaciones. A una mezcla de 20  $\mu$ l de fosfatidiletanolamina 100 mM y 5  $\mu$ l de fosfatidilcolina 100 mM, gaseada con argon durante unos minutos hasta que se evaporó totalmente el solvente, se añadieron 400  $\mu$ l de una solución de citocromo b-559 purificado (1  $\mu$ M). La mezcla se mantuvo en agitación suave, a 4°C y bajo atmósfera de nitrógeno, para prevenir los daños por oxidación del citocromo, durante dos horas. La preparación de liposomas resultante fue diluida con 400  $\mu$ l de Tricina-KOH 10 mM, pH 7,5, conteniendo glicerol al 15%.

## II.C. REACTIVOS

Los siguientes productos procedían de Sigma Chemical Co. (EE.UU.): PMSF; PMS; PES; DTE; DPIP; duroquinona; DCMU; DBMIB; Tris; Tricina; Tritón X-100; TMPD; tioglicolato; EDTA; MES; valinomicina; fosfatidilcolina; fosfatidiletanolamina; azul de Coomassie; polilisina y pirogarol.

El ditionito sódico; hidroquinona; quinhidrona; ferricianuro potásico; azida sódica; sacarosa; dodecil sulfato sódico; azul de bromofenol; 2-mercapto-etanol e hidroxilamina, se obtuvieron de Merck (Alemania Federal).

El CCCP y citocromo c procedían de Boehringer (Alemania Federal). El DAD y la 1,2-naftoquinona de Aldrich-Europe (Bélgica). De Pharmacia (Suecia), se obtuvieron: Sephadex G-25 Fine; azul dextrano 2000 y los patrones para la determinación de pesos moleculares por electroforesis y filtración en gel. La DEAE-celulosa procedía de Whatman (Gran Bretaña). El Mv; TEMED; DOWEX 50 WX2; ovoalbúmina y persulfato amónico de Serva (Alemania Federal). La acrilamida y metilén-bisacrilamida se obtuvieron de Janssen Chimica (Bélgica). El resto de los productos utilizados procedían de Merck y de Sigma y eran de grado analítico.

El pirogarol se preparó antes de cada titulación potenciométrica en una solución alcalina previamente gaseada con argón. La quinhidrona se preparó en tampón comercial Titrisol (pH 7). El CCCP; DCMU; DBMIB; DAD; 1,2-naftoquinona; duroquinona y valinomicina se disolvieron en etanol.

El resto de los reactivos se prepararon en agua destilada que se obtuvo mediante un destilador de vidrio DRA (España). El argón N-50 fué suministrado por la Sociedad Española del Oxígeno.

### **III. RESULTADOS**

### III.A. ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS EN CLOROPLASTOS Y PARTICULAS DEL FOTOSISTEMA II

En esta sección se ha llevado a cabo una caracterización de las actividades fotosintéticas de cloroplastos y partículas del fotosistema II, preparaciones utilizadas posteriormente en los estudios relativos al citocromo b-559.

Se ha realizado además un estudio de los efectos de diferentes agentes y condiciones experimentales en las actividades fotosintéticas de cloroplastos y partículas del fotosistema II. Estos agentes serán los mismos empleados para la posterior caracterización del citocromo b-559, objeto fundamental de este trabajo.

#### III.A.1. Cloroplastos

##### III.A.1.1. Actividades fotosintéticas

En la Tabla I se muestran las actividades fotosintéticas de cloroplastos medidas como desprendimiento de oxígeno, utilizando diversos aceptores y donadores de electrones. Con el sistema  $H_2O \rightarrow \text{Ferri}$ , que determina la actividad fotosintética global, los cloroplastos presentan tasas de desprendimiento de oxígeno en torno a 24  $\mu\text{moles/mg}$  de clorofila.hora, similares a las descritas en la literatura. Estos valores se multiplican por 4,3 cuando se añade el desacoplante amonio, lo cual indica la existencia de un buen acoplamiento, y, por tanto, el buen estado de los cloroplastos extraídos. Los sistemas  $H_2O \rightarrow \text{DPIP}$ ,  $H_2O \rightarrow \text{DPIP/Ferri}$  y  $H_2O \rightarrow \text{DAD/Ferri}$  permiten estimar la actividad fotosintética del fotosistema II, determinándose valores de desprendimiento de oxígeno muy similares en los tres casos, si bien el sistema  $H_2O \rightarrow \text{DAD/Ferri}$  parece ser el más efectivo. El amonio no afecta en absoluto a la actividad fotosintética del fotosistema II medida con los tres sistemas, ya que los aceptores utilizados extraen los electrones

TABLA I

ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA MEDIDAS COMO DESPRENDIMIENTO DE OXIGENO

Sistema	$\mu\text{moles de oxígeno / mg de clorofila.hora}$	
	- $\text{NH}_4^+$	+ $\text{NH}_4^+$
$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ferri}$	24,3	105,1
$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DPIP}$	58,8	58,8
$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DPIP/Ferri}$	67,0	67,0
$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DAD/Ferri}$	73,6	73,6
$\text{Asc/DPIP} \rightarrow \text{Mv/O}_2$	77,4	331,8

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, y cloroplastos frescos correspondientes a 150  $\mu\text{g}$  de clorofila. En el sistema  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ferri}$  se añadió ferricianuro potásico 5 mM. En el sistema  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DPIP}$  se añadió DPIP 180  $\mu\text{M}$ . En el sistema  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DPIP/Ferri}$  se añadió ferricianuro 5 mM y DPIP 60  $\mu\text{M}$ . En el sistema  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DAD/Ferri}$  se añadió ferricianuro 5 mM y DAD 60  $\mu\text{M}$ . En el sistema  $\text{Asc/DPIP} \rightarrow \text{Mv/O}_2$  se añadió ascorbato sódico 5 mM, DPIP 60  $\mu\text{M}$ , Mv 0,1 mM,  $\text{NaN}_3$  0,5 mM y DCMU 10  $\mu\text{M}$ . En este sistema los datos obtenidos corresponden a consumo de oxígeno. Donde se indica se añadió  $\text{NH}_4^+$  5 mM. Todos los ensayos se realizaron a 20°C e iluminando con luz roja de 300  $\text{W/m}^2$ .

del lado reductor del fotosistema II antes de los sitios de acoplamiento. La actividad del fotosistema I, medida con el sistema Ascorbato/DPIP  $\rightarrow$  Mv/O<sub>2</sub>, presenta valores de consumo de oxígeno satisfactorios (77  $\mu$ moles/mg de clorofila.hora), que se multiplican por 4,5 tras la adición de amonio, lo que confirma el buen acoplamiento de los cloroplastos.

### III.A.1.2. Efecto de diferentes agentes sobre las actividades fotosintéticas

#### III.A.1.2.1. Efecto del envejecimiento

Se ha estudiado la evolución en el tiempo de las actividades fotosintéticas de cloroplastos, bien sea del sistema global, o de cada fotosistema funcionando por separado (Tabla II). Las tasas de desprendimiento de oxígeno detectadas con el sistema H<sub>2</sub>O  $\rightarrow$  Ferri descienden rápidamente, situándose a las 72 horas de haber sido extraídos los cloroplastos en el 10% de la tasa inicial, y desapareciendo totalmente a los 7 días. La actividad del fotosistema II desciende más lentamente y se sitúa a las 72 horas alrededor del 30% de la tasa inicial, estabilizándose posteriormente en valores similares durante varios días. El sistema Ascorbato/DPIP  $\rightarrow$  Mv/O<sub>2</sub> presenta tasas de consumo de oxígeno enormemente estables, decreciendo tan solo un 20% 7 días después de la extracción.

#### III.A.1.2.2. Efecto de diferentes inhibidores del flujo electrónico

La Tabla III muestra el efecto del DBMIB sobre las actividades fotosintéticas de cloroplastos. La adición de DBMIB, inhibidor competitivo del "pool" de quinonas, provoca una disminución bastante significativa de la actividad fotosintética del sistema global (hasta un 75%) y, en menor cuantía, de la del fotosistema II (un 50%, aproximadamente). Esta

TABLA II

EFFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA

tiempo (horas)	Sistema		
	H <sub>2</sub> O → Ferri	H <sub>2</sub> O → DPIP	Asc/DPIP → Mv/O <sub>2</sub>
0	152,0	58,8	340,6
2,5	117,9	53,3	364,8
6,5	82,9	43,8	320,0
20	64,0	29,3	305,9
30	84,5	20,6	312,6
44	29,5	19,0	271,4
51	23,6	20,3	275,1
72	17,2	21,1	n.d.*
120	10,0	10,8	303,8
168	0,0	18,5	265,5

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, y cloroplastos frescos correspondientes a 150 µg de clorofila. Las concentraciones de los reactivos son las indicadas en la Tabla I. Los ensayos H<sub>2</sub>O → Ferri y Asc/DPIP → Mv/O<sub>2</sub> incluían además NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 5 mM. Las preparaciones de cloroplastos se almacenaron en hielo y oscuridad los tiempos indicados hasta que se realizaron los ensayos. Los datos corresponden a µmoles de oxígeno / mg de clorofila.hora.

\*n.d.: dato no medido.

TABLA III

EFFECTO DEL DBMIB SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA. REVERSION POR TMPD

Adición	Sistema		
	$H_2O \rightarrow Ferri$	$H_2O \rightarrow DAD/Ferri$	$Asc/DPIP \rightarrow Mv/O_2$
Ninguna	105,0	73,6	364,8
DBMIB	26,5	42,4	364,8
DBMIB/TMPD	43,2	42,4	406,9

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, y cloroplastos frescos correspondientes a 150  $\mu$ g de clorofila. Las concentraciones de los reactivos en los distintos ensayos son las indicadas en la Tabla I. Donde se indica se añadió DBMIB 2  $\mu$ M y TMPD 100  $\mu$ M. Los datos corresponden a  $\mu$ moles de oxígeno/mg de clorofila.hora

diferencia podría deberse a que sólo una pequeña parte de los electrones aceptados por el DAD pasarían a través de las plastoquinonas, mientras que la mayoría de los electrones extraídos por el ferricianuro deben pasar por el "pool" de plastoquinonas. El DBMIB no interfiere, por otra parte, en la actividad del fotosistema I, puesto que el DPIP reducido dona los electrones a la cadena de transporte después de las plastoquinonas.

La adición de TMPD -eficaz transportador de electrones entre plastoquinonas y plastocianina- a cloroplastos tratados con DBMIB produce una reversión parcial de la inhibición producida por este agente en la actividad fotosintética global, fenómeno descrito anteriormente (Trebst, 1980). Esta adición no afecta, sin embargo, al bloqueo de la actividad del fotosistema II.

El herbicida DCMU -agente que bloquea el flujo electrónico entre los aceptores primarios del fotosistema II,  $Q_A$  y  $Q_B$ - inhibe totalmente la actividad fotosintética del sistema global y del fotosistema II (Figura 7).

La valinomicina produce una inhibición parcial de la actividad fotosintética de cloroplastos (Tabla IV), tanto del sistema global como del fotosistema II. Dicha inhibición se puede cifrar en ambos casos en un 30% de la tasa de desprendimiento de oxígeno.

En la Tabla V se muestra el efecto del cianuro potásico sobre las actividades fotosintéticas del sistema global y del fotosistema II medidas espectrofotométricamente. Puede observarse como la incubación durante 20 minutos con 2 mM de cianuro produce una fuerte inhibición de la actividad fotosintética global, que se reduce en un 75% aproximadamente, mientras que no afecta significativamente a la actividad del fotosistema II.

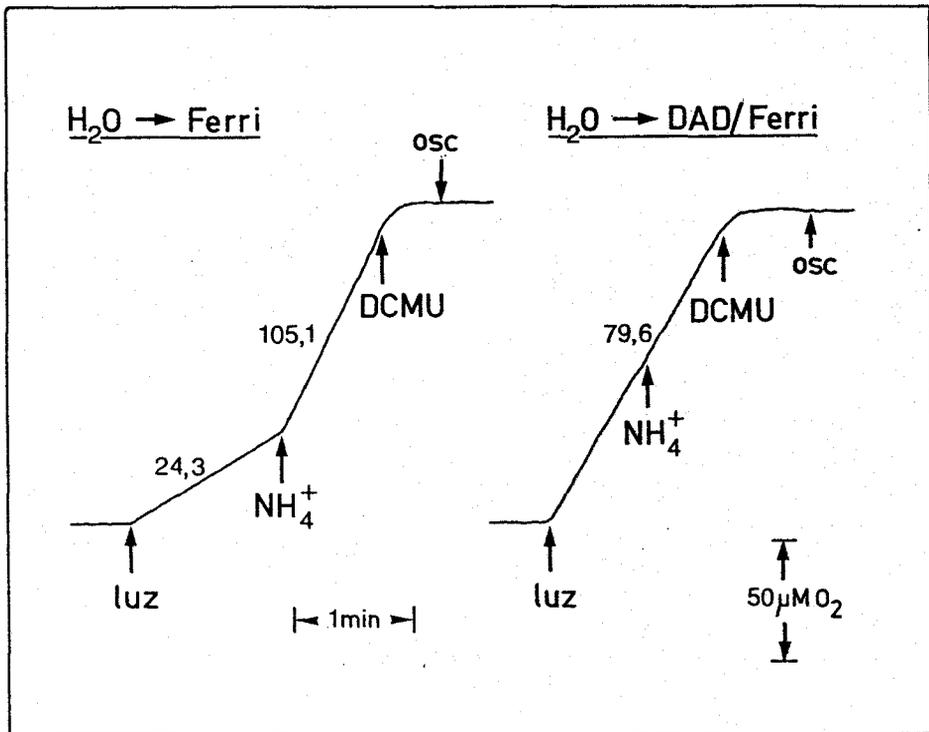


Figura 7. Efecto del DCMU sobre las actividades fotosintéticas de cloroplastos de espinaca medidas como desprendimiento de oxígeno

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, cloroplastos frescos correspondientes a 150  $\mu\text{g}$  de clorofila, y los reactivos usados en los distintos ensayos a las concentraciones indicadas en la Tabla I. Donde se indica se añadió amonio 5 mM y DCMU 10  $\mu\text{M}$ . El resto de las condiciones como se describen en la Tabla I. Los valores de las pendientes expresan las tasas de desprendimiento de oxígeno en  $\mu\text{moles/mg}$  de clorofila.hora.

TABLA IV

EFFECTO DE LA VALINOMICINA SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA

Adición	Sistema	
	$H_2O \rightarrow Ferri$	$H_2O \rightarrow DAD/Ferri$
Ninguna	92,9	79,6
Valinomicina 50 $\mu M$	63,0	55,3

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, y cloroplastos frescos correspondientes a 150  $\mu g$  de clorofila. Las concentraciones de los reactivos son las indicadas en la Tabla I. Los datos corresponden a  $\mu moles$  de oxígeno / mg de clorofila. hora.

TABLA V

EFFECTO DEL CIANURO SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA MEDIDAS ESPECTROFOTOMETRICAMENTE

Tratamiento	Sistema	
	H <sub>2</sub> O → Ferri	H <sub>2</sub> O → DAD/Ferri
Ninguno	229,4	112,9
20 min incubación	204,7	176,5
KCN 2 mM + 20 min incubación	52,9	144,7

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, y cloroplastos frescos correspondientes a 10 µg de clorofila. En el ensayo H<sub>2</sub>O → Ferri se añadió 1 µmol de ferricianuro y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 5 mM. En el ensayo H<sub>2</sub>O → DAD/Ferri se añadió DAD 10 µM y 1 µmol de ferricianuro. Los ensayos se realizaron a 20°C iluminando con luz roja de 2000 W/m<sup>2</sup>. El resto de las condiciones se detallan en el apartado II.B.4. de Materiales y Métodos. Los datos de la tabla corresponden a µmoles de ferricianuro reducido / mg de clorofila.hora.

### II.A.1.2.3. Efecto del CCCP

En la Tabla VI se muestra como la adición de concentraciones crecientes de CCCP provoca un aumento progresivo de la actividad fotosintética de los cloroplastos (efecto desacoplante) hasta una concentración de  $10 \mu\text{M}$ , en que se multiplica por 4,3 la actividad. A partir de esta concentración, la adición de concentraciones superiores de CCCP provoca una disminución progresiva de la tasa de desprendimiento de oxígeno, debida a un efecto inhibitor sobre el sistema de rotura de agua.

### III.A.2. Partículas del fotosistema II

#### III.A.2.1. Actividades fotosintéticas

En la Tabla VII se presentan las actividades fotosintéticas de partículas del fotosistema II, medidas como desprendimiento de oxígeno, utilizando diferentes sistemas aceptores y donadores de electrones. Las mejores tasas de desprendimiento de oxígeno,  $70 \mu\text{moles/mg}$  de clorofila.hora, se consiguen con el sistema  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DPIP/Ferri}$ . Estas tasas suelen ser muy similares a las obtenidas con el mismo sistema en cloroplastos. Los sistemas  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DPIP}$  y  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DAD/Ferri}$  se muestran poco efectivos para medir la actividad fotosintética de las partículas del fotosistema II, al igual que el sistema global. El sistema  $\text{Ascorbato/DPIP} \rightarrow \text{Mv/O}_2$ , utilizado como criterio de pureza de estas preparaciones, no presenta ninguna actividad, lo que indica la inexistencia de contaminación debida al fotosistema I.

El amonio no afecta significativamente la actividad fotosintética de las partículas del fotosistema II, lo que indica que éstas no presentan acoplamiento.

TABLA VI

EFFECTO DEL CCCP SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA

CCCP ( $\mu$ M)	Incremento de la actividad (número de veces)
1	1,35
2	1,60
3	1,90
5	2,50
10	4,31
15	4,00
20	4,00
30	3,05

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, y cloroplastos frescos correspondientes a 150  $\mu$ g de clorofila. El efecto se estudió sobre la actividad global, para lo cual se añadió ferricianuro 5 mM. Los datos de incremento en la actividad fotosintética son el cociente de las tasas de desprendimiento de oxígeno después y antes de añadir CCCP.

TABLA VII

ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS DE PARTICULAS DEL FOTOSISTEMA II  
MEDIDAS COMO DESPRENDIMIENTO DE OXIGENO

Sistema	µmoles de oxígeno / mg clorofila.hora	
	- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
H <sub>2</sub> O → DPIP/Ferri	70,0	68,9
H <sub>2</sub> O → DPIP	48,2	43,0
H <sub>2</sub> O → DAD/Ferri	42,0	42,0
H <sub>2</sub> O → Ferri	21,9	21,9
Asc/DPIP → Mv/O <sub>2</sub>	0,0	0,0

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Mes-NaOH 25 mM, pH 6,5, sacarosa 0,3 M, NaCl 10 mM, PMSF 1 mM, y partículas del fotosistema II frescas correspondientes a 150 µg de clorofila. Las concentraciones de los reactivos son las indicadas en la Tabla I. Todos los ensayos se realizaron a 20°C, utilizando luz roja procedente de una fuente de iluminación que suministra 300 W/m<sup>2</sup>.

La utilización de tampones con alta concentración de un estabilizador osmótico, sacarosa 0,3 M, permite determinar tasas de desprendimiento de oxígeno mucho mayores que cuando se emplean tampones sin sacarosa.

### III.A.2.2. Efecto de diferentes agentes sobre las actividades fotosintéticas

#### III.A.2.2.1. Efecto del pH, temperatura y envejecimiento

El análisis de las tasas de desprendimiento de oxígeno de las partículas del fotosistema II a distintos pHs (Figura 8A) indica un óptimo en la zona ácida, a pH 6, descendiendo la actividad conforme el pH aumenta, hasta casi desaparecer a pH 8,5.

Como se muestra en la Figura 8B, la temperatura de ensayo óptima se sitúa entre 25°C y 35°C, reduciéndose considerablemente la tasa de desprendimiento de oxígeno a temperaturas superiores e inferiores.

En la Figura 9 se muestra la evolución en el tiempo de la actividad fotosintética de partículas del fotosistema II. Como puede observarse, el sistema posee una alta estabilidad, comparada con cloroplastos, presentando tasas de desprendimiento de oxígeno de alrededor del 50% de las iniciales tras dos semanas de almacenamiento.

#### III.A.2.2.2. Efecto de diferentes inhibidores del flujo electrónico

En la Tabla VIII se resume el efecto de varios inhibidores sobre la actividad de las partículas del fotosistema II. El DBMIB no produce ningún efecto sobre la tasa de desprendimiento de oxígeno del sistema a una concentración de 2  $\mu\text{M}$ , ni a concentraciones superiores. La valinomicina a

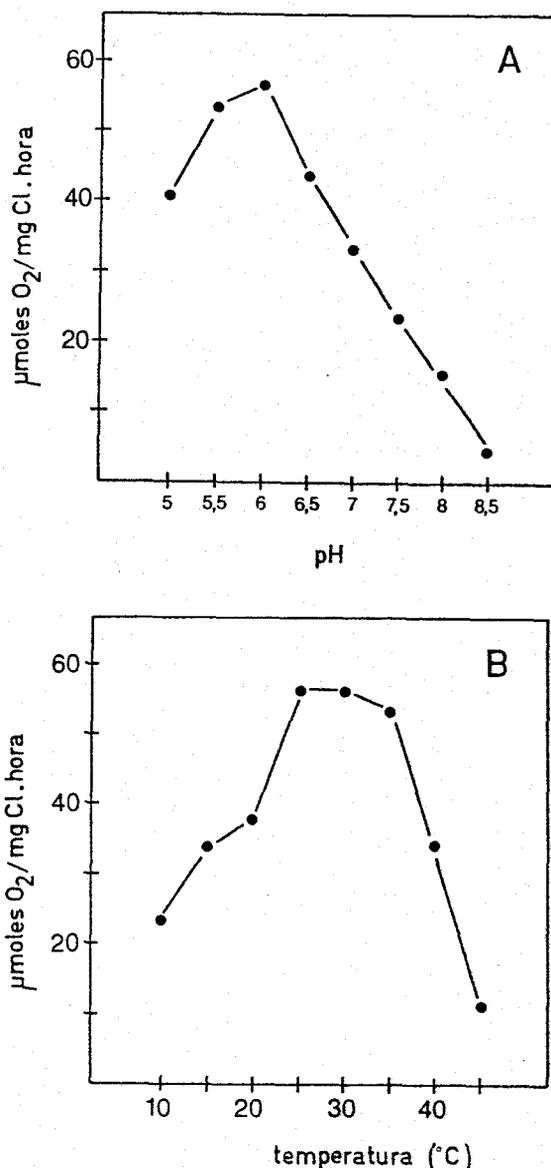


Figura 8. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad fotosintética de partículas del fotosistema II

En A, se determinó la tasa de desprendimiento de oxígeno a diferentes pHs, utilizando para ello los siguientes tampones: malato 50 mM (pHs 5 y 5,5), fosfato 50 mM (pHs 6 y 7); Mes-NaOH 50 mM (pH 6,5) y tricina-KOH 50 M (pHs 7,5; 8 y 8,5). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml, uno de los tampones indicados, sacarosa 0,3 M, NaCl 10 mM, y partículas del fotosistema II correspondientes a 150  $\mu\text{g}$  de clorofila.

En B, la mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Mes-NaOH 25 mM pH 6,5, sacarosa 0,3 M, NaCl 10 mM, PMSF 1 mM, y partículas del fotosistema II frescas correspondientes a 150  $\mu\text{g}$  de clorofila.

Los ensayos en ambos casos se llevaron a cabo con el sistema  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DPIP}/\text{Ferri}$  como se describe en la Tabla I, excepto que en B se realizaron a las temperaturas indicadas.

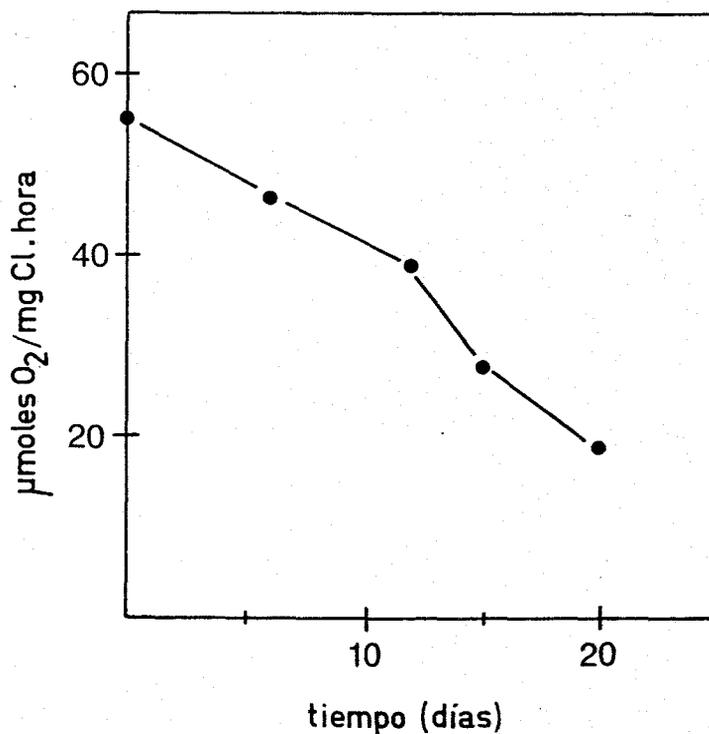


Figura 9. Evolución en el tiempo de la actividad fotosintética de partículas del fotosistema II

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Mes-NaOH 25 mM, pH 6,5, sacarosa 0,3 M, NaCl 10 mM, PMSF 1 mM y partículas del fotosistema II frescas correspondientes a 150 µg de clorofila. Las partículas se almacenaron en hielo y oscuridad durante el tiempo indicado, tras lo cual se determinó la tasa de desprendimiento de oxígeno. Los ensayos se realizaron con el sistema  $H_2O \rightarrow$  DPIP/Ferri como se indica en la Tabla I.

TABLA VIII

EFFECTO DE DIFERENTES INHIBIDORES DEL FLUJO DE ELECTRONES SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE PARTICULAS DEL FOTOSISTEMA II

Adición	µmoles de oxígeno / mg de clorofila.hora
Ninguna	51,4
DBMIB 2 µM	45,4
Valinomicina 50 µM	34,8
KCN 20 mM	0,0
DCMU 10 µM	0,0

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Mes-NaOH 25 mM, pH 6,5, sacarosa 0,3 M, NaCl 10 mM, PMSF 1 mM, y partículas del fotosistema II frescas correspondientes a 150 µg de clorofila. Los distintos efectos se estudiaron sobre la actividad  $H_2O \rightarrow$  DPIP/ Ferri, para lo cual se añadió DPIP 60 µM y ferricianuro 5 mM.

una concentración de 50  $\mu\text{M}$  afecta negativamente al sistema, aunque de forma casi inapreciable. Tanto el cianuro a una concentración de 20 mM como el DCMU a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  inhiben completamente la actividad.

#### III.A.2.2.3. Efecto del CCCP

En la Figura 10 se muestra el efecto del CCCP sobre la actividad fotosintética de partículas del fotosistema II. El CCCP inhibe el desprendimiento de oxígeno por el sistema desde concentraciones muy pequeñas (1 y 5  $\mu\text{M}$ ), reduciéndolo al 50% a concentraciones elevadas (40  $\mu\text{M}$ ).

#### III.A.2.2.4. Efecto del Tritón X-100

Se ha estudiado el efecto del detergente no iónico Tritón X-100 sobre las tasas de desprendimiento de oxígeno de las partículas del fotosistema II (Tabla IX). La incubación con concentraciones crecientes de Tritón X-100 produce una disminución progresiva del desprendimiento de oxígeno por las partículas, llegando a ser de un 40% del inicial con 400 p.p.m. del detergente.

### III.B. CARACTERIZACION REDOX Y ACIDO-BASE DEL CITOCROMO b-559 EN PARTICULAS DEL FOTOSISTEMA II.

Las propiedades redox y ácido-base del citocromo b-559 en cloroplastos de espinaca han sido ya establecidas anteriormente (Galván et al., 1983; Hervás et al., 1985). En esta sección se ha llevado a cabo un estudio de las principales propiedades redox y ácido-base del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II: estado de óxido-reducción; potenciales redox y su dependencia respecto al pH; estabilidad de los pares de potencial del citocromo ante diferentes tratamientos desenergetizantes, etc.

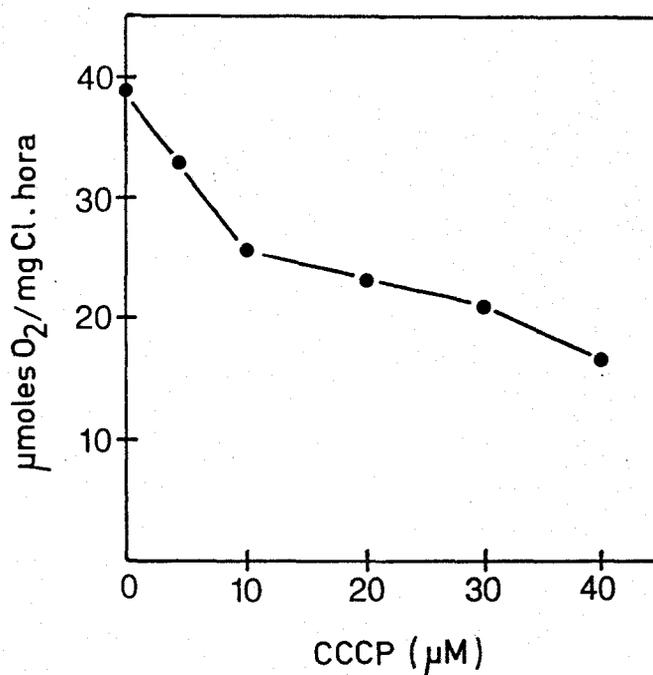


Figura 10. Efecto del CCCP sobre la actividad fotosintética de partículas del fotosistema II

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Mes-NaOH 25 mM, pH 6,5, sacarosa 0,3 M, NaCl 10 mM, PMSF 1 mM, partículas del fotosistema II correspondientes a 150  $\mu\text{g}$  de clorofila y las concentraciones de CCCP indicadas. Los ensayos se realizaron con el sistema  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DPIP}/\text{Ferri}$  como se indica en la Tabla I.

TABLA IX

## EFECTO DEL TRITON X-100 SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE PARTICULAS DEL FOTOSISTEMA II

Tritón X-100 (p.p.m.)	µmoles de oxígeno / mg de clorofila.hora
0	52,6
50	42,6
100	47,8
200	25,9
300	14,0
400	20,0

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Mes-NaOH 25 mM, pH 6,5, sacarosa 0,3 M, NaCl 10 mM, PMSF 1 mM y partículas del fotosistema II correspondientes a 150 µg de clorofila. El efecto se estudió sobre el mismo sistema empleado en la Tabla VIII. Todos los ensayos se realizaron incubando la mezcla de reacción con la concentración de Tritón X-100 indicada en cada caso durante 5 minutos en agitación y a temperatura constante de 20°C, tras lo cual se midió el desprendimiento de oxígeno.

### III.B.1. Estado redox del citocromo b-559

Como paso previo al estudio del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II, se ha determinado el estado redox de este citocromo en cloroplastos con el objeto de poder comparar su situación en ambas preparaciones.

En la Figura 11 se muestran los cambios de absorbancia en el máximo de la banda  $\alpha$  del citocromo b-559 -y los espectros correspondientes a esa zona- producidos por la adición de diferentes agentes reductores y oxidantes en suspensiones de cloroplastos. La adición de hidroquinona (Figura 11A) produce un incremento de absorbancia que corresponde, según muestra el espectro, a la reducción del citocromo f. La adición posterior de ditionito produce la reducción de la fracción oxidada de bajo potencial del citocromo b-559 (en torno a 1/3). Tras la adición de ferricianuro (Figura 11B), la fracción reducida del citocromo b-559 (2/3 del total) se oxida convirtiéndose en la forma oxidada de alto potencial, reducible por hidroquinona. Efectivamente, el espectro de la reducción por hidroquinona posee un máximo a 556 nm, debido a la contribución de los citocromos b-559 y f. La adición posterior de ditionito reduce la fracción oxidada de bajo potencial inicialmente presente.

El tratamiento de las preparaciones de cloroplastos con el detergente Tritón X-100 determina que el citocromo b-559 aparezca únicamente en forma oxidada de bajo potencial reducible por ditionito (Figura 11C). El citocromo f aparece en estas preparaciones parcialmente reducido, como puede observarse por el espectro de la oxidación con ferricianuro, debido posiblemente a la acción de algún reductor endógeno que ha ganado accesibilidad al citocromo por la desorganización de la membrana.

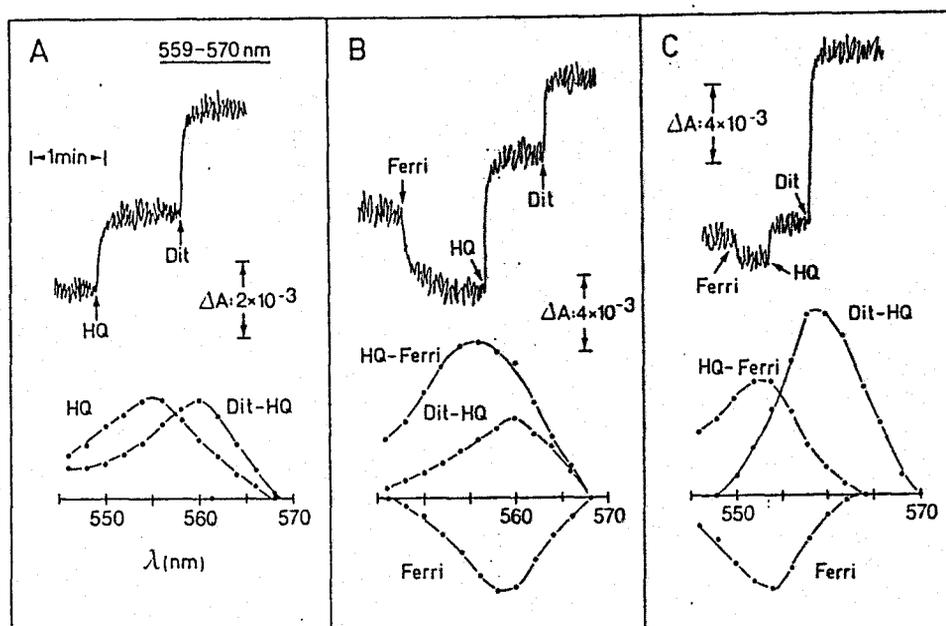


Figura 11. Estado redox del citocromo b-559 en suspensiones de cloroplastos frescas y tratadas con Tritón X-100

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, y cloroplastos correspondientes a 150  $\mu\text{g}$  de clorofila. (A y B) Preparaciones frescas de cloroplastos; (C) preparaciones tratadas con Tritón X-100. En C, los cloroplastos se incubaron con 350 p.p.m. de Tritón X-100 durante 5 minutos a 20°C. Donde se indica se añadió ferricianuro 2 mM, hidroquinona 4 mM y ditionito 2 mM. Las medidas de los cambios puntuales de absorbancia a 559-570 nm y los espectros diferenciales (media de 5 experimentos independientes), se realizaron según se describe en el apartado II.B.4. de Materiales y Métodos.

En la Figura 12 se muestran los cambios de absorbancia en el máximo de la banda  $\alpha$  del citocromo b-559 -y los espectros correspondientes a esa zona- producidos por la adición de diferentes agentes reductores y oxidantes en suspensiones de partículas del fotosistema II. La adición de hidroquinona a partículas del fotosistema II frescas (Figura 12A) provoca un pequeño incremento de absorbancia de carácter inespecífico (espectro sin máximo definido). La adición posterior de ditionito provoca un importante incremento de absorbancia (aproximadamente 1/3 del cambio total) que corresponde, como muestra el espectro, a la reducción de la fracción oxidada de bajo potencial del citocromo b-559. En la Figura 12B se muestra como la adición de ferricianuro a las preparaciones de partículas del fotosistema II produce la oxidación de la fracción inicialmente reducida del citocromo b-559 (2/3), generando una fracción oxidada de alto potencial, que se reduce al añadir hidroquinona; la adición posterior de ditionito reduce la fracción oxidada de bajo potencial del citocromo b-559.

Como muestran los espectros de las Figuras 12A y 12B (todos los máximos alrededor de 559 nm), en ningún caso se observaron interferencias espectrales del citocromo f, pudiéndose atribuir todos los cambios redox producidos al citocromo b-559.

### III.B.2. Estudios potenciométricos del citocromo b-559

#### II.B.2.1. Potenciales medios de óxido-reducción

Las dobles sigmoides detectadas cuando se llevan a cabo titulaciones potenciométricas, tanto oxidativas como reductivas, del citocromo b-559 en las preparaciones de partículas del fotosistema II, ponen de manifiesto la existencia de dos potenciales medios de óxido-reducción, correspondientes a los pares de alto y bajo potencial del citocromo b-559 (Figura

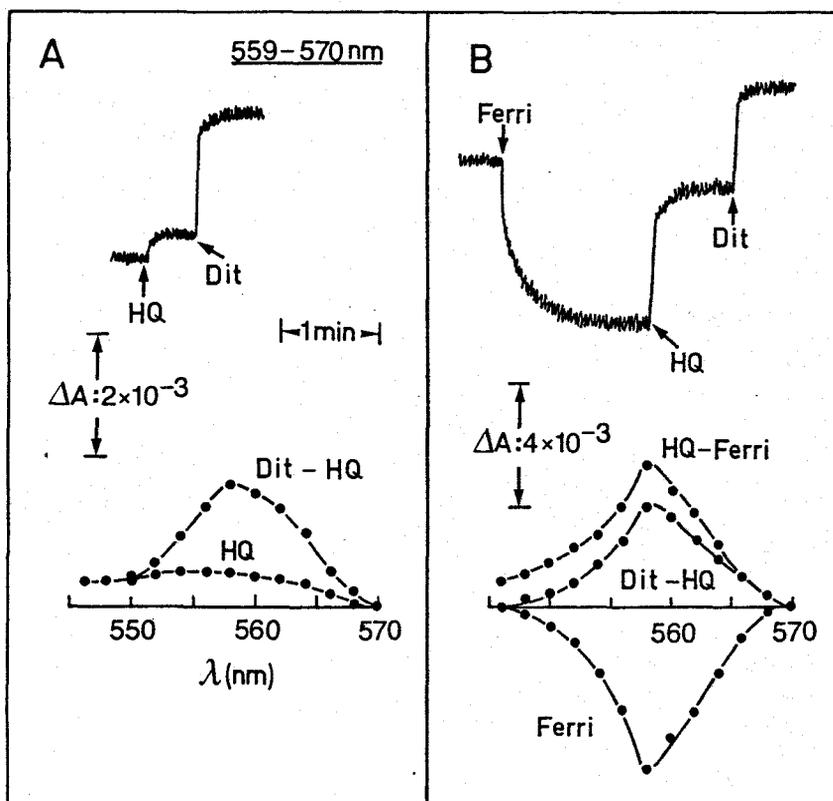


Figura 12. Estado redox del citocromo b-559 en preparaciones de partículas del fotosistema II frescas

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, y partículas del fotosistema II correspondientes a 150  $\mu\text{g}$  de clorofila. Los reactivos añadidos, al igual que el resto de las condiciones, son los referidos en la Figura 5.

13). Los potenciales medios, a pH 7,5, obtenidos en las titulaciones reductivas (Figura 13A) y oxidativas (Figura 13B) no difieren significativamente en el par de bajo potencial, situándose en torno a +150 mV. Para el par de alto potencial se detecta, sin embargo, una pequeña disminución del potencial medio cuando las titulaciones potenciométricas que se realizan son oxidativas. Los valores obtenidos en las titulaciones reductivas son de alrededor de + 380 mV, mientras que en las oxidativas se sitúan en torno a + 340mV.

En la Figura 14 se muestra la representación de Nernst de los potenciales medios de los pares de alto y bajo potencial del citocromo b-559 determinados mediante titulaciones reductivas a pH 7,5 , usando preparaciones frescas de partículas del fotosistema II. Se obtienen unos valores, con una variación de alrededor de  $\pm 10$  mV, de + 380 mV para el par de alto potencial y de + 145 mV para el par de bajo potencial, con valores de  $n$  -número de electrones implicados- muy próximos a 1 en ambos casos.

### III.B.2.2. Dependencia respecto al pH del potencial

Se ha estudiado el efecto del pH sobre el potencial medio de óxido-reducción de los dos pares redox del citocromo b-559 en preparaciones de partículas del fotosistema II (Figura 15). El par de alto potencial es independiente del pH, mostrando un potencial medio constante ( $E'_{\circ}$ , + 380 mV) en el intervalo de pH entre 6,5 y 8,0. Por encima de pH 8 no es posible detectar el par de alto potencial, que se transforma completamente en el de bajo potencial. El par de bajo potencial muestra, por el contrario, independencia de su potencial respecto al pH por encima de pH 7,6, mientras que a pHs menores su potencial decrece 72 mV por unidad de pH, lo cual parece sugerir la implicación de un protón por cada electrón por debajo de dicho  $pK_a$  de 7,6.

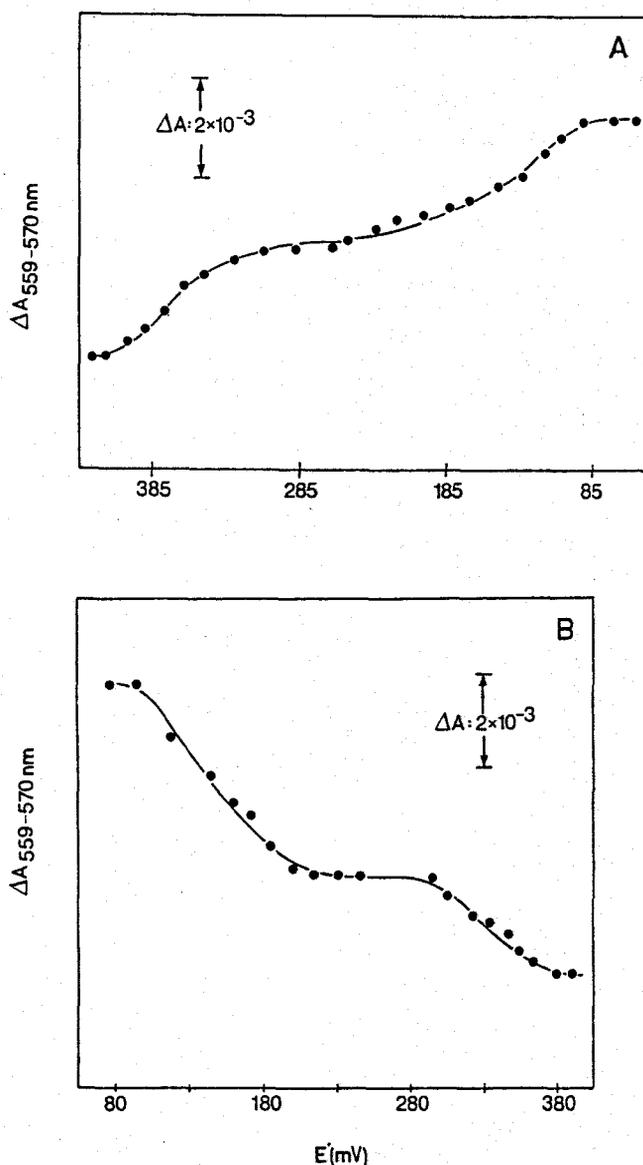


Figura 13. Titulaciones potenciométricas reductiva (A) y oxidativa (B) del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, partículas del fotosistema II correspondientes a 200  $\mu\text{g}$  de clorofila y los siguientes mediadores redox: naftoquinona 20  $\mu\text{M}$ ; duroquinona 20  $\mu\text{M}$ ; DAD 20  $\mu\text{M}$ ; PMS 2,5  $\mu\text{M}$  y PES 10  $\mu\text{M}$ . Las titulaciones se llevaron a cabo como se describe en el apartado II.B.5. de Materiales y Métodos.

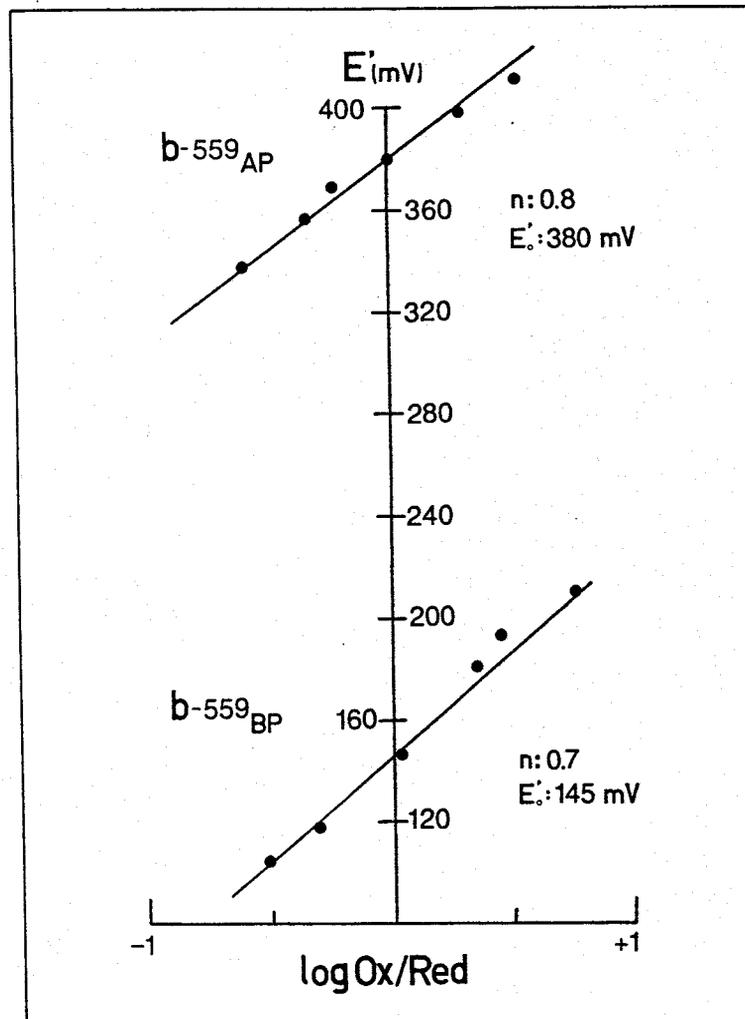


Figura 14. Representación de Nernst de la titulación potenciométrica reductiva de los pares de alto y bajo potencial del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II

La mezcla de reacción es la descrita en la Figura anterior. La titulación se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Se representa el experimento individual con el valor de potencial medio de óxido-reducción más próximo a la media de las diez titulaciones realizadas. El potencial medio obtenido varía + 10 mV en los diferentes ensayos.

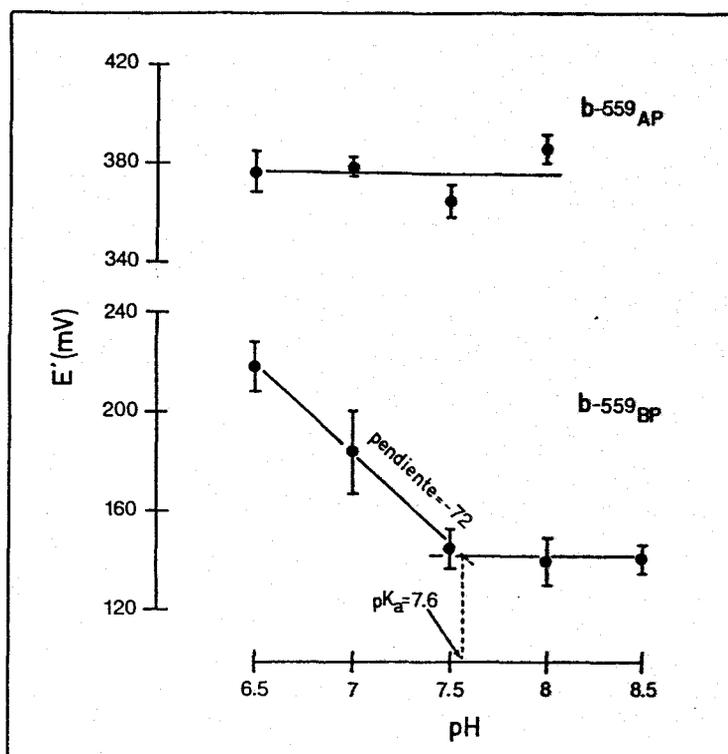


Figura 15. Efecto del pH sobre el potencial medio de óxido-reducción de los pares de alto y bajo potencial del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II

Se determinaron los potenciales medios a distintos pHs mediante titulaciones potenciométricas reductivas como se describe en la Figura 13. Los valores de potencial indicados son la media de 5 experimentos independientes. Sobre cada punto se representa la desviación estándar correspondiente. El valor de  $n$  fué de  $1 \pm 0,3$  en todos los casos. Se emplearon los siguientes tampones: fosfato 50 mM (pHs 6,5 y 7) y Tricina-KOH 50 mM (pHs 7,5; 8 y 8,5).

### III.B.3. Efecto de diferentes agentes sobre la proporción de los pares de alto y bajo potencial del citocromo b-559

Los experimentos que a continuación se exponen van encaminados a caracterizar la estabilidad de los pares de alto y bajo potencial del citocromo b-559 en preparaciones de partículas del fotosistema II sometidas a tratamiento con diferentes agentes físicos y químicos.

#### III.B.3.1. Efecto del pH, temperatura y envejecimiento

En la Figura 16 se muestra el efecto del pH y la temperatura sobre los porcentajes de los pares de alto y bajo potencial del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II. El mayor porcentaje del par de alto potencial (aproximadamente un 70%) se obtiene a pH ligeramente ácido, pH 6,5 (Figura 16A), descendiendo lentamente conforme aumenta el pH, y de forma drástica a partir de pH 7,5, estabilizándose en torno al 50% a partir de pH 8. El par de bajo potencial aumenta en la misma proporción en que disminuye el de alto, lo que sugiere la interconvertibilidad entre ambos pares.

La incubación de las partículas del fotosistema II a temperaturas superiores a 35°C provoca un descenso considerable en el porcentaje del par de alto potencial del citocromo b-559 (Figura 16B), que se reduce hasta el 10% cuando se someten las suspensiones a temperaturas de 50° y 55°C. Los descensos del porcentaje del par de alto potencial a temperaturas elevadas llevan parejos aumentos de la misma cuantía en los porcentajes del par de bajo potencial, si bien a temperaturas superiores a 50°C la cantidad total de citocromo b-559 disminuye alrededor de un 25% por destrucción de la proteína.

En la Figura 17 se muestra la evolución en el tiempo del porcentaje de los dos pares de potencial del citocromo

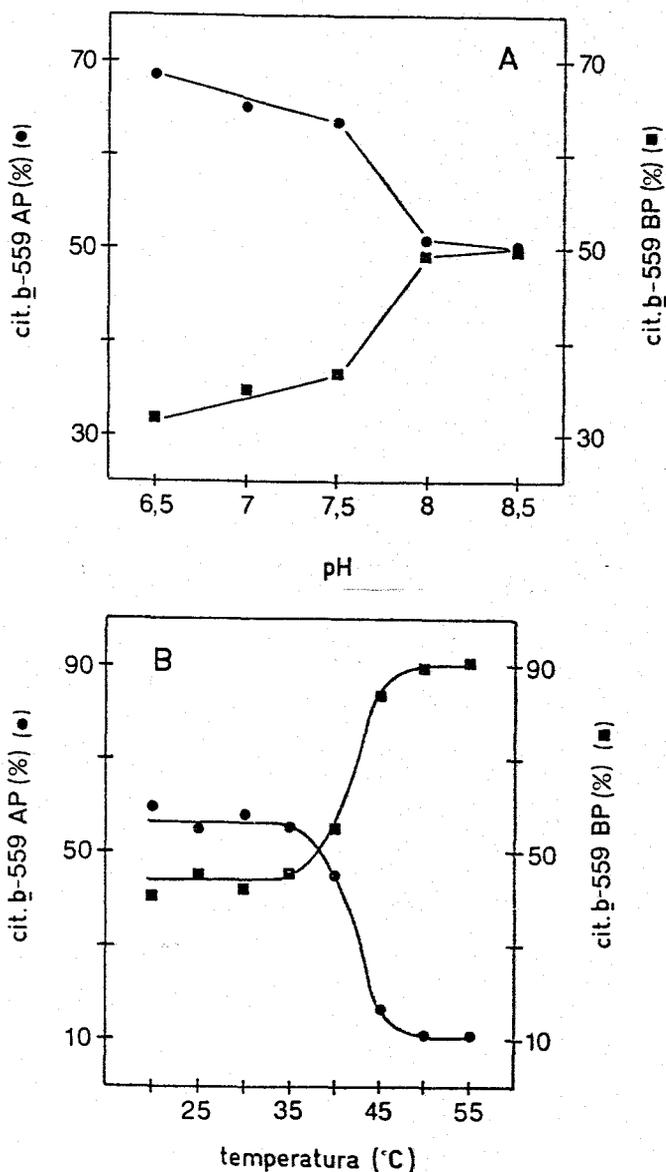


Figura 16. Efecto del pH y la temperatura sobre el porcentaje de los pares de alto y bajo potencial del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II

En el caso A, la mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: partículas del fotosistema II correspondientes a 150  $\mu\text{g}$  de clorofila y, dependiendo del pH del ensayo, uno de los siguientes tampones: Mes-NaOH 50 mM (pH 6,5); fosfato 50 mM (pH 7) o Tricina-KOH 50 mM (pHs 7,5; 8 y 8,5).

En B, la mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Mes-NaOH 50 mM, pH 6,5, y partículas del fotosistema II correspondientes a 150  $\mu\text{g}$  de clorofila. En este caso, las partículas se incubaron durante 5 minutos a la temperatura indicada antes de realizar el ensayo.

Los porcentajes de los pares de alto y bajo potencial se determinaron en ambos casos por reducción diferencial con hidroquinona y ditionito de una muestra previamente oxidada con ferricianuro, como se describe en el apartado II.B.4. de Materiales y Métodos.

b-559 en partículas del fotosistema II. Como puede observarse, el porcentaje del par de alto potencial disminuye muy lentamente con el envejecimiento, manteniéndose tras dos semanas de almacenamiento en valores superiores al 40%. Esta alta estabilidad en el tiempo contrasta con el rápido descenso del porcentaje del par de alto potencial del citocromo b-559 observado en cloroplastos (Galván, 1981; Hervás, 1984).

En la Figura 18A se muestra la evolución con el tiempo del porcentaje del par de alto potencial del citocromo b-559 a diferentes pHs en preparaciones de partículas del fotosistema II. La incubación durante diferentes tiempos a pH 6,5 no altera significativamente el porcentaje del par de alto potencial del citocromo b-559, mientras que a pH 7,5 éste desciende ligeramente conforme aumenta el tiempo de incubación. A pH 8, el porcentaje del par de alto potencial desciende de forma considerable al aumentar el tiempo de incubación, reduciéndose hasta el 15% a las 2 horas.

La adición de ferricianuro a las preparaciones de partículas del fotosistema II incubadas diferentes tiempos a pH alcalino (pH 8) provoca un mayor descenso en el porcentaje del par de alto potencial del citocromo b-559 que en condiciones no oxidantes (Figura 18B). A pH 6,5, el porcentaje del par de alto potencial se mantiene bastante estable después de los diferentes tiempos de incubación en presencia de ferricianuro, descendiendo ligeramente en relación al control realizado en condiciones no oxidantes.

En ambos casos (Figura 18A y B), los porcentajes del par de bajo potencial del citocromo b-559 aumentan en la misma cuantía en que descienden los porcentajes del par de alto potencial.

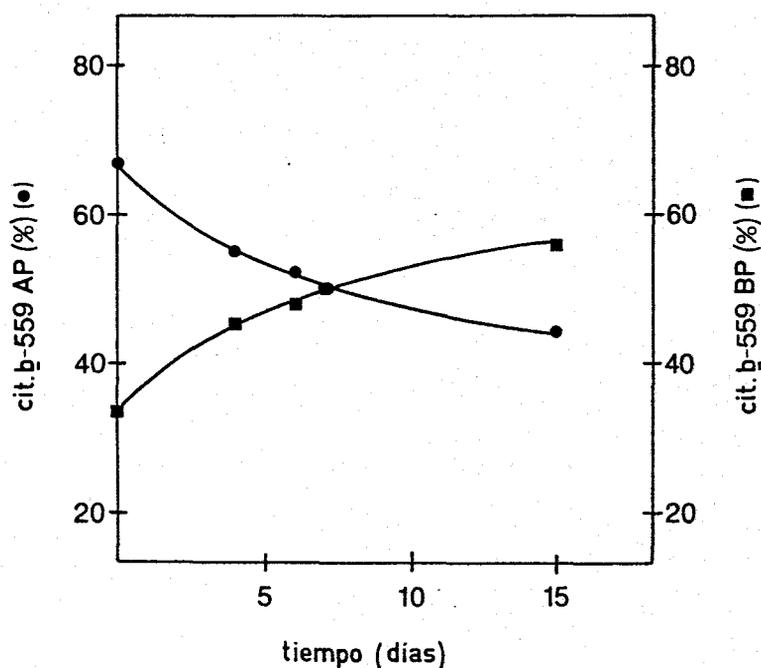


Figura 17. Evolución con el tiempo de los porcentajes de los pares de alto y bajo potencial del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, y partículas del fotosistema II correspondientes a 150  $\mu$ g de clorofila. Las partículas se almacenaron en hielo y oscuridad durante el tiempo indicado, tras lo cual se determinaron los porcentajes de los pares de alto y bajo potencial como en la Figura anterior.

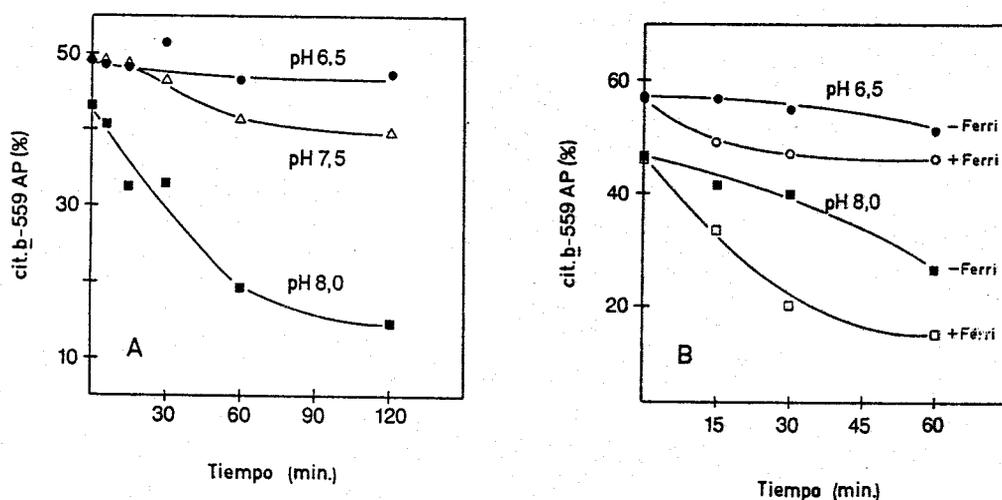


Figura 18. Evolución con el tiempo del porcentaje del par de alto potencial del citocromo b-559 a diferentes pHs en partículas del fotosistema II. Efecto de la incubación en condiciones oxidantes

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Mes-NaOH 50 mM (pH 6,5) o Tricina-KOH 50 mM (pHs 7,5 y 8,5) y partículas del fotosistema II correspondientes a 150 ug de clorofila. La mezcla se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante el tiempo indicado antes de determinar los porcentajes del par de alto potencial como se describe en la Figura 10. En B, la incubación se realizó, donde se indica, en presencia de ferricianuro 2 mM.

### III.B.3.2. Efecto del CCCP

Concentraciones crecientes del agente protonofórico CCCP producen una reducción progresiva del porcentaje del par de alto potencial del citocromo b-559 en preparaciones de partículas del fotosistema II (Figura 19). A partir de 40  $\mu\text{M}$  de CCCP, se estabiliza el porcentaje en torno al 15%. El porcentaje del par de bajo potencial aumenta paralelamente a la disminución del porcentaje del par de alto potencial, permaneciendo constante la cantidad total de citocromo en todos los ensayos.

En la Figura 20 se muestra el efecto de la adición de CCCP sobre el estado redox del citocromo b-559 en preparaciones de partículas del fotosistema II. La adición de concentraciones relativamente bajas de este agente promueve la oxidación del citocromo b-559. Sin embargo, el CCCP no es un agente oxidante per se, como muestra el hecho de que el potencial de la mezcla de reacción no varía significativamente tras su adición.

### III.B.3.3. Efecto del Tritón X-100

La incubación de preparaciones de partículas del fotosistema II con concentraciones elevadas del detergente Tritón X-100 provoca la disminución en el porcentaje del par de alto potencial del citocromo b-559, como puede observarse en la Figura 21. En presencia de ferricianuro, la incubación con el detergente produce una disminución de mayor cuantía en el porcentaje del par de alto potencial que en ausencia de este agente oxidante. Sin ferricianuro, el par de alto potencial desaparece totalmente con 250 p.p.m. de Tritón X-100, mientras que en su presencia sólo se necesitan 200 p.p.m. para eliminarlo totalmente. La disminución en el porcentaje del par de alto potencial del citocromo b-559 conlleva un aumento

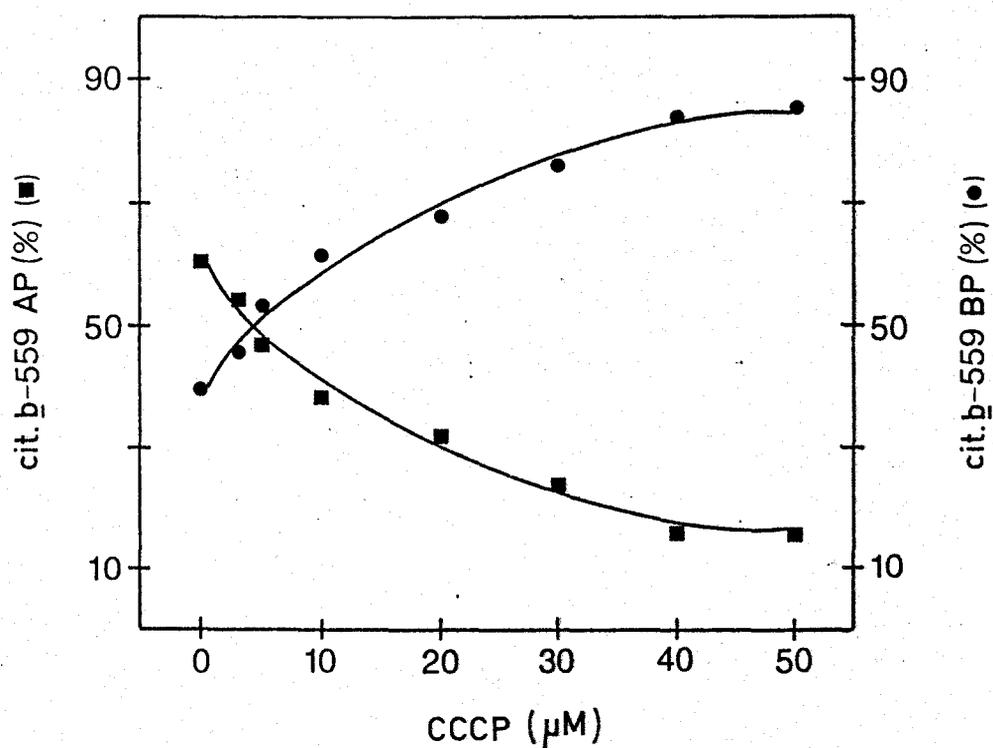


Figura 19. Efecto del CCCP sobre los porcentajes de los pares de alto y bajo potencial del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Mes-NaOH 25 mM, pH 6,5, sacarosa 0,3 M, NaCl 10 mM, PMSF 1 mM, partículas del fotosistema II correspondientes a 150 μg de clorofila y CCCP a las concentraciones indicadas. Los porcentajes de los pares de alto y bajo potencial se determinaron como en la Figura 16.

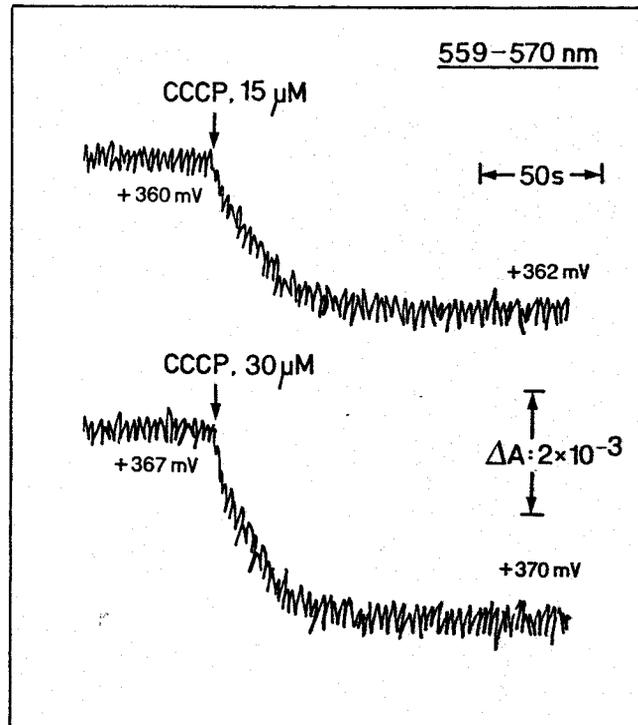


Figura 20. Efecto del CCCP sobre el estado redox del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM pH 7,5, y partículas del fotosistema II correspondientes a 150  $\mu$ g de clorofila. Los cambios de absorbancia y los potenciales se midieron como se describe en Materiales y Métodos.

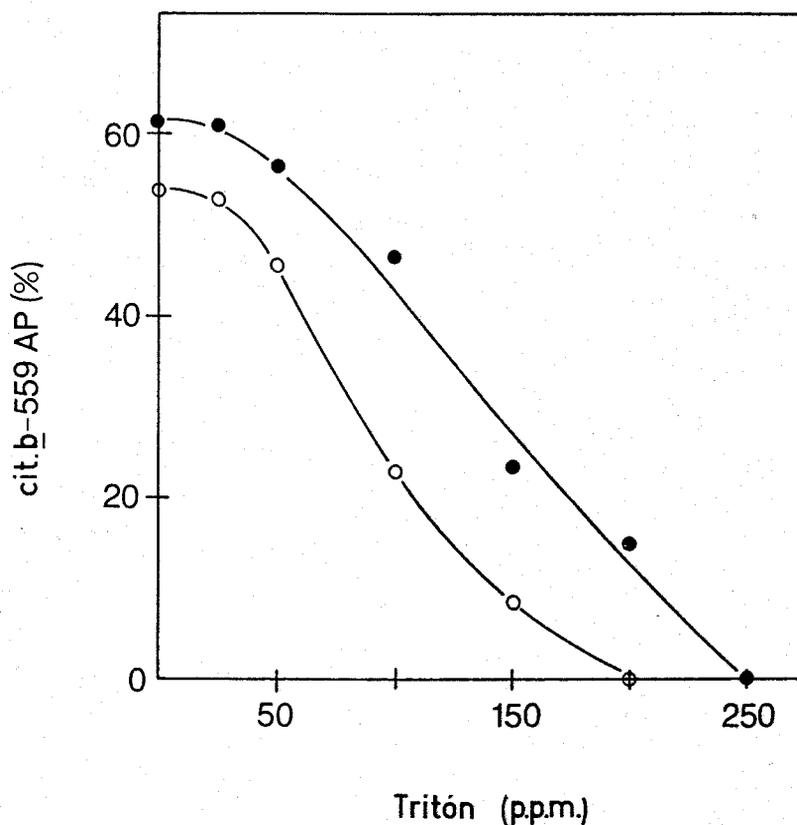


Figura 21. Efecto de la incubación con Tritón X-100 sobre el porcentaje del par de alto potencial del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, y partículas del fotosistema II correspondientes a 150  $\mu$ g de clorofila. Las preparaciones se incubaron durante 5 minutos, a 20°C y en oscuridad, con Tritón X-100 a las concentraciones indicadas, en ausencia (●) y presencia (○) de ferricianuro 2 mM, tras lo cual se determinaron los porcentajes del par de alto potencial como en la Figura 16.

paralelo y de la misma cuantía en el porcentaje del par de bajo potencial.

La Figura 22 muestra el estado redox del citocromo b-559 en preparaciones de partículas del fotosistema II sometidas a incubación con elevadas concentraciones de Tritón X-100. La adición de ferricianuro a las partículas sometidas a este tratamiento produce la oxidación de la fracción inicialmente reducida del citocromo b-559. La posterior adición de hidroquinona no produce cambios significativos en el estado redox del citocromo b-559, poniendo de manifiesto la inexistencia de forma oxidada de alto potencial. El ditionito, por último, reduce todo el citocromo b-559, que se encuentra, por tanto, en su forma oxidada de bajo potencial.

La fracción inicialmente reducida existente en las preparaciones de partículas del fotosistema II tratadas con elevadas concentraciones de Tritón X-100 (Figura 23) es lo suficientemente estable como para permitir su titulación, obteniéndose valores de potencial medio correspondientes al par de alto potencia muy similares en ausencia y en presencia del detergente (alrededor de + 340 mV) . Esta fracción reducida de alto potencial inicialmente presente en las partículas del fotosistema II es algo menor en presencia del detergente que en el control.

#### II.B.4. Regeneración de la forma oxidada de alto potencial del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II tratadas con detergente

En la Figura 24.I se muestra el procedimiento por el cual se consigue la regeneración de una fracción considerable de la forma oxidada de alto potencial reducible por hidroquinona del citocromo b-559 a partir de preparaciones de partículas del fotosistema II sometidas a tratamiento con elevadas concentraciones de Tritón X-100, que determina que

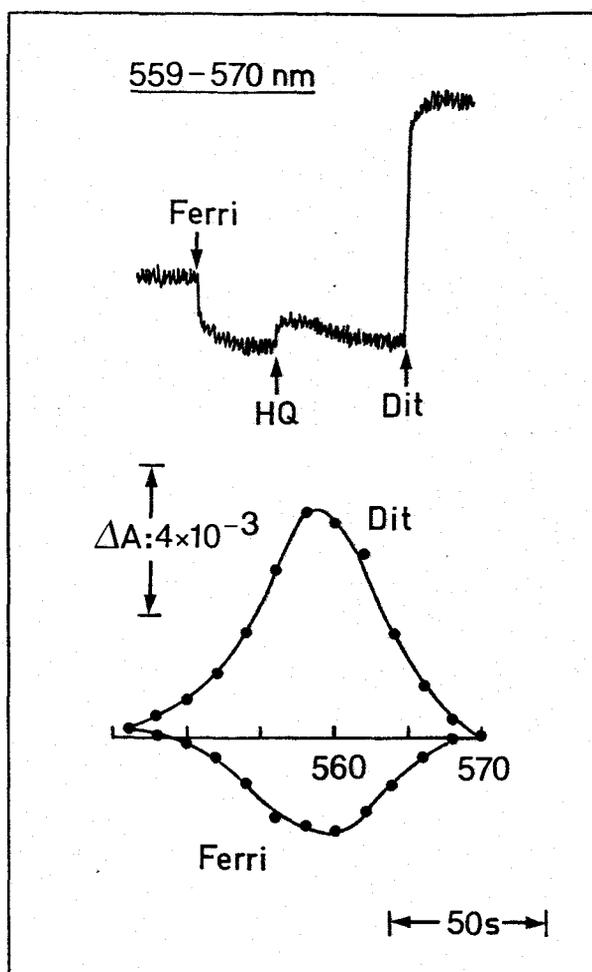


Figura 22. Estado redox del citocromo b-559 en preparaciones de partículas del fotosistema II incubadas con elevadas concentraciones de Tritón X-100

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, y partículas del fotosistema II correspondientes a 150  $\mu\text{g}$  de clorofila. Las preparaciones se incubaron durante 5 minutos, a 20°C y en oscuridad, con 350 p.p.m. de Tritón X-100, tras lo cual se determinó el estado redox del citocromo. Donde se indica se añadió ferricianuro 2 mM, hidroquinona 4 mM y ditionito 2 mM. Las medidas de los cambios puntuales de absorbancia a 559-570 nm y el espectro diferencial (media de 5 experimentos independientes) se realizaron como se describe en el apartado II.B.4. de Materiales y Métodos.

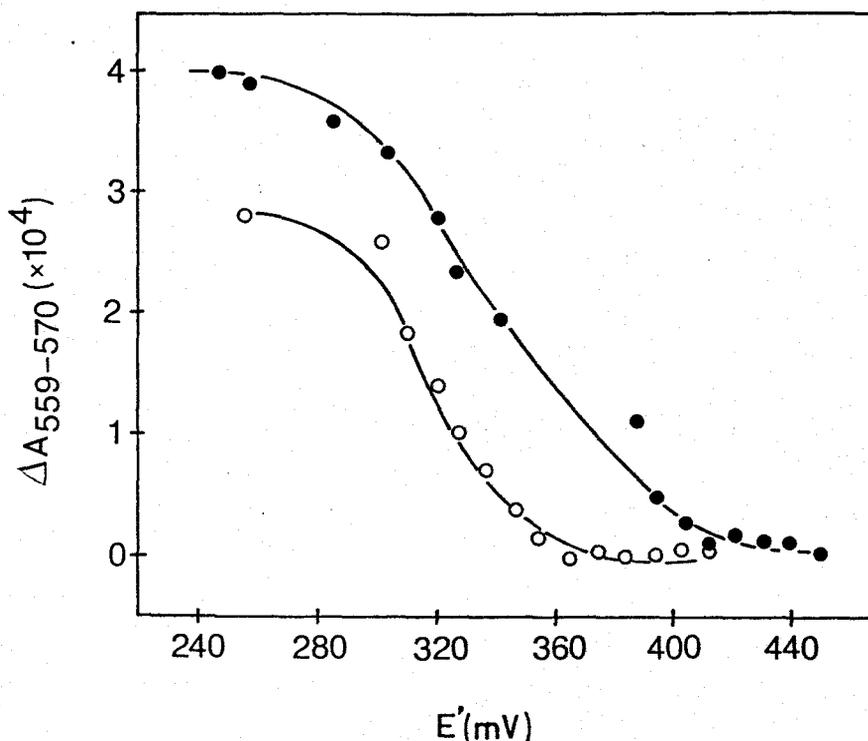


Figura 23. Titulación potenciométrica oxidativa de la fracción inicialmente reducida del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II en ausencia (●) y presencia (○) de Tritón X-100

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, partículas del fotosistema II correspondientes a 150  $\mu\text{g}$  de clorofila y los mediadores redox utilizados en la Figura 7. En el caso de la titulación en presencia de Tritón X-100 se añadió éste a una concentración final de 250 p.p.m. Las titulaciones oxidativas se llevaron a cabo como se describe en el apartado II.B.5. de Materiales y Métodos, salvo que en este caso no se añadió ditionito.

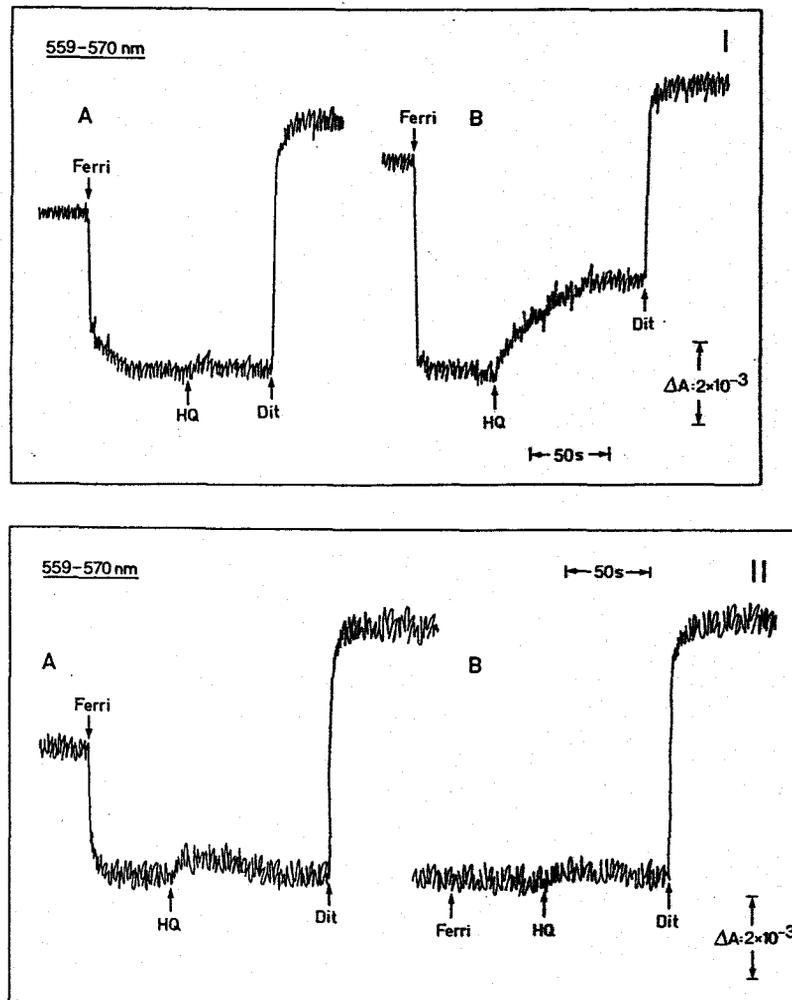


Figura 24. Regeneración de la forma oxidada de alto potencial del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II tratadas con Tritón X-100

(IA y IIA) Partículas del fotosistema II correspondientes a 300  $\mu\text{g}$  de clorofila se incubaron en tampón Mes-NaOH 50 mM, pH 6,5, durante 5 minutos con 450 p.p.m. de Tritón X-100 y, tras ésto, se determinó el estado redox del citocromo como se describe en Materiales y Métodos. (IB) Partículas sometidas a este mismo tratamiento se oxidaron con ferricianuro 1 mM y posteriormente se redujeron con ditionito 4 mM, tras lo cual se centrifugaron a 37000xg durante 7 minutos para eliminar el detergente. El precipitado resultante se resuspendió en el mismo tampón con ditionito 2 mM, determinándose de nuevo el estado redox del citocromo b-559. En IIB, se omitió la reducción con ditionito 4 mM, así como el ditionito en el tampón de resuspensión. Donde se indica se añadió ferricianuro 2 mM en A y 6 mM en B, hidroquinona 4 mM y ditionito 2 mM.

todo el citocromo se encuentre en la forma oxidada de bajo potencial reducible por ditionito. La adición de ferricianuro a las partículas tratadas con el detergente (Figura 24.IA) oxida la fracción de citocromo b-559 inicialmente reducida. La adición posterior de hidroquinona no produce cambio redox, mientras que si se añade ditionito todo el citocromo b-559 se reduce, lo que implica que en estas condiciones el citocromo b-559 se encuentra en su totalidad en la forma oxidada de bajo potencial. Las partículas, incubadas con Tritón X-100 y oxidadas, se reducen con ditionito a pH 6,5, retirándose posteriormente el detergente por centrifugación (Figura 24.IB). Cuando se oxidan con ferricianuro las partículas libres del detergente, reaparece una fracción considerable de forma oxidada de alto potencial, como se demuestra por el incremento de absorbancia producido por la adición de hidroquinona. La posterior adición de ditionito reduce el resto de citocromo b-559, de bajo potencial.

Cuando el experimento se realiza en condiciones oxidantes no se produce regeneración de una fracción significativa de forma oxidada de alto potencial por el mecanismo antes descrito en partículas sometidas al tratamiento con elevadas concentraciones de Tritón X-100 (Figura 24.II). En la Figura 24.IIA se muestra el control de partículas incubadas con el detergente y oxidadas, donde puede apreciarse que todo el citocromo b-559 aparece en la forma oxidada de bajo potencial reducible por ditionito. Las partículas sometidas al tratamiento con Tritón X-100 y oxidadas se centrifugan, sin añadirles previamente ditionito, para eliminar el detergente (Figura 24.IIB). En estas condiciones, todo el citocromo b-559 se encuentra en la forma oxidada de bajo potencial reducible por ditionito, no habiendo aparecido una fracción significativa de forma oxidada de alto potencial reducible por hidroquinona.

III.C. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS REDOX INDUCIDOS POR LUCES  
SELECTIVAS DE LOS FOTOSISTEMAS I Y II EN LOS CITOCROMOS  
b-559 Y f EN CLOROPLASTOS Y b-559 EN PARTICULAS DEL  
FOTOSISTEMA II

Los experimentos que se detallan en esta sección se orientan básicamente hacia el estudio de la localización del citocromo b-559 en la cadena fotosintética de transporte de electrones de cloroplastos de espinaca. Para ello, hemos realizado un análisis comparativo de los cambios redox inducidos por luces selectivas de los fotosistemas I y II en los citocromo b-559 y f -componente este último perfectamente localizado antes de la plastocianina-, estudiando el efecto de diversos agentes desacoplantes e inhibidores del flujo electrónico fotosintético sobre dichos cambios.

En la parte final se describe la caracterización de los cambios redox inducidos por luz del fotosistema II en el citocromo b-559 que aparece asociado a las partículas del fotosistema II.

III.C.1. Cloroplastos

III.C.1.1. Fotorreacciones de los citocromos b-559 y f  
promovidas por luces de los fotosistemas I y  
II. Efecto del CCCP

La iluminación de suspensiones de cloroplastos frescos con luz selectiva del fotosistema II (650 nm) produce un importante incremento de absorbancia a 559-570 nm y 554-570 nm (Figura 25). El espectro muestra que dichos cambios redox corresponden a la reducción de los citocromos b-559 y f. Una vez apagada la luz de 650 nm, el nivel de reducción se mantiene estable. La iluminación posterior con luz selectiva del fotosistema I (720 nm) produce una disminución de absorbancia que corresponde a la oxidación del citocromo f, como muestra

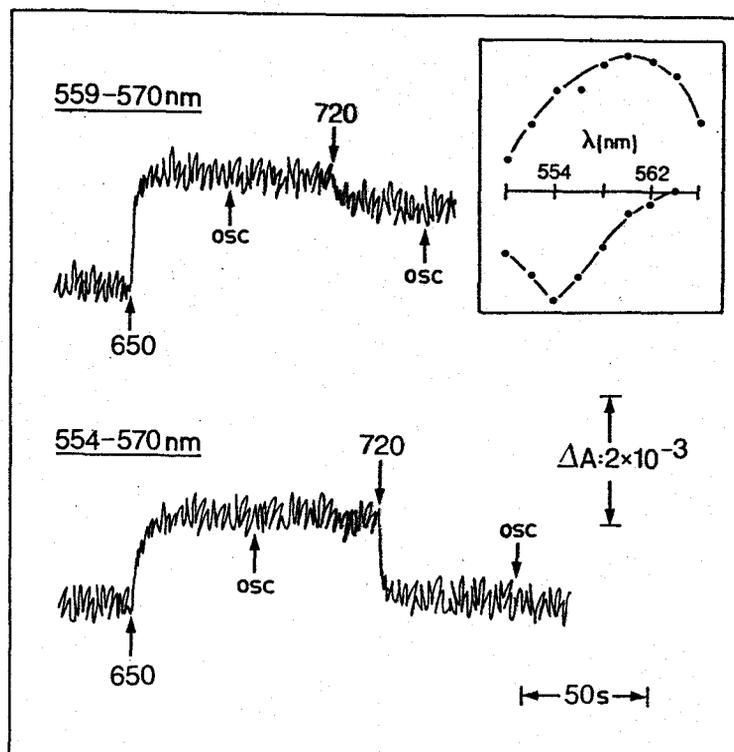


Figura 25. Cambios de absorbancia de los citocromos b-559 y f inducidos por luces selectivas de los fotosistemas I y II en suspensiones de cloroplastos

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, y cloroplastos correspondientes a 200  $\mu\text{g}$  de clorofila. Los cambios de absorbancia se determinaron tras iluminar las preparaciones con luces de 650 nm ( $70 \text{ W/m}^2$ ) o 720 nm ( $50 \text{ W/m}^2$ ), como se describe en el apartado II.B.4. de Materiales y Métodos. En el recuadro se muestran los espectros, en la zona de la banda  $\alpha$  de los citocromos, de la fotorreducción y fotooxidación inducidas por luces de 650 y 720 nm, respectivamente. El espectro se realizó como se describe en Materiales y Métodos. Todos los ensayos se llevaron a cabo a  $20^\circ\text{C}$ .

el máximo del espectro de este cambio. El componente de citocromo b-559 es de muy pequeña cuantía en esta oxidación.

La Figura 26 muestra el efecto del agente protonofórico CCCP sobre los cambios de absorbancia inducidos en los citocromos b-559 y f por luces selectivas de ambos fotosistemas. En presencia de CCCP, la luz de 650 nm promueve la fotorreducción de ambos citocromos. El espectro de esta reacción presenta, en relación al control sin CCCP (Figura 25), un pequeño desplazamiento del máximo hacia la banda del citocromo f. La iluminación posterior de los cloroplastos con luz de 720 nm produce una fuerte oxidación de ambos citocromos, como muestra el espectro, que posee un máximo intermedio entre los máximos de la banda de los dos citocromos.

La adición de CCCP en oscuridad y tras la reducción de ambos citocromos por luz de 650 nm no produce ningún cambio de absorbancia (Figura 27). La iluminación posterior con luz de 720 nm produce una fuerte oxidación, que posee un espectro muy similar al de la figura anterior, lo que indica la implicación de ambos citocromos.

En la Figura 28 se analiza el efecto del CCCP sobre la fotooxidación inducida por luz de 720 nm. La luz de 650 nm induce, como ya se ha establecido, la reducción de los citocromos b-559 y f. La iluminación posterior con luz de 720 nm produce una pequeña oxidación, que se debe fundamentalmente al citocromo f, en tanto que la adición posterior de CCCP induce una fuerte oxidación que corresponde mayoritariamente al citocromo b-559, según muestra el análisis espectral de ambos procesos.

El CCCP induce en oscuridad la oxidación del citocromo b-559 en cloroplastos en los que el citocromo f ha sido previamente oxidado por luz de 720 nm (Figura 29). En efecto, una

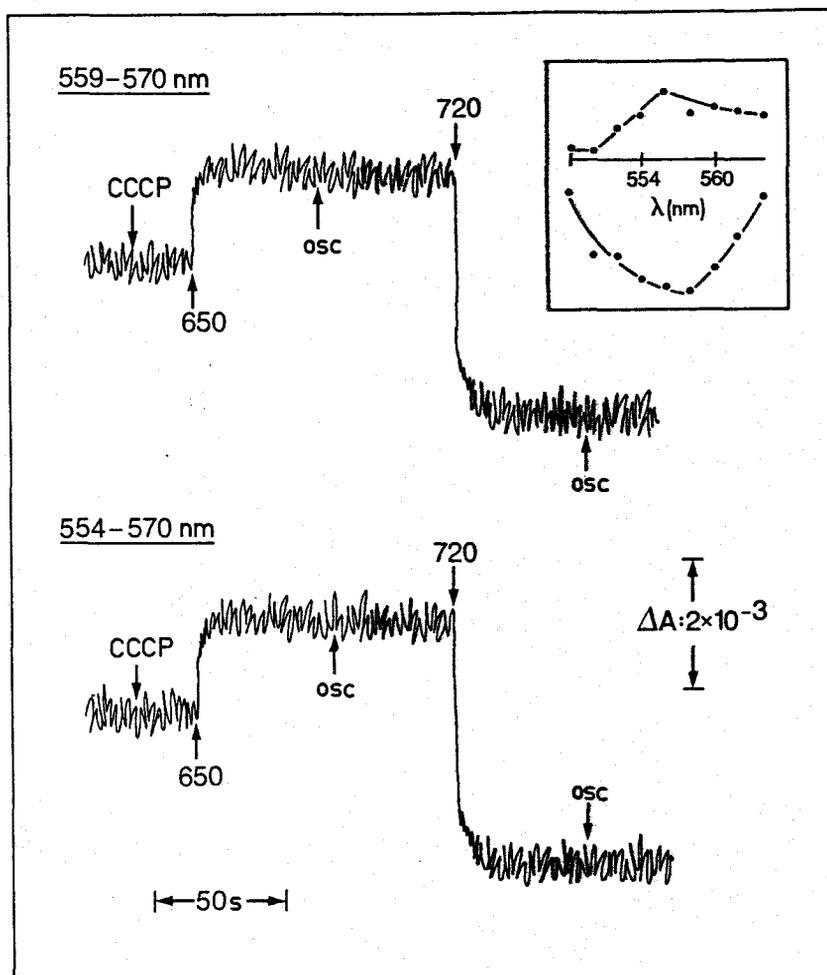


Figura 26. Efecto del CCCP sobre los cambios de absorbancia de los citocromos b-559 y f inducidos por luces de 650 y 720 nm en suspensiones de cloroplastos

Los cambios de absorbancia se determinaron como se describe en la Figura anterior. Donde se indica se añadió CCCP 1  $\mu\text{M}$ . En el recuadro se muestran los espectros de la fotorreducción y fotooxidación inducidas por luces de 650 y 720 nm, respectivamente, a una escala de absorbancia 50% de la indicada.

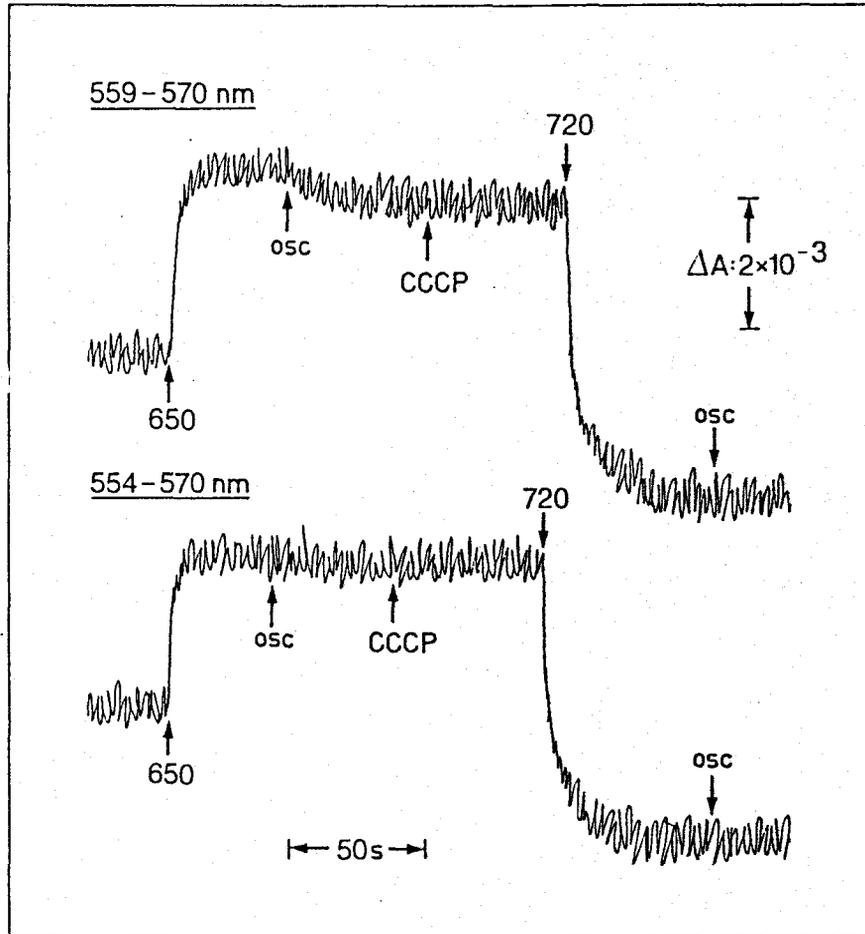


Figura 27. Efecto del CCCP sobre la fotooxidación de los citocromos b-559 y f inducida por luz de 720 nm en suspensiones de cloroplastos previamente iluminadas con luz de 650 nm

Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 25. Donde se indica se añadió CCCP 1  $\mu\text{M}$ .

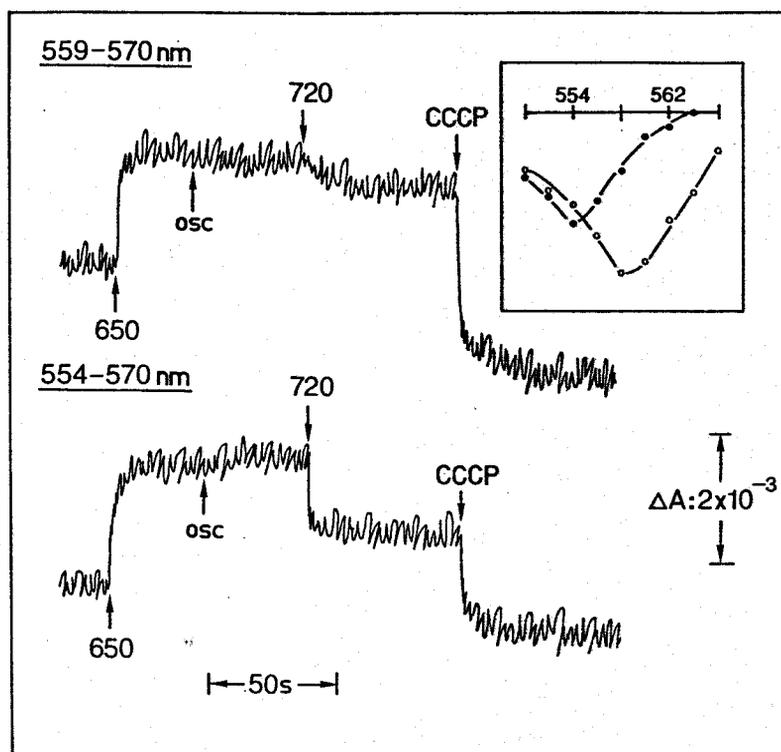


Figura 28. Inducción por CCCP de la fotooxidación del citocromo b-559 en suspensiones de cloroplastos previamente iluminadas con luz de 650 nm y bajo iluminación con luz de 720 nm

Los ensayos se realizaron como se describe en la Figura 25. Donde se indica se añadió CCCP 1  $\mu\text{M}$ . En el recuadro se muestran los espectros de la fotooxidación inducida por luz de 720 nm antes (●) y después (○) de la adición de CCCP.

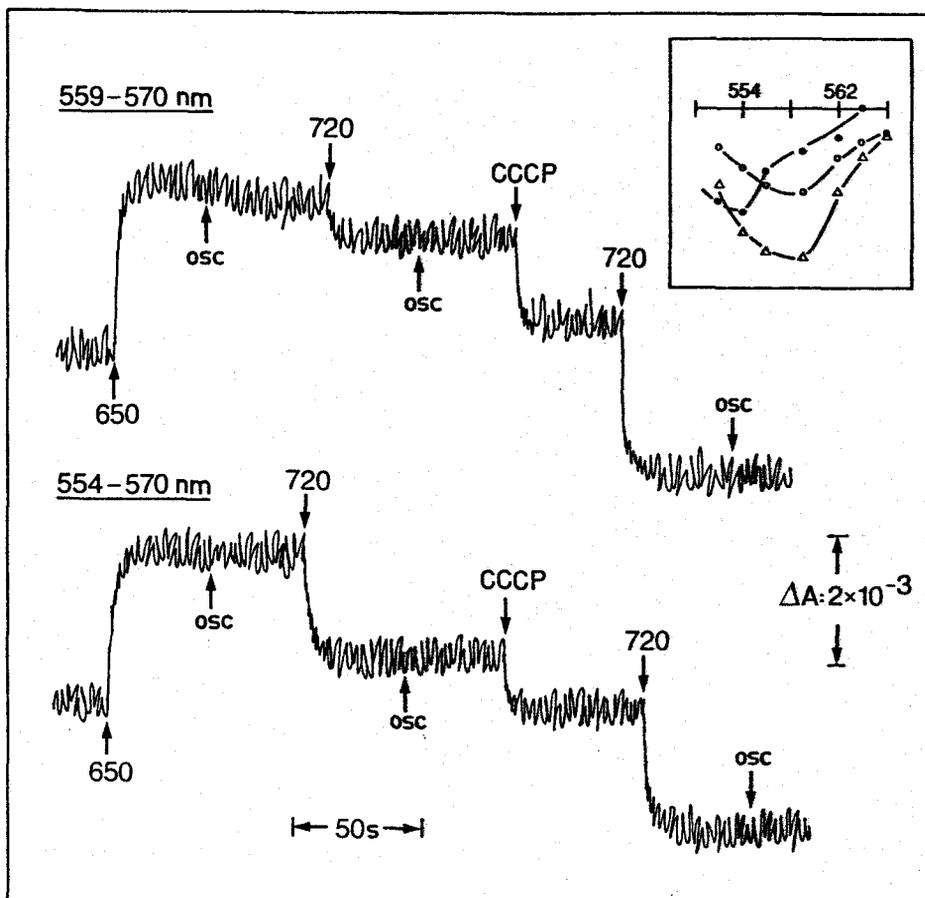


Figura 29. Oxidación del citocromo b-559 promovida por el CCCP en oscuridad tras la iluminación con luz de 720 nm de suspensiones de cloroplastos previamente iluminadas con luz de 650 nm.

Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 25. Donde se indica se añadió CCCP 1  $\mu\text{M}$ . En el recuadro se muestran los espectros, en la zona de la banda  $\alpha$  de los citocromos, de la fotooxidación inducida por luz de 720 nm (●), la oxidación promovida por la adición posterior de CCCP (○) y la fotooxidación inducida al iluminar de nuevo con luz de 720 nm (Δ).

vez reducidos ambos citocromos por luz de 650 nm, la luz de 720 nm produce exclusivamente la oxidación del citocromo f. Tras apagar dicha luz, la adición de CCCP induce una importante oxidación del citocromo b-559. Por último, la iluminación posterior con luz de 720 nm produce una nueva oxidación, que corresponde fundamentalmente a este mismo citocromo.

En la Figura 30 se comparan las fotorreducciones inducidas en el citocromo b-559 por luces selectivas de los fotosistemas I y II. Ambos tipos de luces promueven la reducción del citocromo b-559, pero con una cuantía significativamente menor en el caso de la luz de 720 nm (en torno al 50%). Los espectros de los incrementos de absorbancia promovidos por ambas luces son muy similares, indicando reducción de ambos citocromos. En ambos casos, la adición de CCCP durante la iluminación con luz de 720 nm produce una fuerte oxidación del citocromo b-559.

La iluminación con luz de 650 nm de cloroplastos previamente iluminados con este mismo tipo de luz (Figura 31) produce, una vez añadido CCCP, una pequeña oxidación que corresponde básicamente al citocromo b-559, como demuestra el espectro de esta reacción. La cuantía de esta fotooxidación es mucho menor, del orden de 1/3, que la producida por la luz de 720 nm (trazo superior).

En la Figura 32 se muestra un análisis comparativo del efecto sobre el estado redox de los citocromos b-559 y f de la iluminación inicial con luces de 650 nm y 720 nm en suspensiones de cloroplastos en presencia de CCCP. En estas condiciones, la luz de 650 nm promueve la reducción de los citocromos b-559 y f. Por el contrario, la iluminación con luz de 720 nm produce una fotooxidación significativa que, como muestra el espectro, corresponde también a ambos citocromos.

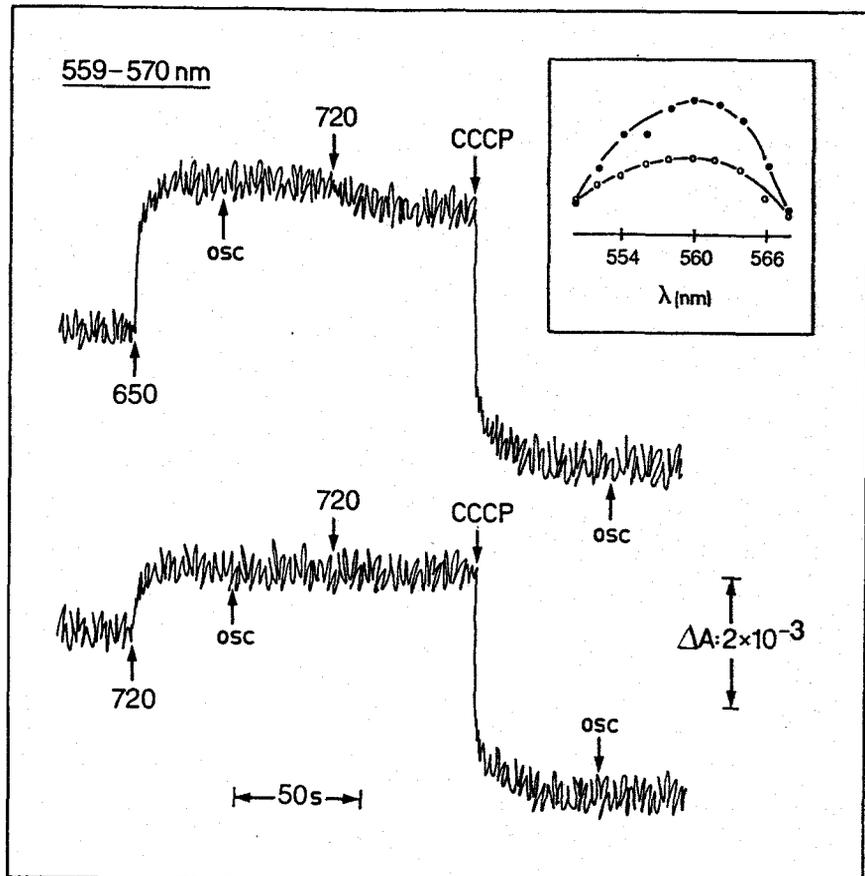


Figura 30. Fotorreducción del citocromo b-559 inducida por luces de 650 y 720 nm en suspensiones de cloroplastos

Las condiciones son las descritas en la Figura 25. Donde se indica se añadió CCCP 1  $\mu\text{M}$ . En el recuadro se muestran los espectros en la zona de la banda  $\alpha$  de los citocromos de las fotorreducciones inducidas por luz de 650 nm (●) y 720 nm (○).

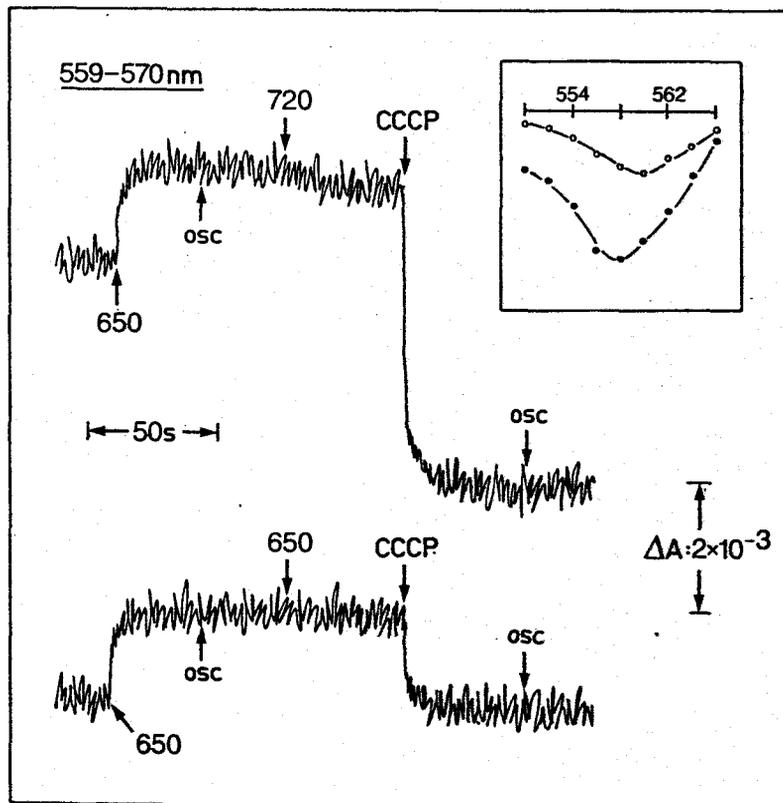


Figura 31. Fotooxidación del citocromo b-559 inducida por luces de 650 y 720 nm en suspensiones de cloroplastos previamente iluminadas con luz de 650 nm

Los cambios de absorbancia se determinaron como se describe en la Figura 25. Donde se indica se añadió CCCP 1  $\mu\text{M}$ . En el recuadro se muestran los espectros, en la zona de la banda  $\alpha$  de los citocromos, de la fotooxidación inducida por luz de 720 nm (●) y 650 nm (○).

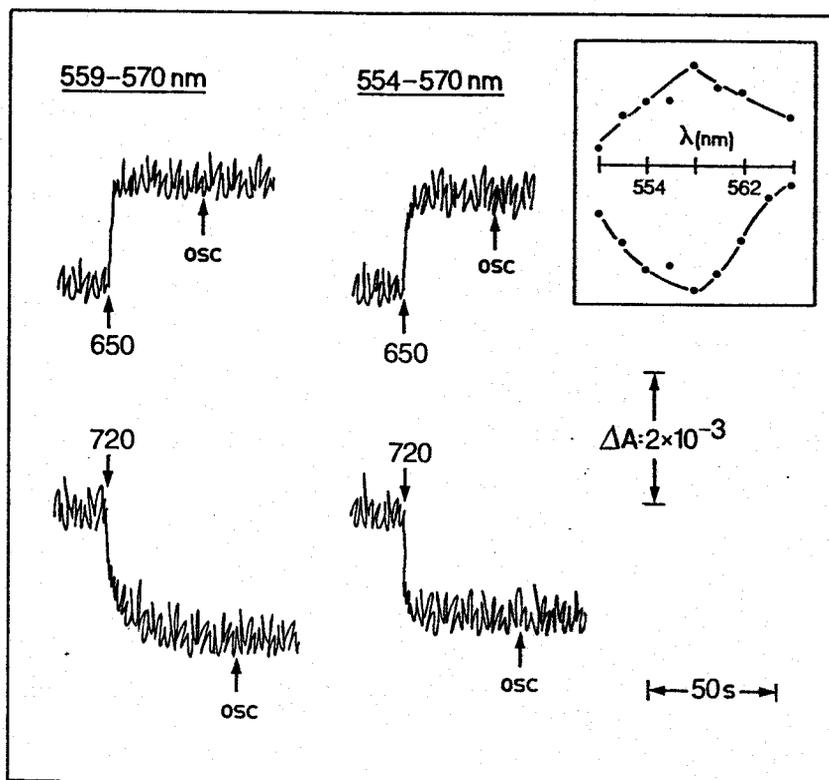


Figura 32. Cambios de absorbancia de los citocromos b-559 y f inducidos por iluminación inicial con luces de 650 o 720 nm en suspensiones de cloroplastos en presencia de CCCP

Los cambios de absorbancia se determinaron, como se indica en la Figura 25, en una suspensión de cloroplastos que contenía CCCP 1  $\mu$ M. El recuadro muestra los espectros de los cambios de absorbancia inducidos por luz de 650 nm (arriba) y 720 nm (abajo).

La iluminación inicial de suspensiones de cloroplastos con luz de 720 nm produce diferentes efectos según se lleven a cabo los ensayos en ausencia o en presencia de CCCP (Figura 33). Como ya se ha establecido en la Figura 30, en ausencia de CCCP la luz de 720 nm induce una pequeña fotorreducción de los citocromos b-559 y f (trazos superiores). La adición de CCCP invierte totalmente la reacción, promoviendo en este caso la luz de 720 nm la fotooxidación de ambos componentes.

### III.C.1.2. Efecto de diferentes inhibidores del flujo electrónico sobre las fotorreacciones de los citocromos b-559 y f

#### III.C.1.2.1. Efecto del DCMU

Se ha estudiado el efecto del inhibidor del transporte de electrones DCMU sobre la fotorreducción y fotooxidación de los citocromos b-559 y f promovidas por luces selectivas de los fotosistemas I y II en cloroplastos.

##### III.C.1.2.1.1. Efecto sobre la fotorreducción por luz de 650 nm

El DCMU inhibe totalmente la reducción de los citocromos b-559 y f promovida por luz de 650 nm (Figura 34). La adición de este agente a preparaciones de cloroplastos determina que la iluminación con luz de 650 nm produzca, por el contrario, una rápida oxidación que corresponde mayoritariamente al citocromo f, según muestra el espectro de este cambio redox.

##### III.C.1.2.1.2. Efecto sobre la fotooxidación por luz de 720 nm

En la Figura 35 se muestra el efecto del DCMU sobre la fotooxidación inducida en los citocromos b-559 y f por la luz

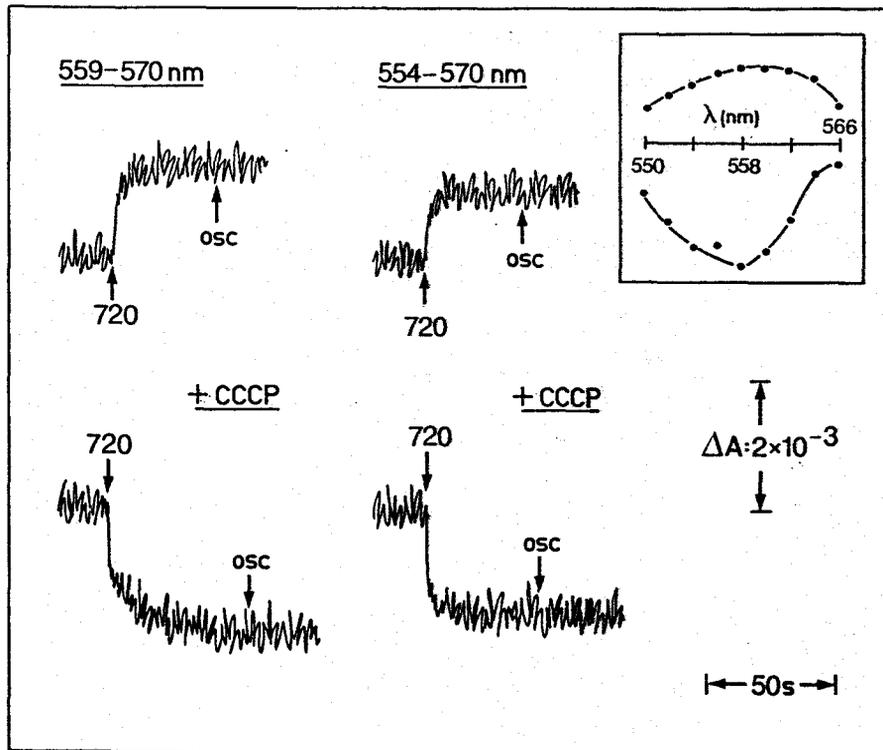


Figura 33. Cambios de absorbancia de los citocromos b-559 y f inducidos por luz de 720 nm en ausencia y presencia de CCCP

Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 25. En los trazos inferiores, las suspensiones de cloroplastos contenían CCCP 1  $\mu\text{M}$ . El recuadro muestra los espectros de los cambios de absorbancia inducidos por luz de 720 nm en ausencia (arriba) y presencia (abajo) de CCCP.

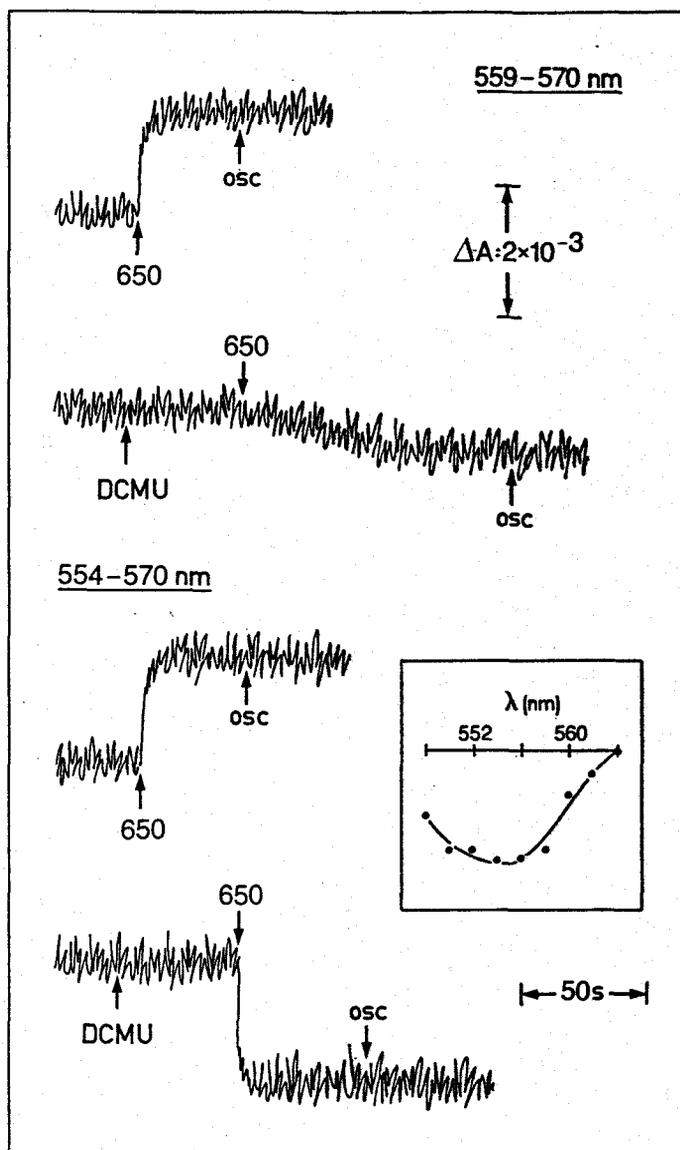


Figura 34. Efecto del DCMU sobre la fotorreducción de los citocromos b-559 y f inducida por luz de 650 nm en suspensiones de cloroplastos

Las condiciones de los ensayos son las de la Figura 25. Donde se indica se añadió DCMU  $10 \mu\text{M}$ . El recuadro muestra el espectro en la zona de la banda  $\alpha$  de los citocromos de los cambios de absorbancia inducidos por luz de 650 nm en presencia de DCMU.

de 720 nm en cloroplastos previamente iluminados con luz de 650 nm. La iluminación con luz de 720 nm induce en presencia de DCMU una fuerte, aunque lenta, oxidación cuando se miden los cambios de absorbancia en el máximo de la banda del citocromo b-559 (Figura 35A). Si se añade CCCP una vez estabilizada la fotooxidación, se produce una pequeña oxidación adicional. Cuando se miden los cambios de absorbancia en la banda del citocromo f (Figura 35B), puede observarse como la iluminación con luz de 720 nm en presencia de DCMU promueve también una gran oxidación, pero en este caso con un componente mayoritario de cinética rápida, ocurriendo el resto de la oxidación con una cinética muy lenta. Es importante resaltar que la oxidación en ambos casos (Figuras 35A y B) se produce sin necesidad de añadir CCCP, condición indispensable para observar esta reacción en los controles sin DCMU.

El análisis espectral de esta fotooxidación (Figura 36) muestra que el componente de cinética rápida corresponde fundamentalmente al citocromo f. La fase lenta de esta fotooxidación posee un espectro correspondiente al citocromo b-559. La oxidación adicional promovida por la adición de CCCP corresponde también al citocromo b-559 (espectro no mostrado).

En general, la cuantía global de la fotooxidación de los citocromos b-559 y f en presencia de DCMU es del mismo orden que la observada en los experimentos control sin DCMU.

#### III.C.1.2.1.3. Efecto del CCCP sobre la fotooxidación promovida por luz de 720 nm en presencia de DCMU

La adición de CCCP a suspensiones de cloroplastos previamente iluminadas con luz de 650 nm produce un incremento considerable de la velocidad de la fotooxidación del citocromo b-559 inducida por luz de 720 nm en presencia de DCMU (Figura 37). A pesar de este aumento, la cinética de esta reacción no

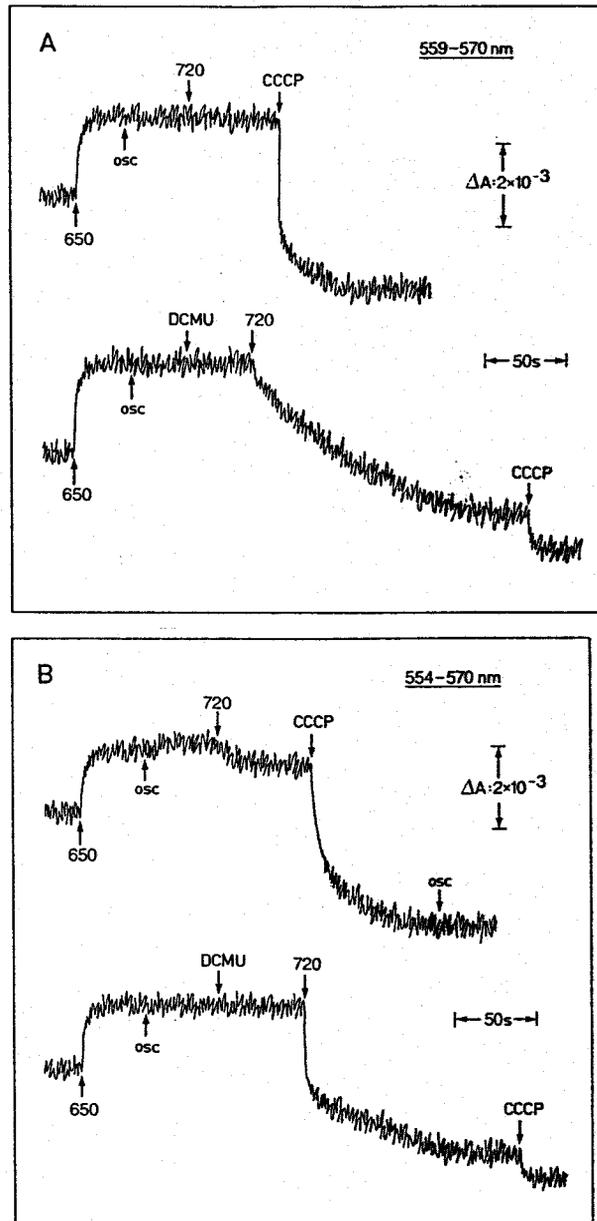


Figura 35. Efecto del DCMU sobre la fotooxidación de los citocromos b-559 (A) y f (B) inducida por luz de 720 nm en suspensiones de cloroplastos previamente iluminadas con luz de 650 nm

Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 25. Donde se indica se añadió DCMU 10  $\mu\text{M}$  y CCCP 1  $\mu\text{M}$ .

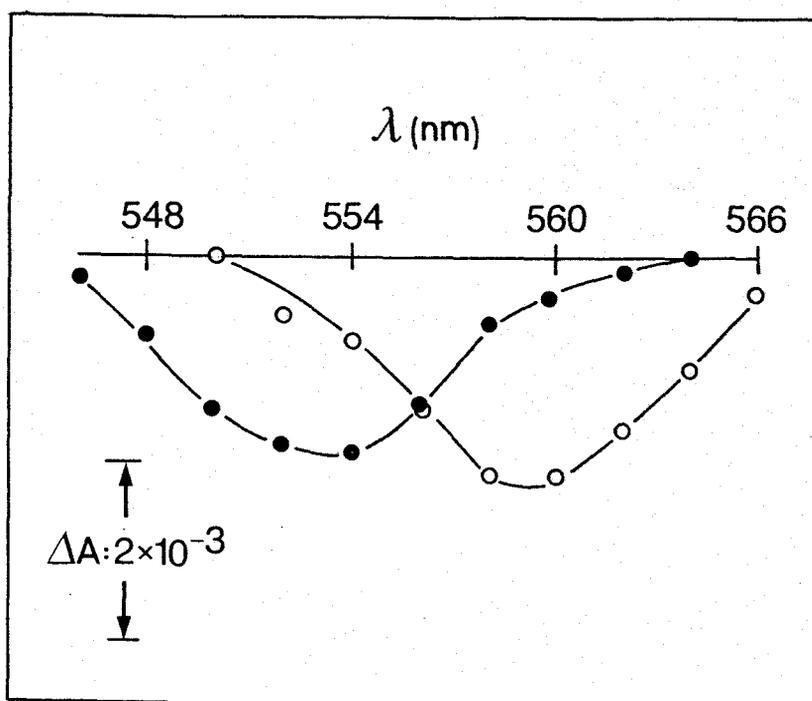


Figura 36. Espectros de la fotooxidación inmediata (●) y a largo plazo (○) inducida por luz de 720 nm en presencia de DCMU en suspensiones de cloroplastos previamente iluminadas con luz de 650 nm

Los espectros en la zona de la banda  $\alpha$  de los citocromos corresponden a los experimentos de la Figura 35 y se realizaron como se describe en el apartado II.B.4. de Materiales y Métodos.

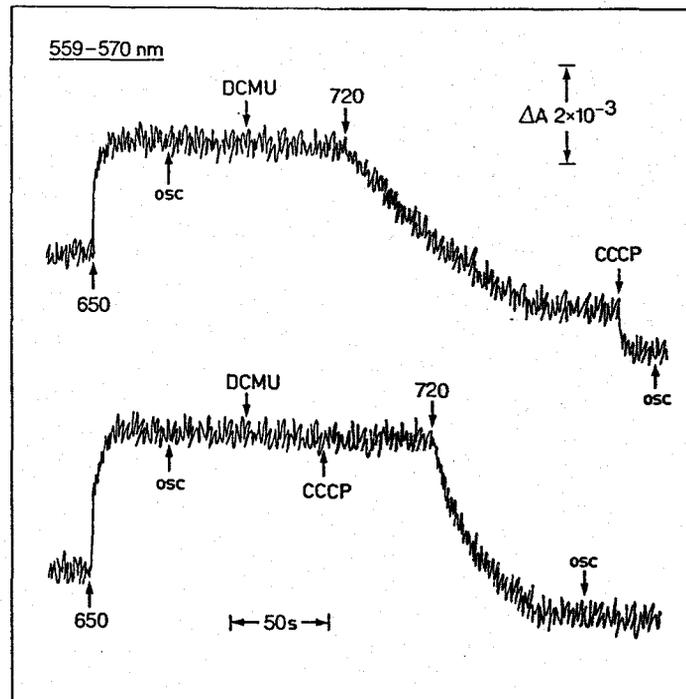


Figura 37. Efecto del CCCP sobre la fotooxidación del citocromo b-559 inducida por luz de 720 nm en presencia de DCMU en suspensiones de cloroplastos previamente iluminadas con luz de 650 nm

Los ensayos se realizaron como se describe en la Figura 25. Donde se indica se añadió DCMU 10  $\mu\text{M}$  y CCCP 1  $\mu\text{M}$ .

es tan rápida como la de los controles con CCCP en ausencia de DCMU (ver Figura 35).

### III.C.1.2.2. Efecto del DBMIB

#### III.C.1.2.2.1. Efecto sobre la fotorreducción por luz de 650 nm

El DBMIB -reconocido inhibidor competitivo de la plastoquinona- bloquea totalmente la fotorreducción de los citocromos b-559 y f inducida por luz de 650 nm en preparaciones de cloroplastos (Figura 38). La adición de este agente induce, por el contrario, una importante fotooxidación por luz de 650 nm (trazo inferior) que, según el análisis espectral, corresponde exclusivamente al citocromo f.

#### III.C.1.2.2.2. Efecto sobre la fotooxidación por luz de 720 nm

En la Figura 39 se muestra el efecto del DBMIB sobre la fotooxidación de los citocromos b-559 y f inducida por luz de 720 nm en cloroplastos previamente iluminados con luz de 650 nm. La iluminación con luz de 720 nm en presencia de DBMIB promueve una oxidación importante cuando se determinan los cambios de absorbancia del citocromo f (Figura 39B). La adición de CCCP, una vez estabilizada la oxidación, induce una oxidación adicional de los dos citocromos, pero de mucha menor cuantía que en los controles sin DBMIB (trazos superiores).

La Figura 40 muestra el análisis espectral de la fotooxidación de los citocromos b-559 y f en ausencia y presencia de DBMIB. Como se ha establecido anteriormente (Figura 28), la luz de 720 nm induce, en cloroplastos previamente iluminados con luz de 650 nm, la fotooxidación del citocromo f (Figura 40A); la fotooxidación del citocromo b-559 se produce sólo en presencia de CCCP. En presencia de DBMIB (Figura 40B),

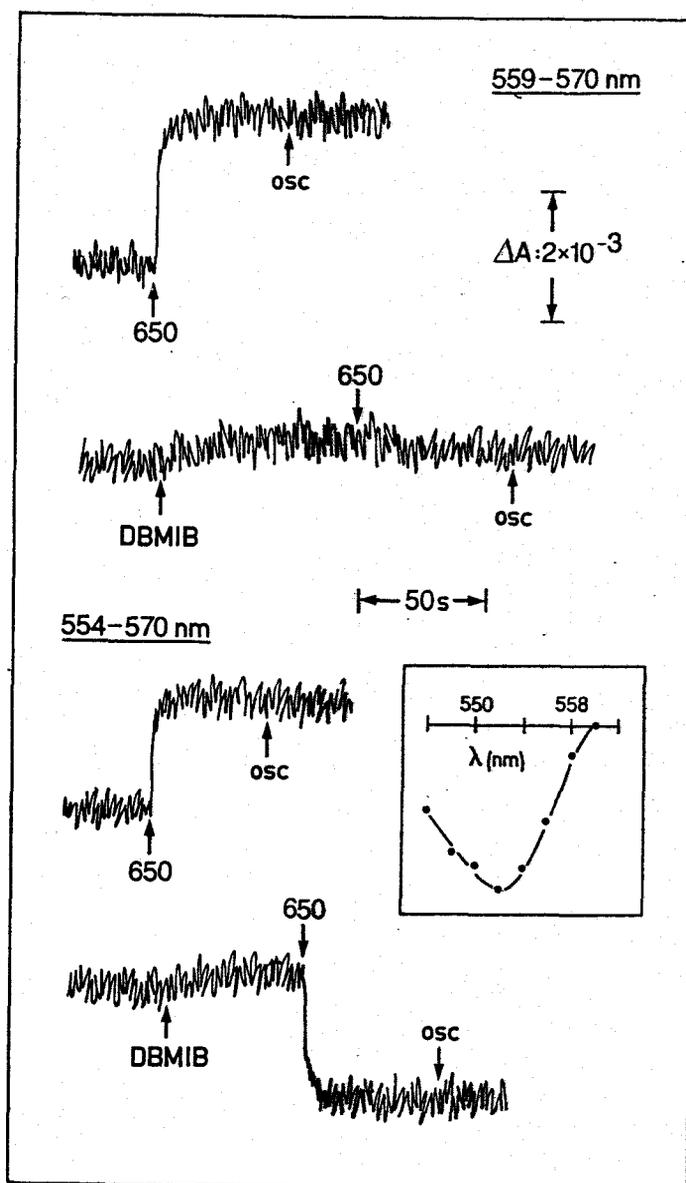


Figura 38. Efecto del DBMIB sobre la fotorreducción de los citocromos b-559 y f inducida por luz de 650 nm en suspensiones de cloroplastos

Los cambios de absorbancia se determinaron como en la Figura 25. Donde se indica se añadió DBMIB  $2 \mu\text{M}$ . El recuadro muestra el espectro, en la zona de la banda  $\alpha$  de los citocromos, de los cambios de absorbancia inducidos por la luz de 650 nm en presencia de DBMIB.

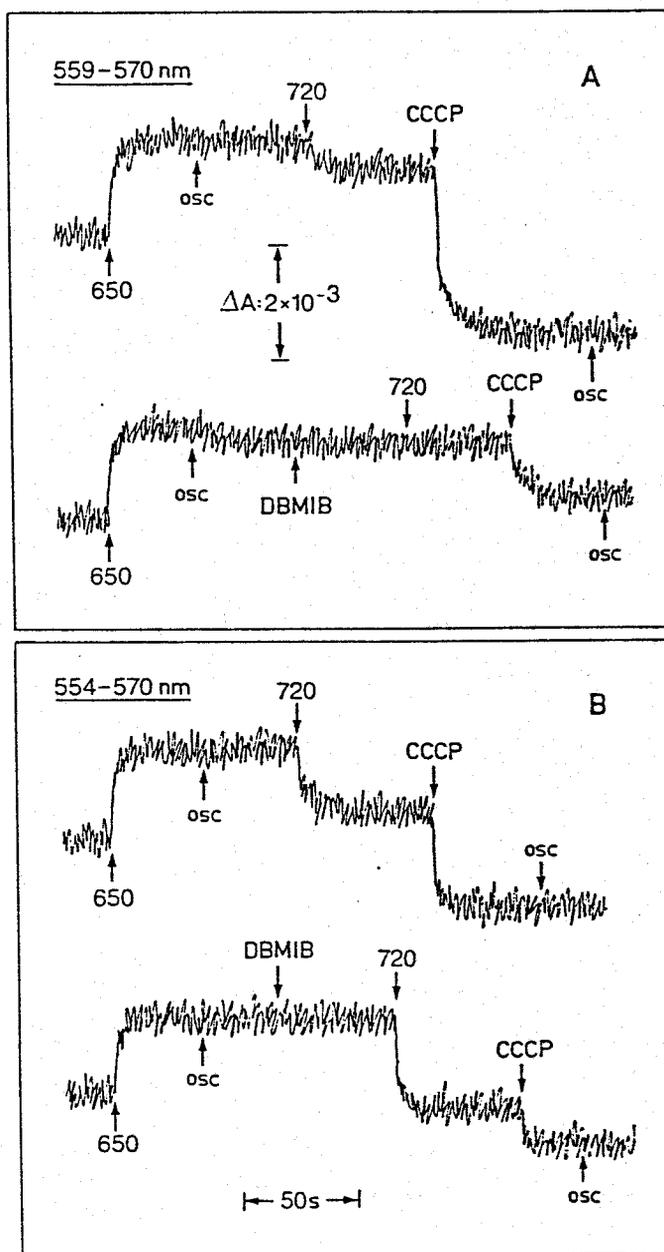


Figura 39. Efecto del DBMIB sobre la fotooxidación de los citocromos b-559 (A) y f (B) inducida por luz de 720 nm en suspensiones de cloroplastos previamente iluminadas con luz de 650 nm

Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 25. Donde se indica se añadió DBMIB 2  $\mu\text{M}$  y CCCP 1  $\mu\text{M}$ .

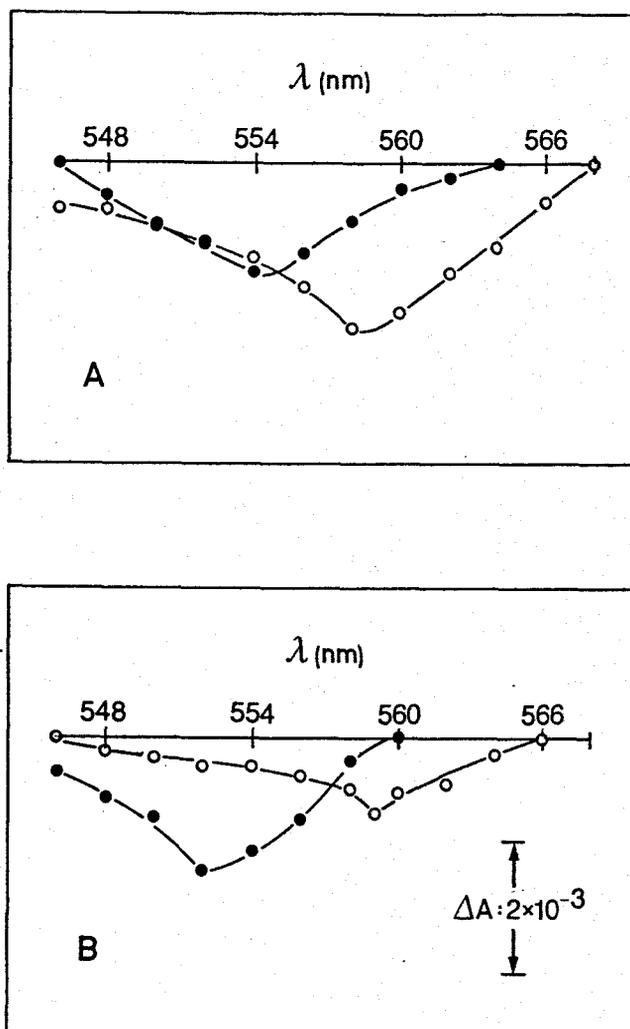


Figura 40. Espectros de la fotooxidación inducida por luz de 720 nm en ausencia (A) y presencia (B) de DBMIB en suspensiones de cloroplastos previamente iluminadas con luz de 650 nm

El espectro A corresponde a los cambios de absorbancia inducidos en la zona de la banda  $\alpha$  de los citocromos por luz de 720 nm en ausencia de DBMIB (Figura 28), y el espectro B, a estos cambios en presencia de DBMIB (Figura 39). Se representan la fotooxidación inicial (●) y la promovida tras la adición posterior de CCCP (○).

la oxidación inicial promovida por luz de 720 nm posee un espectro característico del citocromo f. La oxidación adicional inducida por CCCP posee un espectro que corresponde básicamente al citocromo b-559, si bien la cuantía del espectro se reduce considerablemente en relación al control (Figura 40A).

III.C.1.2.2.3. Efecto conjunto del DCMU y DBMIB sobre la fotooxidación promovida por luz de 720 nm

En presencia de DCMU y DBMIB, la iluminación con luz de 720 nm de preparaciones de cloroplastos previamente iluminados con luz de 650 nm, induce una oxidación de los citocromos b-559 y f con una doble cinética (Figura 41): una cinética muy lenta que corresponde básicamente al citocromo b-559, como indica el espectro, y una cinética rápida que corresponde al citocromo f. La adición posterior de CCCP induce una oxidación extra cuyo espectro indica que pertenece al citocromo b-559.

III.C.1.2.3. Efecto del cianuro

El cianuro -inhibidor del transporte electrónico fotosintético a nivel de plastocianina- bloquea sustancialmente la fotooxidación de los citocromos b-559 y f inducida por luz de 720 nm. En la Figura 42 se muestra el efecto de la incubación de cloroplastos con cianuro potásico sobre los cambios redox de los citocromos b-559 y f inducidos por la iluminación selectiva con luces de los fotosistemas I y II. Las preparaciones incubadas en condiciones similares (20 minutos a 20°C) pero en ausencia de cianuro (trazos superiores) no presentan cambios apreciables ni en la reducción promovida por luz de 650 nm ni en la oxidación promovida por luz de 720 nm, en relación a los controles sin incubación (ver Figura 28). La incubación con cianuro no afecta apreciablemente a la reducción de los citocromos b-559 y f por luz de 650 nm (trazos

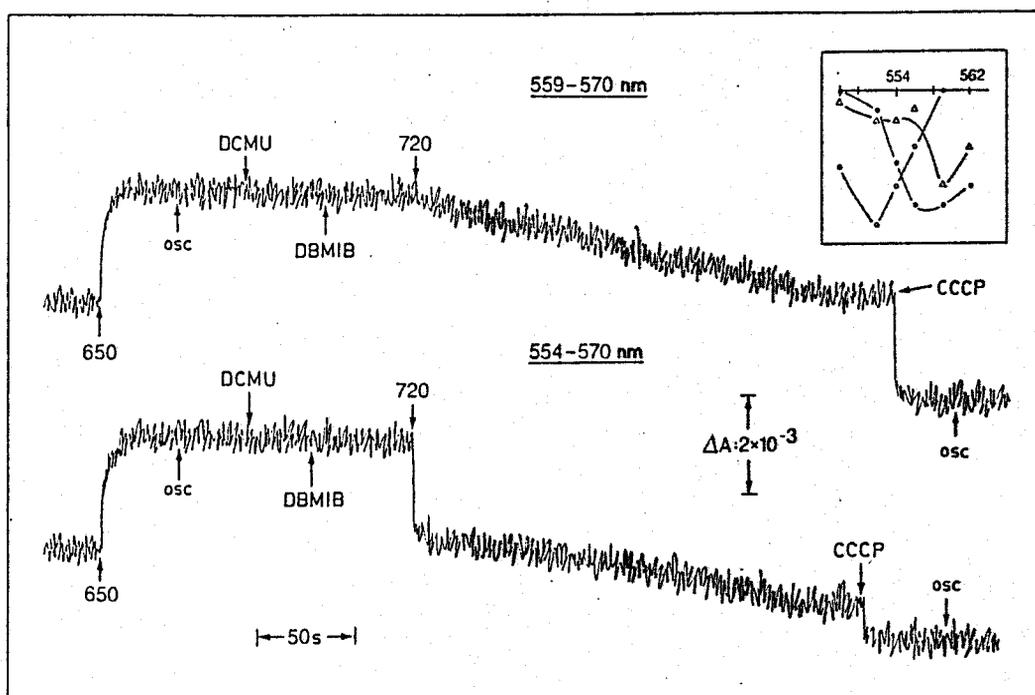


Figura 41. Efecto conjunto del DCMU y DBMIB sobre la fotooxidación de los citocromos b-559 y f inducida por luz de 720 nm en suspensiones de cloroplastos previamente iluminados con luz de 650 nm

Los cambios de absorbancia se midieron como en la Figura 25. Donde se indica se añadieron DCMU 10  $\mu\text{M}$ , DBMIB 2  $\mu\text{M}$  y CCCP 1  $\mu\text{M}$ . En el recuadro se muestran los espectros de la fotooxidación inmediata (○), a largo plazo (●) y tras la adición de CCCP (Δ), inducidas por luz de 720 nm en presencia de DCMU y DBMIB.

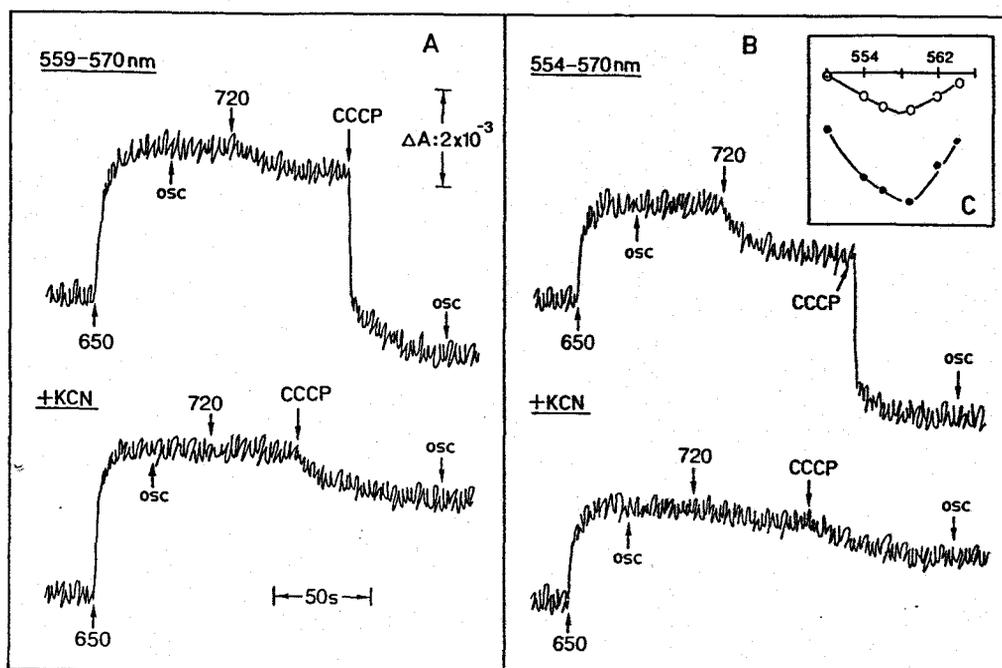


Figura 42. Efecto del cianuro sobre los cambios de absorbancia de los citocromos b-559 (A) y f (B) inducidos por luces de 650 y 720 nm

Los cambios de absorbancia inducidos por luz se determinaron como se describe en el apartado II.B.4. de Materiales y Métodos después de incubar las suspensiones de cloroplastos 20 minutos a 20° C en ausencia y presencia de KCN 20 mM. Donde se indica se añadió CCCP 1  $\mu$ M. El resto de las condiciones, como se describe en la Figura 25. El recuadro C muestra los espectros de la fotooxidación total (incluida la producida tras la adición de CCCP) inducida por luz de 720 nm en ausencia (●) y presencia (○) de KCN, a una escala de absorbancia 50% de la indicada en la figura.

inferiores). Por el contrario, el cianuro reduce de forma considerable la fotooxidación de ambos citocromos por el fotosistema I. En efecto, la iluminación con luz de 720 nm en estas condiciones no produce cambio alguno en el estado redox de los citocromos b-559 y f. La adición posterior de CCCP induce una pequeña oxidación, de bastante menor cuantía que la observada en los controles.

En la Figura 42C se comparan los espectros, en la banda  $\alpha$  de los citocromos, de la fotooxidación inducida por luz de 720 nm, una vez añadido CCCP, en ausencia y presencia de cianuro. Ambos espectros poseen una composición mixta similar, lo que sugiere que se están oxidando los dos citocromos en ambos casos. La diferencia estriba en el importante descenso en la cuantía de la oxidación en presencia de cianuro, que se reduce en torno al 70% en relación al control sin cianuro.

Con concentraciones inferiores de cianuro se consiguen efectos similares de inhibición de la fotooxidación de los citocromos b-559 y f inducida por luz de 720 nm, aunque es necesario aumentar el tiempo de incubación (por ejemplo, 5 mM de cianuro y una hora de incubación).

#### III.C.1.2.4. Efecto de la polilisina

En la Figura 43 se muestra el efecto de la polilisina -como el cianuro, inhibidor del transporte electrónico a nivel de plastocianina- sobre la fotooxidación de los citocromos b-559 y f promovida por luz de 720 nm en cloroplastos previamente iluminados con luz de 650 nm. En presencia de este agente, la luz de 720 nm no produce ningún cambio redox; la posterior adición de CCCP promueve una oxidación, pero de muy pequeña cuantía en relación a los controles (alrededor del 30%). Esta oxidación residual corresponde mayoritariamente al citocromo b-559, según muestra el espectro.

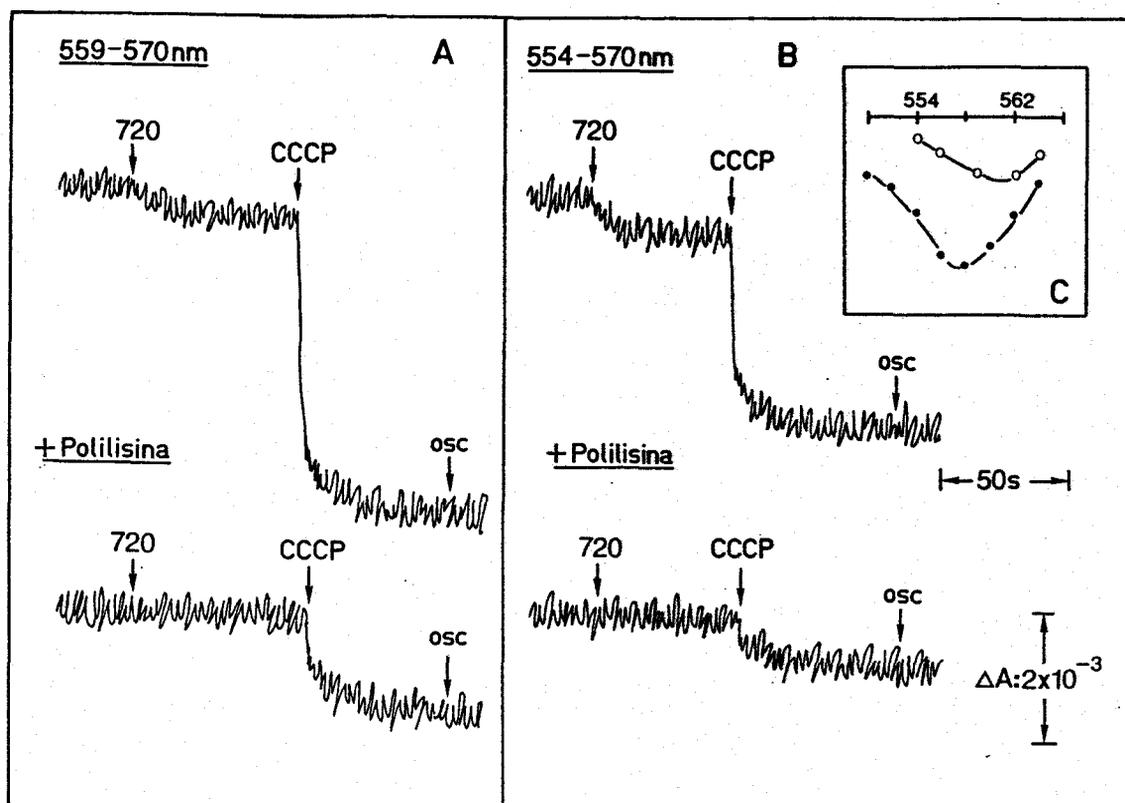


Figura 43. Efecto de la polilisina sobre la fotooxidación de los citocromos b-559 y f inducida por luz de 720 nm en suspensiones de cloroplastos previamente iluminadas con luz de 650 nm

Las suspensiones de cloroplastos se iluminaron previamente con luz de 650 nm y una vez estabilizada la reducción, se apagó la luz y se añadió, en los casos donde se señala, 1 mg/ml de polilisina. Donde se indica se añadió CCCP 1  $\mu$ M. El resto de las condiciones, como se describe en la Figura 25. El recuadro C muestra el espectro de la fotooxidación total (incluida la producida tras la adición de CCCP) inducida por luz de 720 nm en ausencia (●) y presencia (o) de polilisina, a una escala de absorbancia 50% de la indicada.

### III.C.1.2.5. Efecto de la valinomicina

La valinomicina inhibe en cierta medida la fotooxidación de los citocromos b-559 y f inducida por luz de 720 nm (Figura 44). Como se observa en la figura, en presencia de este agente la oxidación de ambos citocromos por luz de 720 nm se reduce en un 40% aproximadamente. La reducción por luz de 650 nm de ambos citocromos también disminuye, aunque en una cuantía muy pequeña (alrededor del 15%).

### III.C.1.2.6. Efecto del TMPD

En la Figura 45 se muestra el efecto del TMPD -que transporta electrones muy eficazmente entre plastoquinona y plastocianina- sobre la fotooxidación de los citocromos b-559 y f inducida por luz de 720 nm en cloroplastos previamente iluminados con luz de 650 nm. La presencia de TMPD determina una fuerte reducción (hasta un 50%) en la cuantía de la fotooxidación inducida por luz de 720 nm cuando se mide a 559-570 nm (Figura 45A). El efecto es mucho menor si se analiza en el máximo de absorbancia del citocromo f (Figura 45B). En efecto, el análisis espectral de la fotooxidación en ausencia o presencia de TMPD (Figura 45C) muestra un desplazamiento acusado del espectro realizado en presencia de TMPD hacia el máximo de la banda  $\alpha$  del citocromo f en relación al control sin TMPD.

## III.C.2. Partículas del fotosistema II

### III.C.2.1. Fotorreacciones del citocromo b-559 promovidas por luz de 650 nm

En suspensiones de partículas del fotosistema II frescas, la iluminación inicial con luz de 650 nm no produce ningún cambio de absorbancia a 559-570 nm (Figura 46). Sin embargo, si las partículas se oxidan inicialmente con una pe-

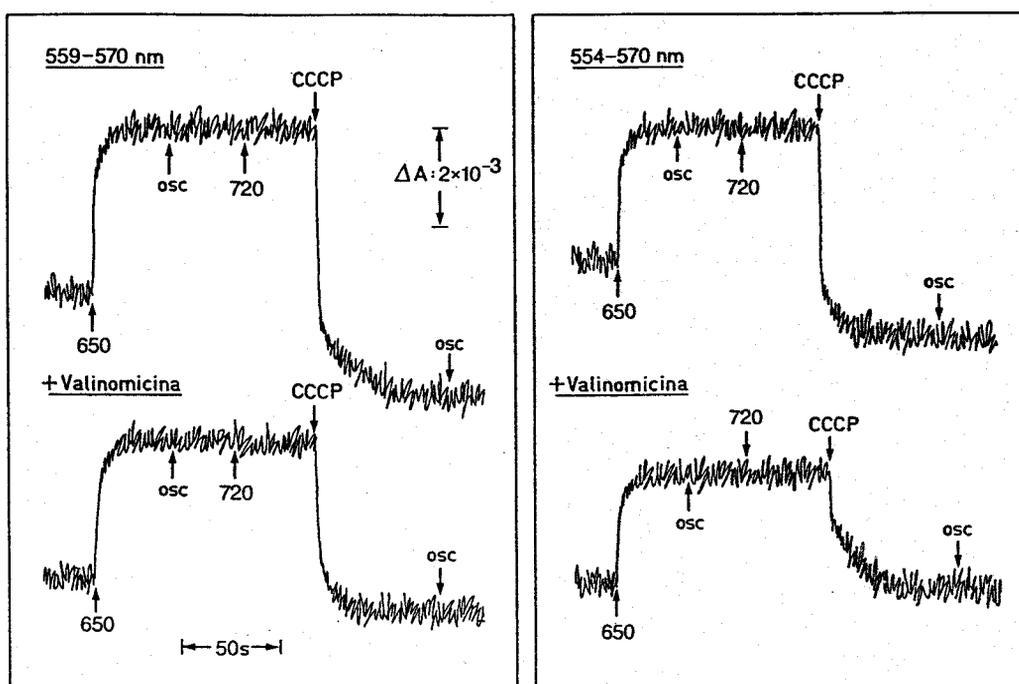


Figura 44. Efecto de la valinomicina sobre los cambios de absorbancia de los citocromos b-559 (A) y f (B) inducidos por luces de 650 y 720 nm

Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 25. En los trazos inferiores, las suspensiones de cloroplastos contenían valinomicina 50  $\mu\text{M}$ . Donde se indica se añadió CCCP 1  $\mu\text{M}$ .

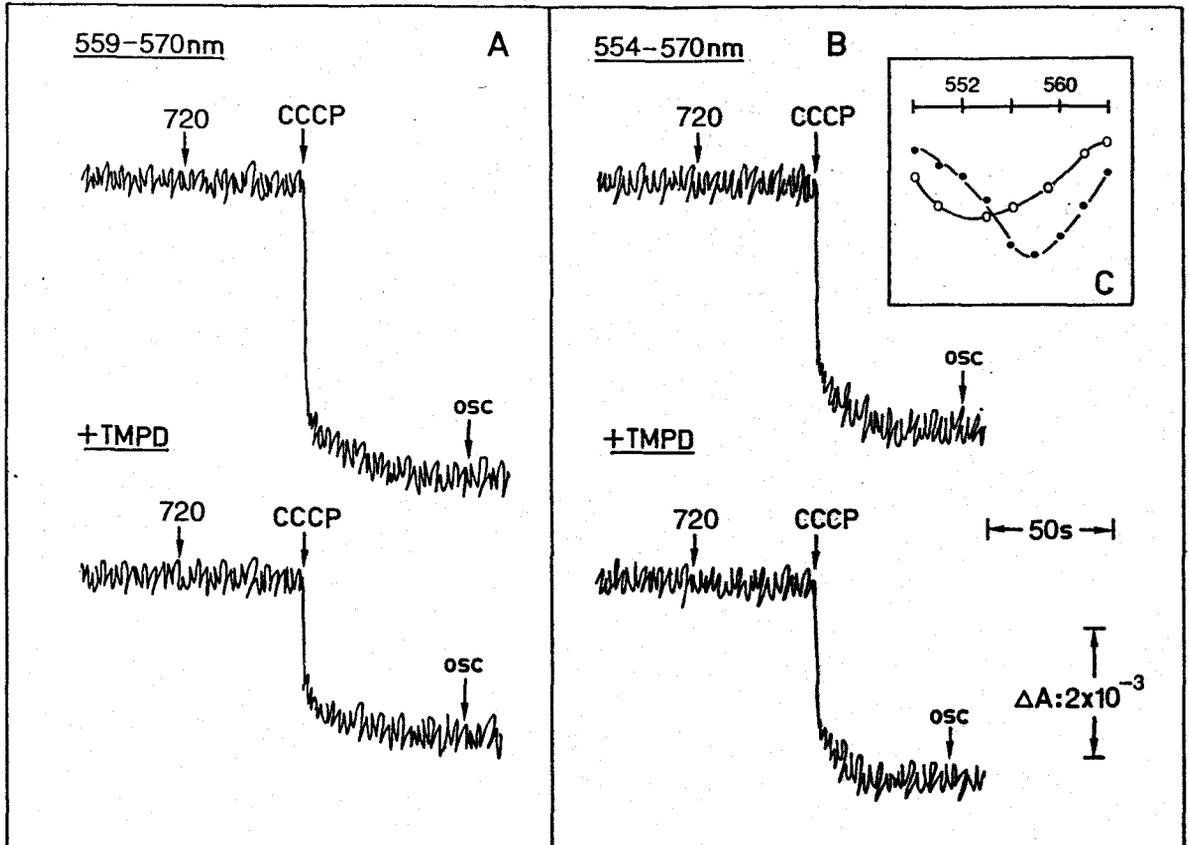


Figura 45. Efecto del TMPD sobre la fotooxidación de los citocromos b-559 y f inducida por luz de 720 nm en suspensiones de cloroplastos previamente iluminadas con luz de 650 nm

La suspensiones de cloroplastos se iluminaron previamente con luz de 650 nm y, una vez estabilizada la reducción, se apagó la luz y se añadió, en los casos donde se señala, TMPD 5  $\mu\text{M}$ . Donde se indica se añadió CCCP 1  $\mu\text{M}$ . El resto de las condiciones, como se describe en la Figura 25. El recuadro C muestra el espectro de la fotooxidación total (incluida la producida tras la adición de CCCP) inducida por luz de 720 nm en ausencia (●) y presencia (○) de TMPD, a una escala de absorbancia 50% de la indicada.

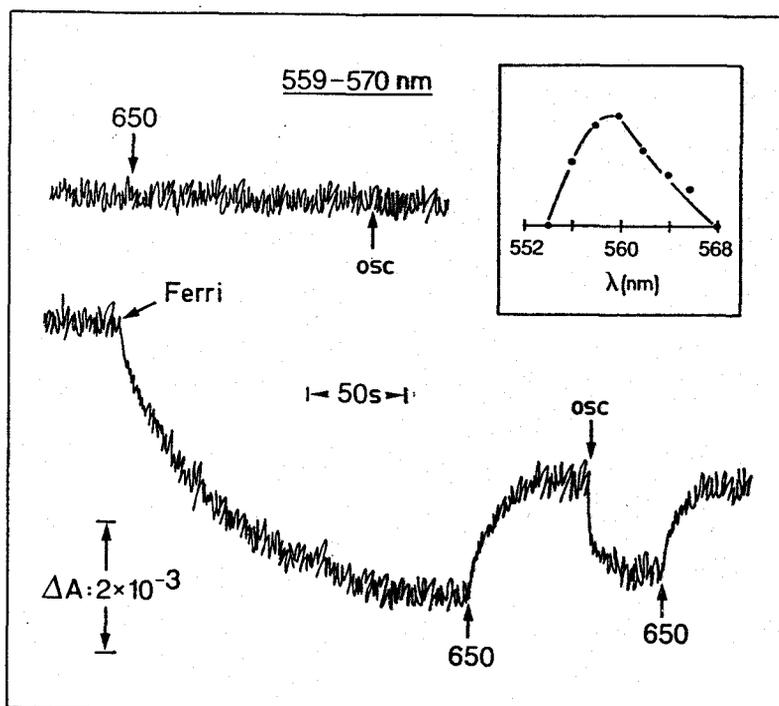


Figura 46. Cambios de absorbancia del citocromo b-559 inducidos por luz de 650 nm en partículas del fotosistema II

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, y partículas del fotosistema II correspondientes a 200  $\mu\text{g}$  de clorofila. Los cambios de absorbancia se determinaron tras iluminar las preparaciones con luz de 650 nm ( $70 \text{ W/m}^2$ ) como se describe en el apartado II.B.4. de Materiales y Métodos. Donde se indica se añadió ferricianuro 0,25 mM. En el recuadro se muestra el espectro, realizado como se describe en Materiales y Métodos, en la zona de la banda  $\alpha$  de los citocromos, de la fotorreducción inducida por luz de 650 nm tras la oxidación de las partículas con ferricianuro. Todos los ensayos se llevaron a cabo a  $20^\circ\text{C}$ .

queña cantidad de ferricianuro, la iluminación posterior con luz de 650 nm induce una reducción que, según muestra el espectro, corresponde al citocromo b-559. En oscuridad, el citocromo es reoxidado por el ferricianuro, pudiendo repetirse este proceso hasta 6 veces. La concentración adecuada de ferricianuro para observar una fotorreducción óptima del citocromo b-559 es 0,25 mM; concentraciones superiores e inferiores disminuyen la cuantía de la reacción.

La oxidación previa del citocromo b-559 parece ser un requisito para observar su fotorreducción en partículas del fotosistema II frescas, donde el citocromo b-559 está reducido en un porcentaje muy elevado (ver Figura 12). En partículas almacenadas a 0°C y en oscuridad durante 24 o 48 horas (Figura 47), la luz de 650 nm induce una reducción de gran cuantía en el citocromo b-559 sin necesidad de añadir previamente ferricianuro. En estas preparaciones, el envejecimiento induce la autooxidación del citocromo.

En la Figura 48 se muestra el efecto del pH y la temperatura sobre la fotorreducción del citocromo b-559 inducida por luz de 650 nm en partículas del fotosistema II. El pH óptimo de esta reacción es 7,5 (Figura 48A), disminuyendo considerablemente por encima y por debajo de este valor hasta desaparecer a pHs 8,5 y 5,5, respectivamente. La temperatura óptima de ensayo de la fotorreducción es 20°C (Figura 48B). Temperaturas superiores reducen la cuantía de la reacción, que desaparece totalmente a 45°C; por debajo, a 15°C, disminuye también considerablemente la fotorreducción del citocromo b-559 inducida por luz de 650 nm.

#### III.C.2.2. Fotooxidación en presencia de CCCP

En presencia de CCCP, la iluminación con luz de 650 nm de partículas del fotosistema II induce una importante oxidación (Figura 49), que corresponde al citocromo b-559, según

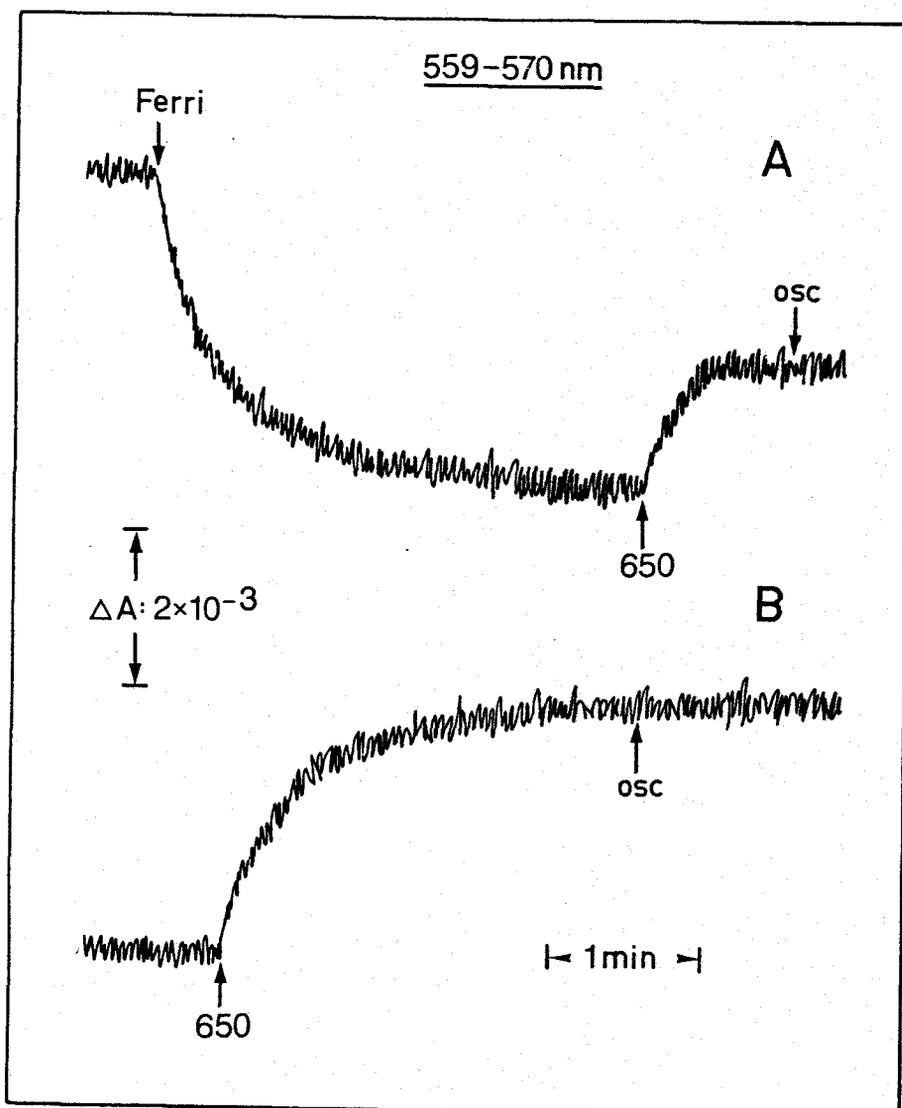


Figura 47. Cambios de absorbancia del citocromo b-559 inducidos por luz de 650 nm en partículas del fotosistema II envejecidas

Los cambios de absorbancia se determinaron en partículas del fotosistema II frescas (A) y almacenadas durante 24 horas en hielo y oscuridad (B). Donde se indica se añadió ferricianuro 0,25 mM. El resto de las condiciones como se describe en la Figura 46.

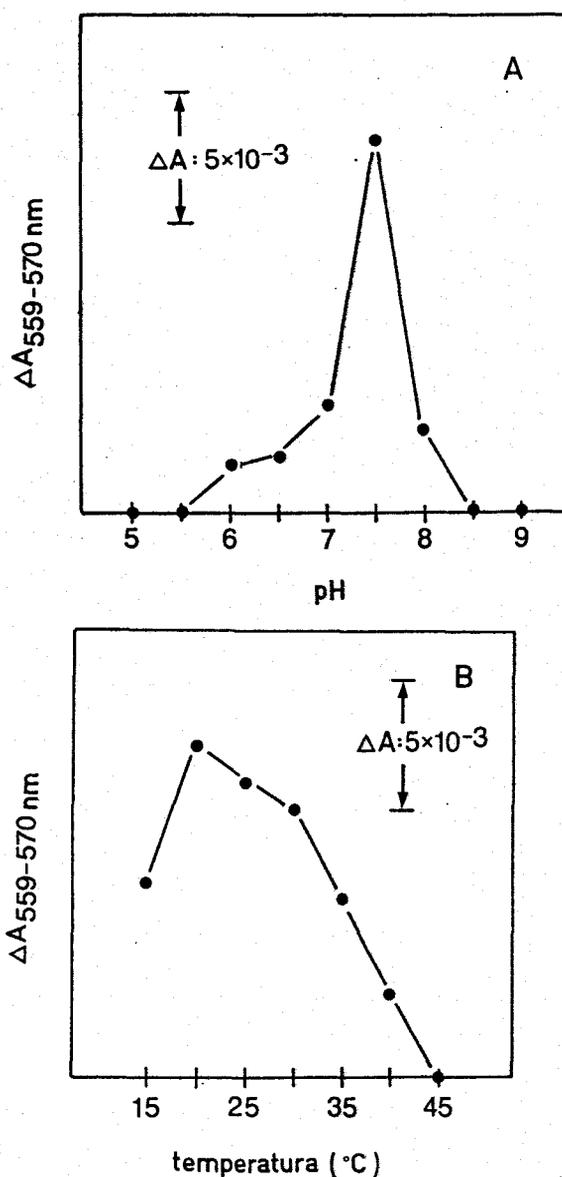


Figura 48. Efecto del pH y la temperatura de ensayo sobre la fotorreducción del citocromo b-559 inducida por luz de 650 nm en suspensiones de partículas del fotosistema II oxidadas previamente con ferricianuro

Los cambios de absorbancia a 559-570 nm inducidos por luz de 650 nm en suspensiones de partículas del fotosistema II previamente oxidadas con ferricianuro 0,25 mM se determinaron como se describe en la Figura 46. En A se midieron los cambios de absorbancia a  $20^{\circ}\text{C}$  y diferentes pHs, para lo cual se usaron los siguientes tampones: malato 50 mM (pHs 5 y 5,5); fosfato 50 mM (pHs 6,5 y 7); Tricina-KOH 50 mM (pHs 7,5; 8 y 8,5). En B los cambios de absorbancia se midieron a las temperaturas indicadas. Los datos representados en ambos casos son la media de 5 experimentos independientes.

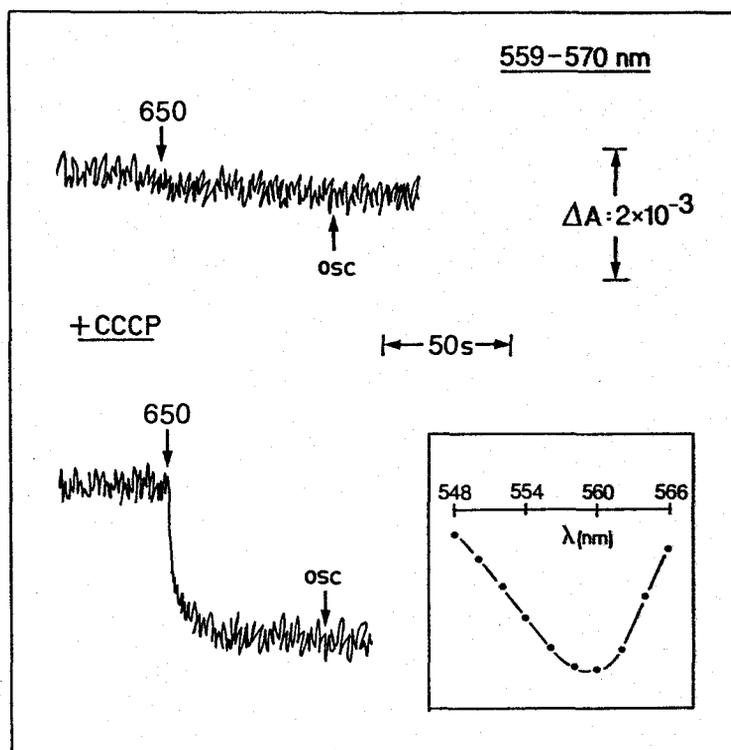


Figura 49. Cambios de absorbancia del citocromo b-559 inducidos por luz de 650 nm en partículas del fotosistema II en presencia de CCCP

En el trazo inferior, las suspensiones de partículas del fotosistema II contenían CCCP  $1 \mu\text{M}$ . El resto de las condiciones como se describe en la Figura 46. En el recuadro se muestra el espectro, en la zona de la banda  $\alpha$  de los citocromos, de la fotooxidación inducida por luz de 650 nm en presencia de CCCP.

muestra el espectro.

III.C.2.3. Efecto del DCMU y la hidroxilamina sobre la fotorreducción promovida por luz de 650 nm

La adición de DCMU bloquea totalmente la fotorreducción del citocromo b-559 inducida por luz de 650 nm en partículas del fotosistema II (Figura 50A). En efecto, si se añade DCMU inicialmente y se oxidan las preparaciones con ferricianuro, la iluminación con luz de 650 nm no produce cambio alguno en el estado redox del citocromo b-559. El efecto es idéntico si se añade el DCMU después de la oxidación con ferricianuro.

La incubación de partículas del fotosistema II con hidroxilamina (Figura 50B) -agente que afecta al sistema de rotura de agua- provoca la práctica desaparición de la reducción del citocromo b-559 promovida por luz de 650 nm.

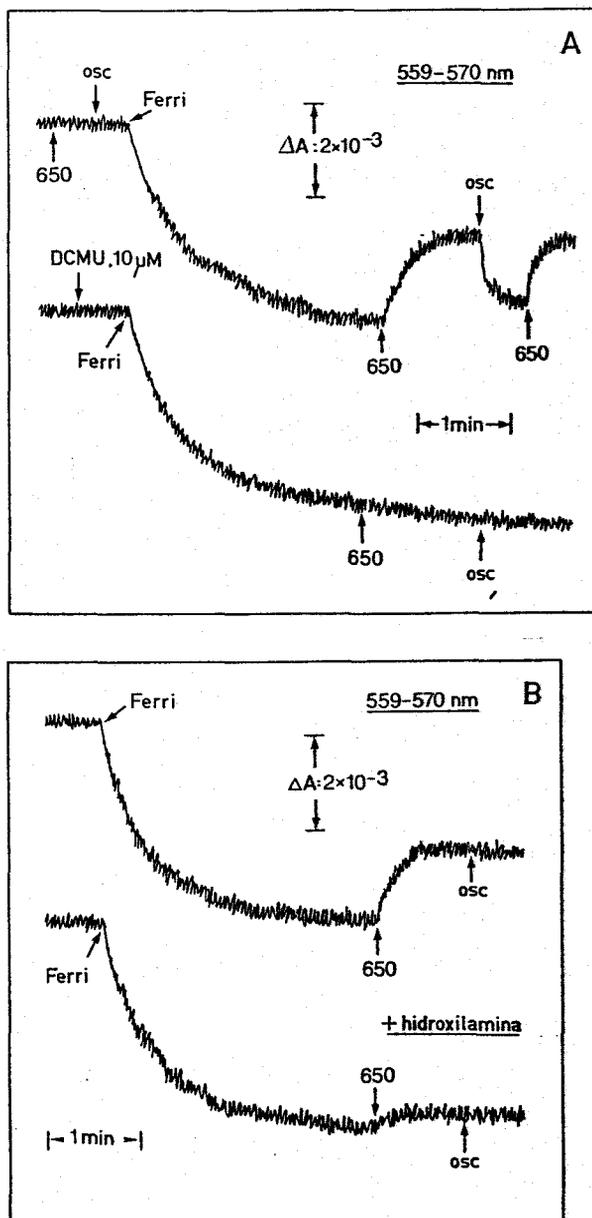


Figura 50. Efecto del DCMU (A) y la hidroxilamina (B) sobre la fotorreducción del citocromo b-559 inducida por luz de 650 nm en partículas del fotosistema II oxidadas previamente con ferricianuro

Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 46. Donde se indica se añadió ferricianuro 0,25 mM y DCMU 10  $\mu$ M. En B, los cambios de absorbancia se midieron tras incubar las preparaciones de partículas del fotosistema II a 20°C durante 5 minutos y en agitación, en ausencia (trazo superior) y presencia (trazo inferior) de hidroxilamina 1 mM.

### III.D. ESTUDIO COMPARATIVO DE ALGUNAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL CITOCROMO b-559 PURIFICADO DE CLOROPLASTOS Y DE PARTICULAS DEL FOTOSISTEMA II

En este apartado se describen los principales pasos del proceso de purificación del citocromo b-559 utilizando como material de partida dos preparaciones diferentes: cloroplastos y partículas del fotosistema II.

A continuación se realiza un estudio comparativo de algunas de las propiedades físico-químicas del citocromo b-559 purificado a partir de ambas preparaciones: espectros de absorción, pesos moleculares y potenciales medios de óxido-reducción.

Por último se investiga la integración del citocromo b-559 purificado en sistemas de membranas artificiales o liposomas.

#### III.D.1. Método de purificación

La purificación del citocromo b-559 hasta homogeneidad electroforética se ha realizado siguiendo el método descrito por Garewal y Wasserman (1974a y b), con ciertas modificaciones.

El proceso de purificación consta de los siguientes pasos fundamentales: (1) obtención de cloroplastos y partículas del fotosistema II; (2) eliminación de pigmentos por extracción con etanol; (3) solubilización del citocromo b-559; (4) eliminación de impurezas por cromatografía de intercambio iónico; y (5) electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida.

La purificación del citocromo b-559 presenta importantes dificultades, la mayoría de las cuales se relacionan

con algunas de las propiedades físico-químicas de esta molécula. Por una parte, el carácter extremadamente hidrófobo de esta molécula dificulta su solubilización, haciendo necesario el uso de condiciones drásticas. La utilización para este fin, en nuestro caso, de urea y, sobre todo, del detergente Tritón X-100 introduce dificultades adicionales, fundamentalmente en el análisis de las muestras durante y al final de la purificación. La extrema labilidad del citocromo b-559, sobre todo en su estado oxidado, constituye otro de los problemas fundamentales de la purificación. Durante todo el proceso es necesario mantener al citocromo reducido, empleándose para ello DTE, agente reductor de grupos sulfhidrilos.

La purificación del citocromo b-559 se ha realizado utilizando como material de partida dos preparaciones subcelulares distintas: cloroplastos y partículas del fotosistema II. Ambas preparaciones se obtuvieron según los procedimientos descritos en los apartados II.A.2. y II.A.3. de Materiales y Métodos. En la purificación a partir de cloroplastos se utilizaban alrededor de 12 kg de hojas de espinaca, mientras que en las purificaciones donde se usaban partículas del fotosistema II como material de partida se empleaban alrededor de 6 kg de hojas.

#### III.D.1.1. Eliminación de pigmentos por extracción con etanol y solubilización del citocromo b-559

Como paso previo en la purificación del citocromo b-559 es necesario someter a las preparaciones de cloroplastos y de partículas del fotosistema II a un proceso de extracción con etanol para eliminar la mayor parte de la clorofila y otros pigmentos asociados a membranas. Este tratamiento se realiza como se describe en el apartado II.B.6. de Materiales y Métodos. Las suspensiones obtenidas se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$  con el 20% de glicerol, o bien se emplean en el siguiente paso del proceso.

Como se ha mencionado antes, el citocromo b-559 es una molécula muy hidrófoba y fuertemente asociada a membranas, siendo necesario aplicar un tratamiento muy drástico para conseguir su solubilización. Esta se consigue mediante sonicación de las muestras en presencia del detergente Tritón X-100 y de altas concentraciones de urea. La sonicación se lleva a cabo como se describe en el apartado II.B.7. El Tritón X-100 y la urea facilitan la extracción del citocromo de las membranas y permiten que éste se mantenga en solución. A partir de esta fase, es necesario suplementar todos los tampones con DTE para mantener el citocromo b-559 reducido. Este agente, según se ha descrito, es el responsable de la desaparición del citocromo b-563, que no aparece a partir de aquí en ninguna de las etapas de la purificación.

Los restos de membranas y otros agregados celulares se eliminaban de las suspensiones sonicadas mediante centrifugación como, se describe en el apartado II.B.7. de Materiales y Métodos.

El rendimiento del proceso de sonicación es extremadamente variable, consiguiéndose desde porcentajes del 80% del citocromo b-559 extraído, hasta ensayos de rendimiento nulo, donde no se consigue solubilizar cantidad apreciable de citocromo. La variabilidad parece ser una característica intrínseca de la técnica de sonicación, influyendo además en el rendimiento las distintas propiedades de las membranas que se extraen en cada purificación. La pérdida de citocromo b-559 se produce tanto por la no extracción de la membrana, como por la destrucción de la proteína ocasionada por la propia sonicación.

### III.D.1.2. Eliminación de impurezas por cromatografía de intercambio iónico

El sobrenadante de la fase anterior se somete a una cromatografía de intercambio iónico, como se describe en el apartado II.B.9.1. de Materiales y Métodos, para eliminar impurezas, así como la clorofila no eliminada en la extracción etanólica.

Previo al desarrollo de esta técnica es necesario concentrar la suspensión sonicada y clarificada hasta un volumen inferior al 10% del volumen vacío de la columna, para evitar una excesiva dispersión de la muestra. La concentración se realiza utilizando Sephadex G-25 Fine seco según se describe en el apartado III.B.8. A veces, se producen pequeñas pérdidas durante el desarrollo de este procedimiento, debidas a que parte del citocromo b-559 queda retenida en el Sephadex.

En la Figura 51 se muestra un perfil de elución típico de esta cromatografía de intercambio iónico. Como puede observarse en la figura, la clorofila migra más veloz que los citocromos b-559 y f, gracias a lo cual es posible eliminar gran parte del pigmento no retirado en la fase de extracción con etanol. Cuando se parte inicialmente de cloroplastos en la purificación, los citocromos b-559 y f eluyen juntos dada su gran homología. En este caso, el perfil de elución del citocromo b-559, representado en la figura, coincide exactamente con el perfil del citocromo f. Si se han utilizado partículas del fotosistema II como material de partida, el citocromo b-559 eluye en solitario tras la clorofila, puesto que no hay citocromo f, al haberse eliminado en el proceso de obtención de las partículas.

Las fracciones recolectadas se analizan espectrofotométricamente, y las que contienen citocromo b-559 se mezclan, se concentran con Sephadex G-25 Fine seco como se

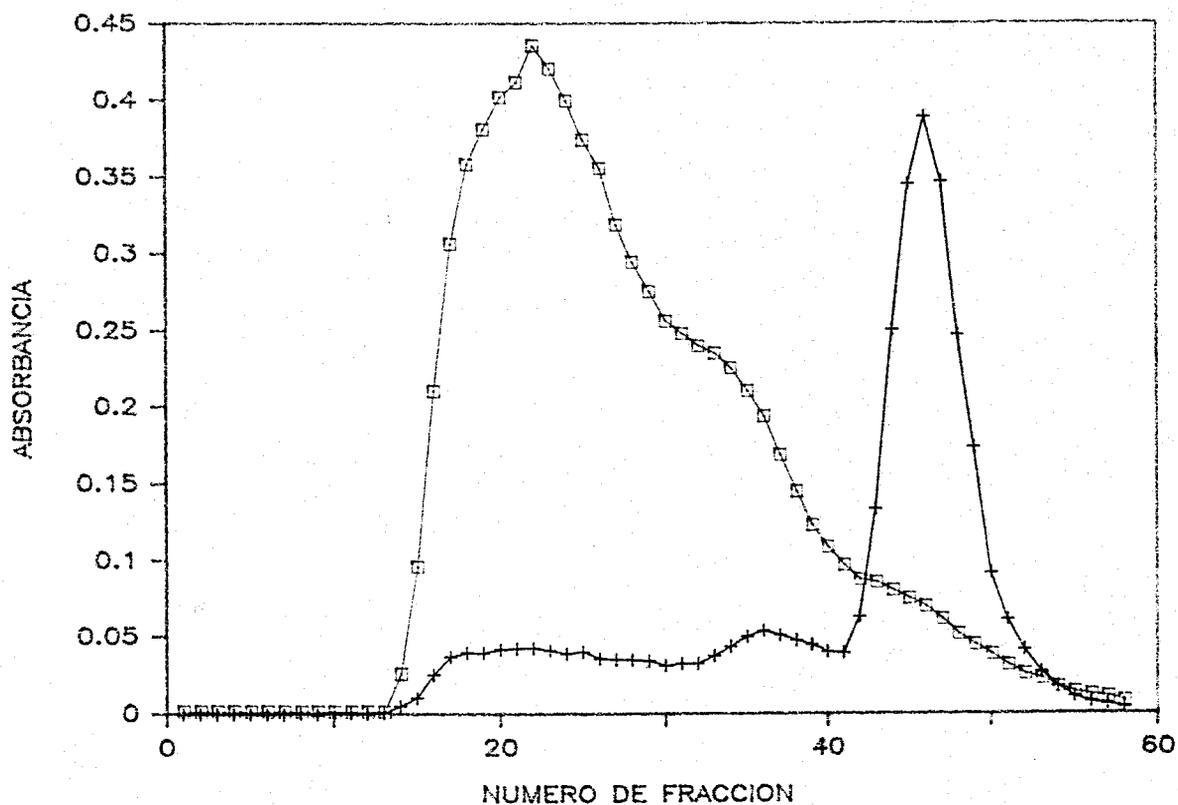


Figura 51. Perfil de elución de clorofila y citocromo b-559 obtenido al cromatografiar en una columna de DEAE-celulosa una suspensión sonicada y clarificada

Las condiciones del proceso son las descritas en el apartado II.B.9.1. de Materiales y Métodos.

(□) Absorbancia a 665 nm; (+) Absorbancia a 559 nm.

describe en el apartado III.B.8. y se suplementan con el 10% de glicerol antes de la electroforesis.

Dada la proximidad de los perfiles de elución de la clorofila y los citocromos, en ningún caso se han obtenido fracciones totalmente libres de este pigmento. En todas las cromatografías realizadas, la cola de elución de la clorofila se alarga y penetra en la zona de los citocromos. Para intentar solventar al máximo esta dificultad fue necesario emplear columnas de gran longitud que facilitan la mayor separación entre clorofila y citocromos, pero que tienen el inconveniente de provocar una gran dilución en las muestras.

Cuando se parte de partículas del fotosistema II en la purificación, las fracciones de citocromo b-559 obtenidas tras la cromatografía son bastante puras, salvo una pequeña contaminación con clorofila, y se pueden utilizar en algunos análisis posteriores.

#### II.D.1.3. Electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida

Las muestras obtenidas tras la cromatografía de intercambio iónico, previamente concentradas como se describe en el apartado II.B.8. de Materiales y Métodos, se someten a una electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida para obtener citocromo b-559 electroforéticamente puro. Las electroforesis se realizaron como se describe en el apartado II.B.10.1. de Materiales y Métodos.

Una vez finalizada la electroforesis (Figura 52), en los geles donde se aplican muestras obtenidas a partir de cloroplastos (Figura 52 izquierda) aparecen dos bandas no muy separadas entre sí y muy cerca ambas del inicio del gel. En los geles donde se aplican muestras provenientes de partículas del fotosistema II (Figura 52 derecha) sólo aparece una banda que

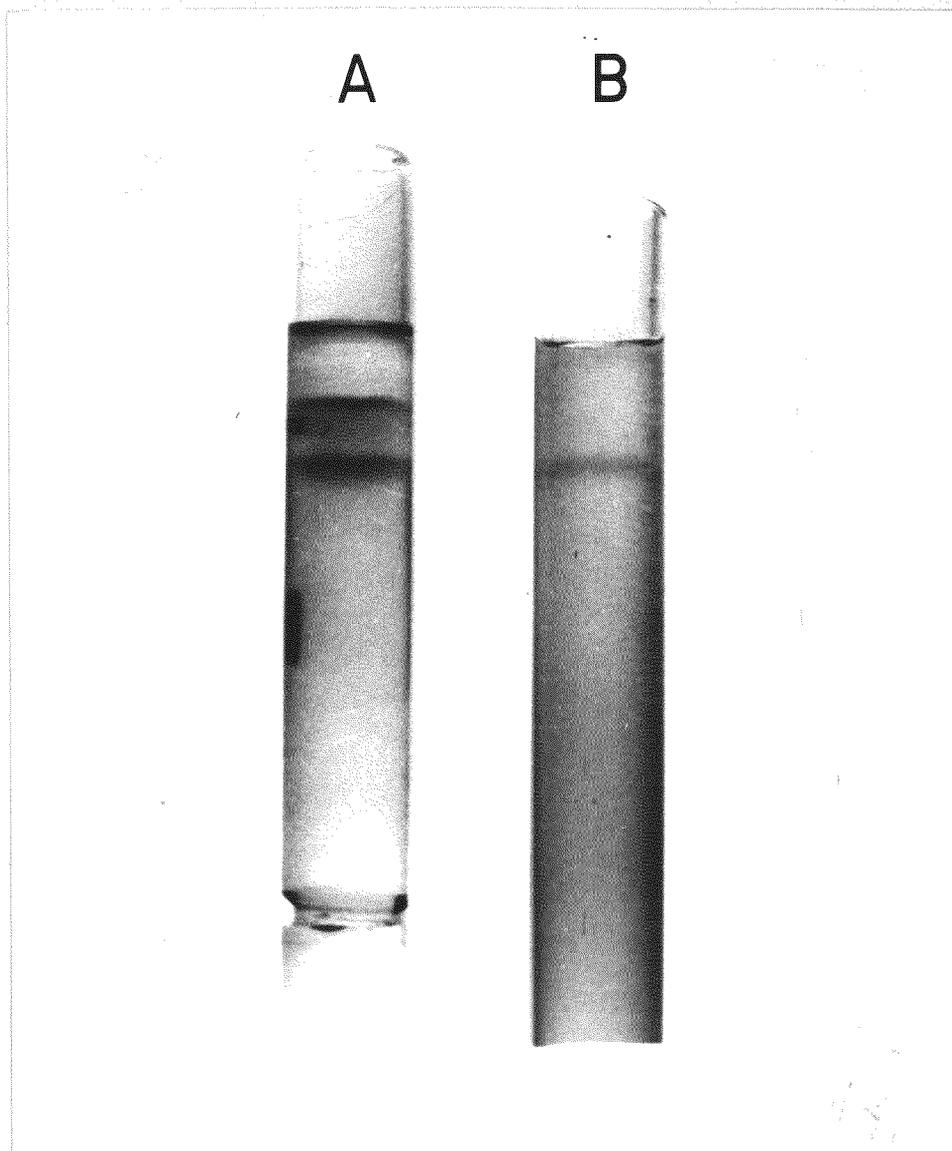


Figura 52. Electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida de las muestras obtenidas tras la cromatografía de intercambio iónico

Las condiciones del proceso son las descritas en el apartado II.B.10.1. de Materiales y Métodos.

En A se aplicó una muestra obtenida utilizando como material de partida de la purificación cloroplastos.

En B se aplicó una muestra obtenida utilizando como material de partida partículas del fotosistema II.

migra aproximadamente la misma distancia que la banda más veloz del primer caso.

El análisis espectrofotométrico de ambos geles mediante densitogramas (Figura 53) muestra que la banda naranja, que aparece en los dos tipos de geles, contiene exclusivamente citocromo b-559. La banda de tono verdoso y menor movilidad, que aparece sólo en los geles donde se aplicaron muestras obtenidas a partir de cloroplastos (Figura 53A), contiene una mezcla de citocromo f y clorofila.

La alta concentración de acrilamida que contienen los geles -necesaria para separar los citocromos b-559 y f- determina la poca migración de las bandas observada en todos los ensayos. Esta baja migración provoca a veces una separación incompleta de las dos bandas y, por tanto, la mezcla de ambos citocromos y la contaminación con clorofila.

El citocromo b-559 se extrae de los geles como se describe en el apartado II.B.10.1. Las muestras de citocromo resultantes se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$  con glicerol al 10% y DTE 2 mM hasta su utilización para los posteriores análisis. La congelación de las muestras de citocromo b-559 en estas condiciones permite su conservación en perfecto estado durante varios meses.

La electroforesis preparativa es uno de los pasos limitantes en el proceso de purificación del citocromo b-559. El citocromo b-559 queda fuertemente retenido en la trama que forma el gel de poliacrilamida, debido a la alta concentración de acrilamida utilizada, recuperándose porcentajes de citocromo bastante bajos, en ningún caso superiores al 50%, a pesar de haber utilizado múltiples métodos de extracción.

En el mejor de los casos, el rendimiento final del proceso de purificación no supera el 20% de recuperación de

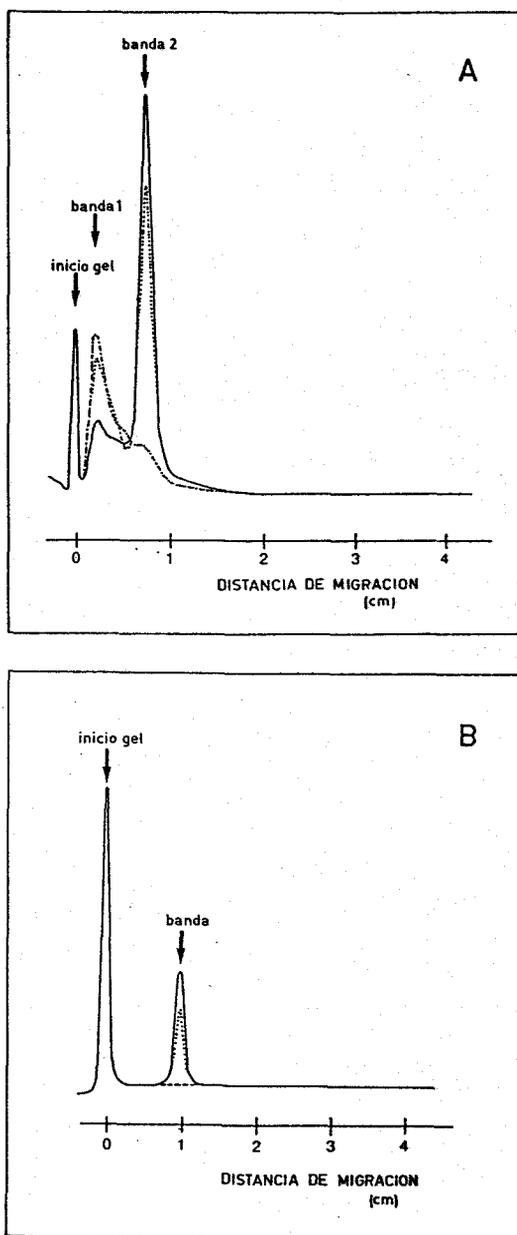


Figura 53. Densitogramas correspondientes a los geles de las electroforesis preparativas de las muestras obtenidas tras la cromatografía de intercambio iónico

Linea continua: gel barrido a 559 nm; línea punteada: gel barrido a 554 nm y línea discontinua: gel barrido a 665 nm. Los densitogramas se realizaron como se describe en el apartado II.B.9.2. de Materiales y Métodos.

(A) Densitograma del gel A de la Figura 52.

(B) Densitograma del gel B de la Figura 52.

citocromo b-559. Partiendo de las cantidades citadas anteriormente -12 kg de hojas de espinaca cuando se utilizan cloroplastos como material de partida y 6 kg cuando se utilizan partículas del fotosistema II- se obtiene una cantidad total de citocromo de 0,5 mg en el caso de cloroplastos y 0,22 mg en partículas del fotosistema II. Dada la diferencia en la cantidad de partida, los rendimientos en ambos casos son muy similares. No obstante, en la mayoría de las purificaciones realizadas partiendo de partículas del fotosistema II el rendimiento suele ser superior a las que utilizan cloroplastos. Esto podría deberse al mayor enriquecimiento en citocromo b-559 respecto a clorofila observado en muchas de las preparaciones de partículas del fotosistema II.

En cualquier caso, es importante resaltar la gran variabilidad global observada en el proceso de purificación del citocromo b-559. Se han obtenido rendimientos desde los descritos como óptimos hasta rendimientos nulos, es decir, purificaciones donde no se ha obtenido cantidad apreciable de citocromo b-559.

### III.D.2. Análisis comparativo de algunas propiedades físico-químicas del citocromo b-559 purificado

#### III.D.2.1. Espectros de absorción

Los espectros de absorción del citocromo b-559 purificado -independientemente de cual haya sido el material de partida de la purificación: cloroplastos o partículas del fotosistema II- son totalmente idénticos, como se muestra en la Figura 54. Se trata en ambos casos de un espectro típico de citocromo, con los tres máximos de absorción característicos en su estado reducido en la banda  $\alpha$  (559 nm),  $\beta$  (530 nm) y Soret (427 nm), y el desplazamiento del máximo de esta última banda en el estado oxidado (414 nm).

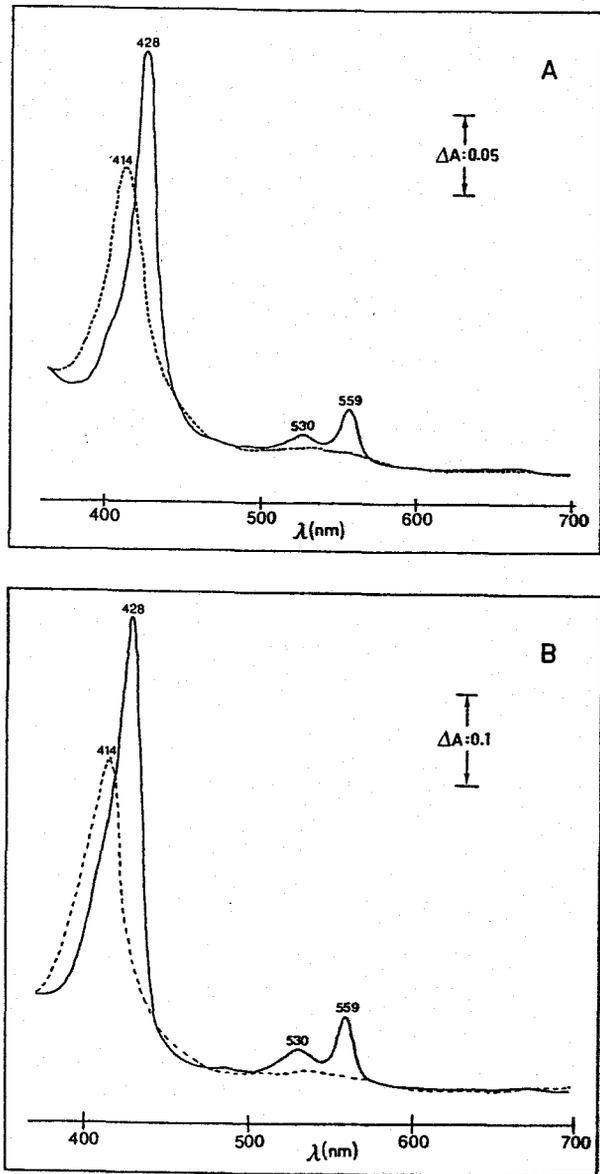


Figura 54. Espectros de absorción del citocromo b-559 purificado a partir de cloroplastos (A) y de partículas del fotosistema II (B)

Línea discontinua: citocromo oxidado; línea continua: citocromo reducido.

Para oxidar completamente al citocromo b-559 se burbujearon las muestras varios segundos con oxígeno. Para asegurar la reducción completa del citocromo se añadieron a las muestras varios cristales de ditionito. Los máximos de absorción en la bandas  $\alpha$ ,  $\beta$  y Soret se indican sobre los picos correspondientes. El resto de las condiciones como en el apartado II.B.4. de Materiales y Métodos.

### III.D.2.2. Peso molecular determinado en condiciones no desnaturalizantes

El peso molecular del citocromo b-559 electroforéticamente puro en condiciones no desnaturalizantes se determina por cromatografía de filtración en gel como se describe en el apartado II.B.9.2. de Materiales y Métodos. En la Figura 55 se muestra la estimación del peso molecular del citocromo mediante esta técnica. Si los volúmenes de elución de las proteínas utilizadas como patrones de peso molecular se representan frente a sus pesos moleculares en una escala semilogarítmica, se obtiene una correspondencia lineal a partir de la cual se puede estimar un valor aproximado de peso molecular para el citocromo b-559 de 200 kDa, asumiendo forma esférica para el complejo de citocromo b-559 y lípidos.

En la determinación del peso molecular del citocromo mediante esta técnica se han utilizado muestras de citocromo obtenidas utilizando como material de partida de la purificación cloroplastos.

### III.D.2.3. Peso molecular determinado en condiciones desnaturalizantes

El peso molecular del citocromo b-559 se determina en condiciones desnaturalizantes mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 9% de acrilamida conteniendo 0,1% de SDS, según se describe en el apartado II.B.10.2.

En todos los ensayos realizados, las electroforesis analíticas en presencia de SDS del citocromo b-559 purificado presentan una única banda polipeptídica (Figura 56), independientemente del material de partida utilizado en la purificación. En algunas ocasiones pudo observarse la aparición de una banda pequeña de color naranja que migraba muy rápidamente,

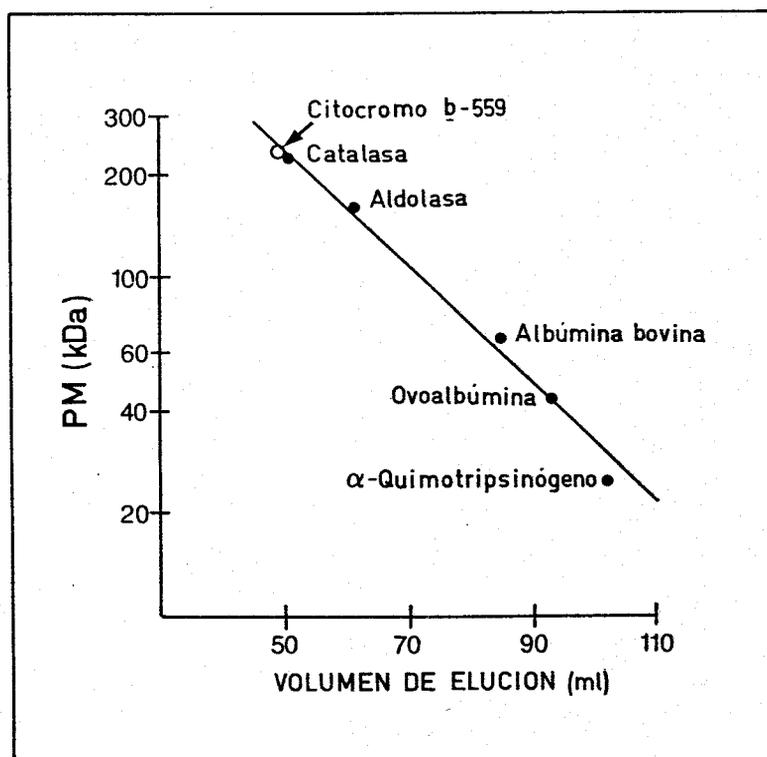


Figura 55. Determinación del peso molecular del citocromo b-559 por cromatografía de filtración en gel

Las condiciones de la cromatografía y el cálculo del peso molecular se describen en el apartado II.B.9.2. de Materiales y Métodos.

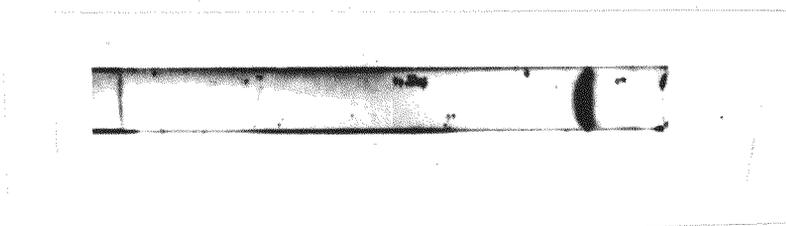


Figura 56. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida  
conteniendo SDS del citocromo b-559 purificado

Muestras de citocromo b-559 purificado fueron sometidas a electroforesis analítica como se describe en el apartado II.B.9.2. de Materiales y Métodos. Los geles se tiñeron posteriormente para localizar las bandas de proteínas según se describe en el mismo apartado. En la figura se muestra un gel donde se aplicó citocromo b-559 purificado utilizando como material de partida cloroplastos.

incluso por delante del propio indicador de frente, y que puede tratarse de algún producto de degradación del colorante utilizado como indicador.

Para determinar el peso molecular del citocromo b-559 se someten a electroforesis simultáneamente una serie de proteínas patrones de peso molecular conocido. La Figura 57 muestra el densitograma de los geles que contenían las proteínas patrones y el citocromo b-559 purificado, a partir del cual pudo calcularse la movilidad relativa de cada proteína. El densitograma del citocromo b-559 representado en la figura corresponde a una muestra de este citocromo obtenida a partir de cloroplastos.

La Figura 58 muestra el resultado obtenido al representar los pesos moleculares, en escala semilogarítmica, frente a los valores de movilidad relativa de cada proteína respecto del frente ( $R_f$ ). Se utilizan muestras de citocromo b-559 purificado a partir de cloroplastos (Figura 58A) y partículas del fotosistema II (Figura 58B), obteniéndose unos valores de peso molecular de 14,6 kDa y 14,0 kDa, respectivamente.

#### III.D.2.4. Potenciales medios de óxido-reducción

La Figura 59 muestra la representación de Nernst de las titulaciones potenciométricas reductivas del citocromo b-559 purificado a partir de cloroplastos (Figura 59A) y partículas del fotosistema II (Figura 59B). En el primer caso, el potencial medio de óxido-reducción obtenido a pH 7,5 es de + 115 mV, y en el segundo caso de + 158 mV, con valores de  $n$  cercanos a 1. Los diferentes ensayos realizados muestran una variabilidad para el potencial de  $\pm 10$  mV.

Esta diferencia de potencial, de alrededor de 40 mV, puede deberse a la posible modificación del entorno del citocromo en las partículas del fotosistema II respecto a los

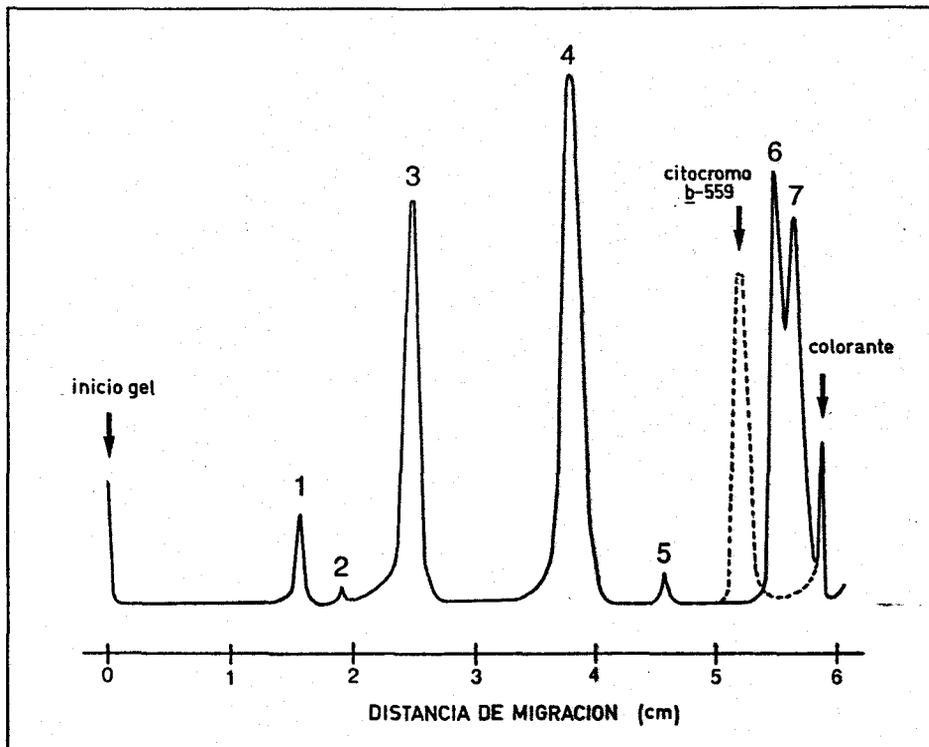


Figura 57. Densitogramas correspondientes a la electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS del citocromo b-559 purificado y de las proteínas utilizadas como patrones de peso molecular

La electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo SDS de las proteínas patrones y del citocromo b-559, la posterior tinción con Coomassie Blue y los densitogramas se realizaron como se describe en el apartado II.B.9.2. de Materiales y Métodos. En la figura se representa el densitograma del gel que contenía las proteínas patrones (línea continua) sobre el que se superpone el densitograma del gel donde se aplicó citocromo b-559 (línea discontinua) obtenido a partir de cloroplastos.

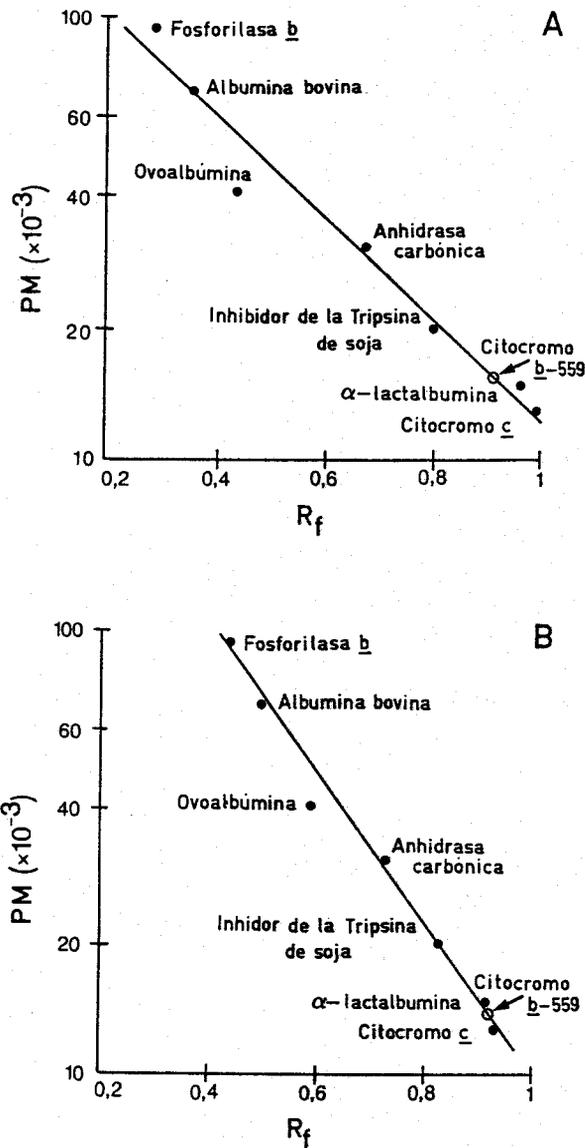


Figura 58. Determinación del peso molecular del citocromo b-559 por electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS

En la electroforesis se aplicaron muestras de citocromo b-559 purificado utilizando como material de partida cloroplastos (A) y partículas del fotosistema II (B). La determinación del peso molecular del citocromo se realizó según se describe en el apartado II.B.9.2. de Materiales y Métodos.

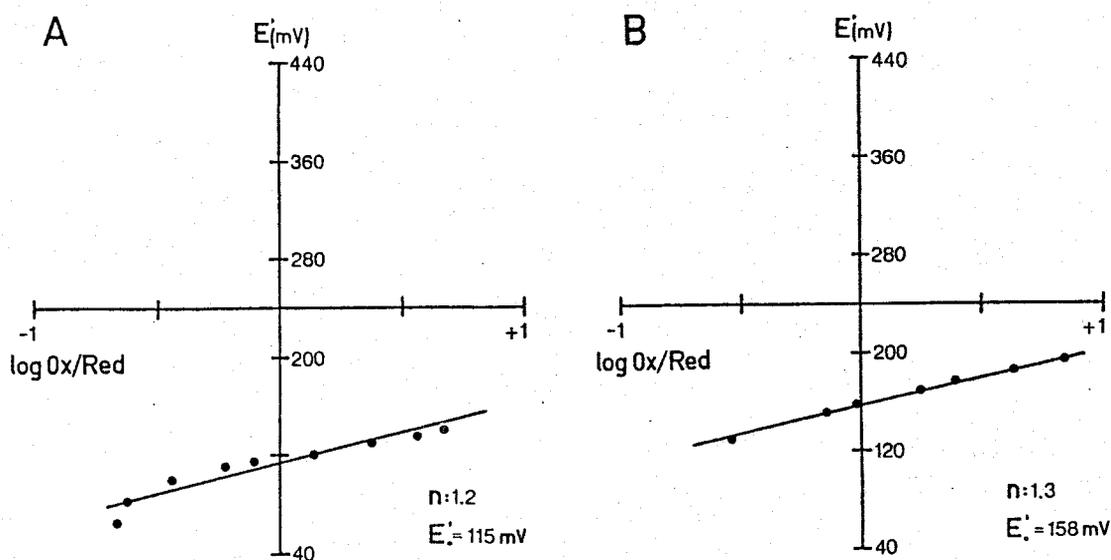


Figura 59. Representación de Nernst de las titulaciones potenciométricas reductivas del citocromo b-559 purificado a partir de cloroplastos (A) y partículas del fotosistema II (B)

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,5, citocromo b-559 purificado y los mediadores redox indicados en la Figura 13. Las titulaciones se llevaron a cabo como se describe en el apartado II.B.5. de Materiales y Métodos. Se representan los experimentos individuales con valores de potencial medio de óxido-reducción más próximos a la media de las 10 titulaciones realizadas en cada caso. El potencial medio obtenido varía  $\pm 10 \text{ mV}$  en los diferentes ensayos.

cloroplastos, que podría alterar en alguna medida el potencial del citocromo b-559.

Es interesante resaltar la gran dificultad que conlleva el realizar las titulaciones potenciométricas con muestras de citocromo b-559 purificado. El sistema muestra una gran inestabilidad que dificulta la detección puntual de los potenciales, probablemente debida al mal equilibrio establecido entre los mediadores redox utilizados y los posibles agregados de citocromo b-559 que se forman, dado su fuerte carácter hidrófobo.

### III.D.3. Regeneración del par de alto potencial mediante la incorporación en liposomas del citocromo b-559 purificado

La integración del citocromo b-559 purificado de bajo potencial en vesículas lipídicas artificiales o liposomas promueve en algunos casos la transformación de parte del citocromo en la forma de alto potencial. En la Figura 60 se muestran los espectros obtenidos tras la reducción secuencial con hidroquinona y ditionito de muestras previamente oxidadas con ferricianuro de citocromo b-559 purificado (Figura 60A) y tras su integración en liposomas (Figura 60B). El citocromo purificado, tras ser oxidado, no muestra fracción de alto potencial reducible por hidroquinona. La adición posterior de ditionito produce un incremento de absorbancia con máximo a 560 nm, correspondiente a la reducción del citocromo b-559, que se encuentra, por tanto, en su totalidad en la forma oxidada de bajo potencial reducible por ditionito. Tras la incorporación del citocromo b-559 en liposomas (Figura 60B), aparece una fracción oxidada de alto potencial reducible por hidroquinona que representa alrededor del 34% del total del citocromo. La posterior adición de ditionito reduce el resto del citocromo b-559 (66%), que se mantiene en bajo potencial.

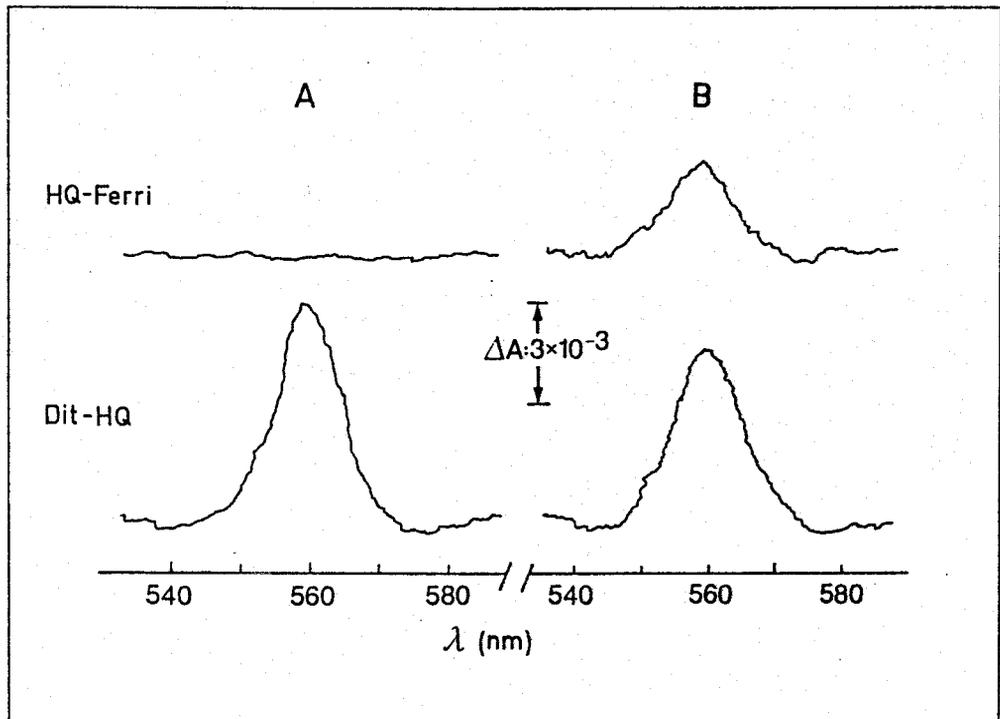


Figura 60. Espectros diferenciales del citocromo b-559 purificado (A) y después de su integración en liposomas (B)

Los espectros de absorción se realizaron como se describe en el apartado II.B.4. de Materiales y Métodos, después de la adición secuencial de ferricianuro 0,5 mM, hidroquinona 20 mM y varios cristales de ditionito. La integración del citocromo b-559 en liposomas se realizó según el procedimiento descrito en el apartado II.B.11. de Materiales y Métodos.

La conversión del citocromo b-559 de bajo potencial en alto potencial mediante su incorporación en liposomas parece ser un fenómeno extremadamente delicado y variable. En nuestro caso, solo se ha conseguido en uno de cada cuatro ensayos de incorporación realizados.

#### **IV. DISCUSSION**

A pesar de los numerosos estudios realizados hasta el presente existe aún gran discusión acerca de las principales propiedades del citocromo b-559, así como en cuanto a su función y sitio de actuación en la cadena fotosintética de transporte de electrones. La importancia cuantitativa de este citocromo en las membranas fotosintéticas, junto a sus peculiares propiedades redox y ácido-base, tales como su existencia en dos pares interconvertibles de diferente potencial redox, con distinta estabilidad y dependencia del potencial respecto al pH, convierten, a nuestro entender, al citocromo b-559 en un serio candidato a desempeñar un papel importante en el aparato fotosintético.

El objetivo fundamental de este trabajo ha sido determinar la posible participación del citocromo b-559 en el mecanismo de transducción de energía redox en energía ácido-base durante el transporte fotosintético de electrones.

En este sentido, las investigaciones realizadas se han centrado en dos cuestiones fundamentales: por una parte, y en base a determinar el posible papel del citocromo b-559 como sistema transductor, se han caracterizado las principales propiedades redox y ácido-base de este citocromo en partículas del fotosistema II; en segundo lugar, se ha investigado la localización del citocromo b-559 en la cadena de transporte de electrones mediante el estudio en cloroplastos de las fotorreacciones inducidas por luces selectivas de los fotosistemas I y II en los citocromos b-559 y f, usando diversos agentes inhibidores y desacoplantes del flujo electrónico fotosintético. También se han estudiado las fotorreacciones del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II.

Por último, se han realizado algunos estudios encaminados a determinar cuantas especies de citocromo b-559 existen

en los cloroplastos, cuestión sometida también a fuerte controversia en la literatura.

Para llevar a cabo este trabajo es necesario disponer de preparaciones de cloroplastos y de partículas del fotosistema II en buenas condiciones. Los cloroplastos deben presentar buenos parámetros de transporte electrónico y de acoplamiento energético, puesto que la preservación del mecanismo de transducción de energía es un requisito indispensable para el tipo de estudios que se han desarrollado. Las partículas del fotosistema II deben poseer, por su parte, un sistema de rotura de agua muy activo, síntoma del buen estado de dichas preparaciones.

La mayoría de las preparaciones de cloroplastos ensayadas presentaban una tasa de transporte electrónico y un acoplamiento óptimos. Los ensayos en cloroplastos se llevaron a cabo siempre a pH 7,5, que es, según se ha descrito previamente (Galván, 1981; Hervás, 1984), el pH al que las vesículas tilacoidales se encuentran mejor acopladas. El sistema global y el fotosistema I, funcionando aisladamente, presentaron tasas iniciales de desprendimiento o consumo de oxígeno, según el caso, muy bajas, que se multiplicaban tras la adición del desacoplante amonio por un factor superior a 4 en ambos sistemas (Tabla I). El fotosistema II en estas preparaciones presenta también buenos niveles de actividad fotosintética, no detectándose ningún efecto del amonio, debido probablemente a que en el ensayo se extraen los electrones antes del segundo sitio de acoplamiento (Tabla I). Estos resultados, con ligeras variaciones, confirman los datos obtenidos por otros autores (Galván, 1981; Hervás, 1984).

El buen acoplamiento de estas preparaciones ha permitido comprobar el efecto desacoplante del CCCP, descrito por numerosos autores (Good, 1977; Avron, 1981) como agente protonofórico (Tabla VI). Hasta una concentración de 10  $\mu\text{M}$

aumenta la tasa de desprendimiento de oxígeno del sistema global. Sin embargo, a concentraciones superiores disminuye la actividad fotosintética del sistema, posiblemente debido a que estas concentraciones pueden afectar negativamente al sistema de rotura del agua (Böhme y Kunert, 1981).

En este trabajo se ha realizado la caracterización de la actividad fotosintética de las preparaciones de partículas del fotosistema II obtenidas según el método de Kuwabara y Murata (1982); preparaciones que, posteriormente, se emplearon en los estudios referentes al citocromo b-559. Se trata de partículas del fotosistema II que liberan oxígeno. La obtención de este tipo de partículas con desprendimiento de oxígeno empezó a principios de esta década (Berthold et al., 1981; Kuwabara y Murata, 1982). Desde entonces se han desarrollado gran cantidad de investigaciones en fotosíntesis utilizando este sistema.

Las preparaciones de partículas del fotosistema II ensayadas presentaban, en la mayoría de los casos, tasas de desprendimiento de oxígeno similares a las obtenidas con el mismo tipo de ensayos en cloroplastos (Tabla VII). Está descrito que el ferricianuro toma fundamentalmente los electrones a nivel de los aceptores primarios del fotosistema I (Trebst, 1972). Sin embargo, la pequeña actividad observada en el sistema  $H_2O \rightarrow Ferri$  en partículas del fotosistema II parece indicar que este reactivo es capaz de aceptar también electrones a nivel de este fotosistema, aunque con mucha menor eficiencia.

Todos los ensayos de desprendimiento de oxígeno en partículas del fotosistema II se han realizado a pH 6,5 y con elevada concentración de sacarosa, ya que la estabilización osmótica del medio parece ser, a diferencia de lo que ocurre en cloroplastos, condición indispensable para el buen funcionamiento de las partículas del fotosistema II. En efecto, si

se elimina la sacarosa del tampón, el desprendimiento de oxígeno desciende considerablemente.

Una propiedad importante de estas partículas es la gran estabilidad que muestra su actividad de desprendimiento de oxígeno (Figura 9), lo que concuerda con los datos obtenidos por otros autores (Kuwabara y Murata, 1982). Esta estabilidad contrasta notablemente con la gran labilidad de la actividad fotosintética de cloroplastos (Tabla II). En preparaciones de cloroplastos, la actividad fotosintética del fotosistema I permanece enormemente estable en el tiempo, en contraste con la actividad global y la del fotosistema II (Tabla II). Esto parece sugerir que el sistema de rotura del agua es el componente más lábil en cloroplastos, contrastando con la gran estabilidad de este sistema observada en partículas del fotosistema II. De acuerdo con Kuwabara y Murata (1982), esta propiedad se debe a que el tratamiento con Tritón X-100 -utilizado en el proceso de extracción de las partículas- elimina un componente de la membrana tilacoidal que podría ser el responsable de la inactivación del sistema de rotura del agua o a que, en todo caso, el detergente protege al sistema de rotura de la desnaturalización. En nuestra opinión, este fenómeno está relacionado con la protección de las estructuras promovida por la gran concentración de estabilizador osmótico presente en el medio de resuspensión y de ensayo. Además, las membranas tilacoidales estarían expuestas, por su mayor complejidad, a un mayor número de posibles causas de deterioro que las partículas del fotosistema II, por ejemplo: presencia de componentes muy oxidados o reducidos en la cadena de transporte, que se eliminan en las preparaciones de partículas del fotosistema II; pérdida de determinados componentes solubles de la cadena fotosintética de transporte, etc.

La actividad fotosintética es mucho más sensible al CCCP en las partículas del fotosistema II (Figura 10) que en

cloroplastos (Tabla VI). Una posible explicación a este fenómeno podría ser que en las partículas del fotosistema II el CCCP ha ganado accesibilidad al componente del sistema de rotura del agua sobre el que actúa.

Las propiedades redox y ácido-base del citocromo b-559 de cloroplastos de espinaca han sido establecidas previamente (Galván, 1981; Galván et al., 1983; Hervás et al., 1985). En base a estos estudios y a otros desarrollados con citocromos de tipo b de mitocondrias, nuestro grupo ha postulado un modelo de funcionamiento del citocromo b-559 como sistema redox y ácido-base transductor, partiendo de la base de que este citocromo está presente "in vivo" en forma de dos pares interconvertibles con diferente potencial medio de óxido-reducción; los pares de alto y bajo potencial. El par de alto potencial es inestable y sus dos formas, oxidada y reducida, están protonadas; siendo la oxidada la forma energizada. El par de bajo potencial es, por el contrario, estable, y sus dos formas son desprotonadas. Ambos pares comparten la misma forma reducida, que puede estar protonada o desprotonada, dependiendo del pH, siendo en el primer caso de alto potencial, y en el segundo, de bajo.

La caracterización redox y ácido-base del citocromo b-559 en las partículas del fotosistema II nos ha permitido confirmar algunos de los planteamientos básicos de nuestro modelo de funcionamiento del citocromo b-559 como sistema transductor. Los resultados obtenidos han servido además para profundizar en algunos puntos del modelo, lo que ha permitido establecer el ciclo redox y ácido-base completo del citocromo b-559.

En partículas del fotosistema II con desprendimiento de oxígeno no se han realizado apenas estudios relativos a la

caracterización redox y ácido-base del citocromo b-559. La utilización de estas partículas para realizar estudios espectrofotométricos y potenciométricos del citocromo b-559 posee enormes ventajas sobre el empleo de cloroplastos. Por una parte, se trata de un sistema menos complejo, ya que se elimina el fotosistema I y gran parte de la cadena de transporte electrónico. Por otra parte, y este aspecto es fundamental, desaparecen las interferencias espectrales debidas a los citocromos f y b-563, pues el único citocromo detectable en estas preparaciones es el b-559.

En las preparaciones de partículas del fotosistema II, el citocromo b-559 aparece en forma de dos pares de alto y bajo potencial. Estas preparaciones presentan  $2/3$  del citocromo b-559 en forma reducida y  $1/3$  en forma oxidada de bajo potencial (Figura 12). Esta situación del citocromo es similar a la encontrada en cloroplastos (Figura 11), con la importante diferencia de que en las partículas del fotosistema II desaparece la interferencia espectral del citocromo f, que se detecta en la fracción reducible por hidroquinona en cloroplastos.

El tratamiento de suspensiones de cloroplastos con Tritón X-100, detergente que altera la estructura de las membranas biológicas, transforma toda la fracción del citocromo b-559 de alto potencial en bajo potencial (Figura 11C). Estos resultados, llevados a cabo a título comparativo, ratifican la inestabilidad del par de alto potencial postulada por nuestro modelo y puesta de manifiesto por diversos autores con diferentes tratamientos (Wada y Arnon, 1971; Galván, 1981; Galván et al., 1983; Hervás et al., 1985).

En preparaciones de partículas del fotosistema II que no desprenden oxígeno se ha determinado el potencial medio del citocromo b-559, detectándose un único potencial con un valor

en torno a + 60 mV (Hind y Nakatani, 1970; Ke et al., 1972). El que en estas preparaciones se detecte sólo el citocromo de bajo potencial podría deberse al método de extracción utilizado, que, dado su carácter drástico, transformaría todo el citocromo b-559 de alto potencial en el de bajo. No existen datos en la literatura sobre el potencial de este citocromo en partículas del fotosistema II que desprendan oxígeno.

En este trabajo se han determinado los potenciales medios de óxido-reducción del citocromo b-559 en preparaciones de partículas del fotosistema II que desprenden oxígeno (Figura 14). El valor del potencial medio del par de alto potencial del citocromo b-559 en estas preparaciones, + 380 mV a pH 7,5, difiere muy poco respecto a los resultados obtenidos por otros autores en preparaciones de cloroplastos (Boardman et al., 1971; Knaff y Arnon, 1971; Knaff, 1975; Rich y Bendall, 1980; Galván, 1981; Hervás et al., 1985). En cuanto al par de bajo potencial, el valor, + 145 mV a pH 7,5, es bastante más elevado que la mayoría de los referidos en cloroplastos (Fan y Cramer, 1970; Rich y Bendall, 1980; Hervás et al., 1985). Esta diferencia puede deberse a la modificación del entorno del citocromo b-559 producida como consecuencia del proceso de extracción de las partículas del fotosistema II.

El diferente comportamiento respecto al pH del potencial medio de los pares de alto y bajo potencial del citocromo b-559 en preparaciones de partículas del fotosistema II (Figura 15) confirma los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo en cloroplastos (Hervás et al., 1985). El par de alto potencial exhibe un valor de potencial medio constante, en torno a + 380 mV, en contraste con las variaciones detectadas por otros autores (Horton y Cramer, 1975b; Knaff, 1975). El potencial del par de bajo potencial, por el contrario, es independiente del pH por encima de pH 7,6, pero se vuelve dependiente por debajo de este valor de  $pK_a$ , con una pendiente de -60 mV/unidad de pH. El  $pK_a$  de 7,6 es similar al observado

en cloroplastos (Hervás et al., 1985). Esto sugiere la implicación de 1 protón por electrón en las reacciones de este par. Así, y según nuestra hipótesis, la reducción de la forma oxidada del par de bajo potencial implicaría, a pHs inferiores a 7,6, la protonación de la forma reducida resultante y su transformación en forma reducida de alto potencial. Al permanecer el potencial del par de alto potencial constante con el pH, la forma oxidada de este par debe estar necesariamente protonada también.

En resumen, esta distinta dependencia respecto al pH del potencial de ambos pares nos ha servido de base para postular la existencia de una forma oxidada, protonada y energizada, y de otra forma oxidada, desprotonada y desenergizada, siendo aquella, en último término, la que acumularía la energía que el par redox es capaz de almacenar y posteriormente transducir en forma de energía ácido-base.

Los estudios de EPR del citocromo b-559 en tilacoides, partículas del fotosistema II y en la proteína purificada (Bergström y Vänngård, 1982; Babcock et al., 1985; Ghanotakis et al., 1986) parecen confirmar la existencia de dos formas oxidadas del citocromo b-559. En estas preparaciones se han identificado dos señales de hemo de bajo spin, con  $g_z$  diferentes, que desaparecen al reducir el citocromo b-559. Estas señales han sido atribuidas a dos formas oxidadas de este citocromo, que deben tener diferente configuración electrónica. Según nuestra hipótesis, esta diferencia podría estar causada porque una de las formas oxidadas del citocromo b-559, la de alto potencial, está protonada, mientras que la otra, de bajo potencial, no lo está.

El carácter lábil del citocromo b-559 de alto potencial de cloroplastos, que se transforma en bajo potencial mediante diversos tratamientos desenergizantes (calentamiento, sonicación, detergentes, digestión con tripsina, lavado con

NaCl, etc.), ha sido repetidamente establecido (Cramer et al., 1971; Wada y Arnon, 1971; Cox y Bendall, 1972; Galván et al., 1983; Briantais et al., 1985; Hervás et al., 1985; Ghanotakis et al., 1986). Según nuestra hipótesis, esta inestabilidad del par de alto potencial se debe a que la forma oxidada está energetizada, siendo responsable del mantenimiento de esta energetización una protonación. Los resultados obtenidos en este trabajo con partículas del fotosistema II confirman la labilidad del par de alto potencial y han permitido profundizar aún más en el mecanismo responsable de esta propiedad.

Que la protonación del par de alto potencial es una condición necesaria para el mantenimiento de la energetización del citocromo b-559 parece confirmarse con los experimentos realizados en partículas del fotosistema II. En efecto, las condiciones que dificultan la protonación, como la incubación de las partículas a pHs básicos (Figuras 16A y 18), resultan ser un buen mecanismo de conversión del par de alto potencial en el de bajo. A pHs básicos, la protonación del par de alto potencial se encuentra dificultada, tendiendo en estas condiciones, por ser un par lábil energetizado, a perder el protón y a transformarse por consiguiente en el par de bajo potencial. Esto parece confirmarse por el hecho de que a pHs ácidos y, aunque en menor medida, neutros, la estabilidad en el tiempo del par de alto potencial es manifiesta (Figura 18). En estas condiciones, la protonación del par de alto potencial está favorecida. En esta misma línea cabría interpretar la desaparición del par de alto potencial del citocromo b-559 y su transformación en el par de bajo potencial observada en las titulaciones potenciométricas de este citocromo en preparaciones de partículas del fotosistema II a pHs básicos (Figura 15). La incubación a ese pH, durante el tiempo necesario para realizar la titulación en anaerobiosis y en presencia de mediadores redox, parece facilitar la pérdida del protón del par de alto potencial y, en consecuencia, su transformación en el par de bajo potencial.

Otros tratamientos que alteran la estructura de la membrana, y que de alguna manera podrían impedir el mantenimiento de la protonación del par de alto potencial, provocan también la transformación de este par en el par de bajo potencial. Este es el caso del calentamiento por encima de 35°C o de la incubación con el detergente Tritón X-100 (Figuras 16B y 21, respectivamente). El envejecimiento también provoca la transformación de una parte del par de alto potencial en el de bajo (Figura 17). Sin embargo, es necesario resaltar la gran estabilidad del par de alto potencial en las partículas del fotosistema II, en comparación con la labilidad de este par en tilacoides (Galván, 1981). Esta propiedad, al igual que la estabilidad observada en el sistema de rotura del agua, pone de manifiesto el alto grado de conservación en el tiempo de las estructuras en las preparaciones de partículas del fotosistema II, lo que favorece el mantenimiento del par energizado y lábil del citocromo.

El CCCP también produce la transformación del par de alto potencial del citocromo b-559 en el par de bajo potencial (Figura 19), pero su efecto no parece poder explicarse por un deterioro en el entorno del citocromo. El CCCP es un agente químico de múltiples efectos en fotosíntesis (Izawa, 1977). Está descrito que actúa como desacoplante del flujo electrónico fotosintético dado su carácter protonofórico (Good, 1977; Avron, 1981) y como agente ADRY, que interacciona con el sistema de rotura del agua, facilitando la desactivación de los estadios intermedios de la oxidación del manganeso, y por tanto, bloqueando globalmente este proceso (Böhme y Kunert, 1981). Algunos autores postulan la interacción directa del CCCP con el citocromo b-559 (Galván et al., 1983; Hervás et al., 1985; Ghanotakis et al., 1986). En esta línea parecen apuntar los resultados obtenidos en este trabajo. En nuestra opinión, la transformación del par de alto potencial del citocromo b-599 en el par de bajo producida por el CCCP (Figura 19), podría interpretarse asumiendo una interacción directa

de este agente con el citocromo, de forma que captaría el protón del par de alto potencial de forma irreversible, promoviendo por tanto la transformación de este par inestable en el par estable y desprotonado de bajo potencial.

A este respecto, es interesante resaltar que el CCCP provoca la pérdida de dependencia respecto al pH del potencial del par de bajo potencial del citocromo b-559 en cloroplastos (Hervás et al., 1985). Según nuestra hipótesis, el CCCP impediría cualquier protonación del citocromo b-559. Sin embargo, el tratamiento con Tritón X-100, que transforma totalmente el par de alto potencial en el de bajo, no elimina la dependencia respecto al pH del potencial del par de bajo potencial, ya que, aunque elimina la protonación de la forma oxidada lábil, no impide la protonación de la forma oxidada de bajo potencial al reducirse.

Algunos autores explican la interconversión entre el citocromo b-559 de alto y bajo potencial por cambios en la estructura interna de la molécula. Análisis ópticos, de EPR y de espectroscopía de resonancia Raman del citocromo b-559 aislado y de diversos modelos de complejos de hemo han demostrado que la coordinación del hemo al citocromo se realiza a través de dos histidinas (Babcock et al., 1985). Como la subunidad secuenciada de este citocromo (Widger et al., 1984; Cramer et al., 1986) sólo contiene una histidina, se ha postulado que el citocromo b-559 es al menos un dímero con el hemo enlazando dos cadenas polipeptídicas (Cramer et al., 1986). Babcock et al. (1985) han propuesto que el citocromo b-559 de bajo potencial tendría los planos de los imidazoles de las dos histidinas en paralelo, mientras que el citocromo de alto potencial, los tendría en una posición más perpendicular. La conversión entre las formas de alto y bajo potencial del citocromo b-559 ha sido explicada en términos de cambios en la orientación de los dos anillos de imidazol de las histidinas

(Babcock et al., 1985) o por cambios en la orientación del plano del hemo (Rutherford, 1985).

Estos cambios de orientación, bien de los anillos imidazólicos o bien del hemo, responsables según algunos autores de las transformaciones entre el citocromo b-559 de alto y bajo potencial, podrían atribuirse, según nuestra hipótesis, a la protonación o desprotonación de la forma oxidada.

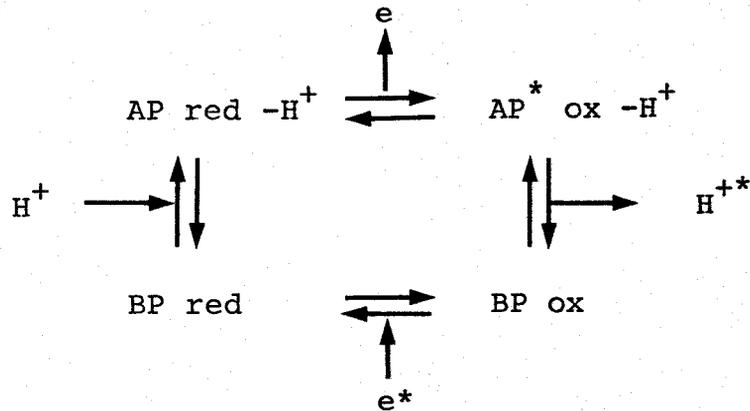
Como ya se ha comentado, los pares de alto y bajo potencial del citocromo b-559 parecen compartir la misma forma reducida, protonada o no según el pH. Sin embargo, las titulaciones oxidativas del citocromo b-559 en partículas del fotosistema II reducidas con ditionito han puesto de manifiesto la existencia de dos formas reducidas diferentes, de alto y bajo potencial (Figura 13B). En preparaciones frescas tan sólo es posible titular la forma reducida de alto potencial (Figura 23), no apareciendo nunca la forma reducida de bajo potencial. Para detectar esta forma es necesario mantener el citocromo b-559 en las condiciones reductoras en las que se realiza la titulación oxidativa (Figura 13B). Parece, por tanto, que esta forma reducida de bajo potencial no aparece nunca en condiciones normales ni en partículas del fotosistema II ni en tilacoides (Hervás et al., 1985), lo que achacamos a que es autooxidable. El carácter autooxidable de la forma reducida de bajo potencial podría explicar la oxidación del citocromo b-559 promovida por el CCCP en oscuridad en las preparaciones de partículas del fotosistema II (Figura 20). Esta oxidación no puede atribuirse a que el CCCP sea un agente oxidante "per se", ya que no promueve cambios apreciables en el potencial de la solución. En nuestra opinión, el CCCP captaría el protón de la forma reducida del par de alto potencial presente inicialmente, determinando su conversión en la forma reducida del par de bajo potencial, que se oxida espontáneamente.

Previamente se ha discutido el carácter lábil e inestable del par de alto potencial del citocromo b-559. Pues bien, las dos formas, oxidada y reducida, de este par parecen mostrar diferente estabilidad entre ellas. Así, mientras que en preparaciones de partículas del fotosistema II sometidas a tratamiento con el detergente Tritón X-100 existe una fracción reducida de alto potencial del citocromo b-559 (Figuras 22 y 23), en estas condiciones es imposible detectar fracción alguna de forma oxidada de alto potencial (Figura 22). Esto sugiere que la forma reducida de alto potencial es estable en presencia del detergente en mucha mayor medida que la forma oxidada. La relativa estabilidad de la forma reducida y protonada de alto potencial del citocromo b-559 pudo comprobarse además durante el proceso de extracción de las partículas del fotosistema II. A pesar de la gran concentración de Tritón X-100 utilizada en uno de los pasos, las partículas obtenidas al final del proceso presentan una proporción de forma reducida de alto potencial muy alta, comparable a la que aparece en tilacoides (Figura 11 y 12).

En esta misma línea podría interpretarse la mayor conversión del par de alto potencial del citocromo b-559 en el par de bajo observada en partículas del fotosistema II incubadas a pH básico, si esta incubación se realiza en condiciones oxidantes (Figura 18B). Como se discutió antes, a pHs básicos la protonación del par de alto potencial del citocromo se encuentra poco favorecida y, por eso, una parte tiende a perder el protón y a transformarse en el par de bajo potencial. Sin embargo, la protonación de la forma reducida parece afectarse en menor medida que la de la forma oxidada a esos pHs. Esto resulta lógico si se piensa que la forma oxidada es la energizada y, por tanto, inestable. Incluso a pH relativamente ácido (pH 6,5), donde la protonación de ambas formas está favorecida, la forma oxidada de alto potencial es menos estable que la reducida.

Un fenómeno similar se ha observado en partículas del fotosistema II incubadas con Tritón X-100 en ausencia y presencia de ferricianuro (Figura 21). En un entorno alterado parece razonable pensar que a la forma oxidada le cuesta más trabajo mantener el protón que a la reducida, siempre partiendo de la base de que la forma oxidada es la energizada.

En base a estos resultados hemos establecido un esquema de funcionamiento del citocromo b-559 como sistema transductor de energía que, a diferencia de los esquemas previos de nuestro grupo (Galván et al., 1983; Losada et al., 1983; Hervás et al., 1985; Losada, 1986; Losada et al., 1988), implica la participación de cuatro formas de este citocromo: formas reducida y oxidada de alto potencial, ambas protonadas, y formas reducida y oxidada de bajo potencial, ambas desprotonadas.



Muchas de las transiciones entre las diversas formas del citocromo b-559 han sido caracterizadas por diversos autores (Chance et al., 1970; De la Rosa et al., 1981; Galván, 1981; Galván et al., 1983; Losada et al., 1983; Hervás, 1984; Hervás et al., 1985). Las formas oxidadas de los pares de alto y bajo potencial pasan a sus correspondientes formas reducidas con hidroquinona y ditionito, respectivamente. Como se ha discutido previamente, la forma reducida de alto potencial se oxida a alto potencial con ferricianuro, mientras que la forma reducida de bajo potencial, que es autooxidable, pasa a la

forma oxidada de bajo potencial espontáneamente. También se han conseguido algunas transiciones entre formas de los dos pares de potencial. Así, la forma oxidada de alto potencial se convierte en la de bajo por diversos tratamientos desenergetizantes, algunos de ellos ya descritos en este trabajo. La forma reducida de alto potencial pierde el protón por acción del CCCP y pasa a la forma reducida de bajo potencial, que se autooxida espontáneamente. La transformación directa de la forma oxidada de bajo potencial en la forma oxidada de alto potencial ocurriría por la protonación de la primera. Teóricamente, teniendo en cuenta que la diferencia de potencial entre los dos pares es de alrededor de + 240 mV, y sin considerar el potencial de membrana, se puede calcular un  $pK_a$  para la forma oxidada de bajo potencial en torno a 3,6. A pHs por debajo de este  $pK_a$ , se produciría la conversión de la forma oxidada de bajo potencial en la forma oxidada de alto. Esto no ha podido ser comprobado por esta vía, es decir, bajando extraordinariamente el pH de las preparaciones, ya que aparecen procesos de deterioro de membranas y proteínas. Sin embargo, como se discutirá posteriormente, esta transformación se ha realizado de forma indirecta.

Existen en la literatura diversos casos de transformación de la forma oxidada de bajo potencial en la de alto. En mitocondrias se han conseguido transformaciones reversibles entre los dos pares de potencial del citocromo b-564 con tratamientos desenergetizantes y energetizantes (Hervás et al., 1984). En preparaciones del complejo III purificado de mitocondrias de levadura, donde sólo aparece citocromo b-564 de bajo potencial, se ha conseguido su conversión completa en alto potencial mediante la integración del complejo III en vesículas lipídicas (Hervás et al., 1988). En cloroplastos, el citocromo b-559 de bajo potencial ha sido transformado en alto potencial mediante diversas técnicas. Okayama y Butler (1972) y Cox y Bendall (1974) consiguieron esta reversión añadiendo plastoquinona a cloroplastos a los que se les había extraído

ésta con solventes orgánicos y en los que todo el citocromo b-559 estaba en bajo potencial. Matsuda y Butler (1983) observaron esta transformación al integrar el citocromo b-559 purificado de bajo potencial en liposomas.

En este trabajo se han obtenido resultados que confirman los experimentos de Matsuda y Butler (Figura 60) y se ha establecido un nuevo procedimiento de regeneración del par de alto potencial a partir de preparaciones de partículas del fotosistema II donde todo el citocromo b-559 está en bajo potencial (Figura 24), lo que ha permitido completar el ciclo redox y ácido-base del citocromo b-559.

Se trata de un procedimiento indirecto puesto que, como ya dijimos antes, pasar directamente de la forma oxidada de bajo potencial a la forma oxidada de alto requiere, según nuestro modelo, bajar extraordinariamente el pH. Así, en partículas del fotosistema II sometidas a un tratamiento altamente desenergetizante (incubación con elevada concentración de Tritón X-100) y oxidadas (Figura 24.I), donde todo el citocromo se encuentra en su forma oxidada de bajo potencial, la reducción completa con ditionito a pH ligeramente ácido, por debajo del  $pK_a$  7,6, conduce a la aparición de forma reducida y protonada de alto potencial, que es, como ya hemos visto, en cierta medida estable en presencia del detergente. La eliminación del Tritón X-100 permite finalmente que, tras oxidar con ferricianuro, aparezca una proporción considerable de forma oxidada y protonada de alto potencial que se puede mantener al haberse restaurado las condiciones fisiológicas iniciales. Que no se consiga una transformación del 100% en la forma oxidada de alto potencial puede deberse a la existencia de un equilibrio en la membrana entre ambos pares, dado que en partículas frescas nunca se observa el 100% del citocromo b-559 en alto potencial, y al hecho de que el entorno del citocromo haya quedado alterado tras el tratamiento con el

detergente, imposibilitando el mantenimiento de niveles altos del par energizado de alto potencial.

Que la transformación directa de la forma oxidada de bajo potencial en la forma oxidada y protonada de alto potencial es un proceso no favorecido termodinámicamente, parece confirmarlo el hecho de que el procedimiento anterior de regeneración no conduce a la aparición de forma oxidada de alto potencial si se realiza en condiciones oxidantes, es decir, si se elimina la reducción con ditionito. (Figura 24.II). En estas condiciones, la eliminación del detergente no produce la aparición de la forma oxidada de alto potencial.

Otro de los aspectos del citocromo b-559 que se encuentra en la actualidad sometido a discusión es si existen una o más especies de este citocromo.

Diversos autores defienden la existencia de un citocromo b-559 de alto potencial asociado al fotosistema II, a partir del cual, por degradación, puede originarse un citocromo b-559 de bajo potencial, que por tanto no es fisiológico (Heber et al., 1979; Bendall, 1982; Tsujimoto y Arnon, 1985; Cramer et al., 1986; Bendall y Rolfe, 1987). Para otros (Anderson y Boardman, 1973; Knaff y Malkin, 1973; Cox, 1979; Rich y Bendall, 1980; Bendall, 1982; Bendall y Rolfe, 1987), existiría además otro citocromo b-559 de bajo potencial, éste fisiológico, asociado al fotosistema I y con un valor de potencial redox mucho menor que el del citocromo de bajo potencial resultante de la degradación del de alto. Los dos citocromos, el de alto potencial del fotosistema II y el de bajo potencial del fotosistema I, serían, por lo tanto, proteínas distintas, situadas en sitios diferentes. Mientras el citocromo b-559 de alto potencial se situaría en las membranas tilacoidales apiladas, el citocromo de bajo potencial lo haría en las no apiladas (Rao et al., 1986; Barber et al., 1987).

Los resultados presentados en la última parte de este trabajo parecen diferir de las hipótesis anteriores. Así, como ya se ha discutido previamente, el citocromo b-559 aparece en todas las preparaciones de partículas del fotosistema II ensayadas en alto y bajo potencial. En estas preparaciones se ha conseguido la transformación reversible entre los dos pares de potencial de este citocromo; primero, transformando el par de alto potencial en el par de bajo mediante tratamientos desenergetizantes (Figuras 16 y 21), y después, transformando el par de bajo potencial en el de alto, mediante el procedimiento descrito y discutido anteriormente (Figura 24). Esta conversión reversible implica, a nuestro entender, que ambos citocromos, de alto y bajo potencial, son dos especies totalmente funcionales y fisiológicas de la misma proteína. En este mismo sentido apuntan los experimentos de regeneración del citocromo b-559 de alto potencial a partir del citocromo purificado de bajo potencial. Aplicando básicamente el método de Matsuda y Butler (1983) hemos conseguido regenerar una fracción de citocromo b-559 de alto potencial por integración del citocromo purificado de bajo potencial en vesículas lipídicas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Figura 60).

Para profundizar más en esta cuestión se ha purificado el citocromo b-559 utilizando como material de partida bien cloroplastos o bien partículas del fotosistema II, obteniéndose en ambos casos una única proteína de similares características físico-químicas: espectro (Figura 54), potencial redox (Figura 59) y peso molecular (Figura 58). La pequeña diferencia observada entre los potenciales redox del citocromo b-559 purificado a partir de ambas preparaciones, + 115 mV en el caso de cloroplastos y + 158 mV en el de partículas del fotosistema II, podría deberse a la alteración del entorno del citocromo producida por el tratamiento con detergente necesario para obtener las partículas del fotosistema II. En todo caso, esta diferencia no es comparable en absoluto a la diferencia de potencial detectada por diversos autores entre

los dos citocromos de bajo potencial, el fisiológico y el no fisiológico.

El peso molecular del citocromo b-559, así como el número de subunidades que lo componen, son aspectos sometidos todavía a una importante discusión (ver INTRODUCCION). Los resultados obtenidos en este trabajo indican la presencia de una sola subunidad polipeptídica de 14 kDa (Figuras 56-58). Sin embargo, realizando la electroforesis con SDS en geles de poliacrilamida más concentrados con el nuevo sistema descrito por Schägger y von Jagow (1987), se ha obtenido una subunidad de 9 kDa. Esta disparidad, puesta de manifiesto en la literatura, podría tener múltiples causas; entre ellas, el carácter sumamente hidrófobo del citocromo, que determina interacciones con los geles, la posible degradación o agregación del citocromo purificado y almacenado durante tiempos prolongados, etc.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto y los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo (Galván, 1981; Losada et al., 1983; Galván et al., 1983; Hervás, 1984; Hervás et al., 1984; Hervás et al., 1985; Hervás et al., 1988) hemos establecido un esquema de funcionamiento del citocromo b-559 como sistema transductor de energía redox en energía ácido-base con algunas modificaciones respecto a anteriores modelos (Hervás et al., 1985). El mecanismo de transducción es del tipo de los que hemos denominado de forma oxidada y básica energizada (ver INTRODUCCION) y presenta dos puntos claves: (1) el citocromo b-559 puede operar como sistema redox transductor a dos potenciales medios alternantes y como sistema ácido-base transductor a dos  $pK_a$ s alternantes; (2) ambos sistemas presentan un intermediario común que puede existir en una forma desenergetizada basal o en una forma energizada y protonada.

El ciclo completo de funcionamiento del sistema sería el siguiente (Figura 61): la forma oxidada y no protonada de

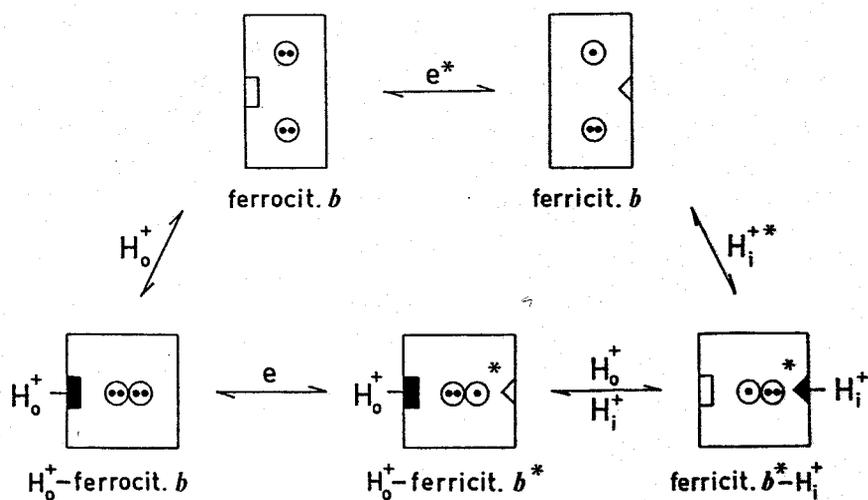


Figura 61. Esquema del mecanismo propuesto para la transducción reversible de energía redox en energía ácido-base por el citocromo b-559

Explicación detallada en el texto.

bajo potencial del citocromo b-559 acepta a bajo potencial un electrón, reduciéndose. Esta forma reducida de bajo potencial cambia isoenergéticamente su configuración electrónica después de la fijación de un protón por un grupo ionizable de alto  $pK_a$  en la parte externa de la membrana del tilacoide, transformándose en la forma reducida y protonada de alto potencial. La oxidación de esta forma a alto potencial genera la forma oxidada y protonada de alto potencial, en la que se produce un desplazamiento isoenergético de un electrón de un orbital a otro, proceso concomitante con la translocación de un protón de un grupo ionizable de alto  $pK_a$  a otro, también de alto  $pK_a$ , en la parte interna de la membrana tilacoidal. Finalmente, esta forma oxidada y protonada de alto potencial se desenergetiza transformándose en la forma original oxidada y desprotonada de bajo potencial, liberando su protón a bajo pH en el lumen tilacoidal. Este proceso va acompañado de un cambio hacia una configuración electrónica más estable, apareciendo un grupo ionizable de menor  $pK_a$  en la forma oxidada de bajo potencial resultante.

En resumen, nuestra hipótesis postula que el primer paso en la transducción de energía por el citocromo b-559 es la formación de un intermediario energizado y protonado que puede disociar su protón a bajo pH para permitir la síntesis endergónica de ATP. Este citocromo sería capaz de promover la translocación de protones, según nuestro mecanismo, por un cambio de  $pK_a$  debido a la diferente estructura electrónica de las formas oxidadas basal y energizada.

El sitio de actuación del citocromo b-559 en la cadena fotosintética de transporte de electrones sigue siendo hoy en día una de las cuestiones más discutidas en fotosíntesis. Las diversas teorías al respecto se resumen en la INTRODUCCION. La razón fundamental de esta incertidumbre es la existencia de

multitud de datos contradictorios en la literatura sobre cambios redox de este citocromo inducidos por luz en cloroplastos de plantas superiores. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la participación de este citocromo en la cadena de transporte de electrones entre los dos fotosistemas.

En cloroplastos frescos, los citocromos b-559 y f se reducen por el fotosistema II (Figura 25); en estas condiciones, con ambos citocromos reducidos, el fotosistema I oxida exclusivamente al citocromo f. Como se discutirá posteriormente, en presencia del agente desacoplante CCCP el fotosistema I también es capaz de oxidar al citocromo b-559 (Figuras 26-28), lo que parece sugerir que el sitio de actuación de este citocromo se encuentra antes o en el mismo sitio de acoplamiento.

Antes de seguir es necesario plantear la cuestión de como de selectivas son las luces de excitación empleadas. La luz del fotosistema I (720 nm de máximo de transmitancia) parece poder activar a los dos fotosistemas, aunque con muy diferente eficiencia. La reducción parcial de los citocromos b-559 y f, inducida por luz del fotosistema I aplicada inicialmente (Figura 30), sugiere que esta luz excita, aunque de forma menos eficiente, también al fotosistema II. Esta reducción por el fotosistema I de ambos citocromos se produce porque la oxidación por el fotosistema I está bloqueada en el sistema acoplado. En efecto, una vez disipado el gradiente de protones con CCCP (Figura 33), la efectividad de la luz de 720 nm para oxidar a los citocromos b-559 y f es mucho mayor que para reducirlos. La luz del fotosistema II excita también al fotosistema I, aunque con poca eficiencia (Figura 31). En resumen, ambas luces excitan a los dos fotosistemas, pero en todo momento es posible estudiar la acción de un fotosistema determinado debido a la muy diferente eficacia de la excitación de cada fotosistema con la luz del otro.

El citocromo b-559 parece encontrarse en el lado reductor del fotosistema II. En efecto, en condiciones fisiológicas (Figura 25), la única fotorreacción observada en el citocromo b-559 en cloroplastos es su reducción por el fotosistema II, lo que concuerda básicamente con los resultados obtenidos por algunos autores (Ben Hayyim y Avron, 1970; Satoh y Katoh, 1972; Knaff, 1973). En ningún caso, con o sin tratamiento, se ha podido observar fotooxidación de este citocromo por el fotosistema II. Esta reacción de oxidación ha sido observada sin embargo por varios autores en cloroplastos sometidos a diversos tratamientos, como la adición de CCCP (Heber et al., 1979), temperaturas criogénicas (Bendall y Sofrová, 1971), etc.

La utilización de dos agentes inhibidores muy específicos del flujo electrónico fotosintético en los primeros pasos de la cadena de transporte -DCMU y DBMIB- ha permitido delimitar aún más la localización del citocromo b-559 en el sitio reductor del fotosistema II. El DCMU bloquea la transferencia de electrones entre los aceptores primarios del fotosistema II,  $Q_A$  y  $Q_B$ , mientras que el DBMIB actúa como inhibidor competitivo del "pool" de plastoquinona. El bloqueo total de la fotorreducción de los citocromos b-559 y f producido por ambos inhibidores (Figura 34 y 38) permite situar el lugar de actuación de ambos citocromos tras los aceptores primarios del fotosistema II,  $Q_A$  y  $Q_B$ , y tras el "pool" de plastoquinona. En presencia de ambos inhibidores, la luz del fotosistema II induce la fotooxidación del citocromo f (Figuras 34 y 38), debido a la excitación residual del fotosistema I por esta luz.

Por otra parte, nuestros resultados apoyan la actuación del citocromo b-559 en el lado oxidante del fotosistema I. Así, en cloroplastos previamente iluminados con luz del fotosistema II, el citocromo b-559 se fotooxida por el fotosistema I, aunque solo en presencia de una pequeña

cantidad del agente protonofórico CCCP. La necesidad del CCCP para observar esta fotorreacción concuerda con los resultados de otros autores (Cramer y Butler, 1967; Böhme y Cramer, 1971; Cramer et al., 1971). Sin embargo, Ben Hayyim y Avron (1970) en cloroplastos de lechuga y Knaff (1973) en fragmentos de Nostoc muscorum han observado oxidación del citocromo por el fotosistema I en condiciones fisiológicas. El citocromo f, sin embargo, una vez reducido por el fotosistema II, se fotooxida por el fotosistema I sin necesidad de añadir CCCP a los cloroplastos (Figura 25 y 28).

Si se asume que el CCCP ejerce un efecto desacoplante en los cloroplastos, como así parecen confirmarlo los controles de la actividad fotosintética en presencia de este compuesto (Tabla VI), la necesidad de la presencia de CCCP para que se produzca oxidación del citocromo por el fotosistema I parece indicar que este citocromo se encuentra antes o en el sitio de acoplamiento. El transporte de electrones desde el citocromo b-559 hasta el fotosistema I estaría frenado por el acoplamiento entre dicho transporte y la generación del gradiente de protones. Una vez disipado este gradiente -tras la adición de CCCP-, el fotosistema I es capaz de arrancar eficientemente los electrones del citocromo a través de otros transportadores de la cadena. El citocromo f, por su parte, estaría situado después de ese sitio de acoplamiento. EL CCCP, a la concentración empleada en este tipo de ensayos, no afecta negativamente al sistema de rotura del agua (ver Tabla VI). La existencia de un sitio de acoplamiento entre los citocromos b-559 y f ha sido sugerida previamente por diversos autores (Hill y Bendall, 1960; Rumberg, 1965; Cramer y Butler, 1967; Knaff, 1973).

Este planteamiento parece confirmado por la mayor reducción del citocromo f observada al iluminar cloroplastos con luz del fotosistema II en presencia de CCCP (Figura 26). Al estar desbloqueada la transferencia de electrones en el sitio

de acoplamiento, el citocromo f puede reducirse más eficientemente. En este sentido podría interpretarse el hecho de que el CCCP pueda inducir también en oscuridad la oxidación del citocromo b-559 si el citocromo f está previamente oxidado (Figura 29). Es decir, el citocromo f oxidado es capaz de arrancar electrones del citocromo b-559, incluso sin la intervención de la luz, una vez roto el acoplamiento que obstaculiza el flujo electrónico entre ambos citocromos. Esto parece sugerir, por tanto, que la oxidación del citocromo b-559 procede a través del citocromo f.

Hay varios resultados que apoyan que el citocromo b-559 se oxida por el fotosistema I y que esta oxidación se produce a través del citocromo f y la plastocianina. La oxidación del citocromo b-559 por el fotosistema I ha sido analizada, junto a la del citocromo f, utilizando una serie de tratamientos que bloquean específicamente la reducción del fotosistema I. En este sentido, tanto el cianuro como la polilisina -descritos como bloqueantes del flujo electrónico que actúan específicamente sobre la plastocianina (Trebst, 1980)- bloquean casi completamente la oxidación de ambos citocromos por el fotosistema I (Figuras 42 y 43), lo que parece indicar que la oxidación de ambos componentes se produce a través de la plastocianina. Los controles del efecto del cianuro sobre la actividad fotosintética de cloroplastos (Tabla V) establecen claramente su sitio de acción entre ambos fotosistemas, no afectando al fotosistema II a las concentraciones empleadas.

El DCMU produce un interesante efecto sobre la oxidación del citocromo b-559 por el fotosistema I. Este agente permite que el citocromo b-559 se oxide por el fotosistema I sin que sea necesaria la presencia de CCCP (Figuras 35 y 36). Este potente herbicida bloquea probablemente el flujo residual de electrones hacia el citocromo b-559 promovido por la excitación del fotosistema II por luz del fotosistema I, favoreciendo en consecuencia la oxidación de este citocromo, aunque

con una cinética muy lenta, por permanecer el transporte electrónico retenido en el sitio de acoplamiento. El citocromo f se oxida en estas condiciones con su cinética rápida habitual, ya que su oxidación no se afecta por el acoplamiento. Cuando los cloroplastos están acoplados, el fotosistema I es incapaz de fotooxidar eficientemente al citocromo b-559, por el bloqueo que supone el sitio de acoplamiento y por la reducción residual de este citocromo producida por la excitación del fotosistema II por la luz del fotosistema I. En efecto, el CCCP acelera esta oxidación del citocromo b-559 por el fotosistema I producida en presencia de DCMU (Figura 37).

Diversos autores (Cramer y Böhme, 1972; Boardman et al., 1971) han sugerido la existencia de una ruta cíclica alrededor del fotosistema II donde estaría implicado el citocromo b-559. Sin embargo, se fundamentan en la observación de la oxidación de este citocromo inducida por el fotosistema II en condiciones no fisiológicas (temperaturas criogénicas, tratamiento con Tris, etc.). Además, la lenta velocidad detectada para esta fotorreacción parece descartar cualquier papel fisiológico de este ciclo. Nuestros resultados no parecen sugerir la participación del citocromo b-559 en un transporte cíclico alrededor del fotosistema II. Como ya hemos comentado, en ningún caso se ha observado la oxidación de este citocromo por el fotosistema II en cloroplastos. Además, parece descartarse también la posible participación del citocromo b-559 de alto potencial en el sistema de rotura del agua, en contra de las propuestas de determinados autores (Bendall y Sofrová, 1971). En este sentido, los experimentos llevados a cabo en partículas del fotosistema II con Tritón X-100 (Tabla IX y Figura 21) y CCCP (Figuras 10 y 19) muestran que no existe relación entre el desprendimiento de oxígeno y el porcentaje de citocromo b-559 de alto potencial.

Los controles del efecto del DBMIB sobre la actividad fotosintética de cloroplastos confirman su papel como

bloqueante del flujo electrónico fotosintético (Tabla III). Sin embargo, ni la actividad global ni la del fotosistema II se bloquean totalmente. En el caso del sistema global, este efecto podría achacarse a que el reactivo de Hill utilizado, ferricianuro, podría arrancar electrones de la cadena de transporte antes de la plastoquinona. Los reactivos empleados para medir la actividad del fotosistema II, DAD y ferricianuro, parecen aceptar una parte considerable de los electrones antes de la plastoquinona.

El DBMIB, además del efecto ya descrito sobre la fotorreducción, produce una inhibición considerable de la oxidación del citocromo b-559 por el fotosistema I, mientras que no afecta a la oxidación del f (Figura 39 y 40). Estos resultados sugieren la implicación de algún transportador tipo quinona en la ruta de oxidación del citocromo b-559 hacia el citocromo f. La reversión por DCMU del bloqueo de la fotooxidación del citocromo b-559 producida por el DBMIB (Figura 41) parece indicar que, aparte del efecto inhibitor del DBMIB sobre la fotooxidación del citocromo b-559, hay una reducción residual de este citocromo provocada por el fotosistema I (incluso en presencia de DBMIB), que disminuye la eficacia de este fotosistema para arrancar electrones en la parte de la cadena de transporte tras el sitio de acoplamiento.

El efecto del TMPD -efectivo transportador de electrones mediante un "bypass" desde plastoquinona a plastocianina (Trebst, 1980)-, que inhibe una parte, aunque pequeña, de la fotooxidación del citocromo b-559 por el fotosistema I, afectando en menor medida a la oxidación del f (Figura 45), sugiere una estrecha relación del citocromo b-559 con el "pool" de plastoquinona. El TMPD tomaría los electrones al nivel de la plastoquinona, cediéndolos muy eficazmente al fotosistema I vía plastocianina. En estas condiciones, el flujo normal de electrones desde el "pool" de plastoquinona hasta la plastocianina estaría bloqueado en parte, siendo por tanto

poco efectiva la oxidación del citocromo b-559 por el fotosistema I. El citocromo f, sin embargo, podría seguir oxidándose por el fotosistema I dada su cercanía a la plastocianina.

En las partículas del fotosistema II, tanto aquéllas que no desprenden oxígeno como las que lo hacen, se han observado diversos tipos de fotorreacciones del citocromo b-559 (Arnon et al., 1970; Ke et al., 1972; Boardman, 1972; Wessels et al., 1973; Huzisige y Takimoto, 1974). En este trabajo se han obtenido una serie de resultados que caracterizan en cierta medida las fotorreacciones del citocromo b-559 en preparaciones de partículas del fotosistema II con desprendimiento de oxígeno.

En estas preparaciones, en condiciones fisiológicas, el citocromo b-559 no experimenta ningún tipo de fotorreacción promovida por luz del fotosistema II (Figura 46). Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos con este mismo tipo de partículas por Ghanotakis et al. (1984). La causa de este fenómeno parece residir en que el citocromo b-559 se encuentra inicialmente muy reducido, ya que al oxidar con una pequeña cantidad de ferricianuro la luz del fotosistema II produce una reducción reversible de este citocromo. Además, este hecho se corrobora por que cuando el citocromo b-559 se oxida de forma natural (partículas envejecidas), la iluminación inicial con luz del fotosistema II sí induce una fuerte fotorreducción del citocromo (Figura 47). La pequeña cuantía de la reducción del citocromo en las partículas frescas oxidadas con ferricianuro, en relación a la observada en las partículas envejecidas, podría deberse a que el citocromo b-559 a la vez que se fotorreduce, se oxida en parte por la presencia de este potente agente oxidante, lo que disminuye la cuantía total de la reacción.

Es importante resaltar que la fotorreducción del citocromo b-559 en las preparaciones de partículas del fotosistema II previamente oxidadas con ferricianuro posee su óptimo a pH 7,5 (Figura 48A), pH prácticamente idéntico al  $pK_a$  de la forma reducida de bajo potencial (Figura 15).

Al igual que en cloroplastos, el bloqueo completo de la fotorreducción del citocromo b-559 en estas preparaciones por DCMU (Figura 50A) parece sugerir la intervención de este citocromo en la transferencia de electrones detrás de los aceptores primarios del fotosistema II,  $Q_A$  y  $Q_B$ .

Se ha investigado, además, el efecto de dos sustancias que pueden afectar al sistema de rotura del agua: CCCP, que parece acelerar la caída de los estadios intermedios del sistema de rotura del agua (agente ADRY) (Trebst, 1980), y la hidroxilamina, que a determinadas concentraciones bloquea el sistema de rotura del agua (Trebst, 1980). En las preparaciones de partículas del fotosistema II, el CCCP induce la oxidación del citocromo b-559 por el fotosistema II (Figura 49). Datos similares han sido obtenidos por Lam et al. (1983). Probablemente este efecto se debe a que en condiciones en que se daña el funcionamiento del sistema de rotura del agua (en presencia de CCCP), se están generando fuertes oxidantes en el centro de reacción del fotosistema II que oxidarían al citocromo dada su proximidad estructural a este centro de reacción. Se trata, por lo tanto, de una fotorreacción que se da en unas condiciones muy alejadas de las fisiológicas y que, en consecuencia, probablemente no posee relevancia funcional.

La fotorreducción del citocromo b-559 en estas partículas está estrechamente asociada al buen funcionamiento del sistema de rotura del agua. En condiciones en que este sistema está bloqueado, por ejemplo, con una concentración adecuada de hidroxilamina, no se produce ninguna fotorreacción del citocromo (Figura 50B).

Todos los resultados expuestos anteriormente parecen sugerir que el citocromo b-559 actúa como transportador de electrones entre los dos fotosistemas, reduciéndose por el fotosistema II y oxidándose por el I, teniendo su sitio de actuación entre el "pool" de plastoquinona y la plastocianina. El citocromo b-559 parece situarse en el sitio de acoplamiento de la cadena no-cíclica de transporte de electrones.

En resumen, los resultados de este trabajo parecen confirmar el funcionamiento del citocromo b-559 como sistema transductor de energía redox en energía ácido-base en la cadena fotosintética de transporte de electrones entre los dos fotosistemas. El citocromo b-559 oxidado aceptaría los electrones de la plastoquinona a bajo potencial, reduciéndose y captando un protón del estroma del tilacoide. Posteriormente se oxidaría a alto potencial vía citocromo f y plastocianina, liberando el protón al interior del tilacoide y volviendo, de esta manera, a su estado basal inicial (Figura 62).

En consecuencia, y según nuestra opinión, este citocromo jugaría un papel fundamental en la generación del gradiente de protones, base para la posterior síntesis de ATP en los cloroplastos.

El mecanismo que hemos propuesto para el funcionamiento de este citocromo como sistema transductor podría constituir, según nuestra hipótesis, un modelo universal que explicaría el acoplamiento entre la energía redox y ácido-base, uno de los problemas fundamentales con el que se enfrenta en la actualidad la bioenergética.

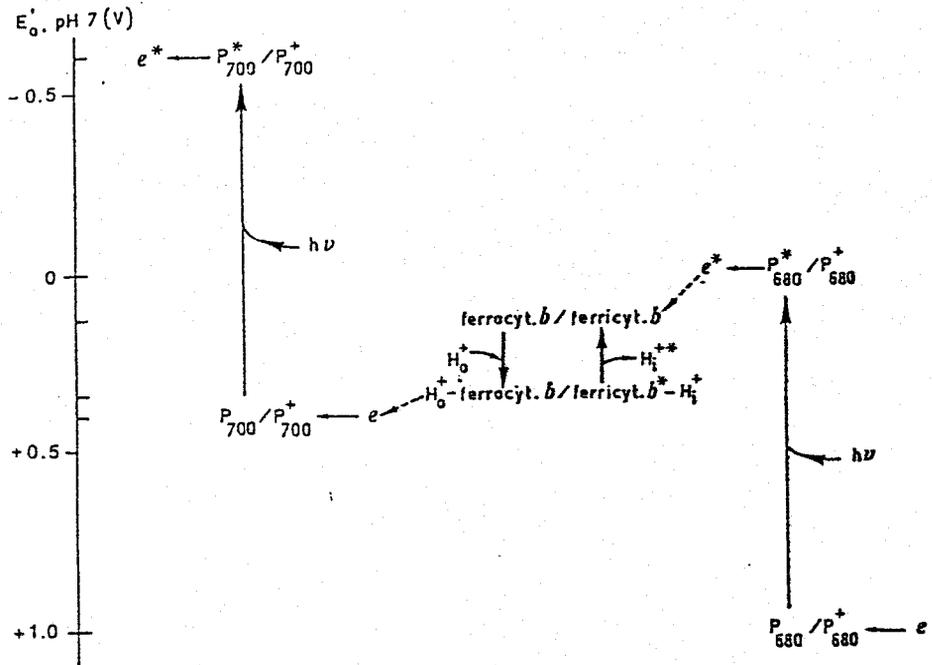


Figura 62. Representación de los sistemas de transducción de energía envueltos en el flujo fotosintético no-cíclico de electrones

## V. CONCLUSIONES

(1) En partículas del fotosistema II, el citocromo b-559 se presenta "in vivo" como dos pares interconvertibles de diferente potencial medio de óxido-reducción.

(2) El par de alto potencial es inestable y sus dos formas, oxidada y reducida, están protonadas. La forma oxidada está energizada electrónicamente, y se mantiene en dicho estado por protonación, en tanto que la forma reducida es comparativamente más estable. El par de bajo potencial es, por el contrario, estable y sus dos formas están desprotonadas.

(3) La conversión reversible entre ambos pares redox y el hecho de que el citocromo b-559 se haya purificado como una sola proteína parece sugerir que los citocromos b-559 de alto y bajo potencial son dos formas totalmente funcionales y fisiológicas de la misma especie molecular.

(4) El citocromo b-559 parece actuar como transportador de electrones entre los dos fotosistemas, localizándose su acción entre el "pool" de plastoquinona y la plastocianina, donde parece además estar implicado en el sitio de acoplamiento de la cadena fotosintética no-cíclica de transporte de electrones.

(5) En definitiva, los resultados expuestos en este trabajo parecen confirmar el funcionamiento del citocromo b-559 como sistema transductor de energía redox en energía ácido-base del tipo de forma oxidada y básica energizada. El citocromo b-559 oxidado aceptaría en su estado basal los electrones de la plastoquinona a bajo potencial, reduciéndose y captando un protón a alto pH del estroma del tilacoide. Posteriormente, se oxidaría a alto potencial, energizándose, vía citocromo f y plastocianina, liberando el protón a bajo pH en el interior del tilacoide y volviendo, de esta manera, a su estado inicial de bajo potencial. El citocromo b-559 desempeñaría, en nuestra opinión, un papel fundamental en la generación del gradiente

electroquímico de protones, que promueve, a su vez, la posterior síntesis de ATP en los cloroplastos.

## **VI. BIBLIOGRAFIA**

- ANDERSON, J.M. y BOARDMAN, N.K. (1973). Localization of the low potential cytochrome b-559 in photosystem I. FEBS Letters, 32:157-160.
- ANDERSON, J.M., THAN-NYUNT y BOARDMAN, N.K. (1973). Light-induced redox changes of cytochrome b-559. Arch. Biochem. Biophys., 155:436-444.
- APARICIO, P.J., ANDO, K. y ARNON, D.I. (1974). Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. II. Low temperature photo-oxidation of cytochrome b-559. Biochim. Biophys. Acta, 357:246-251.
- ARNON, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts: poliphenol oxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol., 24:1-15.
- ARNON, D.I. (1977). Photosynthesis 1950-1975: Changing concepts and perspectives. En: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series (A. Trebst y M. Avron, eds.), vol. 5, Springer-Verlag, Heidelberg, Berlín, pp. 7-56.
- ARNON, D.I., ALLEN, M.B. y WHATLEY, F.R. (1954). Photosynthesis by isolated chloroplasts. Nature, 174: 394.
- ARNON, D.I. Y CHAIN, R.K. (1977). Ferredoxin-catalyzed photophosphorylation: Concurrence, stoichiometry, regulation, and quantum efficiency. En: Photosynthetic Organelles, Special issue of Plant Cell. Physiol. (S. Kiyachi, S. Katoh, Y. Fuyita y K. Shibata, eds.), vol. 3, Japanese Society of Plant Physiologists, Center for Academic Publications, Japan, pp. 129-147.
- ARNON, D.I., CHAIN, R.K., McSWAIN, B.D., TSUJIMOTO, H.Y. y KNAFF, D.B. (1970). Evidence from chloroplast fragments for three photosynthetic light reactions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67:1404-1409.
- ARNON, D.I. y CRANE, F.L. (1965). Role of quinones in photosynthetic reactions. En: Biochemistry of quinones (R.A. Morton, ed.), Academic Press, Londres, pp. 433-458.
- ARNON, D.I. Y TANG, M.-S. (1988). Cytochrome b-559 and proton conductance in oxygenic photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (en prensa).
- ARNON, D.I. y TSUJIMOTO, H.Y. Y TANG, G.M.S. (1981). Proton transport in photooxidation of water: a new perspective on photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2942-2946.
- AVRON, M. (1981). Photosynthetic electron transport and photophosphorylation. En: Biochemistry of Plants (P.K. Stumpf y E.E. Conn, eds.), vol. 8, Academic Press, New York, pp. 163-191.

BABCOCK, G.T. (1987). The photosynthetic oxygen-evolving process. En: *New Comprehensive Biochemistry, Photosynthesis* (J. Ames, ed.), vol. 15, Elsevier, New York, pp. 125-158.

BABCOCK, G.T., WIDGWER, W.R. CRAMER, W.A., OERTLING, W.A. y METZ, J.G. (1985). Axial ligands of chloroplast cytochrome b-559: Identification and requirement for heme-cross-linked polypeptide structure. *Biochemistry*, 24:3638-3645.

BARBER, J. (1982). *Topics in Photosynthesis* (J. Barber, ed.), vol. 4, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

BARBER, J. (1987). Photosynthetic reaction centres: a common link. *TIBS*, 12:321-326.

BARBER, J, GOUNARIS, K. y CHAPMAN, D.J. (1987). En : *Cytochrome Systems: Molecular Biology and Bioenergetics* (S. Papa, B. Chance y L. Ernster, eds.), Plenum Press, New York, pp. 657-666.

BENDALL, D.S. (1968). Oxidation-reduction potentials of cytochromes in chloroplast from higher plants. *Biochem. J.*, 109:46.

BENDALL, D.S. (1982). Photosynthetic cytochromes of oxygenic organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 683: 119-151.

BENDALL, D.S., DAVENPORT, H.E. y HILL, R. (1971). Cytochrome components in chloroplasts of higher plants. En: *Methods in Enzymology* (A. San Pietro, ed.), vol. 23, Academic Press, New York, 327-344.

BENDALL, D.S. y HILL, R. (1956). Cytochrome components in the spadix of *Arum maculatum*. *New Phytol.*, 55:206-212.

BENDALL. D.S. y ROLFE, S.A. (1987). Characterization of chloroplast cytochromes. *Methods Enzymol.*, 148: 259-273.

BENDALL, D.S. y SOFROVA, D. (1971). Reactions at 77°K in photosystem II of green plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 234:371-380.

BEN HAYYIN, G. y AVRON, M. (1970). Cytochrome b of isolated chloroplasts. *Eur. J. Biochem.*, 14: 205-213.

BERTHOLD, D.A., BABCOCK, G.T. y YOCUM, C.F. (1981). A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Letters*, 134:231-234.

BERGSTROM, J. y VANNGARD, T. (1982). EPR signal and orientation of cytochromes in the spinach thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 68:452-456.

- BOARDMAN, N.K. (1972). Photochemical properties of a photosystem II subchloroplast fragment. *Biochim. Biophys. Acta*, 283:469-482.
- BOARDMAN, N.K., ANDERSON, J.M. y HILLER, R.G. (1971). Photooxidation of cytochromes in leaves and chloroplast at liquid-nitrogen temperature. *Biochim. Biophys. Acta*, 234:126-136.
- BÖHME, H. y CRAMER, W.A. (1971). Plastoquinone mediates electron transport between cytochrome b-559 and cytochrome f. *FEBS Letters*, 15: 349-351.
- BÖHME, H. y KUNERT, K.J. (1981). Photoreactions of cytochromes in algal chloroplasts. *Eur. J. Biochem.*, 106:329-336
- BOYER, P.D., CHANCE, B., ERNSTER, L., MITCHELL, P., RACKER, E. y SLATER, E.C. (1977). Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.*, 46:955-1026.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- BRIANTAIS, J.-M., VERNOTTE, C., MIYAO, M., MURATA, N. y PICAUD, M. (1985). Relationship between O<sub>2</sub> evolution capacity and cytochrome b-559 high potential form in photosystem II particles. *Biochim. Biophys. Acta*, 808:348-351.
- BUTLER, W.L. (1978). On the role of cytochrome b-559 in oxygen evolution in photosynthesis. *FEBS Letters*, 95:19-25.
- CHANCE, B., WILSON, D.F., DUTTON, P.L. y ERECINSKA, M. (1970). Energy coupling mechanisms in mitochondria: Kinetic, spectroscopic and thermodynamic properties of an energy transducing form of cytochrome b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 66:1175-1182.
- COX, R.P. (1979). Composition and spectral properties of a cytochrome-enriched fraction obtained from chloroplasts by digitonin treatment. *Biochem. J.*, 182:613-615.
- COX, R.P. y BENDALL, D.S. (1972). The effects on cytochrome b-559 HP and P-546 (C-550) of treatments that inhibit oxygen evolution by chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta*, 283:124-135.
- COX, R.P. y BENDALL, D.S. (1974). The function of the plastoquinone and -carotene in photosystem II of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 347:49-59.
- CRAMER, W.A. (1977). Cytochromes. En: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series* (A. Trebst y M. Avron, eds.), vol. 5, Springer-Verlag, Berlin, pp. 227-237.

CRAMER, W.A. y BOHME, H. (1972). High-potential cytochrome b-559 as a secondary quencher of chloroplast fluorescence in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. *Biochim. Biophys. Acta*, 256:358-369.

CRAMER, W.A. y BUTLER, W. (1967). Light-induced absorbance changes of two cytochromes b components in the electron-transport system of spinach chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta*, 143:332-339.

CRAMER, W.A. y CROFTS, A.R. (1982). Electron and proton transport. En: *Photosynthesis* (Govindjee, ed.), vol. 1, Academic Press, New York, 387-467.

CRAMER, W.A., FAN, H.N. y BOHME, H. (1971). High and low potential states of cytochrome b-559 and thermodynamic control of non-cyclic electron transport. *Bioenergetics*, 2:289-303.

CRAMER, W.A. y HORTON, P. (1975). Recent studies on the chloroplast cytochrome b-559. *Photochem. Photobiol.*, 22:304-308.

CRAMER, W.A., THEG, S.M. y WIDGER, W.R. (1986). On the structure and function of cytochrome b-559. *Photosyn. Res.*, 10:393-403.

CRAMER, W.A., y WHITHMARSH, J. (1977) Photosynthetic cytochromes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28:133-172.

CRAMER, W.A., WHITHMARSH, J. y HORTON, P. (1979). Cytochrome b in energy-transducing membranes. En: *The Porphyrins* (D. Dolphin, ed.), vol. 7, Academic Press, New York, pp. 71-106.

DAVENPORT, H.E. (1952). Cytochrome components in chloroplasts. *Nature*, 170:1112-1114.

DE LA ROSA, F.F., GALVAN, F. y LOSADA, M. (1981). Cytochrome b-559 as an energy-transducing redox system in noncyclic photophosphorylation. En: *Photosynthesis II. Electron transport and photophosphorylation* (G. Akoyunoglou, ed.), Balaban International Science Services, Philadelphia, pp.531-541.

DE LA ROSA, F.F., HERVAS, M. y LOSADA, M. (1983). Coupling between redox and acid-base energy by yeast mitochondrial cytochrome b-564. *International Symposium on Thermodynamics of Proteins and Biological Membranes*, resumen I-19.

DICKERSON, R.E. (1980). El citocromo c y la evolución del metabolismo energético. *Investigación y Ciencia*, 44:76-88.

DUYSENS, L.N.M. y AMESZ, J. (1962). Function and identification of two chemical systems in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 64:243-260.

EMERSON, R. y ARNOLD, W. (1932). A separation of the reactions in photosynthesis by means of intermittent light. *J. Gen. Physiol.*, 15:391-420.

ERIXON, K. y BUTLER, W.L. (1971a). The relationship between Q, C-550 and cytochrome b-559 in photoreactions at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Biochim. Biophys. Acta*, 234:381-389.

ERIXON, K. y BUTLER, W.L. (1971b). Light-induced absorbance changes in chloroplasts at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Photochem. Photobiol.*, 14:427-433.

FAN, H.N. y CRAMER, W.A. (1970). The redox potential of cytochromes b-559 and b-563 in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 216:200-207.

FORTI, G. (1987). Energy conservation in higher plants and algae. En: *New Comprehensive Biochemistry, Photosynthesis* (J. Amesz, ed.), vol. 15, Elsevier, New York, pp. 1-20

GALVAN, F. (1981). El citocromo b-559 como sistema redox transductor de energía en la fotofosforilación no-cíclica. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

GALVAN, F., DE LA ROSA, F.F., HERVAS, M. y LOSADA, M. (1983). pH-dependent interconversion between the two redox forms of chloroplast cytochrome b-559. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 10:413-425.

GAREWAL, H.S., SINGH, S. y WASSERMAN, A.R. (1971). Purification of chloroplast cytochrome b-559. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44:1300-1305.

GAREWAL, H.S. y WASSERMAN, A.R. (1974a). Triton X-100-4 M urea as an extraction medium for membrane proteins. I. Purification of chloroplast cytochrome b-559. *Biochemistry*, 13:4063-4071.

GAREWAL, H.S. Y WASSERMAN, A.R. (1974b). Triton X-100-4 M urea as an extraction medium for membrane proteins. II. Molecular properties of pure cytochrome b-559: a lipoprotein containing small polypeptide chains and a limited lipid composition. *Biochemistry*, 13:4073-4079.

GHANOTAKIS, D.F., BABCOCK, G.T. y YOCUM, C.F. (1984). Structural and catalytic properties of the oxygen-evolving complex. Correlation of polypeptide and manganese release with the behavior of  $Z^+$  in chloroplasts and a highly resolved preparation of the PS II complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 765:388-398.

GHANOTAKIS, D.F., YOCUM, C.F. y BABCOCK, G.T. (1986). ESR spectroscopy demonstrates that cytochrome b-559 remains low potential in  $\text{Ca}^{2+}$ -reactivated salt-washed PS II particles. *Photosyn. Res.*, 9:125-134.

GOOD, N.E. (1977). Uncoupling of electron transport from phosphorylation in chloroplasts. En: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series* (A. Trebst y M. Avron, eds.), vol. 5, Springer-Verlag, Berlín, pp. 422-436.

GUERRIERI, F. y NELSON, B.D. (1975). Studies on the characteristics of a proton pump in phospholipid vesicles inlayed with purified complex III from beef heart mitochondria. *FEBS Letters*, 54:339-342.

HAUSKA, G., HURT, E., GABELLINI, N. y LOCKAU, W. (1983). Comparative aspects of quinol-cytochrome c/plastocyanin oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta*, 726:97-133.

HEBER, U., KIRK, M.R. y BOARDMAN, N.K. (1979). Photoreactions of cytochrome b-559 and cyclic electron flow in photosystem II of intact chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 546:292-306.

HERVAS, M. (1984). Los citocromos b-564 de mitocondrias y b-559 de cloroplastos como sistemas transductores de energía redox en ácido-base en la respiración y en la fotosíntesis. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

HERVAS, M., DE LA ROSA, F.F., DE LA ROSA, M.A. y LOSADA, M. (1984). Coupling between redox and acid-base energy by cytochrome b-554 in Baker's yeast mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124:807-814.

HERVAS, M., ORTEGA, J.M., DE LA ROSA, M.A., DE LA ROSA, F.F. y LOSADA, M. (1985). Location and function of cytochrome b-559 in the chloroplast noncyclic electron transport chain. *Physiol. Vég.*, 23:593-604.

HERVAS, M., ORTEGA, J.M., DE LA ROSA, F.F. y LOSADA, M. (1988). Restoration of high-potential cytochrome b-564 by integration of baker's yeast complex III into liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 152:981-986.

HILDRETH, W.W. (1968). Laser-activated electron transport in a *Clamydomonas* mutant. *Plant Physiol.*, 43:303-312.

HILL, R. (1954). The cytochrome b components of chloroplasts. *Nature*, 174:501-503.

HILL, R. y BENDALL, D.S. (1960). Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis. *Nature*, 186:136-137.

HILL, R. y SCARISBRICK, R. (1951). The haematin compounds of leaves. *New Phytol.*, 50:90-111.

HIND, G. y NAKATANI, H.Y. (1970). Determination of the concentration and the redox potential of chloroplast cytochrome b-559. *Biochim. Biophys. Acta*, 216:223-225.

HORTON, P. y CRAMER, W.A. (1975a). Light-induced turnover of chloroplast cytochrome b-559 in the presence of N-methylphenazonium methosulfate. *Biochim. Biophys. Acta*, 396:310-319.

HORTON, P. y CRAMER, W.A. (1975b). Acid-base induced redox changes of the chloroplast cytochrome b-559. *FEBS Letters*, 56:244-247.

HORTON, P. y CROZE, E. (1977). The relationship between the activity of chloroplast photosystem II and the midpoint oxidation-reduction potential of cytochrome b-559. *Biochim. Biophys. Acta*, 462:86-101.

HORTON, P., WHITMARSH, J. y CRAMER, W.A. (1976). On the specific site of action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea in chloroplasts: Inhibition of a dark acid-induced decrease in midpoint potential of cytochrome b-559. *Arch. Biochem. Biophys.*, 176:519-524.

HUZISIGE, H. y TAKIMOTO, N. (1974). Analysis of photosystem II using particles II preparation. III. Roles of cytochrome b-559 with different redox potentials and plastocyanin in the photosynthetic electron transport system. *Plant & Cell Physiol.*, 15:1099-1113.

IKEGAMI, I. KATOH, S. y TAKAMIYA, A. (1968). Nature of heme moiety and oxidation-reduction potential of cytochrome b-558 in Euglena chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 162:604-606.

IZAWA, S. (1977). Inhibitors of Electron Transport. En: *Encyclopedia of Plant Physiology, New series, Photosynthesis I* (A. Trebst y M. Avron), vol. 5, Springer-Verlag, Berlin, pp. 266-282.

KE, B., VERNON, L.P. y CHANEY, T.H. (1972). Photoreduction of cytochrome b-559 in photosystem II subchloroplast particles. *Biochim. Biophys. Acta*, 256:223-225.

KEILIN, D. (1925). On cytochrome, a respiratory pigment common to animals, yeasts and higher plants. *Proc. Royal. Soc. (Londres)*, Serie B, 98:312-339.

KNAFF, D.B. (1973). Ligth-induced oxidation-reduction reactions in a cell-free preparation from the blue-green alga Nostoc muscorum. *Biochim. Biophys. Acta*, 325:284-296.

KNAFF, D.B. (1975). The effect of pH on the midpoint oxidation-reduction potentials of components associated with plant photosystem II. *FEBS Letters*, 60:331-335.

KNAFF, D.B. y ARNON, D.I. (1969a). Ligth-induced oxidation of a chloroplast b-type cytochrome at  $-189^{\circ}\text{C}$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63:956-962.

- KNAFF, D.B. y ARNON, D.I. (1969b). A concept of three light reactions in photosynthesis by green plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64:715-722.
- KNAFF, D.B. y ARNON, D.I. (1969c). Spectral evidence for a new photoreaction component of the oxygen-evolving system in photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63:963-969.
- KNAFF, D.B. y ARNON, D.I. (1971). On two photoreactions in system II of plant photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta, 226:400-408.
- KNAFF, D.B. y MALKIN, R. (1973). The oxidation-reduction potentials of electron carriers in chloroplast photosystem I fragments. Arch. Biochem. Biophys., 159:555-562.
- KOENING, F. y MOLLER, B.L. (1982). Isolation and characterization of cytochrome b-559 from chloroplasts and etioplasts of barley. Carlsberg Res. Commun., 47:245-262.
- KUWABARA, T. y MURATA, N. (1982). Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polypeptides in the photosystem II particles of spinach chloroplast. Plant & Cell Physiol., 23:533-539.
- LACH, H.J. y BOGER, P. (1975a). Solubilization of high potential cytochrome b-559 from spinach chloroplasts. Z. Naturforsch., 30c:628-633.
- LACH, H.J. y BOGER, P. (1975b). Isolation and some molecular properties of plastidic algal cytochrome b-559. Z. Naturforsch., 32c:75-77.
- LAM, E., BALTIMORE, B., ORTIZ, W., CHOLLAR, S., MELIS, A. y MALKIN, R. (1983). Characterization of a resolved oxygen evolving photosystem II preparation from spinach thylakoids. Biochim. Biophys. Acta, 724:201-211.
- LARKUM, A.W.D. y BONNER, W.D. (1972). Light-induced absorbance changes of cytochromes and other pigments in pea chloroplast fragments. Arch. Biochem. Biophys., 153:249-257.
- LEMBERG, R. y BARRET, J. (1973). Cytochromes. Academic Press, Londres.
- LEUNG, K.H. y HINKLE, P.C. (1975). Reconstitution of ion transport and respiratory control in vesicles formed from reduced CoQ-cytochrome c reductase and phospholipids. J. Biol. Chem., 250:8467-8471.
- LEVINE, R.P. y GORMAN, D.S. (1966). Photosynthetic electron transport chain of Chlamydomonas reinhardtii. III. Light-induced absorbance changes in chloroplast fragments of the wild type and mutant strains. Plant. Physiol., 41:1293-1300.

LOPEZ-BAREA, J., GOMEZ MORENO, C., RIVAS, J. y LOSADA, M. (1974). pHmetría. Universidad de Sevilla.

LOSADA, M. (1978). Energy-transducing redox systems and the mechanism of oxidative phosphorylation. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 5:296-310.

LOSADA, M. (1979a). Photoproduction of ammonia and hydrogen peroxide. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 6:205-225.

LOSADA, M. (1979b). Reflexiones en torno a la transducción biológica de la energía. Discurso de ingreso en la Real Academia de Medicina. Sevilla.

LOSADA, M. (1982). Sistemas bioquímicos de transducción de energía. X Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica, Santander, resumen S-3.

LOSADA, M. (1986). Un concepto unificado de transducción de energía por los sistemas bioquímicos. *Arch. Biol. Med. Exp.*, 19:29-56.

LOSADA, M. HERVAS, M. De la ROSA, M.A. y De la ROSA, F.F. (1983). Energy transduction by bioelectrochemical systems. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11:193-230.

LOSADA, M., HERVAS, M. y ORTEGA, J.M. (1987). Photosynthetic assimilation of the primordial bioelements. En: *Inorganic Nitrogen Metabolism* (W.R. Ullrich, P.J. Aparicio, P.J. Syrett y F. Castillo, eds.), Springer, Berlín, pp. 3-15.

LOSADA, M., HERVAS, M. y ORTEGA, J.M. (1988). Cytochrome *b*-559 as a transducer of redox energy into acid-base energy in photosynthesis. En: *Photocatalytic Production of Energy-rich Compounds* (G. Grassi y D.O. Hall, eds.), Elsevier Applied Science, Londres. pp. 169-179.

LOSADA, M., WHATLEY, F.R. y ARNON, D.I. (1961). Separation of two light reactions in non-cyclic photophosphorylation of green plants. *Nature*, 190:606-610.

LUNDEGARDH, H. (1961). Response of chloroplast cytochromes to light and substrates. *Nature*, 192:243-248.

LUNDEGARDH, H. (1962). Quantitative relations between chlorophyll and cytochromes in chloroplasts. *Physiol. Plant.*, 15:390-398.

LUNDEGARDH, H. (1965). The influence of diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) on the respiratory and photosynthetic systems of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 53:703-710.

- MALKIN, R. (1982). Redox properties and functional aspects of electron carriers in chloroplast photosynthesis. En: Topics in Photosynthesis (J. Barber, ed.), vol. 4, Elsevier Biomedical, Press, Amsterdam, pp. 1-47.
- MALKIN, R. y BEARDEN, A.J. (1978). Membrane-bound iron-sulfur centers in photosynthetic systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 505:147-181.
- MAROC, J. y GARNIER, J. (1981). Gel electrophoresis of chloroplast membranes of mutants of Chlamydomonas reinhardtii which have impaired photosystem II function and lack photosynthetic cytochromes. *Biochim. Biophys. Acta*, 637:473-480.
- MATHIS, P. y RUTHERFORD, A.W. (1987). The primary reactions of photosystem I and II of algae and higher plants. En: New Comprehensive Biochemistry, Photosynthesis (J. Amesz, ed.), vol. 15, Elsevier, New York, pp. 63-96.
- MATHIS, P., SAUER, K. y REMY, R. (1978). Rapidly reversible flash-induced electron transfer in P-700 chlorophyll-protein complex isolated with SDS. *FEBS Letters*, 88:275-278.
- MATSUDA, H. y BUTLER, W.L. (1983a). Restoration of high-potential cytochrome b-559 in photosystem II particles in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 725:320-324.
- MATSUDA, H. y BUTLER, W.L. (1983b). Restoration of high-potential cytochrome b-559 in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 742:123-127.
- METZ, J.G. ULMER, G., BRICKER, T.M. y MILES, D. (1983). Purification of cytochrome b-559 from oxygen-evolving photosystem II preparations of spinach and maize. *Biochim. Biophys. Acta*, 725:203-209.
- NANBA, O. y SATOH, K. (1987). Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:109-112.
- OKAYAMA, S. y BUTLER, W.L. (1972). Extraction and reconstitution of photosystem II. *Plant Physiol.*, 49:769-774.
- O'MALLEY, P.J. y BABCOCK, G.T. (1984). Electron nuclear double resonance evidence supporting a monomeric nature for P-700 in spinach chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1098-1101.
- PAPA, S. (1982a). Molecular mechanism of proton translocation by the cytochrome systems and ATPase of mitochondria. Role of proteins. *J. Bioenerg. Biomemb.*, 14:69-86.

PAPA, S. (1982b). Mechanism to active proton translocation by cytochrome systems. En: Membranes and Transport (N. Martosoni, ed.), vol. 1, Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 363.

PETERS, F., VAN WIELINK, J.E., SANG, H.W.W.F., DE VRIES, S. y KRAAYENHOF, R. (1983). Studies on well coupled photosystem I-enriched subchloroplast vesicles: content and redox properties of electron transfer components. *Biochim. Biophys. Acta*, 722:460-470.

PHILIPSON, K.D. y SAUER, K. (1972). Exciton interaction in the photosystem I reaction center from spinach chloroplasts. Absorption and circular dichroism spectra. *Biochemistry*, 11:4591-4595.

RAO, L.V.M., USHARANI, P., BUTLER, W.L. y TOKUYASU, K.T. (1986). Location of cytochrome b-559 in the chloroplast thylakoid membranes in spinach. *Plant Physiol.*, 80:138-141.

RELIMPIO, A.M., VEGA, J.M., GUERRERO, M.G. y LOSADA, M. (1977). *Potenciometría y Bioenergética*. Universidad de Sevilla.

RICH, P.R. y BENDALL, D.S. (1980). The redox potential of the b-type cytochromes of higher plant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 591:153-161.

RICH, P.R., HEATHCOTE, P., EVANS, M.C.W. y BENDALL, D.S. (1980) An EPR analysis of the partially purified cytochrome bf complex of higher plant chloroplasts. *FEBS Letters*, 116:51-56.

RUMBERG, B. (1965). Evidence for the participation of cytochrome b in the electron transport system of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 102:354-360.

RUTHERFORD, A.W. (1985). Orientation of EPR signals arising from components in photosystem II membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 807:189-201.

SATOH, K. (1988). Reality of chlorophyll protein. Identification of the side of primary photochemistry in oxygenic photosynthesis. *Physiol. Plant.*, 72:209-212.

SATOH, K. y KATOH, S. (1972). Studies on cytochromes in photosynthetic electron transport system I. Photoreduction and photooxidation of cytochrome b-559 by photosystem II in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 13:807-820.

SAUER, K., MATHIS, P. y ACKER, S. (1978). Electron acceptors associated with P-770 in Triton solubilized photosystem I particles from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 503:120-134.

SCHAGGER, H. y VON JAGOW, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.

SIEGEL, L.M. y MONTY, K.J. (1966). Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductase. *Biochim. Biophys. Acta*, 112:346-362.

SING, J. y WASSERMAN, A.R. (1971). The use of disc electrophoresis with non ionic detergent in the purification of cytochrome f from spinach grana membranes. *J. Biol. Chem.*, 246:3532-3541.

THOMPSON, L.K. y BRUDVIG, G.W. (1988). Cytochrome b-559 may function to protect photosystem II from photoinhibition. *Biochemistry*, 27:6653-6658.

TREBST, A. (1972). Measurement of Hill reactions and photoreduction. En: *Methods in Enzymology* (A. San Pietro, ed.), vol. 24, Academic Press, New York, 146-164.

TREBST, A. (1980). Inhibitors in electron flow: Tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites. *Methods Enzymol.*, 69:675-715.

TSUJIMOTO, H.Y., ARNON, D.I. (1985). Differential inhibition by plastoquinone analogues of photoreduction of cytochrome b-559 in chloroplasts. *FEBS Letters*, 179:51-54.

VAN GORKOM, H.J. (1985). Electron transfer in Photosystem II. *Photos. Res.*, 6:97-112.

WASSERMAN, A.R. (1980). Chloroplast cytochromes f, b-559 and b<sub>6</sub>. *Methods Enzymol.*, 69:181-202.

WADA, K. y ARNON, D.I. (1971). Three forms of cytochrome b-559 and their relation to the photosynthetic activity of chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:3064-3068.

WEBER, K. y OSBORN, M. (1975). Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. En: *The Proteins* (Neurath, Hill, Boerder, eds.), vol. 1, Academic Press, New York, pp. 179-221.

WESSELS, J.S.C., VAN ALPHEN-VAN WAVEREN, O. y VOORN, G. (1973). Isolation and properties of particles containing the reaction-center complex of photosystem II from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 292:741-752.

WHITMARSH, J. y CRAMER, W.A. (1977). Kinetic of the photoreduction of cytochrome b-559 by photosystem II in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 460:280-289.

- WHITMARSH, J. y CRAMER, W.A. (1978). A pathway for the reduction of cytochrome b-559 by photosystem II in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 501:83-93.
- WIDGER, W.R., CRAMER, W.A., HERMODSON, M., MEYER, D. y GULLIFOR, M. (1984). Purification and partial amino acid sequence of the chloroplast cytochrome b-559. *J. Biol. Chem.*, 259:3870-3876.
- WIKSTROM, M.K.F., KRABS, K. y SARASTE, M. (1981). Proton-translocating cytochrome complexes. *Ann. Rev. Biochem.*, 50:623-655.
- WILLIAMS, R.J.P. (1978a). The multifarious couplings of energy transduction. *Biochim. Biophys. Acta*, 505:1-44.
- WILLIAMS, R.J.P. (1978b). The history and the hypotheses concerning ATP formation by energised protons. *FEBS Letters*, 85:9-19.
- WILSON, G.S. (1978). Determination of oxidation-reduction potentials. En: *Methods in Enzymology* (S. Fleischer y L. Packer, eds.), vol. 54, Academic Press, New York, pp. 396-341.
- WILSON, D.F. y DUTTON, P.L. (1970). Energy dependent changes in the oxidation-reduction potential of cytochrome b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39:59-64.
- WILSON, D.F., ERECINSKA, M. y NICHOLLS, P. (1972). An energy-dependent transformation of a ferricytochrome of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Letters*, 20:61-65.
- WOOD, P.M. y BENDALL, D.S. (1976). The reduction of plastocyanin by plastoquinol-1 in the presence of chloroplasts: A dark electron transfer reaction involving components between the two photosystems. *Eur. J. Biochem.*, 61:337-344.
- YAMADA, Y., TANG, X.S., ITOH, S. y SATOH, K. (1987). Purification and properties of an oxygen-evolving photosystem II reaction-center complex from spinach. *Biochim. Biophys. Acta*, 891:129-137.
- ZIELINSKY, R.E. y PRICE, C.A. (1980). Synthesis of thylakoid membrane proteins by chloroplast isolated from spinach: Cytochrome b-559 and P700-chlorophyll a-protein. *J. Cell Biol.*, 85:435-445.
- ZIELINSKY, R.E. y PRICE, C.A. (1982). Preparation of cytochrome b-559 from spinach. En: *Methods in Chloroplast Molecular Biology* (M.E. Edelman, N-H. Chua, eds.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 933-944.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. José María Ortega Rodríguez  
titulada "Caracterización del estereocromo B-559 del eloroplasto de espinaca. Localización y función en la cadena fotosintética de transporte de electrones."

acordó otorgarle la calificación de APTO "Cum Laude"  
POR UNANIMIDAD

Sevilla, 29 de Noviembre 1988

El Vocál,

El Vocál,

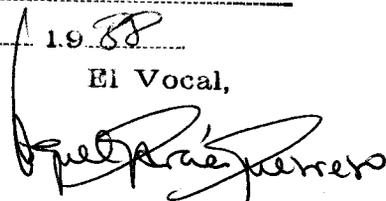
El Vocál,



El Presidente



El Secretario,



El Doctorado,



500584633

FBI E TD-169

584633